



**ESTUDIO PROTEÓMICO Y DE RESISTENCIA A
ARSÉNICO Y MERCURIO EN LA BACTERIA
CIANOTROFA *Pseudomonas
pseudoalcaligenes* CECT5344**

RODRÍGUEZ CABALLERO, Gema



TUTOR/DIRECTOR: Conrado Moreno Vivión

DIRECTOR: Víctor M. Luque Almagro

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA

Máster en
Biotecnología
Molecular, Celular y
Genética

**Estudio proteómico y de resistencia a
arsénico y mercurio en la bacteria
cianotrofa *Pseudomonas
pseudoalcaligenes* CECT5344**

AUTOR:

FDO.: G. RODRÍGUEZ CABALLERO

TUTOR / DIRECTOR:

DIRECTOR:

FDO.: C. MORENO VIVIÁN
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular

FDO.: V.M. LUQUE ALMAGRO
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular

Córdoba, 7 de Octubre de 2013

Víctor M. Luque Almagro (Universidad de Córdoba), director del trabajo y **Conrado Moreno Vivián** (Universidad de Córdoba), tutor/director del trabajo titulado: *“Estudio proteómico y de resistencia a arsénico y mercurio en la bacteria cianotrofa Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344”*, realizado por **Gema Rodríguez Caballero**, proponen como revisores de dicho trabajo a los Doctores:

1. Manuel José Rodríguez Ortega.
2. Aurora Galván Cejudo.

Fdo.: **V. M. Luque Almagro**

Fdo.: **C. Moreno Vivián**

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo no hubiera sido posible sin la dirección de los Doctores Conrado Moreno Vivián y Victor M. Luque Almagro. A ellos y a todos los componentes del grupo de investigación deseo expresar mi gratitud por la paciencia y dedicación que conmigo demostraron desde el primer momento.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1.- EL CIANURO, UN COMPUESTO TÓXICO PERO ESENCIAL EN EL MUNDO MODERNO	2
2.- <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344, UNA BACTERIA CIANOTROFA.....	2
3.- METALES Y METALOIDES PRESENTES EN RESIDUOS CIANURADOS	3
3.1.- Arsénico.....	4
3.1.1- Toxicidad del arsénico	4
3.1.2.- Transformación microbiana del arsénico: resistencia y destoxificación	4
3.2.- Mercurio.....	5
3.2.1.- Toxicidad del mercurio.....	5
3.2.2.- Transformación microbiana del mercurio y resistencia.....	6
OBJETIVOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
1.- MATERIAL BIOLÓGICO	9
2.- MEDIOS DE CULTIVO	9
2.1- Medios Líquidos	9
2.2- Medios sólidos	10
3.- RESISTENCIA A ARSÉNICO Y MERCURIO	10
4.- ANÁLISIS PROTEÓMICO.....	10
4.1 - Condiciones de cultivo	10
4.2 - Preparación de la muestra	11
4.3 - Isoelectroenfoque	12
4.4- Equilibrado	12
4.5- Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	12
4.6- Tinción y escaneado de los geles	12
4.7- Picado e identificación de spots.....	13
5.- MÉTODOS ANALÍTICOS	13
5.1- Medida del crecimiento celular	13
5.2- Determinación de la concentración de proteína	13
RESULTADOS	14
1.- RESISTENCIA DE <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 A ARSÉNICO Y MERCURIO.....	14

2.- EFECTO DEL ARSÉNICO Y EL MERCURIO EN EL PROTEOMA DE <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344	19
3.- ANÁLISIS PROTEÓMICO DE <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 EN RESPUESTA A CIANURO Y AL RESIDUO CIANURADO DE LA JOYERÍA.....	24
DISCUSIÓN.....	27
1.- RESISTENCIA DE <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 A ARSÉNICO Y MERCURIO.....	27
2.- EFECTO DEL ARSÉNICO Y MERCURIO EN EL PROTEOMA DE <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344	28
3.- ANÁLISIS PROTEÓMICO DE <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 EN RESPUESTA A CIANURO Y AL RESIDUO CIANURADO DE LA JOYERÍA.....	31
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34

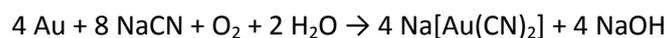
RESUMEN

La minería, la joyería y otras actividades industriales generan residuos cianurados que además contienen otros metaloides y metales como el arsénico y el mercurio. La toxicidad del cianuro reside en su elevada afinidad por metales de tal forma que es capaz de inhibir un gran número de metaloenzimas esenciales para la vida. El arsénico es un potente carcinógeno cuyas formas más abundantes en la naturaleza son el arsenito y el arseniato. La toxicidad del arsenito es debida a su capacidad de unirse covalente a los grupos sulfhidrilo y ditioles de las proteínas mientras que para el arseniato, su analogía molecular con los grupos fosfato provoca la inhibición de la fosforilación oxidativa entre otros procesos. El mercurio puede formar compuestos organomercuriales altamente tóxicos pero también puede actuar como inhibidor de enzimas cuando se encuentra en forma inorgánica. En respuesta a la elevada toxicidad de estas sustancias, los microorganismos han desarrollado una serie de mecanismos de resistencia. Para el arsénico, el sistema más extendido en bacterias es el operón *Ars*, que codifica la enzima arseniato reductasa (*ArsC*) y un transportador de membrana cuya función es expulsar el arsenito al exterior (*ArsAB*). En cuanto a la maquinaria de resistencia al mercurio, está codificada por el operón *mer* el cual va dirigido tanto a sales inorgánicas como a compuestos organomercuriales. Entre sus elementos destacan la flavoproteína *MerA*, que es una mercurio reductasa, y la enzima *MerB*, encargada de romper los puentes carbono-Hg para liberar el mercurio inorgánico. Debido a su carácter nocivo y al grave impacto ambiental que suponen estas sustancias, se hace indispensable el desarrollo de tecnologías eficientes capaces de contribuir a la descontaminación de los residuos que las contienen. Como solución a este problema surge la utilización de microorganismos tales como la bacteria cianotrofa *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 que, siendo resistente a dichos compuestos, es capaz de llevar a cabo la biodegradación de cianuro cuando se encuentra en presencia de otras sustancias. En este trabajo se ha llevado a cabo una primera aproximación, fundamentalmente mediante técnicas de proteómica, a la resistencia de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 a arsénico, mercurio y a los metales contenidos en el residuo cianurado de la joyería. El estudio de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio sólido rico (LB) y en los medios líquidos mínimo (M9) y rico (LB) reveló unos valores de resistencia altos para arsenito, muy altos para arseniato y bajos para mercurio. En cuanto al estudio proteómico de la respuesta a arsénico y mercurio, se obtuvieron datos que indican la puesta en marcha de mecanismos contra el estrés general y el estrés oxidativo producidos por dichos compuestos. Se detectó la presencia del operón *ars* en los cultivos de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 expuestos a arsenito, pero no en aquellos a los que se adicionó arseniato. Tampoco se encontraron proteínas pertenecientes al sistema *Mer* en las muestras tratadas con mercurio. Por otro lado, el estudio proteómico de la respuesta de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 a los metales presentes en el residuo joyero no reveló la inducción de una respuesta específica de resistencia a dichas sustancias a pesar de que si se pudieron observar otros mecanismos de resistencia a estrés.

INTRODUCCIÓN

1.- EL CIANURO, UN COMPUESTO TÓXICO PERO ESENCIAL EN EL MUNDO MODERNO

Las propiedades químicas del cianuro le confieren una elevada afinidad por los metales. Esta capacidad de unir metales es en última instancia la responsable tanto de su toxicidad como de su extensa utilización en diversas actividades industriales. Respecto a su toxicidad, el cianuro inhibe un gran número de metaloenzimas, entre las que se encuentran algunas enzimas esenciales para la vida, como la citocromo c oxidasa de la cadena de transporte electrónico. Por otro lado, el cianuro es utilizado frecuentemente en diversas actividades industriales como minería, joyería, cementación de aceros, galvanoplastia, producción de nylon, acrílicos, goma sintética, etc. En el caso de la minería, el cianuro se utiliza para extraer el oro del mineral durante un proceso denominado cianuración, una técnica en la que el oro insoluble en agua es convertido en aniones metálicos complejos de oro-cianuro solubles en agua. La reacción química de la cianuración se denomina ecuación de Elsner:



Siendo un compuesto altamente tóxico, su uso extendido en la industria implica la generación de un número considerable de residuos que contienen cianuro, lo cual supone un alto riesgo para la salud y un grave impacto medioambiental. Por tanto, un correcto tratamiento para reducir dicha toxicidad se hace indispensable. Como alternativa a los métodos físico-químicos de descontaminación, que implican a su vez la producción de nuevos residuos tóxicos, surge la necesidad de encontrar procesos más eficaces y limpios para el medio ambiente, tales como la utilización de microorganismos capaces de biodegradar estos contaminantes.

2.- *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, UNA BACTERIA CIANOTROFA

Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344 es una bacteria Gram-negativa aislada de los lodos del Río Guadalquivir a su paso por Córdoba. Crece a un pH óptimo de 9,5 y posee la capacidad de utilizar como fuente de nitrógeno, tanto cianuro libre como complejos cianuro-metal (Luque-Almagro et al., 2005). Debido a que es un organismo alcalófilo, constituye un candidato ideal para la biorremediación de efluentes industriales contaminados con cianuro, ya que es capaz de eliminarlo sin que se produzca la evaporación de HCN propia de soluciones con pH inferior a 9,2 (Luque-Almagro et al., 2005). En este microorganismo se ha estudiado de forma extensa el efecto del cianuro sobre su metabolismo (Luque-Almagro et al., 2011), identificándose diversas proteínas inducidas por cianuro (Luque-Almagro et al., 2008), caracterizando la ruta de asimilación de cianuro (Estepa et al., 2012) y en última instancia, secuenciando su genoma para poder así identificar los genes involucrados en el metabolismo del cianuro (Luque-Almagro et al., 2013)

3.- METALES Y METALOIDES PRESENTES EN RESIDUOS CIANURADOS

Como se ha comentado en el apartado anterior, la minería es una de las principales actividades industriales en las que se utiliza cianuro, siendo por lo tanto una importante fuente de residuos cianurados. Si bien el cianuro es el principal compuesto presente en estos residuos, su composición química va a variar dependiendo del mineral aurífero y del proceso de extracción de oro empleado. Uno de los minerales asociados al oro es la arsenopirita (FeAsS). Existe un gran número de minas de oro asociado a la arsenopirita, como ocurre en Ghana y en el oeste de Estados Unidos, generándose en todas ellas un residuo cianurado con altas concentraciones de arsénico y otros metales como hierro, zinc, plomo y cobre (Straskraba et al., 1990; Acheampong et al., 2013). Respecto al proceso de extracción de oro, en la minería a gran escala la cianuración es el método más extendido. En algunos países el cierre de las grandes minas ha dado paso a la minería artesanal a pequeña escala. Además de la cianuración, en este tipo de minería se utiliza, tanto por su sencillez como por su bajo coste, un proceso de extracción de oro denominado amalgamación. En este proceso el mercurio se usa para separar y extraer el oro del mineral en el que se encuentra. El mercurio se adhiere al oro, formando una amalgama que facilita su separación de la roca, arena u otro material. Se estima que hay por lo menos 10-15 millones de personas en 70 países que trabajan en este tipo de minería (Fig. 1). Además, se cree que la minería de oro artesanal produce aproximadamente el 15% del oro mundial, por lo que su importancia es considerable (www.mercurywatch.org).

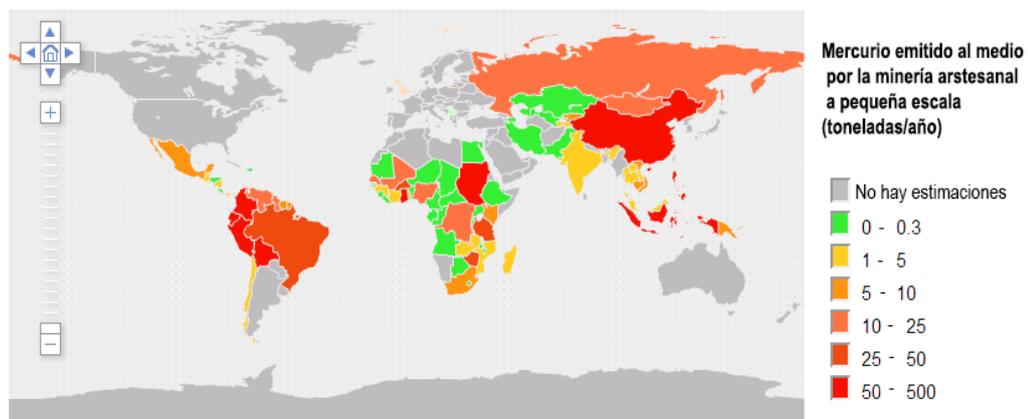


Fig. 1: Distribución de minas que producen residuos con mercurio.

La presencia de estos metaloides tóxicos (arsénico y mercurio) en los residuos cianurados supone una dificultad añadida a la hora de aplicar un tratamiento biológico en la descontaminación de cianuro, por lo que se hace necesario encontrar microorganismos capaces de superar estas condiciones para obtener resultados eficaces (Velasquez-Lopez et al., 2010; Guimaraes et al., 2011; Velásquez-López et al., 2011)

3.1.- Arsénico

El arsénico (As) es un metaloide ampliamente distribuido en ambientes terrestres y acuáticos que se puede encontrar con diferentes estados de oxidación (+V, arseniato; +III, arsenito; 0, arsénico elemental; y -III, arseniuro). Además, presenta formas inorgánicas y orgánicas, las cuales pueden estar metiladas o no. En la naturaleza las formas más frecuentes de arsénico son el arseniato (AsO_4^{-3}) y el arsenito (AsO_2^-).

3.1.1- Toxicidad del arsénico

El arsénico fue uno de los primeros carcinógenos reconocidos por la International Agency of Research on Cancer (IARC, 1987) y la US Environmental Protection Agency (EPA, 1988). Incrementa el riesgo de desarrollar cáncer especialmente en vejiga, pulmones, piel, hígado, fosas nasales, riñón y próstata, por lo que el valor límite para la concentración de arsénico en agua potable, establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), es de 10 $\mu\text{g/L}$. De las formas más abundantes en la naturaleza, el arsenito es más tóxico que el arseniato. La toxicidad del arsenito es debida a su capacidad de unirse covalentemente a los grupos sulfhidrilo y ditiolos de las proteínas, impidiendo así el correcto funcionamiento de estas proteínas. Además, el arsenito interacciona con el receptor de glucocorticoides. En cuanto al arseniato, su toxicidad se basa en su analogía molecular con el fosfato, lo que provoca fundamentalmente la inhibición de la fosforilación oxidativa, un proceso esencial en la generación de energía en los seres vivos. En el caso hipotético de producirse la incorporación del arseniato al ADN, el resultado derivaría en una molécula de alta inestabilidad (Huertas y Michán, 2012).

3.1.2.- Transformación microbiana del arsénico: resistencia y destoxificación

El ciclo biogeoquímico del arsénico depende en gran medida de las transformaciones microbianas, afectando a la especiación y la movilidad del arsénico en la naturaleza. Se ha descrito que el metabolismo del arsénico incluye reacciones de reducción, oxidación, excreción, inmovilización y metilación/desmetilación.

Si bien estas reacciones están encaminadas a la resistencia/destoxificación de arsénico, la reducción desasimiladora del arseniato y la oxidación del arsenito son procesos generadores de energía, lo que les confiere una especial relevancia. La inmovilización en biofilms y la metilación del arsénico reducen su toxicidad, aunque el sistema de resistencia/destoxificación de arsénico más extendido en bacterias es el sistema *Ars*, basado en la reducción de arseniato a arsenito y la posterior excreción de este mediante sistemas específicos de transporte. Este sistema está codificado por el operón *ars*, cuya composición génica varía de unas especies a otras pero con ciertos elementos que siempre están presentes. Podemos diferenciar dos grupos, el primero consiste en la versión más simple del operón, constando sólo de tres genes, *arsRBC*, que codifican, respectivamente, un represor transcripcional que responde a arsénico, un transportador de membrana que expulsa arsenito al exterior celular, y una arseniato reductasa citoplasmática que reduce arseniato a arsenito. También se puede encontrar una versión ampliada del operón *ars*, presentándose como *arsRDABC*, el cual proporciona mayor resistencia a la bacteria que lo porta (Páez-Espino et al., 2009). El gen *arsA* codifica una ATPasa que se acopla a *ArsB* e incrementa de forma significativa los niveles de resistencia a arsenito en aquellos organismos en los que está presente. Además, cambia el consumo de energía del transportador *ArsB* de tal forma que lo convierte en dependiente de ATP. *ArsD* funciona como

una metalochaperona que transfiere arsenito a la subunidad ArsA del complejo ArsAB. Para el intercambio del ligando entre ambas proteínas, entran en juego tres residuos de cisteína por cada una de ellas. Esto incrementa la afinidad de ArsA por el arsenito (Lin et al., 2007).

Además de estos genes, existen otros identificados recientemente que codifican una permeasa de membrana (ArsP), un sistema tiorredoxina (ArsTX), una proteína de tipo acetiltransferasa (ArsN), y una proteína de función desconocida (ArsH). Sus funciones con respecto a la resistencia a arsénico no han sido aún esclarecidas, sugiriéndose de esta forma que pueden existir otros mecanismos de resistencia en bacterias (Paez-Espino et al. 2009, Kruger et al., 2013).

El arsénico es transportado al interior celular en forma de arseniato, a través de transportadores de fosfato de baja (Pit) o alta (Pst) afinidad y selectividad (Elias et al., 2012), o en forma de arsenito, a través de aquaglicerolporinas y algunos transportadores de glucosa (familia Hxt en *Sacharomyces cerevisiae*) (Rosen y Liu, 2009).

El genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 contiene dos operones de resistencia a arsénico. En la Figura 2 se muestra la organización de la agrupación génica *ars* de la bacteria cianotrofa *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 según la anotación del genoma de dicha estirpe (Luque-Almagro et al. 2013). Entre los genes *ars* se encuentra un gen (*glyox.*) que codifica una glioxilasa de la cual se desconoce su función en el proceso de resistencia a arsénico.

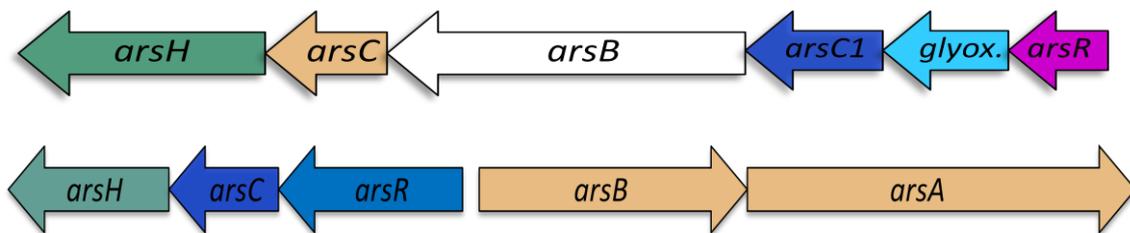


Fig. 2: Organización génica en los operones *ars* de resistencia a arsénico en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

3.2.- Mercurio

El mercurio es un componente natural del manto terrestre que se puede encontrar en tres estados de oxidación: mercurio metálico o elemental (Hg^0), catión mercúrico (Hg^{2+}) y catión mercurioso (Hg^+). El origen del Hg^0 atmosférico es natural y también antropogénico. Esta forma de mercurio volátil se oxida formando Hg^{2+} como resultado de su interacción con el ozono en presencia de agua. La mayoría del mercurio que pasa a los sistemas acuáticos se encuentra en esta forma como $Hg(OH)_2$ y $HgCl_2$, el cual se reduce de nuevo a su forma elemental o bien es metilado y se acumula en los seres vivos. En los sedimentos el mercurio se encuentra principalmente como HgS .

3.2.1.- Toxicidad del mercurio

La alta toxicidad del mercurio hace que este se encuentre en el tercer lugar de la lista de sustancias peligrosas prioritarias elaborada por la Agency for Toxic Substances and Disease

Registry en 2011. Al igual que el arsénico, la toxicidad del mercurio depende en gran medida de su estado redox. La forma más tóxica del mercurio es el ión Hg^{2+} altamente reactivo, que se une a los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína en enzimas y proteínas que juegan funciones esenciales en el metabolismo celular, quedando inactivadas y bloqueadas. También se sabe que el mercurio es capaz de reaccionar con los grupos amino, carboxilo, fosfato e imidazol, disminuyendo o inhibiendo la actividad de enzimas vitales como la lactato deshidrogenasa y la glutatión peroxidasa (Mathema et al., 2011). La afinidad del mercurio por las moléculas orgánicas generalmente resulta en la formación de compuestos organomercuriales (CH_3Hg^+), recalcitrantes y altamente tóxicos, que poseen la capacidad de difundir a través de las membranas y de bioacumularse a lo largo de la cadena trófica. A diferencia del Hg^{2+} y de las formas orgánicas de mercurio, el Hg^0 es prácticamente inocuo.

3.2.2.- Transformación microbiana del mercurio y resistencia

El mercurio, a diferencia de la mayoría de metales, no participa en ninguna función biológica. Sin embargo, la exposición continuada a mercurio ha llevado a las comunidades bacterianas a desarrollar varios tipos de transformaciones enzimáticas de este tóxico, fundamentalmente con el objetivo de detoxificar/resistir a dicho metal. Estas reacciones son: 1) reducción de Hg^{2+} a Hg^0 , 2) degradación de compuestos organomercuriales, incluyendo CH_3Hg^+ , con formación de Hg^0 , 3) metilación de Hg^{2+} , y 3) oxidación de Hg^0 a Hg^{2+} (Wagner-Döbler, 2003). La metilación y oxidación biológica del mercurio contribuye a la generación de especies de mercurio tóxicas, mientras que la producción de Hg^0 a partir de la reducción del Hg^{2+} o de la degradación de compuestos organomercuriales constituye el mecanismo de resistencia a mercurio más extendido en los seres vivos. Este mecanismo de resistencia a mercurio se basa en las peculiaridades únicas de este metal: 1) el potencial electroquímico del par $\text{Hg}^{2+}/\text{Hg}^0$, de +430 mV (pH 7), que posibilita que las células puedan reducir el Hg^{2+} a la forma no tóxica Hg^0 , y 2) los puntos de ebullición y fusión extremadamente bajos del mercurio (357 °C y -39 °C, respectivamente), que hacen que el Hg^0 escape de las células por difusión pasiva y se volatilice debido a su escasa solubilidad en agua (Wagner-Döbler, 2003).

La maquinaria celular de resistencia a mercurio está codificada por el operón *mer*, que fundamentalmente se localiza en plásmidos aunque también puede estar localizado en el ADN genómico. Este operón puede conferir resistencia sólo a sales inorgánicas de mercurio (resistencia de espectro reducido), o puede incluir genes que confieran además resistencia de compuestos organomercuriales como el metilmercurio y el fenilmercurio (resistencia de amplio espectro) (Dash et al., 2012). En primer lugar el mercurio es introducido en la célula mediante las proteínas transportadoras MerP y MerT, siendo posteriormente reducido por MerA, una flavoproteína dependiente de NAD(P)H. Se ha descrito que el Hg^{2+} es transportado al interior celular a través de pares de residuos de cisteína presentes en MerP y posteriormente en MerT, accediendo finalmente a MerA también a través de dos residuos de cisteína presentes en esta enzima (Brown et al., 2003). Algunos genes *merA* codifican además una o dos proteínas de tipo metalochaperona, con dominio N-terminal de unos 70-90 aminoácidos y motivos GMTXCXC que median la captura y transferencia del Hg^{2+} hasta el centro activo de MerA (Allen et al., 2013).

En el caso de bacterias Gram-negativas portadoras del operón que confiere resistencia de amplio espectro a mercurio, existen además los transportadores MerE y MerG que median la

entrada de los compuestos organomercuriales al interior celular. Posteriormente, estos compuestos son transformados gracias la acción de una enzima liasa organomercurial, codificada por *merB*. MerB es capaz de romper los puentes Carbono-Hg para liberar Hg^{2+} , que será seguidamente reducido a Hg^0 por MerA (Dash et al, 2012). Además, en algunas bacterias se ha encontrado el gen *merC*, con características de transportador de membrana con gran afinidad por el ión Hg^{2+} , y los genes adicionales *merH* y *merI*, presentes a ambos lados de *merA* y cuya función exacta se desconoce (Mathema et al., 2011). En cuanto a MerF, Wilson J. R. et al. (2000) la describen como una proteína de transporte de mercurio.

El operón *mer* está regulado por MerR, una proteína que se une a la región promotora del operón y regula negativamente su propia expresión y también la transcripción del operón tanto de forma positiva (en presencia de concentraciones inductoras de Hg^{2+}) como negativa (en ausencia de Hg^{2+}). Por otro lado, el gen *merD* también codifica una proteína con función reguladora que se une a la misma región promotora pero de forma mucho más débil que MerR. (Nascimento y Chartone-Souza, 2003).

La secuencia del genoma de la bacteria cianotrofa *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro et al. 2013) ha revelado la presencia de los genes *merATR* implicados en la resistencia a mercurio (Fig. 3).

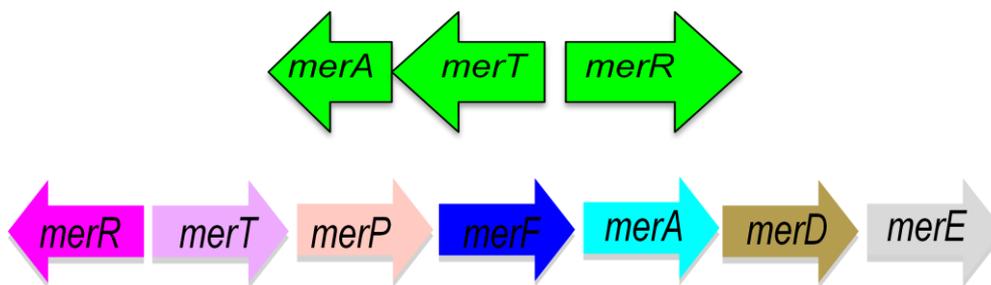


Fig. 3: Organización génica de los operones *mer* de resistencia a mercurio en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

OBJETIVOS

A través de una primera aproximación, obtenida fundamentalmente mediante técnicas de proteómica, el presente Trabajo Fin de Máster pretende estudiar la respuesta de la bacteria cianotrofa *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 a los metales y metaloides, compuestos muy tóxicos presentes en los residuos generados en distintas actividades industriales, como la minería y la joyería. De forma más específica, los objetivos concretos de este trabajo pueden dividirse en dos grandes bloques:

1. Estudio de la resistencia de la bacteria *P.pseudoalcaligenes* CECT5344 a arsénico y mercurio, así como su efecto sobre el proteoma.
2. Análisis proteómico de la respuesta de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 a los metales presentes en el residuo cianurado generado por la industria joyera.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para todos los ensayos que contempla el presente trabajo se utilizó la estirpe bacteriana CECT5344 de *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, con resistencia espontánea al antibiótico ácido nalidíxico (Nx) y capaz de utilizar cianuro como fuente de nitrógeno.

Todos los cultivos se incubaron 30 °C y en agitación constante a 220 rpm en un incubador orbital MaxQ 4000 de Thermo Scientific. Los matraces se cerraron con algodón hidrófobo estéril.

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1- Medios Líquidos

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

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O destilada	Hasta llegar a 1 L

Como medio mínimo se empleó el medio M9 (Maniatis et al., 1982) con la siguiente composición:

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
H ₂ O destilada	Hasta llegar a 1 L

*La solución de trazas contiene por litro: MgCl₂ (10,75 g), CaCO₃ (2 g), MgSO₄ · 7H₂O (6,16 g), FeSO₄ · 7H₂O (4,75 g), ZnSO₄ · 7H₂O (1,44 g), MnSO₄ · 7H₂O (1,12 g), CuSO₄ · 5H₂O (0,25 g), CoSO₄ · 7H₂O (0,28 g), H₃BO₃ (0,06 g) y HCl 12 N (51,3 ml).

La fuente de nitrógeno adicionada al medio M9 varió dependiendo de cada experimento. Para la esterilización de los medios se utilizó un programa de autoclave de duración 20 minutos y temperatura 126 °C. La solución de trazas se esterilizó por separado, sin el MgSO₄ y con sólo 4,5 g de FeSO₄. El MgSO₄ y el resto de FeSO₄ se esterizaron por filtración (filtros con poros de 0,22 µm de diámetro suministrados por Millipore), y se añadieron posteriormente al resto de la solución de trazas.

Una vez enfriados los medios y justo antes de su utilización, se añadió el antibiótico Nx a una concentración final de 10 µg·ml⁻¹ en el medio de cultivo y a partir de una solución concentrada (10 mg·ml⁻¹) preparada en NaOH 0,1 M.

2.2- Medios sólidos

Los medios sólidos se prepararon añadiendo una concentración final de 1,5% (p/v) de bacto-agar a los medios líquidos anteriormente descritos, y previamente al paso de esterilización. El antibiótico Nx se añadió al medio esterilizado antes de que solidificara y a una temperatura aproximada de 50 °C.

3. RESISTENCIA A ARSÉNICO Y MERCURIO

Para determinar la resistencia a arsénico y mercurio de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se cultivó dicha estirpe en medio sólido LB (pH 9,5) en ausencia (control) o presencia de distintas concentraciones de arsénico y mercurio. Las placas se realizaron por duplicado y se incubaron a 30 °C durante 24 h.

Por otro lado, se realizaron curvas de crecimiento en ausencia y presencia de arsénico y mercurio en medio LB o M9, en este último caso con acetato 50 mM y amonio 10 mM como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente.

4. ANÁLISIS PROTEÓMICO

4.1 - Condiciones de cultivo

Para el análisis proteómico en condiciones de exposición a NaCN o residuo joyero, se inoculó la estirpe CECT5344 en matraces Erlenmeyer de 2 L con 400 ml de medio M9 (pH 9,5) con acetato 50 mM y NH_4Cl 2 mM como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Los cultivos se incubaron durante 24 horas a 30 °C y 220 rpm, hasta que consumieron completamente el amonio y alcanzaron una densidad óptica (D.O.) a 600 nm aproximada de 0,3. En ese momento, a dos cultivos se les adicionó NaCN a una concentración final de 2 mM, y a otros dos cultivos se les añadió un volumen de residuo joyero para obtener igualmente una concentración final de cianuro libre en el medio de 2 mM. De cada condición, uno de los cultivos fue recogido transcurridas 3 h desde la adición de NaCN o residuo, y el otro cultivo se recogió a las 8 h.

Para el estudio proteómico de la respuesta a arsénico y mercurio, se prepararon dos cultivos de 200 ml de medio mínimo M9 (pH 9,5) en matraces Erlenmeyer de 1 L por cada una de las condiciones a estudiar, con NH_4Cl 10 mM como fuente de nitrógeno y acetato 50 mM como fuente de carbono. Previamente a su inoculación con *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, los cultivos fueron suplementados con arsenito sódico (NaAsO_2), arseniato sódico (HNa_2AsO_4) o cloruro de mercurio (HgCl_2), utilizando como control cultivos de las mismas características pero sin la adición de metaloides. Los cultivos se recogieron cuando su D.O. a 600 nm se encontraba entre 0,6 y 0,7.

En todos los casos la recogida de las células se llevó a cabo mediante centrifugación utilizando una centrífuga 6K15 de SIGMA Laboratory Centrifuges, a 8000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. Tras retirar el sobrenadante las células que formaban el precipitado se lavaron y resuspendieron en un tampón de bajo contenido en sal que contenía KCl 3 mM, KH_2PO_4 1,5

mM, Na₂HPO₄ 9 mM y NaCl 68 mM (pH 9). Se volvieron a centrifugar bajo las mismas condiciones y se repitió el proceso de lavado, reduciéndose el volumen de tampón de lavado a usar. Finalmente la suspensión de células se centrifugó en una microcentrífuga Minispin de Eppendorf a 13000 rpm y el precipitado resultante se conservó a -80 °C hasta su uso.

4.2 - Preparación de la muestra

Tras descongelar los precipitados celulares, éstos se resuspendieron en tampón Tris-HCl 40 mM (pH 9) y trataron con DNAsa (65 µg/ml), RNasa (40 µg/ml), MgCl₂ (5 mM), y de los inhibidores de proteasas pepstatina A (2,8 µg/ml), Leupeptina (2 µg/ml) y PMSF (7 µg/ml). Tras un mezclado suave, las muestras se sonicaron durante 3 pulsos de 5 segundos cada uno, utilizando un sonicador Vibracell de Sonics and Materials INC (Danbury, Connecticut USA). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 11000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante, considerado la fracción soluble, fue utilizado como fuente de proteína para llevar a cabo el análisis proteómico.

Con el fin de eliminar los lípidos y sales de la muestra para evitar su interferencia durante el isoelectroenfoque, se procedió a la limpieza de la muestra precipitando las proteínas mediante el siguiente procedimiento: a 200 µl de muestra (fracción soluble) se añadieron 4 volúmenes de metanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua Milli-Q. Después de la adición de cada reactivo se agitó la mezcla en un vórtex para conseguir un correcto mezclado. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se retiró con cuidado de no eliminar la fracción proteica, que formaba un anillo blanco en suspensión. A esta fracción proteica se añadieron 3 volúmenes de metanol y, tras centrifugar y retirar el sobrenadante, el precipitado formado se dejó secar durante 5 minutos en un flujo de aire. Finalmente, las proteínas se solubilizaron al resuspender suavemente el precipitado proteico, mediante pipeteo, en tampón de resolubilización (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4 %, IPG-buffer 4-7, DTT 50 mM), e incubando en agitación suave a temperatura ambiente durante al menos una hora. Durante la preparación de la muestra se procedió a la medida de la concentración de proteína, mediante el método de Bradford, en la fracción soluble antes y después de aplicar el protocolo de limpieza de sales y lípidos.

4.3 - Isoelectroenfoque

La primera dimensión de la electroforesis bidimensional se llevó a cabo utilizando el sistema IPGphor de Pharmacia. El IEF se realizó en tiras de 11 y 13 cm (GE Healthcare), ambas con un gradiente de pH de 4-7. El volumen de muestra utilizado, 200 y 250 μl para las tiras de 11 y 13 cm, respectivamente, contenía en ambos casos 250 μg de proteína total. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 12000 rpm previamente a su distribución a lo largo de los sarcófagos de porcelana (GE Healthcare). A continuación se colocó una tira de IEF con el gel hacia abajo, recubriéndose posteriormente con aceite mineral (GE Healthcare). El programa de IEF que se les aplicó a las muestras estaba constituido por las siguientes fases:

Paso	Duración	Incremento de Voltaje
Rehidratación	12 h	-
Paso 1 (500 V)	1 h	lineal
Paso 2 (1000 V)	1 h	gradiente
Paso 3 (8000 V)	2,5 h	lineal
Paso 4 (8000 V)	Hasta alcanzar 2200 Vh	lineal

4.4- Equilibrado

Tras la primera dimensión los geles de IEF se equilibraron en dos pasos de 15 min en tampón de equilibrado con Tris-HCl 50mM (pH 8,8), urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), y trazas de azul de bromofenol. Este tampón de equilibrado contenía DTT ($10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) durante el primer paso y yodoacetamida ($25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) en el segundo paso de equilibrado.

4.5- Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para la segunda dimensión se utilizó el sistema Hoefer SE 600 (Pharmacia). Todo el material se lavó cuidadosamente con agua destilada y etanol. Se prepararon geles de poliacrilamida al 12,5% sobre los que se colocaron las tiras de IEF ya equilibradas. Los marcadores de peso molecular se aplicaron en un trozo de papel Whatmann, el cual se colocó a un lado de la tira del gel de IEF. Posteriormente las tiras y los marcadores se sellaron con agarosa al 0,5%. La electroforesis constó de un primer paso de 30 minutos de duración en el que la intensidad fue de 15 mA por cada gel. Transcurrido este tiempo la intensidad se aumentó a 30 mA por gel.

4.6- Tinción y escaneado de los geles

La visualización de las proteínas en los geles bidimensionales se llevó a cabo utilizando la tinción fluorescente SYPRO Ruby de Biorad y siguiendo el protocolo de la casa comercial. Para ello los geles se incubaron en agitación suave durante 60 min con una solución fijadora que contenía metanol 10% y ácido acético 7%. A continuación se retiró la solución fijadora y se procedió a cubrir los geles con el reactivo "SYPRO Ruby protein gel stain". La tinción se llevó a cabo en agitación suave durante unas 12 h y en oscuridad. Posteriormente se retiró la solución de tinción y los geles se incubaron con la solución fijadora durante 1 h en agitación y manteniendo la oscuridad. Por último, los geles se lavaron con agua destilada, donde se mantuvieron inmersos a 4 °C y protegidos de la luz para su conservación.

La visualización de las manchas de proteínas en los geles 2-DE se llevó a cabo utilizando un escáner de fluorescencia (FX Pro Plus Multiimager, Bio-Rad), en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

4.7- Picado e identificación de spots

El picado y la identificación de los spots de interés se llevó a cabo en el SCAI de la Universidad de Córdoba. Estos spots se recortaron del gel en una estación automática de picado de geles (ProPic, Genomics Solutions) y posteriormente se digirieron con tripsina. Los péptidos obtenidos se analizaron por espectrometría de masas mediante huella peptídica MS-MS/MS (MALDI-TOF-TOF). Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina se depositaron sobre una placa MALDI junto con una matriz (α -ciano-4-hidroxicinámico) usando la estación automática de dispensación de proteínas sobre placa de MALDI (Pro MS MALDI, Genomic Solutions). Las muestras se analizaron mediante MALDI-TOF/TOF, obteniéndose la huella peptídica (MS) y adicionalmente 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 usando como motor de búsqueda MASCOT (MatrixScience, UK) sobre bases de datos de secuencias de proteínas.

5. MÉTODOS ANALÍTICOS

5.1- Medida del crecimiento celular

El crecimiento de los cultivos bacterianos se siguió utilizando el método habitual por turbidimetría, el cual mide la absorbancia a del cultivo a 600 nm. Se utilizó un espectrofotómetro Thermo Spectronic de Thermo Scientific.

5.2- Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (1976), utilizando el reactivo "Bio-rad dye reagent concentrate" (Biorad). A 0,8 ml de muestra se añadieron 0,2 ml del reactivo de Bradford, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se determinó extrapolando los valores de absorbancia a 595 nm en una recta de calibrado realizada con la albúmina sérica bovina.

RESULTADOS

1.- RESISTENCIA DE *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 A ARSÉNICO Y MERCURIO

Los residuos industriales cianurados suelen contener, además de cianuro, otros compuestos tóxicos que pueden interferir durante el tratamiento biológico de descontaminación de cianuro. En el caso de los residuos generados por la minería de oro estos suelen contener como tóxicos adicionales arsénico o mercurio. Uno de los objetivos de este trabajo ha sido determinar la toxicidad de estos compuestos en la bacteria cianotrofa *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Para ello se ha realizado un estudio de resistencia a arseniato, arsenito y mercurio en medios LB y M9 a pH 9,5. En el caso del medio mínimo M9 se utilizó acetato y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente.

La resistencia de un microorganismo frente a un compuesto tóxico, como es el caso de los metales y metaloides, viene determinada por la concentración mínima inhibitoria (CMI), que se define como la concentración mínima de un compuesto tóxico que es capaz de inhibir completamente el crecimiento de un microorganismo. Con la finalidad de obtener una aproximación inicial a la CMI de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 a arsénico y mercurio, se inocularon placas con medio LB sólido suplementado con distintas cantidades de estos compuestos en intervalos amplios de concentración. Como control se utilizó medio LB sólido sin la adición del tóxico (Tablas 1 y 2). Transcurridas 48 h se determinó la presencia o ausencia de colonias en las placas. Según los resultados expuestos en las Tabla 1 y 2, el valor de resistencia más alto en medio LB sólido para arsenito y para mercurio fue de 1 mM y 100 μ M, respectivamente. En el caso del arseniato, su solubilidad en agua (5,46 g/100 ml) impidió la preparación de soluciones muy concentradas de arseniato con las que suplementar las placas con LB sólido a concentraciones superiores a 0,5 M, por lo que en este caso no se pudo determinar con exactitud la CMI de este metaloide.

En los cultivos sólidos con HgCl_2 realizados en LB-agar se observó que a partir de una concentración de 50 μ M, se produjeron cambios en la morfología y aspecto de las colonias, siendo especialmente visibles en la placa que contenía una concentración 100 μ M de este compuesto. El aspecto normal contempla colonias de forma circular, color oscuro y límites bien definidos en cuyo perímetro se puede observar un borde sombreado más oscuro. La morfología y el aspecto ocasionado por el mercurio supone colonias de mayor tamaño y color crema claro, con los límites menos definidos y apariencia de menor consistencia al desaparecer el perímetro sombreado.

Una vez analizada la resistencia para cada compuesto en medio LB sólido, se procedió a estudiar el efecto del arsénico y el mercurio en el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en medio LB líquido (Fig.4). Para ello se llevaron a cabo curvas de crecimiento en dicho medio rico adicionando concentraciones de arsénico o mercurio que variaban dentro del intervalo de los valores previamente establecidos por los resultados de los ensayos en medio LB sólido

Tabla 1. Crecimiento de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en medio sólido LB con distintas concentraciones de arsenito y arseniato.

	Concentración (mM)	Crecimiento tras 48 h ¹
Control	0	+
ARSENITO	1	+
	2	-
	3	-
	6	-
	8	-
	10	-
ARSENIATO	10	+
	100	+
	250	+
	300	+
	500	+
	800	¿?

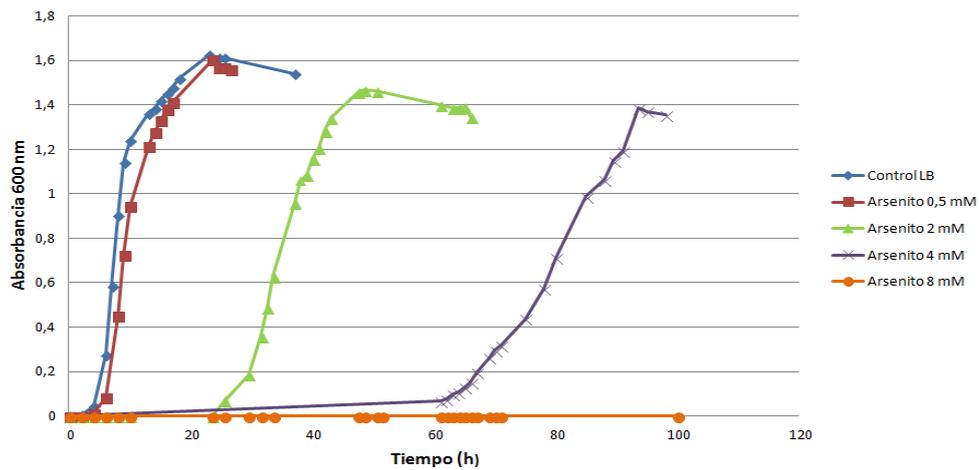
¹A las 48 horas de sembrar las placas con LB sólido se determinó la presencia “+” o ausencia “-” de colonias.

Tabla 2. Crecimiento de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en medio sólido LB en ausencia o presencia de distintas concentraciones de mercurio.

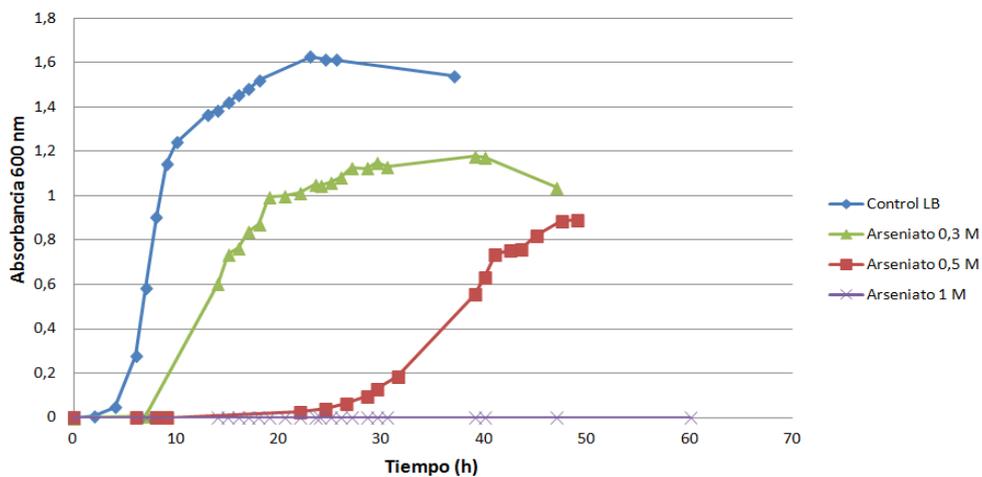
	Concentración (μM)	Crecimiento tras 48 h ¹
Control	0	+
MERCURIO	1	+
	10	+
	50	+
	100	+
	300	-
	600	-
	800	-
	1000	-

¹A las 48 horas de sembrar las placas con LB sólido se determinó la presencia “+” o ausencia “-” de colonias.

A (LB)



B (LB)



C (LB)

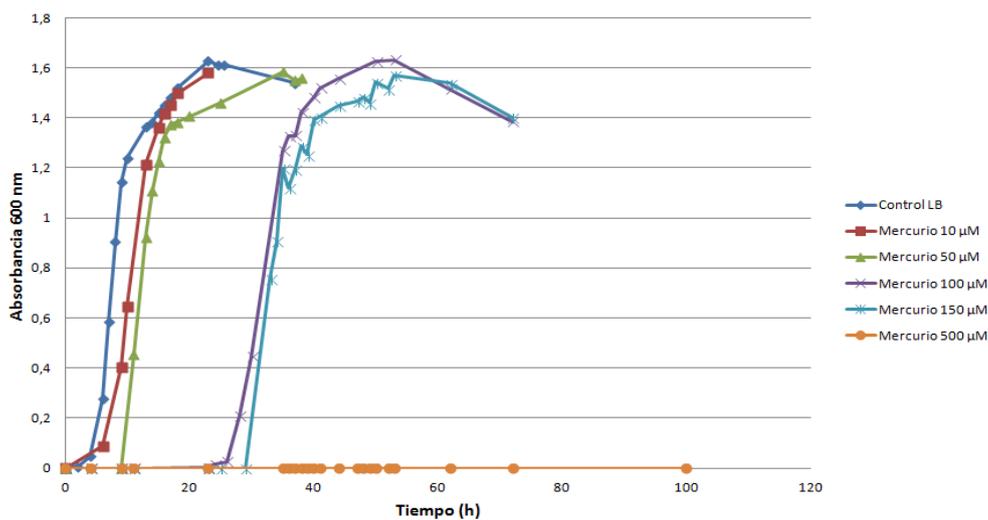
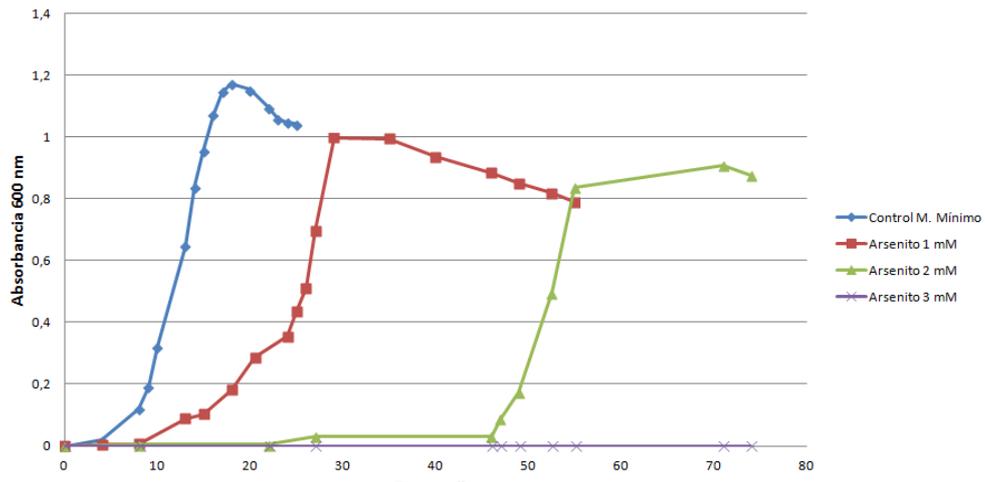


Fig. 4: Crecimiento de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en medio líquido LB con arsenito (A), arseniato (B) o mercurio (C). La estirpe CECT5344 se cultivó en este medio rico en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de estas sustancias, determinándose la absorbancia a 600 nm de los cultivos a lo largo del tiempo.

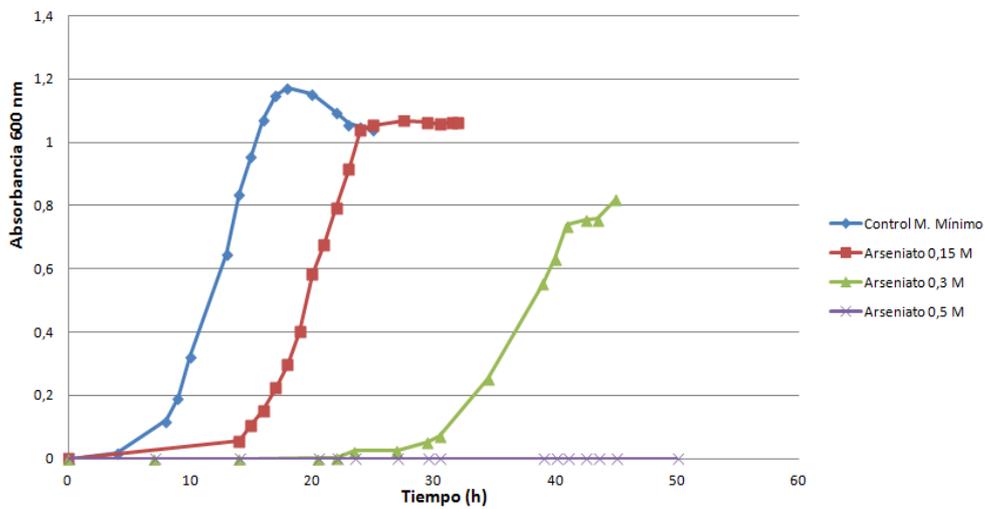
En la Figura 4 se observa que en medio líquido LB la estirpe CECT5344 toleró hasta 4 mM de arsenito, 0,5 M de arseniato y 150 μ M de mercurio. En el caso del arsenito y el arseniato, la fase de latencia aumentó de forma proporcional a la concentración de arsénico, mientras que el crecimiento máximo disminuyó. La disminución del crecimiento máximo fue más notable con arseniato que con arsenito. En los cultivos con mercurio se puede observar cómo la duración de la fase de latencia también aumentó con la concentración de mercurio en el medio, aunque a diferencia del arsenito y arseniato el crecimiento máximo no disminuyó.

Por último, se determinó la toxicidad del arsénico y del mercurio en medio líquido M9 (medio mínimo) con acetato 50 mM y amonio 10 mM a pH 9,5. Para ello se realizaron curvas de crecimiento con distintas concentraciones de metaloides, como se muestra en la Figura 5. Los resultados obtenidos indican que en estas condiciones la estirpe CECT5344 tolera hasta 2 mM de arsenito, 0,3 M de arseniato y 10 μ M de mercurio. Al igual que en el medio rico LB, la fase de latencia aumentó de forma proporcional a la concentración de arsénico mientras que el crecimiento máximo disminuyó. En el caso del mercurio, en estas condiciones la fase de latencia aumentó con la concentración del metal pero el crecimiento máximo no se vio afectado.

A (M. Mínimo)



B (M. Mínimo)



C (M. Mínimo)

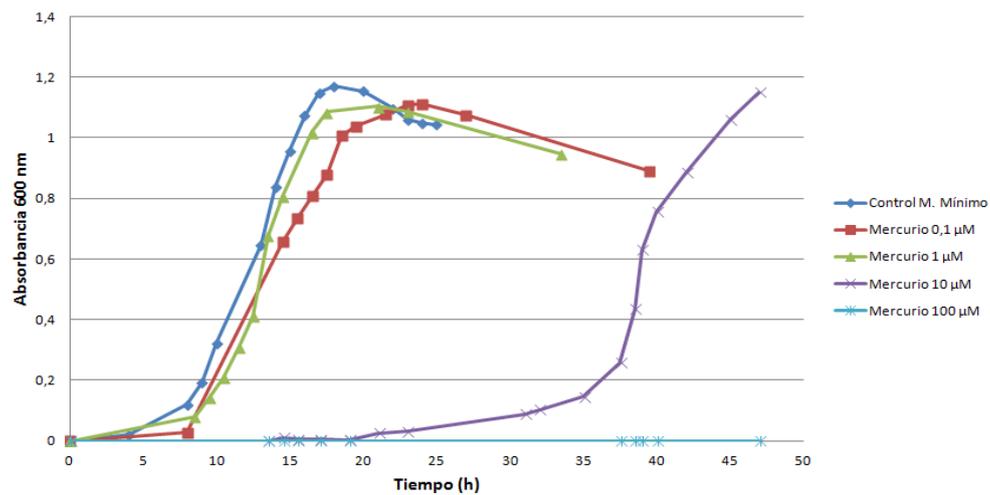


Fig. 5: Crecimiento de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en medio líquido M9 con arsenito (A), arseniato (B) o mercurio (C). La estirpe CECT5344 se cultivó en este medio mínimo con acetato 50 mM y amonio 10 mM, en ausencia (control) o presencia de diferentes concentraciones de estas sustancias, determinándose la absorbancia a 600 nm de los cultivos a lo largo del tiempo.

2.- EFECTO DEL ARSÉNICO Y EL MERCURIO EN EL PROTEOMA DE *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

Además de determinar la toxicidad del arsénico y el mercurio en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, en este trabajo se ha estudiado la respuesta de la bacteria a estos compuestos, a nivel de proteína. Este estudio se ha llevado a cabo mediante electroforesis bidimensional (2D-PAGE) de la fracción soluble (citoplasma y periplasma) obtenida a partir de células de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 cultivadas en medio mínimo M9 (pH 9,5) con acetato y amonio, en ausencia (control) o presencia de arsenito, arseniato o mercurio. Las concentraciones de metaloides utilizadas (arsenito 1 mM, arseniato 150 mM y mercurio 1 μ M), corresponden a concentraciones que, según los resultados obtenidos en el apartado anterior, afectan al crecimiento de la estirpe CECT5344 aunque de una forma no muy drástica. En estas condiciones la bacteria es capaz de tolerar el compuesto, por lo que inducirá los mecanismos de resistencia que son de nuestro interés. El estudio proteómico se llevó a cabo con dos réplicas biológicas de cada condición, determinándose en cada caso el número de spots y las diferencias cualitativas (presencia o ausencia de spots) más importantes con respecto al control. Los spots de los distintos geles 2D se cuantificaron mediante el programa ProteomWeaver (Biorad Laboratories), obteniéndose los resultados que se presentan en las Tablas 3 y 4.

La electroforesis bidimensional reveló un total de 361 spots diferencialmente expresados en los geles de arsenito y control, de los cuales 194 correspondían a proteínas reprimidas por el arsenito mientras que 167 eran proteínas cuya expresión fue inducida por dicho compuesto. Para el arseniato se encontraron 365 spots diferencialmente expresados con respecto al control siendo un total de 158 proteínas las que sufrieron represión por el metaloide y 207 las que se indujeron en su presencia. En cuanto a los ensayos realizados con mercurio, se encontraron 483 spots que se expresaban de forma diferente en la muestra control o en la muestra sometida a mercurio. Las proteínas reprimidas por dicho compuesto constituyeron un número total de 239 mientras que las inducidas por mercurio fueron 244.

Tabla 3. Número total de spots contabilizados en los geles 2D-PAGE de extractos de células cultivadas con arsenito, arseniato o mercurio.

Gel	Nº total de spots
Control 1	807
Control 2	800
Arsenito 1	780
Arsenito 2	820
Arseniato 1	849
Arseniato 2	840
Mercurio 1	805
Mercurio 2	756

Tabla 4. Análisis diferencial de los spots afectados por arsenito, arseniato y mercurio.

Condición	Nº total de spots	Spots coincidentes ¹	Spots diferenciales ²
Control 1	807	613 (75,9%)	194 (24,1%)
Arsenito 1	780	613 (78,6%)	167 (21,4%)
Control 2	800	642 (80,25%)	158 (19,75%)
Arseniato 1	849	642 (75,6%)	207 (24,4%)
Control 2	800	561 (70,1%)	239 (29,9%)
Mercurio 1	805	561 (69,7%)	244 (30,3%)

¹Spots que aparecen en ambas condiciones.

²Spots que sólo aparecen en una de las dos condiciones.

^{1,2}En ambos casos el porcentaje está referido al número total de spots de cada condición.

Los geles correspondientes a este análisis proteómico se muestran en la Figura 6 y la identificación de los spots seleccionados en función de su respuesta diferencial en los cultivos control y los tratados con arsenito, arseniato o mercurio se presenta en las Tablas 5 y 6.

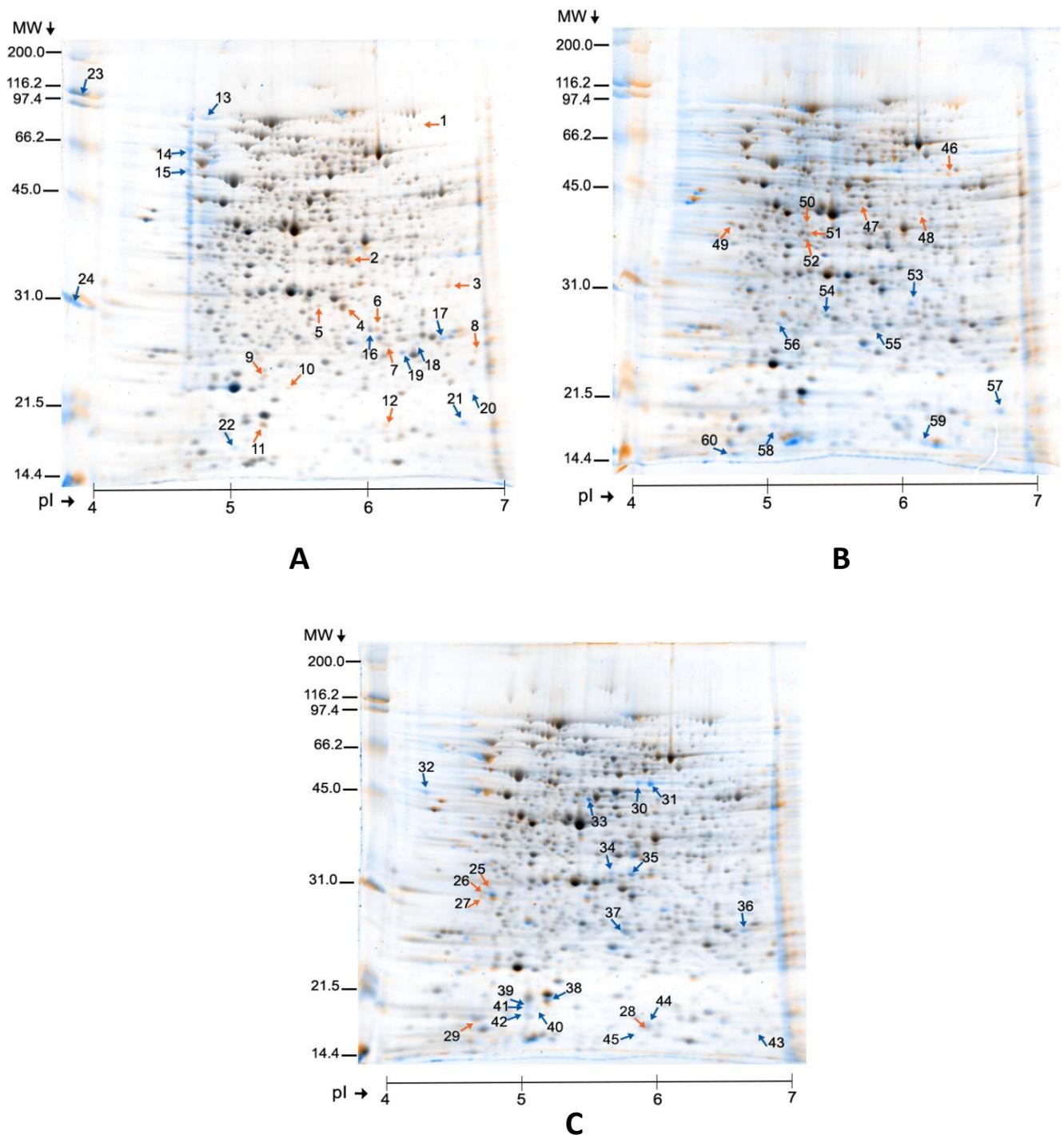


Fig. 6: Análisis proteómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta a arsenito (A), arseniato (B) y mercurio (C). La estirpe CECT5344 se cultivó en medio M9 con acetato 50 mM y amonio 10 mM, adicionando arsenito 1 mM, arseniato 150 mM o mercurio 1 μ M. A un cultivo control no se le adicionó ningún metaloide o metal. Las fracciones solubles obtenidas de estos cultivos se sometieron a electroforesis bidimensional y las proteínas se visualizaron con Sypro. Los gels obtenidos se analizaron mediante el programa Proteomweaver, mostrándose en la figura el solapamiento del gel control (naranja) con los gels tratados (azul). Las flechas naranjas indican proteínas reprimidas metaloide arsenito, arseniato o mercurio en comparación con el cultivo control, mientras que las flechas azules indican spots inducidos por estos compuestos. Los números hacen referencia a los spots identificados que se indican en las tablas 5 y 6.

Tabla 5: Identificación de spots expresados diferencialmente en las muestras tratadas con arsenito y arseniato y sus controles.

ARSENITO						Patrón Expresión	
Nº Spot	Proteína identificada	Nº Acceso	Nº péptidos coincidentes	Total Ion Score	Total Ion Score C.I.(%)	Control	Arsenito
1	Phosphoketolase	I7K1E0	13	97	100	+	-
2	Alcohol dehydrogenase, zinc-containing	I7K499	19	637	100	+	-
3	Universal stress protein	I7J0Y9	18	613	100	+	-
4	UspA domain-containing protein	I7IXJ6	19	701	100	+	-
5	UspA domain-containing protein	I7IXJ6	16	625	100	+	-
6	Uridylate kinase	A4XWT9	14	282	100	+	-
7	Uncharacterized protein YigA	I7IWX7	8	326	100	+	-
8	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	A4XSS6	7	322	100	+	-
9	OmpW family outer membrane protein	I7K6Q7	8	248	100	+	-
10	Phasin-like protein	I7J2Z9	14	661	100	+	-
11	OmpW family outer membrane protein	I7K6Q7	10	478	100	+	-
12	Uncharacterized protein	I7J3D1	5	279	100	+	-
13	Aconitate hydratase 2	I7IZ74	25	198	100	-	+
14	Acetyl-coenzyme A synthetase	F4DQJ9	29	584	100	-	+
15	Isocitrate lyase	I7IZ21	28	542	100	-	+
16	Uncharacterized protein	I7IE44	13	226	100	-	+
17	Succinate dehydrogenase, iron-sulfur protein	I7K7B6	13	343	100	-	+
18	Arsenical resistance protein ArsH	I7JN7	10	201	100	-	+
19	Isocitrate lyase	I7IZ21	13	336	100	-	+
20	Protein tyrosine phosphatase domain-containing protein1	I7IE58	10	188	100	-	+
21	Arsenate reductase, putative	I7IE08	11	611	100	-	+
22	Arsenate reductase	I7JK48	10	513	100	-	+
ARSENIATO						Patrón Expresión	
Nº Spot	Proteína identificada	Nº Acceso	Nº péptidos coincidentes	Total Ion Score	Total Ion Score C.I.(%)	Control	Arseniato
23	-						
24	-						
25	Pyruvate kinase	I7K513	22	521	100	+	-
26	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	I7IYD4	19	425	100	+	-
27	Cysteine desulfurase	I7JIB8	22	160	100	+	-
28	Extracellular solute-binding protein	I7J2F2	10	270	100	+	-
29	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	I7JHI1	16	536	100	+	-
30	Fatty-acyl-CoA synthase	I7JN71	20	623	100	-	+
31	Fatty-acyl-CoA synthase	I7JN71	22	735	100	-	+
32	Flagellin B/Flagellin N	I7K8E8	22	923	100	-	+
33	Arginine deiminase	I7K5W2	30	760	100	-	+
34	Universal stress protein E homolog	I7K865	14	617	100	-	+
35	Universal stress protein E homolog	I7K865	17	529	100	-	+
36	Succinate dehydrogenase, iron-sulfur protein	I7K7B6	14	563	100	-	+
37	3-ketoacyl-(Acyl-carrier-protein) reductase	J7U7T7	12	464	100	-	+
38	OmpW family outer membrane protein	I7K6Q7	9	305	100	-	+
39	Probable thiol peroxidase	I7IZ33	6	407	100	-	+
40	Ferritin, Dps family protein	I7K1D3	11	484	100	-	+
41	Probable thiol peroxidase	I7IZ33	3	172	100	-	+
42	OstA family protein	I7J127	7	197	100	-	+
43	Heavy metal-dependent transcription regulator 2	I7K4W9	7	131	100	-	+
44	Ferric uptake regulator	G9HWE9	7	421	100	-	+
45	Uncharacterized protein	I7IG22	7	113	100	-	+

Tabla 6: Identificación de spots expresados diferencialmente en las muestras tratadas con mercurio y su control.

MERCURIO						Patrón Expresión	
Nº Spot	Proteína identificada	Nº Acceso	Nº péptidos coincidentes	Total Ion Score	Total Ion Score C.I. (%)	Control	Mercurio
46	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	I7K8W9	20	526	100	+	-
47	Rod shape-determining protein MreB	I7JMP6	19	576	100	+	-
48	Thioredoxin	I7JNB2	12	400	100	+	-
49	Putative signal transduction protein	I7IDS6	9	140	100	+	-
50	Elongation factor P	I7K2B0	6	82	100	+	-
51	Ferric uptake regulator	G9HWE9	8	393	100	+	-
52	Copper ion binding protein	I7K0L7	7	221	100	+	-
53	Beta-lactamase domain-containing protein	I7IF59	16	665	100	-	+
54	Putative uncharacterized protein	F2ZG19	-	-	-	-	+
55	Alkaline phosphatase synthesis transcriptional regulatory protein sphR	I7IEG4	20	558	100	-	+
56	Antioxidant, AhpC/Tsa family	I7K7S9	14	328	100	-	+
57	Type III effector protein AvrE1	K6C9A8	19			-	+
58	Arsenate reductase	I7JK48	11	440	100	-	+
59	Universal stress protein AUspA domain-containing protein	I7JLK4	6	374	100	-	+
60	Uncharacterized protein	I7JLT3	7	216	100	-	+

3.- ANÁLISIS PROTEÓMICO DE *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 EN RESPUESTA A CIANURO Y AL RESIDUO CIANURADO DE LA JOYERÍA

Como se ha descrito en la introducción de este trabajo, los residuos industriales cianurados suelen contener otros compuestos tóxicos, principalmente metales y/o metaloides. En el caso del residuo de la joyería se ha constatado la presencia de metales pesados como hierro, cobre y cinc. Con el objetivo de identificar proteínas afectadas por estos metales u otros compuestos tóxicos presentes en este residuo cianurado, se ha realizado un análisis proteómico diferencial de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con cianuro o residuo joyero como fuentes de nitrógeno. Aquellos spots expresados diferencialmente en el residuo con respecto al cianuro como control, corresponderán a proteínas afectadas por otros componentes del residuo. Con objeto de estudiar una posible respuesta temprana y tardía al residuo, el análisis proteómico se llevó cabo con células tratadas durante 3 y 8 horas, respectivamente (Fig. 7).

Como se indica en la Tabla 7, se identificó hasta un total de 259 spots expresados diferencialmente al comparar las muestras tratadas con NaCN o residuo y extraídas pasadas las 3 h, del cual 145 spots se atribuyen a represiones por efecto de los metales del residuo joyero y 114 se pueden interpretar como inducciones por el mismo. En cuanto al estudio proteómico de las muestras extraídas a las 8 h, el número total de proteínas diferencialmente expresadas asciende a 292, de las cuales 130 se corresponderían con inhibiciones causadas por el residuo mientras que las 162 restantes equivaldrían a inducciones.

Tabla 7. Análisis diferencial de los spots afectados por cianuro y residuo.

Condición	Nº total de spots	Spots coincidentes ¹	Spots diferenciales ²
NaCN 3 h	606	461 (76,1%)	145 (23,9%)
Residuo 3 h	575	461 (80,2%)	114 (19,8%)
NaCN 8 h	658	528 (80,2%)	130 (19,8%)
Residuo 8 h	690	528 (76,5%)	162 (23,5%)

¹Spots que aparecen en ambas condiciones.

²Spots que sólo aparecen en una de las dos condiciones.

^{1,2}En ambos casos el porcentaje está referido al número total de spots de cada condición.

En la Tabla 8 se indican las proteínas identificadas correspondientes a los spots expresados diferencialmente en los cultivos tratados con el residuo joyero y el cianuro.

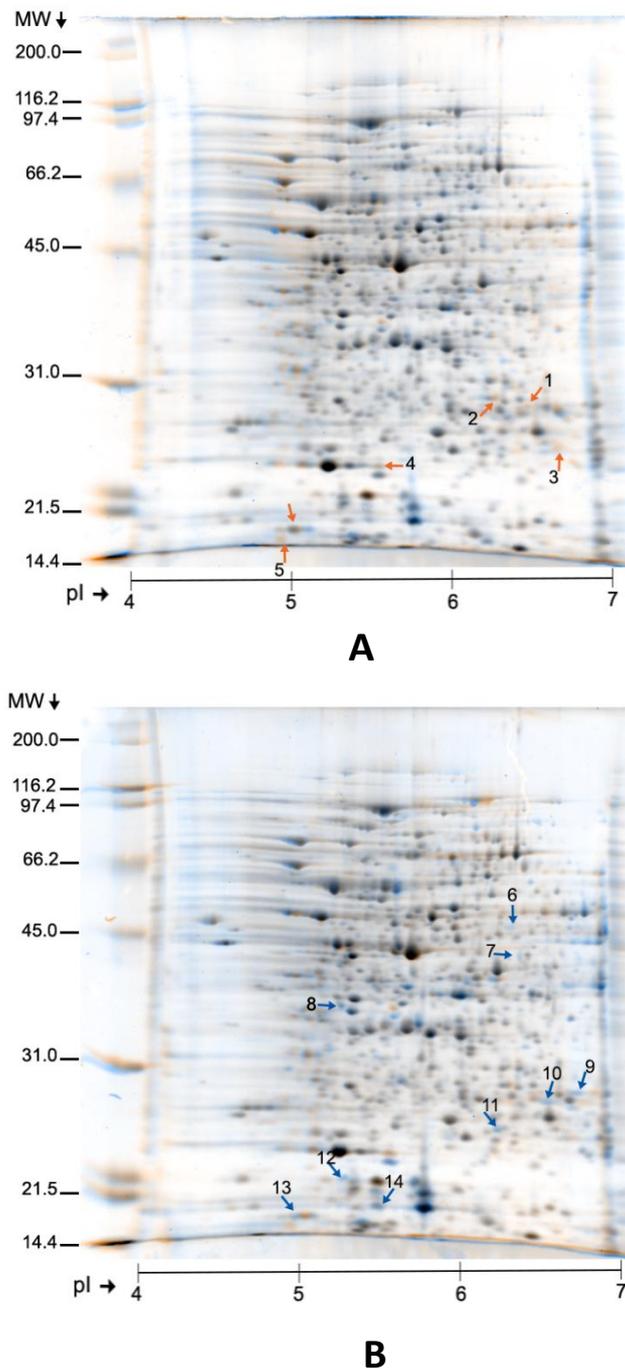


Fig. 7: Análisis proteómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta al NaCN y al residuo joyero pasadas 3 h (A) y 8 h (B) desde su adición. La estirpe CECT5344 se cultivó en medio M9 con acetato 50 mM y amonio 10 mM, adicionando NaCN 2 mM o residuo joyero con una concentración equivalente de cianuro libre 2 mM. Las fracciones solubles obtenidas de estos cultivos se sometieron a electroforesis bidimensional y las proteínas se visualizaron con Sypro. Los gels obtenidos se analizaron mediante el programa Proteomweaver, mostrándose en la figura el solapamiento de los gels de NaCN (naranja) con los gels tratados con residuo (azul).

Tabla 8: Identificación de spots expresados diferencialmente en las muestras tratadas con NaCN y residuo joyero.

NaCN - Residuo						Patrón Expresión			
Nº Spot	Proteína identificada	Nº Acceso	Nº péptidos coincidentes	Total Ion Score	Total Ion Score C.I. (%)	CN- 3 h	CN 8h	R 3h	R 8h
1	Uridylate kinase	F4DPP7	11	319	100	+	+	-	-
2	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	I7K0Q0	7	121	100	+	+	-	-
3	Thiol:disulfide interchange protein DsbA	I7K4D1	10	378	100	+	+	-	-
4	Uncharacterized protein	I7K0B0	9	251	100	++	++	+	+
5	Copper binding protein plastocyanin/azurin family	I7K0L7	5	369	100	+	+	-	-
6	CynA (ABC-type transporter periplasmic component protein)	I7K580	13	248	100	-	-	-	+
7	Glutaryl-CoA dehydrogenase	7JPI8	18	352	100	-	-	-	+
8	NitF (AIR synthase related protein domain protein)	H9N5E5	14	584	100	+	+	++	++
9	Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit	I7K0Q0	8	282	100	-	-	+	++
10	Succinate dehydrogenase, iron-sulfur protein	I7K7B6	12	399	100	-	-	-	+
11	FMN-dependent NADH-azoreductase	I7JIR3	8	454	100	-	-	+	++
12	Uncharacterized protein	I7K4R3	9	205	100	-	-	+	++
13	30S ribosomal protein S6	K2RSV4	12	164	100	+	+	++	++
14	Ferritin	I7K1D3	10	339	100	-	-	+	+

DISCUSIÓN

1.- RESISTENCIA DE *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 A ARSÉNICO Y MERCURIO

Los residuos industriales cianurados suelen contener, además de cianuro, diversos compuestos tóxicos que dificultan su descontaminación mediante métodos biológicos. Entre estos compuestos se encuentran principalmente metaloides y metales pesados, como ocurre con los residuos generados por la joyería y la minería. El arsénico y/o el mercurio son principalmente dos de estos compuestos que forman parte de la composición química del residuo cianurado producido por la industria minera. *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria alcalófila que utiliza cianuro como fuente de nitrógeno (Luque-Almagro et al., 2005). Además, se ha descrito que la estirpe CECT5344 es capaz de crecer con el residuo de la joyería y degradar el cianuro presente en dicho residuo (Luque-Almagro et al., 2005), que además contiene metales como Fe, Cu y Zn. Su aplicación en la descontaminación de residuos cianurados producidos por la joyería ha sido propuesta (Luque-Almagro et al., 2005). Con objeto de la posible aplicación de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en la descontaminación de otros residuos cianurados, como el generado por la minería, en este trabajo se ha estudiado la resistencia de esta estirpe a arsénico y mercurio.

En bacterias, las condiciones de cultivo influyen sobre el metabolismo del organismo. Dependiendo de las condiciones metabólicas, la resistencia a un tóxico puede ser favorecida o impedida. Según los resultados obtenidos en este trabajo, la resistencia de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 a mercurio y arsénico, este último en forma de arsenito o arseniato, varía en función del medio de cultivo, tanto entre medios sólido y líquido, como entre medio rico LB y medio mínimo M9. En medio sólido LB la estirpe CECT5344 toleró concentraciones de arsenito, arseniato y mercurio de hasta 1 mM, 500 mM y 100 μ M (Tablas 1 y 2), mientras que en medio LB líquido toleró hasta arsenito 4 mM y mercurio 150 μ M. Para arseniato el límite se mantuvo en 500 mM (Fig. 4). En medio mínimo M9 líquido, con amonio y acetato, la resistencia disminuyó de forma notable siendo este descenso especialmente acusado para mercurio (Fig. 5). La mayor resistencia a estas sustancias observada en medio LB respecto a medio M9 podría justificarse desde el punto de vista de que el medio LB es un medio rico en nutrientes que permite invertir mayor energía en la resistencia a estos tóxicos.

En un trabajo previo sobre resistencia a arsénico, realizado con aislados de la especie *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Krumova et al., 2008), la CMI frente a arseniato resultó ser más baja que las obtenidas para la estirpe CECT5344. De acuerdo con Jackson et al. (2005), cuando la resistencia a arseniato supera concentraciones de 100 mM se considera muy alta. En el mismo trabajo se indica que el valor más alto de CMI alcanzado por una de las bacterias aisladas en el estudio, señalada como "Fon15" y perteneciente al grupo de las betaproteobacterias, es de 400 mM para arseniato mientras que para arsenito, el valor máximo de tolerancia encontrado es de 10 mM y en este caso se corresponde con "Fon12", clasificada dentro del mismo grupo. Respecto a la tolerancia a arsenito, los estudios de Ghodsi et al. (2011), señalan que el 69% de las bacterias que fueron aisladas de un suelo contaminado con arsénico, y las cuales poseen mayores niveles de resistencia a arsenito, fueron gram positivas. Al igual que lo descrito en la bibliografía, en este trabajo también queda demostrado

que el arsenito es más tóxico que el arseniato. Además, las bacterias únicamente resistentes a arsenito son mucho menos habituales que las resistentes a arseniato en ambientes naturales (Joshi *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2007). Los genes de resistencia a arsénico están ampliamente extendidos, por ello no es sorprendente encontrar bacterias resistentes a arsénico incluso en ambientes en los que no se ha detectado este elemento. El incremento de los niveles de arsénico podría resultar en nuevas presiones selectivas que dieran lugar a bacterias más resistentes.

La fase de latencia en los cultivos de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con arsenito, arseniato o mercurio, aumentó con la concentración de estos compuestos (Fig. 4 y Fig. 5). Para el caso de las muestras que fueron tratadas con HgCl_2 , la bibliografía revisada contempla CMI similares pero también más altas, tal y como ocurre en los estudios realizados por Ruiz-Díez *et al.* (2012), en los que la bacteria más resistente entre los aislados extraídos de suelos contaminados con mercurio muestra una CMI de HgCl_2 de 30 μM .

2.- EFECTO DEL ARSÉNICO Y MERCURIO EN EL PROTEOMA DE *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

Además de estudiar la resistencia a arsénico y mercurio de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, en este trabajo se ha llevado a cabo un análisis proteómico de la respuesta de esta estirpe a estas sustancias tóxicas. Se realizó una réplica para cada condición y, como muestra la Tabla 4, especialmente para los geles de control y arseniato, no existe una gran variabilidad entre en el número de total de spots en las réplicas de cada tratamiento. Aunque no se observan grandes variaciones en el número de spots cuando se comparan los resultados obtenidos a partir de los cultivos control y los de los cultivos a los que se adicionó arsenito o arseniato, hay un aumento de proteínas expresadas en las muestras tratadas con el metaloide tal y como cabría esperarse.

Se han identificado cuatro spots (18, 20, 21 y 22 en la Tabla 5) relacionados con la resistencia específica a arsénico (sistema Ars) en las muestras tratadas con arsenito, pero ninguno en las tratadas con arseniato. Estos spots se corresponden con las tres arseniato reductasas presentes en el genoma de la estirpe CECT5344, así como con la proteína ArsH de función desconocida. La ausencia de estas proteínas Ars en células de *P. pseudoalcaligenes* cultivadas con arseniato puede ser debida a que la concentración ensayada de arseniato induzca de forma más débil la agrupación génica *ars*.

Entre los spots inducidos por arsénico también se han identificado varias proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos y producción de energía. Dos de estas proteínas inducidas por arsenito son la aconitato hidratasa (spot 13) y la succinato deshidrogenasa (spot 17), que forman parte del ciclo de Krebs. Por otro lado, el arsenito también induce la isocitrato liasa, enzima que participa en la ruta del glioxilato. Un estudio previo en *Rhodococcus* sp. NAU-1 evidenció que también se produce una inducción de la isocitrato liasa por arsenito y que junto con la inhibición de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa (específica del ciclo de Krebs) y la expresión de otras enzimas que forman parte de la ruta del glioxilato, el arsenito está produciendo un cambio en la ruta metabólica central del carbono derivándose al ciclo del

glioxilato (Jain et al., 2012). Los estudios realizados por Zhang et al. (2007) también describen la inducción por arseniato de algunas enzimas involucradas en el ciclo del glioxilato en *Comamonas* sp. CNB-1. Por otro lado, el análisis proteómico en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 revela que el arsenito reprime la enzima piruvato deshidrogenasa mientras que induce la acetil-CoA sintetasa, ambas enzimas encargadas de producir acetil-CoA. Esto indica que para mantener una concentración de acetil-CoA suficiente para los requerimientos metabólicos en presencia de arsenito, el cual reprime la piruvato deshidrogenasa, la bacteria sobreexpresa la acetil-CoA sintetasa. La detoxificación de arsénico es un proceso que requiere energía y podría por tanto inferirse que la bacteria potencia los mecanismos de obtención de energía mediante la sobreexpresión las enzimas implicadas en dichos procesos para alcanzar los requerimientos necesarios.

El arsénico, al igual que el mercurio, genera estrés oxidativo en los seres vivos. Entre otros mecanismos, este estrés oxidativo es causado por la reacción de estos metales y metaloides con los grupos sulfidrilos del centro activo de la tiorredoxina, enzima antioxidante. Por lo tanto, en presencia de arsénico las bacterias inducen una respuesta de defensa a estrés oxidativo (Ciprandi et al., 2012). En *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, la inducción por arseniato de la enzima tiol-peroxidasa (spots 39 y 41) y la inducción tanto por arseniato como por arsenito de la enzima succinato deshidrogenasa, sugieren que el arsénico también genera estrés oxidativo.

Frente a una condición de estrés, las bacterias pueden responder desencadenando una respuesta específica y/o una respuesta general. Entre los spots afectados por arsénico se han identificado varias proteínas de estrés universal (Usp). En el caso del arseniato se trata de los spots 34 y 35, pertenecientes a la misma proteína que se encuentra inducida, mientras que en presencia de arsenito las Usp (spots 3, 4 y 5) están reprimidas.

Entre los spots inducidos por arseniato se han identificado dos proteínas que participan en la homeostasis del hierro, la ferritina (spot 40) y la proteína reguladora de hierro Fur (spot 44). Estudios en levaduras evidencian que los sistemas de captación de hierro (Fet3–Ftr1) de *S. cerevisiae* facilitan la entrada de arseniato en la célula. En respuesta a la entrada de este tóxico, dichos sistemas se reprimen, provocando un déficit de hierro en la célula (Batista-Nascimento et al., 2013). Los datos obtenidos en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 sugieren que la inducción de la ferritina y de Fur podría responder a un déficit de hierro provocado por el arseniato. Por otro lado, el arseniato induce la flagelina (spot 32), principal componente del flagelo bacteriano. Estudios en *Rhizobium* sp. NT-26 revelan que la síntesis de los flagelos parece estar controlada por arsenito (Andres et al., 2013).

Entre las proteínas reprimidas por arsénico se encuentra la enzima alcohol deshidrogenasa (spot 2), que participa en la oxidación de alcoholes primarios y secundarios a aldehídos y cetonas, respectivamente. El hecho de que su expresión se reprima al entrar en contacto con metales pesados ha sido aprovechado en la monitorización de suelos contaminados con estos compuestos (Prell-Swaid et al. 2006). Otra enzima reprimida por arsénico es la ácido delta-aminolevulínico deshidratasa (spot 29), efecto previamente descrito en sangre de ratas (Bhadauria et al., 2004).

El estudio proteómico de los cultivos de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 tratados con mercurio ha revelado un número total de spots expresados bajo estas condiciones muy similar al de los cultivos control. No se ha identificado ninguna de las proteínas de la agrupación génica *mer* presente en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, lo que sugiere que estos genes son inactivos y no se transcriben en respuesta a mercurio, o bien que su inducción requiere una concentración de mercurio mayor.

Sin embargo y pese a lo que en principio cabría esperar, se induce una arseniato reductasa (spot 58), lo que podría sugerir el hecho de que los genes *ars* sean inducidos inespecíficamente por otros metales y metaloides. Estudios previos en *Nitrosomonas europaea* describen que la agrupación génica *mer* es inducida por cadmio (Park y Ely, 2008), por lo que podría ocurrir la misma inducción inespecífica de *ars* por mercurio. Otra posibilidad es que los genes *ars* estén induciéndose a través de una respuesta general de estrés. En este último sentido, entre los resultados aparece también la inducción por mercurio de UspA (spot 59).

Del mismo modo, el estrés inducido por mercurio también podría ser el responsable de la represión de MreB (spot 47, Tabla 6), tal y como describen Gong et al. (2000), aunque en su estudio esta proteína parece estar afectada de forma más significativa por Cd^{2+} y Cu^{2+} . Además esta represión podría estar ligada al cambio de aspecto de las colonias observado en los cultivos en LB sólido con concentración de mercurio 50-100 μM . La represión del factor de elongación P (EF-P, spot 50), es otro de los indicios que podrían señalar la puesta en acción de mecanismos contra el estrés. El déficit de esta enzima reprimida ocasionaría la inhibición de la síntesis de proteínas a nivel del ribosoma, algo coherente si se tiene en cuenta que bajo condiciones de estrés el proteoma de la célula debe adaptarse al ambiente cambiante. No obstante, en *P. putida* se ha observado que el estrés causado por altas concentraciones de mercurio induce un aumento generalizado de la expresión de proteínas siendo especialmente notable para aquellas que forman parte de los ribosomas (Doerfel y Rodnina, 2013). Por otro lado, Zou et al. (2011), han descrito que la pérdida de EF-P altera la integridad de la membrana externa bacteriana, lo cual podría ser otra explicación al cambio de morfología citado anteriormente que se observa en medio LB suplementado con mercurio, o bien ser uno de los factores influyentes en dicha respuesta. La inducción por mercurio de la proteína antioxidante de la familia AhpC/Tsa (spot 56), así como la inhibición de la tiorredoxina (spot 48), indican que el mercurio también genera estrés oxidativo. El mercurio forma enlaces covalentes con el glutatión reducido (GSH) y los residuos reducidos de cisteína de las proteínas tal y como Fanous et al. (2008) indican tras sus estudios realizados en *C. glutamicum* en los que también se evidencia la expresión de proteínas antioxidantes en respuesta a metales pesados.

La enzima aspartato-semialdehído deshidrogenasa aparece inhibida por mercurio (spot 46) Se ha descrito que en *E. coli* el mercurio es un potente inhibidor de la ruta de síntesis de la treonina, en la cual se incluye dicha enzima (Chassagnole et al., 2003). La identificación del spot 55 ha revelado las proteínas PhoP y PhoQ que desempeñan funciones de virulencia y de regulación de estrés y se activan por señales tales como baja concentración de Mg^{2+} , bajo pH o presencia de péptidos antimicrobianos, por tanto, también podría estar implicado en la respuesta al mercurio.

3.- ANÁLISIS PROTEÓMICO DE *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 EN RESPUESTA A CIANURO Y AL RESIDUO CIANURADO DE LA JOYERÍA

El análisis proteómico diferencial de las células cultivadas con NaCN versus residuo se realizó con el objetivo de identificar posibles proteínas inducidas en respuesta a metales pesados presentes en el residuo. Entre los metales más abundantes en este residuo se encuentran el Fe, el Cu y el Zn. De los spots diferenciales entre las dos condiciones utilizadas, aquellos inducidos por residuo serían posibles proteínas de respuesta a metales o a cualquier otro compuesto presente en el residuo y ausente en la condición control. De las 13 proteínas identificadas en este estudio (Tabla 8), ocho presentaron este patrón de expresión. De ellas, tres fueron inducidas exclusivamente a las 8 h, por lo que se considera que son proteínas de respuesta tardía al residuo. Curiosamente, ninguna de estas proteínas participa de forma directa en la respuesta a metales pesados. Únicamente la enzima FMN-dependiente NADH azoreductasa (spot 11), capaz de utilizar azoderivados (R-N=N-R') como sustratos, se ha descrito previamente que se induce en respuesta al estrés generado por metales pesados (Mugerfeld et al., 2009). Entre las proteínas inducidas por el residuo se encuentra también el transportador de cianato CynA (spot 6). En trabajos previos realizados en la estirpe CECT5344 se ha descrito que el cianuro induce la agrupación génica *cyn* responsable de la utilización de cianato como fuente de nitrógeno. Sin embargo, en este estudio sólo se ha observado la inducción de esta proteína en respuesta a residuo. Según las condiciones utilizadas en los trabajos previos, los genes *cyn* se inducen de forma más tardía por NaCN, por lo que la rápida inducción de CynA en respuesta a residuo observada en este estudio sugiere que el residuo podría contener cianato, el cual se podría formar por oxidación química del cianuro. La enzima glutaril-CoA deshidrogenasa (spot 7) es otra proteína inducida por el residuo. Estudios realizados por Blázquez et al. (2007), indican que en las estirpes *Pseudomonas* KB 740 y K 172 esta proteína se induce por benzoato y otros compuestos aromáticos bajo condiciones anaerobias, participando en la degradación de estos compuestos. Por otra parte, los spots 9, 11, 12 reflejan además un aumento de la respuesta al residuo conforme aumenta el tiempo de exposición.

Otro de los spots identificados en este estudio es NitF, una proteína codificada en la agrupación génica *nit1C* previamente descrita en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y que participa en la asimilación de cianuro (Estepa et al., 2012). Esta proteína se induce por NaCN y por el residuo, aumentando su inducción especialmente en este último. El crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en medios con cianuro o con el residuo es debido a la asimilación de cianuro como fuente de nitrógeno, por lo que cabe esperar la inducción de alguna de las proteínas Nit1C que participan en este proceso. Por otro lado, pese a que los patrones de expresión de los spots 2 y 9 son diferentes, su identificación reveló que correspondían a la misma proteína, la enzima ubiquinol citocromo-c reductasa. El diferente punto isoeléctrico que presentan estas dos formas de la misma proteína indica que está sufriendo una modificación post-traducciona dependiente de la presencia de cianuro o residuo.

Existe además otro grupo de proteínas identificadas en este estudio que se reprimen en respuesta al residuo (spots 1, 2, 3, 4 y 5). Solamente el spot 4, que corresponde a una proteína periplásmica que contiene el dominio Yce-I, no experimenta una inhibición total por el residuo.

Su función está relacionada con la síntesis de isoprenoides, moléculas esenciales para todos los organismos. El spot 5 se ha identificado de cómo una proteína de unión a cobre que transfiere electrones a las enzimas nitrito reductasa o arsenito oxidasa (Bond et al., 2001).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente Trabajo Fin de Máster, y en relación con los objetivos propuestos, se han extraído las siguientes conclusiones:

- *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria que presenta una alta resistencia a arsénico, tanto en su forma de arseniato como de arsenito, mientras que su resistencia a mercurio es más limitada.
- *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 induce una respuesta, a nivel de proteoma, diferente para el arsenito y el arseniato. En el primer caso se induce el sistema Ars de resistencia a arsénico, así como una respuesta a estrés oxidativo y a estrés general, mientras que para el arseniato no se ha identificado ninguna proteína de resistencia específica a arsénico, aunque sí están presentes las respuestas a estrés oxidativo y a estrés general.
- El mercurio genera estrés oxidativo en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, mientras que los genes del sistema Mer de resistencia a mercurio, presentes en el genoma de la bacteria no son funcionales o no se inducen, lo que podría explicar la baja resistencia de la estirpe al mercurio.
- A pesar de contener altas concentraciones de metales, el residuo cianurado de la joyería no induce una respuesta de resistencia específica a metales en la estirpe CECT5344.

BIBLIOGRAFÍA

- Acheampong M. A., Paksirajan K. Lens P. N. L. (2013). Assessment of the effluent quality from a gold mining industry in Ghana. *Environmental science and pollution research international*, 20 (6): 3799-3811.
- Allen R. C., Tu Y-K., Nevarez M. J., Bobbs A. S., Friesen J.W., Lorsch J. R., McCauley J. A., Voet J. G., Hamlett N. V. (2013). The mercury resistance (*mer*) operon in a marine gliding flavobacterium, *Tenacibaculum discolor* 9A5. *FEMS Microbiology Ecology*, 83 (1): 135-148.
- Andres J., Arsène-Ploetze F., [...], Bertin P. N. (2013) Life in an arsenic-containing gold mine: Genome and physiology of the autotrophic arsenite-oxidizing bacterium *Rhizobium* sp. NT-26. *Genome Biology and Evolution*, 5 (5): 934-953.
- Batista-Nascimento L., Toledano M. B., Thiele D. J., Rodrigues-Pousada C. (2013). Yeast protective response to arsenate involves the repression of the high affinity iron uptake system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833 (5): 997-1005.
- Bhadauria S., Flora S. J. (2003). Arsenic induced inhibition of delta-aminolevulinatase activity in rat blood and its response to meso 2,3-dimercaptosuccinic acid and monoisoamyl DMSA. *Biomedical and Environmental Sciences*, 17 (1): 101-8.
- Blázquez B., Carmona M., García J. L., Díaz E. (2007) Identification and analysis of a glutaryl-CoA dehydrogenase-encoding gene and its cognate transcriptional regulator from *Azoarcus* sp. CIB. *Environmental Biotechnology*, 10 (2): 474-82.
- Bond C. S., Blankenship R. E., Freeman H.C., Guss J. M., Maher M. J., Selvaraj F. M., Wilce M. C., Willingham K. M. (2001). Crystal structure of auracyanin, a "blue" copper protein from the green thermophilic photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *Journal of Molecular Biology*, 306 (1): 47-67.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brown N. L., Stoyanov J. V., Kidd S. P., and Hobman J. L. (2013). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 145-163.
- Chassagnole C., Quentin E., Fell D. A., Atauri de P., Mazat J. P. (2003). Dynamic simulation of pollutant effects on the threonine pathway in *Escherichia coli*. *Comptes Rendus Biologies*, 326 (5): 501-508.
- Ciprandi A., Azevedo-Barauna R., Valadares- Santos A., Costa- Goncalves. E, Peixe-Carepo M.S., Cruz-Schneider M.P., Silva A. (2012). Proteomic response to arsenic stress in *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Integrated Omics*, 2 (1): 60-73.
- Dash H. R., Das S. (2012). Bioremediation of mercury and the importance of bacterial *mer* genes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 75: 207-213.

- Doerfel L. K., Rodnina M. V. (2013). Elongation factor P: Function and effects on bacterial fitness. *Biopolymers*, 99 (11) :837-845.
- Elias M., Wellner A., Goldin-Azulay K., Chabriere E., Vorholt J. A., Erb T. J., Tawfik D. S. (2012). The molecular basis of phosphate discrimination in arsenate-rich environments. *Nature*, 491 (7422): 134-137.
- Estepa J., Luque-Almagro V. M., Manso I., Escribano M. P., Martínez-Luque M., Castillo F., Moreno-Vivián C., Roldán M. D. (2012). The *nit1C* gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involved in assimilation of nitriles is essential for growth on cyanide. *Environmental Microbiology Reports*, 4(3):326-334.
- Fanouf A., Weiss W., Görg A., Fritz J., Parlar H. (2008). A proteome analysis of the cadmium and mercury response in *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics*, 8 (23-24): 4976-4986.
- Ghodsi H., Hoodaji M., Tahmourespour A., Gheisari M.M. (2011). Investigation of bioremediation of arsenic by bacteria isolated from contaminated soil. *African Journal of Microbiology Research*, 5 (32): 5889-5895.
- Gong P., Ogra Y., Koizumi S. (2000). Inhibitory effects of heavy metals on transcription factor Sp1. *Industrial Health*, 38 (2): 224-227.
- Guimaraes J. R., Betancourt O., Rodrigues-Miranda M., Barriga R., Cueva E., Betancourt S. (2011). Long-range effect of cyanide on mercury methylation in a gold mining area in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*, 409 (23): 5026-5033.
- Huertas M. J., Michán C. (2012). Indispensable or toxic? The phosphate versus arsenate debate. *Microbial Biotechnology*, 6 (3): 209-211.
- Jackson C. R., Harrison K. G., Dugas S. L. (2005). Enumeration and characterization of culturable arsenate resistant bacteria in a large estuary. *Systematic and Applied Microbiology*, 28 (8): 727-734.
- Jain R., Adhikary H., Jha S., Jha A., Kumar G. N. (2012). Remodulation of central carbon metabolic pathway in response to arsenite exposure in *Rhodococcus* sp. strain NAU-1. *Microbial Biotechnology*, 5 (6): 764-772.
- Joshi D. N., Patel J. S., Flora S. J. S., Kalia K. (2008). Arsenic accumulation by *Pseudomonas stutzeri* and its response to some thiol chelators. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 13 (5): 257-263.
- Kruger M. C., Bertin P. N., Heipieper H. J., Arsène-Ploetze F. (2013). Bacterial metabolism of environmental arsenic - Mechanisms and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9):3827-3834.
- Krumova K., Nikolovska M., Groudeva V. (2008). Isolation and identification of arsenic-transforming bacteria from arsenic contaminated sites in Bulgaria. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22 (2): 721-728.

Lin Y-F., Yang J., Rosen B. P. (2007). ArsD: an As(III) metallochaperone for the ArsAB As(III)-translocating ATPase. *Journal of Bioenergetics*, 39 (5-6): 453-458.

Luque-Almagro V. M., Huertas M. J., Martínez-Luque M., Moreno-Vivián C., Roldán M. D., García-Gil L. J., Castillo F., Blasco R. (2005). Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2): 940-947.

Luque-Almagro V. M., Huertas M. J., Sáez L. P., Luque-Romero M., Moreno-Vivián C., Castillo F., Roldán M. D., Blasco R. (2008). Characterization of the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 cyanase, an enzyme that is not essential for cyanide assimilation. *Applied Environmental Microbiology*, 74 (20): 6280-6288.

Luque-Almagro V. M., Blasco R., Martínez-Luque M., Moreno-Vivián C., Castillo F., Roldán M. D. (2011). Bacterial cyanide degradation is under review: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a case of an alkaliphilic cyanotroph. *Biochemical Society Transactions*, 39 (1): 269-274.

Luque-Almagro V. M., Acera F., Igeño M. I., Wibberg D., Roldán M. D., Sáez L. P.[...], Blasco R.(2013). Draft whole genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Environmental Microbiology*, 15 (1): 253-270.

Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Mathema V. B., Thakuri B. C., Sillanpää M. (2011). Bacterial *mer* operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Archives of Microbiology*, 193 (12): 837-844.

Mugerfeld I., Law B. A., Wickham G. S., Thompson D. K. (2009). A putative azoreductase gene is involved in the *Shewanella oneidensis* response to heavy metal stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82 (6): 1131-1144.

Nascimento A. M., Chartone-Souza E. (2003). Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genetics and Molecular Research*, 2 (1): 92-101.

Páez-Espino D., Tamames J., De Lorenzo V., Cánovas D. (2009). Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals*, 22 (1): 117-123.

Park S., Ely R. L. (2008). Candidate stress genes of *Nitrosomonas europaea* for monitoring inhibition of nitrification by heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (17): 5475-5482.

Patel P. C., Goulhen F., Boothman C., Gault A. G., Charnock J. M., Kalia K., Lloyd J. R. (2006). Arsenate detoxification in a *Pseudomonas* hypertolerant to arsenic. *Archives of Microbiology*, 187 (3):171-183.

Prell-Swaid A., Schwedt G. (2006). A screening procedure for heavy metals in soil extracts by alcohol dehydrogenase and urease inhibition. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 22 (2): 70-75.

Rosen B. P., Liu Z. (2009). Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. *Environment International*, 35 (3): 512-515.

Ruiz-Díez B., Quiñones M. A., Fajardo S., López M. A., Higuera P., Fernández-Pascual M. (2012). Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Hg-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96 (2):543-554.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Straskraba, V., Moran, R. E.(1990). Environmental occurrence and impacts of arsenic at gold mining sites in the Western United States. *International Journal of Mine Water*, 9 (1-4): 181-191.

Velásquez-López P. C., Veiga M. M., Hall K. (2010). Mercury balance in amalgamation in artisanal and small-scale gold mining: identifying strategies for reducing environmental pollution in Portovelo–Zaruma, Ecuador. *Journal of Cleaner Production*, 18 (3): 226-232.

Velásquez-López P. C., Veiga M. M., Klein B., Shandro J. A., Hall K. (2011). Cyanidation of mercury-rich tailings in artisanal and small-scale gold mining: identifying strategies to manage environmental risks in Southern Ecuador. *Journal of Cleaner Production*, 19 (9-10): 1125-1133.

Wagner-Döbler I. (2003). Pilot plant for bioremediation of mercury-containing industrial wastewater, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62 (2-3): 124-133.

Wilson J. R., Leang C., Morby A. P., Hobman J. L., Brown N. L., (2000). MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters? *FEBS Letters*, 472 (1): 78-82.

Zhang Y., Ma Y-F., Qi S-W., Meng B., Chaudhry M. T., Liu S. Q., Liu S-J. (2007). Responses to arsenate stress by *Comamonas* sp strain CNB-1 at genetic and proteomic levels. *Microbiology*, 153 (11): 3713-3721.

Zou S. B., Roy H., Ibba M., Navarre W. W. (2011). Elongation factor P mediates a novel post-transcriptional regulatory pathway critical for bacterial virulence. *Virulence*, 2 (2): 147-151