



UNIVERSIDAD  
DE  
CÓRDOBA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Programa de Doctorado en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias  
(RD99/2011)

## Tesis Doctoral

**Identificación, caracterización de pequeños RNAs  
y dianas implicadas en la degradación de residuos  
cianurados de la joyería por *Pseudomonas  
pseudoalcaligenes* CECT5344**

Identification and characterization of small RNAs  
involved in detoxification of jewelry industrial  
cyanide-containing wastewaters by *Pseudomonas  
pseudoalcaligenes* CECT5344

### Directores:

Dra. María Dolores Roldán Ruiz y Dr. Víctor Manuel Luque Almagro

### Autor:

María Dolores Pérez Ramírez

Córdoba, marzo 2024

TITULO: *Identificación, caracterización de pequeños RNAs y dianas implicadas en la degradación de residuos cianurados de la joyería por Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT5344*

AUTOR: *María Dolores Pérez Ramírez*

---

© Edita: UCOPress. 2024  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---





# INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/ES DE LA TESIS

Este documento se presentará junto con el depósito de la tesis en <https://moodle.uco.es/ctp3/>



## DOCTORANDA/O

María Dolores Pérez Ramírez

## TÍTULO DE LA TESIS:

Identificación, caracterización de pequeños RNAs y dianas implicadas en la degradación de residuos cianurados de la joyería por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

## INFORME RAZONADO DE LAS/LOS DIRECTORAS/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)**

María Dolores Roldán Ruiz, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba y Víctor Manuel Luque Almagro, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba,

informan que,

La presente Tesis Doctoral, titulada "Identificación, caracterización de pequeños RNAs y dianas implicadas en la degradación de residuos cianurados de la joyería por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344", realizada por D<sup>ña</sup> María Dolores Pérez Ramírez, se ha desarrollado en el grupo BIO117 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba bajo nuestra dirección. Esta tesis doctoral reúne todas las condiciones exigidas, según la legalidad vigente. Su evolución y desarrollo ha seguido el plan de trabajo previsto, alcanzándose los objetivos previamente marcados. Durante el desarrollo de la tesis la doctoranda ha realizado una labor satisfactoria en el grupo de investigación y se ha implicado en el desarrollo y aprendizaje de nuevas metodologías, habiendo probado con solvencia sus capacidades investigadoras.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se han publicado en tres artículos de investigación en revistas de prestigio internacional, siendo la doctoranda primera autora en una de estas publicaciones, la cual constituye el criterio de calidad de la tesis (Perez et al., 2021. *Microbiology Spectrum*, 9,3:e0077721). También se han difundido los resultados derivados de esta tesis en cuatro congresos, dos internacionales y dos nacionales. La doctoranda también ha desarrollado su plan de formación de forma satisfactoria, realizando tanto las actividades obligatorias como varias optativas, incluyendo actividades divulgativas y cursos de perfeccionamiento.

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

Córdoba, a 21 de marzo de 2024

Las/los directoras/es

Fdo.: María Dolores Roldán Ruiz y Víctor M.  
Luque Almagro



Este trabajo ha sido financiado con el proyecto **RTI2018-099573-B-I00**  
del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades



“Es justamente la posibilidad de realizar un sueño lo que hace que la vida sea interesante.”

Paulo Coelho, El Alquimista.



A mis padres

A Rafa

A mi bebé



## Agradecimientos

Tras varios años en el mundo de la investigación, sólo tengo palabras de agradecimiento para todas y cada una de las personas que, de un modo u otro, han hecho posible este sueño.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, los Doctores María Dolores Roldán Ruiz y Víctor Manuel Luque Almagro, no encuentro palabras suficientes para agradecerlos todo lo que me habéis enseñado. Gracias por haber confiado en mí y ayudarme a alcanzar este logro. Lola, gracias por tu sabiduría, dedicación y palabras de aliento para abrazar el camino de la investigación. Víctor, eternamente agradecida por tu tiempo, tu conocimiento, tu apoyo y tu disponibilidad absoluta para todo lo que he necesitado. Esta tesis es también tuya. A ambos gracias por vuestra labor de dirección, sin la cual hubiese estado perdida.

Gracias al Doctor Conrado Moreno Vivian por acogerme desde un primer momento en su magnífico grupo de investigación, gracias por la oportunidad y tu profesionalidad.

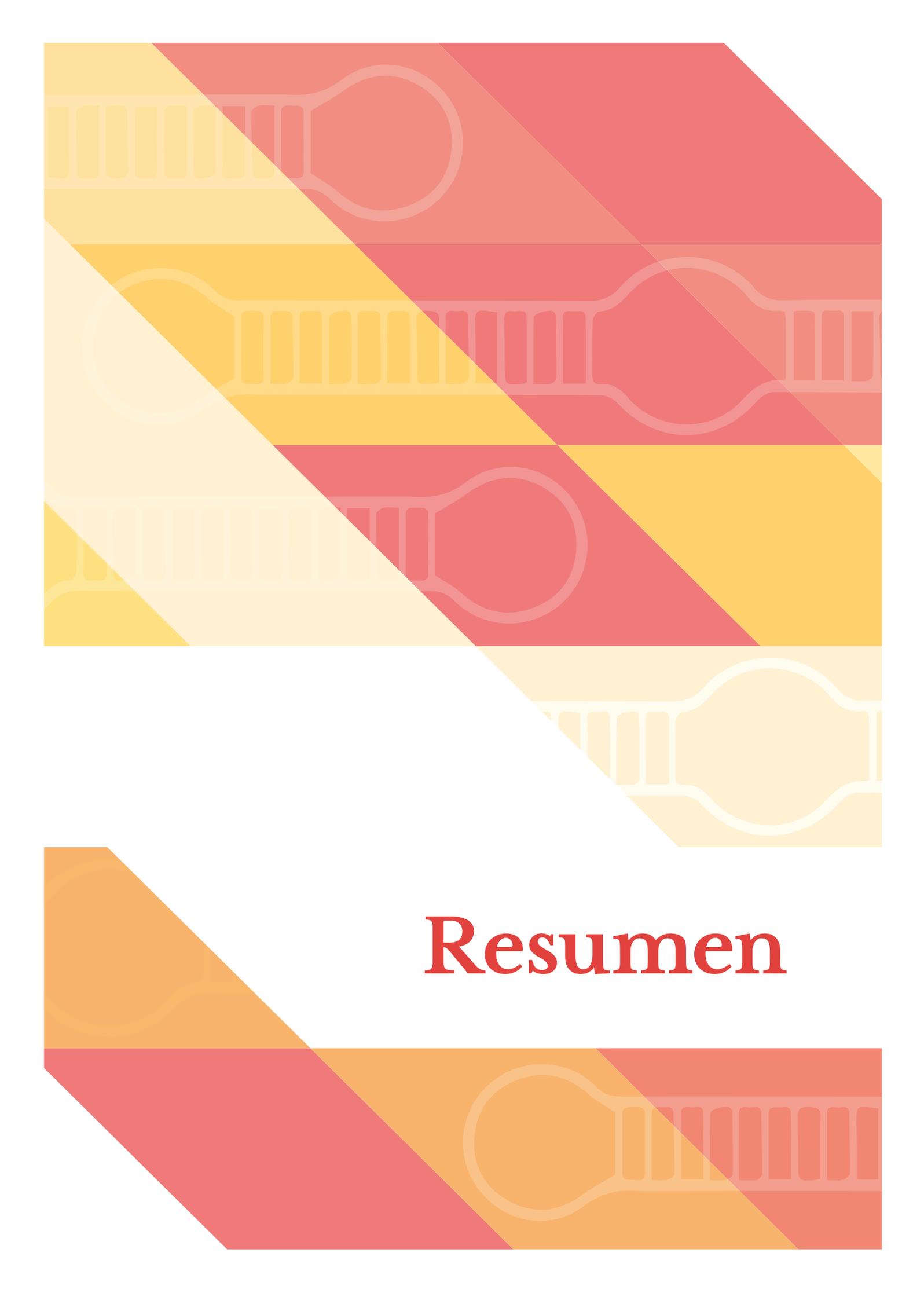
A mis compañeras y compañeros de laboratorio, porque hemos compartido más que experimentos y datos científicos. Hemos compartido risas, frustraciones, descubrimientos y sueños. Lara, gracias por ayudarme a encontrar la solución a cualquier problema que se presentara, siempre has estado ahí para echar una mano y ¡qué mano! Gracias por tu pasión y tus puntos de vista, no solo referentes a la investigación sino a la vida en general. Karol, mi rubia, gracias por ser un ser de luz y tener siempre una sonrisa y un comentario amable, aunque las cosas no hayan sido siempre positivas. Gema, gracias por ser un apoyo, ha sido un lujo poder aprender de ti, de tus conocimientos y tu saber estar. Noelia, gracias por estar siempre disponible cuando he necesitado tu ayuda. Gracias por ser mis aliadas en esta travesía científica. Vuestra amistad es un tesoro que espero dure siempre. Carlos, como ya te he dicho en alguna ocasión, de mayor me gustaría ser como tú porque he conocido muy pocas personas tan grandes. Puri, gracias por tu tiempo y tus enormes conocimientos de HPLC. Y por supuesto, a Alfonso, por su inestimable ayuda con la proteómica y a Diego, que me alegra verte seguir tu carrera investigadora, y a todos aquellos compañeros que han pasado por el Departamento y que, de alguna forma, han hecho más fácil mi trabajo.

Al profesor Pedro Piedras, gracias por brindarme su laboratorio como mío y a Goyi por sus lecciones de HPLC y nuestras charlas de huerto. Al grupo de Emilio Fernández, por ofrecer su equipamiento.

Agradecer cómo no de forma especial a mi familia, por ser mi apoyo incondicional en todo momento. Gracias por vuestras palabras de aliento, vuestras sonrisas y vuestro amor han sido mi combustible. A mi hermano Manolo, por siempre mostrarme su cariño y no dudar ni un segundo de que este logro lo conseguiría. A mis padres, Manuel y Antonia, porque me habéis enseñado que en esta vida todo se puede conseguir con trabajo y constancia. A ellos, que siempre han tenido palabras de cariño en cada llamada telefónica, en cada abrazo. Gracias por ser mi red de seguridad, por celebrar mis triunfos y por secar mis lágrimas en los momentos difíciles. A mis abuelos que ojalá desde arriba estén orgullosos, ya que como mi abuelo Manuel me decía “niña tú estudia, aunque sea para practicante”, y mírame ahora abuelo, camino de ser doctora. A mi otra familia, mi familia política, porque sois parte importante de mi vida, y porque siempre habéis tenido palabras de apoyo. Gracias a mi cuñado Javi por la portada.

No puedo olvidarme de mi amor, mi confidente, mi compañero de vida, de ti Rafa, porque jamás tendré las palabras suficientes para agradecerte tu paciencia, tu comprensión, tu apoyo, tu amor y tu soporte. Porque nadie, solo tú, sabe hacerme reír y desconectar en los momentos difíciles. Y porque nunca me han faltado esos besos y abrazos que me recargaban de energía. Tú más que nadie has soportado mis estados de ánimo durante esta andadura, gracias por creer en mis sueños y por ser mi mayor motivación. Tu confianza ha sido el motor para seguir adelante porque estoy segura de que no lo hubiese conseguido, a ti, te debo esta tesis. Y, por último, a esta vida que está creciendo dentro de mí y que ha vivido estos últimos momentos con nosotros, espero que en un futuro sientas orgullo por tu madre porque estaré ahí para ayudarte a alcanzar todo lo que te propongas en esta vida, bebé.

Cada uno de ustedes ha dejado una huella imborrable en mi corazón. Este logro no es solo mío, sino también vuestro. ¡Gracias por ser parte de mi historia!



# Resumen



## Resumen

Los contaminantes suponen un grave problema medioambiental y de salud pública, especialmente aquellos residuos industriales tóxicos que contiene cianuro y metales pesados procedentes de las industrias joyera y minera. El cianuro es un compuesto de elevada toxicidad que inhibe metalo-enzimas esenciales como la citocromo c oxidasa de la cadena de transporte de electrones. Aunque tradicionalmente se han usado métodos físico-químicos para tratar los residuos cianurados, la utilización de técnicas de biorremediación mediante el empleo de microorganismos cianotrofos que asimilan cianuro ofrecen una alternativa más sostenible y segura. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344 es una bacteria alcalófila y cianotrofa que asimila cianuro libre, complejos cianuro-metálicos y otros compuestos cianoderivados en condiciones alcalinas, minimizando así la formación de ácido cianhídrico e incrementando la eficiencia y seguridad del proceso de degradación de cianuro. Esta bacteria presenta una oxidasa terminal insensible a cianuro CioAB y una nitrilasa NitC esencial para la asimilación de cianuro. Estos procesos de resistencia y asimilación de cianuro están conectados por una malato:quinona oxidorreductasa, la cual proporciona, por un lado, electrones a CioAB para llevar a cabo la respiración celular, y por otro oxalacetato, que reacciona con el cianuro para formar la cianhidrina que utiliza como sustrato NitC. Se han descrito diferentes bacterias cianotrofas y rutas de asimilación de cianuro, aunque la regulación de este proceso no ha sido caracterizada en detalle hasta la fecha. Este trabajo se ha centrado en la identificación de pequeños RNAs en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 que participan en la regulación de la biodegradación del cianuro presente en los residuos generados por la industria joyera. Mediante RNA-Seq se han identificado 16 pequeños RNAs con posibles funciones reguladoras, los cuales se encontraron diferencialmente expresados con el residuo de la joyería. De todos los pequeños RNAs identificados, sRNA649, sRNA14 y sRNA222, los cuales se encontraron inducidos por cianuro, fueron los que presentaron un mayor número de dianas, entre las que se incluyen genes pertenecientes a las agrupaciones génicas *nit1C*, *cioAB-nit4*, *ure* y *gln*. Una de las dianas específicas de sRNA649 fue un transportador de citrato DctM. La caracterización fisiológica con el residuo de la joyería o metales del mutante DctM<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 ha revelado, por su deficiencia para crecer en presencia de metales, que el citrato puede ser una molécula clave para que la degradación de cianuro se realice en condiciones óptimas, ya que este ácido tricarbóxico podría actuar como un quelante de hierro en condiciones cianotróficas. Se ha demostrado en estudios previos que la adición de citrato al medio de cultivo de la estirpe CECT 5344 provoca una degradación de concentraciones más elevadas de cianuro en reactor. La agrupación génica *cioAB-nit4* codifica la nitrilasa Nit4, responsable de la asimilación de 3-cianoalanina en la estirpe CECT 5344 en presencia de cianuro. Aunque esta

estirpe carece de una 3-cianoalanina sintasa funcional, el análisis del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 reveló la existencia de posibles vestigios de una 3-cianoalanina sintasa en esta estirpe. Además, una caracterización fisiológica y proteómica de los mutantes Nit4<sup>-</sup> y NitC<sup>-</sup> ha permitido dilucidar una nueva ruta de asimilación de 3-cianoalanina a través de la nitrilasa NitC, la cual utiliza como sustrato un hipotético nitrilo que es generado tras la desaminación del grupo  $\alpha$ -amino de la 3-cianoalanina. Esta ruta alternativa tiene lugar en ausencia de cianuro, condiciones en las que Nit4 no se expresa. El fenotipo del mutante doble NitC<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> en presencia de cianuro indicó que la 3-cianoalanina es asimilada principalmente a través de la nitrilasa Nit4, aunque también estaría implicada la nitrilasa NitC. Por otro lado, se ha abordado un estudio proteómico detallado de la respuesta a cianuro de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Entre los procesos inducidos por cianuro se han encontrado la resistencia y asimilación de cianuro, homeostasis de metales, metabolismo de aminoácidos y biosíntesis de cofactores, asimilación de fuentes de nitrógeno alternativas y respuesta frente a estrés oxidativo. Un análisis mutacional de los mutantes Nit<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 ha revelado que la mayoría de las proteínas codificadas por la agrupación génica *nit1C* son importantes para la degradación de cianuro, con especial relevancia de las proteínas NitA, NitB, NitC y NitE. Además, se ha llevado a cabo un análisis proteómico de los mutantes Nit<sup>-</sup> en condiciones cianotróficas, estableciéndose una relación entre estas proteínas y los procesos asimilación/resistencia a cianuro, homeostasis de metales, asimilación de otras fuentes nitrogenadas, con especial énfasis en la ruta de biosíntesis de arginina, metabolismo de nucleótidos biosíntesis de cofactores, como el ácido fólico, y formación de biofilm. La L-arginina se ha descrito como una molécula relevante para la formación de biofilm. Además, el tetrahidrofolato tiene un papel crucial como cofactor en varios pasos de la síntesis *de novo* de purinas, así como de forma indirecta en la modificación de algunas bases nitrogenadas pirimidínicas.

## Abstract

Contaminants pose a serious environmental and public health problem, especially toxic industrial wastes containing cyanide and heavy metals from the jewellery and mining industries. Cyanide is a highly toxic compound that inhibits essential metalloenzymes such as cytochrome *c* oxidase in the electron transport chain. Although physico-chemical methods have traditionally been used to treat cyanide-containing waste, the use of bioremediation techniques involving cyanotrophic microorganisms that assimilate cyanide offers a more sustainable and safer alternative. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344 is an alkalophilic and cyanotrophic bacterium that assimilates free cyanide, cyanide-metal complexes, and other cyanoderivatives under alkaline conditions, thus minimizing the formation of hydrogen cyanide and increasing the efficiency and safety of the cyanide degradation process. This bacterium possesses a cyanide-insensitive terminal oxidase (CioAB) and a nitrilase (NitC) essential for cyanide assimilation. These cyanide resistance and assimilation processes are connected by a malate:quinone oxidoreductase, which provides electrons to CioAB for cellular respiration and produces oxaloacetate that reacts with cyanide to form the cyanohydrin substrate utilized by NitC. Various cyanotrophic bacteria and cyanide assimilation pathways have been described so far, but the regulation of this process has not been thoroughly characterized to date. This study is focused on identifying small RNAs involved in the regulation of cyanide biodegradation in jewellery waste by *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Through RNA-Seq, 16 small RNAs with potential regulatory functions were identified, and their expression was found to be upregulated by the jewellery waste. Of all the identified small RNAs, sRNA649, sRNA14, and sRNA222, which were induced by cyanide, had the highest number of targets. These targets include genes that belong to the *nit1C*, *cioAB-nit4*, *ure*, and *gln* gene clusters. One specific target of sRNA649 was the citrate transporter DctM. Physiological characterization of the DctM<sup>-</sup> mutant of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344 grown in the presence with jewellery waste or metals revealed that citrate could be a key molecule for optimal cyanide degradation. Under cyanotrophic conditions, citrate may act as an iron chelator. Previous studies have demonstrated that addition of the citrate in the culture medium of the strain CECT 5344 leads to the degradation of higher cyanide concentrations in a reactor. The *cioAB-nit4* gene cluster encodes the nitrilase Nit4, responsible for the assimilation of 3-cyanoalanine in the strain CECT 5344 in the presence of cyanide. Although this strain lacks a functional 3-cyanoalanine synthase, genome analysis of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344 revealed possible remnants of a 3-cyanoalanine synthase in this bacterium. Furthermore, physiological and proteomic characterization of Nit4<sup>-</sup> and NitC<sup>-</sup> mutants has elucidated a novel pathway for 3-cyanoalanine assimilation through the NitC nitrilase. This pathway utilizes a hypothetical

nitrile generated after the  $\alpha$ -amino group deamination of 3-cyanoalanine. This alternative route occurs in the absence of cyanide, a condition under which Nit4 is not expressed. The phenotype of the NitC<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> double mutant in the presence of cyanide indicates that 3-cyanoalanine is primarily assimilated via the Nit4 nitrilase, although NitC may also be involved. Additionally, a detailed proteomic study of the response of *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 to cyanide has been undertaken. Among the processes induced by cyanide, we have identified cyanide resistance and assimilation, metal homeostasis, amino acid metabolism, cofactor biosynthesis, assimilation of alternative nitrogen sources, and response to oxidative stress. An analysis of Nit<sup>-</sup> mutants in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344 has revealed that most proteins encoded by the *nit1C* gene cluster are important for cyanide degradation, with special relevance to the NitA, NitB, NitC, and NitE proteins. Additionally, a proteomic analysis of Nit<sup>-</sup> mutants under cyanotrophic conditions has established a relationship between these proteins and cyanide assimilation/resistance, metal homeostasis, assimilation of other nitrogen sources, with particular emphasis on the arginine biosynthesis pathway, nucleotide metabolism, and cofactor biosynthesis, such as folic acid. L-arginine has been described as a relevant molecule for biofilm formation. Furthermore, tetrahydrofolate plays a crucial role as a cofactor in several steps of *de novo* purine synthesis, as well as indirectly in the modification of certain pyrimidine nitrogenous bases.

## Abreviaturas

°C	Grados Celsius
2D-PAGE	Electroforesis bidimensional en gel de acrilamida
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CAS	3-cianoalanina sintasa
cDNA	DNA complementario
CFU	Unidades formadoras de colonias
CNA	3-ciano-L-alanina
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAD/FADH <sub>2</sub>	Forma oxidada/reducida del dinucleótido de flavina y adenina
FC	"Fold Change" o cambio de expresión
FDR	"False Discovery Rate"
Gm	Gentamicina
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IEF	Isoelectroenfoco
IPTG	Isopropil-β-D-galactopiranosido
Kan	Kanamicina
Kb	Kilobases
Kd	Constante de disociación
LB	Luria-Bertani
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
MALDI-TOF	"matriz-assisted laser desorption ionization, time of fly"
MQO	Malato:quinona oxidoreductasa
N <sup>5</sup> -CAIR	N <sup>5</sup> -carboxiaminoimidazol ribonucleótido
NAD <sup>+</sup> /NADH	Forma oxidada/reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina
Nx	Ácido nalidíxico
p/v	Relación peso/volumen
PAGE	Electroforesis en gel de poli(acrilamida)
pb	Pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales
PCBs	Policlorobifenilos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHAs	Polihidroxialcanoatos
PLP	Piridoxal fosfato
ppm	partes por millón
PSM	"Peptide Spectrum Matches"
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RIN	Número de integridad
RNA	Ácido ribonucleico
RNA seq	Secuenciación de RNA

RNAsa	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Reacción de retrotranscripción
sRNA	pequeños RNAs
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
™ o ®	Marca Registrada
UQ/UQH <sub>2</sub>	Forma oxidada/reducida de la ubiquinona
UV	Ultravioleta
v/v	Relación volumen/volumen
XIC	Cromatograma de ión extraído

---

# ÍNDICE

---

## INTRODUCCIÓN

---

1. La contaminación ambiental.....	1
1.1. Tipos de contaminación.....	2
1.2. Problemas medioambientales derivados de actividades antropogénicas .....	3
1.3. Control y legislación .....	4
2. La biotecnología ambiental.....	6
2.1. Aproximaciones ómicas aplicadas a la biorremediación de contaminantes ambientales .....	9
3. El cianuro.....	10
3.1. Naturaleza química del cianuro .....	10
3.2. Cianuro y el origen de la vida .....	11
3.3. Fuentes de producción de cianuro .....	12
3.3.1. Fuentes naturales .....	13
3.3.2. Fuentes antropogénicas .....	14
3.4. Toxicidad del cianuro .....	19
3.5. Tratamientos para la descontaminación de cianuro.....	20
3.5.1. Métodos fisicoquímicos para la descontaminación de cianuro .....	20
3.5.2. Degradación de cianuro mediante el uso de microorganismos .....	23
3.5.2.1. Rutas de asimilación de cianuro inorgánico.....	24
3.5.2.2. Rutas de asimilación de cianuro orgánico .....	26
4. Metabolismo del cianuro en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	28
5. Técnicas ómicas aplicadas al estudio de la biodegradación de cianuro: cianómica.....	31

---

## OBJETIVOS

---

1. Objetivos.....	35
-------------------	----

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

1. Material biológico .....	37
1.1. Estirpes bacterianas.....	37
1.2. Plásmidos.....	38
2. Medios y condiciones de cultivo .....	39
2.1. Medios de cultivo.....	39
2.2. Condiciones de cultivo.....	40
3. Conservación y mantenimiento de los cultivos .....	41
4. Curvas de crecimiento .....	41
5. Preparación de extractos acelulares de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	41

6. Determinaciones analíticas.....	42
6.1. Medida del crecimiento celular .....	42
6.2. Determinación de la concentración de cianuro .....	42
6.3. Determinación de la concentración de amonio .....	42
6.4. Determinación de la concentración de proteína.....	43
6.5. Análisis de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta resolución.....	43
6.6. Análisis de ácidos orgánicos carboxílicos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV) .....	44
6.7. Ensayos enzimáticos.....	45
6.7.1. Determinación de la actividad nitrilasa .....	45
6.7.2. Determinación de la actividad cianasa .....	45
7. Técnicas de manipulación del DNA/RNA .....	45
7.1. Aislamiento de DNA .....	45
7.1.1. Aislamiento de DNA total.....	45
7.1.2. Aislamiento de DNA plasmídico .....	46
7.2. Cuantificación de ácidos nucleicos/ribonucleicos .....	46
7.3. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR .....	46
7.4. Separación electroforética de ácidos nucleicos .....	47
7.5. Purificación de fragmentos de DNA.....	47
7.6. Digestión del DNA con endonucleasas de restricción.....	47
7.7. Ligación de fragmentos de DNA.....	48
7.8. Preparación y transformación de células competentes.....	48
7.9. Transferencia de plásmidos por conjugación.....	49
7.10. Secuenciación de fragmentos de DNA .....	49
8. Aislamiento y purificación del RNA total de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	49
9. Análisis transcripcional mediante qRT-PCR .....	50
10. Identificación de sRNA y sus dianas en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	51
10.1. Preparación de la librería de sRNA y secuenciación .....	51
10.2. Predicción y análisis bioinformático de los sRNA .....	51
10.3. Identificación de sRNA por RT-PCR.....	52
10.4. Validación de las dianas de los sRNA por qRT-PCR.....	52
11. Construcción de estirpes mutantes de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	52
11.1. Obtención de los mutantes DctM <sup>-</sup> .....	53
11.2. Obtención de los mutantes Nit1 <sup>-</sup> , Nit2 <sup>-</sup> , Nit4 <sup>-</sup> , Nit5 <sup>-</sup> , Nit6 <sup>-</sup> y Nit7 <sup>-</sup> .....	53
11.3. Obtención de los mutantes MocR <sup>-</sup> y GntR <sup>-</sup> .....	54
11.4. Generación de los mutantes NitD <sup>-</sup> y NitF <sup>-</sup> .....	55
12. Análisis proteómico cuantitativo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).....	56

12.1. Preparación de las muestras .....	56
12.2. Separación e identificación de péptidos mediante espectrometría de masas .....	56
12.3. Análisis de los datos .....	57
13. Tratamiento estadístico de los datos y análisis bioinformático de secuencias.....	58
14. Material químico.....	59

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### **CAPÍTULO I: Análisis de pequeños RNAs implicados en la regulación de la degradación de cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344**

Resultados .....	63
Identificación de los sRNA de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 en condiciones cianotróficas .	63
Análisis de los sRNA involucrados en la detoxificación del residuo cianurado por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	65
Distribución bacteriana de los sRNA identificados en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	67
Dianas de los sRNA de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 expresados en condiciones cianotrofas	69
Mutagénesis del gen <i>dctM</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	74
Discusión.....	78

### **CAPÍTULO II: Asimilación de 3-cianoalanina por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344**

Resultados .....	83
Búsqueda de una posible CNA sintasa en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	84
Análisis proteómico diferencial de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 en respuesta a CNA.....	87
Caracterización de la asimilación de CNA en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	94
Discusión.....	99

### **CAPÍTULO III: Caracterización molecular de la agrupación génica *nit1C* de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344**

Resultados .....	103
Análisis mutacional de la agrupación génica <i>nit1C</i> y caracterización fisiológica de los mutantes Nit <sup>-</sup> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	104
Análisis proteómico de las cepas WT y mutantes Nit <sup>-</sup> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 en respuesta a cianuro.....	109
Comparación de los análisis proteómicos (WT cianuro vs. amonio) y (mutantes Nit <sup>-</sup> vs. WT en cianuro) de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 534 .....	113
Análisis de las proteínas con expresión diferencial identificadas específicamente en el proteoma de cada mutante Nit <sup>-</sup> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	125
Discusión.....	131

---

## CONCLUSIONES

---

Conclusiones.....	155
-------------------	-----

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

Bibliografía.....	156
-------------------	-----

---

MATERIAL SUPLEMENTARIO

---

Material suplementario..... 173

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1.	Acontecimientos ligados a la Revolución Industrial .....	1
Figura 2.	Tipos de biorremediación y factores relevantes .....	7
Figura 3.	Proporción HCN/CN <sup>-</sup> en función del pH .....	10
Figura 4.	Utilización de cianuro por en diferentes tipos de industrias .....	15
Figura 5.	Desastres medioambientales ocasionados por el cianuro y sus derivados .....	18
Figura 6.	La citocromo c oxidasa de la cadena de transporte electrónico como diana de cianuro .....	19
Figura 7.	Rutas de asimilación de cianuro en bacterias .....	24
Figura 8.	Sitio activo de la nitrilasa NIT4 .....	26
Figura 9.	Cadena de transporte electrónico y ruta de asimilación de cianuro en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	29
Figura 10.	Reacción de dansilación de los aminoácidos .....	42
Figura 11.	Localización en el genoma de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 de los sRNA expresados en respuesta al residuo cianurado .....	65
Figura 12.	Predicción de la estructura secundaria de los 20 sRNA expresados en respuesta al residuo cianurado de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	66
Figura 13.	Validación por RT-PCR de los sRNA de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 identificados mediante RNA-Seq .....	67
Figura 14.	Distribución bacteriana de los sRNA de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 afectados por el residuo joyero .....	68
Figura 15.	Genes regulados por los sRNA de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 en respuesta al residuo cianurado .....	72
Figura 16.	Estrategia de mutagénesis del gen <i>dctM</i> para la construcción del mutante DctM <sup>-</sup> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	75
Figura 17.	Caracterización del mutante DctM <sup>-</sup> de <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 en presencia de metales o residuo de la joyería .....	76
Figura 18.	Alineamiento de secuencias de la región intergénica <i>cysK1-cysK3</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 con la región intermedia de las CNA sintasas de <i>P. putida</i> y <i>G. stearothermophilus</i> .....	85
Figura 19.	Análisis filogenético de CNA sintasas y homólogos identificados en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	86
Figura 20.	Análisis de componentes principales (PCA) de los datos proteómicos de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	87
Figura 21.	Diagramas de Venn de las proteínas de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 procedentes del análisis proteómico a partir de células cultivadas con amonio, CNA o residuo cianurado .....	88
Figura 22.	Análisis de enriquecimiento de ontologías génicas correspondientes a las proteínas de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 expresadas diferencialmente en respuesta a CNA .....	89

Figura 23. Análisis transcripcional de genes de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 que codifican proteínas expresadas diferencialmente en respuesta a CNA (A) o residuo (B) .....	93
Figura 24. Estrategia de mutagénesis desarrollada para la construcción de los mutantes Nit2 <sup>-</sup> , Nit4 <sup>-</sup> , Nit5 <sup>-</sup> , Nit6 <sup>-</sup> y Nit7 <sup>-</sup> de la estirpe CECT 5344 .....	95
Figura 25. Crecimiento de la cepa silvestre de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 y los mutantes deficientes en distintas nitrilasas en medio mínimo con amonio (A), CNA (B) o CNA + cianuro (C).....	97
Figura 26. Crecimiento de la cepa silvestre de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 y los mutantes MocR <sup>-</sup> y MocR <sup>-</sup> /Nit4 <sup>-</sup> con CNA .....	98
Figura 27. Rutas de asimilación de CNA en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 en presencia o ausencia de cianuro.....	101
Figura 28. Estrategia de mutagénesis del mutante NitD <sup>-</sup> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	105
Figura 29. Comprobación mediante PCR de los mutantes NitD <sup>-</sup> y NitF <sup>-</sup> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	106
Figura 30. Crecimiento de las estirpes WT y Nit <sup>-</sup> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 en presencia de cianuro.....	108
Figura 31. Análisis comparativo de los proteomas de la estirpe WT de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 cultivadas con cianuro o amonio.....	109
Figura 32. Análisis del componente principal de los proteomas de las estirpes WT y mutantes Nit <sup>-</sup> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	111
Figura 33. Proteínas con expresión diferencial en los proteomas de mutantes Nit <sup>-</sup> con respecto al proteoma de la WT de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 en respuesta a cianuro.....	112
Figura 34. Enriquecimiento funcional de las proteínas expresadas diferencialmente en proteoma de WT con respecto a los mutantes Nit <sup>-</sup> .....	113
Figura 35. Proteínas expresadas diferencialmente en los análisis proteómicos (WT cianuro vs. amonio y mutantes Nit <sup>-</sup> vs. WT cianuro) de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	114
Figura 36. Proteínas relevantes expresadas diferencialmente entre la estirpe WT comparada con el proteoma del mutante NitA <sup>-</sup> <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	126
Figura 37. Proteínas relevantes expresadas diferencialmente entre la estirpe WT comparada con el proteoma del mutante NitB <sup>-</sup> <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	127
Figura 38. Proteínas relevantes expresadas diferencialmente entre la estirpe WT comparada con el proteoma del mutante NitC <sup>-</sup> <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	128
Figura 39. Proteínas relevantes expresadas diferencialmente entre la estirpe WT comparada con el proteoma del mutante NitE <sup>-</sup> <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	129
Figura 40. Proteínas relevantes expresadas diferencialmente entre la estirpe WT comparada con el proteoma del mutante NitH <sup>-</sup> <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	130
Figura 41. Ruta de biosíntesis de arginina afectada en los mutantes Nit <sup>-</sup> .....	148

Figura 42. Metabolismo de la arginina afectado en los mutantes Nit <sup>-</sup> .....	149
Figura 43. Ruta de biosíntesis y recuperación de bases/nucleósido/nucleótidos afectados en los mutantes Nit <sup>-</sup> .....	151
Figura 44. Ruta de biosíntesis de folato afectada en los mutantes Nit <sup>-</sup> .....	152

---

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1.	Tipos de contaminación ambiental .....	2
Tabla 2.	Principales destrastres medioambientales .....	4
Tabla 3.	Fuentes de producción de cianuro .....	12
Tabla 4.	Procesos fisicoquímicos para la descontaminación de cianuro.....	21
Tabla 5.	Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.....	37
Tabla 6.	Plásmidos empleados en este trabajo.....	38
Tabla 7.	Composición de los medios de cultivo bacterianos empleados .....	40
Tabla 8.	Antibióticos utilizados .....	40
Tabla 9.	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	59
Tabla 10.	Identificación y caracterización de los sRNA involucrados en la detoxificación del residuo cianurado de la joyería .....	64
Tabla 11.	qRT-PCR de genes diana de los sRNA expresados en condiciones cianotrófas de la estirpe CECT 5344.....	71
Tabla 12.	Proteínas relevantes inducidas por CNA y/o el residuo joyero cianurado en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	90
Tabla 13.	Determinación de la actividad nitrilasa NitC en las estirpes WT y Nit <sup>-</sup> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	107
Tabla 14.	Proteínas identificadas en el análisis proteómico comparativo WT vs. mutantes Nit <sup>-</sup> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	110
Tabla S1.	Posibles dianas de los sRNA identificados en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .	172
Tabla S2.	Proteínas diferencialmente expresadas en células de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 cultivadas en CNA y amonio como control .....	178

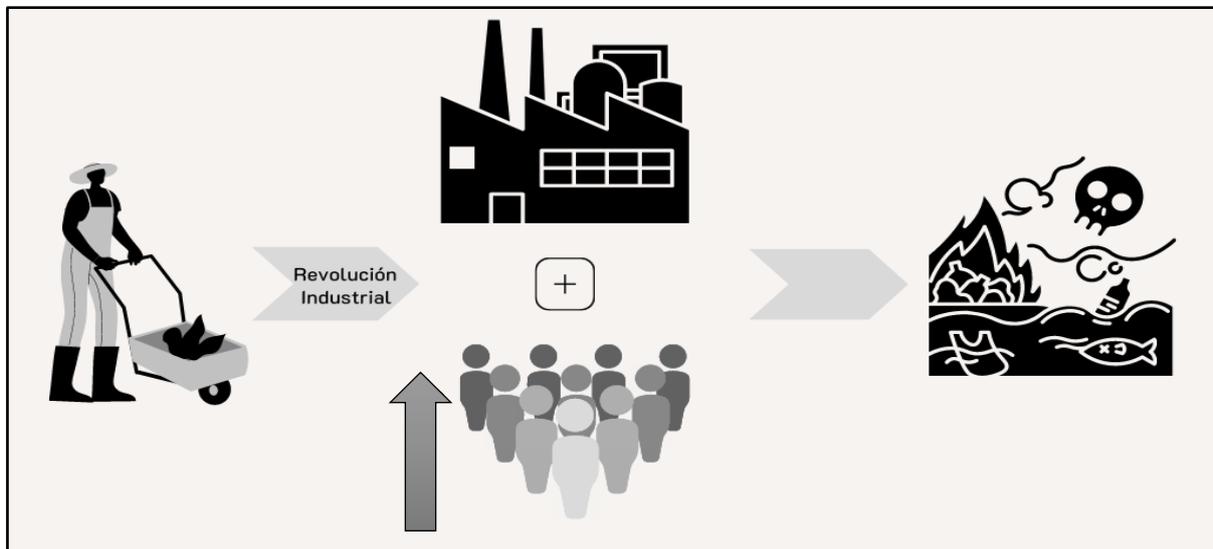


# Introducción



## 1. La contaminación ambiental

La revolución industrial que comienza en Gran Bretaña a finales del siglo XVIII supuso un gran hito para el hombre. El desarrollo industrial impulsó un conjunto de transformaciones económicas, tecnológicas y sociales para el ser humano no vividas desde el Neolítico. Estos cambios hicieron virar una economía rural basada en la agricultura y el comercio hacia una dependiente de la industria y la producción a gran escala. Gracias a la revolución industrial, se comenzó a fabricar en línea numerosos productos, multiplicando la producción, disminuyendo su tiempo de fabricación y abaratando su coste de producción, lo que permitió una mayor accesibilidad a éstos. También en consecuencia, se generaron multitud de puestos de trabajo, lo que derivó en el crecimiento de las ciudades y el éxodo rural (Fig. 1).



**Figura 1. Acontecimientos ligados a la Revolución Industrial.** La revolución industrial supuso ventajas económicas y sociales para la población, pero tuvo un efecto muy negativo sobre el medioambiente por los problemas de contaminación ocasionados.

El consumo masivo de combustibles fósiles por las diferentes actividades industriales, sumado al aumento de la población derivado del mayor bienestar de la sociedad, dio lugar a la generación de gran cantidad de compuestos tóxicos perjudiciales para los ecosistemas y la salud humana, causando un fuerte impacto en la biosfera (Fig. 1). La contaminación se define como el desequilibrio del medio natural entre la producción (entrada) y la descomposición (salida) de materia en un ecosistema como consecuencia de una perturbación del transporte (horizontal) de la materia que no ha sido asimilada por los seres vivos (Margalef, 1998). Por otro lado, la contaminación ambiental es la introducción de agentes físicos, químicos o biológicos en forma y concentración que puedan ser nocivos para el medio, así como perjudicial para los seres vivos. Este fenómeno representa uno de los mayores problemas de nuestra sociedad actual.

## 1.1. Tipos de contaminación

Distintas actividades antropogénicas generan una gran diversidad de compuestos tóxicos que afectan negativamente a la naturaleza (Markande *et al.*, 2021). Esta diversidad de agentes nocivos ha ocasionado una contaminación de tipo químico, físico o biológico. Además, la contaminación también puede clasificarse atendiendo al tipo de proceso que la causa o al tipo de medio físico contaminado (Tabla 1).

**Tabla 1. Tipos de contaminación ambiental.**

Parámetro	Tipo	Ejemplos
<b>Proceso causante</b>	Natural	Erupciones volcánicas, cenizas, incendios, aludes
	Antropogénica	Minas, industrias, vehículos, residuos industriales
<b>Según medio físico</b>	Suelo	Fertilizantes, plaguicidas, pesticidas, plásticos
	Hídrica	Nitrato, nitrito, residuos minerales, sales metálicas, detergentes, derivados del petróleo
	Atmosférica	CO <sub>2</sub> , CO, óxidos de nitrógeno (NO <sub>x</sub> ), SO <sub>2</sub> , compuestos clorofluorocarbonados (CFC), hidrocarburos aromáticos policíclicos
<b>Naturaleza del contaminante</b>	Químico	Inorgánicos (cianuro, cianato, cloruros, sulfatos, nitratos, carbonatos, etc.). Orgánicos (hidrocarburos halogenados, nitroaromáticos, bifenilos policlorados, dioxinas, plásticos derivados de petróleo)
	Físico	Ruido y vibraciones, radiaciones, temperatura, humedad, velocidad del aire, presión atmosférica, campos eléctricos y magnéticos
	Biológico	Organismos vivos y restos orgánicos (toxinas, proteínas urinarias)

En la naturaleza, los compuestos inorgánicos forman parte de los ciclos biogeoquímicos. El desequilibrio de éstos, causado por actividades industriales, da lugar a la aparición de problemas de contaminación. Los contaminantes inorgánicos, mayoritariamente, se originan como consecuencia de las actividades antropogénicas específicas de las industrias minera, joyera y agrícola, entre otras. Estos contaminantes inorgánicos incluyen principalmente metales pesados, nitrato, nitrito, cianuro y cianato.

En el último siglo, la industria química de síntesis orgánica ha sufrido un desarrollo importante, lo que ha provocado la liberación al medio de una gran variedad de compuestos orgánicos tóxicos denominados compuestos xenobióticos, los cuales son de origen reciente y extraños desde un punto de vista estructural para los seres vivos, por lo que son compuestos recalcitrantes resistentes a la degradación biológica, ocasionando graves problemas de contaminación y representando una amenaza para los ecosistemas y la salud humana (Castillo *et al.*, 2005; Adkins y Ross, 2021). Entre estos compuestos se encuentran los hidrocarburos halogenados presentes en propelentes, disolventes, refrigerantes e

insecticidas; compuestos nitroaromáticos que forman parte de explosivos, disolventes y plaguicidas, entre otros; bifenilos policlorados de plastificantes y aislantes-refrigerantes; dioxinas, generadas en el blanqueo del papel, entre otros; sulfonatos alquilbencílicos de detergentes; y polímeros sintéticos usados en la fabricación de envoltorios y materiales de empaquetado. Según la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA), los compuestos xenobióticos presentan las siguientes propiedades:

- a) Toxicidad. Sustancias químicas que se han relacionado con ciertos efectos adversos para la salud humana, fauna silvestre y medioambiente.
- b) Persistencia. Por presentar estructuras químicas extrañas para los seres vivos, debido a su reciente síntesis, son de difícil degradación por éstos.
- c) Transporte de largo alcance. Pueden ser transportados lejos de su fuente de origen a través del viento, el agua y por especies migratorias.
- d) Bioacumulación. Se retienen fácilmente por el tejido adiposo. Su concentración aumenta con el nivel de complejidad del organismo en la escala trófica y la longevidad de las especies que acumulan estos compuestos (Castillo *et al.*, 2005).

## 1.2. Problemas medioambientales derivados de actividades antropogénicas

Las actividades antropogénicas están provocando un empobrecimiento del suelo por el abuso de los fertilizantes nitrogenados en la agricultura y por el vertido de sustancias tóxicas, empleadas por la industria. Además de una reducción del estándar óptimo del aire, sobre todo en núcleos urbanos, y un deterioro de la calidad del agua debido al vertido de residuos acuosos industriales y urbanos. Si bien esta degradación ambiental ocurre paulatinamente, a lo largo de la historia han ocurrido diversos desastres medioambientales que han afectado negativamente a los ecosistemas naturales y que han puesto en riesgo la salud humana. Algunos desastres ambientales ocurridos a finales del siglo XX y principios del siglo XXI se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Algunos desastres medioambientales.**

Año	Localización	Consecuencias
1976	Seveso, Italia	Escape de 5-50 µg/m <sup>2</sup> de TCDD* usado en la fabricación del gas naranja, generado como subproducto en la síntesis de herbicidas
1984	Bhopal, India	Escape de 40 Tm de gases tóxicos, principalmente metilisocianato, empleado en la fabricación de pesticidas en la planta de Unión Carbide
1991	Irak	Derrame de 840 000 Tm de petróleo en la Guerra del Golfo Pérsico
1998	Aznalcóllar, España	Derrame de 4,5 hm <sup>3</sup> de lodos contaminados con metales pesados
2002	Galicia, España	Derrame de 77 000 Tm de petróleo del barco "Prestige"
2015	Tianjin, China	Derrame de 700 Tm de cianuro sódico tras múltiples explosiones en una terminal de contenedores
2020	Norilsk, Rusia	Derrame de 17 500 Tm de diésel a los ríos locales por parte de la industria Nornickel
2023	Ohio, EE.UU.	Escape de 400 000 L de gases peligrosos como cloruro de vinilo y benceno por el descarrilamiento de un tren de la empresa Norfolk Southern

(\*) TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina.

## 1.3. Control y legislación

---

El deterioro ambiental ocasionado por la actividad antropogénica ha despertado a lo largo del tiempo una concienciación social que ha posibilitado la promulgación de una legislación medioambiental. En un primer paso se desarrolló el concepto de desarrollo sostenible, contemplando lo siguiente: "El progreso social y económico debe resolver las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras de satisfacer las suyas".

En 2015, la Asamblea General de las Naciones Unidas adoptó la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, lo que implicó un compromiso común y universal. Esta Agenda plantea 17 objetivos de desarrollo sostenible (ODS), con 169 metas de carácter integrado e indivisible que abarcan las esferas económica, social y ambiental. La igualdad entre las personas, proteger el planeta y asegurar la prosperidad sostenible son los principales objetivos. En paralelo, desde la escala social se está impulsando la educación ambiental en los centros educativos para inculcar el compromiso con el medioambiente a los ciudadanos del mañana.

A medida que la Unión Europea avanza hacia una economía circular, la cual promueve la reutilización y el reciclaje de productos, se están tomando medidas para garantizar que los productos químicos tóxicos no se concentren en los materiales reciclados. En 2021, la Comisión Europea propuso revisar la legislación y las nuevas normas ayudarán a reducir significativamente los niveles permitidos de sustancias químicas peligrosas en los productos y en los procesos de producción, con prohibiciones totales excepto especiales disposiciones de uso para el diclorodifeniltricloroetano (DDT) y policlorobifenilos (PCB). También, se propone la eliminación de materiales de la cadena de reciclaje si su nivel de contaminantes

es alto, y la prohibición de ciertas sustancias químicas, añadiendo nuevos productos químicos a la lista de sustancias nocivas.

En Estados Unidos se han adoptado fuertes medidas para reducir las emisiones de compuestos xenobióticos. Actualmente, ninguno de los plaguicidas incluidos en la lista del Convenio de Estocolmo (2001) están registrados para la venta y distribución. No es así para el caso de emisiones de dioxinas y furanos, para los que la EPA prevé que se reducirá su uso en más del 90 % para el año 2025, con respecto a la producción del año 1987.

En 1998, la Unión Europea, Estados Unidos y otros 71 países, firmaron el Convenio de Rotterdam para implantar el procedimiento de consentimiento previamente informado para adquirir ciertos productos químicos peligrosos y plaguicidas en el comercio internacional. Este convenio identifica pesticidas y productos químicos industriales de interés, facilita el intercambio de información sobre sus riesgos y ofrece a estos países la oportunidad de tomar decisiones informadas sobre su importación (<https://www.epa.gov/>).

---

## 2. La biotecnología ambiental

---

La biotecnología se define como la aplicación de los seres vivos, o material procedente de estos, en la generación de productos o procesos de valor para el hombre. De forma específica, la biotecnología ambiental trata de minimizar, mediante la utilización de organismos, la huella medioambiental o ecológica, es decir, el impacto negativo que las actividades antropogénicas causan sobre el planeta (Castillo *et al.*, 2005). La biotecnología ambiental permite reducir o eliminar riesgos medioambientales resultantes de la acumulación de compuestos tóxicos y otros residuos peligrosos, entre otras posibilidades.

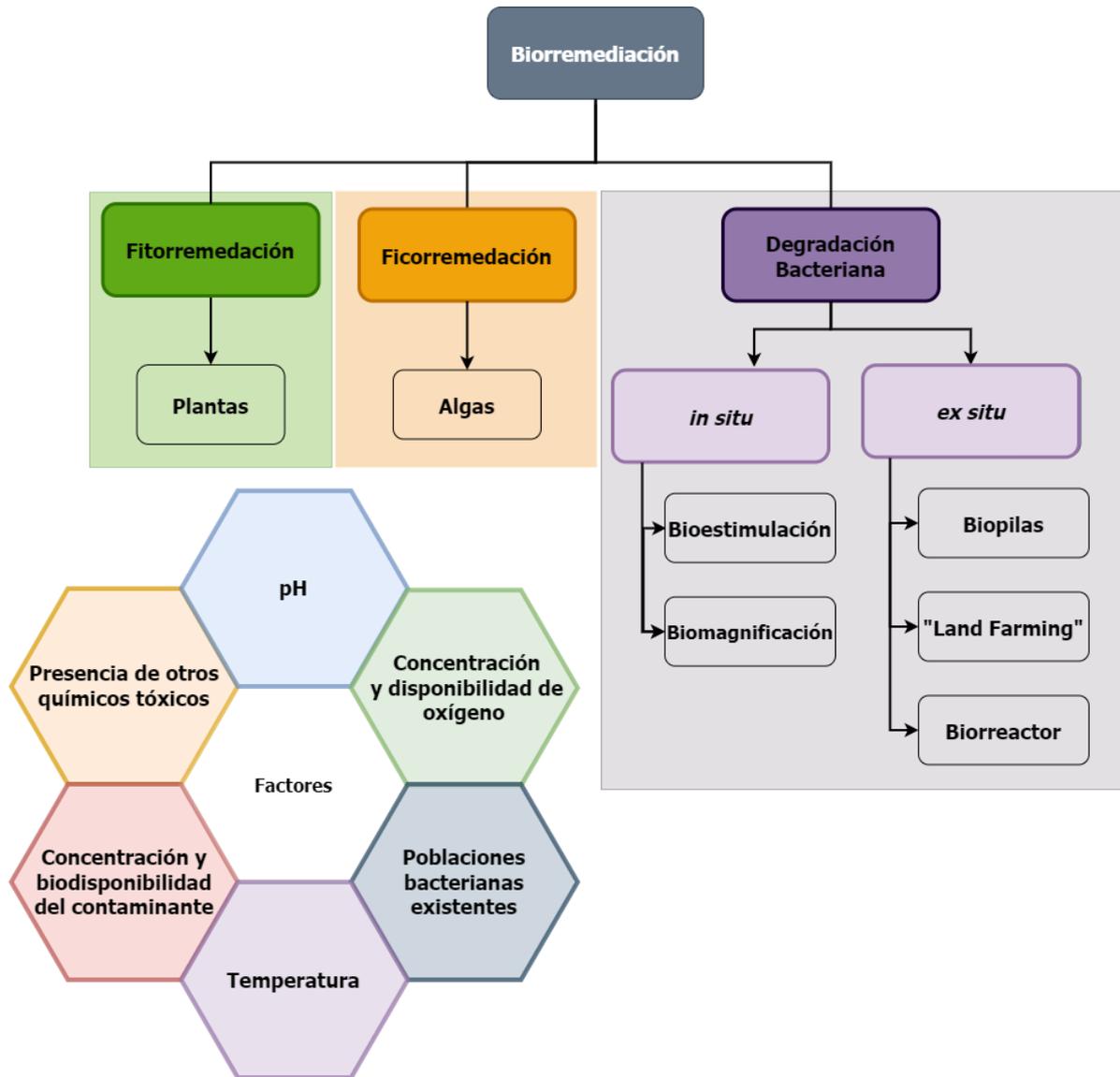
Las bacterias presentan una elevada versatilidad metabólica, lo que les permite degradar un gran número de compuestos, incluso aquellos que presentan cierta toxicidad. Esta capacidad biodegradativa ha sido aplicada al desarrollo de técnicas de biorremediación. Las ventajas de la biorremediación radican fundamentalmente en su bajo coste, su posibilidad de control, su alta eficiencia y su seguridad para el medioambiente, ya que no generan productos tóxicos adicionales. Las estrategias de biorremediación requieren la optimización de diversos factores, como la presencia de poblaciones microbianas capaces de degradar el contaminante de interés, la disponibilidad de oxígeno (en procesos aeróbicos), el control de pH del medio y de la temperatura, la concentración y biodisponibilidad del contaminante, o la presencia de compuestos tóxicos adicionales (Fig. 2). El ámbito de aplicabilidad de la biorremediación es amplio, pudiéndose aplicar a medios contaminados sólidos (suelos, sedimentos o lodos), residuos líquidos (aguas superficiales, subterráneas, residuales, entre otras) y a emisiones gaseosas.

Atendiendo al lugar en el que se realiza el proceso, las estrategias de biorremediación se pueden clasificar en:

- Biorremediación *in situ*, el tratamiento se realiza en el lugar donde se ha vertido el contaminante, lo que implica que no es necesario una infraestructura específica.
- Biorremediación *ex situ*, se requiere el transporte del material contaminado hasta una planta de tratamiento. En este caso, las variables del proceso de biorremediación son fácilmente controlables, lo que aumenta la eficiencia de dicho proceso.

La biorremediación *in situ* se puede llevar a cabo mediante dos aproximaciones: la bioestimulación o biomagnificación. La bioestimulación está basada en potenciar el crecimiento de microorganismos autóctonos. Así, el crecimiento de los microorganismos puede potenciarse aumentando la riqueza de nutrientes o aceptores de electrones del medio a tratar. El bioventeo es un tipo de bioestimulación que se emplea en suelos de mayor profundidad y consiste en aumentar la concentración de oxígeno para optimizar al máximo el

proceso de degradación de los contaminantes por microorganismos aerobios. Por otro lado, la biomagnificación consiste en la adición de microorganismos, naturales o modificados genéticamente, para potenciar la degradación de los contaminantes (Fig. 2).



**Figura 2. Tipos de biorremediación y factores relevantes.** La biorremediación se puede clasificar según el tipo de organismo que la lleve cabo y en función del lugar en el que ocurra dicho proceso. Numerosos factores pueden afectar a este proceso.

## Introducción

En las estrategias de biorremediación *ex situ*, el proceso de detoxificación se lleva a cabo, generalmente en biorreactores, en los que la biomasa se puede encontrar en suspensión o inmovilizada (Fig. 2). Para la biomasa inmovilizada se usan soportes sólidos naturales, entre los que se incluyen roca granítica, cáscaras de cítricos o celulosa; o soportes sintéticos como el acero inoxidable, alginatos y plásticos. Los biorreactores pueden procesar el residuo contaminado operando con un flujo de residuo discontinuo o continuo. El uso de biorreactores permite utilizar condiciones óptimas de trabajo, teniendo en cuenta parámetros controlados de pH, temperatura, agitación u oxígeno. La suplementación de diferentes fuentes de carbono o nitrógeno puede potenciar el proceso de biodegradación. Otras estrategias de biorremediación *ex situ* son el “Landfarming”, proceso en el que el suelo contaminado es excavado y esparcido sobre un lecho preparado y mediante lavados periódicos se consigue la degradación de los contaminantes, con objeto de estimular los microorganismos autóctonos con capacidades biodegradativas, y las biopilas, en las que el suelo contaminado es extraído y depositado en un área de tratamiento. Las biopilas proporcionan un entorno favorable para los microorganismos aerobios y anaeróbicos autóctonos y se suelen utilizar para sustancias muy volátiles en las que está desaconsejado utilizar el “Landfarming”. (Castillo *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2019).

En los últimos años, están surgiendo nuevas técnicas basadas en métodos tradicionales de biorremediación que, además de permitir la descontaminación de los residuos tóxicos, generan productos con un valor añadido. La electrobiorremediación es una técnica híbrida entre la biorremediación y la electrocinética que aumenta la movilidad de los contaminantes, maximizando así la interacción entre estos y los microorganismos, lo que aumenta la eficacia del proceso de biorremediación (Daghio *et al.*, 2017). Las celdas de combustible microbianas constituyen una tecnología en la que, de forma simultánea a la biodegradación, se genera energía. En estos sistemas, un transductor bioelectroquímico convierte la energía química de compuestos orgánicos o inorgánicos de aguas residuales agrícolas, lácteas, municipales o industriales, en corriente eléctrica, utilizando los microorganismos como biocatalizadores (Chaudhary *et al.*, 2022). Por otro lado, aunque la degradación biológica en condiciones anaeróbicas no es una técnica novedosa, su empleo está aumentando debido a las ventajas adicionales que conlleva, como la producción de biogás (metano), la generación de un residuo que puede ser utilizado como fertilizante, o la reducción de la demanda biológica de oxígeno y el consiguiente ahorro energético frente a los procesos aeróbicos. Por último, la aplicación de técnicas de ingeniería genética, así como los análisis ómicos de procesos de biodegradación, posibilitan la optimización de la capacidad biodegradativa de los microorganismos (Wu *et al.*, 2018; Malmir, *et al.*, 2022). La biología sintética también proporciona herramientas para diseñar microorganismos mejorados que puedan ser utilizados en procesos de biorremediación (Kallergi *et al.*, 2021; Roldan *et al.*, 2021).

## 2.1. Aproximaciones ómicas aplicadas a la biorremediación de contaminantes ambientales

---

Tradicionalmente el estudio de la biodegradación de contaminantes ambientales se ha llevado a cabo a escala de laboratorio mediante estudios fisiológicos y de biología molecular, los cuales han permitido elucidar las rutas de degradación e identificar los componentes (genes/proteínas) responsables de estos procesos. Para aumentar el conocimiento del proceso de biorremediación mediante una visión global de los mecanismos moleculares que operan durante la degradación de un contaminante, han surgido en los últimos años las técnicas ómicas, basadas en el análisis holístico de genes (genómica), transcritos (transcriptómica), proteínas (proteómica) y metabolitos (metabolómica). Las ómicas se han aplicado en distintos ámbitos de la investigación, incluida la biodegradación de pesticidas, hidrocarburos y otros contaminantes ambientales (Zampolli *et al.*, 2019; Rodríguez *et al.*, 2020). Estas aproximaciones no solo han posibilitado conocer en detalle los procesos de biodegradación, sino, además, determinar el efecto que los contaminantes ejercen sobre el metabolismo de los microorganismos que los degradan. Además, las bacterias cultivables representan solo el 1 % de la biodiversidad total debido a la limitación de los medios de cultivo utilizados, por lo que la aplicación directa de las distintas metodologías ómicas sobre muestras ambientales (metaómicas) está posibilitando analizar de forma más precisa la diversidad microbiana en los distintos ecosistemas, incluidos aquellos que están en contacto con los contaminantes ambientales (Sharma *et al.*, 2022). A través de aproximaciones principalmente metagenómicas, se están identificando nuevos genes y enzimas que pueden ser aplicadas en procesos de biorremediación (Wani *et al.*, 2023). Además, mediante estudios metatranscriptómicos y metaproteómicos a partir de muestras de suelo, se están asociando perfiles funcionales de transcritos y proteínas, respectivamente, a diferentes contaminantes ambientales, lo que posibilita el seguimiento de la presencia de contaminantes y la evolución de los procesos de biorremediación (Kim *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2022).

---

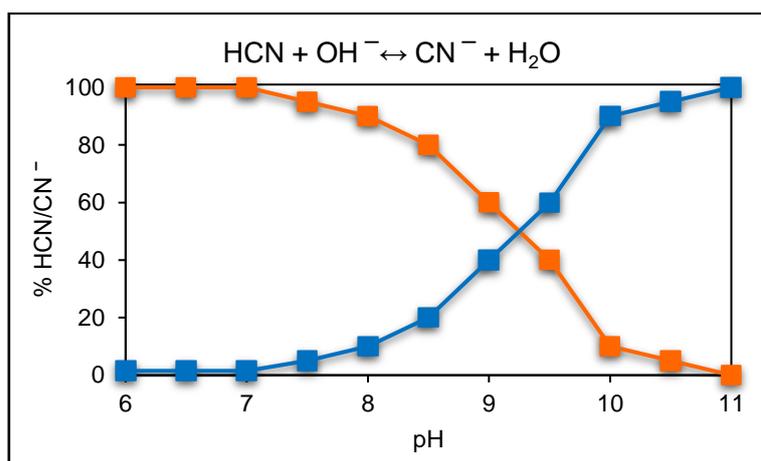
## 3. El cianuro

---

### 3.1. Naturaleza química del cianuro

---

El cianuro y los compuestos cianurados presentan el grupo funcional ciano ( $-\text{C}\equiv\text{N}$ ), formado por la unión de un átomo de carbono y un átomo nitrógeno, mediante un triple enlace. Aunque sea una molécula sencilla, la química del cianuro es compleja. El anión  $\text{CN}^-$  es soluble, incoloro y extremadamente reactivo. El ácido cianhídrico (HCN) es un ácido débil y presenta un  $\text{pK}_a$  de 9,2 (Fig. 3), lo que implica que a un pH inferior a 9,2, el equilibrio se desplaza hacia la formación de HCN, un gas incoloro y tóxico con un ligero olor a almendras amargas, característica no perceptible para todas las personas. Para evitar la pérdida de cianuro por volatilización es prioritario mantener las disoluciones cianuradas a un  $\text{pH} > 9,2$ , condiciones en las que predomina la forma desprotonada ( $\text{CN}^-$ ) en disolución acuosa (Fig. 3).



**Figura 3. Proporción HCN/ $\text{CN}^-$  en función del pH.** Evolución del equilibrio químico en función del pH, mostrándose el porcentaje de HCN (línea naranja) y de  $\text{CN}^-$  (línea azul).

El anión cianuro forma sales simples con cationes alcalinos o alcalinotérreos, entre las que se incluyen sales de cianuro de sodio, potasio y calcio. Estas formas de cianuro son muy tóxicas debido a su alta solubilidad en agua, generando fácilmente cianuro libre. El anión cianuro también puede formar complejos con otros cationes metálicos, cuya solubilidad, y por consiguiente estabilidad, depende de la naturaleza del catión metálico y del pH del medio. Estos complejos cianuro-metálicos se clasifican en complejos débiles o fácilmente disociables en disolución acuosa, tales como los formados por el cadmio, cobre o zinc; y complejos fuertes, entre los que se incluyen los formados con oro, mercurio, cobalto o hierro, siendo estos últimos los más estables. Los complejos cianuro-metálicos son notablemente menos tóxicos que el cianuro libre, ya que liberan cianuro de una forma más lenta y limitada. Los

complejos cianuro-metálicos fuertes también se disocian, aunque en este caso por ácidos fuertes o por exposición directa a la radiación ultravioleta.

El tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) es otra forma de cianuro, el cual se disocia fácilmente en condiciones ácidas y es más estable que el anión cianuro, lo que disminuye su toxicidad, pero dificulta su degradación. Este suele encontrarse en los residuos industriales generados durante el procesamiento del coque, un combustible sólido poroso formado a partir de la pirólisis del carbón (Mediavilla *et al.*, 2019). El cianato ( $\text{OCN}^-$ ) es un derivado del cianuro producido por la oxidación de este en procesos naturales o en tratamientos de eliminación de cianuro. El cianato presenta también una toxicidad inferior a la del cianuro.

El grupo ciano también forma parte de compuestos orgánicos denominados nitrilos ( $\text{R}-\text{C}\equiv\text{N}$ ), que son producidos de forma natural o artificial y se encuentran ampliamente distribuidos en la biosfera (Banerjee, 2002). Los cianuros orgánicos comprenden nitrilos alifáticos, aromáticos y aril-alifáticos. También incluyen diferentes compuestos derivados de lípidos, carbohidratos y otros compuestos biológicos, los cuales son producidos en la naturaleza principalmente por las plantas en forma de glucósidos cianogénicos y cianolípidos. Los glucósidos cianogénicos derivan de aminoácidos alifáticos y aromáticos, y desempeñan una función importante en el metabolismo secundario de las plantas (Zagrobelyny *et al.*, 2004; Panter, 2018). El cianuro generado por las plantas cianogénicas deriva de la hidrólisis de estos compuestos.

### 3.2. Cianuro y el origen de la vida

---

El cianuro es un compuesto conocido principalmente por su toxicidad, sin embargo, este se ha propuesto como una molécula esencial en el origen de la vida en la Tierra. En 1959 Joan Oró *et al.*, lograron sintetizar la base nitrogenada adenina por condensación de cinco moléculas de HCN, y desde entonces, son numerosos los estudios que señalan al cianuro como una de las moléculas que posibilitaron la síntesis prebiótica de compuestos nitrogenados, tales como los aminoácidos y las bases nitrogenadas (Islam, 2022). Así, se ha demostrado experimentalmente que la síntesis de los monómeros fundamentales para la mayoría de las biomoléculas, incluyendo ribonucleótidos, aminoácidos y precursores de lípidos, es posible a partir de cianuro y ácido sulfhídrico.

### 3.3. Fuentes de producción de cianuro

Diversos estudios han identificado el ácido cianhídrico y el cianuro de vinilo en la atmósfera de Titan, uno de los satélites de Saturno (Palmer *et al.*, 2017; Fitzsimmons *et al.*, 2019). Según algunos estudios, el cianuro que participó en la síntesis abiótica de numerosos compuestos orgánicos pudo tener un origen extraterrestre, como se ha mencionado anteriormente. De hecho, el análisis de condritas carbonáceas, fragmentos de antiguos asteroides que proporcionan un registro de la química del sistema solar primigenio, ha revelado que estos pudieron aportar cianuro a la Tierra en forma de complejos cianocarbonílicos de hierro (Smith *et al.*, 2019). Sin embargo, las principales fuentes actuales de producción de cianuro se encuentran en la Tierra, las cuales se pueden clasificar en fuentes naturales o antropogénicas (Tabla 3). El cianuro es producido en la biosfera como mecanismo defensivo/ofensivo por bacterias, algas, hongos, plantas e insectos. Por otro lado, el ser humano utiliza este compuesto en una gran variedad de aplicaciones industriales, así como puntualmente como un agente químico en procesos bélicos.

**Tabla 3. Fuentes de producción de cianuro.**

Fuentes Naturales	
Bacterias	<i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas chloraphis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Algas y cianobacterias	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Nostoc muscorum</i> <i>Plectonema boryanum</i> <i>Anacystis nidulans</i>
Hongos	<i>Marasmius oreades</i> <i>Stemphyllium loti</i> <i>Gioecercospora sorghii</i>
Plantas	Helechos, sorgo, lino, yuca, algodón, judía y árboles frutales (almendros, manzanos, albaricoque, etc)
Animales	Insectos Miriápodos Y otros artrópodos
Fuentes Antropogénicas	
Limpieza de metales Siderurgia (endurecimiento del acero) Baños de galvanoplastia (industria joyera) Recuperación de metales preciosos (minería) Construcción de barcos Construcción de carreteras Gases de escape de automóviles Industria farmacéutica Industria de fabricación de pinturas Humos de combustión de plásticos (poliuretano) Productos agroquímicos (agentes pesticidas) Intermediarios en la producción química agrícola Industrias productoras de fibras sintéticas y plásticos	

### 3.3.1. Fuentes naturales

El proceso biológico de síntesis de cianuro se conoce como cianogénesis. Existe una gran variedad de seres vivos cianogénicos que producen cianuro a través de su metabolismo secundario. En plantas, la cianogénesis actúa como un mecanismo de defensa para combatir herbívoros y patógenos en forma de pesticidas naturales. De forma general, se pueden distinguir dos tipos de rutas biológicas de producción de cianuro: síntesis directa, llevada a cabo por bacterias, algas y hongos; y síntesis indirecta, a través de la formación de intermediarios estables como los nitrilos, que posteriormente son hidrolizados generando cianuro libre. Esta última ruta tiene lugar en plantas superiores y artrópodos.

Algunas de las bacterias cianogénicas más relevantes pertenecen a los géneros *Pseudomonas* y *Chromobacterium* (Tabla 3). Estas bacterias poseen la HCN sintasa, enzima codificada por la agrupación génica *hcnABC*, y que cataliza la oxidación de glicina generando HCN y CO<sub>2</sub> (Blumer y Haas, 2000). *Chromobacterium violaceum* es una bacteria cianogénica en la que se ha estudiado en detalle este proceso, determinándose que el oxígeno, hierro y fosfato son factores que afectan a la producción de cianuro (Fairbrother *et al.*, 2009). Otros géneros bacterianos cianogénicos son *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus* y *Serratia*, así como algunas cianobacterias como *Nostoc muscorum*.

También existen aproximadamente 300 especies de hongos cianogénicos pertenecientes a 52 géneros. En el reino Fungi, el cianuro es sintetizado en la formación del esporocarpo o cuerpo fructífero, estructura pluricelular que sirve de soporte para las estructuras reproductoras. En hongos como *Trichoderma* y *Fusarium*, se ha demostrado que la producción de cianuro ocurre en condiciones de estrés abiótico y con el fin de obtener nitrógeno y carbono (Kumar *et al.*, 2017). En el caso de las algas, existen pocos organismos cianogénicos descritos hasta la fecha (Gurbuz *et al.*, 2004), entre los que destaca *Chlorella vulgaris* (Tabla 3).

Las plantas producen cianuro como producto residual durante la síntesis de etileno, una hormona vegetal, a través del ciclo de la metionina o ciclo de Yang (Heldt y Piechulla, 2021). Sin embargo, solo se consideran plantas cianogénicas aquellas que producen cianuro en forma de glucósidos cianogénicos, conocidos como glucósidos de 2-hidroxinitrilos (o cianhidrinas), los cuales son derivados de aminoácidos ramificados o aromáticos. Estos compuestos cianurados son almacenados en vacuolas y liberados durante la lisis celular a causa de una rotura del tejido vegetal, por lo que tradicionalmente se han asociado a la protección frente al ataque de herbívoros y hongos. No obstante, se ha sugerido que el cianuro también tiene un papel en otros procesos biológicos, como la germinación, la formación de

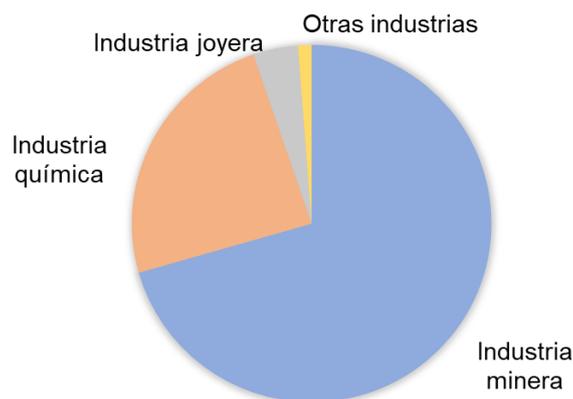
## Introducción

brotos, la desactivación de especies reactivas de oxígeno o como disipador del exceso de energía, proporcionando poder reductor en condiciones ambientales desfavorables (Ramalingam *et al.*, 2022). Además, los glucósidos cianogénicos son utilizados como marcadores taxonómicos (Gleadow y Møller, 2014; Ramalingam *et al.*, 2022). En el reino vegetal se han descrito más de 2500 especies cianogénicas, incluyendo angiospermas, gimnospermas y helechos. Algunas de estas plantas cianogénicas son de interés agronómico, como la alfalfa (*Medicago sativa*), el lino (*Linum usitatissimum*), el bambú (*Bambusoideae*), el algodón (*Gossypium hirsutum*), la patata (*Solanum tuberosum*), la yuca (*Manihot esculenta*), la judía (*Phaseolus vulgaris*) y algunos árboles frutales, como el almendro (*Prunus dulcis*). De hecho, es muy conocida la presencia de cianuro en las almendras. En el caso de la yuca, esta planta tiene un gran interés agronómico, ya que constituye la base alimenticia en algunos países tropicales. En ocasiones, el consumo de este alimento puede causar alertas sanitarias debido a su alto contenido en cianuro, aunque actualmente existen instalaciones de procesado de la yuca, donde se elimina este compuesto tóxico. Algunos estudios se han centrado en dilucidar en estas poblaciones los mecanismos neuropatogénicos subyacentes a la exposición a cianuro a largo plazo (Tshala-Katumbay *et al.*, 2016).

La síntesis biológica de cianuro dentro del reino animal se restringe a algunos grupos de artrópodos, como miriápodos e insectos, incluyendo entre estos últimos coleópteros, heterópteros y lepidópteros (Zagobelny *et al.*, 2004; Naveena *et al.*, 2021).

### 3.3.2. Fuentes antropogénicas

La cianogénesis producida por los seres vivos no constituye una amenaza medioambiental, debido a que los recursos biológicos naturales son capaces de transformar y/o eliminar el cianuro en las concentraciones producidas, manteniendo un equilibrio en la naturaleza. En cambio, a raíz de la revolución industrial, el cianuro se ha utilizado de forma masiva en multitud de procesos industriales, lo que ha originado la producción de grandes volúmenes de residuos industriales cianurados, generando un problema medioambiental a escala global. Se estima que anualmente se producen aproximadamente 1,5 millones de toneladas métricas de cianuro en el mundo, el cual es utilizado por multitud de industrias, entre las que destacan la actividad minera (Fig. 4).



**Figura 4. Utilización de cianuro por diferentes tipos de industrias.** El 70 % del cianuro se emplea en la industria minera, un 24 % en la industria química en diferentes aplicaciones, como plásticos, adhesivos, papel, retardantes de fuego, productos cosméticos, productos farmacéuticos, pinturas, disolventes y procesado de alimentos, y un 4 % en la industria joyera (<http://chemnews.com>).

En los últimos años, la producción mundial de cianuro procede principalmente de Asia, que representa aproximadamente el 59 % de la capacidad total de producción mundial, seguida de América del Norte, Oceanía y Europa, que representan el 15 %, 9 % y 14 %, respectivamente. Los principales fabricantes mundiales de cianuro son Hebei Chengxin Group y Anhui Shuguang Chemical (China), Cyanco (EE.UU.) y Orica (Australia).

El 70 % del cianuro producido a nivel mundial se destina a la industria minera (Fig. 4), en la que el cianuro es utilizado para la extracción de minerales a través de un proceso de lixiviación denominado cianuración. Los procesos químicos de extracción de minerales, denominados procesos hidrometalúrgicos, son los únicos métodos económicamente viables para la extracción de concentraciones aceptables de metales nobles, como el oro y la plata. Durante la cianuración, el oro y la plata insolubles forman complejos solubles con el cianuro,  $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$  y  $[\text{Ag}(\text{CN})_2]^-$ . La concentración mínima de NaCN requerida en este proceso es de 350 mg/L (0,035 %). La reacción global del proceso se ajusta a la Ecuación de Elsner:  $4 \text{ Au} + 8 \text{ NaCN} + \text{O}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{ Na}[\text{Au}(\text{CN})_2] + 4 \text{ NaOH}$ .

Existen agentes complejantes alternativos al cianuro, como el cloruro o el bromuro, pero estos forman complejos menos estables y, por lo tanto, requieren condiciones más oxidantes para disolver el oro o la plata, lo que aumenta el coste del proceso. Por este motivo, el cianuro ha sido el reactivo más utilizado en la lixiviación de oro y plata desde su incorporación a la minería a finales del siglo XIX. Una vez que el oro y la plata se encuentran disueltos por la formación de complejos solubles de cianuro, estos se recuperan mediante precipitación con zinc o por adsorción a carbón activado. Después de la elución del carbón activado, el metal se concentra adicionalmente por precipitación o electrodeposición. El cianuro también se usa

## Introducción

en galvanoplastia, otro proceso de extracción de oro y plata utilizado por la industria joyera para estabilizar los iones metálicos en la solución del electrolito antes de su deposición.

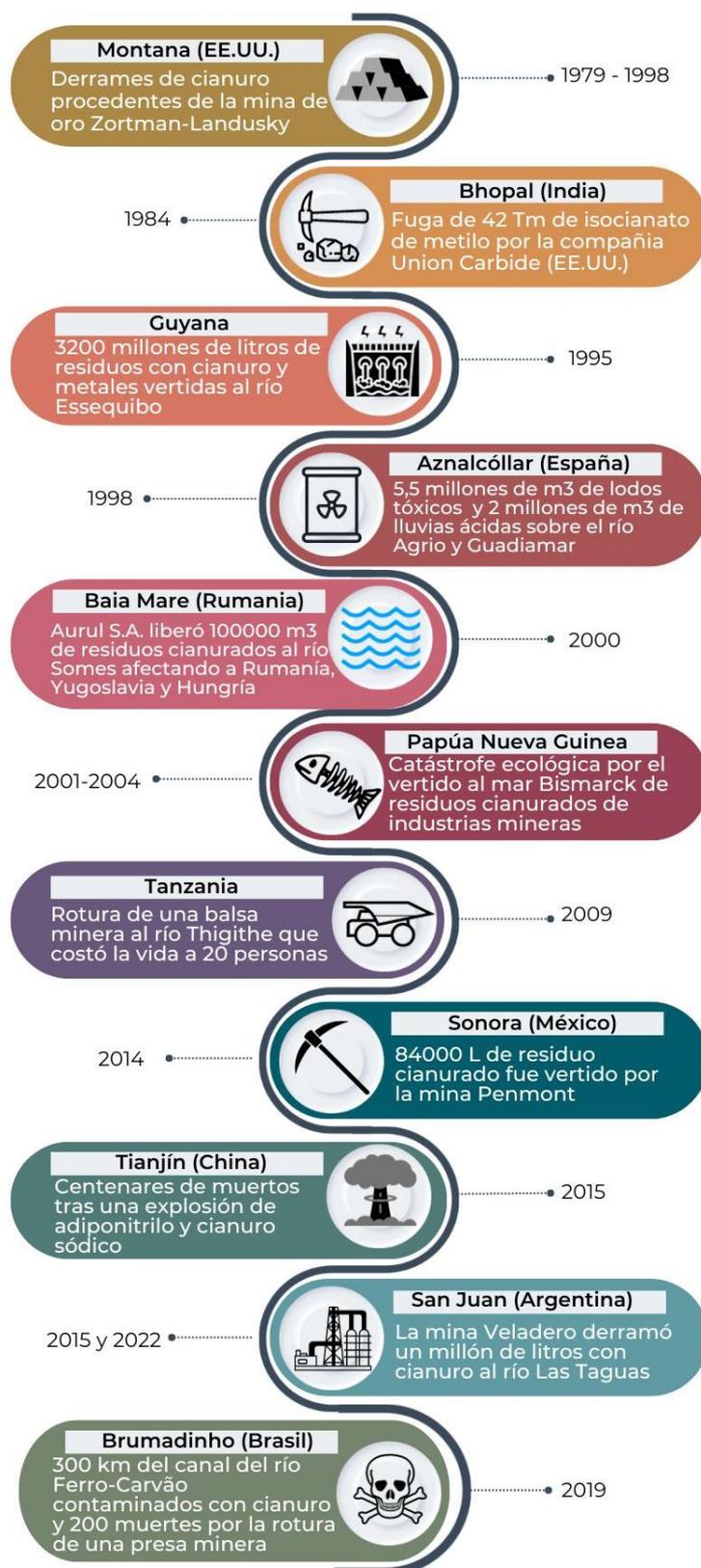
Además de su alta afinidad por el oro, el cianuro también forma complejos estables con otros metales, como Fe, Co, Ni, Cu, Zn o V, por lo que los residuos procedentes de la minería y la joyería contienen, además de cianuro libre, diversos metales en su forma libre o complejos cianuro-metálicos. A pesar de que las técnicas de extracción de metales preciosos en minería han aumentado su eficiencia, cada año se producen millones de toneladas de aguas residuales extremadamente tóxicas por su elevado contenido en cianuro y metales, los cuales se almacenan en balsas artificiales. En ocasiones el desbordamiento o rotura de estas balsas, ha causado la liberación de grandes volúmenes de residuos mineros en la naturaleza, provocando incluso la contaminación de vías fluviales próximas, generando serios problemas ambientales y para la salud humana (Luque-Almagro *et al.*, 2016; Olaya-Abril *et al.*, 2024). Entre estos desastres medioambientales destaca el ocurrido en Bahía Mare (Rumanía) y en Bhopal (India), con numerosas muertes y graves consecuencias ambientales. Además de los desastres medioambientales causados por los residuos cianurados de la minería, a lo largo de la historia también se han producido importantes episodios de contaminación como consecuencia de la utilización de cianuro y sus derivados por otras actividades industriales (Fig. 5).

Por otro lado, la industria química es una fuente de producción a gran escala de cianuro orgánico, como el adiponitrilo, uno de los precursores del nailon. La síntesis de nitrilos tiene lugar generalmente por la hidrocianación de alquenos, a través de la siguiente reacción:  $RCH=CH_2 + HCN \rightarrow RCH(CN)CH_3$ .

El cianuro y sus derivados también han sido utilizados con fines médicos; así, desde la Primera Guerra Mundial se empleó cianuro de cobre para el tratamiento de la tuberculosis y la lepra, hasta la reciente utilización del carbonilcianuro-*m*-clorofenilhidrazona usado como inductor químico de la mitofagia en tratamientos para combatir el cáncer de pulmón (Tran *et al.*, 2022). Sin embargo, ha sido el nitroprusiato sódico  $[Fe(CN)_5NO]$ , el cianoderivado que ha tenido un uso más extendido en medicina, utilizándose durante más de 70 años como vasodilatador en situaciones de urgencia (Zerbe y Wagner, 1993). Este compuesto también se utiliza en bioquímica clínica para la determinación de cuerpos cetónicos en orina, y recientemente, se proponen nuevos usos terapéuticos de este medicamento mediante su administración a través de nanopartículas de sílice (da Silva-Filho *et al.*, 2022). Por otro lado, en la síntesis química de la vitamina B12, y su posterior purificación, se obtiene cianocobalamina, una forma inactiva en la que su cofactor de cobalto se encuentra ligado al cianuro, el cual debe ser eliminado por el organismo para obtener la forma activa de vitamina

B12. Precisamente, debido a la afinidad que presenta el cianuro por el cobalto, la vitamina B12, suele utilizarse como antídoto frente a la intoxicación por cianuro (Lee *et al.*, 2016).

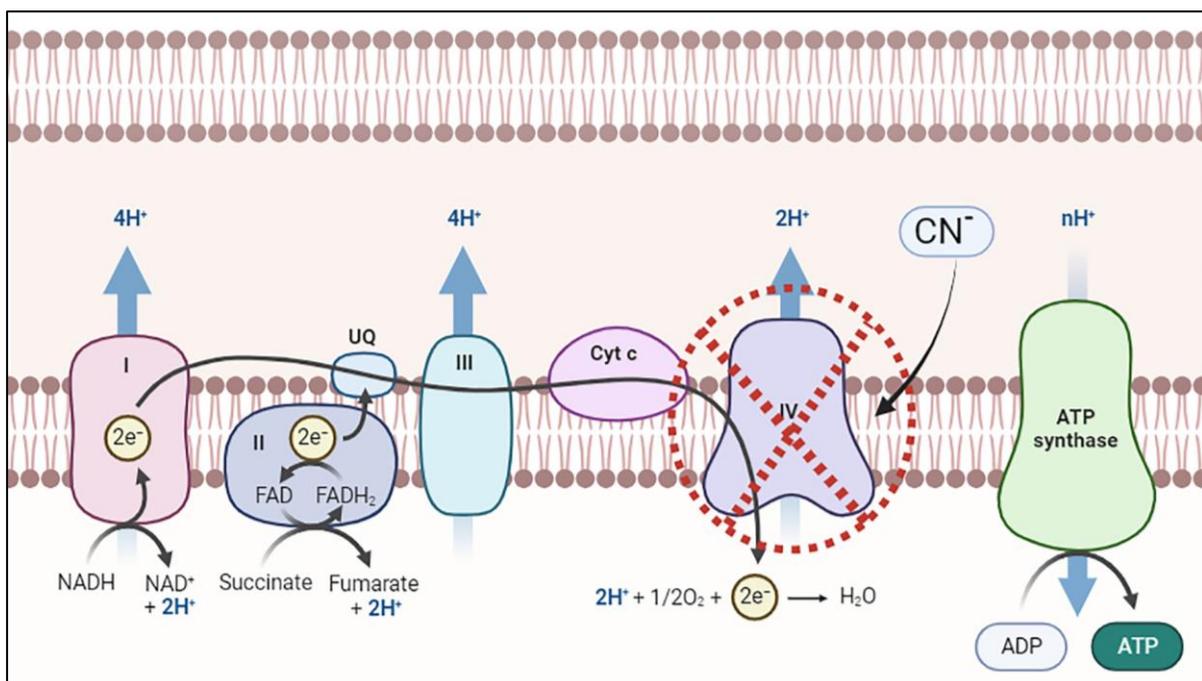
Otros usos del cianuro en países en vías de desarrollo en los que su uso no está regulado se relacionan con el control de plagas, la pesca ilegal y la caza furtiva. El cianuro se emplea para capturar peces vivos, cerca de los arrecifes de coral, para su comercialización en acuarios y mercados de mariscos de forma ilegal. Además, los cazadores furtivos en África usan cianuro para envenenar los pozos de agua con el fin de matar a los elefantes y obtener su marfil. Esta práctica es controvertida, peligrosa y perjudicial para los ecosistemas, pero está estimulada por el mercado lucrativo (Barber y Vaughan, 1998).



**Figura 5. Desastres medioambientales ocasionados por el cianuro y sus derivados.** Cronología de las principales catástrofes debidas a la actividad de distintas industrias que usan cianuro, mayoritariamente la industria minera, que provocaron numerosas muertes de seres humanos y el deterioro de ecosistemas.

### 3.4. Toxicidad del cianuro

El cianuro es extremadamente tóxico para la mayoría de los seres vivos. Esta elevada toxicidad radica en la alta afinidad del cianuro por los metales, lo que disminuye drásticamente la biodisponibilidad de estos y provoca la inhibición de las proteínas que requieren metales para su actividad. Entre las dianas del cianuro destacan especialmente las proteínas que contienen hierro, como la citocromo *c* oxidasa, que participa en la cadena de transporte electrónico, causando su inhibición (Fig. 6), generando un bloqueo específico del transporte de electrones a través de esta y, por lo tanto, la inhibición de la fosforilación oxidativa, disminuyendo drásticamente la concentración de ATP en la célula y provocando la muerte celular en última instancia (Dubey y Holmes, 1995; Jünemann, 1997; Quesada *et al.*, 2007). Además, en mamíferos el cianuro impide el suministro de oxígeno a los tejidos por la inhibición de la hemoglobina, induce la apoptosis celular y altera los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, ocasionando disfunciones en la actividad neuromotora (Hendry-Hofer *et al.*, 2019; Mills *et al.*, 2002).



**Figura 6. La citocromo *c* oxidasa de la cadena de transporte electrónico como diana de cianuro.** Microorganismo no cianotrofo sensible a cianuro. Bloqueo de la cadena de transporte electrónico por la unión del cianuro a la metaloproteína citocromo *c* oxidasa.

Según el departamento de trabajo de los Estados Unidos, la concentración de cianuro que no supone un riesgo para la salud humana se establece en 10 ppm (mg/L) para las formas libres de cianuro (HCN, KCN y NaCN) en el aire o en contacto con la piel, mientras que, en lugares de trabajo donde se cumplen jornadas de 8 h diarias este límite baja a 5 ppm

## Introducción

(<https://www.osha.gov/>). Dosis superiores de cianuro ocasionan dolor de cabeza, náuseas, pérdida de apetito, síntomas que se agravan al aumentar la dosis y el tiempo de exposición, llegando a producir desvanecimientos, efectos negativos sobre el sistema nervioso central, sistema cardiovascular y respiratorio, y agrandamiento de la glándula tiroidea. La exposición a 500 ppm de cianuro durante 90 segundos provoca la muerte del individuo. Para un individuo normopeso (70 Kg), se considera que la dosis letal de cianuro por ingesta o vía intravenosa es de 100-200 mg. La concentración máxima de cianuro permitida en el agua potable es de 0,2 mg por litro de agua (0,2 ppm). Además, el cianuro liberado en aguas residuales causa elevada ecotoxicidad en los sistemas marinos, debido a que los peces son altamente sensibles a concentraciones relativamente bajas de este compuesto, alrededor de 5 mg/L. Por ello, es necesario regular la cantidad de cianuro que puede liberarse a las aguas residuales para frenar el fuerte impacto del cianuro en la vida acuática (National Research Council (US), 2002; Committee on Acute Exposure Guideline Levels, 2016; Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo, 2019).

### 3.5. Tratamientos para la descontaminación de cianuro

---

Debido a la elevada toxicidad del cianuro, así como a la necesidad de dar cumplimiento a la legislación medioambiental vigente, los residuos industriales que contienen este compuesto tóxico deben ser tratados antes de ser vertidos al medioambiente. Tradicionalmente, estos tratamientos se han basado en métodos fisicoquímicos (Tabla 4); sin embargo, su elevado coste y la generación de productos tóxicos adicionales han hecho que en los últimos años se contemple el uso de tecnologías alternativas, amigables con el medioambiente, basadas en la biodegradación del cianuro mediante el uso de microorganismos.

#### 3.5.1. *Métodos fisicoquímicos para la descontaminación de cianuro*

Los métodos fisicoquímicos se basan principalmente en la estabilización o transformación del cianuro. La estabilización del cianuro minimiza tanto su velocidad de migración como su toxicidad, mientras que los métodos de transformación, principalmente basados en la oxidación química, destruyen el cianuro e impiden su reutilización. Estos métodos tienden a ser efectivos con cianuro libre o complejos cianuro-metálicos débiles, presentando dificultades para eliminar los complejos cianuro-metálicos más estables. Para seleccionar el tratamiento adecuado de eliminación de cianuro es necesario tener en cuenta varios factores, tales como el tipo de compuesto cianurado, el volumen a tratar o el entorno donde se aplicará el tratamiento.

Tabla 4. Procesos fisicoquímicos para la descontaminación de cianuro.

Estabilización		
Adsorción por carbón activado y resina		
Precipitación de cianuro libre		
Intercambio iónico		
Proceso	Método	Reacción
Transformación		
Físicos	Volatilización	$\text{HCN} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{CN}^-$
	Recirculación	
	Fotólisis	$\text{CN}^- + \text{h}\nu \rightarrow \text{NO}_3^-/\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$
Químicos	Cloración alcalina	$\text{CN}^- + \text{Cl}_2 \rightarrow \text{CNCl} + \text{Cl}^-$ $\text{CNCl} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CNO}^- + 2\text{H}^+ + \text{Cl}^-$
	Oxidación con $\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{CN}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{CNO}^- + \text{H}_2\text{O}$ $\text{CNO}^- + 3\text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{NO}_2^- + \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$ $\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O}$
	Ozonización	$\text{CN}^- + \text{O}_3 \rightarrow \text{CNO}^- + \text{O}_2$ $2\text{CNO}^- + 3\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{N}_2 + 3\text{O}_2$
Fisicoquímicos	Acidificación-Volatilización-Regeneración (AVR)	$\text{CN}^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{HCN}$ $\text{HCN} + \text{NaOH} \leftrightarrow \text{NaCN}$
	Radiación ultravioleta/ $\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{h}\nu (\text{UV}) \leftrightarrow 2\text{OH}^-$ $\text{CN}^- + 2\text{OH}^- \leftrightarrow \text{CNO}^- + \text{H}_2\text{O}$
	Proceso INCO ( $\text{SO}_2/\text{aire}$ ) *	$\text{CN}^- + \text{SO}_2 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CNO}^- + \text{H}_2\text{SO}_4$ $\text{M}(\text{CN})_x^{y-x} + \text{SO}_2 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CNO}^- + \text{H}_2\text{SO}_4$
	Ósmosis inversa	

(\*) Oxidación mediante dióxido de azufre, aire y catalizador de cobre.

Para la estabilización del cianuro existen procesos, como la adsorción, donde se suelen utilizar ciertos minerales, como la ilmenita ( $\text{FeTiO}_3$ ), la hematita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) o la bauxita ( $\text{AlO}\cdot\text{OH}/\text{Al}(\text{OH})_3$ ), el carbón activado y algunas resinas que poseen la capacidad de adsorber compuestos de cianuro (<2 mg/L de cianuro). El cianuro es adsorbido por este material y, posteriormente, es transportado a otro sistema donde el contaminante es desorbido y controlado. Otro método es la precipitación de cianuro en forma de sales, mediante la adición de agentes complejantes como el hierro. Esto reduce la concentración de cianuro libre, así como la de metales que se encuentren en el medio. Es fundamental en este método un riguroso control del pH, ya que es un factor determinante en la precipitación de los complejos formados. Por este método, la eliminación de cianuro solo se consigue de forma parcial y, por lo tanto, debe complementarse con otro tipo de tratamientos. Por último, en el proceso de intercambio iónico es necesario la aplicación de una diferencia de potencial entre dos electrodos separados por una membrana permeable a los compuestos de cianuro. La solución a detoxificar se coloca en la parte catódica de la cámara y, al aplicar la diferencia de potencial, el ión cianuro migra hacia la parte anódica, debido a su carga eléctrica negativa, donde tiene lugar su oxidación (Logsdon *et al.*, 2000).

## Introducción

Por otro lado, existen numerosos y variados procesos basados en la oxidación química del cianuro. En las minas en las que se utiliza cianuro como agente lixivante, su acumulación en balsas a pH ácido conlleva la transformación del anión soluble en ácido cianhídrico volátil, dando lugar a una disminución o eliminación del cianuro en dichas balsas y trasladando el problema a la atmósfera. Si bien, al existir también metales, una gran cantidad de cianuro se queda atrapado en el residuo líquido en forma de complejos cianuro-metálicos. El proceso de Acidificación-Volatilización-Regeneración (AVR) consiste en provocar un descenso del pH, utilizando ácido sulfúrico, para favorecer la formación de ácido cianhídrico gas. Este gas es atrapado por una solución de hidróxido de sodio a contracorriente, formando cianuro sódico, el cual puede ser recirculado al proceso de lixiviación, influyendo positivamente en la economía del proceso de cianuración. La fotólisis es un proceso donde tienen lugar reacciones de oxidación/reducción gracias a la energía de la radiación electromagnética que activa los procesos de transferencia de electrones, haciendo que sean más aptos para participar en reacciones redox (Young y Jordan, 2000). Este es un mecanismo de disociación de ciertos compuestos cianurados, como los complejos cianuro-hierro, y un importante catalizador de la oxidación del cianuro a cianato. La fotólisis directa no es eficaz para la eliminación de cianuro libre, pero si es útil para la rotura de algunos complejos cianuro-metálicos.

La oxidación por cloración es el método más antiguo y que durante más tiempo ha sido utilizado, pero actualmente está en desuso. El proceso es muy eficaz para eliminar grandes cantidades de cianuro y de fácil manejo, pero resulta caro debido al elevado consumo de reactivos y solo es eficaz para cianuro libre (Patil y Paknikar, 2000). Sin embargo, la ozonización se presenta como una buena alternativa para el tratamiento de los compuestos cianurados, ya que es un proceso muy rápido que consigue la completa descomposición de cianuro, cianato y tiocianato. Además, requiere un bajo mantenimiento de las instalaciones, no es necesario el transporte, el almacenamiento, el manejo de reactivos químicos o la eliminación de residuos químicos tóxicos. El ozono actúa como un agente oxidante fuerte. La tendencia actual de la investigación en los métodos no biológicos se basa en la integración de la oxidación con ozono y la fotólisis asistida, una combinación que incrementa la eficacia de la oxidación y minimiza el consumo de reactivos (Logsdon *et al.*, 2000).

El empleo de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como oxidante del cianuro para formar cianato, y posteriormente, amonio y dióxido de carbono, es muy similar al proceso INCO, pero el intervalo de pH en el que se lleva a cabo la reacción es mayor. Otro método es el uso del  $H_2O_2$  fotoactivado para el tratamiento de efluentes industriales, sobre todo para la destrucción directa de disolventes orgánicos y cianuro. La irradiación de soluciones de  $H_2O_2$  con radiación

ultravioleta ( $\lambda$  254 nm) causa la rotura de la molécula formando radicales libres  $\text{OH}^\cdot$ . Estos radicales tienen una vida corta, son muy reactivos y poseen un elevado potencial de oxidación. Es un proceso muy lento, pero de una gran efectividad, limpio y que solo necesita  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Logsdon *et al.*, 2000). El dióxido de azufre ha sido muy utilizado durante el siglo pasado en sistemas con diversas variantes para la oxidación de las especies cianuradas. El proceso INCO, una variante del método Robbins, fue patentado en 1996 y ha sido el más empleado desde entonces. El proceso de oxidación se fundamenta en la inyección, en el tanque de detoxificación, de una mezcla de dióxido de azufre y aire, la cual rápidamente oxida el cianuro en la solución acuosa, utilizando como catalizador cobre (II). El control de pH en el proceso es primordial (Baxter y Cummings, 2006).

El tratamiento de ósmosis inversa también se utiliza para tratar soluciones cianuradas, a las cuales se les aplica una presión para obligar a los compuestos cianurados a atravesar una membrana semipermeable. En el caso de los tratamientos de intercambio iónico y ósmosis inversa, tienen la enorme ventaja de eliminar simultáneamente compuestos como cianuro, cianato, tiocianato, iones de amonio y nitrato. No obstante, estos procesos generan un residuo altamente contaminante y se caracterizan por tener altas concentraciones de otro tipo de contaminantes (Sharma *et al.*, 2008).

En general, aunque los métodos químicos son los más utilizados en el tratamiento de los residuos industriales cianurados, estos son deficientes por la imposibilidad de degradar el 100 % de los complejos de cianuro estables, requieren reactivos caros, un equipo especializado y generan compuestos secundarios tóxicos no deseados.

### 3.5.2. Degradación de cianuro mediante el uso de microorganismos

Como alternativa a los métodos físicoquímicos tradicionales, existen estrategias biotecnológicas de descontaminación de cianuro basadas en el uso de microorganismos, principalmente bacterias, que utilizan el cianuro como fuente de nitrógeno (Nava-Alonso *et al.*, 2007; Alvillo-Rivera *et al.*, 2021). En la biorremediación de cianuro, el pH es un factor limitante, siendo necesario un pH alcalino para evitar la volatilización del cianuro. Es de destacar que la mayoría de los microorganismos cianotrofos descritos degradan cianuro a pH neutro lo que limita su aplicación. No obstante, algunos microorganismos cianotrofos, como las bacterias *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344, *Aerococcus viridans*, *Exiguobacterium acetylicum* y *Bacillus marisflavi*; y el hongo *Trichoderma harzianum*, degradan cianuro a pH alcalino (Mekuto *et al.*, 2016). Por otro lado, se ha descrito que la levadura *Cryptococcus cyanovorans* puede degradar cianuro libre (hasta 10 mM) como única fuente de carbono (Motaung *et al.*, 2012).

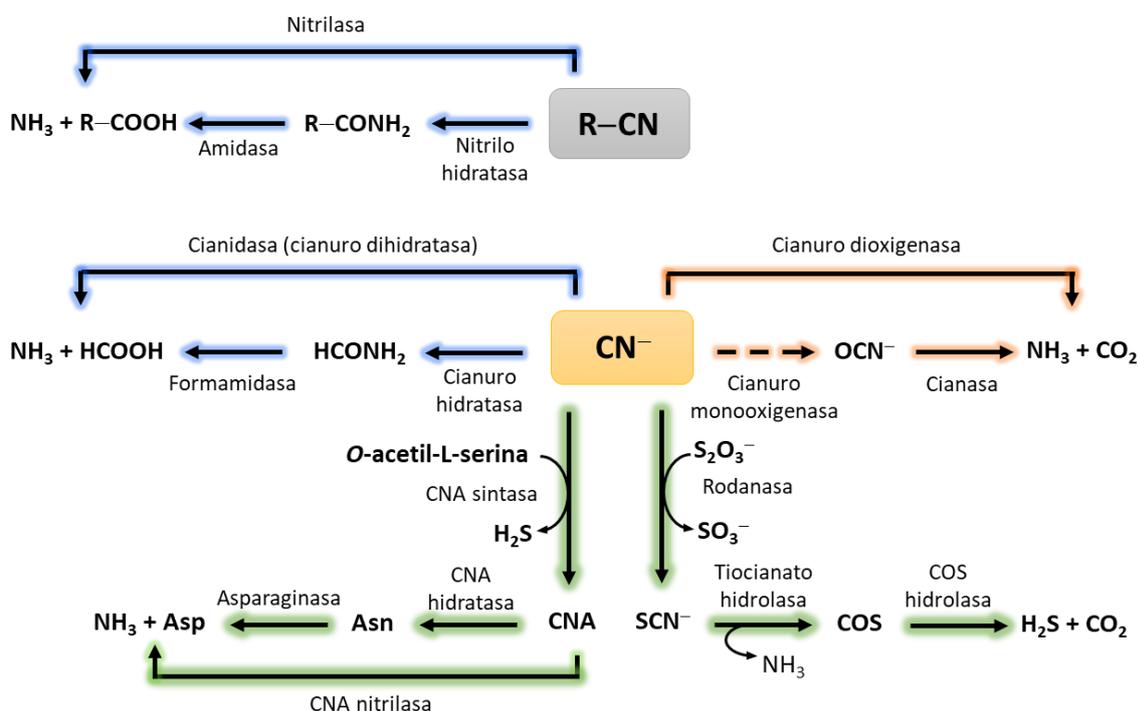
## Introducción

Las rutas de biodegradación de cianuro se pueden clasificar en función del tipo de sustrato cianurado, inorgánico u orgánico, y atendiendo al tipo de reacción. Entre estas reacciones se incluyen las de tipo oxidativo, de sustitución/adición e hidrolítico (Fig. 7). Estas rutas generan como producto final amonio, una fuente de nitrógeno fácilmente asimilable por los microorganismos, así como  $\text{CO}_2$ , ácido fórmico o ácidos carboxílicos (Ebbs, 2004; Gupta *et al.*, 2010; Luque-Almagro *et al.*, 2018; Roldán *et al.*, 2021).

### 3.5.2.1. Rutas de asimilación de cianuro inorgánico

#### ▪ Rutas oxidativas

La cianuro dioxigenasa cataliza la oxidación del cianuro a amonio y dióxido de carbono. La oxidación parcial del cianuro por una monooxigenasa podría generar cianato como intermediario, sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito la existencia de esta actividad enzimática. Por el contrario, la cianasa, que cataliza la hidrólisis del cianato a amonio y dióxido de carbono, se encuentra ampliamente distribuida en bacterias y otros microorganismos (Fig. 7).



**Figura 7. Rutas de asimilación de cianuro en bacterias.** Rutas hidrolíticas (flechas azules) en las que participan las enzimas cianuro hidratasa y cianuro dihidratasa para cianuro inorgánico; y nitrilasas y nitrilo hidratatas para cianuro orgánico (nitrilos); rutas oxidativas (flechas naranjas) llevadas a cabo por cianuro dioxigenasa y una posible cianuro monooxigenasa (línea discontinua) y rutas de sustitución/adición (flechas verdes) en las se pueden generar 3-cianoalanina (CNA) o tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) como intermediarios. Sulfuro de carbonilo (COS) (Roldán *et al.*, 2021; Olaya-Abril *et al.*, 2024).

### ▪ Rutas de sustitución/adición

El carácter nucleófilo y la alta afinidad del cianuro por los metales ha sido utilizada por los microorganismos para la detoxificación y asimilación de cianuro empleando reacciones de sustitución/adición. Las rutas más destacadas están catalizadas por la rodanasa y la 3-cianoalanina sintasa (CAS). Las sulfurotransferasas son enzimas ubicuas en los seres vivos, como la rodanasa, una enzima que utiliza tiosulfato como donador de azufre y cataliza la formación de tiocianato a partir de cianuro. El tiocianato, un compuesto menos tóxico que el cianuro, puede ser hidrolizado por la acción de una tiocianato hidrolasa para formar sulfuro de carbonilo y, este a su vez, puede ser transformado en H<sub>2</sub>S y CO<sub>2</sub> por una sulfuro de carbonilo hidrolasa (Fig. 7). Por otro lado, la CAS es otra enzima incluida en este tipo de rutas, la cual produce CNA y H<sub>2</sub>S a partir de cianuro y L-cisteína en plantas o O-acetil-L-serina, en bacterias. La CNA es un nitrilo ampliamente distribuido en el reino vegetal que, a pesar de ser considerablemente menos tóxico que el cianuro libre, presenta algunos efectos neurotóxicos y mutagénicos. Por ello, la CAS, dependiente de piridoxal fosfato, constituye el principal mecanismo de detoxificación del cianuro liberado a partir de los glucósidos cianogénicos producidos por plantas cianogénicas (Machingura *et al.*, 2016). También se ha descrito la producción de CNA por la CAS en bacterias, tanto cianogénicas, como *Chromobacterium violaceum*, como no cianogénicas, entre las que se encuentran *Bacillus megaterium* y *Enterobacter* (Brysk *et al.*, 1969; Castric y Strobel, 1969; Sakai *et al.*, 1981). En cianobacterias marinas, la síntesis de CNA en medios libres de cianuro ha sido propuesta como un mecanismo biocida frente a las microalgas (Yoshikawa *et al.*, 2000). Hasta la fecha, solo se han caracterizado dos CAS bacterianas, en *Pseudomonas ovalis*, reclasificada como *Pseudomonas putida*, y en *Bacillus stearothermophilus*, reclasificada como *Geobacillus stearothermophilus* (Omura, 2003; Kumano *et al.*, 2016). Estas enzimas son homodímeros termoestables de 70 kDa, con especificidad por la O-acetil-L-serina. La CAS de *G. stearothermophilus* sintetiza tanto CNA como cisteína, por lo que presenta también actividad cisteína sintasa (Omura, 2003; Kumano *et al.*, 2016). La CNA puede ser asimilada posteriormente mediante rutas hidrolíticas (O'Reilly y Turner, 2003).

### ▪ Rutas hidrolíticas

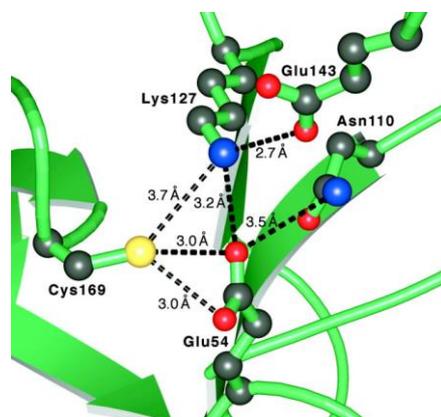
La hidrólisis del cianuro requiere la participación de dos moléculas de agua. La cianuro dihidratasa o cianidasa (CynD), cataliza la hidrólisis del cianuro en un solo paso, usando dos moléculas de agua como cosustrato, generando amonio y ácido fórmico como productos. La hidrólisis del cianuro también puede llevarse a cabo por la acción secuencial de las enzimas cianuro hidratasa y formamidasa, cada reacción requiere una molécula de agua como cosustrato, generándose formamida como intermediario, y amonio y ácido fórmico como

## Introducción

productos finales. Esta segunda ruta hidrolítica se encuentra principalmente distribuida en hongos fitopatógenos, actuando como mecanismo de defensa frente al cianuro que secretan las plantas a las que infectan, mientras que la cianidasa es propia de bacterias (Park *et al.*, 2017). Las rutas hidrolíticas utilizan como sustrato tanto cianuro inorgánico como nitrilos (Fig. 7).

### 3.5.2.2. Rutas de asimilación de cianuro orgánico

Existen dos tipos de enzimas hidrolíticas implicadas en la degradación de nitrilos que pertenecen a la familia de las carbono-nitrógeno hidrolasa: las nitrilasas, que producen amonio y ácidos carboxílicos; y las nitrilo hidratatasas, las cuales catalizan la formación de amidas a partir de nitrilos. Las amidas son posteriormente hidrolizadas por amidasas, produciendo amonio y sus correspondientes ácidos carboxílicos. Las nitrilo hidratatasas utilizan tanto nitrilos alifáticos como aromáticos, aunque muestran menos especificidad de sustrato que las cianuro hidratatasas y las cianidasas (Jez, 2019). La promiscuidad de sustrato de las nitrilasas y las nitrilo hidratatasas, la toxicidad de los nitrilos y el valor de algunos de los productos generados por estas enzimas, así como la ausencia de cofactores enzimáticos, les confiere un alto potencial biotecnológico en la biorremediación de desechos industriales que contienen nitrilos, y en su uso como biocatalizadores a escala industrial (Bhalla *et al.*, 2018).



**Figura 8. Sitio activo de la nitrilasa NIT4.** Los residuos Glu54, Lys127 y Cys169 forman una tríada catalítica característica de la superfamilia carbono-nitrógeno hidrolasa (Pace *et al.*, 2000).

Las nitrilasas están compuestas por uno o dos tipos de subunidades de diferente tamaño y número, aunque generalmente son homomultiméricas siguiendo un plegamiento tipo sándwich  $\alpha\beta\beta\alpha$ - $\alpha\beta\beta\alpha$ . Estas enzimas poseen en su sitio activo una tríada formada por cisteína, ácido glutámico y lisina, y no presentan ningún cofactor (Fig. 8). Las nitrilasas comparten con las cianidasas y las cianuro hidratatasas homología de secuencia, similitud estructural y un mismo mecanismo de reacción (O'Reilly y Turner, 2003; Dash *et al.*, 2009; Terada *et al.*, 2022).

Se han llevado a cabo estudios sobre la degradación de nitrilos en distintos microorganismos. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica la cianuro/nitrilo hidratasa del hongo *Fusarium lateritium* en *Escherichia coli* le ha conferido a esta bacteria la capacidad de asimilar nitrilos como única fuente de nitrógeno (Nolan *et al.*, 2003). Recientemente, se ha llevado a cabo la modificación de la enzima cianuro hidratasa de *Trichoderma harzianum* utilizando un diseño computacional y análisis de acoplamiento para mejorar su afinidad de unión al cianuro en procesos de biodegradación (Malmir *et al.*, 2021). Por otro lado, en plantas se han descrito cuatro nitrilasas (NIT1-NIT4). La nitrilasa NIT4 presenta especificidad por la CNA, que es hidrolizada a amonio y ácido aspártico. A la nitrilasa NIT4 se le ha asignado una función relevante en la interacción planta-bacteria. En *Arabidopsis*, NIT4 presenta, además de actividad nitrilasa, actividad nitrilo hidratasa, a través de la cual se produce asparagina. Posteriormente, la asparaginasa hidroliza la asparagina produciendo ácido aspártico y amonio (Piotrowski *et al.*, 2001; Machingura *et al.*, 2016).

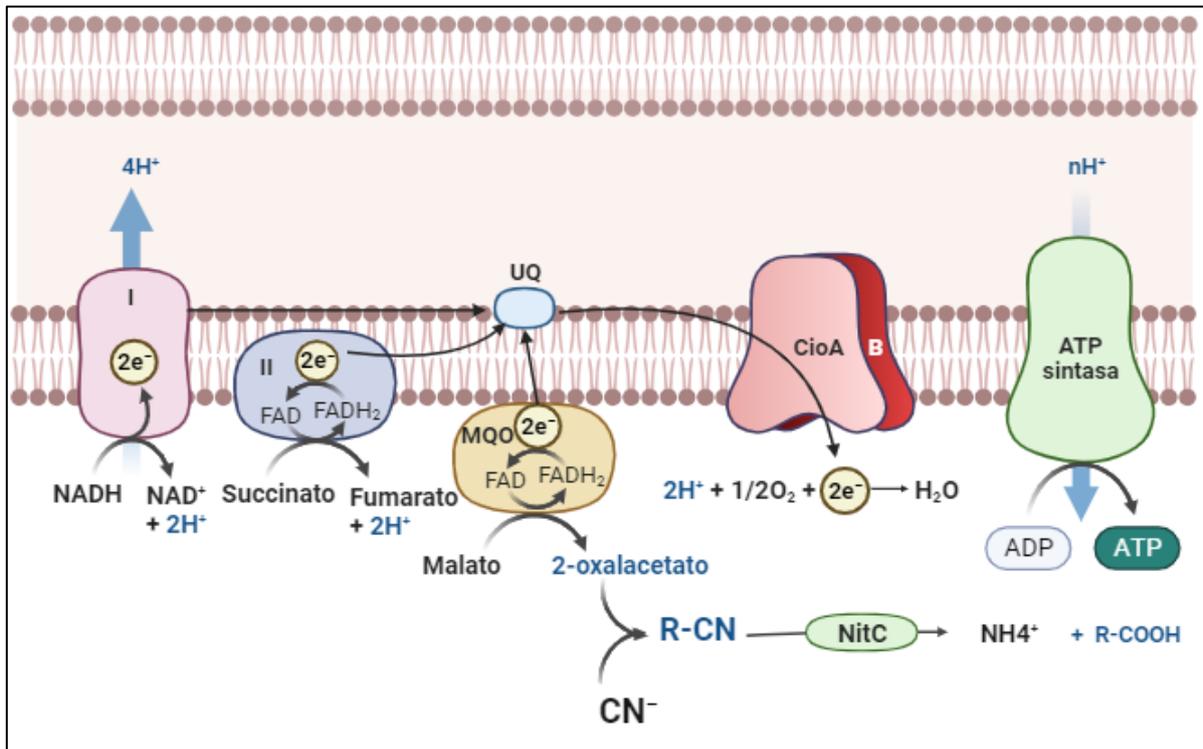
---

#### 4. Metabolismo del cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344

---

*P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es una bacteria Gram negativa que se aisló a partir de lodos del río Guadalquivir, a su paso por Córdoba, mediante técnicas de enriquecimiento en medio alcalino (pH 9,5) con cianuro como única fuente de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2005b). Por lo tanto, *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es una bacteria alcalófila y cianotrofa, lo que supone una ventaja durante su uso en procesos de biorremediación de residuos cianurados, ya que se evita la volatilización de HCN, aumentando la eficiencia del proceso de biodegradación (Luque-Almagro *et al.*, 2011a). Esta bacteria, además de cianuro libre, también asimila diferentes complejos cianuro-metálicos, los residuos cianurados procedentes de las industrias joyera y minera, así como otras formas cianuradas, incluyendo cianoacetamida, nitroprusiato, cianato, CNA y otros nitrilos (Luque-Almagro *et al.*, 2005a; 2005b; 2008; 2011a; Estepa *et al.*, 2012).

En *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se distinguen dos procesos metabólicos que están estrechamente relacionados, la resistencia y la asimilación de cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2011b). La inducción por cianuro de una oxidasa terminal insensible a cianuro (CioAB), impide el bloqueo de la cadena de transporte electrónico, lo que le permite a la bacteria sobrevivir en condiciones cianotrofas (Quesada *et al.*, 2007). Además, la estirpe CECT 5344 cuenta con isoformas de fumarasa y aconitasa, enzimas clave del ciclo de Krebs, independientes de hierro (Igeño *et al.*, 2011). Por otro lado, la ruta de asimilación de cianuro en la estirpe CECT 5344 está formada por una malato:quinona oxidorreductasa, que cataliza la sobreproducción de oxalacetato en respuesta a cianuro. El oxalacetato reacciona químicamente con el cianuro produciendo un 2-hidroxinitrilo (o cianhidrina); este nitrilo es sustrato de la nitrilasa NitC, que cataliza su hidrólisis hasta amonio y el correspondiente ácido carboxílico. El amonio es finalmente asimilado por la ruta de la glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) (Luque-Almagro *et al.*, 2007; 2011b; Estepa *et al.*, 2012). La enzima malato:quinona oxidorreductasa constituye una conexión entre los procesos de resistencia y asimilación de cianuro, ya que produce el oxalacetato requerido durante la asimilación y, al mismo tiempo, transfiere electrones a la oxidasa insensible a cianuro en condiciones cianotróficas (Fig. 9). En un estudio de biodegradación del residuo cianurado de la joyería llevado a cabo en reactor se demostró que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es capaz de degradar cianuro (12 mM), incluyendo cianuro libre (8 mM) y complejos cianuro-metálicos (4 mM) (Ibáñez *et al.*, 2017).



**Figura 9. Cadena de transporte electrónico y ruta de asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.** La estirpe cianotrofa CECT 5344 induce una oxidasa insensible a cianuro (CioAB). La asimilación de cianuro se lleva a cabo mediante la sobreproducción de oxalacetato por la malato:quinona oxidorreductasa (Mqo). Posteriormente, el cianuro reacciona químicamente con el 2-oxalacetato formando una cianhidrina, sustrato de la nitrilasa NitC.

Además de los mecanismos relacionados con la asimilación y la resistencia a cianuro, los microorganismos cianotrofos deben resolver problemas adicionales ocasionados por el cianuro, como la disminución de la biodisponibilidad de metales esenciales como el hierro y el cobre, y el potencial daño celular ocasionado por el estrés oxidativo. Por ello, la homeostasis del hierro y las respuestas frente al estrés oxidativo forman también parte del metabolismo del cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2007; 2016).

El cianato es un derivado del cianuro, que se postuló inicialmente como intermediario en la ruta de asimilación de cianuro en *Pseudomonas fluorescens* NCIMB11764 (Harris y Knowles, 1983). *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 utiliza cianato como fuente de nitrógeno por la acción de la cianasa CynS (Luque-Almagro *et al.*, 2008). En esta estirpe, el gen de la cianasa *cynS* se localiza en la agrupación génica *cynFABDS*, que también incluye genes que codifican un regulador transcripcional de la familia Fis (CynF) y un transportador de cianato, de tipo ABC (CynABD) (Sáez *et al.*, 2019). En trabajos previos se ha demostrado que en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 la actividad cianasa está presente tanto en células cultivadas con cianato como con cianuro, sin embargo, un mutante deficiente en el gen *cynS* conservó la capacidad de asimilar cianuro de forma similar a la estirpe silvestre, lo que descartó al

## Introducción

cianato como intermediario de la ruta de asimilación de cianuro en esta bacteria (Luque-Almagro *et al.*, 2008).

*P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 carece de actividad CNA sintasa, pero es capaz de asimilar CNA como única fuente de nitrógeno a través de la nitrilasa Nit4, codificada en la agrupación génica *cioAB-nit4*, responsable de la resistencia a cianuro. Sin embargo, esta agrupación génica se induce por cianuro, y no por CNA (Acera *et al.*, 2017).

---

## 5. Técnicas ómicas aplicadas al estudio de la biodegradación de cianuro: cianómica

---

Para definir las diferentes técnicas ómicas aplicadas al estudio de la biodegradación de cianuro, mayoritariamente llevadas a cabo en la bacteria *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, se ha acuñado el término cianómica (Luque-Almagro *et al.*, 2016; Cabello *et al.*, 2018). La estirpe CECT 5344 fue la primera bacteria cianotrofa cuyo genoma fue secuenciado, para lo que se empleó la técnica de pirosecuenciación 454 Life Sciences (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg, *et al.*, 2014). En este primer borrador del genoma se pudieron identificar, por homología de secuencias, genes clave para la asimilación (agrupación génica *nit1C*) y la resistencia (agrupación génica *cioAB-nit4*) a cianuro. Posteriormente, se realizó una nueva secuenciación mediante la tecnología PacBio single-molecule, real-time (SMRT®). El uso de esta tecnología permitió completar en su totalidad el genoma y establecer el patrón de metilación, obteniéndose por primera vez el metiloma de un organismo cianotrofo (Wibberg *et al.*, 2016). Hasta la fecha se han secuenciado los genomas de otras cinco bacterias asimiladoras de cianuro, *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 (Vilo *et al.*, 2012), *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 (Robson *et al.*, 2015), *Pseudomonas monteillii* BCN3 (Jones y Kunz, 2019), *Pseudomonas koreensis* AB36 (Babalola y Ayangbenro, 2019) y *Bacillus safensis* PER-URP-08 (Justo-Arevalo *et al.*, 2022). El análisis de estos genomas ha permitido identificar genes que codifican proteínas involucradas en la asimilación de cianuro, como la nitrilasa NitC de *P. fluorescens* NCIMB 11764, o la cianuro dihidratasa CynD de *Bacillus safensis* PER-URP-08. La estirpe CECT 5344 contiene, además de NitC y Nit4, otras dos nitrilasas y otros seis genes de la superfamilia C-N hidrolasa, también denominada superfamilia nitrilasa. Otros genes identificados en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 que le confieren a esta estirpe un gran potencial biotecnológico desde el punto de vista medioambiental, codifican sistemas de resistencia a arsénico y mercurio, rutas de biodegradación de compuestos aromáticos tóxicos y rutas de síntesis de polihidroxialcanoatos (Luque-Almagro *et al.*, 2013).

El estudio transcriptómico de la biodegradación de cianuro solo se ha llevado a cabo en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. En esta estirpe se realizó un análisis transcriptómico con células cultivadas con distintas fuentes de nitrógeno, incluyendo amonio, cianuro sódico o residuo cianurado de la joyería, así como condiciones limitantes de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2015). Este análisis reveló que el cianuro induce los genes de las agrupaciones génicas *nit1C* y *cioAB-nit4*, responsables de la asimilación y de la resistencia a cianuro. Entre los genes inducidos por cianuro también se identificaron genes responsables de la asimilación de cianato, otros genes involucrados en la homeostasis del hierro relacionados con el ensamblaje

## Introducción

de los centros Fe-S y genes de resistencia a estrés oxidativo. El gen *mgoB*, que codifica una malato:quinona oxidoreductasa, así como genes que codifican transportadores de metales y sus posibles reguladores, se indujeron exclusivamente por el residuo cianurado de la joyería (Luque-Almagro *et al.*, 2015). También se llevó a cabo un análisis transcriptómico en respuesta a cianuro en la bacteria nitrificante no cianotrofa *Nitrosomonas europaea*, con el objeto de identificar dianas del cianuro que afectan negativamente al proceso de nitrificación (Park y Ely, 2009).

La transcriptómica incluye el estudio de los pequeños RNA (sRNA), los cuales han evolucionado para modular la expresión de genes diana en respuesta a los cambios producidos en el ambiente (Holmqvist y Wagner, 2017; Dutta y Srivastava, 2018). Diferentes mecanismos de acción de los sRNA han sido descritos, incluyendo los sRNA antisentido, que actúan por emparejamiento extenso de bases en la región 3' no codificante (UTR) de sus mRNA diana, y los sRNA de complementariedad limitada con sus dianas, que requieren chaperonas de RNA, como las proteínas Hfq, para activar/reprimir su traducción (Gottesman y Storz, 2011; Holmqvist y Wagner, 2017; Nitzan *et al.*, 2017). Además, existen sRNA reguladores de proteínas, cuyo mecanismo consiste en unirse a estas y afectar su actividad, o secuestrar proteínas reguladoras, como algunos factores de transcripción (Papenfort *et al.*, 2015).

Los primeros estudios proteómicos sobre la biodegradación de cianuro se realizaron mediante electroforesis bidimensional (2D-PAGE) acoplada a espectrometría de masas en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y *Klebsiella oxytoca* (Luque-Almagro *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2010). En estos trabajos se identificaron proteínas expresadas en respuesta a cianuro. En la estirpe CECT 5344 se estableció que el cianuro induce una compleja respuesta frente al estrés oxidativo, la homeostasis de hierro y la regulación general del metabolismo del nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2007). En los últimos años, las técnicas proteómicas han evolucionado hacia la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), posibilitando una proteómica cuantitativa más resolutive y precisa. Esta proteómica de nueva generación se ha aplicado al estudio del proceso de biorremediación de un residuo cianurado procedente de la joyería por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Ibáñez *et al.*, 2017). Las proteínas identificadas en este trabajo se correlacionaron estrechamente con los genes que se encontraron inducidos en el análisis transcriptómico por el cianuro y por los metales presentes en este residuo cianurado (Luque-Almagro *et al.*, 2015).

En un estudio proteómico realizado sobre un mutante de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 deficiente en el gen *dapA1*, que codifica una dihidrodipicolinato sintasa, se ha demostrado que esta proteína es relevante para la resistencia al cianuro, el estrés oxidativo y la

homeostasis del hierro. El dipicolinato podría actuar como quelante de hierro intracelular, confiriendo protección frente al estrés oxidativo y, además, se ha propuesto que participa en la regeneración de los centros de Fe-S para reactivar las metaloproteínas dañadas por el cianuro (Olaya-Abril *et al.*, 2020).

Las distintas aproximaciones ómicas aplicadas en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 han permitido determinar el gran potencial biotecnológico de esta bacteria, convirtiéndole en un organismo cianotrofo modelo. Además, los resultados obtenidos han establecido la base para predecir su potencial para la biodegradación de diferentes residuos industriales cianurados (Luque-Almagro *et al.*, 2013, 2015; Ibáñez *et al.*, 2017; Cabello *et al.*, 2018).

Hasta la fecha no se ha llevado a cabo ningún estudio metabolómico en el contexto de la biodegradación de cianuro por bacterias, aunque se han realizado perfiles metabólicos relacionados con la búsqueda de marcadores y/o antídotos frente al cianuro, proponiendo que la riboflavina puede ser un tratamiento novedoso para reducir la toxicidad causada por cianuro y una medida profiláctica al tratamiento con nitroprusiato, usado como vasodilatador en situaciones graves de hipertensión arterial. Además, se ha propuesto que la inosina puede servir como biomarcador de la exposición a cianuro (Nath *et al.*, 2013). También se ha estudiado el perfil metabólico de la degradación de la durrina, un glucógeno cianogénico presente en alimentos como el sorgo (*Sorghum spp.*), para regular los contenidos de cianuro en las distintas variedades de este y prevenir su toxicidad en el ganado por ingesta elevada (Choi *et al.*, 2020).

En los últimos años, la biodegradación de cianuro también está siendo abordada desde un punto de vista que abarca comunidades bacterianas, utilizando aproximaciones metagenómicas. En un trabajo reciente realizado con técnicas metagenómicas en el Lago Ace (Antártida), se identificó la agrupación génica *nit1C*, responsable de la asimilación de cianuro, en la cianobacteria *Candidatus Regnicoccus frigidus sp. nov.* (Panwar *et al.*, 2022). Las secuencias génicas obtenidas a partir de poblaciones establecidas en diferentes profundidades revelaron que poblaciones superficiales de esta bacteria contenían en una alta frecuencia la agrupación génica *nit1C*, mientras que esta disminuía con la profundidad. La presencia de los genes *nit1C* en bacterias de las capas superficiales de este lago podría conferir una ventaja competitiva debido a que en un ambiente en el que los nutrientes son escasos, el cianuro producido por otras cianobacterias cianogénicas como mecanismo de defensa frente a posibles predadores, ciliados y rotíferos, podría constituir una fuente de nitrógeno asimilable.

## Introducción

Otros estudios metagenómicos se han centrado principalmente en procesos de biorremediación de residuos industriales conteniendo tiocianato y en la búsqueda de nitrilasas con nuevas capacidades catalíticas y de remediación. Así, se ha realizado un análisis metagenómico basado en el estudio de consorcios bacterianos procedentes de residuos generados en procesos de galvanoplastia, en presencia de cianuro o tiocianato, identificándose la biodiversidad bacteriana de ambos consorcios, mediante la secuenciación masiva del DNA que codifica el RNA ribosómico 16S. Estos consorcios incluyen los géneros *Proteus sp.* y *Myroides sp.* entre las principales bacterias degradadoras de cianuro, y a *Proteus vulgaris* en el consorcio degradador de tiocianato (Mekuto *et al.*, 2017, 2018). También se han realizado estudios metagenómicos sobre comunidades microbianas procedentes de residuos de la minería seleccionadas en biorreactores con tiocianato. Mediante secuenciación masiva de genomas se identificaron 19 microorganismos, la mayoría de los cuales contenían genes de desnitrificación y oxidación de sulfuros, aunque solo en la bacteria *Thiobacillus sp.* se identificaron genes posiblemente involucrados en la degradación de tiocianato (Rahman *et al.*, 2017).



# Objetivos



## Objetivos

El objetivo general de este trabajo consiste en determinar los mecanismos de regulación y los componentes que participan en la resistencia y asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Para ello se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación de pequeños RNAs y sus dianas, implicados en la degradación de residuos cianurados.
2. Estudio de la agrupación génica *cioAB-nit4*, diana de pequeños RNAs, implicada en la resistencia a cianuro y en la asimilación de 3-cianoalanina.
3. Caracterización de la agrupación génica *nit1C*, diana de pequeños RNAs, la cual participa en la asimilación de cianuro.



The background features a complex geometric design with overlapping shapes in shades of yellow, orange, and red. Faint, stylized patterns resembling a comb or a series of connected circles are visible across the design.

**Materiales**

**y**

**Métodos**



# I. Material biológico

## 1.1. Estirpes bacterianas

La bacteria cianotrofa *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344 aislada por el grupo Bio-117 (Luque-Almagro *et al.*, 2005b), ha sido el microorganismo objeto de estudio de este trabajo. Además, para los estudios de biología molecular se han utilizado diferentes estirpes de *Escherichia coli* en base a sus características genotípicas. Todas las estirpes empleadas se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.

<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT 5344			
Estirpe	Genotipo/Fenotipo*		Referencia
<b>Silvestre</b>	Estirpe silvestre cianotrofa (Nx <sup>R</sup> )		(Luque-Almagro <i>et al.</i> , 2005b)
<b>Nit1<sup>-</sup></b>	<i>nit1<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen de la nitrilasa alifática <i>nit1</i> (BN5_1925)	Este trabajo
<b>Nit2<sup>-</sup></b>	<i>nit2<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen de la nitrilasa/cianuro hidratasa <i>nit2</i> (BN5_4427)	Este trabajo
<b>NitC<sup>-</sup></b>	<i>nit3<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen de la nitrilasa <i>nit3</i> (BN5_1632)	(Estepa <i>et al.</i> , 2012)
<b>Nit4<sup>-</sup></b>	<i>nit4<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen de la nitrilasa de la 3-ciano-L-alanina <i>nit4</i> (BN5_1912)	Este trabajo
<b>Nit5<sup>-</sup></b>	<i>nit5<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Estirpe mutante deficiente en el gen de la nitrilasa/cianuro hidratasa y apolipoproteína N-aciltransferasa <i>nit5</i> (BN5_0736)	Este trabajo
<b>Nit6<sup>-</sup></b>	<i>nit6<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Estirpe mutante deficiente en el gen de la proteína de la familia cianuro hidrolasa <i>nit6</i> (BN5_1196)	Este trabajo
<b>Nit7<sup>-</sup></b>	<i>nit7<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen de la amidohidrolasa <i>nit7</i> (BN5_3251)	Este trabajo
<b>NitC/Nit2<sup>-</sup></b>	<i>nit3<sup>-</sup>/nit2<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en los genes <i>nit3</i> y <i>nit2</i>	Este trabajo
<b>NitC/Nit4<sup>-</sup></b>	<i>Nit3<sup>-</sup>/nit4<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en los genes <i>nit3</i> y <i>nit4</i>	Este trabajo
<b>NitC/Nit5<sup>-</sup></b>	<i>nit3<sup>-</sup>/nit5<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en los genes <i>nit3</i> y <i>nit5</i>	Este trabajo
<b>NitC/Nit6<sup>-</sup></b>	<i>nit3<sup>-</sup>/nit6<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en los genes <i>nit3</i> y <i>nit6</i>	Este trabajo
<b>NitC/Nit7<sup>-</sup></b>	<i>nit3<sup>-</sup>/nit7<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en los genes <i>nit3</i> y <i>nit7</i>	Este trabajo
<b>NitA<sup>-</sup></b>	<i>nitA<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen regulador transcripcional dependiente de $\sigma$ (54) <i>nitA</i> (BN5_1630)	(Estepa <i>et al.</i> , 2012)
<b>NitB<sup>-</sup></b>	<i>nitB<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen de una proteína hipotética <i>nitB</i> (BN5_1631)	(Estepa <i>et al.</i> , 2012)
<b>NitD<sup>-</sup></b>	<i>nitD<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen de un miembro de la superfamilia S-adenosilmetionina <i>nitD</i> (BN5_1633)	Este trabajo
<b>NitE<sup>-</sup></b>	<i>nitE<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen de una acetiltransferasa <i>nitE</i> (BN5_1634)	(Ibáñez, 2018)

<b>NitF<sup>-</sup></b>	<i>nitF<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen del polipéptido trifuncional de la familia AIRS/GARS <i>nitF</i> (BN5_1635)	Este trabajo
<b>NitG<sup>-</sup></b>	<i>nitG<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen de una proteína hipotética <i>nitG</i> (BN5_1636)	Grupo Bio-117 (Ibáñez, 2018)
<b>NitH<sup>-</sup></b>	<i>nitH<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen la oxidorreductasa dependiente de NADH <i>nitH</i> (BN5_1636)	Este trabajo
<b>GntR<sup>-</sup></b>	<i>gntR1352<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen de la proteína reguladora tipo GntR (BN5_1352)	Este trabajo
<b>DctM<sup>-</sup></b>	<i>dctM<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Estirpe mutante deficiente en el gen <i>dctM</i> (BN5_0450) que codifica un transportador de citrato	Este trabajo
<b>MocR<sup>-</sup></b>	<i>mocR<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen de la proteína reguladora tipo GntR <i>mocR</i> (BN5_1899)	Este trabajo
<b>MocR/Nit4<sup>-</sup></b>	<i>mocR<sup>-</sup>/nit4<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> , kan <sup>R</sup> )	Doble mutante deficiente en los genes <i>mocR</i> (BN5_1899) y <i>nit4</i> (BN5_1912)	Este trabajo
<b>DapA1<sup>-</sup></b>	<i>dapA1<sup>-</sup></i> (Nx <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Mutante deficiente en el gen de la dihidrodipicolinato sintasa <i>dapA1</i> (BN5_1907)	(Olaya-Abril <i>et al.</i> , 2020)
<b><i>Escherichia coli</i></b>			
<b>Estirpe</b>	<b>Genotipo/Fenotipo*</b>		<b>Referencia</b>
<b>DH5α</b>	<i>F- supE44 DlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17recA1end A1gyrA96 thi-1 relA1 TpR SmR recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc: Mu: Km Tn7Tra<sup>+</sup></i>		(Green y Sambrook, 2012)
<b>S17-1</b>	Huésped para plásmidos movilizables en genes <i>mob</i>		(Simon y Prier, 1983)

(\*): Nx<sup>R</sup>, resistente a nalidixico; Gm<sup>R</sup>, resistente a gentamicina; Kan<sup>R</sup>, resistente a kanamicina

## 1.2. Plásmidos

Los plásmidos empleados en este trabajo se recogen en la Tabla 6.

**Tabla 6. Plásmidos empleados en este trabajo.**

Vector	Aplicación	Referencia/Casa comercial
<b>pGEM-T</b> (Amp <sup>R</sup> )	Vector para la clonación de fragmentos de DNA generados mediante PCR	Promega (Madison-WI, EE.UU.)
<b>pGEM-T-Easy</b> (Amp <sup>R</sup> )	Vector para la clonación de fragmentos de DNA generados mediante PCR	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
<b>pK18mob</b> (Km <sup>R</sup> )	Vector suicida en <i>Pseudomonas</i> derivado de pK18 con los genes <i>mob</i>	(Becker <i>et al.</i> , 1995)
<b>pMS255</b> (Gm <sup>R</sup> )	Vector con casete de resistencia a gentamicina	Agilent Technologies, (CA, EE.UU.)
<b>pBKS</b> (km <sup>R</sup> )	Vector con casete de resistencia a kanamicina	Este trabajo
<b>pGEM-T-EasyΔdctM</b> (Amp <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Vector pGEM-T- Easy con fragmento ( <i>EcoRI</i> - <i>Bam</i> HI) que contiene una secuencia parcial del gen	

<b>pK18mob<math>\Delta</math>dctM::Gm</b> (Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	BN5_0450 interrumpida por el casete de gentamicina Vector pK18mob con fragmento ( <i>EcoRI</i> - <i>Bam</i> HI) que contiene una secuencia parcial del gen BN5_0450 interrumpida por el casete de gentamicina	Este trabajo
<b>pK18mob<math>\Delta</math>nit1::Gm</b> (Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Vector pK18mob con fragmento ( <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III) que contiene una secuencia parcial del gen BN5_1925 interrumpida por el casete de gentamicina	Este trabajo
<b>pK18mob<math>\Delta</math>nit2</b> (Km <sup>R</sup> )	Vector pK18mob con fragmento ( <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI) que contiene una secuencia parcial del gen BN5_4427	Este trabajo
<b>pK18mob<math>\Delta</math>nit4</b> (Km <sup>R</sup> )	Vector pK18mob con fragmento ( <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III) que contiene una secuencia parcial del gen BN5_1912	Este trabajo
<b>pK18mob<math>\Delta</math>nit5</b> (Km <sup>R</sup> )	Vector pK18mob con fragmento ( <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI) que contiene una secuencia parcial del gen BN5_0736	Este trabajo
<b>pK18mob<math>\Delta</math>nit6</b> (Km <sup>R</sup> )	Vector pK18mob con fragmento ( <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI) que contiene una secuencia parcial del gen BN5_1196	Este trabajo
<b>pK18mob<math>\Delta</math>nit7</b> (Km <sup>R</sup> )	Vector pK18mob con fragmento ( <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III) que contiene una secuencia parcial del gen BN5_3251	Este trabajo
<b>pK18mob<math>\Delta</math>gntR2::Gm</b> (Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Vector pK18mob con fragmento ( <i>Eco</i> RI) que contiene una secuencia parcial del gen BN5_1352 interrumpida por el casete de gentamicina	Este trabajo
<b>pK18mob<math>\Delta</math>mocR::Gm</b> (Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Vector pK18mob con fragmento ( <i>Eco</i> RI - <i>Hind</i> III) que contiene una secuencia parcial del gen BN5_1899 interrumpida por el casete de gentamicina	Este trabajo
<b>pK18mob<math>\Delta</math>nitD::Km</b> (Km <sup>R</sup> )	Vector pK18mob con fragmento ( <i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I) que contiene una secuencia parcial del gen BN5_1633 interrumpida por el casete de Km	Este trabajo
<b>pK18mob<math>\Delta</math>nitF::Gm</b> (Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup> )	Vector pK18mob con fragmento ( <i>Eco</i> RI) que contiene una secuencia parcial del gen BN5_1635 interrumpida por el casete de Gm	Este trabajo

## 2. Medios y condiciones de cultivo

### 2.1. Medios de cultivo

Para el cultivo de las estipes bacterianas *E. coli* y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se utilizó el medio rico Luria-Bertani (LB). Además, *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se cultivó en medio mínimo M9 (Green y Sambrook, 2012), ajustado a pH 9,5, utilizando acetato 50 mM como fuente de carbono, trazas metálicas y distintas fuentes de nitrógeno, incluyendo, cloruro amonio, cianuro sódico, residuo joyero cianurado, 3-ciano-L-alanina (CNA) y otros nitrilos, a las concentraciones indicadas en cada experimento. La composición de los medios de cultivo utilizados se detalla en la Tabla 7.

**Tabla 7. Composición de los medios de cultivo bacterianos empleados.**

Medio	Compuesto	Concentración (g/L)	pH
LB	Bactotripton	10	7,5
	Extracto de levadura	5	
	NaCl	10	
	H <sub>2</sub> O destilada hasta 1 L		
LB sólido	Medio LB		7,5
	Agar (BD Headquarters, NJ, EE.UU.)	15	
M9*	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6	9,5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3	
	NaCl	0,5	

(\*) Composición de las trazas x1000: MgCl<sub>2</sub> 10,75 g/L, CaCO<sub>3</sub> 2 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 6,16 g/L; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4,75 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,44 g/L, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,12 g/L, CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,25 g/L, CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,28 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,06 g/L, HCl 51,3 mL y H<sub>2</sub>O destilada hasta 1 L. Las trazas se esterilizaron por separado, sin MgSO<sub>4</sub> y con solo 4,5 g de FeSO<sub>4</sub>. El MgSO<sub>4</sub> y el resto del FeSO<sub>4</sub> se esterilizaron por filtración y se añadieron por separado al resto de la solución de trazas previamente a su uso.

Los medios de cultivo se autoclavaron a 126 °C durante 20 min y se suplementaron con los antibióticos requeridos según la estirpe bacteriana a las concentraciones indicadas en la Tabla 8. Los antibióticos se esterilizaron por filtración utilizando filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore, Burlington-MA, EE.UU.).

**Tabla 8. Antibióticos utilizados.**

Antibiótico*	Disolvente	Concentración stock (mg/mL)	Concentración en el medio (µg/mL)
Ácido Nalidíxico (Nx)	NaOH (0,1M)	10	10
Kanamicina (Kan)	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	50	50
Gentamicina (Gm)	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	20	20
Ampicilina (Amp)	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	100	100

(\*) Todos los antibióticos usados en este trabajo fueron suministrados por Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, EE.UU.). H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>: agua destilada.

Para la selección de las colonias de *E. coli* DH5α mediante su actividad enzimática β-galactosidasa, el medio LB sólido se suplementó con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (55 mg/L) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (40 mg/L), previamente a su solidificación.

## 2.2. Condiciones de cultivo

Las distintas estirpes de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se cultivaron aeróbicamente en un incubador orbital refrigerado New Brunswick Scientific C24 (Edison, NJ, EE.UU.) a 30 °C y con agitación constante a 220 rpm. Se emplearon matraces Erlenmeyer con un volumen medio de cultivo de hasta un 25 % de su capacidad total, para así garantizar una buena aireación del cultivo. Los matraces se taparon con algodón hidrófobo estéril para evitar su contaminación. *E. coli* se cultivó aeróbicamente en tubos de ensayo de 15 mL de capacidad

cerrados con tapones metálicos para mantener la esterilidad. A estos tubos se añadieron 3 mL de medio LB y se incubaron a 37 °C con una agitación constante a 220 rpm.

---

### 3. Conservación y mantenimiento de los cultivos

---

Las estirpes bacterianas se conservaron a - 80 °C, en sus respectivos medios de cultivo, con glicerol estéril 20 % (v/v). Regularmente se realizó la siembra de las diferentes estirpes en medios sólidos en condiciones axénicas para garantizar la pureza y durabilidad de los gliceroles almacenados.

---

### 4. Curvas de crecimiento

---

Las curvas de crecimiento con cianuro como única fuente de nitrógeno se llevaron a cabo precultivando *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en medio M9 (pH 9,5) con acetato de sodio 50 mM como fuente de carbono y cloruro de amonio 2 mM como fuente de nitrógeno. Transcurridas 24 h, cuando el amonio se consumió por completo ( $A_{600}$  inicial  $\sim 0,25$ ), se añadió cianuro sódico, residuo cianurado joyero o cloruro de amonio, como única fuente de nitrógeno, a una concentración 2 mM. Este momento fue considerado el inicio de la curva de crecimiento.

---

### 5. Preparación de extractos acelulares de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344

---

Los extractos acelulares de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se prepararon a partir de células recogidas a una absorbancia de 600 nm ( $A_{600}$ ) de  $\sim 0,3$  y cuando la fuente de nitrógeno se consumió entre un 60-70 %. El cultivo se centrifugó en una centrífuga refrigerada 6K15, a 4500 x g durante 10 min y a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante obtenido se utilizó para determinar la concentración de la fuente de nitrógeno, mientras que el precipitado celular se lavó dos veces con distintos tampones, según el ensayo a realizar, manteniéndose a - 80 °C hasta su uso. Justo antes de su utilización, las células se descongelaron y, dependiendo del experimento, estas se resuspendieron en un tampón determinado. Las células se rompieron por cavitación aplicando 90 W durante tres pulsos de 5 s utilizando el sonicador Vibracell (Sonics & Materials Inc., Newtown-CT, EE.UU.), manteniéndose en hielo para evitar la acción de las proteasas y el sobrecalentamiento de la muestra. El extracto obtenido se centrifugó a 15 000 x g durante 20 min y 4 °C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante constituyó el extracto acelular.

---

## 6. Determinaciones analíticas

---

### 6.1. Medida del crecimiento celular

---

El crecimiento bacteriano se determinó de forma rutinaria mediante turbidimetría a 600 nm ( $A_{600}$ ) en un espectrofotómetro Thermo Spectronic (Thermo Scientific, Waltham-MA, EE.UU.). También se determinó mediante la cuantificación de la concentración de proteína en células enteras por el método de Lowry, según se detalla en el apartado materiales y métodos 6.4.

### 6.2. Determinación de la concentración de cianuro

---

La concentración de cianuro se determinó siguiendo el método colorimétrico previamente descrito por Asmus y Garschagen (1953). A 2,5 mL de muestra, convenientemente diluida, se le añadieron 0,1 mL de cloramina T 1 % (p/v) y se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 0,3 mL de reactivo B, compuesto por 3 g de ácido barbitúrico, 15 mL de piridina, 3 mL HCl y H<sub>2</sub>O hasta 50 mL. Transcurridos 8 min, se midió la absorbancia a 578 nm. Los valores de absorbancia obtenidos fueron extrapolados a una recta patrón de concentraciones conocidas de cianuro sódico.

### 6.3. Determinación de la concentración de amonio

---

Para la determinación de la concentración de amonio se empleó el método basado en el reactivo de Nessler (Morrison, 1971). A 0,5 mL de muestra, convenientemente diluida, se añadieron 0,5 mL del reactivo Nessler, preparado mezclando volúmenes iguales de las soluciones A (K<sub>2</sub>HgI<sub>4</sub> 6,35 M) y B (NaOH 1 N) de la casa comercial Merck (Darmstadt, Alemania, Europa) y diluido 1:3 en agua destilada. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 410 nm, extrapolándose los resultados en una recta patrón realizada con cloruro amónico.

Para determinar la concentración de amonio en los ensayos enzimáticos, se utilizó el método descrito por Solorzano (1969), usando los siguientes reactivos:

- 1) Reactivo A (solución fenol-alcohol): se mezclaron 1,5 mL de fenol con 15 mL de etanol al 95 % (v/v).
- 2) Reactivo B: Nitroprusiato de sodio 0,5 % (p/v).
- 3) Reactivo C (solución alcalina): citrato trisódico (10 g) e hidróxido de sodio (0,5 g) en 50 mL de agua.
- 4) Reactivo D (solución de hipoclorito sódico): se diluyó 1 mL de hipoclorito sódico en 7 mL de agua.
- 5) Reactivo E (solución oxidante): este reactivo se preparó en el momento de su uso, mezclando 20 mL del reactivo C con 5 mL del reactivo D.

Para llevar a cabo la determinación de la concentración de amonio, se mezclaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra y 720  $\mu\text{L}$  de agua, añadiendo 60  $\mu\text{L}$  de reactivo A, 60  $\mu\text{L}$  de reactivo B y 150  $\mu\text{L}$  60  $\mu\text{L}$  de reactivo E. Tras una hora y media de incubación en oscuridad, se midió la absorbancia a 640 nm, la cual se extrapoló en una recta patrón realizada con cloruro amónico.

#### 6.4. Determinación de la concentración de proteína

---

La concentración de proteína en extractos acelulares se determinó por el método descrito por Bradford (1976), mientras que, para la determinación de proteína en células enteras se empleó el método de Lowry modificado (Shakir *et al.*, 1994). En el método Bradford se utilizó el reactivo Bio-Rad Dye reagent concentrate, suministrado por la casa comercial Biorad (Hercules-CA, EE.UU.). Este método se llevó a cabo mezclando 0,8 mL de muestra convenientemente diluida y 0,2 mL del reactivo de Bradford, incubándose durante 5 min a temperatura ambiente y determinándose la absorbancia a 595 nm. En el método de Lowry modificado, a 0,25 mL de muestra se le añadieron 1,75 mL de reactivo A ( $\text{Na}_2\text{CO}$  185 mM; NaOH 98,1 mM;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,39 mM y  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  7 mM) y la mezcla se incubó durante 3 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 0,25 mL de reactivo Folin Ciocalteau diluido en proporción 1:1 en agua destilada. Esta mezcla se volvió a incubar durante 3 min a 37 °C, midiéndose posteriormente la absorbancia a 750 nm. La concentración de proteína se determinó extrapolar los valores obtenidos en una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA).

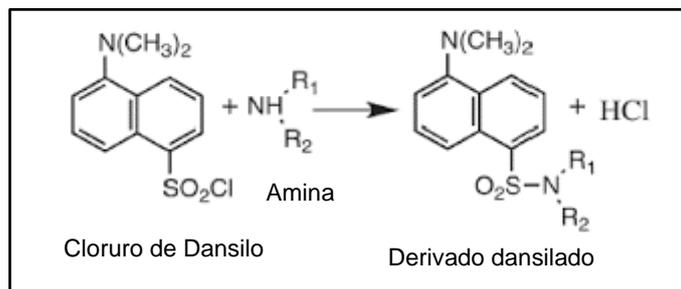
#### 6.5. Análisis de aminoácidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV)

---

En este análisis se utilizaron como patrones los distintos aminoácidos, así como la 3-ciano-L-alanina. Estos compuestos se diluyeron en HCl 2N, a concentraciones comprendidas entre 25 y 100  $\mu\text{M}$ . En todas las muestras se incluyó como patrón interno asparagina 10  $\mu\text{M}$ .

Previamente a la separación cromatográfica de los aminoácidos se realizó su derivatización mediante el marcaje selectivo de los grupos amino (aminas primarias y secundarias) con cloruro de dansilo [cloruro de 5-(dimetilamino)naftaleno-1-sulfonilo] (Seiler, 1970). Los aminoácidos dansilados son altamente estables, fácilmente separables en el HPLC y detectables a muy bajas concentraciones en la región ultravioleta (Fig. 10). La reacción de dansilación se llevó a cabo siguiendo el método de Gray modificado (Gray, 1972), en el que la muestra se mezcló con etanol 0,25 % (v/v),  $\text{NaHCO}_3$  1 % (p/v), preparados en agua desionizada, y cloruro de dansilo al 10 % (p/v) en acetonitrilo. A continuación, la mezcla se incubó durante 30 minutos a 60 °C en oscuridad, manteniéndose posteriormente las muestras

a - 80 °C hasta uso. Las soluciones estándar se inyectaron por separado para generar las correspondientes rectas patrón.



**Figura 10. Reacción de dansilación de los aminoácidos.** La reacción entre el cloruro de dansilo y la amina ocurre mediante sustitución nucleofílica de manera orquestada en un único paso.

La cromatografía líquida se realizó en un equipo Thermo Quest P4000 HPLC (Thermo Scientific, Waltham-MA, EE.UU.) con una columna Thermo Scientific Hypersil ODS C18 (Ø 5 µm; 4,6 x 250 mm) (Thermo Scientific, Waltham-MA, EE.UU.). Las fases móviles utilizadas fueron: solución A (ácido acético 0,5 % y trietilamina 0,0075 % preparada en agua desionizada) y solución B (acetonitrilo 100 %). Estas soluciones se desgasificaron y filtraron a través de un filtro de 0,45 µm (Millipore, Burlington-MA, EE.UU.) antes de su utilización. El flujo utilizado fue de 1 mL/min y el gradiente de elución empleado fue el siguiente: 0-10 min, A:B (82,5:17,5 v/v); cambio lineal de 10-40 min a A:B (70:30 v/v); 40-45 min A:B (65:35 v/v); A:B (0:100 v/v) durante 5 minutos y estabilización con A:B (82,5:17,5 v/v) durante 10 minutos. La columna se mantuvo a 35 °C y la detección se llevó a cabo a una absorbancia de 254 nm. El volumen de muestra utilizado fue 20 µL.

## 6.6. Análisis de ácidos orgánicos carboxílicos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV)

La concentración de ácidos orgánicos, como el citrato y oxalacetato, se determinó mediante HPLC en un equipo Jasco (Tokio, Japón) compuesto por una bomba Jasco PU 2089, un autoinyector Jasco 2055 Plus con un bucle de 100 µL y un detector diodo array Jasco MD-2010 Plus. El equipo se controló a través del paquete informático Jasco Borwin 1.5. Para la cromatografía de intercambio aniónico se utilizó una columna AMINEX HPX87H, 300 mm x 7,8 mm (Bio-rad, CA, EE.UU.). Como fase móvil se empleó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8 mM, a un flujo constante de 0,5 mL/min. La detección se realizó a una longitud de onda de 210 nm. El volumen de muestra utilizada fue de 20 µL de sobrenadante correspondiente a los cultivos celulares previamente centrifugados 5 min a 14 000 rpm. La señal medida se interpoló en una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de los estándares de ácido cítrico y ácido oxalácetico.

## 6.7. Ensayos enzimáticos

---

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un  $\mu\text{mol}$  de producto, o la desaparición de un  $\mu\text{mol}$  de sustrato, por minuto.

### 6.7.1. Determinación de la actividad nitrilasa

La determinación de la actividad nitrilasa se llevó a cabo mediante el método enzimático descrito por Heinemann *et al.* (2003). La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 1 mL, tampón fosfato 100 mM (pH 7,4), fumaronitrilo 10 mM, usado como sustrato, y el volumen apropiado de extracto acelular. Este extracto se preparó a partir de células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 recogidas cuando se había consumido entre el 60-70 % de la fuente nitrogenada, amonio, cianuro o CNA. El ensayo se incubó durante 5 min a 35 °C, determinándose posteriormente el amonio producido en el ensayo por el método colorimétrico de Solorzano, detallado previamente.

### 6.7.2. Determinación de la actividad cianasa

Para la determinación de la actividad cianasa se empleó el método descrito por Anderson (1980). El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 mL, conteniendo el volumen apropiado de extracto acelular, tampón Tris-HCl 0,5 M (pH 8,5) y  $\text{NaHCO}_3$  3 mM. Para iniciar la reacción enzimática se adicionó cianato de potasio 2 mM como sustrato. El ensayo se incubó a 65 °C durante 10 minutos y, se determinó, posteriormente, el amonio producido utilizando el método de Nessler descrito anteriormente.

---

## 7. Técnicas de manipulación del DNA/RNA

---

### 7.1. Aislamiento de DNA

---

#### 7.1.1. Aislamiento de DNA total

El aislamiento del DNA total de diversas estirpes bacterianas se realizó sobre el precipitado celular resultante de la centrifugación de 7 mL de un cultivo crecido con amonio 10 mM durante 24 h ( $A_{600} \sim 0,8$ ), centrifugado a 14 000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Para la extracción del DNA se empleó el kit de extracción de DNA genómico Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison-WI, EE.UU.). El protocolo de extracción utilizado fue el suministrado por la casa comercial.

### 7.1.2. Aislamiento de DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico de *E. coli* se llevó a cabo utilizando 4 mL de cultivo el kit FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit (FavorGen, Taiwán, China). El método de extracción consistió en una lisis celular alcalina previa a una cromatografía de intercambio aniónico, donde el DNA fue retenido selectivamente, permitiendo eliminar casi en su totalidad la mayor parte del RNA, proteínas, sales y otros contaminantes celulares no deseados.

## 7.2. Cuantificación de ácidos nucleicos/ribonucleicos

---

La concentración de ácidos nucleicos se determinó mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro ND1000 (NanoDrop Technologies, DE, EE.UU.). Para ello, se midió la absorbancia a 260 nm. Además, se determinó la absorbancia a 230 y 280 nm para calcular la relación  $A_{260}/A_{230}$  y  $A_{260}/A_{280}$ , detectándose las posibles contaminaciones por polisacáridos o proteínas, respectivamente.

La cuantificación de los ácidos ribonucleicos totales purificados se llevó a cabo en un espectrofotómetro ND1000 (NanoDrop Technologies, DE, EE.UU.) y su integridad se verificó mediante el equipo Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, EE.UU.) en el SCAI. Todas las muestras utilizadas en este trabajo mostraron un número de integridad (RIN) superior a 6,9.

## 7.3. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

---

Las reacciones de amplificación de fragmentos de DNA se llevaron a cabo en un termociclador C1000™ de Biorad (Hercules-CA, EE.UU.). Las amplificaciones se realizaron a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L, conteniendo 5  $\mu$ L de tampón (10x) estándar de BIOTAQ™ (Bioline, Toronto, Canada), 2,5  $\mu$ L  $MgCl_2$  BIOTAQ™ (50 mM, Bioline, Toronto, Canada), 1  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, oligonucleótido directo 10  $\mu$ M y oligonucleótido indirecto 10  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ L DNA Polimerasa BIOTAQ™ 10 U/ $\mu$ L (Bioline, Toronto, Canada), 1  $\mu$ L de ADN molde o colonia bacteriana, completando con agua MiliQ hasta 50  $\mu$ L.

El programa estándar de PCR consistió en un primer paso de desnaturalización inicial a 98 °C durante 5 min, seguido de 39 ciclos de amplificación: desnaturalización a 95 °C durante 30 s; hibridación a 62-65 °C durante 30 s y elongación a 72 °C y 0,5 s/kb. Tras los ciclos de amplificación, para evitar una amplificación incompleta de los fragmentos de PCR se incubaron 10 min a 72 °C. Por último, se mantuvo el resultado de la PCR a una temperatura constante de 12 °C hasta su retirada del equipo.

## 7.4. Separación electroforética de ácidos nucleicos

---

La separación electroforética del DNA se llevó a cabo de forma horizontal empleando geles de agarosa a una concentración de 0,8 % (p/v) en tampón TAE, que contenía Tris-HCl (40 mM; pH 7,5), acetato 19 mM y EDTA 1 mM (Green y Sambrook, 2012). A la agarosa se le añadió 0,1x de la solución Redsafe para la tinción de ácidos nucleicos (iNtRON Biotechnology; Corea del Sur). A 5  $\mu$ L de DNA se le añadió 1  $\mu$ L de tampón de carga (Gel Loading Dye Purple 6x, NEB, Ipswich-MA, EE.UU.), cargando los pocillos del gel con esta mezcla y realizando la separación electroforética aplicando una diferencia de potencial de 80 V hasta separar convenientemente los fragmentos de DNA. Para la visualización de los fragmentos de DNA se empleó el digitalizador Gel Doc™ EZ Imager (Biorad) y para el posterior análisis se utilizó el programa ImageLab (Biorab). Con objeto de estimar aproximadamente la cantidad y/o tamaño de los fragmentos de DNA, en las separaciones electroforéticas se incluyeron los marcadores de DNA Quick-Load 2-Log DNA Ladder (NEB, Ipswich-MA, EE.UU.), de concentración y tamaños moleculares conocidos.

## 7.5. Purificación de fragmentos de DNA

---

Los fragmentos de DNA, tanto en disolución como los recuperados del gel de agarosa, se purificaron empleando el kit ISOLATE II PCR (Bioline, Toronto, Canadá) siguiendo las instrucciones suministradas por la casa comercial para cada caso.

## 7.6. Digestión del DNA con endonucleasas de restricción

---

La digestión del DNA se llevó a cabo utilizando endonucleasas de restricción Time-Saver™ y alta fidelidad de la casa comercial New England Biolabs (Ipswich-MA, EE.UU.). La mezcla de digestión se realizó en 25  $\mu$ L, conteniendo el DNA a digerir, el tampón correspondiente y 1 U enzima/ $\mu$ g de DNA. Esta mezcla se incubó durante 15 minutos a la temperatura requerida según la enzima de restricción utilizada. Transcurrido este tiempo, se procedió a la inactivación de las enzimas de restricción a 65 °C durante 5 min y posteriormente se comprobó la correcta digestión del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa.

## 7.7. Ligación de fragmentos de DNA

---

Para la ligación de fragmentos lineales de DNA obtenidos por digestión con enzimas de restricción o por PCR, se preparó una mezcla de ligación en un volumen de 15  $\mu\text{L}$ , a la que se añadió 3 U de DNA ligasa del fago T4 (NEB, Ipswich-MA, EE.UU.), para extremos cohesivos, o 3 U de DNA-ligasa Quick Blunting™ Kit (NEB, Ipswich-MA, EE.UU.), para extremos romos, 1,5  $\mu\text{L}$  tampón de ligación 10x suministrado por la casa comercial y las concentraciones adecuadas de DNA inserto y DNA vector. La mezcla de reacción se incubó 1 h a temperatura ambiente o a 4 °C durante 12 h. En ocasiones se llevó a cabo la desfosforilación de los extremos empleando 1  $\mu\text{L}$  de la enzima rSAP (“Shrimp Alkaline Phosphatase”, NEB, Ipswich-MA, EE.UU.) y 2  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción. La mezcla resultante de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  o S17-1 (Mandel e Higa, 1970).

## 7.8. Preparación y transformación de células competentes

---

Para la obtención de células competentes, las estirpes de DH5 $\alpha$  y S17-1 de *E. coli* se cultivaron en medio LB a 37 °C durante 12 h con una agitación de 220 rpm. Transcurrido este tiempo, el cultivo se diluyó 50 veces en medio fresco LB, incubándose aproximadamente 2 horas hasta obtener una  $A_{600}$  0,4-0,5 (equivalente a  $5 \times 10^7$  células/mL). El cultivo se centrifugó a 5 000 g durante 5 min a 4 °C, y el precipitado celular se resuspendió en la mitad del volumen de partida de una solución fría de  $\text{CaCl}_2$  50 mM. La suspensión celular se incubó en hielo durante 30 min y se volvió a centrifugar, resuspendiéndose el precipitado celular en la décima parte del volumen inicial en la solución fría de  $\text{CaCl}_2$  50 mM. Esta suspensión celular se incubó durante 12 h a 4 °C. Posteriormente, se añadió glicerol 20 % (v/v) y se repartió en alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  en tubos eppendorf estériles. Estos viales se almacenaron a - 80 °C hasta su uso.

Para la transformación de células de las estirpes DH5 $\alpha$  o S17-1 de *E. coli* se siguió el procedimiento descrito por Mandel e Higa (1970), basado en la capacidad que adquieren las células de *E. coli* para captar DNA externo cuando se someten a una solución fría de cloruro cálcico. La mezcla de transformación estaba compuesta por 10  $\mu\text{L}$  de mezcla de ligación, 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión de células competentes y 100  $\mu\text{L}$  del tampón TCM frío. Este tampón estaba compuesto por Tris-HCl (10 mM; pH 7,5),  $\text{CaCl}_2$  10 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM. La mezcla se incubó 30 min en hielo y posteriormente, se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 1,5 min. A continuación, se añadió 700  $\mu\text{L}$  de medio LB y se incubó a 37 °C durante 1 h en agitación. Tras la incubación, las células se sembraron en placas Petri con medio LB sólido

selectivo suplementado con los antibióticos especificados para cada construcción, y se incubó a 37 °C durante 24 horas para la selección de colonias transformantes.

## 7.9. Transferencia de plásmidos por conjugación

---

La movilización de plásmidos desde la cepa donadora *E. coli* S17-1 hasta la cepa receptora *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se realizó mediante conjugación biparental (Herrero *et al.*, 1990). Las estirpes S17-1 y CECT 5344 se recogieron en fase exponencial y fase estacionaria, respectivamente, y se depositaron conjuntamente en un filtro estéril (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), el cual se mantuvo durante 24 horas a 30 °C sobre la superficie de una placa de Petri con medio LB sólido. Posteriormente, la mezcla de conjugación se sembró mediante diluciones seriadas en medio mínimo M9 con los antibióticos adecuados dependiendo de los plásmidos movilizados.

## 7.10. Secuenciación de fragmentos de DNA

---

La secuenciación de los fragmentos de DNA se realizó en la Unidad de Genómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Para ello, se empleó el kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City-CA, EE.UU.) y el secuenciador multicapilar ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City-CA, EE.UU.). Para la secuenciación se usaron los oligonucleótidos universales T3 y T7 para el plásmido pGEM-T-Easy y, M13 forward y M13 reverse para el plásmido pK18*mob* (Tabla 9). La secuencia del genoma completo de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se encuentra depositada en la base de datos EMBL con número de acceso LK391695 (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014, 2016).

## 8. Aislamiento y purificación del RNA total de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344

---

Para el aislamiento del RNA total de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se emplearon células precultivadas en 25 mL de medio mínimo M9 (pH 9,5) que contenía acetato sódico 50 mM y NaCN 2 mM o NH<sub>4</sub>Cl 2 mM, como única fuente de nitrógeno. Las células se recogieron por centrifugación a 1 000 rpm a 4 °C durante 10 min y se lavaron tres veces con tampón TEG, que contenía Tris-HCl (25 mM, pH 8,0), glucosa 1 % y EDTA 10 mM. El precipitado celular resultante se resuspendió en 500 µL del tampón de lisis TRIsure™ (Bioline, UK, Europa), aislándose posteriormente el RNA total con el kit Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research, CA, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La eliminación del DNA presente en las muestras se realizó durante el aislamiento del RNA, con un tratamiento con

DNAasa libre de RNAasa en columna y posteriormente, con un tratamiento adicional post-columna con DNasa I (Ambion-Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.). La ausencia de DNA se determinó mediante PCR utilizando RNA 500 ng.

---

## 9. Análisis transcripcional mediante qRT-PCR

---

La síntesis del cDNA se llevó a cabo en 20  $\mu$ L partiendo de 500 ng de RNA purificado. Además, la mezcla de reacción contenía dNTPs 0,7 mM, retrotranscriptasa SuperScript II Reverse Transcriptase 200 U (Invitrogen, CA, EE.UU.) y hexámeros aleatorios 3,75 mM (Applied Biosystems, CA, EE.UU.). Las mezclas de reacción se incubaron según el siguiente protocolo: 65 °C durante 5 min, 42 °C durante 50 minutos y finalmente a 70 °C durante 15 minutos. El cDNA sintetizado se purificó con el kit Isolated II PCR and Gel (Bioline, UK, Europa), y se determinó su concentración y pureza en un espectrofotómetro ND1000.

La PCR cuantitativa se llevó a cabo en 25  $\mu$ l en un iQ5 Multicolour Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, CA, EE.UU.), utilizando 5 ng de cDNA como molde, oligonucleótidos 0,2 mM y 12,5  $\mu$ L de iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules-CA EE.UU.). Los oligonucleótidos utilizados en este análisis se muestran en la Tabla 9. Las amplificaciones de las muestras problema y sus correspondientes controles negativos de la retrotranscripción (RNA molde sin retrotranscriptasa) se llevaron a cabo por triplicado. El programa empleado en la PCR cuantitativa consistió en una primera desnaturalización a 95 °C durante 3 min, seguida de 40 ciclos de amplificación (desnaturalización, 95 °C, 5 s; unión de los cebadores/extensión/adquisición de la señal, 60 °C, 30 s) y, por último, un incremento de temperatura de 65-95 °C (0,5 °C/5 s) para el análisis de la curva de fusión. Para la cuantificación relativa de los valores de fluorescencia se utilizó una curva de calibrado usando diluciones seriadas de 0,005 a 50 ng de DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. La normalización de los datos se realizó usando el gen de referencia *rpoB*, que codifica la cadena  $\beta$  de la RNA polimerasa. Para todas las parejas de oligonucleótidos se realizó una recta de eficiencia de amplificación de forma individual. Los datos del análisis transcripcional qRT-PCR se sometieron a un *t*-test.

---

## 10. Identificación de sRNA y sus dianas en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344

---

A partir del RNA total de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 extraído según se detalla en el apartado 8, se aislaron e identificaron los sRNA producidos en condiciones cianotróficas. Este trabajo se llevó a cabo por la empresa STABvida (Caparica, Portugal).

---

### 10.1. Preparación de la librería de sRNA y secuenciación

---

A partir del RNA extraído se sintetizó el cDNA correspondiente y se generó la librería de sRNA con el kit Small RNA-Seq Library Preparation (Bioo Scientific, Austin-TX, EE.UU.). La librería generada se secuenció con la plataforma Illumina HiSeq 2500 usando lecturas de secuenciación de un solo extremo de 100 pb. Como resultado se obtuvieron archivos FASTQ.

---

### 10.2. Predicción y análisis bioinformático de los sRNA

---

Las lecturas obtenidas en la secuenciación se recortaron con el programa Cutadapt 1.14., aplicando un límite ambiguo de 2 nucleótidos, un límite de calidad de 0,01 (probabilidad de error) y eliminando 4 pb en los extremos 5' y 3'. El software Rockhopper (McClure *et al.*, 2013) se utilizó para predecir el RNA no anotado en el genoma de referencia de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344 (HG916826.1), considerando una cadena específica, una longitud de semilla de 0,33, un desajuste permitido de 0,15 y una expresión mínima de UTR y ncRNAs de 0,8. Así se seleccionaron las lecturas alineadas a regiones no anotadas (mayor del 30 % en todas las muestras). Los datos brutos (archivos FASTQ), los procesados (archivos wig) y el mapeo (archivos bam) están disponibles en la base de datos GEO con el número de registro GSE117374.

Las lecturas de secuenciación de alta calidad se mapearon frente al genoma utilizando una fracción de longitud y de similitud de 0,95 (Altschul *et al.*, 1990). Los datos resultantes se utilizaron para determinar la expresión de los pequeños RNA no anotados predichos por el programa Rockhopper en función de los transcritos por millón (Mortazavi *et al.*, 2008). Posteriormente, se realizó un análisis de expresión diferencial siguiendo un modelo lineal generalizado influenciado por el multifactorial EdgeR (Robinson *et al.*, 2009). Los pequeños RNA detectados diferencialmente se filtraron de acuerdo con los parámetros establecidos previamente (Van-Iterson *et al.*, 2010; Raza, 2012) y considerando una variación en la expresión  $\geq 2$  o  $\leq -2$ , y un valor  $p$  de FDR  $\leq 0,05$ . Los posibles sRNA se clasificaron como intergénicos (codificados en regiones intergénicas) o antisentido (codificados en dirección inversa al posible ORF). Solo los sRNA expresados específicamente con amonio o cianuro

(NaCN o residuo joyero cianurado), se seleccionaron manualmente y se consideraron para análisis posteriores. Se analizó manualmente el entorno génico de cada sRNA y se identificó el terminador independiente de Rho más cercano a cada sRNA utilizando los softwares FindTerm (Solovyev y Salamov, 2011) y RNAold (Gautheret y Lambert, 2001). Se llevó a cabo una predicción de promotores utilizando los programas Prokaryotic Promoter Predictor y Neutral Network Promoter Prediction (Reese, 2000, 2001). Como criterio de selección se consideró la presencia de regiones promotoras predichas y terminadores de la transcripción independientes de Rho. Se usó el programa Mfold (Zuker, 2003) para predecir la estructura secundaria de los sRNA, mientras que las posibles dianas de los sRNA se identificaron mediante la herramienta TargetRNA2 (Kery *et al.*, 2014). Para identificar homólogos bacterianos se utilizó el programa GLASSgo, la base de datos de sRNA bacterianos y BLASTn (Li *et al.*, 2013; McClure *et al.*, 2013).

### 10.3. Identificación de sRNA por RT-PCR

---

Para la identificación de los posibles sRNA por RT-PCR se utilizaron células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivadas con cloruro de amonio, cianuro sódico o residuo de la joyería, a una concentración 2 mM. Se utilizaron tres réplicas biológicas independientes para cada condición. El aislamiento del RNA, su cuantificación y la síntesis del cDNA se llevó a cabo según se detalla en el apartado 8. Posteriormente, se procedió a la amplificación por PCR utilizando el cDNA como molde y oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 9). Los fragmentos resultantes de la RT-PCR se separaron en geles de agarosa al 3 %.

### 10.4. Validación de las dianas de los sRNA por qRT-PCR

---

Las posibles dianas de los sRNA se analizaron mediante qRT-PCR a partir del RNA aislado de células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivadas con cloruro de amonio, cianuro o residuo de joyería. El protocolo seguido para la qRT-PCR se describe en el apartado 8, y utilizando los oligonucleótidos específicos detallados en la Tabla 9.

---

## II. Construcción de estirpes mutantes de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344

---

En este trabajo se han obtenido diferentes mutantes de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 deficientes en genes de interés para el estudio de la degradación de cianuro. La estrategia de mutagénesis empleada para la construcción de estos mutantes fue mediante delección. La inserción de casetes de resistencia a antibióticos mediante recombinación homóloga. Las construcciones se generaron en la estirpe *E. coli* S17-1 (cepa donante) y se transfirieron a *P.*

*Pseudoalcaligenes* CECT 5344 (cepa receptora) mediante conjugación biparental. Los transconjugantes se seleccionaron en medio mínimo M9 sólido con ácido nalidíxico y el antibiótico correspondiente al casete inserto en la construcción (Tabla 6).

### 11.1. Obtención de los mutantes DctM<sup>-</sup>

---

El mutante DctM<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se construyó mediante delección parcial del gen BN5\_0450 e inserción del casete de resistencia a gentamicina. El tamaño del gen es de 1 791 nucleótidos, de los cuales se amplificaron mediante PCR la región 5' y 3' de 507 y 606 pb con las parejas de oligonucleótidos 0450FA1E/0450RA1B y 0450FB2B/0450RB2H, respectivamente (Tabla 9). Los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector pGEM-T-Easy, generando un sitio de restricción *Bam*HI que se utilizó para insertar un casete de resistencia a gentamicina, el cual se extrajo previamente como *Bam*HI del plásmido pMS255. Los dos extremos del gen BN5\_0450 interrumpidos por el casete de resistencia a gentamicina se subclonaron en el vector suicida pK18*mob* usando los sitios de restricción *Eco*RI/*Hind*III, generando pK18*mob*Δ*dctM*::Gm.

### 11.2. Obtención de los mutantes Nit1<sup>-</sup>, Nit2<sup>-</sup>, Nit4<sup>-</sup>, Nit5<sup>-</sup>, Nit6<sup>-</sup> y Nit7<sup>-</sup>.

---

Para generar el mutante Nit1<sup>-</sup>, el gen BN5\_1925, con un tamaño de 1 017 pb, se amplificó a partir de ADN genómico mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Nit1925B/Nit1925RH (Tabla 9), y el fragmento de ADN de 1 431 pb obtenido se clonó en pGEM-T-Easy. Se insertó un casete de resistencia a gentamicina en el sitio *Sal*I de este fragmento, y la construcción pGEMTΔ*nit1*::Gm fue posteriormente subclonada en el vector suicida pK18*mob* usando sitios *Eco*RI y *Bam*HI, construyendo el plásmido pK18*mob*Δ*nit1*::Gm.

Para construir un mutante Nit2<sup>-</sup>, el gen BN5\_4427 (930 pb) se interrumpió mediante la inserción del gen resistente a kanamicina. Un fragmento de ADN de 415 pb amplificado por PCR con los oligonucleótidos Nit4427F1B/Nit4427R1B (Tabla 9) fue clonado en pGEM-T-Easy. Posteriormente, esta secuencia parcial fue subclonada en pK18*mob*, usando sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI, generando el plásmido pK18*mob*Δ*nit2*.

El mutante Nit4<sup>-</sup> se generó mediante la inserción del vector pK18*mob* con un casete de kanamicina, a través de un único evento de recombinación, en la región central del gen BN5\_1912 (975 pb) que codifica la nitrilasa Nit4. Se amplificó un fragmento de DNA de 512 pb por PCR usando los oligonucleótidos 1912MFB1/1912MRH1 (Tabla 9). El fragmento de

PCR resultante se clonó en pGEM-T-Easy y, posteriormente, se subclonó en pK18*mob* mediante los sitios de restricción *HindIII-BamHI*, generando la construcción pK18*mob*Δ*nit4*.

La misma estrategia de mutagénesis seguida para la obtención del mutante Nit4<sup>-</sup> fue utilizada para la construcción del mutante en el gen *nit5* (BN5\_0736), de 849 pb. Para ello, se amplificó un fragmento de 496 pb utilizando los oligonucleótidos 0736FCH/0736RCH (Tabla 9), generando la construcción pK18*mob*Δ*nit5* mediante la subclonación en los sitios de restricción *HindIII-BamHI* para el mutante Nit6<sup>-</sup>, se amplificó un fragmento de 410 pb del gen *nit6* (BN5\_1196), de 885 pb, obteniéndose finalmente la construcción pK18*mob*Δ*nit6*.

La estrategia de obtención del mutante Nit7<sup>-</sup> fue similar a las anteriores, se amplificó un fragmento de 448 pb empleando los cebadores 3251MFB1/3251MRH1 del gen *nit7* (BN5\_3251), con un tamaño de 783 pb, y se subclonó mediante las enzimas *BamHI/HindIII* en el plásmido pK18*mob*, generando la construcción final pK18*mob*Δ*nit7*.

### 11.3. Obtención de los mutantes MocR<sup>-</sup> y GntR<sup>-</sup>

---

El mutante MocR<sup>-</sup> se construyó mediante la eliminación parcial del gen *mocR* (BN5\_1899) de 1 404 pb, e inserción del casete de resistencia a gentamicina. Las regiones 5' y 3' de este gen, separadas por 592 pb, fueron amplificadas por PCR con los pares de oligonucleótidos 1899F1/1899R1 y 1899F2/1899R2 (Tabla 9). Los fragmentos obtenidos, de 432 bp y 537 bp, se clonaron en pGEM-T-Easy. Posteriormente, se insertó un casete de resistencia a gentamicina en el sitio de restricción *SphI* generado entre ambos fragmentos. Esta construcción se subclonó en pK18*mob* mediante los sitios de restricción *EcoRI-HindIII* y se generó el plásmido pK18*mob*Δ*mocR*::Gm

Para la construcción de la estirpe mutante GntR<sup>-</sup> se utilizó el mismo procedimiento que para su homólogo *mocR*, delecionando parcialmente el gen *gntR* (BN5\_1352) de 1 476 pb, e insertando un casete de resistencia a gentamicina. Se generaron dos fragmentos de 453 pb y de 574 pb mediante PCR con la pareja de oligonucleótidos 1352FA/1352RA y 1352FB/1352RB, interrumpidos por un casete de gentamicina mediante el sitio de restricción *BamHI*. La subclonación para generar la construcción pK18*mob*Δ*gntR*2::Gm se realizó mediante *EcoRI*.

Para la obtención del doble mutante MocR<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> se llevó a cabo una conjugación biparental empleando como cepa receptora la estirpe mutante MocR<sup>-</sup> y la cepa *E. coli* S17-1 portadora de la construcción pK18*mob*Δ*Nit4*<sup>-</sup>.

## 11.4. Generación de los mutantes NitD<sup>-</sup> y NitF<sup>-</sup>

---

La construcción del mutante NitD<sup>-</sup> se llevó a cabo mediante la eliminación parcial del gen *nitD* (BN5\_1633), de 1 101 pb, e inserción del casete de resistencia a kanamicina. Las regiones 5' y 3' de este gen fueron amplificadas con PCR por los oligonucleótidos nitDFAB/nitDRAH y nitDFBH/nitDRBS (Tabla 9), generando dos fragmentos, de 597 bp y 555 bp, que fueron clonados en pGEM-T-Easy conjuntamente, generando la construcción pGEM-TΔnitDA-B. En el sitio de restricción *HindIII* generado ente los dos fragmentos se insertó un casete de resistencia a kanamicina procedente del plásmido pBKS::Km. Esta construcción se subclonó en pK18*mob* mediante los sitios de restricción *BamHI/SalI*, obteniéndose la construcción pK18*mob*ΔnitD::Km

Para la construcción de la estirpe mutante NitF<sup>-</sup> se llevó a cabo mediante una delección parcial del gen *nitF* (BN5\_1635), de 1 023 pb, y la inserción del casete de resistencia a gentamicina. Las regiones 5' y 3' de este gen fueron amplificadas por PCR con los pares de oligonucleótidos nitFF1B/NitFR1B y nitFF2B/nitFR2B (Tabla 9), generando fragmentos de 660 pb y 600 pb que fueron clonados en pGEM-T-Easy conjuntamente. Una vez generada la construcción pGEM-TΔnitFA-B, se insertó un casete de resistencia a gentamicina en el sitio de restricción *BamHI* generado entre ambos fragmentos. Esta construcción se subclonó en pK18*mob* mediante el sitio de restricción *EcoRI* y se generó la construcción pK18*mob*ΔnitF::Gm

La batería de mutantes dobles de las distintas nitrilasas con la nitrilasa NitC se llevó a cabo utilizando en todos los casos la estirpe mutante NitC<sup>-</sup> como cepa receptora en la conjugación biparental y como cepa donadora las distintas estirpes de *E. coli* S17-1 portadoras de las construcciones finales en pK18*mob*, obteniéndose las cepas dobles mutantes: NitC<sup>-</sup>/Nit1<sup>-</sup>, NitC<sup>-</sup>/Nit2<sup>-</sup>, NitC<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup>, NitC<sup>-</sup>/Nit5<sup>-</sup>, NitC<sup>-</sup>/Nit6<sup>-</sup> y NitC<sup>-</sup>/Nit7<sup>-</sup>. Los transconjugantes fueron seleccionados con los antibióticos gentamicina y kanamicina.

Todas las construcciones finales en el vector suicida pK18*mob* fueron secuenciadas y comprobadas mediante PCR. Además, una vez obtenidos los mutantes de la estirpe *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, estos se confirmaron mediante análisis PCR. Los casetes de resistencia a kanamicina o gentamicina utilizados en este trabajo se insertaron en la misma orientación que los genes diana, descartando un posible efecto polar sobre los genes aguas abajo en los diferentes mutantes construidos, como se describió previamente (Estepa *et al.*, 2012).

---

## 12. Análisis proteómico cuantitativo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

---

Se llevó a cabo un análisis mediante proteómica cuantitativa a partir de células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 precultivadas en 25 mL de medio mínimo M9 (pH 9,5) con acetato 50 mM y NH<sub>4</sub>Cl 2 mM. Transcurridas 24 h, y una vez consumido completamente el amonio, se adicionó como fuente de nitrógeno NH<sub>4</sub>Cl 2 mM, NaCN 2 mM, residuo de la joyería (cianuro 2 mM) o CNA 2 mM. Para cada condición se utilizaron 4 réplicas biológicas. Los cultivos se recogieron por centrifugación a 5 000 g durante 10 min a 4 °C cuando se consumió aproximadamente el 50-60 % de la fuente de nitrógeno, tomándose la pella celular como material de partida para llevar a cabo el análisis proteómico.

---

### 12.1. Preparación de las muestras

---

El precipitado celular, mantenido a - 80 °C hasta su uso, se resuspendió en 400 µL de tampón de lisis, que contenía urea 8 M, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y CHAPS 4 % (p/v). Las células se rompieron por cavitación según se detalla en el apartado 5. El extracto acelular obtenido se centrifugó a 13 400 rpm durante 30 minutos a 4 °C para eliminar restos celulares y las células no rotas, y el sobrenadante se utilizó como fuente de proteínas. Estas se precipitaron utilizando el kit comercial 2D-Clean Up (GE Healthcare, Illinois, EE.UU.), siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial. Finalmente, las proteínas precipitadas se resuspendieron en 200 µL de tampón de lisis, manteniéndose durante 12 h en agitación a temperatura ambiente para su resolubilización. Por último, se cuantificó la concentración de proteína en las muestras mediante el método de Bradford, obteniéndose aproximadamente una concentración entre 2-4 mg/mL.

---

### 12.2. Separación e identificación de péptidos mediante espectrometría de masas

---

Las muestras conteniendo las proteínas se enviaron al servicio de proteómica del SCAI para su análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Las muestras se digirieron con tripsina durante 12 h a 37 °C en agitación, para su posterior análisis e identificación en un sistema nano UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham-MA, EE.UU.) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham-MA, EE.UU.) y equipado con una fuente de ionización por nanoelectrospray (nESI) y una columna C18 Acclaim Pepmap, 150 mm x 0,075 mm; tamaño de poro 3 µm, (Thermo Fisher Scientific, Waltham-MA, EE.UU.) para la separación de

los péptidos. También se utilizó una precolumna C18 Acclaim Pepmap, 5 mm x 0,3 mm, (Agilent Technologies, CA, EE.UU.). Se inyectaron 5  $\mu$ L de muestra, a un flujo de 10  $\mu$ L/min durante 5 minutos con acetonitrilo 2 %/ácido trifluoroacético 0,05 %. A continuación, la columna de captura se conectó en línea con la columna de separación y se inició el programa, según el cual los péptidos se eluyeron con un gradiente de acetonitrilo 5-40 %/ácido fórmico 0,1 % durante 60 min a un flujo de 300 nL/min. Los datos de MS (Full Scan) se adquirieron en el modo ión positivo en el intervalo 400-1500  $m/z$ . Los datos de MS/MS se adquirieron en el modo de escaneo dependiente, seleccionando automáticamente los cinco iones más intensos para la fragmentación, con exclusión dinámica activada. En todos los casos se utilizó un voltaje de pulverización por nESI de 1,9 kV. Para la adquisición de los espectros de masas en tándem y el procesado de los datos brutos se empleó el software Thermo Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham-MA, EE.UU.).

La búsqueda de los espectros MS2 se llevó a cabo comparando los datos obtenidos del motor de búsqueda SEQUEST frente a la base de datos de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (base de datos EMBL con número de acceso HG916826). Los péptidos se generaron a partir de una digestión triptica manteniendo los parámetros específicos: una escisión máxima no realizada, carbamidometilación de cisteínas como modificación fija y oxidación de metioninas como modificación variable. La tolerancia de la masa de los precursores se fijó en 10 ppm y los iones del producto se buscaron con un margen de 0,8 Da. Las coincidencias de espectros peptídicos (PSM) se validaron utilizando un filtro basado en valores q del 1 % FDR, calculado frente a una base de datos de señuelos concatenados. El software Proteome Discoverer permitió agrupar las identificaciones de péptidos en proteínas de acuerdo con la ley de parsimonia y filtrados al 1 % de FDR. Sin embargo, para proteínas identificadas a partir de un único péptido, las fragmentaciones se comprobaron manualmente.

### 12.3. Análisis de los datos

---

En los análisis comparativos realizados en los diversos estudios proteómicos llevados a cabo en este trabajo, las proteínas compartidas se cuantificaron utilizando el software Progenesis IQ considerando un valor  $p$  (Anova)  $\leq 0,05$  y una variación en la expresión de FC ( $\geq 2$  o  $\leq -2$ ). En el caso de las proteínas exclusivamente presentes en una sola de las condiciones estudiadas, se consideraron todos los péptidos detectados en las cuatro réplicas biológicas cuando éstas mostraron un cambio en el número de veces  $< 2$ . Las proteínas se cuantificaron usando el XIC (cromatograma de ión extraído) según los tres péptidos más intensos. Los datos obtenidos en el análisis de la CNA (capítulo II), que han sido publicados, se han depositado en el ProteomeXchange Consortium a través del repositorio PRIDE (Griss *et al.*, 2013) con el identificador PXD026640. El análisis proteómico se realizó con MaxQuant

(Cox, 2008) y los datos se analizaron con el software gratuito Perseo 1.5.6.02. Para el análisis comparativo diferencial por pares, las proteínas identificadas a partir de un solo péptido fueron descartadas y solamente se consideraron las proteínas identificadas en al menos dos réplicas en cada condición. Después, se analizó si la variación de los datos era o no significativa utilizando un *t*-test de dos colas. Únicamente, las proteínas con un valor absoluto de variación de la expresión  $> 2$  y un valor  $p \leq 0,05$  se consideraron diferencialmente expresadas. Las proteínas identificadas en una sola fuente de nitrógeno estudiada se consideraron exclusivas de esa condición (Olaya-Abril *et al.*, 2018, 2020).

Mediante el uso de la aplicación Cytoscape v3.0.0 ClueGO v2.0.3. se realizó un análisis comparativo de categorías funcionales sobrerrepresentadas (valor  $p < 0,05$ ) (Fruzangohar *et al.*, 2013). Además, se construyó una distribución hipergeométrica de la función biológica GO de tercer nivel [E(GO)]. El genoma completo de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se utilizó como referencia y el parámetro [E(GO<sub>i</sub>)], que indica el enriquecimiento de GO, se calculó con la fórmula [E(GO<sub>i</sub>)] = tamaño de muestra/tamaño genoma GO<sub>i</sub>. La integración de los datos proteómicos finales se llevó a cabo mediante el uso la herramienta KEGG Mapper (Kanehisa y Sato, 2020). Para el análisis filogenético se utilizaron los programas MUSCLE, disponible en el servidor web EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), y PhyML (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>).

---

### 13. Tratamiento estadístico de los datos y análisis bioinformático de secuencias

---

Todos los experimentos mostrados en este trabajo se realizaron por triplicado de forma independiente, con desviaciones estándar medias que nunca excedieron el 10 %. En las curvas de crecimiento únicamente se muestra una media de tres experimentos realizados de forma independiente.

Para el tratamiento y análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos, así como, la determinación de las fases abiertas de lectura, sitios de restricción, uso de codones, composición de aminoácidos y otros parámetros, se empleó el paquete informático Lasergene 8 (DNASTAR, Wisconsin, EE.UU.). La comparación de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas con las distintas bases de datos existentes se llevó a cabo con la herramienta BLAST (Altschul, *et al.*, 1997), disponible en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para el alineamiento de secuencias peptídicas se empleó el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). El diseño de cebadores se realizó con el programa Oligo 7 (Offerman, 2003).

## 14. Material químico

Los productos químicos utilizados en este trabajo, cloruro de amonio, cianuro de sodio, acetato de sodio y nitrilos, entre otros, presentaron una pureza de grado analítico y fueron suministrados por las casas comerciales Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), Panreac (BCN, España) y Merck (Darmstadt, Alemania, Europa). Las disoluciones se prepararon utilizando agua Milli-Q obtenida en un sistema Elix 3 (Millipore, Burlington-MA, EE.UU.). El residuo joyero utilizado en este trabajo contenía cianuro total 1,5 M (1 M CN<sup>-</sup>; 0,5 M complejos cianuro-metálicos) (Ibáñez *et al.*, 2017), suministrado por las empresas Avenir S.L. y Gemasur S.L. (Córdoba, España). Los desechos con cianuro y otros productos químicos tóxicos fueron almacenados y recogidos por la Unidad de Protección Ambiental de la Universidad de Córdoba.

**Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.**

Nombre	Secuencia 5' → 3'
<b>Mutagénesis</b>	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T3	GCGCGAAATTAACCCTCACTAAAG
M13 Forward	TGTA AACACGACGGCCAGT
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
1912MFB1	TGAGGATCCTGTCTGGAGTGGCCGCTCTAGCAA ( <i>Bam</i> HI)
1912MRH1	GGCGACGAAGCTTCGAGCGGATC ( <i>Hind</i> III)
3251MFB1	GCCTGAGGATGGATCCCAGCAGCAT ( <i>Bam</i> HI)
3251MRH1	TGAAAGCTTCGCCCTGAAAATCCAGTACCTGAGAATCG ( <i>Hind</i> III)
NIT1925FB	CCGGATCCCGCCCCGGACCTGGAAACCACTGAAGCAAC ( <i>Bam</i> HI)
NIT1925RH	CCAAGCTTGCCTGCGTGATCCTGCGGCGTCAAGT ( <i>Hind</i> III)
0736FCH	CGCGCTGCTCGTGACCTCAAGCTTTATGGA ( <i>Hind</i> III)
0736RCH	CTGCCCCGGATCCGCCAGTACATAGCACT ( <i>Bam</i> HI)
NIT4427F1B	GTACCAAGCTTATGTCGATGGGGCTGTG ( <i>Hind</i> III)
NIT4427R1B	CCCTTCAAGAGCAATGTGGATCCATGGA ( <i>Bam</i> HI)
nitDFAB	CGGGATCCGACCCGACGCCTACCGCCACCTGCATGA ( <i>Bam</i> HI)
nitDRAH	CGAAGCTTGACGCCATCGAGCTCCACCGCCGCTTTG ( <i>Hind</i> III)
nitDFBH	CGAAGCTTACCCCAAGCCCGACAGCGCCTTCA ( <i>Hind</i> III)
nitDRBS	CGGTGACCTGCACGGTGGCCAGAAAGGTGTGACAGC ( <i>Sa</i> II)
nitFF1B	GAATTCGCTGGTCAAGCCTGCCACCGAGCGCTGGGA ( <i>Eco</i> RI)
nitFR1B	GGATCCCGTGTGCATCGCCGGGAGTGCATAACGGGATCC ( <i>Bam</i> HI)
nitFF2B	CCGGATCCCATTCACCGGTTTACCCAATCCACCC ( <i>Bam</i> HI)
nitFR2B	GAATTCGGCGTGACCAAGGCAGAAGGCATCCC ( <i>Eco</i> RI)
0450FA1E	CGGAATTCACACGAGATTCGACGCTAAGGATGCTCAT ( <i>Eco</i> RI)
0450RA1B	CGGGATCCGAATCAGCAGTTTCGACGGCAGGGT ( <i>Bam</i> HI)
0450FB2B	CGGGATCCCTGGTCAAGCTGATGGTGGAGAACGTCATGGG ( <i>Bam</i> HI)
0450RB2H	CCCAAGCTTCTGGCGAAGTTGGCTTGGGTGAGCGTG ( <i>Hind</i> III)
1899F1	CAACCGAGGAATTCATATGGCTACTCG ( <i>Eco</i> RI)
1899R1	AAGCATGCTACTGGGATAGGGTCTCGATAGGC ( <i>Sph</i> I)
1899F2	AAGCATCCGGGACGGGATCTGCACTTCT ( <i>Sph</i> I)
1899R2	AAAGCTTTACGCCTCCACATCGGACCTTCA ( <i>Hind</i> III)
1196FH	GCTGGTTGGAAGTGTGCGAGAAAGCTTGGC ( <i>Hind</i> III)
1196R	GCGAATGCAGCACGGCGATCTGGT
1352 FA	TTCAGCCGCGAAAACACCCCACT
1352 RA	CGAGGCGAGCACGGGAGAACACCA
1352 FB	ACCATCTCGCCGTCGGTGCCAG
1352 RB	TTACCTGCGCGGCCGACCGAT

<b>Oligonucleótidos utilizados en la identificación de sRNA por RT-PCR</b>	
RT-683F	TGCCAGTCAGTTAAGCCGTTGCACT
RT-683R	GTTTCGTCACCACCCCTCTACTTG
RT-455F	TCAGCGCACGCGGTAACGGATAGTG
RT-455R	CGCCGCGATGCTGTTCAACCTG
RT-655F	TGGCAGCGTCGCACAGGTTTGA
RT-655R	CGATTTGGTTTGCATGGGCGGATT
RT-679F	CTATTCGGCAGTGAAGTTTCTAGGC
RT-679R	GCAAATTCCTTGGGGGATCA
RT-184F	CGGAAACTGCAGGACGCACTTTTGTCCAGGCA
RT-184R	ATTCAGTCGGACTCTTCAGATTATCTCCTCA
RT-222F	GCACGAGTAGTGGAGGTGCTGTGGAGGAGG
RT-222R	TCCGTCGCGCGCTGTTCCGAGGGTCGTCGC
RT-149F	GAAGTGGCGGTAGAACTGTCGAAGAAATC
RT-149R	CCAATCTGGTATGCAGAGCTATGGACGCTG
RT-150F	GAGGAAGGCGAACAGGCACAGGCCAGGCCGAGG
RT-150R	GCCCTGATGATGTACGTTCTGGTGGGCGGCC
RT-312F	CGATTGCTGGCACAACGACAATCATCATGA
RT-312R	AACTCAAAGGGGCGGTAGGCATCGCCCAG
RT-649F	GCACAGGGCTGGGCAACCTCCCTACCCA
RT-649R	CGGTGACCAGGTCGGTTTTGGCCGGG
RT-601F	CTGTCCAGCGTGTCCCTGTTCTGTCT
RT-601R	GCACATGGATTTCAGCGCAGGAAGC
RT-431F	GCCAGTTAAGCAGGTAAGGTGAGT
RT-431R	CTTCAAGCGGGCTGATGATT
RT-258F	AAATCAAGGTACGCGGTCCACGGTA
RT-258R	GGAACGTAAGTGTGCGGCATCT
RT-14F	GGCGACCCGAGGGTTAATGCTGATCAGATAAGTTAGTCAC
RT-14R	GGCTCTACGAAAAGCGCCCTCTACTGCAAGTAG
RT-511F	GCAGTAGAGGGGCGCTTTTTCGTAGGAGCCA
RT-511R	CGGGGTAATGTCAGTCAGTTAAGCCGTTGCACTCG
RT-559F	ACGCTTTCGTGCAACCTGCCGACGCAAGCC
RT-559R	CGCGCCGCCGACATTCCGACAGCACCT
<b>Oligonucleótidos empleados para qRT-PCR en el capítulo 1</b>	
qRT-415F	GTGCTTCGACGACGGCCATGA
qRT-415R	CTGCGTCAGGTATTCGGCCCAGAGT
qRT-417F	GTACCGACCGCAGCCTGAGCCGTCT
qRT-417R	CCGGTGATGATCAGCGATGCGTCCT
qRT-550F	CGGCGTCGACATGCTGGAGATGGAT
qRT-550R	AGTGCTTGCAGTTCGGCGAGGCTGA
qRT-551F	CGTCGCCCTGACCGCCCTCT
qRT-551R	GCATAACCGAAGGGGCTGGCCAGAT
qRT-554F	GAATGCCTGCAAGCCAATGACGAC
qRT-554R	GCAGGGCGACATGGCGGTTG
qRT-570F	CGGATAGTGGCCTTGCCTGACGAAG
qRT-570R	CGGCCAACTGACCTGCGAGGAAGT
qRT-574F	CTCTCGATCATCGCCCTACCCA
qRT-574R	AAATCCTTGATCCCGACCAGGCAGA
qRT-575F	TGCGATGCAATCATTCCCGAGGCT
qRT-575R	GGTCGTGCTCGGCCTGACAGTTGAC
qRT-577F	TGTTGAGCCACCGACGTCAGACGAA
qRT-577R	GCGTCACCAGCCATGCTTGAGC
qRT-598F	GCCAAATGCCAGAACGTCGCCATC
qRT-598R	CGGAACAGATCGACCACGCCTTTGA
qRT-607F	GCTACTCGCGCTCGGCCTCGGTATG
qRT-607R	ATTGCGCACCGTGACCATCCAAGTG
qRT-830F	CGCGGCGAAGATGACCAAGACCA
qRT-830R	GGTGCCCGGTTGTATTTGTCCAGG
qRT-834F	GCACGCAATTCAACGCCAAGCAAAT
qRT-834R	GCGGGCCATGCACGAAGAACAAC
qRT-835F	CCAGTGGCCAATCTGCACCCGGATG
qRT-835R	AGCAGGGCGTTGTCCACCAGGCTCA
qRT-1092F	CAAGCACCATGGCCTGACCGACACC
qRT-1092R	AGGAAACGACGGATGTGCGCGATCA
qRT-1094F	CGTGCCGGCTCCAATCTCTACCAGG
qRT-1094R	AGAGGTACCAGCGCGGCCATGAT
qRT-1096F	TGGCACCCAGCATCGGCATCAG

qRT-1096R	CGTTGTTTCAGCTCCTTGCGGATCAC
qRT-1629F	CAGCTTCCTGTTTCATGCGCGTTGC
qRT-1629R	CAGTTTGCCGCGAAAGTCCCAGTCC
qRT-1631F	GCGTTCATCGAGGAAGGCGGTGAG
qRT-1631R	CAGATCCATCACGTCCAGCGGGTTG
qRT-1632F	CGCGAAGCTGGATGGTGGTGTC
qRT-1632R	GGAGTGATCTTGCGCCGATGCTGAA
qRT-1637F	GCGTGCGCGACAACCAACCACTA
qRT-1637R	GAGACGCTGCAGCAGGCCGAACAAC
qRT-1642F	CGAGTTGCCGTGCGATCTGGATCTC
qRT-1642R	GGCATCTTCGAACCACACCGCTTCA
qRT-1900F	CGTGAGCGATTGCGTGGCACCTGACT
qRT-1900R	GGTGCGTGTTGTTGCGAACCCAGTG
qRT-1903F	CGCACGCTCAATGACGACCC
qRT-1903R	CGATGGAGGCACGATGTTGG
qRT-1909F	CCAAGGGGCTGCATGTGGAATCAC
<b>Oligonucleótidos empleados para qRT-PCR en el capítulo 2</b>	
qRT-CIOA1	GGCTTTCTCGGCGTGATGC
qRT-CIOA2	TCGTGTCCCTGCGGCGTCT
qRT-1905F	CCTCGAACTGATTTTGAAAGCGATA
qRT-1905R	GACGACAAGTGTCTCAAGAGGAA
qRT-1910F	CGGAAACACGCCACTGATCGCACT
qRT-1910R	ATCCTTGACTGAGCCTCCGGGGTT
qRT-1912A	GGAAGGGCGGTGTTTCGTGATA
qRT-1912B	GTCAAAGGTAGGGGCGACCAAG
qRT-NITC1	TGAGCGTATGGTCTGGGGGCGAGGG
qRT-NITC2	CGCCGCATGAATCTGCTCGCCATC
qRT-NIT1F	CACGAGCGCCTGATCTGGGACGAAG
qRT-NIT1R	AGAAGCGCGCCAGGGGGTTGTA
qRT-NIT2F	TTGGCGTCCTGGGAGCGTG
qRT-NIT2R	GCTGTCGGGGCGCAGTAGATCTGAA
qRT-CYNSF	TGCTCGAATTGCCGGCGGAGGTCTC
qRT-CYNSR	GGGTGCGGTGGGCACGGCCTTG
qRT-1558F	TCAAGGGCTACAAGATGATTCTGA
qRT-1558R	CTCCTCCTTGCTGACCAGGAT
qRT-1627F	CATTTTCGCTGACAACCTCCAGTC
qRT-1627R	ATGCGGCACTTGACCGAATAG
qRT-1628F	TTTCGTACCGAAGAACCTCGAC
qRT-1628R	CAGGAGATACCGCAGAGAATGC
qRT-0412F	AAGCTCTTGTCGTTGGATAGATCG
qRT-0412R	ACTGATCCAGTACAAACCGATGAG
qRT-2229F	AAGATGATGATTCTCGGCTTCCCTT
qRT-2229R	CTTCCAACCGTCATAAACGATGTC
qRT-1603F	GAGCATTACGGTTTGCAGTTTCTC
qRT-1603R	GTATTCACCGTCCAGTTCGTTCT
qRT-RPOBF	CGCTGGTGAGCAAGGGGGATCAGGT
qRT-RPOBR	CGCTCGGACAGGCAGATGGAGTCTTC





# Capítulo I

Análisis de pequeños RNAs implicados en la  
regulación de la degradación de cianuro en  
*Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344



La bacteria alcalófila *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344 utiliza cianuro y residuo cianurado de la joyería como única fuente de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2005b; Cabello *et al.*, 2018). La composición química de los residuos cianurados es heterogénea, ya que contienen, además de cianuro, complejos cianuro-metálicos y otros compuestos tóxicos que dificultan el proceso de biodegradación de cianuro. La secuenciación y anotación del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014, 2016), ha permitido estudiar la respuesta global de la estirpe CECT 5344 a cianuro sódico (CN<sup>-</sup>) y al residuo cianurado de la joyería mediante la construcción de micromatrices de DNA y análisis proteómicos (Luque-Almagro *et al.*, 2015; Ibáñez *et al.*, 2017).

En los últimos años, diversos trabajos han revelado que los pequeños RNAs (sRNA) constituyen un elemento regulador, muy extendido entre bacterias y archaeas, de diferentes procesos metabólicos, como la respuesta a estrés oxidativo y el metabolismo del nitrógeno (Holmqvist y Wagner, 2017; Nitzan *et al.*, 2017). Con el fin de estudiar la posible implicación de los sRNA en la regulación del proceso de biodegradación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, en este trabajo se ha llevado a cabo la identificación de los sRNA expresados en células de esta estirpe cultivadas con amonio, cianuro o residuo cianurado, como única fuente de nitrógeno, mediante RNA seq. Además, se ha realizado un análisis bioinformático en el que se han identificado las posibles dianas de los sRNA previamente identificados. Estos resultados han sido publicados en el artículo Olaya-Abril *et al.*, 2019.

---

## **Identificación de los sRNA de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en condiciones cianotróficas**

---

Para la identificación de los sRNA implicados en la regulación del proceso de degradación de cianuro en la cepa CECT 5344 se extrajo el RNA total de células cultivadas con residuo cianurado de la joyería, cianuro sódico o cloruro de amonio, como única fuente de nitrógeno. Posteriormente, se realizó la síntesis del cDNA y la generación de la librería de DNA, para su secuenciación mediante la plataforma Illumina HiSeq 2500. El análisis diferencial comparativo de las secuencias obtenidas entre las condiciones de cultivo utilizadas, con amonio como control, reveló la existencia de 20 sRNA, con tamaños que abarcaban desde 14 pb a 241 pb (Tabla 10). De estos 20 sRNA, un total de 16 sRNA presentaron una localización intergénica, mientras que los otros 4 sRNA fueron intragénicos de tipo antisentido. La variación en la expresión de los sRNA se calculó considerando su expresión en el residuo cianurado como condición de referencia, de este modo, 13 sRNA se indujeron por el residuo, mientras que 7 sRNA se reprimieron en esta condición. La mayoría de los posibles sRNA identificados en la

estirpe CECT 5344 presentaron homología con sRNA previamente descritos en otras estirpes bacterianas, excepto los sRNA676 y sRNA679, que fueron exclusivos de la cepa CECT 5344 (Tabla 10). Un total de 15 sRNA se afectaron por cianuro sódico, que también se expresaron en el residuo cianurado (Tabla 10). Se identificaron 3 sRNA sobreexpresados específicamente por el residuo de la joyería con respecto a cianuro sódico ( sRNA184, sRNA559 y sRNA679), mientras que dos sRNA fueron específicamente reprimidos por el residuo (sRNA150 y sRNA511).

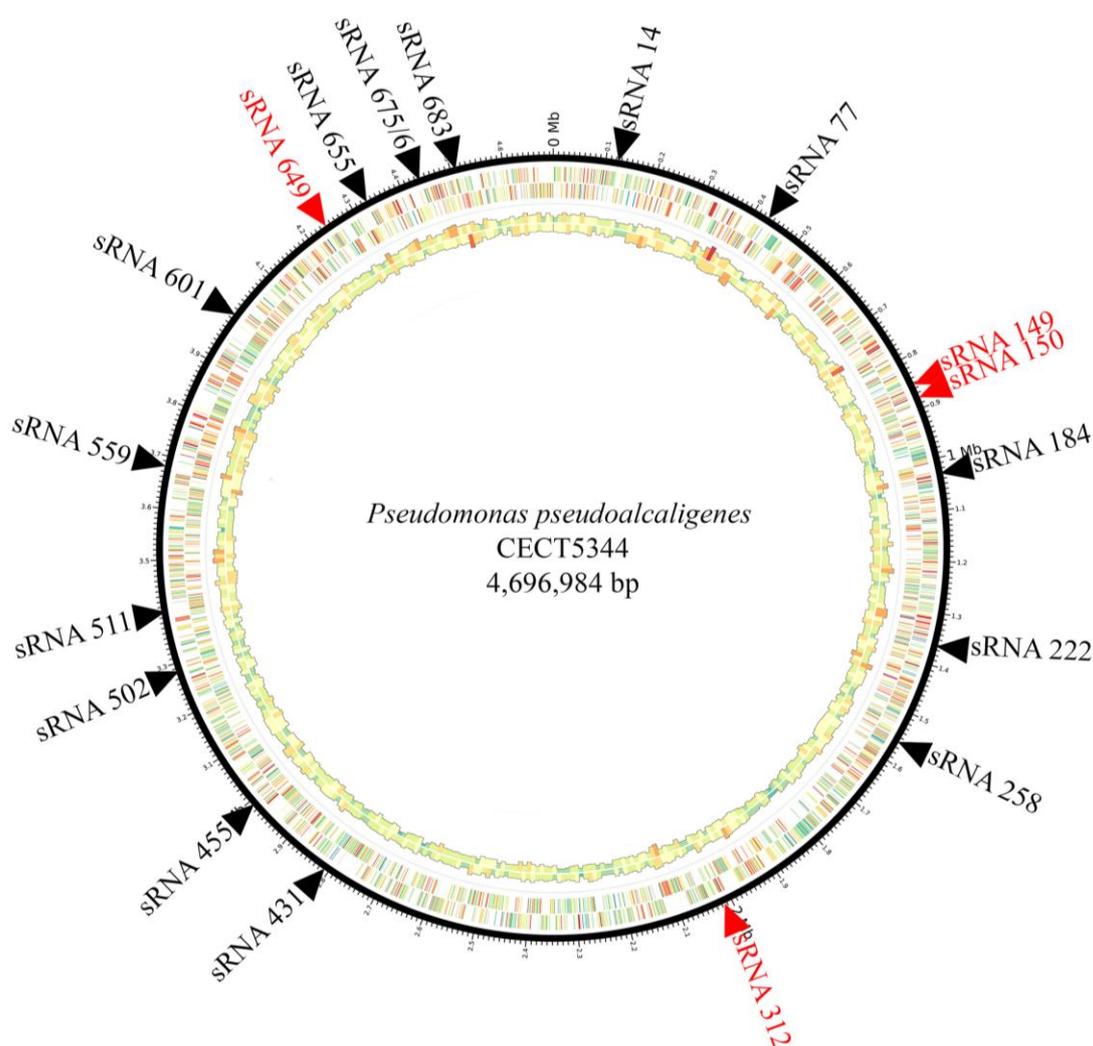
**Tabla 10. Identificación y caracterización de los sRNA involucrados en la detoxificación del residuo cianurado de la joyería.**

RNAs	Tamaño (pb)	Localización genoma (inicio-final)	Cadena DNA	Localización génica	FC* (CN/NH <sub>4</sub> )	Valor p	FC* (Res/NH <sub>4</sub> )	Valor p
RNA14	38	123092-123130	-	Intergénico	-3,07	5,6E-07	-2,92	1,4E-06
RNA77	28	430235-430263	+	Intergénico	2,50	2,9E-06	2,77	1,8E-07
RNA149	31	852589-852620	+	Antisentido	-2,38	4,9E-05	-4,68	1,4E-12
RNA150	241	852772-853013	+	Antisentido	-	-	-3,76	5,8E-10
RNA184	45	1032809-1032854	-	Intergénico	-	-	3,58	4,8E-08
RNA222	51	1365111-1365162	+	Intergénico	2,59	1,9E-04	2,08	4,3E-03
RNA258	86	1664608-1664694	+	Intergénico	7,54	>1,0E-17	7,99	>1,0E-17
RNA312	40	2018669-2018709	+	Antisentido	22,64	>1,0E-17	41,56	>1,0E-17
RNA431	37	2814997-2815034	-	Intergénico	5,22	>1,0E-17	2,15	6,4E-05
RNA455	29	2995436-2995465	+	Intergénico	4,16	>1,0E-17	3,53	2,2E-16
RNA502	34	3288590-3288624	-	Intergénico	-3,32	1,9E-03	-2,29	1,7E-2
RNA511	38	3405640-3405678	-	Intergénico	-	-	-2,06	7,3E-4
RNA559	38	3685225-3685263	+	Intergénico	-	-	3,04	2,1E-2
RNA601	124	4006653-4006777	-	Intergénico	-2,35	1,6E-07	-2,71	1,1E-09
RNA649	21	4241523-4241544	-	Antisentido	2,94	1,9E-08	2,59	6,5E-07
RNA655	57	4337874-4337931	-	Intergénico	6,69	>1,0E-17	3,99	1,7E-13
RNA675	22	4439338-4439360	+	Intergénico	3,11	1,1E-10	3,40	2,4E-12
RNA676	24	4440233-4440257	+	Intergénico	2,27	3,2E-05	2,93	3,7E-08
RNA679	79	4450665-4450744	-	Intergénico	-	-	2,13	5,0E-05
RNA683	14	4541161-4541175	+	Intergénico	-10,22	>1,0E-17	-10,11	>1,0E-17

(\*) FC: variación en la expresión o "Fold Change"

## Análisis de los sRNA involucrados en la detoxificación del residuo cianurado por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344

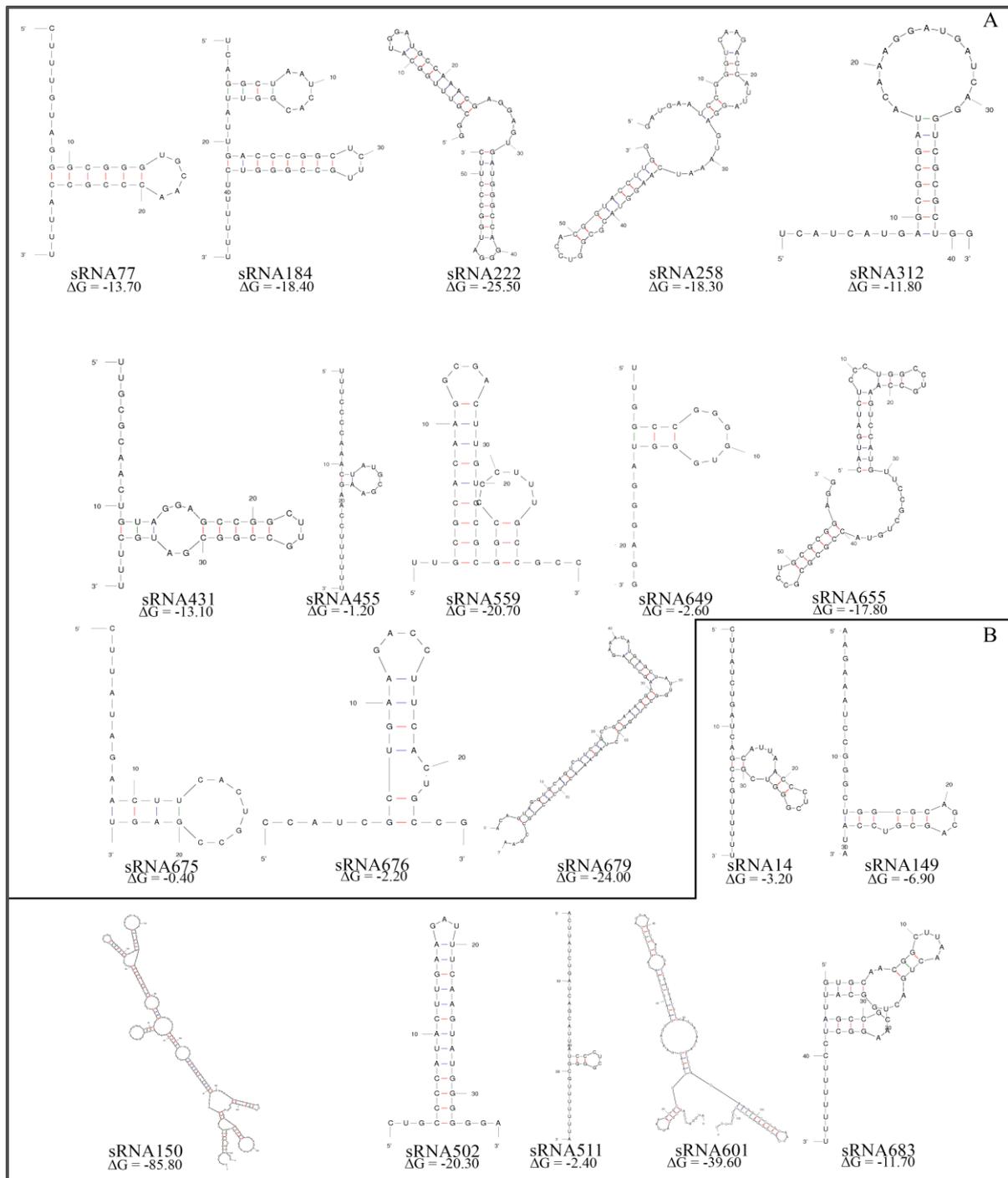
Los genes que codifican los 20 sRNA expresados en respuesta al residuo cianurado, se localizaron en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014, 2016). La mayoría de los sRNA se encontraron distribuidos de forma homogénea a lo largo del genoma de la cepa CECT 5344, excepto los sRNA649, sRNA655, sRNA675, sRNA676 y sRNA683, que se encontraron muy próximos entre sí (Fig. 11).



**Figura 11. Localización en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 de los sRNA expresados en respuesta al residuo cianurado.** Los 20 sRNA presentaron expresión diferencial en el residuo de la joyería utilizando amonio como control. Los sRNA intergénicos se muestran con flechas negras y los sRNA antisentido con flechas rojas.

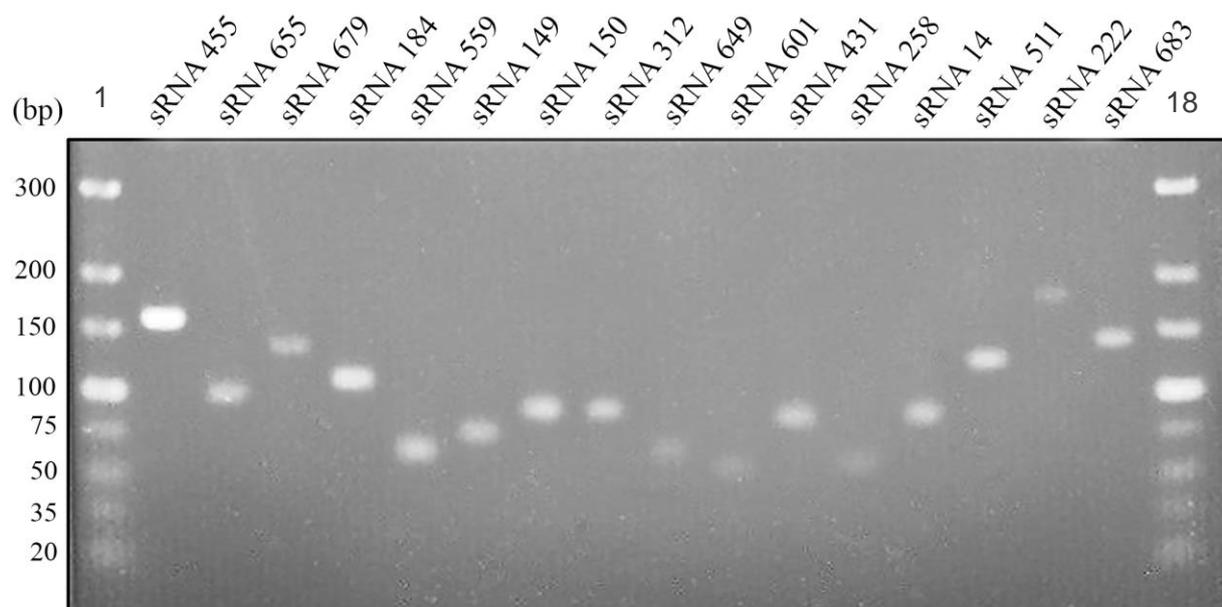
## Capítulo I-Resultados

También se llevó a cabo la predicción de la estructura secundaria de los 20 sRNA identificados (Fig. 12). El algoritmo utilizado consideró un valor mínimo de energía libre de Gibbs ( $\Delta G < 0$ ), tanto para la estructura completa como para el plegamiento de cada par de bases. En la mayoría de los casos los sRNA formaron moléculas altamente estructuradas y complejas que incluían más de un bucle de horquilla.



**Figura 12. Predicción de la estructura secundaria de los 20 sRNA expresados en respuesta al residuo cianurado de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Se representan los sRNA inducidos (A) y los reprimidos por el residuo (B). La predicción se llevó a cabo con el programa Mfold (Kery *et al.*, 2014).**

Los sRNA cuya expresión se afectó por el residuo joyero, se validaron por RT-PCR (Fig. 13). Para ello, se utilizó el mRNA obtenido a partir de células cultivadas con el residuo de la joyería y los oligonucleótidos indicados en la Tabla 9. Como se observa en la Figura 13, 16 de los 20 sRNAs se amplificaron positivamente. Además, los productos de PCR obtenidos se sometieron a secuenciación para su confirmación. Por lo tanto, y en base a esta validación, en los posteriores análisis solo se consideraron los 16 sRNA confirmados por RT-PCR (Fig. 13, Tabla 10).

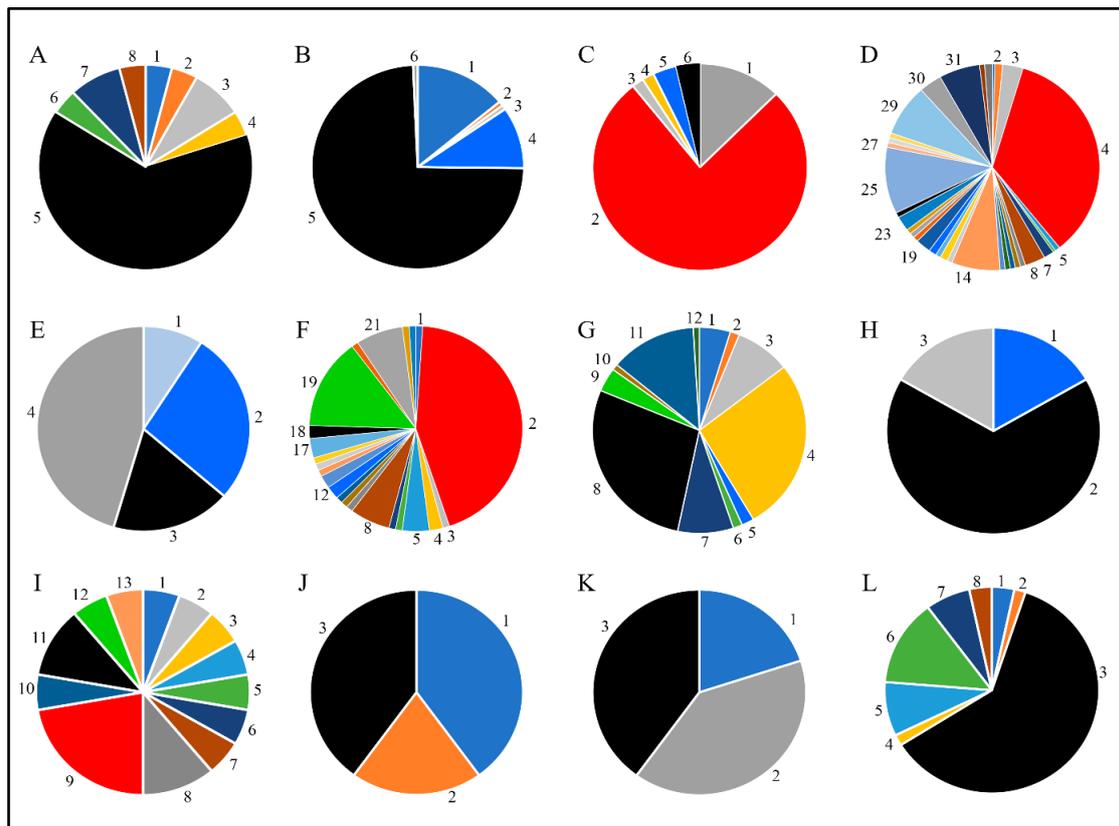


**Figura 13. Validación por RT-PCR de los sRNA de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 identificados mediante RNA-Seq.** Los productos amplificados (calles 2-17) se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 3 %. En las calles 1 y 18 se muestra el marcador de DNA TrackIt Ultra Low Range (Invitrogen, CA, EE.UU.).

## Distribución bacteriana de los sRNA identificados en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344

Se analizó la distribución de genes que codifican los 16 sRNA de la cepa CECT 5344 en otras estirpes bacterianas mediante la herramienta informática GLASSgo. Los resultados mostraron que 11 de estos sRNA se conservaron en más de dos estirpes bacterianas (Fig. 14), mientras que los sRNA150 y sRNA655 presentaron una distribución mínima, encontrándose en *Pseudomonas mendocina* y *P. pseudoalcaligenes*. Los sRNA312 y sRNA511 se encontraron exclusivamente en *P. pseudoalcaligenes*. Además, como se mencionó anteriormente, sRNA679 no presentó homología con ningún sRNA en bacterias, por lo que se consideró exclusivo de la estirpe CECT 5344.

La mayoría de los sRNA de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se encontraron presentes en  $\gamma$ -proteobacterias, específicamente en el género *Pseudomonas* (Fig. 14). El sRNA14 mostró una alta representación entre enterobacterias (Fig. 14A), mientras que los sRNA149 y sRNA222 se encontraron exclusivamente en *Pseudomonas* (Figs. 14B y 14D). Los sRNA184, sRNA258, sRNA431 y sRNA559 se encontraron ampliamente distribuidos entre los distintos géneros bacterianos estudiados (Figs. 14C, 14E, 14F y 14H). El sRNA184 se encontró altamente representado en *Pseudomonas* y en *Azotobacter* (Fig. 14C), mientras que el sRNA431 se encontró en *Rhodanobacter*, de la familia *Xanthomonadaceae* (Fig. 14F). El sRNA455 presentó una escasa distribución, estando representado en tan solo dos estirpes de *Pseudomonas* y *Helicobacter*, esta última  $\epsilon$ -proteobacteria (Fig. 14G). Por el contrario, el sRNA559 fue el que se encontró más ampliamente distribuido entre bacterias, incluidas  $\beta$ -proteobacterias de la familia *Comamonadaceae* y diversas estirpes de  $\gamma$ -proteobacterias pertenecientes a las familias *Alcanivoraceae*, *Piscirickettsiaceae* y *Pseudomonadaceae* (Fig. 14H). El sRNA601 (Fig. 14I) y el sRNA649 (Fig. 14J) se encontraron principalmente en *Pseudomonas*, mientras que el sRNA683 se encontró en la familia *Enterobacteriaceae* (Fig. 14K).



**Figura 14. Distribución bacteriana de los sRNA de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 afectados por el residuo joyero.** Los sRNA bacterianos se analizaron utilizando el programa GLASSgo. El 100 % representa el total de las secuencias de sRNAs encontradas en todas las especies bacterianas, considerando tanto el número de secuencias como el porcentaje de identidad (al menos

60 % de identidad entre secuencias). Entre paréntesis se muestra la contribución específica de cada especie (expresada en %). Solo se representan los sRNA con homólogos en más de 2 especies. **A.** (sRNA14): 1. *E. coli* (4,0), 2. *Oceanimonas sp.* (4,0), 3. *P. chlororaphis* (8,0), 4. *P. plecoglossicida* (4,0), 5. *P. pseudoalcaligenes* (64,0), 6. *Shigella dysenteriae* (4,0), 7. *Shigella sonnei* (8,0), 8. *Yersinia enterocolitica* (4,0). **B.** (sRNA149): 1. *P. stutzeri* (12,5), 2. *P. aeruginosa* (76,8), 3. *P. fulva* (1,8), 4. *P. mandelii* (1,8), 5. *P. mendocina* (3,6), 6. *P. pseudoalcaligenes* (3,6). **C.** (sRNA184): 2. *Azotobacter vinelandii* (1,2), 3. *Pseudomonadaceae bacterium* (3,1), 4. *P. aeruginosa* (34,6), 7. *P. brassicaceae* (1,5), 8. *P. chlororaphis* (3,1), 14. *P. fluorescens* (7,3), 16. *P. knackmussii* (1,2), 18. *P. mendocina* (1,2), 19. *P. montellii* (2,3), 23. *P. protegens* (2,3), 25. *P. putida* (10,4), 29. *Pseudomonas sp.* (8,1), 30. *P. stutzeri* (3,5), 31. *P. syringae* (6,2), 33. microorganismo del suelo no cultivable (1,2). **D.** (sRNA222): 1. *P. fulva* (9,1), 2. *P. mendocina* (27,3), 3. *P. pseudoalcaligenes* (18,2), 4. *P. stutzeri* (45,5). **E.** (sRNA258): 2. *P. aeruginosa* (43,9), 4. *P. brassicaceae* (2), 5. *P. chlororaphis* (4,1), 8. *P. fluorescens* (6,1), 12. *P. mendocina* (2), 13. *P. montellii* (2), 17. *P. protegens* (3,1), 18. *P. pseudoalcaligenes* (2), 19. *P. putida* (14,3), 21. *Pseudomonas sp.* (7,1). **F.** (sRNA431): 1. *P. chlororaphis* (4,7), 2. *P. deceptionensis* (1,4), 3. *P. entomophila* (8,4), 4. *P. fluorescens* (27,1), 5. *P. mendocina* (1,9), 6. *P. mosseii* (1,4), 7. *P. protegens* (8,4), 8. *P. pseudoalcaligenes* (28), 9. *P. putida* (3,7), 11. *Pseudomonas sp.* (13,1). **G.** (sRNA455): 1. *P. mendocina* (16,7), 2. *P. pseudoalcaligenes* (66,7), 3. *Helicobacter cetorum* (16,7). **H.** (sRNA559): 1. *Alcanivorax dieselolei* (5,5), 2. *Comamonas testosteroni* (5,5), 3. *Cronobacter muytjensii* (5,5), 4. *Cronobacter universalis* (5,5), 5. *Enterobacter cloacae* (5,5), 6. *Klebsiella oxitoca* (5,5), 7. *Methylophaga frappieri* (5,5), 8. *Pantoea sp.* (11,1), 9. *P. aeruginosa* (22,2), 10. *P. fluorescens* (5,5), 11. *P. pseudoalcaligenes* (11,1), 12. *P. putida* (5,5), 13. *Pseudomonas sp.* (5,5). **I.** (sRNA601): 1. *P. mendocina* (40), 2. *P. fulva* (20), 3. *P. pseudoalcaligenes* (40). **J.** (sRNA649): 1. *P. extremaustralis* (20), 2. *P. stutzeri* (40), 3. *P. pseudoalcaligenes* (40). **K.** (sRNA683): 1. *E. coli* (3,4), 2. *Oceanimonas sp.* (1,7), 3. *P. pseudoalcaligenes* (61), 4. *Rahnella aquatilis* (1,7), 5. *Shigella boydii* (8,5), 6. *Shigella flexneri* (13,6), 7. *Shigella sonnei* (6,8), 8. *Vibrio vulnificus* (3,4).

---

## Dianas de los sRNA de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 expresados en condiciones cianotrofas

---

La identificación de las posibles dianas de los 16 sRNA de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se realizó mediante el programa TargetRNA2 (Kery *et al.*, 2014), obteniéndose un amplio número de posibles dianas (Tabla S1). Además, se observó que un número elevado de estas dianas correspondería a genes que forman parte de agrupaciones génicas de la estirpe CECT 5344 (Fig. 15). Las agrupaciones génicas *nit1C* y *cioAB-nit4*, previamente descritas como esenciales en la asimilación y resistencia a cianuro en la estirpe CECT 5344, se encontraron positivamente reguladas por el sRNA649, y por los sRNA14, sRNA222, sRNA551 y sRNA184 (Fig. 15). En la agrupación génica *nit1C*, cuatro genes presentaron secuencias diana para los sRNA citados anteriormente (Fig. 15A). Específicamente, el gen *nitB* podría ser diana del sRNA222, el gen *nitC* podría estar regulado por el sRNA14, el gen *nitH* presentó dianas para los sRNA14 y sRNA511 y el gen *nitG* podría estar regulado por el sRNA649. Por otro lado, algunos de los genes de la agrupación génica *cioAB-nit4* también se propusieron como dianas de los sRNA, así el gen *cysI*, que codifica la subunidad sulfito/nitrito reductasa dependiente de NADPH, podría ser diana del sRNA184, y los genes *cioB* y *cysM* podrían ser dianas del sRNA649 (Fig. 15B).

También se encontraron genes implicados en el metabolismo de polihidroxicanoatos de cadena media como posibles dianas de los sRNA222, sRNA312 y sRNA258 (Fig. 15C). Además, los sRNA149, sRNA511 y sRNA683 podrían regular genes implicados en la síntesis de fosfolípidos, como el gen *glpQ*, y en el metabolismo de la urea, como los genes *ureY* y *ureE* (Fig. 15D). Otros sRNA posiblemente implicados en el control de genes relacionados con el metabolismo de lípidos y otros procesos, agrupación génica BN5\_2263-BN5\_2270 donde se incluye el gen regulador *merR2* involucrado en el metabolismo del mercurio, fueron los sRNA511, sRNA258, sRNA649 y sRNA431 (Fig. 15F). Otros genes de la agrupación génica BN5\_0570-BN5\_0578, podrían estar regulados por los sRNA150, sRNA222 y sRNA655, como el gen *oadA* que codifica una oxaloacetato descarboxilasa y el gen BN5\_0576 que codifica una proteína similar a la hemeritina (Fig. 15E). También se identificó un grupo de genes (BN5\_2305-BN5\_2314), que podrían estar regulados por los sRNA222, sRNA14 y sRNA649 (Fig. 15G). Así el sRNA222 podría tener como diana al gen *spuC*, que codifica una aminotransferasa, mientras que el sRNA14 podría regular al gen *glnA5* de la glutamina sintetasa. El sRNA679 controlaría una oxidoreductasa dependiente de FAD y un regulador transcripcional CopG (Fig. 15H). Los sRNA14, sRNA258, sRNA511, sRNA150 y sRNA149 podrían regular varios genes relacionados con los procesos de transferencia de DNA (Fig. 15I).

Además de los genes diana de sRNA que se encontraron formando parte de agrupaciones génicas de la estirpe CECT 5344, se identificaron otros genes diana distribuidos de forma aislada a lo largo del genoma de esta bacteria. Entre estos genes se encontraron, arseniato reductasa *arsC*/sRNA14, aquil-hidroperóxido reductasa *ahpC3*/sRNA150, importador de D-metionina *metN1*/sRNA184, formiato deshidrogenasa BN5\_0294/sRNA222, transportador de ácidos tricarbóxicos BN5\_2918/sRNA258, formiato deshidrogenasa BN5\_0294/sRNA312, antranilato fosforribosil transferasa BN5\_1879/sRNA312, formamidasa *amiF*/sRNA655, dihidropirimidinasa *hydA*/sRNA649, regulación de la captación de hierro *fur*/sRNA649 y regulador GntR *gntR*/sRNA649 (Tabla S1). Todos estos componentes (genes/proteínas) se han encontrado afectados por el residuo cianurado en estudios ómicos previos. Sin embargo, algunas de las dianas de los sRNA identificados en este trabajo no han sido descritas previamente estar reguladas por el cianuro, entre las que se encontraron como dianas: furoil-CoA deshidrogenasa *hmfA*/sRNA184, oxalacetato deshidrogenasa *bcpA*/sRNA222, S-adenosilhomocisteína desaminasa BN5\_1672/sRNA222, la homoserina O-acetiltransferasa *metX*/sRNA258/sRNA511, un regulador de ornitina BN5\_2771/sRNA258 y un componente de la biosíntesis de sideróforos BN5\_1295/sRNA312/sRNA649. También se identificaron, como posibles dianas de sRNA312, la proteína de maduración de la nitrato reductasa periplásmica *napD*, una arseniato reductasa y un regulador transcripcional *tetR*.

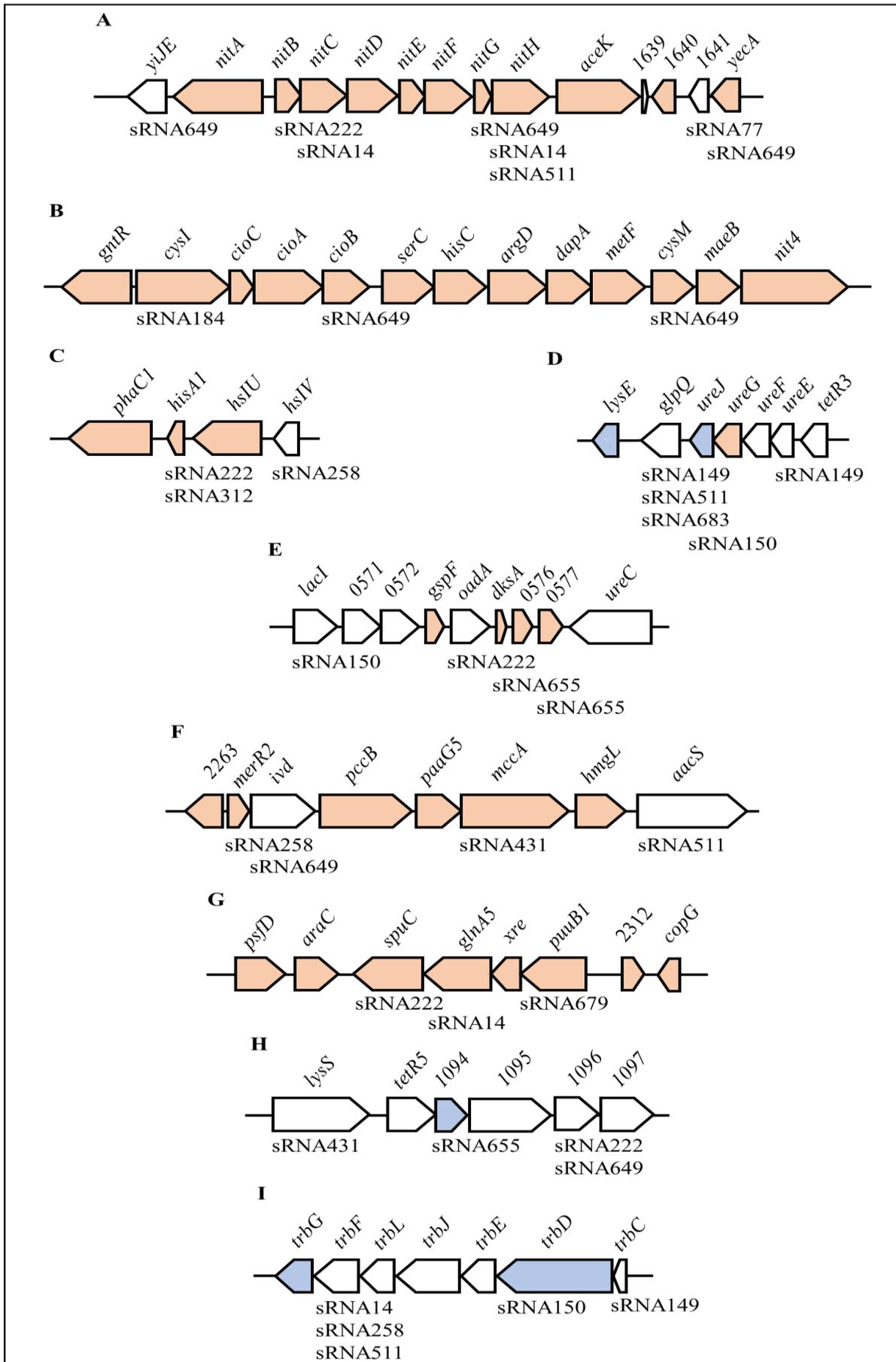
Otras posibles dianas fueron una glicerofosfodiéster fosfodiesterasa BN5\_0550/sRNA511/sRNA149/sRNA683, una alquil hidroperóxido reductasa *ahpD*/sRNA511, una proteína de resistencia a mercurio *merE*/sRNA511, una nitrilasa de nitrilos alifáticos *nit1*/sRNA511 y un transportador de electrones de la nitrato reductasa periplásmica *napB*/sRNA601. Además, el análisis identificó el transportador de citrato DctM (BN5\_0450), un componente de resistencia a hidroperóxido (BN5\_2297), una 7-ciano-7-deazaguanina reductasa (BN5\_2508) y una ácido cob(II)irínico ac-diamida reductasa (BN5\_3545), como dianas de sRNA649. Por último, el sRNA679 tendría entre sus dianas un regulador transcripcional de la familia *arsR* (Tabla S1).

Para validar algunas de las dianas de los sRNA expresados en respuesta al residuo cianurado, se realizó una qRT-PCR con mRNA aislados a partir de células cultivadas con el residuo cianurado de la joyería (Tabla 11). Según los resultados obtenidos, todos los genes diana analizados se indujeron significativamente por este residuo cianurado, especialmente los genes de las agrupaciones génicas *nit1C* y *cioAB-nit4* (Tabla 11).

**Tabla 11. qRT-PCR de genes diana de los sRNA expresados en condiciones cianotrófas de la estirpe CECT 5344.**

sRNA	Gen diana/ nombre	Amonio	Residuo	FC R/A*
222, 312	BN5_0415/ <i>hisA1</i>	7,4 ± 1,8	109,5 ± 9	14,8
258	BN5_0417/ <i>hsIV</i>	18,3 ± 1,2	348,4 ± 12	19,0
149, 511, 683	BN5_0550/ <i>glpO</i>	0,9 ± 0,06	9,8 ± 0,8	10,9
150	BN5_0551/ <i>ureJ</i>	0,6 ± 0,04	38,8 ± 4,9	64,7
149	BN5_0554/ <i>ureE</i>	0,5 ± 0,07	4,8 ± 0,9	9,6
150	BN5_0570/ <i>lacl</i>	1,4 ± 0,1	6,1 ± 0,6	4,4
222	BN5_0574/ <i>oadA</i>	5,1 ± 0,78	18,6 ± 0,3	3,6
655	BN5_0575/ <i>dkxA</i>	76,0 ± 5,2	226,9 ± 19	3,0
655	BN5_0577	0,3 ± 0,03	1,5 ± 0,02	5,0
649	BN5_1629/ <i>yiJE</i>	0,8 ± 0,07	25,9 ± 1,8	32,4
222	BN5_1631/ <i>nitB</i>	0,9 ± 0,08	1096 ± 76	1217
14	BN5_1632/ <i>nitC</i>	0,8 ± 0,09	714 ± 31	893
649	BN5_1636/ <i>nitG</i>	1,1 ± 0,1	1113 ± 84	1012
14, 511, 683	BN5_1637/ <i>nitH</i>	0,7 ± 0,09	525 ± 48	750
649	BN5_1642/ <i>yecA</i>	10,5 ± 0,7	27,7 ± 0,1	2,6
184	BN5_1900/ <i>cysI</i>	5,7 ± 0,4	5059 ± 89	887
649	BN5_1903/ <i>cioB</i>	5,5 ± 0,3	1877 ± 162	341
649	BN5_1909/ <i>metF</i>	1,7 ± 0,1	206,1 ± 18	153
258	BN5_2264/ <i>merR2</i>	9,6 ± 1,9	186,7 ± 13	19,4
649	BN5_2265/ <i>ivd</i>	1,2 ± 0,05	24,2 ± 1,4	20,2
431	BN5_2268/ <i>mccA</i>	2,2 ± 0,08	39,9 ± 2,2	18,1
222	BN5_2308/ <i>spuc</i>	12,3 ± 0,8	143,9 ± 2,3	11,7
14	BN5_2309/ <i>glnA5</i>	1,2 ± 0,07	50,4 ± 4,6	42,0
679	BN5_2311/ <i>puuB1</i>	2,1 ± 0,1	18,4 ± 1,9	8,8
14, 258, 511	BN5_3528/ <i>trbF</i>	0,5 ± 0,05	17,9 ± 1,2	35,8
150	BN5_3532/ <i>trbD</i>	0,2 ± 0,02	7,7 ± 0,4	38,5
149	BN5_3533/ <i>trbC</i>	0,4 ± 0,04	16,7 ± 1,3	41,7

\*La expresión de los genes diana de los sRNA fue cuantificada en células cultivadas con cloruro de amonio (A) o residuo joyero (R) para determinar la tasa de cambio (FC) (residuo/amonio) se ha usado el cociente expresión génica relativa.



**Figura 15. Genes regulados por los sRNA de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en respuesta al residuo cianurado.** En naranja se muestran los genes inducidos por el residuo joyero y en azul los reprimidos, según estudios ómicos previos (Estepa *et al.*, 2012; Luque-Almagro *et al.*, 2015). Los genes mostrados y las proteínas que codifican son: **A.** Agrupación génica BN5\_1629-BN5\_1642; BN5\_1629, transportador YiJE de membrana; BN5\_1630, regulador transcripcional NitA; BN5\_1631, proteína de función desconocida NitB; BN5\_1632, nitrilasa NitC; BN5\_1633, NitD con dominio S-adenosilmetionina; BN5\_1634, N-acetiltransferasa-GCN5 NitE; BN5\_1635, NitF AIR sintasa; BN5\_1636, NitG de función desconocida; BN5\_1637, FAD-oxidoreductasa NitH; BN5\_1638, isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa IDH AceK; BN5\_1639, proteína de función desconocida; BN5\_1640, proteína con dominio  $\beta$ -lactamasa; BN5\_1641, proteína de membrana; BN5\_1642, proteína de función desconocida YecA. **B.** Agrupación génica BN5\_1899-BN5\_1912; BN5\_1899, regulador transcripcional GntR; BN5\_1900, sulfito reductasa-NADPH hemoproteína CysI; BN5\_1901, proteína de función desconocida CioC; BN5\_1902, oxidasa terminal insensible a cianuro CioA; BN5\_1903, citocromo *d* ubiquinol oxidasa CioB; BN5\_1904, fosfoserina aminotransferasa SerC; BN5\_1905, histidinol-fosfato aminotransferasa-imidazol acetol-fosfato transaminasa HisC; BN5\_1906, acetilornitina aminotransferasa ArgD; BN5\_1907, 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato sintasa DapA; BN5\_1909, metilentetrahidrofolato reductasa MetF; BN5\_1910, cisteína sintasa CysM; BN5\_1911, NADP<sup>+</sup>-enzima málica MaeB; BN5\_1912, nitrilasa Nit4. **C.** Agrupación génica BN5\_0414-BN5\_0417; BN5\_0414, polimerasa de 3-hidroxialcanoato PhaC1; BN5\_0415, fosforribosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida ribósido isomerasa HisA1; BN5\_0416, subunidad de proteasa dependiente de ATP HslU; BN5\_0417, subunidad de proteasa dependiente de ATP HslV. **D.** Agrupación génica BN5\_0549-BN5\_0555; BN5\_0549, exportador de lisina LysE/YggA; BN5\_0550, glicerofosfodiéster fosfodiesterasa GlpQ; BN5\_0551, hidrogenasa/ureasa UreJ BN5\_0552, proteína accesoria de la ureasa UreG; BN5\_0553, proteína accesoria de ureasa UreF; BN5\_0554, proteína accesoria de ureasa UreE; BN5\_0555, regulador transcripcional TetR. **E.** Agrupación génica BN5\_0570-BN5\_0578; BN5\_0570, regulador transcripcional LacI; BN5\_0571 y BN5\_0572, proteínas extracelulares de unión a soluto; BN5\_0573, proteína del sistema de secreción de tipo II GspF; BN5\_0574, oxalacetato descarboxilasa OadA; BN5\_0575, proteína de función desconocida DksA; BN5\_0576, proteína con dominio de unión a hemeritina HHE; BN5\_0577, proteína de función desconocida; BN5\_0578, subunidad  $\alpha$  de la ureasa UreC. **F.** Agrupación génica BN5\_2263-BN5\_2270; BN5\_2263, deshidrogenasa; BN5\_2264, regulador transcripcional MerR2; BN5\_2265, Isovaleryl-CoA deshidrogenasa Ivd; BN5\_2266, subunidad propionil-CoA carboxilasa PccB; BN5\_2267,  $\gamma$ -carboxygeranoil-CoA hidratasa PaaG5; BN5\_2268, subunidad 3-metilcrotonoil-CoA carboxilasa MccA; BN5\_2269, hidroximetilglutaril-CoA liasa HmgL; BN5\_2270, acetoacetyl-CoA sintetasa AacS. **G.** Agrupación génica BN5\_2306-BN5\_2313; BN5\_2306, proteína accesoria de xantina deshidrogenasa PsfD; BN5\_2307, proteína reguladora de la familia AraC; BN5\_2308, aminotransferasa SpuC; BN5\_2309, glutamina sintetasa GlnA5; BN5\_2310, regulador transcripcional XrE; BN5\_2311, FAD-oxidoreductasa PuuB1; BN5\_2312, integrasa de fago; BN5\_2313, regulador transcripcional CopG. **H.** Agrupación génica BN5\_1092-BN5\_1098; BN5\_1092, lisina-tRNA ligasa LysS; BN5\_1093, regulador transcripcional de tipo HTH TetR5; BN5\_1094, lipoproteína; BN5\_1095, proteína de función desconocida; BN5\_1096, proteína de función desconocida; BN5\_1097, lipoproteína. **I.** Agrupación génica BN5\_3527-BN5\_3533; BN5\_3527, proteína de transferencia por conjugación TrbG; BN5\_3528, proteína de transferencia por conjugación TrbF; BN5\_3529, proteína de transferencia TrbL; BN5\_3530, proteína señal de transferencia TrbJ; BN5\_3531, proteína de transferencia por conjugación de tipo P TrbE; BN5\_3532, proteína transmembrana de transferencia TrbD; BN5\_3533, proteína transmembrana de transferencia TrbC.

---

## Mutagénesis del gen *dctM* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344

---

El gen *dctM* (BN5\_0450) de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 codifica un posible transportador de citrato (W6RB28), que se ha descrito como una de las posibles dianas del sRNA649. Para estudiar la función de este transportador en la destoxificación/asimilación del residuo cianurado en la cepa CECT 5344, se construyó el mutante DctM<sup>-</sup> deficiente en este transportador. Este mutante se construyó mediante la delección parcial, fragmento A y B, y la inserción de un casete de resistencia a gentamicina, consiguiendo la mutagénesis del gen *dctM* (Fig. 16). En primer lugar, se amplificaron las regiones centrales correspondientes a los fragmentos A (507pb) y B (607pb) del gen *dctM* utilizando las parejas de cebadores 0450FA1E-0450RA1B y 0450FB2B-0450RB2H, respectivamente (Tabla 9). Los fragmentos se clonaron en el vector de clonación comercial pGEM-T-Easy, de forma individual, generando así las construcciones pGEM-T-Easy $\Delta$ *dctM*F A y pGEM-T-Easy $\Delta$ *dctM*F B. Con el fin, de obtener la construcción pGEM-T-Easy $\Delta$ *dctM*F A-FB, se digirió la construcción pGEM-T-Easy $\Delta$ *dctM*F B con las enzimas de restricción *Bam*HI//*Hind*III, se purificó el fragmento B digerido y se clonó en el sitio específico *Bam*HI del plásmido pGEM-T-Easy $\Delta$ *dctM*F A, previamente digerido con esta enzima de restricción, mediante la ligasa T4. Posteriormente, un fragmento *Bam*HI//*Bam*HI de 1 kb obtenido del plásmido pMS255 (Becker *et al.*, 1995) y conteniendo un gen de resistencia a gentamicina, se clonó en el vector pGEM-T-Easy $\Delta$ *dctM*F A-FB previamente digerido con *Bam*HI para generar pGEM-T-Easy $\Delta$ *dctM*F A-GM-FB. Esta construcción se digirió con *Eco*RI y *Hind*III produciendo un fragmento de 2,11 kb que contenía el gen de resistencia a gentamicina flanqueado por las regiones internas del gen *dctM*. El fragmento resultante se clonó finalmente en pK18*mob*, un plásmido suicida en *Pseudomonas* por carecer de origen de replicación en este género y que confiere resistencia a kanamicina (Schäfer *et al.*, 1994). La construcción final, pK18*mob* $\Delta$ *dctM*F A-GM-FB, se utilizó para generar la mutación  $\Delta$ *dctM* en el genoma de la estirpe silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 mediante recombinación homóloga. Para ello, se llevó a cabo una conjugación biparental utilizando *E. coli* S17-1 conteniendo la construcción pK18*mob* $\Delta$ *dctM*F A-GM-FB como la cepa donadora, y la estirpe silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, resistente a ácido nalidíxico por una mutación espontánea, como cepa receptora. Los transconjugantes se seleccionaron en medio M9 con ácido nalidíxico y gentamicina. La interrupción del gen *dctM* en la estirpe CECT 5344 se confirmó mediante una doble PCR empleando distintas parejas de oligonucleótidos (Fig. 16).

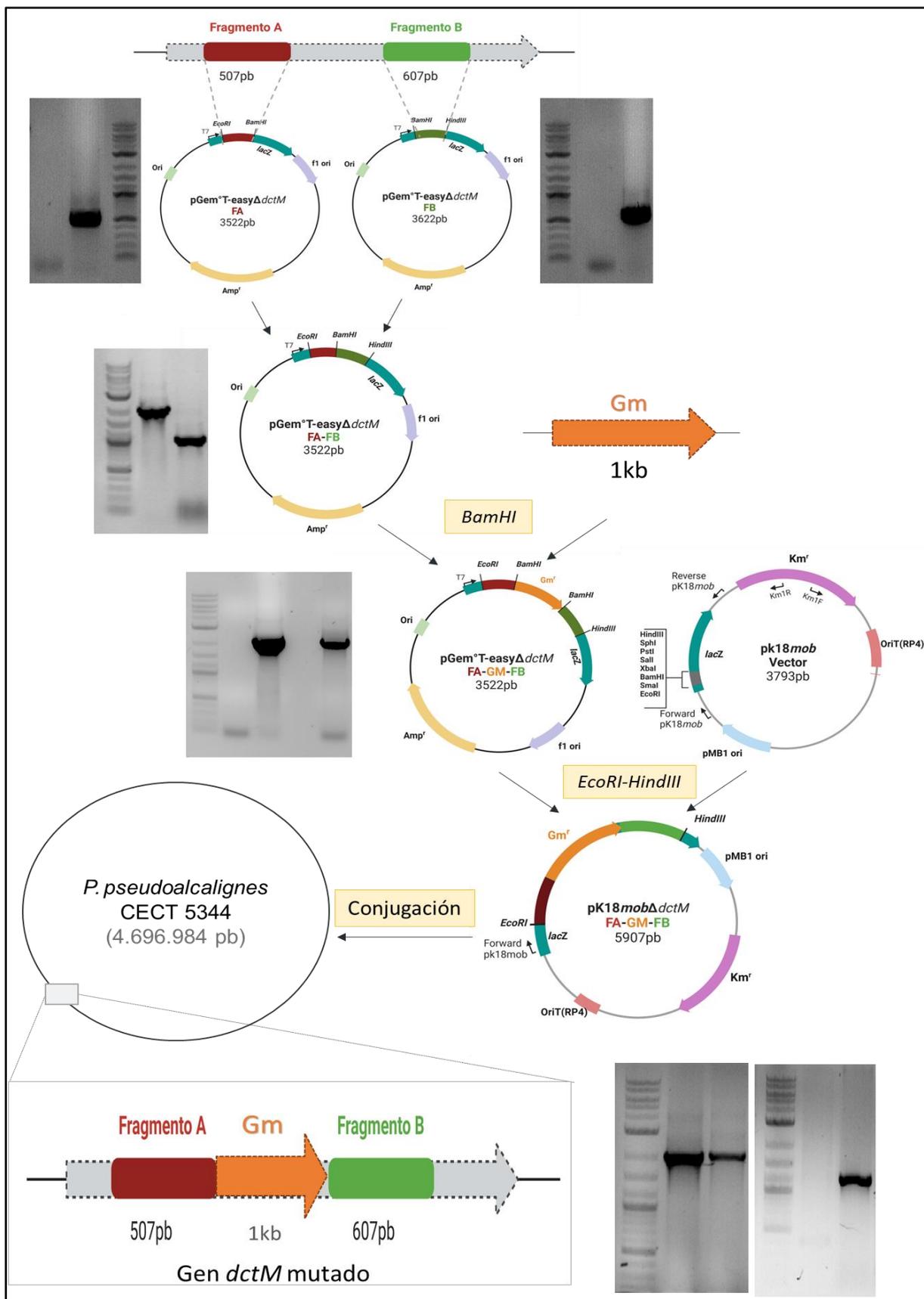
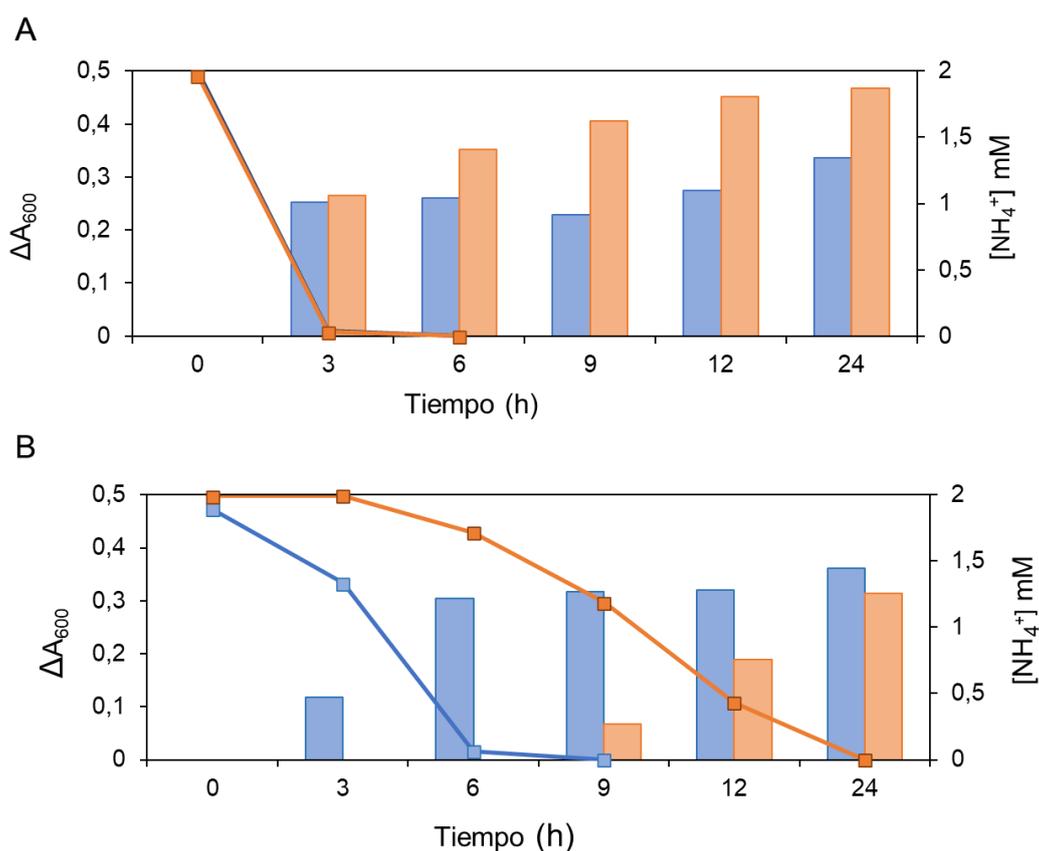
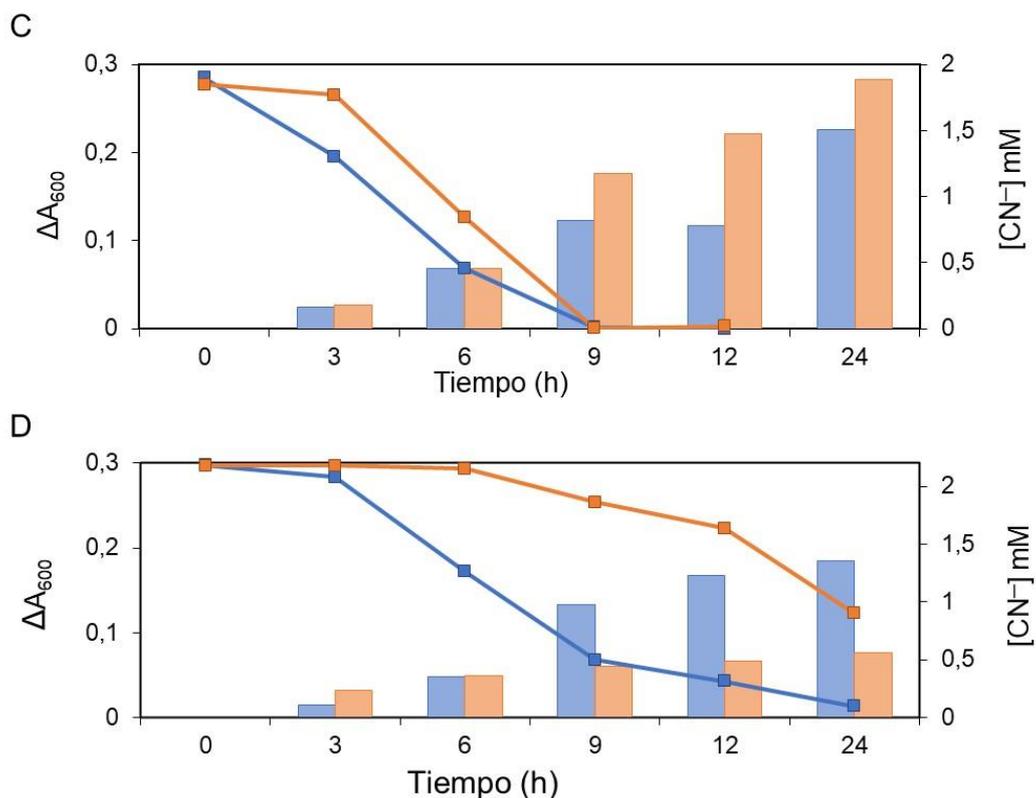


Figura 16. Estrategia de mutagénesis del gen *dctM* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. En esta estrategia se utilizó el vector de clonación pGem-T-Easy, el vector suicida en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 pK18mob y los sitios de restricción que se indican para cada paso de clonación.

El mutante DctM<sup>-</sup> se caracterizó en medio mínimo con acetato como fuente de carbono y amonio, cianuro sódico o residuo cianurado de la joyería como única fuente de nitrógeno. El crecimiento observado de la estirpe mutante DctM<sup>-</sup> en medios con amonio o cianuro fue similar al de la estirpe silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Fig. 17A,C). Sin embargo, en presencia del residuo cianurado, el mutante DctM<sup>-</sup> presentó un crecimiento muy inferior comparado con la estirpe silvestre después de 24 h (Fig. 17D). Por otro lado, el mutante DctM<sup>-</sup> se cultivó en medio mínimo con amonio como única fuente de nitrógeno en presencia de los metales Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> y Zn<sup>2+</sup>, a la misma concentración en la que se encuentran en el residuo joyero cianurado. En estas condiciones, el mutante DctM<sup>-</sup> presentó un retraso en el crecimiento de 24 horas respecto a la estirpe silvestre, pero el crecimiento máximo alcanzado fue similar (Fig. 17B). Un análisis BLASTP en el que se utilizó la secuencia aminoacídica del gen BN5\_0450 reveló la existencia de una proteína homóloga en la estirpe CECT 5344, el producto del gen BN5\_3291. Estas proteínas presentaron un 91 % de cobertura y un 31 % de identidad a nivel de secuencia aminoacídica.





**Figura 17. Caracterización del mutante DctM<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en presencia de metales, cianuro o residuo de la joyería.** Se utilizó medio mínimo M9 con amonio 2 mM (A), amonio 2 mM + metales (Cu<sup>2+</sup>, 0,57 mM; Fe<sup>3+</sup>, 0,07 mM y Zn<sup>2+</sup>, 0,3 mM) (B), cianuro sódico 2 mM (C) y residuo cianurado 2 mM (D). Se representa el incremento de absorbancia a 600 nm ( $\Delta A_{600}$ ) de la estirpe silvestre (barras azules) y de la estirpe mutante DctM<sup>-</sup> (barras naranjas), así como el consumo de la fuente de nitrógeno por la estirpe silvestre (línea azul) o el mutante (línea naranja). Los datos representados corresponden a una media de tres experimentos independientes.

## Discusión

Hasta la fecha se conocen diferentes bacterias capaces de asimilar cianuro, entre las que se encuentra *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, un microorganismo en el que se ha estudiado este proceso a través de diferentes técnicas ómicas. Sin embargo, la regulación del proceso de biodegradación de cianuro no ha sido abordada hasta el momento. En este trabajo se han identificado sRNA producidos en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en respuesta al residuo cianurado generado por la industria joyera, y que podrían participar en la regulación de la biodegradación de cianuro. Mediante RNA-Seq se identificaron inicialmente 20 posibles sRNA expresados diferencialmente en presencia del residuo joyero (Tabla 10). De estos sRNA, 15 fueron también identificados en células cultivadas con cianuro sódico, por lo que los 5 sRNA restantes (sRNA150, sRNA184, RNA511, sRNA559 y sRNA679) podrían tener un papel regulador en la resistencia a los metales presentes en el residuo joyero. De los 20 sRNA identificados por RNA-Seq en respuesta al residuo cianurado, 16 fueron validados mediante RT-PCR utilizando mRNA extraído de células cultivadas con el residuo cianurado (Fig. 13). Esta validación supone un 80 % de los sRNA identificados inicialmente, un porcentaje superior al descrito en otros trabajos (Payá *et al.*, 2018). Según la predicción realizada sobre estos sRNA, muchos de ellos tienen el potencial de formar complejas conformaciones, similares a las que se asocian comúnmente con muchos otros RNA, incluyendo los sRNA (Papenfort *et al.*, 2015; Payá *et al.*, 2018). Los sRNA antisentido, que se transcriben a partir de la cadena de DNA opuesta a los genes que regulan y que muestran complementariedad con su RNA diana, a menudo están localizados en las regiones no traducidas (UTR) del gen correspondiente. La formación de dúplex de RNA puede afectar a la unión del ribosoma, la traducción, la terminación o la estabilidad del mRNA por la reorganización de las horquillas formadas en el RNA diana (Oliva *et al.*, 2015). Los sRNA identificados y validados en este trabajo, y que podrían desempeñar un papel regulador en la destoxicación de los residuos de la joyería, se sometieron a un análisis filogenético, encontrándose que la mayoría de los sRNA de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 presentaron homólogos en  $\gamma$ -proteobacterias, específicamente del género *Pseudomonas* (Fig. 14). Por el contrario, sRNA679 no presentó ningún homólogo en otras bacterias, por lo que podría ser considerado un sRNA exclusivo de la estirpe cianotrofa CECT 5344. De todos los sRNA identificados con una potencial función reguladora en la destoxicación del residuo cianurado de la joyería, los sRNA222 y sRNA649 mostraron el mayor número de dianas, incluyendo 15 genes ubicados en 8 agrupaciones génicas (Fig. 15 y Tabla 10). La sobreexpresión de las correspondientes proteínas en respuesta al residuo de la joyería sugiere que estas dianas estarían reguladas positivamente por los sRNA de la estirpe CECT 5344. Según la predicción de dianas realizada en este trabajo, sRNA679 tendría 14 posibles genes diana, los cuales no han sido identificados en

estudios transcriptómicos y proteómicos previos realizados en esta estirpe (Tabla S1). Aunque se desconoce el mecanismo de acción de los sRNA identificados en este trabajo, incluido sRNA679, hay que tener en cuenta que la mayoría de los sRNA bacterianos llevan a cabo una regulación a nivel postraducciona (Dutta y Srivastava, 2018). Los 5 sRNA que presentaron expresión diferencial sólo en el residuo cianurado (sRNA150, sRNA184, sRNA511, sRNA559 y sRNA679) fueron exclusivos de la cepa CECT 5344 o presentaron una distribución mínima entre otras bacterias, lo que pone de manifiesto la relevancia que estos podrían tener sobre el control de la destoxicación de otros compuestos tóxicos, como metales, presentes en el residuo joyero. Además, la baja distribución entre bacterias de los sRNA222 y sRNA649, y su elevado número de dianas relacionadas con la destoxicación del cianuro, sugieren que estos sRNA podrían desempeñar un papel regulador en los diferentes procesos implicados en el metabolismo del cianuro (Fig. 15). El sRNA649 mostró el mayor número de dianas entre los genes localizados en las agrupaciones génicas de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 responsables de la asimilación y resistencia a cianuro (Fig. 15). Además, entre las dianas del sRNA222 se identificó el gen BN5\_0415, localizado aguas arriba del gen BN5\_0414, que codifica una polimerasa de polihidroxialcanoatos de longitud media, el gen BN5\_2309 de una aminotransferasa, ubicado aguas abajo del gen de la glutamina sintetasa, el gen BN5\_0294 que codifica una formiato deshidrogenasa, y el gen *nitB* (BN5\_1631) de la agrupación génica *nit1C*. Si bien aún no se ha dilucidado la función de NitB, estudios previos han determinado que esta proteína es esencial para la asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Estepa *et al.*, 2012). En trabajos previos también se ha demostrado la capacidad de la estirpe CECT 5344 de acumular polihidroxialcanoatos durante la degradación del cianuro presente en el residuo de la joyería, añadiendo así valor al proceso de biodegradación mediante la producción simultánea de estos bioplásticos (Manso *et al.*, 2015). La inducción de la glutamina sintetasa y otras enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno, como la ureasa, podría estar relacionada con la respuesta a hambre de nitrógeno que produce el cianuro, considerando su toxicidad y la baja concentración utilizada (2 mM). También es importante resaltar que para el sRNA14 se identificaron posibles dianas en la agrupación génica *nit1C*, incluyendo el gen BN5\_1632 de la nitrilasa NitC y el gen BN5\_1637, que codifica la oxidorreductasa NitH dependiente de FAD, el gen BN5\_1993 de la arseniato reductasa, y el gen BN5\_2309 que codifica la glutamina sintetasa. Aunque no se ha detectado arseniato en el residuo joyero, se ha descrito previamente la inducción de una arseniato reductasa por el residuo cianurado. Otra posible diana del sRNA649 es el gen BN5\_0450, que codifica un transportador de citrato. Un mutante DctM<sup>-</sup> deficiente en este gen se ha realizado en este trabajo (Fig. 16). El citrato es un compuesto con capacidad de quelar metales, por lo que para estudiar esta posible relación entre el citrato y los metales, el mutante DctM<sup>-</sup> se cultivó en medio mínimo con amonio como única fuente de nitrógeno en presencia

de los metales  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , residuo joyero y amonio como control. Este mutante mostró un fenotipo parcial en presencia del residuo y de metales específicos (Fig. 17). Estos resultados sugieren que podría existir otro transportador de citrato adicional, como el codificado por el gen BN5\_3291, que podría suplir el efecto de esta mutación a largo plazo. Además, el citrato se ha adicionado a un cultivo en reactor, en un trabajo previo realizado en la cepa CECT 5344 en presencia del residuo cianurado y se ha demostrado que la adición de citrato aumenta la tolerancia de esta estirpe al residuo cianurado de la joyería, aumentándola desde 2 mM hasta 20 mM de cianuro (Ibáñez *et al.*, 2017; Ibáñez, 2018).

Por otro lado, una formamidasasa (BN5\_3204/W6QY63) fue descrita como posible diana del sRNA655. Esta enzima produce ácido fórmico, que podría ser convertido en  $\text{CO}_2$  por la acción de una formiato deshidrogenasa. Estas dos enzimas han sido descritas como enzimas clave en varias vías hidrolíticas bacterianas para la degradación de cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2018). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la asimilación/detoxificación de cianuro en la estirpe CECT 5344 podría ocurrir no sólo a través de la nitrilasa NitC, sino también a través de un mecanismo complementario basado en la acción conjunta de las enzimas formamidasasa/formiato deshidrogenasa. El gen que codifica la formiato deshidrogenasa también es diana del sRNA222 y el sRNA312, por lo que este hipotético mecanismo complementario de degradación de cianuro podría constituir una ruta altamente regulada. Teniendo en cuenta que la formamida es un producto de la reacción catalizada por la enzima cianuro hidratasa y que varios genes anotados como nitrilasas/cianuro hidratasas (BN5\_0736, BN5\_3251 y BN5\_4427) se indujeron por el residuo de la joyería en la estirpe CECT 5344, este compuesto podría ser un intermedio generado en respuesta a cianuro.

Según los datos obtenidos, la proteína transmembrana TrbD de transferencia por conjugación (BN5\_3532/W6RJU5), que se encuentra reprimida en células cultivadas con el residuo joyero, estaría regulada por el sRNA150. La conjugación es un método de adquisición de DNA exógeno ampliamente distribuido entre bacterias y que está regulado por sRNA. En *Salmonella*, el ensamblaje de la maquinaria de conjugación está controlado de forma precisa por sRNA en condiciones de estrés (Papenfort *et al.*, 2015). Las condiciones cianotróficas en las que se lleva a cabo la destoxificación de cianuro, también constituyen condiciones de estrés que podrían desencadenar una regulación de dicho proceso a través del sRNA150 en la estirpe CECT 5344.

El sRNA184 inducido por el residuo cianurado tiene entre sus dianas una sulfito/nitrito reductasa dependiente de NADPH (W6RF17), la cual está codificada por el gen BN5\_1900 perteneciente a la agrupación génica *cioAB-nit4* responsable de la resistencia al cianuro (Quesada *et al.*, 2007). Aunque se desconoce si la sulfito/nitrito reductasa está implicada en

la resistencia/asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, el residuo de la joyería contiene una pequeña concentración de nitrito (8  $\mu\text{M}$ ), por lo que podría existir una reacción cruzada entre las nitrito y sulfito reductasas, sobre todo teniendo en cuenta que ambas enzimas comparten mecanismos de catálisis similares.

Otra proteína identificada como posible diana de los sRNA diferencialmente expresados en respuesta al residuo de la joyería es el regulador Fur (BN5\_0907/W6QZB3), implicado en la captación de hierro. Fur es un factor de transcripción global que regula la homeostasis de hierro, un proceso que es esencial para el mantenimiento de la reserva de hierro durante la asimilación de cianuro en la estirpe CECT 5344 (Becerra *et al.*, 2011). El gen *fur* se ha identificado como diana de los sRNA649 y sRNA258. La absorción de hierro en bacterias suele estar mediada por moléculas de bajo peso molecular llamadas sideróforos que se secretan en condiciones limitantes de hierro (Becerra *et al.*, 2011). Otras posibles dianas del sRNA649, también identificadas en este estudio, son una proteína involucrada en la biosíntesis de sideróforos codificada por el gen BN5\_1295, y la proteína reguladora GntR (Tabla S1). En un estudio previo, un mutante de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 deficiente en un regulador GntR, codificado por el gen BN5\_1894, mostró un crecimiento en medios con cianuro inferior a la estirpe silvestre (Ibáñez *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que la familia de proteínas reguladoras GntR podrían participar en la estirpe CEC5344 en la regulación de la detoxificación del cianuro presente en residuos de la joyería. Otras posibles dianas del sRNA649 son el componente CioB de la oxidasa alternativa insensible a cianuro (BN5\_1903/W6QVH5) y la proteína MetF, una metileno tetrahidrofolato reductasa (BN5\_1909/W6QWY1). Si bien hasta la fecha no se ha demostrado la participación de la metionina en la degradación del cianuro, la proteína MetN responsable de la importación de metionina también se ha identificado como diana del sRNA184.





# Capítulo II

Asimilación de 3-cianoalanina por  
*Pseudomonas pseudoalcaligenes*  
CECT 5344



Los nitrilos son cianuros orgánicos sintetizados por la industria química para su aplicación en diversos procesos industriales (Pollak *et al.*, 2002; Martíková *et al.*, 2009), aunque también son sintetizados por los seres vivos. La 3-cianoalanina (CNA) y las cianhidrinas son nitrilos producidos como intermediarios en algunas rutas de degradación de cianuro en plantas y bacterias, pero la CNA también puede estar involucrada en otros procesos, como la tolerancia al estrés, el metabolismo del nitrógeno y el azufre, y la señalización celular (Machingura *et al.*, 2016). La CNA es producida por la 3-cianoalanina sintasa (CAS) a partir de cianuro y cisteína o serina. La CAS es una enzima dependiente de piridoxal fosfato que forma parte de la familia de sintasas de alanina  $\beta$ -sustituida, en la cual también se encuentra la cisteína sintasa (Hatzfeld *et al.*, 2000). El mecanismo enzimático que comparten estas enzimas es similar, presentando en ocasiones una misma enzima ambas actividades. Sin embargo, las CAS presentan una mayor eficiencia en la producción de CNA que de cisteína. Las CAS se encuentran principalmente en plantas cianogénicas, donde representan el principal mecanismo de detoxificación del cianuro producido durante la síntesis de etileno, aunque también se han descrito en algunas bacterias. La CNA es utilizada como sustrato por nitrilasas de tipo NIT4, formando amonio y aspartato (Yanase *et al.*, 1982; Omura, 2003). En algunos organismos, esta enzima también presenta una actividad nitrilo hidratasa que genera asparagina. En la bacteria alcalófila *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 no se ha detectado la actividad CAS, aunque puede crecer con CNA como única fuente de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2005a). La estirpe CECT 5344 presenta una nitrilasa Nit4 codificada en una agrupación génica que contiene genes de resistencia a cianuro (*cioAB-nit4*). Como se ha mencionado en el capítulo I, esta agrupación génica se encontró altamente regulada por los sRNA, ya que tres componentes de este sistema (una subunidad de sulfito/nitrito reductasa dependiente de NADPH codificada por BN5\_1900, la oxidasa alternativa *CioB* codificada por BN5\_1903, y una metilentetrahidrofolato reductasa codificada por BN5\_1909, fueron identificados como posibles dianas de sRNA184 y sRNA649.

La estirpe cianotrofa *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 produce un nitrilo durante la asimilación de cianuro, la cianhidrina del oxalacetato, que es posteriormente hidrolizada a amonio y al correspondiente ácido carboxílico por acción de la nitrilasa NitC (BN5\_1632) (Luque-Almagro *et al.*, 2011b; Estepa *et al.*, 2012). Esta estirpe contiene, además de NitC y Nit4, dos nitrilasas adicionales, Nit1 y Nit2, codificadas por los genes BN5\_1925 y BN5\_4427, respectivamente. En este trabajo se ha realizado un análisis proteómico cuantitativo y un estudio mutacional para determinar el papel de las nitrilasas de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en el metabolismo de la CNA, e identificar otras proteínas que podrían estar implicadas en la respuesta de este microorganismo a la CNA. Parte de estos resultados se han publicado en el artículo Pérez *et al.*, 2021.

---

## Búsqueda de una posible CNA sintasa en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344

---

En algunos microorganismos se ha descrito una actividad CAS que forma CNA a partir de cianuro y cisteína o serina. En un trabajo previo se realizaron ensayos enzimáticos en células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivadas con cianuro para identificar una posible actividad CNA-sintasa, aunque todos los intentos fueron infructuosos (Luque-Almagro *et al.*, 2005b). En este trabajo se ha llevado a cabo la búsqueda de una posible enzima CAS utilizando la secuencia de aminoácidos de la CAS descrita previamente en *P. putida* (Kumano *et al.*, 2016). Un análisis mediante el programa BLASTP reveló la existencia de cuatro homólogos a esta CAS en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, CysM1 (38 % de identidad), CysM3 (40 %), CysK1 (84 %) y CysK3 (89 %), codificados por los genes BN5\_1558, BN5\_1910, BN5\_1627 y BN5\_1628, respectivamente. Curiosamente, las proteínas CysK1 y CysK3, codificadas por dos genes adyacentes, solo mostraron en el alineamiento una cobertura de secuencia del 50 % y el 42 %, respectivamente, debido a que la longitud de CysK1 (162 aa) y CysK3 (152 aa) fue aproximadamente la mitad de la longitud de la CAS de *P. putida*. El alineamiento de CysK1 se correspondió con el extremo N-terminal de la CAS, mientras que CysK3 alineó con el extremo C-terminal. Un resultado similar, pero con una menor identidad, se obtuvo cuando se utilizó la secuencia de aminoácidos de la CAS de *Geobacillus stearothermophilus* (Omura, 2003) en el análisis comparativo con la cepa CECT 5344.

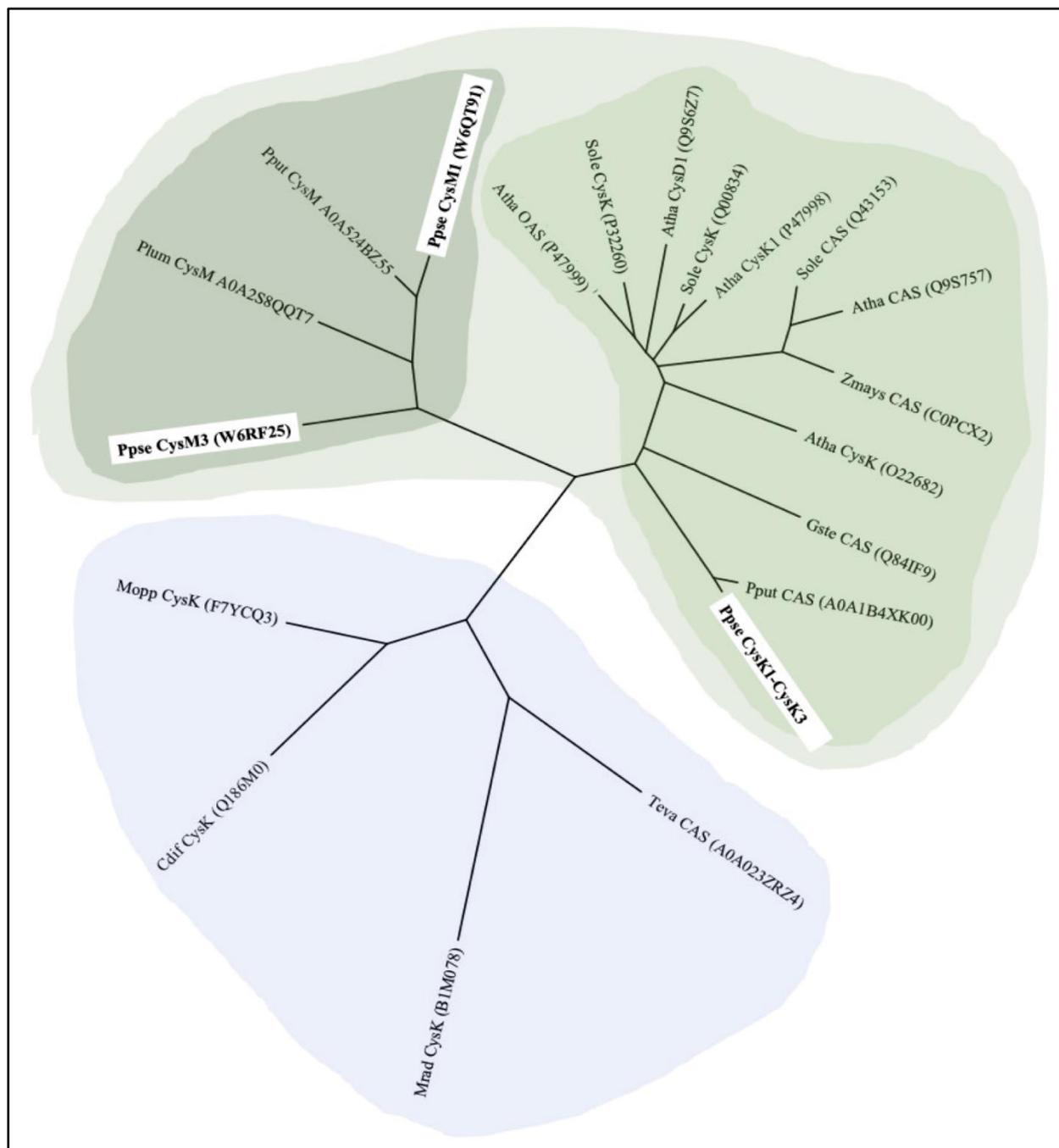
Cuando se compararon las secuencias de nucleótidos mediante BLASTN, el gen *casA* de *P. putida* que codifica la CAS mostró una cobertura completa con una similitud del 100 % y una identidad del 82,6 % con la secuencia unida de los genes BN5\_1627 y BN5\_1628 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Cuando el gen de la CAS de *G. stearothermophilus* se alineó con la secuencia del genoma de la cepa CECT 5344, se obtuvo una identidad menor (71 %). Estos alineamientos de secuencias de nucleótidos revelaron que el codón de parada TGA del gen BN5\_1627 de *P. pseudoalcaligenes* se correspondió con el codón TGG que codifica triptófano en *P. putida*, o GTG, que codifica valina, en *G. stearothermophilus* (Fig. 18). Los genes BN5\_1627 (*cysK1*) y BN5\_1628 (*cysK3*) se encontraron en el mismo marco de lectura, separados por una región intergénica de 24 pb que también mostró una alta identidad con la secuencia interna correspondiente al gen *casA* de *P. putida* (Fig. 18). La secuencia aminoacídica de la proteína fusionada *in-silico* CysK1-CysK3 mostró una alta identidad (~93 %) con la longitud total (~324 residuos) de las enzimas CAS bacterianas estudiadas. Al igual que en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, en *Klebsiella michiganensis* y *Brucella abortus* se encontraron dos genes adyacentes que codifican los extremos N- y C-terminal de posibles

CAS, lo que indica que este evento de división de genes también podría haber ocurrido en otras bacterias.

		<i>cysK1</i>	→			<i>cysK3</i>	→	
Ppse	475	GGCCCGAAATCT	<b>TGA</b>	CGTGACACCGAAGGCGCCATCGACGTGCTGGTCTCCGGCGTCGGC				534
		G P E I .				M L V S G V G		
Pput	478	GGCCCGAAATCTGGAACGACACCGATGGCGCAGTCGACGTGTTGGTGGCTGGTGTCCGGA						537
		G P E I W N D T D G A V D V L V A G V G						
Gste	475	GGGAAAGAGATCGTGGAGCAAATGGGGGACCAACTCGACGCCTTCGTTGCCGGCGTTGGC						534
		G K E I V E Q M G D Q L D A F V A G V G						
		**      ** ***		* * * * *		*****	* ** * ** ** **	

**Figura 18. Alineamiento de secuencias de la región intergénica *cysK1-cysK3* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 con la región intermedia de las CNA sintasas de *P. putida* y *G. stearothermophilus*. Los nucleótidos conservados se indican con asteriscos.**

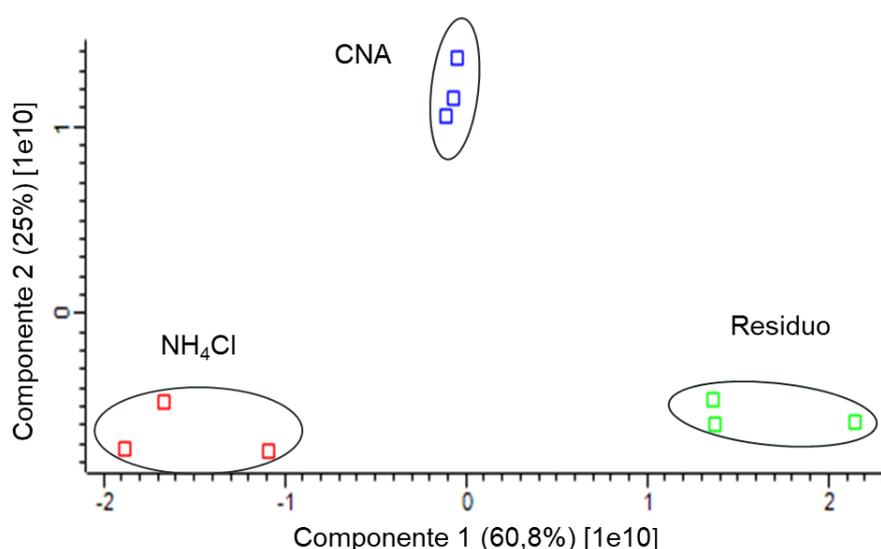
Por otro lado, se realizó un análisis filogenético de las proteínas de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 homólogas a la CAS, incluida la proteína fusionada *in-silico* CysK1-CysK3 (Fig. 19). Las secuencias analizadas se agruparon en dos clados principales, uno donde se localizaron varias CAS CysK (EC 2.8.5.1) de bacterias y una CAS de origen bacteriano descrita en ácaros, y otro dividido en dos subgrupos. Uno de estos subgrupos estaba formado por varias cisteínas sintasas bacterianas de tipo CysM (EC 2.5.1.113 y 2.5.1.144), incluyendo CysM1 y CysM3 de la estirpe CECT 5344, mientras que en el segundo subgrupo se agruparon las CAS de *P. putida* y *G. stearothermophilus*, así como CNA sintasas de plantas. En este subgrupo también localizó la proteína fusionada CysK1-CysK3 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Fig. 19).



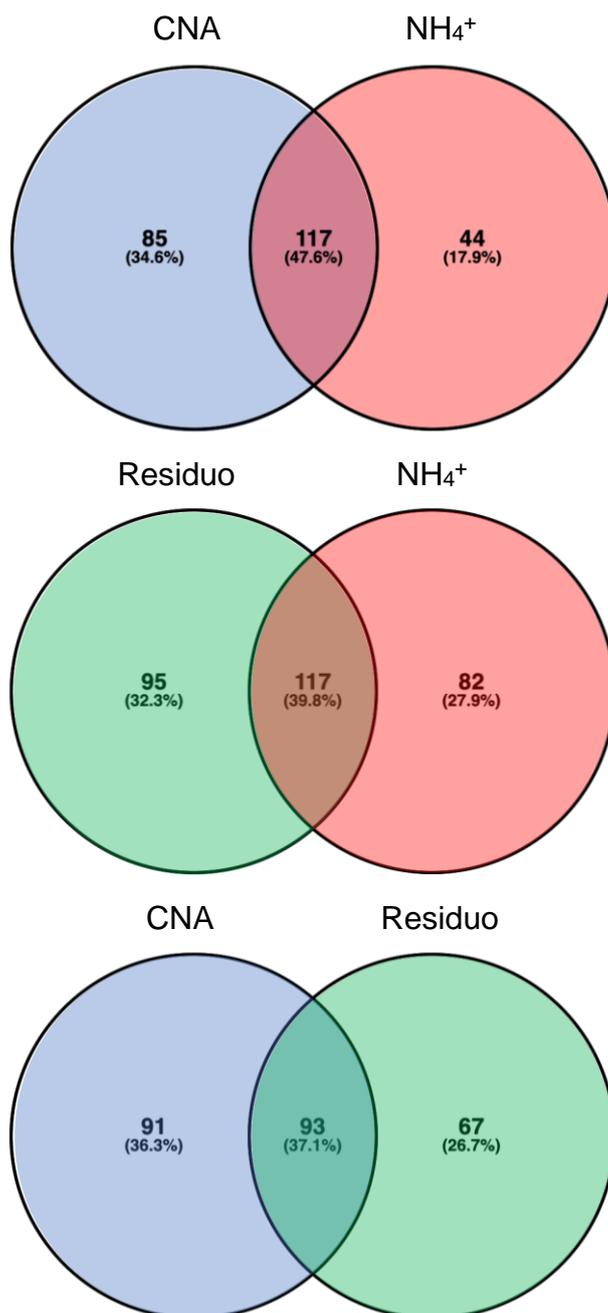
**Figura 19. Análisis filogenético de CNA sintetasas y homólogos identificados en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.** Los números de acceso de las proteínas corresponden a la base de datos UniProt. Ppse, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344; Pput, *Pseudomonas putida*; Gste, *Geobacillus stearothermophilus*; Plum, *Photorhabdus luminescens*; Mopp, *Mesorhizobium opportunistum*; Mrad, *Methylobacterium radiotolerans*; Cdif, *Clostridioides difficile*; Teva, *Tetranychu sevansi*; Sole, *Spinacia oleracea*; Atha, *Arabidopsis thaliana*; Zmays, *Zea mays*.

## Análisis proteómico diferencial de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en respuesta a CNA

La identificación de las proteínas implicadas en el metabolismo de CNA en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas en tándem (LC-MS/MS). Para este análisis proteómico cuantitativo se utilizaron células cultivadas con amonio, CNA o residuo joyero cianurado como única fuente de nitrógeno, empleando tres réplicas biológicas para cada condición. Según el análisis de componentes principales, las réplicas de cada condición se presentaron agrupadas, mientras que las distintas condiciones se encontraron claramente diferenciadas (Fig. 20). En el estudio comparativo entre los proteomas obtenidos de células cultivadas con CNA o amonio, se identificaron 150 proteínas inducidas por el nitrilo, de las que 85 fueron identificadas exclusivamente en CNA y 65 proteínas se encontraron sobreexpresadas en CNA. Además, un total de 96 proteínas se regularon negativamente por CNA, de las que 52 proteínas se encontraron reprimidas y 44 proteínas fueron exclusivas de la condición de amonio (Fig. 21, Tabla S2). El análisis proteómico diferencial entre el residuo cianurado y amonio reveló que 154 proteínas fueron reguladas positivamente por el residuo cianurado (95 proteínas exclusivas y 59 sobreexpresadas en el residuo), mientras que 140 proteínas se regularon de forma negativa por el residuo (82 proteínas exclusivas y 58 sobreexpresadas en amonio) (Fig. 21, Tabla S2). Finalmente, en el análisis comparativo entre CNA y el residuo cianurado se detectaron 141 proteínas reguladas positivamente por CNA (91 proteínas exclusivas y 50 proteínas sobreexpresadas en CNA), mientras que 110 se regularon de forma negativa (67 proteínas exclusivas y 43 proteínas sobrerrepresentadas en el residuo) (Fig. 21, Tabla S2).

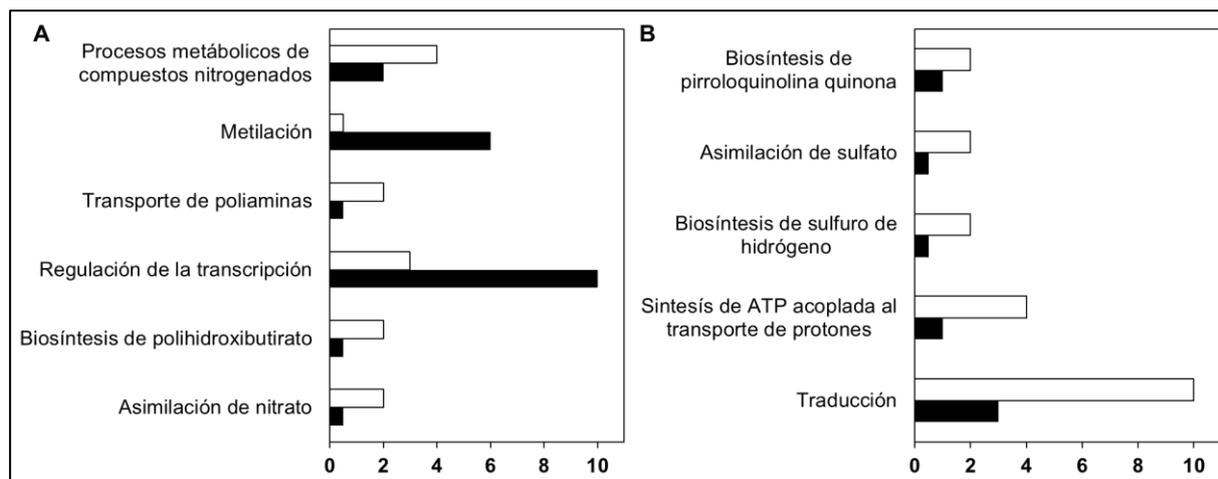


**Figura 20.** Análisis de componentes principales (PCA) de los datos proteómicos de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Se utilizaron tres réplicas biológicas para cada condición.



**Figura 21. Diagramas de Venn de las proteínas de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 procedentes del análisis proteómico a partir de células cultivadas con amonio, CNA o residuo cianurado. Se muestra el análisis comparativo entre las distintas condiciones estudiadas.**

Las proteínas reguladas positiva o negativamente por CNA, considerando la condición de amonio como control, se asignaron a ontologías génicas utilizando la base de datos "Gene Ontology" (GO) (Fruzangohar *et al.*, 2013). En la categoría "procesos biológicos", los términos GO sobrerrepresentados significativamente entre las proteínas sobreexpresadas por CNA correspondieron a "asimilación de nitrato", "proceso biosintético de polihidroxitirato", "transporte de poliaminas" y "procesos metabólicos de compuestos nitrogenados". En el caso de las proteínas reprimidas por CNA, el único término GO sobrerrepresentado fue "traducción" (Fig. 22).



**Figura 22. Análisis de enriquecimiento de ontologías génicas correspondientes a las proteínas de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 expresadas diferencialmente en respuesta a CNA.** Solo se muestran los términos GO afectados significativamente (valor  $p < 0,05$ ) correspondientes a las proteínas sobreexpresadas (A) o reprimidas por CNA (B). Las barras negras representan el número de proteínas esperado para los términos GO de acuerdo con el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, mientras que las barras en blanco muestran el número de proteínas en los términos GO según los resultados proteómicos. Como condición control se utilizó amonio.

En el análisis proteómico diferencial de CNA *versus* amonio no se encontró ninguna de las proteínas codificadas por la agrupación génica *cioAB-nit4*, esencial para la resistencia a cianuro (Quesada *et al.*, 2007; Luque-Almagro *et al.*, 2013), excepto la histidinol-fosfato aminotransferasa HisC. Por el contrario, la nitrilasa NitC y otras proteínas codificadas por la agrupación génica *nit1C*, necesaria para la asimilación de cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2011b; Estepa *et al.*, 2012), se encontraron inducidas por CNA (Tabla 12). Al igual que en estudios previos, la mayoría de las proteínas codificadas por las agrupaciones génicas *cioAB-nit4* y *nit1C* se indujeron por el residuo cianurado cuando se utilizó amonio como control (Tabla 12), lo que validó el análisis proteómico realizado (Ibáñez *et al.*, 2017). De las cuatro nitrilasas que posee *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2013), NitC, Nit1 y Nit2 se sobreexpresaron por la CNA, mientras que Nit4 no se afectó. En el caso del residuo cianurado, este indujo las nitrilasas NitC, Nit1 y Nit4 respecto a amonio (Tabla 12). La cianasa CynS, necesaria para la asimilación del cianato (Luque-Almagro *et al.*, 2008; Sáez *et al.*, 2019), se encontró sobrerrepresentada en el proteoma de células cultivadas con el residuo cianurado, pero no se indujo por CNA (Tabla 12).

**Tabla 12. Proteínas relevantes inducidas por CNA y/o el residuo joyero cianurado en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.**

Protein accesión number (1)	Locus (2)	Proteína	FC (3)		
			CNA vs NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Residuo vs NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CNA vs Residuo
<b>Proteínas codificadas por la agrupación génica <i>cioAB-nit4</i></b>					
W6RF17	BN5_1900	Subunidad β de la sulfito reductasa (Cysl3)		R	
W6QU90	BN5_1901	Proteína no caracterizada (CioC)		R	R
W6R254	BN5_1902	Subunidad I de la oxidasa terminal (CioA)		R	R
W6QWX6	BN5_1904	Fosfoserina aminotransferasa (SerC)		R	R
W6RF21	BN5_1905	Histidinol-fosfato aminotransferasa (HisC)	CNA	R	-243,78
W6QU95	BN5_1906	Acetilornitina aminotransferasa (ArgD)		R	R
W6R260	BN5_1907	4-hidroxi-tetrahidropicolinato sintasa (DapA)		155,94	-139,07
W6QWY1	BN5_1909	Metilentetrahidrofolato reductasa (MetF)		R	R
W6RF25	BN5_1910	Cisteína sintasa (CysM3)		R	R
W6QUA1	BN5_1911	Enzima málica dependiente de NADP (MaeB)			-322,78
W6R265	BN5_1912	Nitrilasa (Nit4)		147,93	-53,39
<b>Proteínas codificadas por la agrupación génica <i>nit1C</i></b>					
H9N5E0	BN5_1630	Regulador transcripcional dependiente de σ (54) (NitA)	CNA		CNA
H9N5E2	BN5_1631	Proteína no caracterizada (NitB)			-24,63
H9N5E1	BN5_1632	Nitrilasa (NitC)	CNA	R	-70,60
H9N5E3	BN5_1633	Miembro superfamilia S-adenosylmethionine (NitD)		R	R
H9N5E4	BN5_1634	Acetiltransferasa (NitE)		R	R
H9N5E5	BN5_1635	Polipéptido trifuncional de la familia AIRS/GARS (NitF)	CNA	R	-70,09
H9N5D8	BN5_1637	Oxidorreductasa dependiente de NADH (NitH)	CNA	R	-11,91
<b>Proteínas codificadas por la agrupación génica <i>cyn</i></b>					
W6QRB2	BN5_0438	Regulador transcripcional de la familia Fis (CynF)	CNA		CNA
W6QST4	BN5_0439	Prot. periplásmica transportadora tipo ABC (CynA)	CNA	R	-190,04
W6RB18	BN5_0440	Subunidad del transportador ABC (CynB)		R	R
W6QQ36	BN5_0441	Transportador ABC/prot. componente ATPasa (CynD)		R	R
W6QY14	BN5_0442	Cianasa (CynS)		R	R
<b>Otras nitrilasas</b>					
W6RF39	BN5_1925	Nitrilasa alifática (Nit1)	CNA	R	
W6R989	BN5_4427	Nitrilasa/nitrilo hidratasa (Nit2)	5,30		5,63
<b>Otras proteínas relevantes</b>					
W6QXC5	BN5_0151	Flavina monoamino oxidasa	18,90	5,94	3,18
W6RAL1	BN5_0265	Proteína periplásmica transportadora de putrescina	2,18		
W6QPL1	BN5_0266	Proteína de unión en el transporte de putrescina	2,21		
W6QXK5	BN5_0267	ATPasa transportadora de poliaminas	2,38		2,56
W6QSH6	BN5_0329	Glutamato sintasa	CNA		CNA
W6QXQ0	BN5_0332	N-carbamoil-L-aminoácido amidohidrolasa	CNA	R	2,48
W6QSM0	BN5_0374	Transportador de gly-betaína de tipo ABC	2,02	2,28	
W6QXX9	BN5_0412	Polihidroxicanoato sintasa, clase II PhaC2	CNA		CNA
W6QSQ8	BN5_0414	Poli(3-hidroxicanoato) polimerasa PhaC1	4,04		3,73
W6QRB2	BN5_0438	Regulador transcripcional de la familia Fis	CNA		CNA
W6QQC6	BN5_0543	Proteína que contiene el dominio transglutaminasa	13,10	8,11	
W6RBC9	BN5_0552	Proteína accesoria de ureasa UreG	CNA	R	
W6QQF7	BN5_0578	Subunidad alfa de la ureasa	CNA	R	
W6QQH3	BN5_0593	Transporte de AA de cadena ramificada tipo ABC	15,71	8,70	
W6QQW2	BN5_0701	Regulador transcripcional de la familia MerR		R	R
W6QYV6	BN5_0702	ATPasa tipo P translocadora de metales pesados		453,86	-130,94
W6QTN1	BN5_0704	Proteína de transporte de metales pesados		R	R
W6RBV5	BN5_0715	Transportador ABC de oligopéptidos, ATPasa	CNA		CNA
W6QZ51	BN5_0842	Beta-alanina-piruvato transaminasa		2,01	
W6QUE9	BN5_1006	Prot. de unión al transportador ABC de aminoácidos	6,92	4,24	
W6QZK3	BN5_1009	Componente de unión a ATP de un transportador	CNA		CNA
W6QUU3	BN5_2114	Componente periplásmico del transportador de nitrato	CNA	R	-12,13

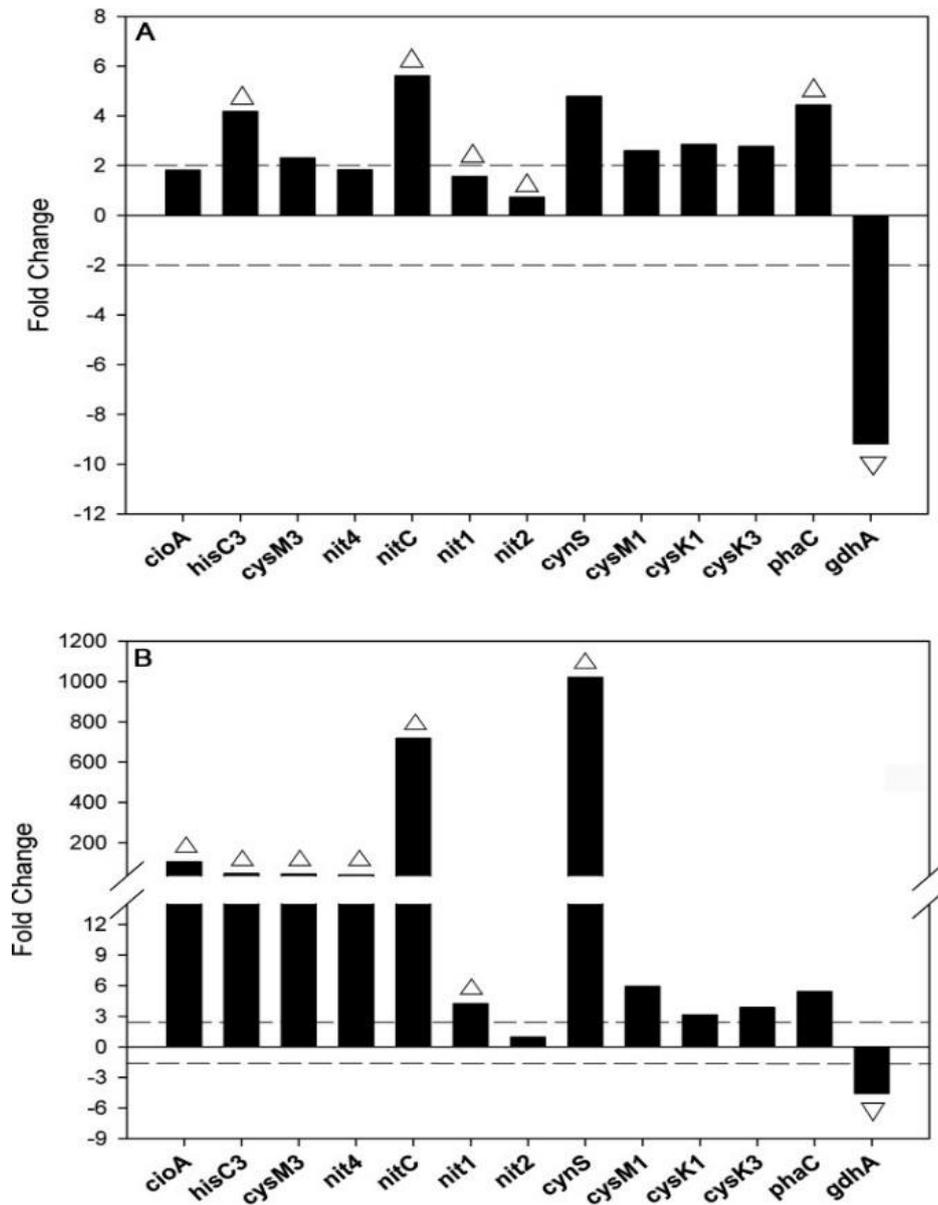
W6RFM9	BN5_2123	Nitrito reductasa	CNA	R	-32,97
W6R2U2	BN5_2125	Nitrato reductasa	CNA	R	-24,11
W6QVA5	BN5_2229	Aminotransferasa	12,42		6,18
W6QVA8	BN5_2234	Amidotransferasa	CNA		CNA
W6QVB9	BN5_2244	Transglutaminasa	CNA	R	2,03
W6QWV0	BN5_2413	Regulador transcripcional de la familia GntR	CNA	R	
W6QYJ4	BN5_2987	Prot. de unión en el transporte de aminoácidos	2,31		
W6QYM4	BN5_3018	Serina hidroximetiltransferasa	CNA		
W6QY54	BN5_3194	Prot. unión a ATP importe espermidina/putrescina	2,98		2,34
W6R622	BN5_3235	Proteína de unión a oligopéptidos periplásmicos	CNA	R	
W6QZC3	BN5_3236	Acetamidasa/formamidasa (EC 3,5,1,4)	CNA	R	
W6QZR6	BN5_3762	ATPasa transportadora de poliaminas (EC 3,6,3,31)	CNA		CNA
W6R077	BN5_3958	Glutamina sintetasa	8,86	5,36	
W6RKV8	BN5_3962	Proteína reguladora de nitrógeno NR(I)	7,13	5,51	
W6R822	BN5_4009	ATPasa transportadora de poliaminas (EC 3,6,3,31)	CNA	R	2,54
W6R1F1	BN5_4010	Prot. periplásmica de unión a espermidina/putrescina	29,27	11,32	2,59

(1) Identificación de proteínas con la base de datos Uniprot con número de acceso HG916826 (Wibberg *et al.*, 2014). (2) Identificación de los genes en Genebank con número de acceso LK391695 (Wibberg *et al.*, 2016). (3) FC "Fold-Change" o tasa de cambio. \*\*Las proteínas marcadas con "CNA" o "R" indican que se identificaron exclusivamente en células cultivadas con CNA o el residuo de joyería, respectivamente.

Las proteínas de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 homólogas a la CAS de *P. putida* no aumentaron su expresión en CNA, mientras que en células cultivadas con el residuo joyero cianurado se encontró una sobreexpresión de la cisteína sintasa CysM3 (Tabla 12). Entre las proteínas sobrerrepresentadas tanto en CNA como en el residuo cianurado, utilizando amonio como referencia, se encontraron una flavina monoamino oxidasa, una acetamidasa/formamidasa y varias proteínas involucradas en el transporte y metabolismo de fuentes de nitrógeno alternativas (nitrato, urea, poliaminas y aminoácidos). Entre estas últimas cabe destacar las nitrato y nitrito reductasas, ureasa, N-carbamoil-1-aminoácido amidohidrolasa, glutamina sintetasa y transglutaminasas, así como la proteína reguladora de nitrógeno NRI y un regulador transcripcional de la familia GntR (Tabla 12). La glutamato deshidrogenasa se encontró regulada negativamente en ambas condiciones (Tabla S2). Las proteínas reguladas positivamente solo por CNA incluyeron transportadores de compuestos nitrogenados (poliaminas y oligopéptidos), enzimas del metabolismo del nitrógeno (glutamato sintasa, aminotransferasa y amidotransferasa) y polihidroxialcanoato sintasas de tipo II (PhaC1 y PhaC2) (Tabla 12). Entre las proteínas reguladas negativamente solo por CNA se identificaron varias subunidades de la citocromo *c* oxidasa tipo *ccb*<sub>3</sub> y la ATP sintasa (Tabla S2).

El análisis proteómico se validó a nivel transcripcional determinando la expresión génica, mediante qRT-PCR, de 13 genes relevantes en el metabolismo del cianuro, cianato o CNA. Para ello se usó RNA aislado de células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivadas con CNA, residuo joyero o amonio como única fuente de nitrógeno, y se utilizó el amonio como condición control. Según los resultados obtenidos, el gen *nitC* se indujo significativamente tanto por CNA como por el residuo cianurado, mientras que el gen *nit4* únicamente se indujo

en células cultivadas con residuo cianurado (Fig. 23). Los genes *cioA*, *hisC3* y *cysM3*, localizados en la misma agrupación génica que el gen *nit4*, también se indujeron considerablemente por el residuo, mientras que en presencia de CNA solo se indujo el gen *hisC3*. Los genes *nit1* y *nit2*, que codifican las otras dos nitrilasas en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, presentaron un perfil de expresión distinto. En el residuo cianurado, el gen *nit1* se indujo ligeramente, mientras que *nit2* mostró una expresión basal. En células cultivadas con CNA, la expresión de estos dos genes no se vio significativamente afectada. El gen *cynS*, que codifica la cianasa, presentó una inducción considerablemente superior en células cultivadas con residuo cianurado que en CNA. Este resultado se confirmó a nivel de actividad enzimática, ya que células cultivadas con el residuo presentaron una mayor actividad enzimática (628 U/mg) que células cultivadas con CNA (11 U/mg). Los genes *cysM1*, *cysK1* y *cysK3*, que codifican proteínas homólogas a CNA/cisteínas sintasas, mostraron una ligera inducción tanto por el residuo como por la CNA. Finalmente, el gen *phaC*, que codifica una polihidroxicanoato sintasa, se indujo tanto por CNA como por el residuo, mientras que el gen *gdhA* de la glutamato deshidrogenasa se reprimió en ambas fuentes de nitrógeno (Fig. 23).



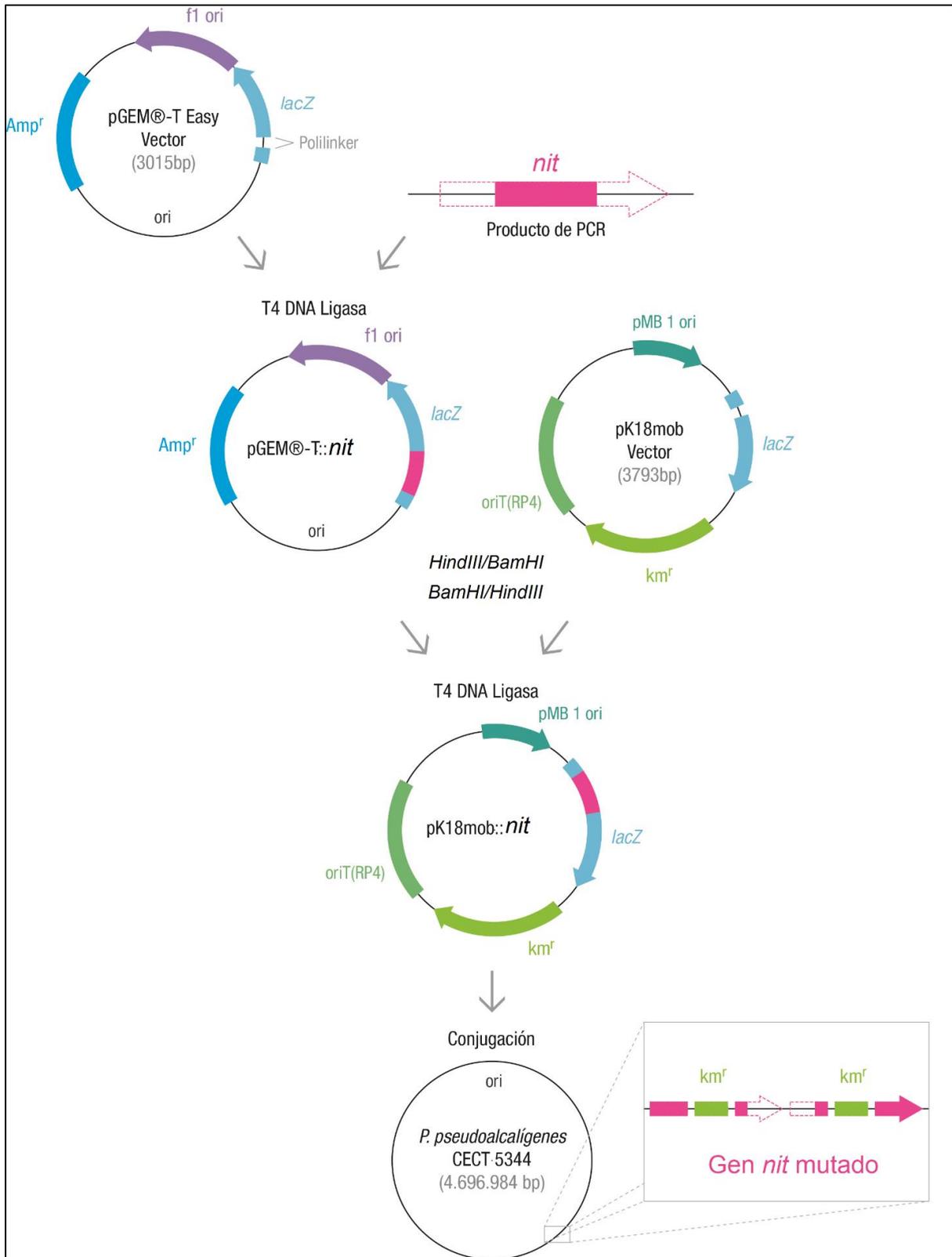
**Figura 23. Análisis transcripcional de genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 que codifican proteínas expresadas diferencialmente en respuesta a CNA (A) o residuo (B).** Las células se cultivaron con amonio, CNA o el residuo cianurado como única fuente de nitrógeno. La expresión relativa de los genes se determinó utilizando el gen de referencia *rpoB*. Los datos se obtuvieron a partir de 3 réplicas independientes y la variación en la expresión ("Fold Change") se determinó usando amonio como condición de referencia. Solo la variación en la expresión  $\geq 2$  o  $\leq -2$  se consideraron significativas. Los triángulos indican que las proteínas correspondientes estaban sobreexpresadas (hacia arriba) o reguladas negativamente (hacia abajo) en el análisis proteómico (Tabla 12).

---

## Caracterización de la asimilación de CNA en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344

---

Para caracterizar la asimilación de CNA en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se construyó una batería de mutantes deficientes en las distintas nitrilasas que posee la estirpe CECT 5344, incluyendo Nit1, Nit2, Nit4, Nit5, Nit6 y Nit7, así como un doble mutante en las nitrilasas NitC y Nit4. Para generar el mutante en la nitrilasa Nit1 se siguió la misma estrategia de mutagénesis empleada para la construcción del mutante DctM<sup>-</sup> (Fig. 16). Los mutantes Nit2, Nit4, Nit5, Nit6 y Nit7 se construyeron mediante delección parcial e inserción del plásmido *pk18mob*, que contiene un casete de Kanamicina, mediante un único evento de recombinación, como se ejemplifica en Fig. 24. En primer lugar, se amplificaron las regiones centrales correspondientes de cada gen, con un tamaño de 415 pb para el gen *nit1*, 512 pb para el gen *nit4*, 496 pb para el gen *nit5*, 410 pb para el gen *nit6* y 448 pb para el gen *nit7*, utilizando las parejas de cebadores específicas para cada gen (Tabla 9). El fragmento resultante de cada gen se clonó en el vector de clonación comercial pGEM-T-Easy, generando así las construcciones pGEM-T-Easy $\Delta nit$ . Esta construcción se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III y el fragmento resultante se clonó finalmente en *pK18mob*, un plásmido suicida en *Pseudomonas* por carecer de origen de replicación en este género y que confiere resistencia a kanamicina (Schäfer *et al.*, 1994). Las construcciones finales, *pK18mob* $\Delta nit$ , se emplearon para generar las distintas mutaciones  $\Delta nit1$ ,  $\Delta nit4$ ,  $\Delta nit5$ ,  $\Delta nit6$  y  $\Delta nit7$  en el genoma de la estirpe silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 mediante recombinación homóloga en un único evento de recombinación. Para ello, se llevó a cabo una conjugación biparental utilizando *E. coli* S17-1, portando la construcción *pK18mob* $\Delta nit$  correspondiente para cada caso, como la cepa donadora, y la estirpe silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, resistente a ácido nalidíxico por una mutación espontánea, como cepa receptora. Los transconjugantes se seleccionaron en medio M9 con ácido nalidíxico y kanamicina (Fig. 24). La interrupción de los genes *nit2*, *nit4*, *nit5*, *nit6* y *nit7* en la estirpe CECT 5344 se confirmó mediante PCR.



**Figura 24. Estrategia de mutagénesis desarrollada para la construcción de los mutantes Nit2<sup>-</sup>, Nit4<sup>-</sup>, Nit5<sup>-</sup>, Nit6<sup>-</sup> y Nit7<sup>-</sup> de la estirpe CECT 5344.** En esta estrategia se utilizó el vector de clonación pGem-T-Easy, el vector suicida en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 pK18mob y los sitios de restricción que se indican para cada paso de clonación.

## Capítulo II-Resultados

La estirpe silvestre y los mutantes Nit1<sup>-</sup>, Nit2<sup>-</sup>, NitC<sup>-</sup>, Nit4<sup>-</sup> y NitC<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> se cultivaron en medio mínimo M9 con acetato como fuente de carbono, y amonio o CNA como únicas fuentes de nitrógeno. Además, los cultivos con CNA se incubaron en ausencia o presencia de cianuro. Cuando se usó amonio como fuente de nitrógeno, todos los mutantes mostraron un crecimiento similar a la estirpe silvestre (Fig. 25A). Con CNA como única fuente de nitrógeno, en ausencia de cianuro, solo los mutantes NitC<sup>-</sup> y NitC<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> mostraron un fenotipo diferente de la estirpe silvestre (Fig. 25B). En la etapa inicial, la tasa de crecimiento fue similar para todas las estirpes, pero después de 50 h de cultivo, el crecimiento de los mutantes NitC<sup>-</sup> y NitC<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> se detuvo, alcanzando un crecimiento máximo significativamente inferior al resto de estirpes (Fig. 25B). A pesar de estas diferencias en el crecimiento, todas las estirpes presentaron un consumo de CNA similar (no mostrado). Los mutantes Nit5<sup>-</sup>, Nit6<sup>-</sup> y Nit7<sup>-</sup>, que también se cultivaron en medios con amonio 2 mM o CNA 2 mM, como única fuente de nitrógeno, presentaron un comportamiento fenotípico similar al de la estirpe silvestre, por lo que no se aportan los datos para facilitar la comprensión del documento gráfico.

En medios con CNA y cianuro, la estirpe silvestre mostró un crecimiento más rápido y mayor que con CNA (Fig. 2C). La tasa de crecimiento del mutante Nit4<sup>-</sup> en medios con CNA y cianuro fue inferior a la de la estirpe silvestre, mientras que en estas condiciones el doble mutante NitC<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> experimentó una fase de latencia prolongada de aproximadamente 35 h (Fig. 25C). El doble mutante alcanzó un crecimiento máximo similar en amonio y en CNA, en este último caso tanto en ausencia como en presencia de cianuro. Sin embargo, en medios con CNA y cianuro, el crecimiento máximo alcanzado por el doble mutante se correspondió aproximadamente con la mitad del crecimiento máximo alcanzado por el resto de mutantes (Fig. 25).

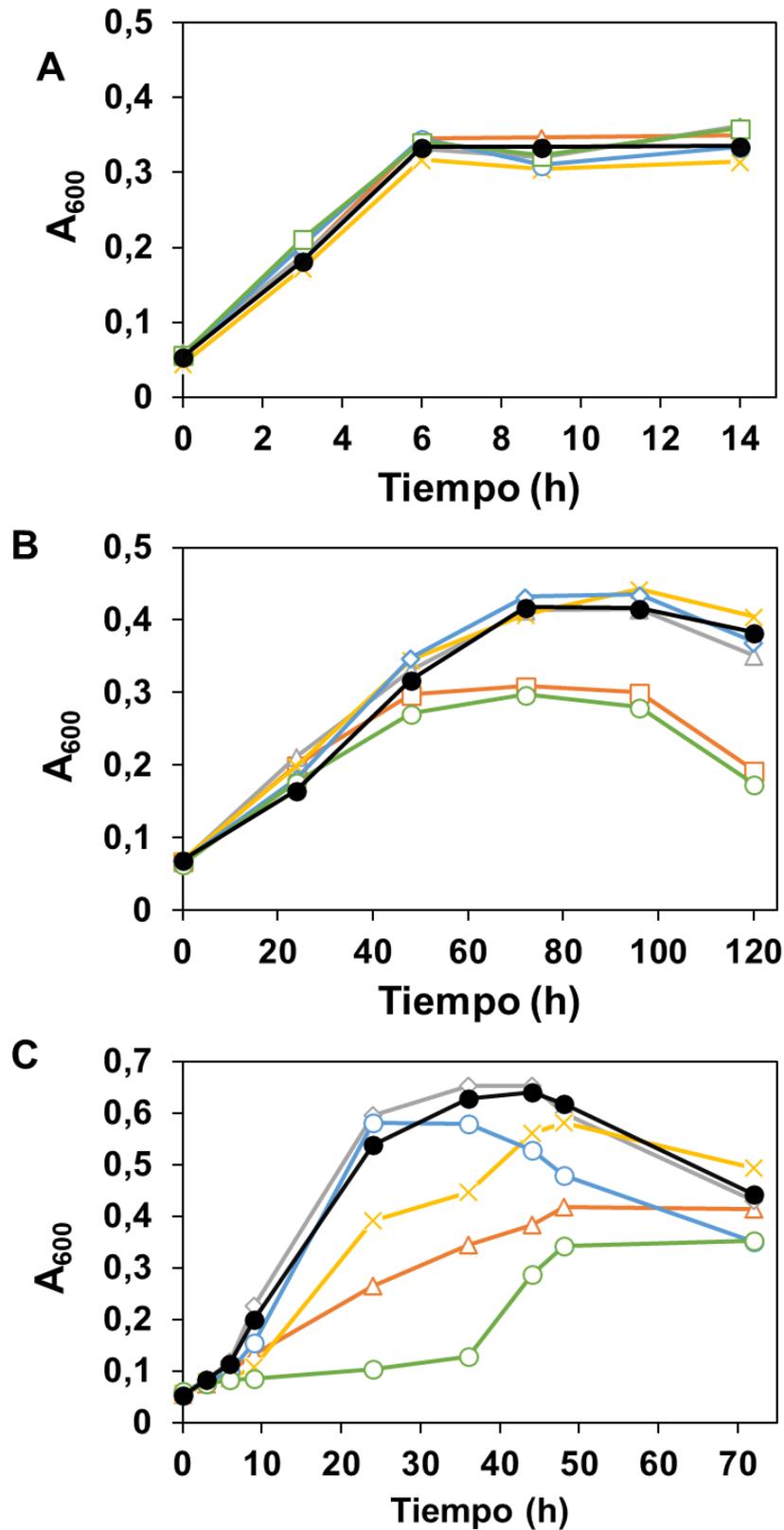
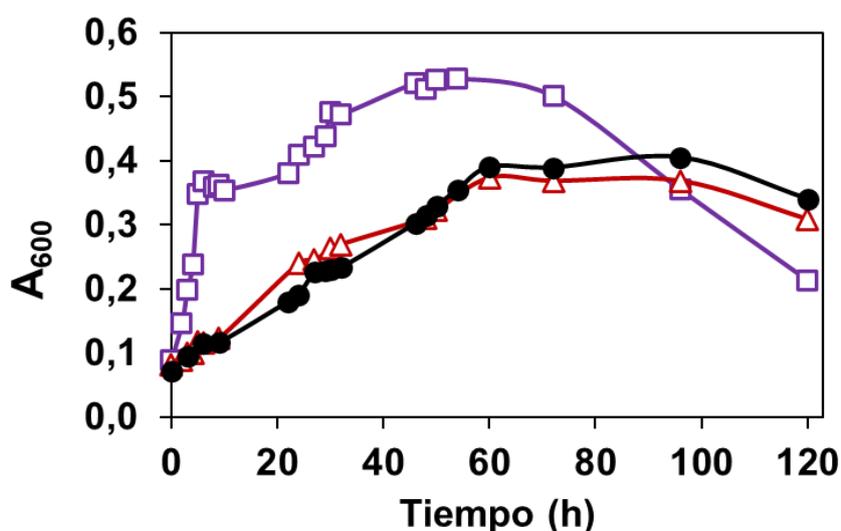


Figura 25. Crecimiento de la cepa silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y los mutantes deficientes en distintas nitrilasas en medio mínimo con amonio (A), CNA (B) o CNA + cianuro (C). Las concentraciones de CNA y amonio usadas fueron 2 mM, mientras que la de NaCN fue 1 mM. Cepa silvestre (círculos rellenos), Nit1<sup>-</sup> (estrellas), Nit2<sup>-</sup> (rombos), Nit3<sup>-</sup> (círculos vacíos), Nit4<sup>-</sup> (triángulos) y NitC<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> (cuadrados). Los datos representados corresponden a una media de tres experimentos independientes.

Por otro lado, en este trabajo se ha estudiado la posible función del gen *mocR* (BN5\_1899) de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en la asimilación de CNA. Este gen codifica un hipotético regulador transcripcional de la familia GntR y se encuentra localizado aguas arriba de la agrupación génica *cioAB-nit4*, con orientación opuesta a dichos genes (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Se ha construido un mutante en el gen *mocR* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 por inserción/delección, obteniéndose además un doble mutante MocR<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup>. Estos mutantes se cultivaron en medio M9 con NH<sub>4</sub>Cl 2 mM como única fuente de nitrógeno, junto con la estirpe silvestre como control, obteniéndose un crecimiento similar en las distintas estirpes analizadas (resultados no mostrados). Cuando se utilizó CNA 2 mM como única fuente de nitrógeno, el mutante MocR<sup>-</sup> no presentó la fase de latencia que exhibió la estirpe silvestre, y su crecimiento fue significativamente superior (Fig. 26). El crecimiento del mutante MocR<sup>-</sup> presentó una cinética bifásica, a diferencia de la estirpe silvestre (Fig. 26). El doble mutante MocR<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> recuperó el fenotipo de la cepa silvestre en medios con CNA (Fig. 26). Además, en un análisis proteómico cuantitativo preliminar realizado con el mutante MocR<sup>-</sup>, se identificaron las proteínas codificadas por la agrupación génica *cioAB-nit4*, incluida la nitrilasa Nit4, en células cultivadas con amonio, mientras que en estudios previos esta agrupación génica ha sido descrita como inducible por cianuro. Por otro lado, un mutante DapA<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 deficiente en una dihidrodipicolinato sintasa y construido por inserción de un casete de resistencia a gentamicina, mostró el mismo fenotipo que el mutante MocR<sup>-</sup> en medios con CNA como única fuente de nitrógeno (resultado no mostrado). El gen *dapA* (BN5\_1907) se encuentra localizado en la agrupación génica *cioAB-nit4*, aguas arriba del gen *nit4* (Olaya-Abril *et al.*, 2020).



**Figura 26. Crecimiento de la cepa silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y los mutantes MocR<sup>-</sup> y MocR<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> con CNA.** Se utilizó medio mínimo M9 con acetato 50 mM como fuente de carbono y CNA 2 mM como fuente de nitrógeno. Cepa silvestre (círculos), MocR<sup>-</sup> (cuadrados) y MocR<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> (triángulos). Los datos representados corresponden a una media de tres experimentos independientes.

## Discusión

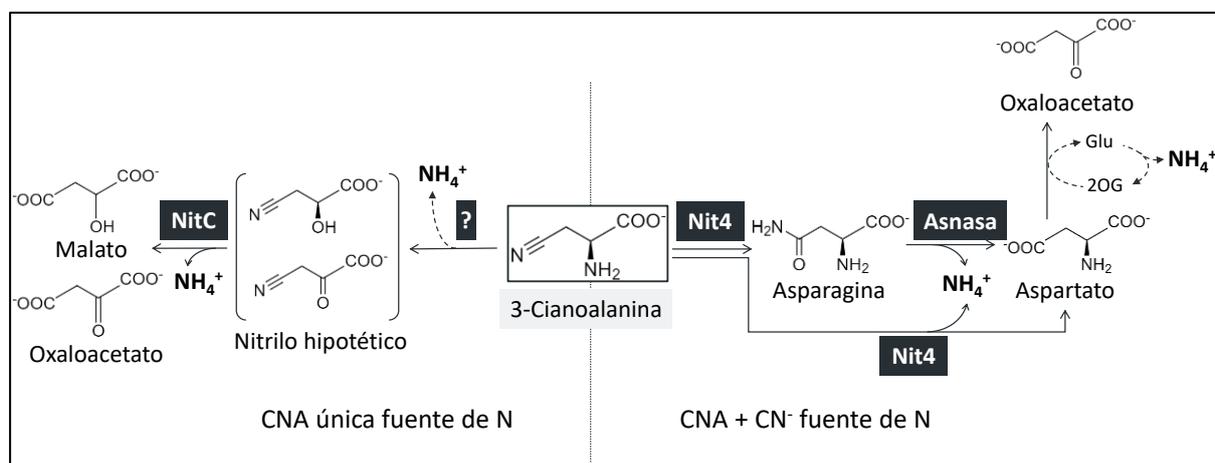
La bacteria cianotrofa *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 asimila cianuro y compuestos cianoderivados como el cianato y la CNA (Cabello *et al.*, 2018; Luque-Almagro *et al.*, 2018). Estudios previos mostraron que un mutante CynS<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 conservaba la capacidad de asimilar cianuro, descartando la participación del cianato como intermediario en la ruta de asimilación de cianuro en esta bacteriana (Luque-Almagro *et al.*, 2008; Sáez *et al.*, 2019). Por otro lado, la ausencia de una actividad CAS en células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivadas con cianuro, también indicó en un estudio previo que la CNA no es un intermediario en la ruta de asimilación de cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2005b). En este trabajo se han identificado en la cepa CECT 5344 cuatro genes homólogos a una CAS previamente caracterizada en *P. putida* (Kumano *et al.*, 2016). Uno de ellos, *cysM3*, forma parte de la agrupación génica *cioAB-nit4*, que también codifica la nitrilasa Nit4 responsable de la asimilación de CNA (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Acera *et al.*, 2017), lo que sugiere la posibilidad de una posible ruta de degradación de cianuro a través de CNA. Sin embargo, tanto CysM3 como otro de los homólogos identificados, CysM1, presentaron baja identidad con la CAS de *P. putida*. Además, estas proteínas se agruparon en un análisis filogenético junto a cisteína sintasas bacterianas de tipo CysM y alejadas de las CAS (Fig. 19). Estos resultados descartaron a CysM1 y CysM3 como posibles CAS. El alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los restantes homólogos, *cysK1* y *cysK3*, y la elevada identidad de las proteínas codificadas por estos genes con los extremos N- y C-terminal, respectivamente, de la CAS de *P. putida* (Fig. 18), sugirieron que los genes *cysK1* y *cysK3* podrían formar parte de un mismo gen que habría perdido su funcionalidad como consecuencia de una mutación que generó un codón de parada prematuro. Además, ambos genes presentaron el mismo perfil de expresión génica, una ligera inducción tanto por el residuo cianurado como por la CNA (Fig. 23). Las proteínas CysK1 y CysK3 codificadas por estos genes no fueron identificadas en el análisis proteómico llevado a cabo en este trabajo en respuesta al residuo cianurado o a la CNA (Tabla 12). La presencia del codón de parada prematuro identificado entre los genes *cysK1* y *cysK2* generaría un transcrito cuya traducción daría lugar a una proteína truncada no funcional, correspondiente a CysK1, que probablemente sería degradada.

La nitrilasa Nit4 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 utiliza CNA como sustrato, aunque el gen *nit4* se induce únicamente por cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2015; Acera *et al.*, 2017; Ibáñez *et al.*, 2017). Por lo tanto, la CNA es asimilada a través de la nitrilasa Nit4 sólo en presencia de cianuro (Acera *et al.*, 2017). Sin embargo, la estirpe CECT 5344 también es

capaz de asimilar CNA en ausencia de cianuro y, por lo tanto, cuando no hay expresión de Nit4. Para determinar el mecanismo por el que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 asimila CNA cuando el cianuro no está presente, se llevó a cabo un análisis proteómico cuantitativo por LC-MS/MS con células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivadas con CNA, utilizando como control células cultivadas con amonio. También se determinó el proteoma de células cultivadas con el residuo cianurado de la joyería. La asimilación de CNA en bacterias ha sido estudiada en un número muy limitado de trabajos, y hasta la fecha este sería el primer proteoma descrito en bacterias cultivadas con este nitrilo. El análisis proteómico reveló que la CNA tiene principalmente un efecto de sobreexpresión sobre el proteoma de la cepa CECT 5344, afectando específicamente a proteínas involucradas en el metabolismo general del nitrógeno (Figs. 21 y 22; Tabla 12). Este efecto de la CNA, junto con la sobreexpresión de proteínas involucradas en la biosíntesis de polihidroxicanoatos, sugiere que este nitrilo es una fuente pobre de nitrógeno. En comparación con la CNA, el residuo cianurado de la joyería afectó negativamente a un elevado número de proteínas, lo que podría deberse a la mayor toxicidad del cianuro y los metales presentes en el residuo (Fig. 21). En este trabajo, y de acuerdo con estudios previos (Luque-Almagro *et al.*, 2015; Ibáñez *et al.*, 2017), el residuo de la joyería causó la sobreexpresión de proteínas implicadas en los mecanismos de resistencia a cianuro y metales, incluida la oxidasa insensible a cianuro CioAB (Tabla 12). Por el contrario, en células cultivadas con CNA no se sobreexpresó CioAB ni proteínas implicadas en la defensa frente a estrés oxidativo, lo que indica que la base molecular de la toxicidad del cianuro y la CNA, y las respuestas de resistencia desarrolladas por la cepa CECT 5344 frente a estas dos formas de cianuro, son diferentes.

El genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 codifica cuatro nitrilasas distanciadas filogenéticamente (Luque-Almagro *et al.*, 2013). En este estudio proteómico, las nitrilasas NitC, Nit1 y Nit2 se sobreexpresaron por CNA, mientras que en células cultivadas con el residuo cianurado se sobreexpresaron NitC, Nit4 y Nit1 (Tabla 12). Este resultado fue confirmado por un análisis transcripcional mediante qRT-PCR (Fig. 23). A diferencia de la nitrilasa Nit4 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, la nitrilasa de la CNA de *Pseudomonas* sp. 13 sí se sobreexpresó en respuesta a CNA (Yanase *et al.*, 1982). Además, la mayoría de las nitrilasas bacterianas descritas se inducen por los nitrilos que usan como sustratos (Chhiba-Govindjee *et al.*, 2019). El perfil de expresión del gen *nit4* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 podría estar relacionado con su ubicación en la agrupación génica *cioAB-nit4*, la cual se induce específicamente por cianuro y no por CNA (Fig. 23). Es de destacar que hasta la fecha no se han identificado homólogos bacterianos de *nit4* con un contexto génico similar. Como se ha descrito en estudios previos, la nitrilasa NitC tiene un papel fundamental en la asimilación del cianuro (Estepa *et al.*, 2012). La sobreexpresión de

NitC por CNA sugiere la posible participación de esta nitrilasa en la asimilación de CNA en la cepa CECT 5344 (Tabla 12 y Tabla S2). La caracterización de mutantes de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 deficientes en las nitrilasas Nit1 y Nit2 reveló que estos no presentaron diferencias con la estirpe silvestre en su crecimiento en medios con CNA, tanto en ausencia como en presencia de cianuro, por lo que se descartó el papel de estas nitrilasas en la asimilación de CNA (Fig. 25). Teniendo en cuenta estos resultados, en este trabajo se propone la existencia de dos rutas metabólicas diferentes de asimilación de CNA en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. La ruta dependiente de Nit4, descrita en trabajos previos, requiere de la presencia de cianuro (condiciones cianotróficas), mientras que en ausencia de este compuesto (condiciones no cianotróficas), la asimilación de CNA se llevaría a cabo a través de la nitrilasa NitC (Fig. 27). Esta ruta alternativa a Nit4 requeriría de un paso inicial de desaminación que generaría el sustrato de la nitrilasa NitC.



**Figura 27. Rutas de asimilación de CNA en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en presencia o ausencia de cianuro.** En ausencia de cianuro, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 asimila CNA por la vía dependiente de NitC (izquierda) porque el gen *nit4* no se induce en estas condiciones. Cuando hay cianuro presente, la cepa CECT5344 asimila CNA a través de la vía dependiente de Nit4 (derecha). El signo de interrogación indica una hipotética desaminasa o aminotransferasa; Asnasa, asparaginasa.

El fenotipo de los mutantes afectados en las distintas nitrilasas puede explicarse atendiendo a las rutas metabólicas alternativas propuestas (Fig. 27). En el doble mutante NitC<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup>, la ruta de asimilación de CNA a través de Nit4 no sería funcional, pero la vía alternativa a través de NitC suministraría una molécula de amonio debido a la desaminación/transaminación de la CNA. Esta hipótesis explicaría que, en ausencia de cianuro, condición en la que no se expresa la nitrilasa Nit4, los mutantes NitC<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> y NitC<sup>-</sup> mostraron un crecimiento similar, el cual fue menor que el mostrado por la estirpe silvestre (Fig. 25B). En presencia de cianuro, el crecimiento del mutante doble NitC<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> fue inferior y más lento que el de la estirpe silvestre o el del mutante NitC<sup>-</sup>, ya que estos podrían assimilar CNA a través de Nit4 (Fig. 25C). Además, el fenotipo de los mutantes MocR<sup>-</sup> y MocR<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> en medios con CNA también apoya la existencia de dos rutas de asimilación de CNA en *P.*

*pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Figs 26 y 27). El crecimiento de la estirpe silvestre con CNA como única fuente de nitrógeno, en ausencia de cianuro, se debería a una hipotética desaminasa/aminotransferasa y a la nitrilasa NitC (Fig. 27, izquierda). La ausencia de fase de latencia y el mayor crecimiento experimentado por el mutante MocR<sup>-</sup> en estas condiciones podría ser consecuencia de un posible papel represor del regulador MocR sobre la agrupación génica *cioAB-nit4*, posibilitando en el mutante la sobreexpresión de Nit4 y la asimilación de CNA a través de esta nitrilasa (Fig. 27, derecho). El fenotipo del doble mutante MocR<sup>-</sup>/Nit4<sup>-</sup> confirmaría esta hipótesis, ya que en este mutante la sobreexpresión de Nit4 como consecuencia de la ausencia de MocR, sería contrarrestada por la mutación en el gen *nit4*, lo que conlleva a que el mutante doble recupere el fenotipo silvestre (Fig. 26). Un fenotipo similar al mostrado por el mutante MocR<sup>-</sup> con CNA fue observado en un mutante DapA<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes*. En este mutante, la inserción de un casete de resistencia a gentamicina en el gen *dapA*, situado aguas arriba de *nit4*, provocaría la expresión constitutiva de Nit4. Por lo tanto, el mutante DapA<sup>-</sup> asimilaría CNA a través de Nit4 incluso en ausencia de cianuro (Olaya-Abril *et al.*, 2020).

La posible coexistencia en el pasado de dos vías de degradación de cianuro en la cepa CECT5344 a través de las nitrilasas NitC y Nit4, sugiere que el cianuro pudo actuar como una importante presión selectiva en el nicho original de esta bacteria cianotrófica.



# Capítulo III

Caracterización molecular de la agrupación  
génica *nit1C* de *Pseudomonas*  
*pseudoalcaligenes* CECT 5344



La nitrilasa NitC codificada en la agrupación génica *nit1C* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es esencial para la asimilación de cianuro inorgánico y nitrilos alifáticos (Estepa *et al.*, 2012; Cabello *et al.*, 2018). Esta agrupación génica contiene los genes *nitBCDEFGH* (BN5\_1631-BN5\_1637), todos ellos con la misma orientación, y el gen *nitA* (BN5\_1630), el cual presenta una orientación divergente al resto de genes *nit*. Además de la nitrilasa NitC, otras proteínas codificadas por los genes *nit* son las siguientes: un regulador transcripcional dependiente de  $\sigma^{54}$  (NitA), un miembro de la superfamilia S-adenosilmetionina (NitD), un miembro de la superfamilia N-aciltransferasa (NitE), una proteína con actividad fosforribosilaminoimidazol-AIR sintetasa (NitF) y una oxidorreductasa dependiente de FAD (NitH). Los genes *nitB* y *nitG* codifican dos proteínas de función desconocida (Estepa *et al.*, 2012). En estudios previos se ha demostrado que los genes estructurales *nitBCDEFGH* se inducen en respuesta a cianuro sódico o al residuo cianurado de la joyería, mientras que éstos se reprimen por amonio (Estepa *et al.*, 2012; Luque-Almagro *et al.*, 2015). Estos resultados se confirmaron mediante técnicas proteómicas, incluyendo electroforesis bidimensional (2D-PAGE) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), permitiendo la identificación de las proteínas estructurales NitB, NitC, NitD, NitE, NitF, NitG y NitH a partir de extractos acelulares procedentes de células de la estirpe CECT 5344 cultivadas con cianuro sódico o con el residuo cianurado de la joyería como única fuente de nitrógeno. Estas proteínas no se detectaron en extractos acelulares procedentes de células cultivadas con amonio (Ibáñez *et al.*, 2017). Según los resultados presentados en el capítulo I, la agrupación génica *nit1C* podría estar regulada por sRNA, ya que los genes *nitB*, *nitC*, *nitG* y *nitH* presentaron posibles dianas para sRNA222, sRNA14, sRNA511, sRNA683 y sRNA649.

En un trabajo previo se generaron mutantes deficientes en los genes *nitA*, *nitB* y *nitC* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Estepa *et al.*, 2012). Estos mutantes mostraron un crecimiento residual con cianuro comparado con el presentado por la estirpe silvestre, por lo que se propuso que, además de NitC, el resto de proteínas codificadas en la agrupación génica *nit1C* también podrían tener un papel en la degradación de cianuro. Además, otros mutantes Nit<sup>-</sup>, incluyendo NitE<sup>-</sup>, NitG<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, se han generado previamente por el grupo de investigación BIO117 (resultados no publicados). En este trabajo se ha continuado con el análisis mutacional de otros genes de la agrupación génica *nit1C*, generándose así mutantes deficientes en los genes *nitD* y *nitF*. Posteriormente, se ha llevado a cabo una caracterización fisiológica de los mutantes Nit<sup>-</sup> en medios con cianuro. En esta determinación se ha determinado el crecimiento, consumo de cianuro y actividad nitrilasa NitC. Además, en este estudio, y mediante proteómica de alta resolución LC-MS/MS, se ha determinado el proteoma de la estirpe silvestre (WT) de *P.*

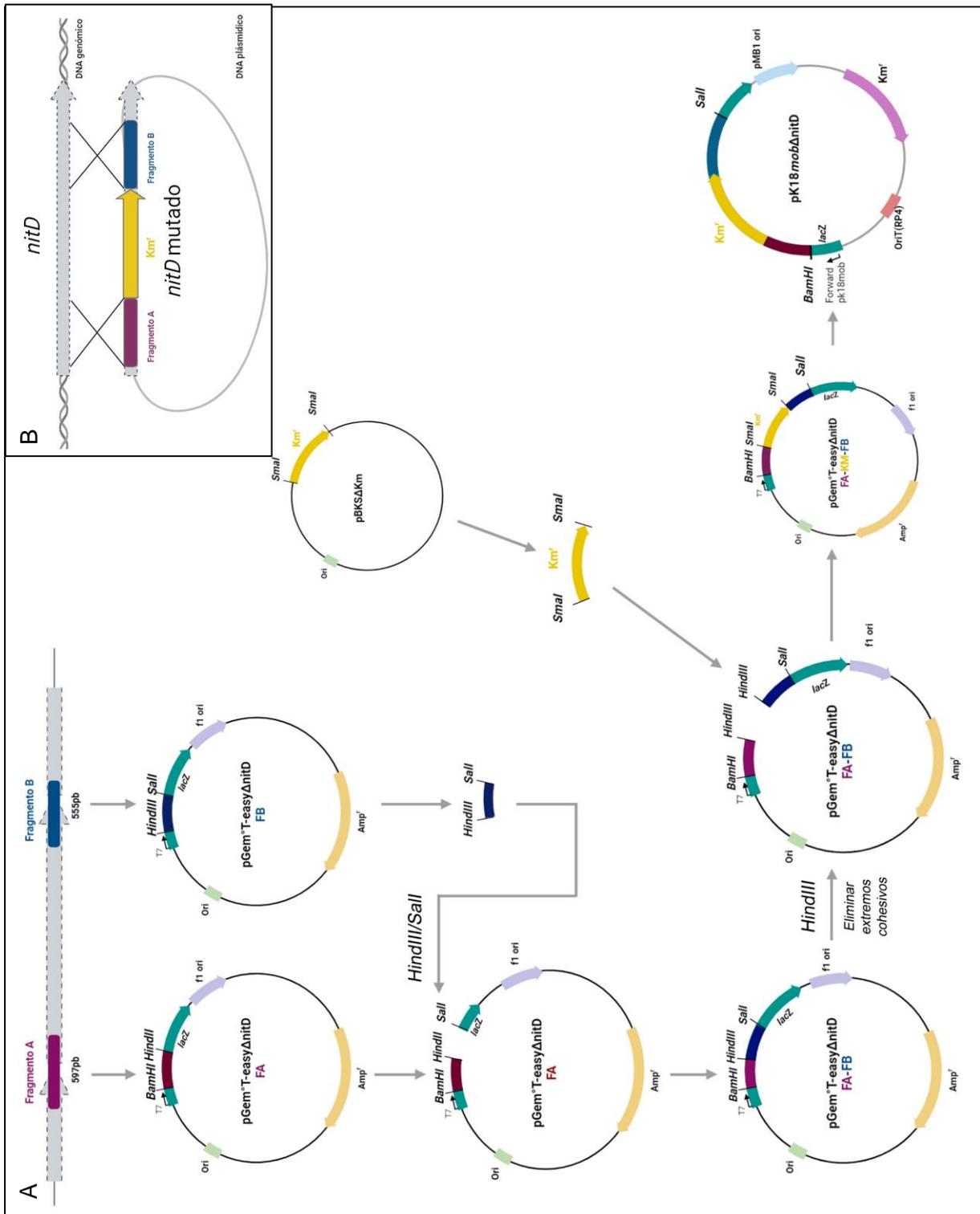
*Pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivada en condiciones cianotróficas, resultando una mayor cantidad de proteínas identificadas que en estudios previos. También, y con el propósito de identificar nuevas proteínas que puedan estar relacionadas con las proteínas Nit, además de conocer su función, se ha llevado a cabo un análisis proteómico de los distintos mutantes Nit<sup>-</sup> en condiciones cianotróficas, utilizando la estirpe WT como control.

---

### **Análisis mutacional de la agrupación génica *nitIC* y caracterización fisiológica de los mutantes Nit<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344**

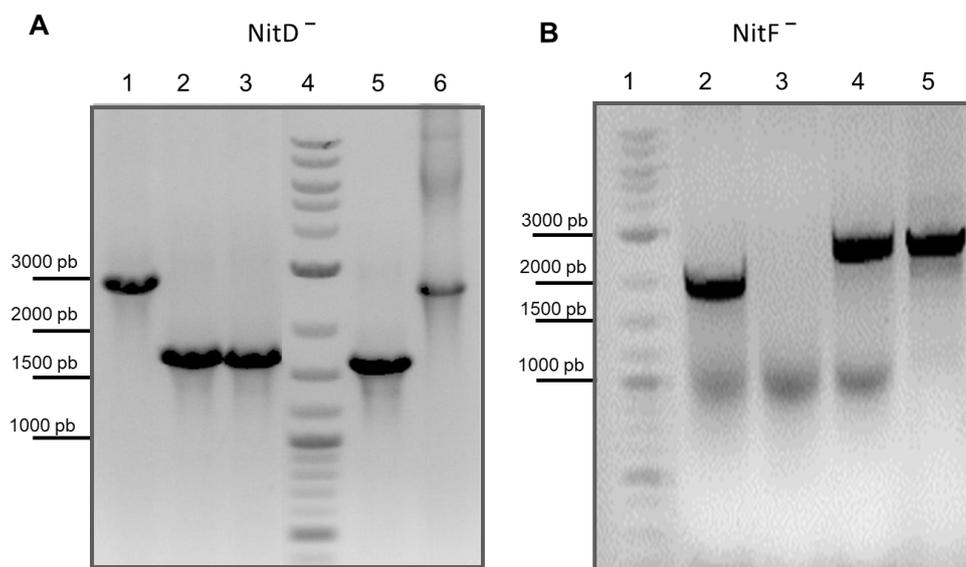
---

Para la construcción de los mutantes NitD<sup>-</sup> y NitF<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, según se detalla en Materiales y Métodos, se ha seguido una estrategia de mutagénesis similar, se ha llevado a cabo una delección parcial del gen *nitD* (BN5\_1633) o *nitF* (BN5\_1635) y la inserción, en una región central del gen *nitD* o *nitF*, de un casete de resistencia a kanamicina o gentamicina, respectivamente (Fig. 28). Para la construcción del mutante NitD<sup>-</sup> se amplificó por PCR el extremo 5'- del gen *nitD*, usando el par de oligonucleótidos nitDFAB/nitDRAH (Tabla 9), generando el fragmento A de 597 pb y el extremo 3'- del gen *nitD* con el par de oligonucleótidos nitDFBH/nitDRBS (Tabla 9), generando el fragmento B de 555 pb. Los fragmentos A y B se clonaron individualmente en el vector pGEM-T Easy, obteniéndose las construcciones pGEM-Teasy $\Delta$ *nitDFA* y pGEM-Teasy $\Delta$ *nitDFB* (Fig. 28A). Posteriormente, el fragmento B se clonó como fragmento *HindIII/SalI* en el plásmido pGEM-T $\Delta$ *nitDFA*, resultando la construcción pGEM-Teasy $\Delta$ *nitDFA-FB*, con un sitio de corte para la enzima de restricción *HindIII*, localizado entre los fragmentos A y B. Este sitio fue utilizado para clonar un casete de resistencia a kanamicina, obteniéndose el plásmido pGEM-Teasy $\Delta$ *nitDFA-km-FB* (Fig. 28A). Finalmente, la construcción conteniendo los dos fragmentos interrumpidos por el casete de resistencia a kanamicina se subclonó en el plásmido suicida pK18*mob* utilizando los sitios de corte para las enzimas de restricción *BamHI* y *SalI*, generándose la construcción pK18*mob* $\Delta$ *nitD* (Fig. 28A). Esta última construcción, generada en *E. coli* DH5 $\alpha$ , se transfirió a *E. coli* S17-1, y posteriormente a la estirpe silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 mediante conjugación biparental. Los transconjugantes que incorporaron el casete de resistencia a kanamicina en el gen *nitD* mediante un evento de doble recombinación, se seleccionaron por resistencia a kanamicina y nalidíxico y aquellos transconjugantes que insertaron este casete de kanamicina en la misma orientación que el gen *nitD*, para evitar así un efecto polar sobre los genes situados aguas abajo del gen *nitD* (Fig. 28B).



**Figura 28. Estrategia de mutagénesis del mutante *NitD*<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. A.** Pasos seguidos para la obtención del vector pK18*mob*Δ*nitD*::Km. **B.** Esquema del doble evento de recombinación homóloga ocurrido en la mutagénesis del gen *nitD* de la estirpe CECT 5344. En esta estrategia se empleó el vector de clonación pGem-T Easy, el vector suicida pK18*mob* y el plásmido pBKs como fuente del casete de resistencia a kanamicina. Las enzimas de restricción utilizadas (NEB, Ipswich-MA, EE. UU.), se indican en el esquema.

Los mutantes NitD<sup>-</sup> y NitF<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se comprobaron mediante PCR amplificando la zona de delección e inserción del casete de resistencia a kanamicina o gentamicina, respectivamente, y comparando los resultados con los obtenidos cuando se utilizó como DNA molde el DNA total de la estirpe silvestre. En ambos casos, la mutación incrementó 1,1 kb la longitud del fragmento amplificado por PCR respecto a la estirpe WT, la cual mostró un tamaño aproximado de 1,5 kb (Fig. 29).



**Figura 29. Comprobación mediante PCR de los mutantes NitD<sup>-</sup> y NitF<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. A.** Resultado de la PCR realizada con los oligonucleótidos nitDFAB/nitDRBS (Tabla 9) de algunos transconjugantes obtenidos en la mutagénesis del gen *nitD*. **B.** Amplificación por PCR de transconjugantes obtenidos en la mutagénesis del gen *nitF*. Gel A: (1) fragmento amplificado de transconjugante obtenido por doble recombinación, (2 y 3), recombinantes simples, (4) marcador de peso molecular, (5) DNA total estirpe silvestre, (6) construcción pk18mobΔ*nitD* en la estirpe S17.1. Gel B: (1) marcador de peso molecular, (2) DNA total estirpe silvestre, (3) control negativo sin DNA, (4 y 5) recombinante doble.

Para realizar la caracterización fisiológica de los mutantes Nit<sup>-</sup>, éstos se precultivaron inicialmente, junto con la estirpe WT, en medio mínimo M9 con acetato 50 mM y amonio 2 mM, durante 24 h, hasta que se agotó el amonio del medio y se alcanzó un crecimiento de los cultivos determinado por la biomasa ( $A_{600}$  0,250). Este se consideró el tiempo cero de la curva de crecimiento, momento en el que se adicionó cloruro de amonio 2 mM o cianuro sódico 2 mM, como única fuente de nitrógeno. Todos los mutantes Nit<sup>-</sup> alcanzaron un crecimiento similar al de la estirpe WT en presencia de amonio ( $A_{600}$  0,6) y un consumo total de la fuente nitrogenada (resultados no mostrados). En medios con cianuro, a las 15 h de la adición de cianuro, la estirpe WT presentó un incremento del crecimiento ( $\Delta A_{600}$  0,15), considerándose este valor el 100 % del crecimiento. Los mutantes NitF<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> mostraron un 75 % de crecimiento, el mutante NitD<sup>-</sup> alcanzó el 43 %, mientras que los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitB<sup>-</sup>, NitC<sup>-</sup> y NitE<sup>-</sup> alcanzaron entre el 28-36 % del crecimiento con respecto a la estirpe WT (Fig. 30).

El mutante NitG<sup>-</sup> presentó un crecimiento y consumo de cianuro similares a los mostrados por la estirpe WT a tiempo final, consumiéndose completamente el cianuro trascurridas 15 h, aunque en el mutante NitG<sup>-</sup> consumió el cianuro más lentamente. En el resto de mutantes no fueron capaces de consumir el cianuro completamente, manteniéndose este en el medio de cultivo a una concentración final entre 0,5-0,7 mM (Fig. 30).

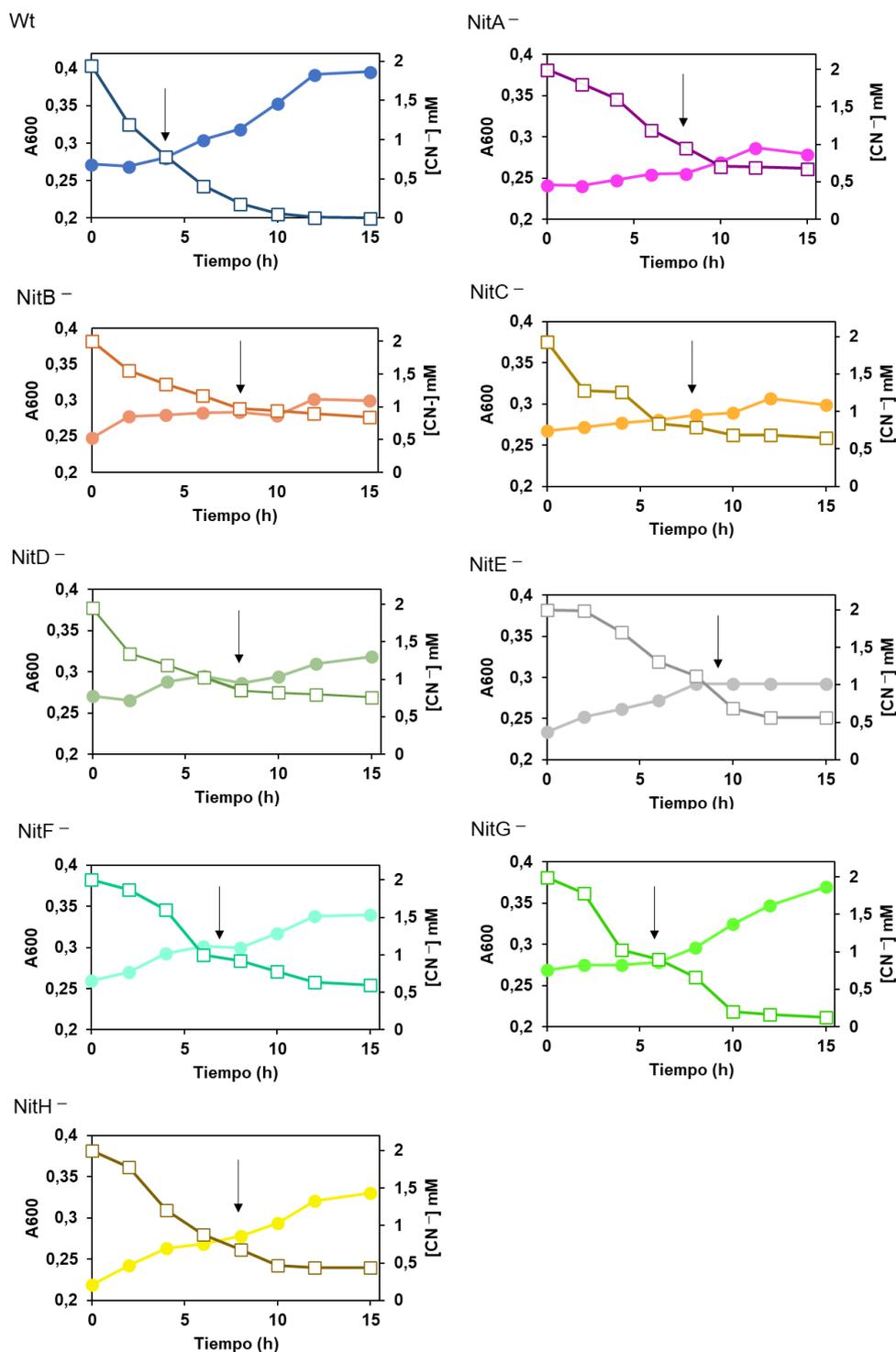
Los mutantes Nit<sup>-</sup> también se caracterizaron mediante la determinación de la actividad nitrilasa NitC. Esta actividad se ensayó en extractos acelulares obtenidos a partir de células de la estirpe WT o los mutantes Nit<sup>-</sup>, cultivadas con amonio 2 mM durante 1,5 h o con NaCN 2 mM durante 6 h. El ensayo enzimático se llevó a cabo determinando el amonio producido a partir de fumaronitrilo, un sustrato específico de la nitrilasa NitC (Tabla 13).

**Tabla 13. Determinación de la actividad nitrilasa NitC en las estirpes WT y Nit<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.**

Estirpe	Actividad nitrilasa (U/mg)*	Actividad nitrilasa (%)
WT	1,13 ± 0,13	100
NitA <sup>-</sup>	0,02 ± 0,02	2
NitB <sup>-</sup>	0,02 ± 0,02	2
NitC <sup>-</sup>	0,02 ± 0,04	2
NitD <sup>-</sup>	0,51 ± 0,12	45
NitE <sup>-</sup>	0,08 ± 0,01	7
NitF <sup>-</sup>	0,59 ± 0,10	52
NitG <sup>-</sup>	1,08 ± 0,06	96
NitH <sup>-</sup>	0,90 ± 0,19	80

(\*) La actividad nitrilasa se determinó en extractos acelulares obtenidos a partir de células cultivadas con cianuro.

En la estirpe silvestre y en los mutantes Nit<sup>-</sup> no se detectó actividad nitrilasa en extractos obtenidos a partir de células cultivadas con amonio (resultado no mostrado), mientras que en los extractos procedentes de células cultivadas con cianuro se detectó actividad nitrilasa (Tabla 13). En la estirpe WT se detectó la máxima actividad enzimática (1,13 U/mg), considerándose este valor el 100 % de la actividad enzimática. Los mutantes NitG<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> presentaron una actividad nitrilasa elevada, aunque ligeramente inferior a la de la estirpe WT, mientras que los mutantes NitD<sup>-</sup> y NitF<sup>-</sup> exhibieron aproximadamente el 50 % de la actividad nitrilasa. Por el contrario, los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitB<sup>-</sup>, NitC<sup>-</sup>, y NitE mostraron una actividad nitrilasa mínima, comprendida entre 2-7 % (Tabla 13).

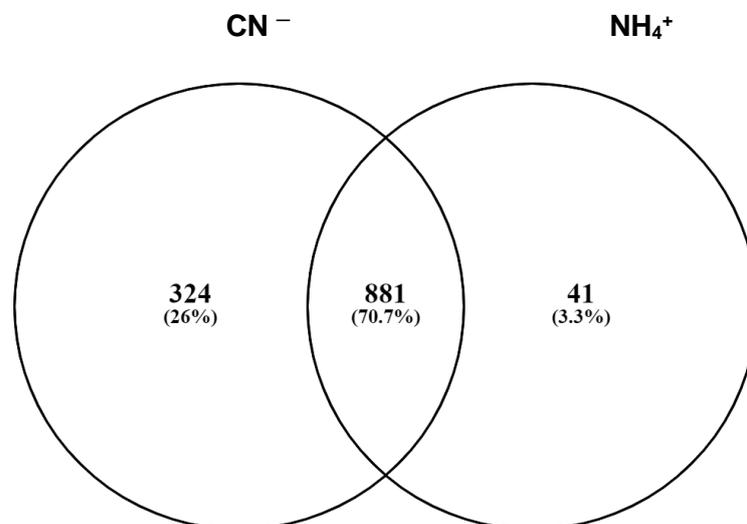


**Figura 30. Crecimiento de las estirpes WT y Nit<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en presencia de cianuro.** Las curvas de crecimiento se realizaron en medio mínimo M9 (pH 9,5) con acetato 50 mM y amonio 2 mM. Trascurridas 24 h, se adicionó NaCN 2 mM como única fuente de nitrógeno, determinándose a partir de este momento el crecimiento ( $A_{600}$ , símbolos rellenos) y el consumo de cianuro ( $CN^-$ , símbolos vacíos). Los valores representados corresponden a la media de tres experimentos realizados de forma independiente, con una desviación estándar inferior al 10 %. Las fechas indican el momento en el que se recogieron las células para el análisis proteómico.

## Análisis proteómico de las cepas WT y mutantes $\text{Nit}^-$ de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en respuesta a cianuro

En este trabajo se llevó a cabo un análisis proteómico cuantitativo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y libre de marcaje, utilizando extractos acelulares procedentes de células de las estirpes WT y mutantes  $\text{Nit}^-$  de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivadas con cianuro. En todos los análisis proteómicos se utilizaron tres réplicas biológicas para cada condición analizada.

Inicialmente se obtuvieron los proteomas de la cepa WT cultivada con amonio o cianuro como única fuente de nitrógeno, identificándose 1 470 proteínas en cianuro y 1 249 proteínas en amonio. El análisis comparativo entre estas dos condiciones reveló que en total 1 246 proteínas presentaron diferencias de expresión significativas. De estas proteínas, 324 proteínas fueron exclusivas de cianuro, 41 exclusivas de amonio y 881 se compartieron entre ambas condiciones (Fig. 31). De las proteínas compartidas, 875 proteínas se encontraron sobreexpresadas en cianuro y sólo 6 proteínas se identificaron reprimidas por cianuro (Tabla S3).



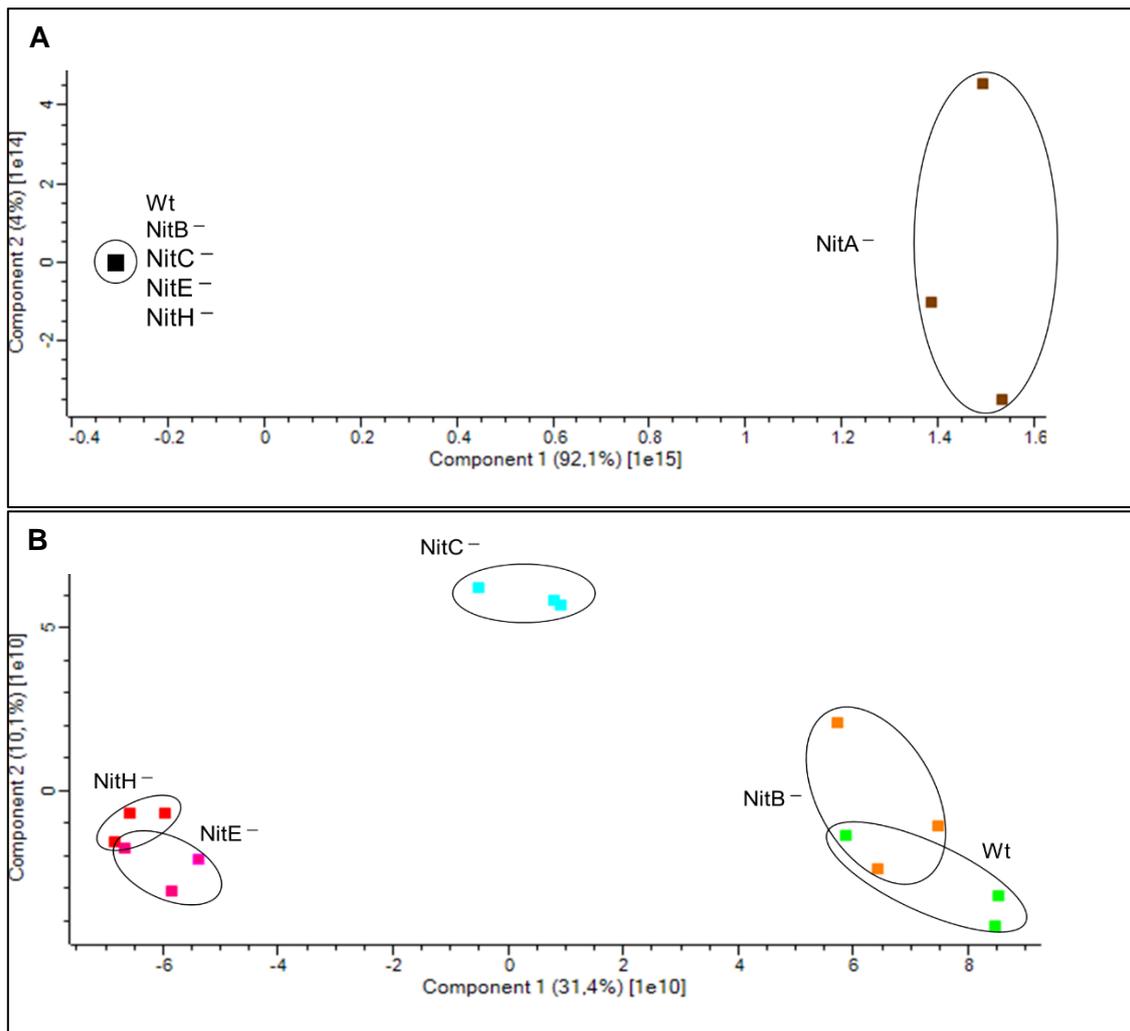
**Figura 31. Análisis comparativo de los proteomas de la estirpe WT de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivadas con cianuro o amonio.** La intersección muestra proteínas que presentaron diferencias cuantitativas entre las dos condiciones estudiadas, mientras que los valores no incluidos en la intersección indican proteínas expresadas exclusivamente en el proteoma de cianuro o amonio.

Por otro lado, para caracterizar las proteínas Nit de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, se realizó un análisis proteómico mediante LC-MS/MS en el que se compararon los proteomas de cada mutante Nit<sup>-</sup> con el de la estirpe WT en condiciones cianotróficas. En este análisis se identificaron 1470 proteínas en la estirpe WT, un número similar al número de proteínas identificadas en el mutante NitA<sup>-</sup>, mientras que en el resto de mutantes Nit<sup>-</sup>, el número de proteínas identificadas fue similar entre ellos, y ligeramente inferior al de la estirpe WT y el mutante NitA<sup>-</sup> (Tabla 14). En los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> se identificaron entre 393-370 proteínas con expresión diferencial (Tabla 14). En el mutante NitB<sup>-</sup> el número de proteínas identificadas con expresión diferencial fue menor que en las otras estirpes analizadas (74 proteínas), mientras que en el mutante NitC<sup>-</sup> se identificaron 226 proteínas que variaron su expresión con respecto al proteoma de la estirpe WT (Tabla 14). En el mutante NitA<sup>-</sup> la cantidad de proteínas reprimidas y sobreexpresadas fue similar. En el resto de mutantes, la mayoría de las proteínas que presentaron expresión diferencial respecto al proteoma de la estirpe WT se encontraron reguladas negativamente en los mutantes (FC ≥ 2 WT/Nit<sup>-</sup> y exclusivas de WT) (Tabla 14). Los análisis proteómicos WT vs. NitD<sup>-</sup>, WT vs. NitF<sup>-</sup> y WT vs. NitG<sup>-</sup> no se han podido completar en este trabajo, quedando pendiente su ejecución para un futuro próximo.

**Tabla 14. Proteínas identificadas en el análisis proteómico comparativo WT vs. mutantes Nit<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.**

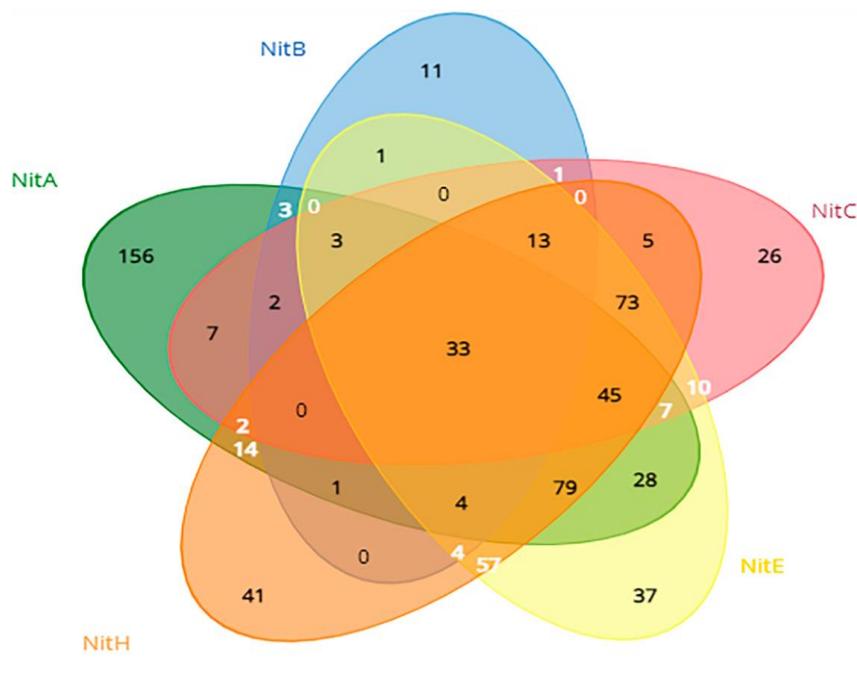
	WT vs. NitA <sup>-</sup>	WT vs. NitB <sup>-</sup>	WT vs. NitC <sup>-</sup>	WT vs. NitE <sup>-</sup>	WT vs. NitH <sup>-</sup>
Nº promedio de proteínas identificadas	1444	1102	1198	1149	1150
Nº de proteínas con expresión diferencial	383	74	226	393	370
Nº de proteínas FC ≥ 2 WT/Nit <sup>-</sup>	109	5	24	63	79
Nº de proteínas exclusivas WT	106	52	186	256	225
Nº de proteínas FC ≤ -2 Nit <sup>-</sup> /WT	69	0	0	40	34
Nº de proteínas exclusivas Nit <sup>-</sup>	99	17	16	34	32

El análisis de componentes principales (PCA) de los resultados proteómicos obtenidos mostró una clara diferencia entre el proteoma del mutante NitA<sup>-</sup> (Tabla S4) y el resto de los proteomas pertenecientes a otros de mutantes Nit<sup>-</sup> y la estirpe WT (Fig. 32A). Cuando se eliminó el mutante NitA<sup>-</sup> de este análisis, se observó que el proteoma del mutante NitB<sup>-</sup> (Tabla S5) se situó próximo al de la estirpe WT, mientras que los proteomas de NitE<sup>-</sup> (Tabla S7) y NitH<sup>-</sup> (Tabla S8) se encontraban próximos entre sí, aunque a la vez alejados de la estirpe WT. El proteoma del mutante NitC<sup>-</sup> (Tabla S6) se situó en una posición intermedia (Fig. 32B).



**Figura 32. Análisis de componentes principales de los proteomas de las estirpes WT y mutantes Nit<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.** El análisis se realizó mediante el programa Perseus en presencia (A) o ausencia (B) de los resultados obtenidos para el mutante NitA<sup>-</sup>. En todos los casos se utilizaron 3 réplicas biológicas. Para este estudio las células de las estirpes WT y mutantes Nit<sup>-</sup> se cultivaron con cianuro como única fuente de nitrógeno.

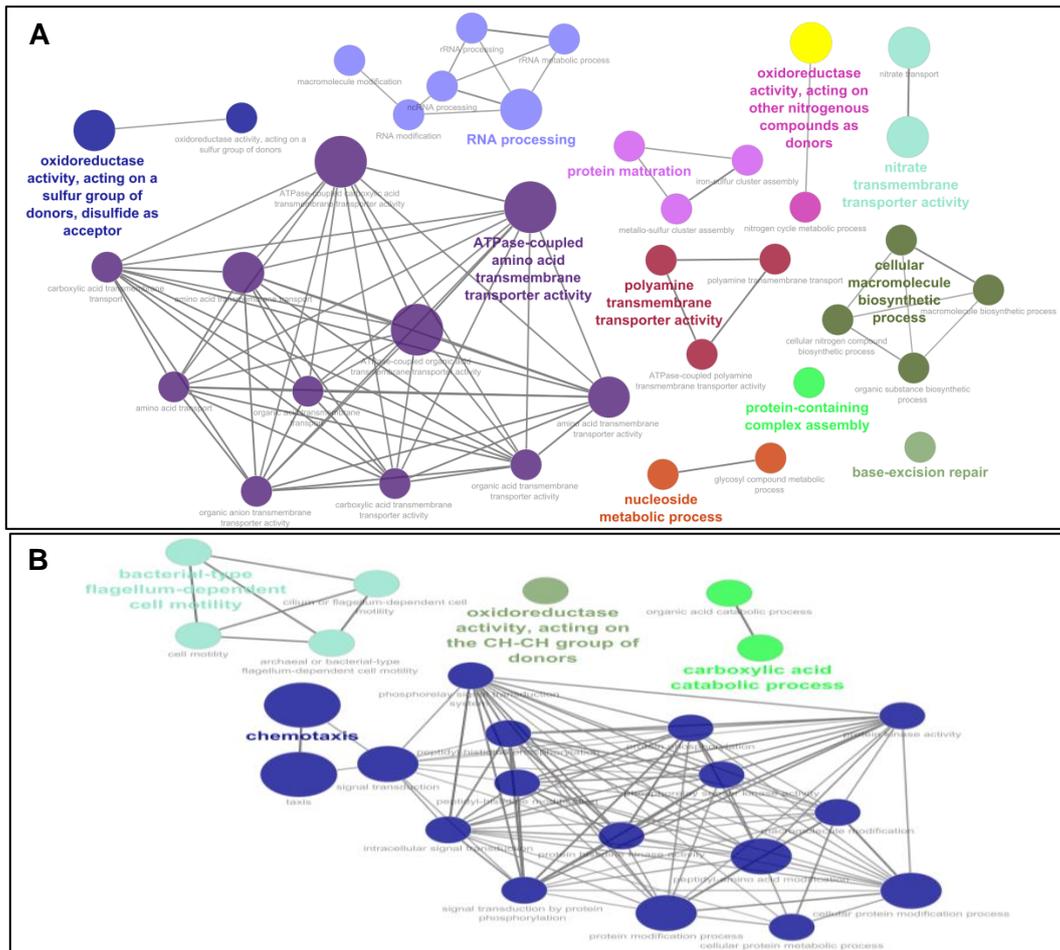
En los proteomas de los mutantes Nit<sup>-</sup> se identificaron 389 proteínas con expresión diferencial con respecto al proteoma de WT, que se comparten por al menos dos mutantes Nit<sup>-</sup>, así como un número variable de proteínas que sólo se vieron afectadas específicamente en cada uno de los proteomas de los mutantes Nit<sup>-</sup>. De las 389 proteínas compartidas entre los distintos mutantes Nit<sup>-</sup>, 302 proteínas se encontraron de forma inducida o exclusiva en WT, mientras que 77 proteínas estaban ausentes o reprimidas en WT (exclusivas o inducidas en los mutantes). Tan solo 33 proteínas se encontraron afectadas en todos los mutantes Nit<sup>-</sup> cuando se compararon con el proteoma de la estirpe silvestre (Fig. 33). Los proteomas de mutantes NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> compartieron 308 proteínas diferencialmente expresadas, mientras que los proteomas de los mutantes NitA<sup>-</sup> y NitE<sup>-</sup> compartieron 199 proteínas afectadas, y los proteomas de NitA<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> mostraron 178 proteínas afectadas en común (Fig. 33).



**Figura 33. Proteínas con expresión diferencial en los proteomas de mutantes Nit<sup>-</sup> con respecto al proteoma de WT de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en respuesta a cianuro.** El análisis proteómico se realizó mediante LC-MS/MS utilizando tres réplicas biológicas para cada estirpe.

El número de proteínas que se vieron afectadas específicamente en cada uno de los mutantes Nit<sup>-</sup> varió entre 156, en el proteoma del mutante NitA<sup>-</sup>, y 11 en del mutante NitB<sup>-</sup>, mostrando un número intermedio de proteínas en el resto de mutantes Nit<sup>-</sup> (Fig. 33). En los mutantes NitC<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> la mayoría de estas proteínas se encontraron sobreexpresadas o exclusivas en la estirpe WT.

El enriquecimiento funcional de las proteínas sobreexpresadas o exclusivas en el proteoma de WT, con respecto a los proteomas de los mutantes Nit<sup>-</sup>, permitió identificar procesos biológicos relacionados con procesamiento del RNA, reparación por escisión de bases, maduración de proteínas, ensamblaje de complejos proteicos, actividad oxidorreductasa de compuestos nitrogenados y de azufre, transporte de nitrato, aminoácidos y poliaminas, metabolismo de nucleósidos y biosíntesis de macromoléculas (Fig. 34A). En el enriquecimiento funcional de las proteínas reguladas negativamente en el proteoma de WT, con respecto a los proteomas de los mutantes Nit<sup>-</sup>, se encontraron procesos biológicos de quimiotaxis, motilidad celular dependiente del flagelo, catabolismo de ácidos carboxílicos y actividad oxidorreductasa específica de grupos donadores CH-CH (Fig. 34B).



**Figura 34. Enriquecimiento funcional de las proteínas expresadas diferencialmente en proteoma de WT con respecto a los mutantes Nit<sup>-</sup>. A.** Procesos biológicos enriquecidos en las proteínas sobreexpresadas o exclusivas en la estirpe WT. **B.** Procesos biológicos enriquecidos en las proteínas reguladas negativamente en la estirpe WT o exclusivas de los mutantes Nit<sup>-</sup>. Enriquecimientos funcionales realizados con la aplicación ClueGo del programa Perseus considerando un p-valor < 0,05.

## Comparación de los análisis proteómicos (WT cianuro vs. amonio) y (mutantes Nit<sup>-</sup> vs. WT en cianuro) de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344

De las 389 proteínas que mostraron expresión diferencial en el proteoma de al menos dos mutantes Nit<sup>-</sup> con respecto al proteoma WT, se encontraron 299 proteínas sobreexpresadas en el proteoma WT/cianuro con respecto al proteoma WT/amonio y 8 proteínas mostraron represión en el proteoma WT/cianuro. El resto de las proteínas compartidas, 82 proteínas, no cambiaron su expresión o no se detectaron en el análisis proteómico WT (cianuro vs. amonio).

Entre las proteínas exclusivas en el proteoma WT en cianuro, respecto al proteoma WT en amonio, se identificaron diversas proteínas implicadas en la asimilación de cianuro que están codificadas por la agrupación génica *nit1C* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, entre las que se encontraron NitB (H9N5E2), NitC (H9N5E1), NitD (H9N5E3), NitE (H9N5E4), NitF

### Capítulo III-Resultados

(H9N5E5), NitG (H9N5D9) y NitH (H9N5D8) (Fig. 35). En el análisis proteómico de los mutantes Nit<sup>-</sup> se encontró que muchas proteínas Nit estaban sobreexpresadas o eran exclusivas del proteoma WT. Así, las proteínas NitC y NitH se encontraron inducidas o exclusivas en el proteoma de WT, comparado con los proteomas de todos los mutantes Nit<sup>-</sup> (Fig. 35). Las proteínas NitB, NitD y NitG se encontraron inducidas/exclusivas en el proteoma de WT, respecto a casi todos los proteomas de los mutantes Nit<sup>-</sup> (en 4 proteomas de 5), mientras que las proteínas NitF y NitE estaban sobreexpresadas/exclusivas en el proteoma de WT, comparando con los proteomas de la mayoría de los mutantes (en 3 proteomas de 5) (Fig. 35). La proteína reguladora NitA no fue identificada en este análisis.

Protein accession number (1)	Locus (2)	Protein name	FC (3)					
			WT CN/ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	WT/ NitA <sup>-</sup>	WT/ NitB <sup>-</sup>	WT/ NitC <sup>-</sup>	WT/ NitE <sup>-</sup>	WT/ NitH <sup>-</sup>
<b>Asimilación de cianuro</b>								
H9N5E0	BN5_1630	Sigma 54-dependent transcriptional regulator NitA						
H9N5E2	BN5_1631	Uncharacterized protein NitB	Red	Red	Red	Grey	Yellow	Yellow
H9N5E1	BN5_1632	Nitrilase NitC (EC 3.5.5.7)	Red	Red	Red	Red	Yellow	Yellow
H9N5E3	BN5_1633	Member superfamily S-adenosylmethionina NitD (EC 2.1.1.-)	Red	Grey	Red	Red	Red	Red
H9N5E4	BN5_1634	GCN5-related N-acetyltransferase NitE	Red	Red	Red	Red	Red	Red
H9N5E5	BN5_1635	Protein domain family AIRS/GARS NitF	Red	Grey	Red	Red	Yellow	Yellow
H9N5D9	BN5_1636	Uncharacterized protein NitG	Red	Red	Red	Red	Red	Red
H9N5D8	BN5_1637	FAD dependent oxidoreductase NitH	Red	Red	Red	Red	Red	Red
<b>Resistencia a cianuro</b>								
W6QWX1	BN5_1899	GntR family transcriptional regulator MocR1	Red	Grey	Red	Red	Red	Red
W6RF17	BN5_1900	Sulfite reductase (NADPH) hemoprotein CysI3 (EC 1.8.1.2)	Red	Yellow	Grey	Yellow	Orange	Orange
W6R254	BN5_1902	Terminal oxidase subunit I CioA3 (EC 7.1.1.7)	Red					
W6QVH5	BN5_1903	Cytochrome <i>d</i> ubiquinol oxidase, subunit II CioB3 (EC 7.1.1.7)						
W6QWX6	BN5_1904	Phosphoserine aminotransferase SerC3 (EC 2.6.1.52)	Red	Yellow	Grey	Grey	Yellow	Yellow
W6RF21	BN5_1905	Histidinol-phosphate aminotransferase HisC3 (EC 2.6.1.9)	Red	Yellow	Grey	Grey	Yellow	Yellow
W6QU95	BN5_1906	Acetylornithine aminotransferase ArgD (EC 2.6.1.11)	Red	Yellow	Grey	Yellow	Yellow	Yellow
W6R260	BN5_1907	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase DapA (EC 4.3.3.7)	Red	Grey	Grey	Grey	Yellow	Yellow
W6QVI0	BN5_1908	High-affinity glucose transporter						
W6QWY1	BN5_1909	Methylenetetrahydrofolate reductase MetF (EC 1.5.1.20)	Red	Orange	Grey	Orange	Orange	Grey
W6RF25	BN5_1910	Cysteine synthase CysM3 (EC 2.5.1.144)						
W6R265	BN5_1912	Nitrilase Nit4 (EC 3.5.5.1)	Red	Grey	Grey	Yellow	Yellow	Yellow
<b>Asimilación de cianato</b>								
W6QRB2	BN5_0438	Fis family transcriptional regulator CynF						
W6QST4	BN5_0439	ABC-type transporter periplasmic component protein CynA	Red	Yellow	Grey	Grey	Yellow	Yellow
W6RB18	BN5_0440	ABC transporter inner membrane subunit protein CynB	Red	Red	Red	Red	Red	Red
W6QQ36	BN5_0441	ABC transporter/ATPase component protein CynD (EC 7.3.2.4)	Red	Yellow	Grey	Grey	Yellow	Yellow
W6QY14	BN5_0442	Cyanase CynS (EC 4.2.1.104)	Red	Red	Grey	Grey	Yellow	Yellow
<b>Homeostasis de metales</b>								
W6QQS0	BN5_0248	ABC iron transporter	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QXN1	BN5_0307	TonB domain protein	Red	Red	Grey	Grey	Red	Red
W6QV91	BN5_0637	Magnesium and cobalt exporter, CNNM family	Red	Red	Red	Red	Red	Red
W6QYV6	BN5_0702	P-type Cu <sup>+</sup> transporter CopA (EC 7.2.2.8)	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QZB3	BN5_0907	Ferric uptake regulation protein FUR	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QRZ4	BN5_1118	Iron (III) ABC transporter, ATP-binding protein (EC 7.2.2.8)	Yellow	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6QX80	BN5_2026	Sulfite reductase (Ferredoxin) (EC 1.8.1.2)	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QVY0	BN5_2075	Heavy metal sensor kinase CopS (EC 2.7.13.3)	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QXC9	BN5_2076	Transcriptional activator CopR	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QXD3	BN5_2081	P-type Cu <sup>+</sup> transporter (EC 7.2.2.8)	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QVZ2	BN5_2090	Copper-resistance protein CopA	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey

			WT CN/ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	WT/ NitA	WT/ NitB	WT/ NitC	WT/ NitE	WT/ NitH
W6RFJ3	BN5_2092	Copper resistance B	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QW23	BN5_2131	Zinc transporter	Red	Red	Red	Red	Red	Red
W6RHD6	BN5_2705	Arsenical pump-driving ATPase ArsA	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6R5D0	BN5_3027	ABC-type Fe <sup>3+</sup> transport system	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QYU3	BN5_3091	Ferritin, Dps family protein	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QZE8	BN5_3668	Bacterioferritin (EC 1.16.3.1)	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6R0R1	BN5_3729	Iron-sulfur cluster insertion ErpA	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6R959	BN5_4392	Probable TonB-dependent receptor YncD	Grey	Red	Red	Red	Red	Red
<b>Metabolismo del nitrógeno</b>								
W6QRS6	BN5_0087	L-asparaginase I (EC 3.5.1.1)	Red	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6QS60	BN5_0199	Argininosuccinate lyase ArgH (EC 4.3.2.1)	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QQT1	BN5_0263	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QXX9	BN5_0308	Glutathione synthetase GshB1 (EC 6.3.2.3)	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QY09	BN5_0437	Glutamate synthase (NADPH) small subunit (EC 1.4.1.13)	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6RBC9	BN5_0552	Urease accessory protein UreG	Red	Orange	Grey	Grey	Orange	Grey
W6QYD7	BN5_0554	Urease accessory protein UreE	Red	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6QQF7	BN5_0578	Urease UreA (EC 3.5.1.5)	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QQZ6	BN5_0736	Nitrilase/cyanide hydratase and protein N-acyltransferase Nit5 (EC 3.5.1.128)	Red	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6QUY5	BN5_1196	Nitrilase Nit6 (EC 3.5.-.-)	Yellow	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6QUU3	BN5_2114	Nitrate transporter periplasmic component NasF	Grey	Orange	Grey	Grey	Orange	Orange
W6QW12	BN5_2116	Nitrate ABC transporter, ATPase NasD (EC 3.6.3.31)	Red	Orange	Grey	Red	Red	Red
W6RFM9	BN5_2123	Assimilatory nitrite reductase (NAD(P)H) large subunit NasB (EC 1.7.1.4)	Red	Grey	Orange	Red	Red	Red
W6QUV5	BN5_2124	Nitrite reductase (NAD(P)H) small subunit NasG (EC 1.7.1.4)	Red	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6R2U2	BN5_2125	Nitrate reductase NasC (EC 1.7.99.4)	Red	Orange	Grey	Red	Red	Red
W6QXT1	BN5_2227	Nitrate/nitrite sensor NasS	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6RHN5	BN5_2779	Nitrate reductase NapA (EC 1.7.99.4)	Grey	Light Blue	Grey	Light Blue	Light Blue	Light Blue
W6RHY4	BN5_2859	Glutamate synthase (NADPH)	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QZD7	BN5_3251	Nitrilase/cyanide hydratase Nit7	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6RJS0	BN5_3512	PTS IIA-like nitrogen-regulatory protein PtsN (EC 2.7.1.69)	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6R077	BN5_3958	Glutamine synthetase GlnA7 (EC 6.3.1.2)	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6R2P4	BN5_3961	Nitrogen regulation protein sensor histidine kinase NtrB (EC 2.7.13.3)	Orange	Grey	Grey	Grey	Yellow	Yellow
W6RKV8	BN5_3962	Nitrogen regulation protein response regulator NtrC	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6R989	BN5_4427	Bifunctional nitrilase/nitrile hydratase Nit2 (EC 3.5.5.1)	Orange	Grey	Grey	Red	Red	Red
<b>Metabolismo de aminoácidos</b>								
W6RAA1	BN5_0139	Amino acid ABC transporter, solute-binding component	Red	Yellow	Grey	Grey	Yellow	Yellow
W6QQI9	BN5_0142	Amino acid ABC transporter, ATP-binding component (EC 7.4.2.1)	Red	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6QXC5	BN5_0151	Flavin monoamine oxidase-related protein (EC 1.4.3.4)	Orange	Grey	Grey	Grey	Yellow	Yellow
W6QXF0	BN5_0187	Diaminopimelate epimerase (EC 5.1.1.7)	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QQM0	BN5_0188	Diaminopimelate decarboxylase (EC 4.1.1.20)	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QQU2	BN5_0273	Acetylornithine deacetylase (EC 3.5.1.-) (EC 3.5.1.16)	Grey	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6QPR8	BN5_0326	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (EC 3.13.2.1)	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QZB8	BN5_0912	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase DapB (EC 1.17.1.8)	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QUC9	BN5_1488	Arginine/ornithine transport protein (EC 3.6.3.-)	Red	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6R0Z7	BN5_1492	Arginine N-succinyltransferase (EC 2.3.1.109)	Yellow	Grey	Grey	Yellow	Yellow	Yellow
W6QW22	BN5_1602	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (EC 2.8.1.2)	Red	Grey	Red	Red	Red	Red
W6QUY7	BN5_1676	Phosphoserine aminotransferase (EC 2.6.1.52)	Yellow	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QTQ0	BN5_1679	Histidinol-phosphate aminotransferase (EC 2.6.1.9)	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QUB2	BN5_1921	Serine hydroxymethyltransferase GlyA3 (EC 2.1.2.1)	Red	Grey	Red	Red	Red	Red
W6QVU3	BN5_2035	B12-dependent methionine synthase (EC 2.1.1.13)	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QVL9	BN5_2346	Amino acid ABC transporter	White	Dark Blue	White	White	Dark Blue	Dark Blue
W6R4K8	BN5_2718	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase DapA (EC 4.3.3.7)	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QXX6	BN5_2762	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase (EC 2.5.1.54)	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6QZH3	BN5_2843	Amino acid ABC transporter periplasmic protein TctC	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6QXG1	BN5_2990	Branched-chain amino acid transport system	Grey	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6R686	BN5_3331	Arginine deiminase (EC 3.5.3.6)	Grey	Light Blue	Grey	Light Blue	Light Blue	Light Blue
W6QZK4	BN5_3332	Ornithine carbamoyltransferase (EC 2.1.3.3)	Yellow	Light Blue	Grey	Light Blue	Light Blue	Light Blue
W6R008	BN5_3495	Histidinol-phosphate aminotransferase (EC 2.6.1.9)	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6QZR6	BN5_3762	Polyamine-transporting ATPase	White	Dark Blue	White	White	White	White
W6R0A5	BN5_3988	Methionine import ATP-binding protein MetN (EC 3.6.3.-)	Red	Yellow	Grey	Grey	Yellow	Yellow
W6R2H0	BN5_3901	Histidine ammonia-lyase (EC 4.3.1.3)	White	Dark Blue	Dark Blue	White	White	White
W6R1J8	BN5_4065	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisF (EC 4.3.2.10)	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey

## Capítulo III-Resultados

			WT CN/ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	WT/ NitA-	WT/ NitB-	WT/ NitC-	WT/ NitE-	WT/ NitH-
W6R874	BN5_4069	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase (EC 4.2.1.19)						
W6R2F7	BN5_4358	L-serine dehydratase (EC 4.3.1.17)						
<b>Metabolismo de bases/nucleósidos/nucleótidos</b>								
W6QP07	BN5_0064	N <sup>5</sup> -CAIR ribonucleotide synthase (EC 6.3.4.18)						
W6QX02	BN5_0065	N <sup>5</sup> -CAIR ribonucleotide mutase (EC 5.4.99.18)						
W6QS38	BN5_0169	Xanthine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.22)						
W6QXN0	BN5_0302	Dihydroorotase (EC 3.5.2.3)						
W6QQX2	BN5_0303	Aspartate carbamoyltransferase (EC 2.1.3.2)						
W6QSH6	BN5_0329	Dihydropyrimidine dehydrogenase subunit PreT (EC 1.3.1.1)						
W6RAR6	BN5_0330	Dihydropyrimidinase (EC 3.5.2.2)						
W6QPS4	BN5_0331	Permease for cytosine/purines, uracil, thiamine, allantoin						
W6QXQ0	BN5_0332	N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase (EC 3.5.1.87)						
W6QSZ2	BN5_0494	ADP-ribose pyrophosphatase (EC 3.6.1.13)						
W6QQH7	BN5_0598	Glycinamide ribonucleotide synthetase (EC 6.3.4.13)						
W6QTZ4	BN5_0829	Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family						
W6RC47	BN5_0835	General nucleoside ABC transporter						
W6QZK3	BN5_1009	General nucleoside ABC transporter (EC 7.4.2.1)						
W6QT42	BN5_1060	Phosphoribosylformylglycinamide synthase (EC 6.3.5.3)						
W6QRW1	BN5_1068	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase (EC 6.3.1.21)						
W6R0E8	BN5_1290	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta (EC 1.17.4.1)						
W6QTT2	BN5_1291	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit alfa (EC 1.17.4.1)						
W6QVK9	BN5_1424	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase (EC 3.1.5.1)						
W6RHE4	BN5_2716	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase (EC 6.3.2.6)						
W6R581	BN5_2981	Dihydroorotase (EC 3.5.2.3)						
W6QZV0	BN5_3435	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.8)						
W6RL10	BN5_4027	Thymidylate synthase (EC 2.1.1.45)						
W6R8R3	BN5_4212	Orotate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.10)						
W6R8R7	BN5_4217	Guanylate kinase (EC 2.7.4.8)						
<b>Metabolismo del carbono</b>								
W6QRQ2	BN5_0057	Tripartite ATP-independent periplasmic transporter DctQ						
W6QP71	BN5_0124	Malate synthase G (EC 2.3.3.9)						
W6QS11	BN5_0127	Glycolate oxidase FAD binding subunit (EC 1.1.99.14)						
W6QSE5	BN5_0294	Formate dehydrogenase, alpha subunit (EC 1.2.1.2)						
W6RAP3	BN5_0295	Formate dehydrogenase FdhD						
W6RB28	BN5_0450	Citrate transporter DctM						
W6QYF7	BN5_0574	Oxaloacetate decarboxylase (EC 4.1.1.112)						
W6RD81	BN5_1202	Fumarate hydratase class I (EC 4.2.1.2)						
W6QUZ6	BN5_1206	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)						
W6QTU1	BN5_1301	6-phosphogluconolactonase (EC 3.1.1.31)						
W6QV86	BN5_1302	2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase						
W6RE08	BN5_1524	Fumarate hydratase class II (EC 4.2.1.2)						
W6R1L7	BN5_1670	Phosphoglycolate phosphatase (EC 3.1.3.18)						
W6QWH8	BN5_1757	Aconitate hydratase (EC 4.2.1.3)						
W6REY3	BN5_1853	Isocitrate lyase (EC 4.1.3.1)						
W6QU60	BN5_1864	Isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42)						
W6QVH1	BN5_1898	2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase)						
W6QXI3	BN5_2137	Aconitate hydratase (EC 4.2.1.3)						
W6RFP6	BN5_2138	2-methylcitrate synthase (EC 2.3.3.5)						
W6QXN9	BN5_2177	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component (EC 1.2.4.2)						
W6RFX0	BN5_2178	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit (EC 1.3.5.1)						
W6QV55	BN5_2179	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit (EC 1.3.5.1)						
W6R327	BN5_2180	Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor						
W6QXP3	BN5_2182	Citrate synthase (EC 2.3.3.1)						
W6QWP0	BN5_2348	Alcohol dehydrogenase (cytochrome c) (EC1.1.2.8)						
W6QX86	BN5_2542	Aconitase hydratase (EC 4.2.1.3)						
W6QZP0	BN5_2918	Tricarboxylic transport membrane protein						
W6QY63	BN5_3204	Formamidase (EC 3.5.1.49)						
W6QZC3	BN5_3236	Acetamidase/formamidase						
W6R3Q4	BN5_4274	Sialic acid TRAP transporter permease protein SiaT						
W6R3U1	BN5_4309	Oxaloacetate decarboxylase (EC 6.4.1.1)						

			WT CN/ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	WT/ NitA	WT/ NitB	WT/ NitC	WT/ NitE	WT/ NitH
<b>Cadena de transporte electrónico y ATPasa</b>								
W6RDK8	BN5_1353	Cytochrome <i>c</i> oxidase accessory protein CcoG	■	■	■	■	■	■
W6R0P5	BN5_1395	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit B (EC 7.2.1.1)	■	■	■	■	■	■
W6QVI4	BN5_1397	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit D (EC 7.2.1.1)	■	■	■	■	■	■
W6R3F4	BN5_2347	Cytochrome <i>c</i> 550	■	■	■	■	■	■
W6RGI6	BN5_2445	Cytochrome <i>c</i> oxidase, <i>cbb</i> <sub>3</sub> -type, subunit I (EC 7.1.1.9)	■	■	■	■	■	■
W6QVW1	BN5_2446	Cytochrome <i>c</i> oxidase, <i>cbb</i> <sub>3</sub> -type, subunit II	■	■	■	■	■	■
W6QWY4	BN5_2448	Cytochrome <i>c</i> oxidase subunit <i>cbb</i> <sub>3</sub> -type	■	■	■	■	■	■
W6QYC5	BN5_2449	Cytochrome <i>c</i> oxidase accessory protein CcoG	■	■	■	■	■	■
W6RGJ0	BN5_2450	Cytochrome <i>c</i> oxidase accessory protein CcoH	■	■	■	■	■	■
W6R187	BN5_3481	Ubiquinol-cytochrome <i>c</i> reductase iron-sulfur subunit (EC 7.1.1.8)	■	■	■	■	■	■
W6R9G5	BN5_4497	ATP synthase F1 subunit beta	■	■	■	■	■	■
W6R2W1	BN5_4498	ATP synthase gamma chain	■	■	■	■	■	■
W6R4E1	BN5_4499	ATP synthase subunit alpha	■	■	■	■	■	■
W6R9H1	BN5_4502	ATP synthase subunit c	■	■	■	■	■	■
W6R2W6	BN5_4503	ATP synthase F0 subunit a	■	■	■	■	■	■
<b>Metabolismo de polihidroxicanoatos</b>								
W6QSQ4	BN5_0409	Poly(Hydroxyalkanoate) granule-associated protein Phal	■	■	■	■	■	■
W6RAY6	BN5_0410	Poly(Hydroxyalkanoate) granule-associated protein Phaf	■	■	■	■	■	■
W6QR86	BN5_0413	Poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase PhaZ (EC 3.1.1.76)	■	■	■	■	■	■
<b>Biosíntesis de cofactores</b>								
W6QXF9	BN5_0202	Porphobilinogen deaminase HemC	■	■	■	■	■	■
W6QS62	BN5_0204	Uroporphyrinogen-III synthetase (EC 2.1.1.107)	■	■	■	■	■	■
W6QPJ1	BN5_0246	2-octaprenyl-6-methoxyphenyl hydroxylase (EC 1.14.13.-)	■	■	■	■	■	■
W6QSG5	BN5_0319	Adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase (EC 2.6.1.62)	■	■	■	■	■	■
W6RAR3	BN5_0325	Methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.5.1.54)	■	■	■	■	■	■
W6RB74	BN5_0495	Phosphomethylpyrimidine synthase (EC 4.1.99.17)	■	■	■	■	■	■
W6QRK2	BN5_0943	Pantothenate synthetase (EC 6.3.2.1)	■	■	■	■	■	■
W6R034	BN5_1149	Formyltetrahydrofolate deformylase (EC 3.5.1.10)	■	■	■	■	■	■
W6QV91	BN5_1307	Pterin-4- $\alpha$ -carbinolamine dehydratase (EC 4.2.1.96)	■	■	■	■	■	■
W6RE56	BN5_1578	Molybdenum cofactor biosynthesis protein B (EC 2.7.7.75)	■	■	■	■	■	■
W6QTB1	BN5_1579	Molybdopterin molybdochelataze (EC 2.10.1.1)	■	■	■	■	■	■
W6RFE4	BN5_2037	Fe/S biogenesis NfuA	■	■	■	■	■	■
W6QY65	BN5_2379	Phosphomethylpyrimidine synthase (EC 4.1.99.17)	■	■	■	■	■	■
W6QXD1	BN5_2965	Nicotinate phosphoribosyltransferase (EC 6.3.4.21)	■	■	■	■	■	■
W6R051	BN5_3077	7-carboxy-7-deazaguanine synthase (EC 4.3.99.3)	■	■	■	■	■	■
W6R0Q7	BN5_3267	Iron-sulfur cluster assembly scaffold IscU	■	■	■	■	■	■
W6QZN0	BN5_3362	Molybdopterin-synthase adenylyltransferase (EC 2.7.7.80)	■	■	■	■	■	■
W6RK60	BN5_3637	GTP cyclohydrolase-2 (EC 3.5.4.25)	■	■	■	■	■	■
W6R0F5	BN5_3645	Riboflavin synthase, alpha subunit (EC 2.5.1.9)	■	■	■	■	■	■
W6R1P1	BN5_3646	Riboflavin biosynthesis protein RibD (EC 3.5.4.26) (EC 1.1.1.193)	■	■	■	■	■	■
W6RL04	BN5_4022	Dihydrofolate reductase (EC 1.5.1.3)	■	■	■	■	■	■
<b>Metabolismo de ácidos grasos</b>								
W6R1B3	BN5_1600	Long-chain fatty acid transport protein	■	■	■	■	■	■
W6QYI9	BN5_2514	Acyl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.99.-)	■	■	■	■	■	■
W6RK65	BN5_3590	Fatty-acyl-CoA synthase (EC 2.3.1.86)	■	■	■	■	■	■
W6R754	BN5_3592	Acyl-CoA dehydrogenase family protein (EC 1.3.99.41)	■	■	■	■	■	■
<b>Formación de biofilm</b>								
W6R3E2	BN5_4126	Glycosyl transferase (EC 2.4.1.-)	■	■	■	■	■	■
W6RLH0	BN5_4127	Polysaccharide biosynthesis protein PsiH	■	■	■	■	■	■
W6R3E7	BN5_4131	Putative capsule polysaccharide export protein	■	■	■	■	■	■
W6R0Y2	BN5_4133	Mannose-6-phosphate isomerase (EC 2.7.7.22)	■	■	■	■	■	■
<b>Estrés oxidativo</b>								
W6QS83	BN5_0229	Thioredoxin (EC 1.8.1.9)	■	■	■	■	■	■
W6QZK7	BN5_1014	Glutathione S-transferase like protein (EC 2.5.1.18)	■	■	■	■	■	■
W6QUP3	BN5_2063	Glutathione reductase (EC 1.8.1.7)	■	■	■	■	■	■
W6R3L0	BN5_2412	Glutathione S-transferase family protein (EC 2.5.1.18)	■	■	■	■	■	■
W6QZ60	BN5_2720	Alkyl hydroperoxide reductase (EC 1.11.1.15)	■	■	■	■	■	■
W6QZD5	BN5_2808	S-formylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.12)	■	■	■	■	■	■
W6RIJ1	BN5_3035	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F (EC 1.6.4.-)	■	■	■	■	■	■
W6QXK3	BN5_3036	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (EC 1.11.1.15)	■	■	■	■	■	■

Capítulo III-Resultados

			WT CN/ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	WT/ NitA	WT/ NitB	WT/ NitC	WT/ NitE	WT/ NitH
W6QY54	BN5_3194	Spermidine/putrescine import PotA (EC 3.6.3.31)	Orange	Grey	Grey	Grey	Red	Red
W6R0G4	BN5_3650	Thioredoxin (EC 1.8.1.9)	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
W6R1G0	BN5_4020	Lactoylglutathione lyase (EC 4.4.1.5)	Orange	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<b>Procesamiento del RNA</b>								
W6QQY9	BN5_0318	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase E (EC 2.1.1.193)	Red	Grey	Grey	Grey	Red	Red
W6QSK3	BN5_0873	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase C (EC 2.1.1.172)	Orange	Grey	Grey	Grey	Red	Red
W6QU83	BN5_1448	Pseudouridine synthase (EC 5.4.99.-)	Red	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6R1X0	BN5_1810	tRNA 2-selenouridine synthase (EC 2.9.1.-)	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Red
W6QXV6	BN5_2252	tRNA-dihydrouridine synthase (EC 1.3.1.-) (EC 1.3.1.91)	Grey	Grey	Grey	Grey	Red	Red
W6QZL5	BN5_2893	tRNA U34 carboxymethyltransferase (EC 2.5.1.-)	Orange	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6QYB2	BN5_2907	RNA polymerase sigma factor	Red	Grey	Grey	Grey	Red	Red
W6QYB7	BN5_2912	tRNA-modifying protein YgfZ	Red	Grey	Grey	Grey	Yellow	Red
W6QY17	BN5_2982	Ribonuclease T (EC 3.1.13.-)	Red	Grey	Grey	Grey	Red	Red
W6R122	BN5_3411	Pseudouridine synthase (EC 5.4.99.-)	Orange	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6R7I2	BN5_3783	tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase TsaD (EC 2.3.1.234)	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6R7W8	BN5_3954	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase E (EC 2.1.1.166)	Red	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6R199	BN5_3955	23S rRNA methyltransferase (EC 2.1.1.-)	Red	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6RKV5	BN5_3957	tRNA sulfurtransferase (EC 2.8.1.4)	Grey	Grey	Red	Red	Red	Red
W6R2X2	BN5_4508	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl MnmG	Grey	Orange	Grey	Red	Red	Red
<b>Sistema CRISPR</b>								
W6QS95	BN5_0768	CRISPR-associated family protein Cse1	Red	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue
W6RBZ4	BN5_0770	CRISPR-associated family protein CasC	Red	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue
W6QZ01	BN5_0772	CRISPR-associated family protein Cse3	Blue	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue
W6R8X4	BN5_4292	CRISPR-associated family protein Csy1	Grey	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue
W6R2A2	BN5_4293	CRISPR-associated family protein Csy2	Grey	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue
W6R3S5	BN5_4294	CRISPR-associated family protein Csy3	Orange	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue
W6RLS9	BN5_4295	CRISPR-associated family protein Csy4	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue
<b>Quimiotaxis</b>								
W6QPQ3	BN5_0311	Putative CheW protein	Grey	Grey	Blue	Blue	Grey	Grey
W6QTP6	BN5_0719	Extracellular solute-binding protein	Red	Orange	Grey	Grey	Red	Red
W6QU30	BN5_0869	Methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	Grey	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue
W6RDG8	BN5_1303	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer	Grey	Red	Grey	Red	Red	Red
W6QTW8	BN5_1759	Universal stress protein E homolog	Orange	Light Blue	Grey	Grey	Light Blue	Light Blue
W6QYL0	BN5_2543	Aerotaxis receptor	Grey	Light Blue	Grey	Grey	Light Blue	Light Blue
W6QW69	BN5_2580	Twitching motility protein	Red	Grey	Grey	Grey	Red	Red
W6QXH7	BN5_2627	Chemotaxis response regulator	Orange	Light Blue	Grey	Grey	Light Blue	Light Blue
W6QYU0	BN5_2628	Chemotaxis protein CheA (EC 2.7.3.-)	Orange	Light Blue	Grey	Grey	Light Blue	Light Blue
W6QWG1	BN5_2660	Flagellar hook-associated protein 2	Grey	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue
W6QXL4	BN5_2662	Flagellin	Red	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue
W6QWH4	BN5_2670	Flagellar P-ring protein	Grey	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue
W6QZ56	BN5_2679	Chemotaxis protein CheV (EC 2.7.3.-)	Orange	Light Blue	Grey	Red	Light Blue	Light Blue
W6QYP8	BN5_3423	Fimbrial protein pilin	Red	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6R1X7	BN5_4198	Laminin subunit gamma-1	Red	Blue	Grey	Grey	Light Blue	Light Blue
<b>Otras proteínas reguladoras</b>								
W6RAQ0	BN5_0310	Response regulator receiver protein	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6RBU5	BN5_0705	TetR family transcriptional regulator	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6QQY1	BN5_0721	Sensor histidine kinase	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6QYX0	BN5_0722	Two component transcriptional regulator, Fis family	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6QUW6	BN5_1176	Two-component hybrid sensor and regulator	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6RDY8	BN5_1500	Carbon storage regulator homolog CsrA	Orange	Red	Grey	Red	Red	Red
W6R1V0	BN5_1785	Sensory histidine protein kinase ColS	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6R243	BN5_1892	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator Ywbl	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6QY51	BN5_2364	GntR family transcriptional regulator	Orange	Grey	Grey	Red	Red	Red
W6QWV0	BN5_2413	GntR family transcriptional regulator	Grey	Orange	Grey	Grey	Yellow	Yellow
W6QY91	BN5_2414	MarR family transcriptional regulator	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6QVX1	BN5_2456	CRP/FNR family transcriptional regulator	Red	Light Blue	Grey	Light Blue	Light Blue	Light Blue
W6QYR2	BN5_2598	HTH-type transcriptional regulator RutR	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6R5U8	BN5_3157	Histidine kinase	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6QY41	BN5_3189	LysR family transcriptional regulator	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6R153	BN5_3446	Multi-sensor signal transduction histidine kinase	Red	Red	Grey	Red	Red	Red
W6RK05	BN5_3587	Response regulator receiver protein	Red	Red	Grey	Red	Red	Red



aminotransferasa ArgD (W6QU95), 4-hidroxi-tetrahidropicolinato sintasa DapA (W6R260), transportador de glucosa de alta afinidad (W6QVI0), metilentetrahidrofolato reductasa MetF (W6QWY1), cisteína desulfurasa CysM3 (W6RF25) y nitrilasa Nit4 (W6R265) (Fig. 35). La mayoría de estas proteínas de resistencia a cianuro también se encontraron sobreexpresadas o exclusivas en el proteoma de la estirpe WT (vs. mutantes Nit<sup>-</sup>), entre las que se incluyen el regulador MocR (W6QWX1), que estaba presente en el proteoma de WT con respecto al proteoma de todos los mutantes Nit<sup>-</sup> (excepto en el proteoma del mutante NitA<sup>-</sup>), la sulfito reductasa (W6RF17) y ArgD (W6QU95), presentes en el proteoma de WT con respecto al proteoma de todos los mutantes Nit<sup>-</sup> (excepto en el proteoma del mutante NitB<sup>-</sup>) (Fig. 35). Las proteínas SerC3 (W6QWX6) y HisC (W6RF21), se encontraron sobreexpresadas en el proteoma de WT, comparado con proteomas de la mayoría de los mutantes Nit<sup>-</sup> (en 3 proteomas de 5). Curiosamente, la subunidad A de la oxidasa terminal insensible a cianuro CioA3 (W6R254) no varió su expresión en el análisis proteómico (mutantes Nit<sup>-</sup> vs. WT en cianuro) (Fig. 35).

También se han identificado proteínas exclusivas en el proteoma WT/cianuro (vs. amonio), implicadas en la asimilación de cianato, entre las que se incluyen la cianasa CynS (W6QY14) y las tres subunidades del transportador de cianato de tipo ABC CynABD (W6QST4, W6RB18, W6QQ36) (Fig. 35). La gran mayoría de estas proteínas también se encontraron inducidas en el proteoma de la estirpe WT (vs. mutantes Nit<sup>-</sup>), en concreto cuando se comparó el proteoma de WT con los proteomas de los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup>, mientras que cuando se comparó con los proteomas de los mutantes NitB<sup>-</sup> y NitC<sup>-</sup>, estas proteínas no variaron su expresión (Fig. 35).

En relación a la homeostasis de metales, en el proteoma WT/cianuro (vs. amonio), se encontraron proteínas implicadas en la homeostasis de cobre, tales como el regulador CopR (W6QXC9), componentes de un transportador de tipo ABC (W6QXD3, W6QVZ2 y W6RFJ3); de magnesio/cobalto, como el transportador de la familia CNNM (W6QV91); de arsénico, como el componente ATPasa de un transportador de arsenito (W6RHD6); y de hierro, incluyendo la proteína reguladora Fur (W6QZB3), varios transportadores de hierro (W6QQS0, W6QRZ4 y W6R5D0), TonB (W6QXN1) y la proteína almacenadora de hierro ferritina (W6QYU3); además de un transportador inespecífico de metales (W6QW23) (Fig. 35). Por otro lado, en este estudio se encontraron inducidas en el proteoma de WT/cianuro proteínas implicadas en la reparación de centros sulfoférricos, como la proteína ErpA (W6R0R1) (Fig. 35). Además de inducidas en el análisis WT/cianuro (vs. amonio), algunas proteínas se identificaron inducidas en WT/cianuro respecto a los proteomas de la mayoría de los mutantes Nit<sup>-</sup>, tales como el transportador de magnesio/cobalto de la familia CNNM (W6QV91), TonB

(W6QXN1), la proteína ErpA (W6R0R1) y un transportador inespecífico de metales (W6QW23) (Fig. 35). Curiosamente, también inducido en el proteoma de todos los mutantes Nit<sup>-</sup> se identificó un receptor dependiente de TonB (W6R959), el cual no cambió su expresión en el análisis WT cianuro vs. amonio (Fig. 35).

Por otro lado, una gran cantidad de proteínas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno se encontraron sobreexpresadas en el proteoma de la estirpe WT/cianuro (vs. amonio), entre las que destacan el componente citosólico del transportador de nitrato de tipo ABC NasF (W6QUU3) y el componente ATPasa NasD (W6QW12), la nitrato reductasa asimiladora NasC (W6R2U2), la subunidad grande de la nitrito reductasa asimiladora NasB (W6RFM9) y la subunidad pequeña de esta enzima NasG (W6QUU5), tres subunidades de la ureasa (W6RBC9, W6QYD7 y W6QQF7), la asparraginasa (W6QRS6), las nitrilasas/C-N hidrolasas Nit2 (W6R989), Nit5 (W6QQZ6), Nit6 (W6QUY5) y Nit7 (W6QZD7), dos glutamato sintasas/GOGAT (W6RHY4 y W6QY09), dos glutamina sintetasas/GS (W6QQT1 y W6R077), la proteína reguladora NasS (W6QXT1), el sistema regulador NtrBC (W6R2P4 y W6RKV8) y la proteína reguladora PtsN (W6RJS0) (Fig. 35). Por otro lado, la asparraginasa, la subunidad de la ureasa UreE, las nitrilasas/C-N hidrolasas Nit5 y Nit6 y la proteína reguladora PtsN, se encontraron de forma exclusiva en el proteoma de WT, cuando se comparó con los proteomas de la mayoría de los mutantes Nit<sup>-</sup>. Por el contrario, el sensor de nitrato/nitrito NasS (W6QXT1), las dos GS (W6QQT1 y W6R077), las dos GOGAT (W6RHY4 y W6QY09) y la nitrilasa/C-N hidrolasas Nit7 (W6QZD7) no cambiaron su expresión en este análisis. Curiosamente, la nitrato reductasa periplásmica NapA (W6RHN5) se ha encontrado inducida en los proteomas de los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> (Fig. 35), aunque NapA no varió su expresión en el análisis proteómico WT cianuro vs. amonio (Fig. 35).

En el análisis proteómico WT cianuro vs. amonio, varias proteínas inducidas en el proteoma de cianuro están implicadas en el transporte y metabolismo de aminoácidos, principalmente de lisina, tales como la diaminopimelato epimerasa (W6QXF0), la diaminopimelato descarboxilasa (W6QQM0), la 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato reductasa (W6QZB8) y la 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato sintasa (W6R4K8); de la arginina, tales como el transportador de arginina/ornitina (W6QUC9) y la arginina *N*-succiniltransferasa (W6R0Z7); de la serina, como la fosfo-serina aminotransferasa (W6QUY7) y la serina hidroximetiltransferasa (W6QUB2); de aminoácidos aromáticos, como la fosfo-2-dehidro-3-desoxiheptonato aldolasa (W6QXX6); de la histidina, tales como dos histidinolfosfato aminotransferasas (W6QTQ0 y W6R008), la imidazol glicerol-fosfato sintasa (W6R1J8) y la imidazol glicerolfosfato deshidratasa (W6R874); de la cisteína, tales como la *S*-adenosil-*L*-homocisteína hidrolasa (W6QPR8) y la 3-mercaptopiruvato sulfurotransferasa (W6QW22); y de la metionina, como el transportador

de metionina MetN (W6R0A5) (Fig. 35). Algunas de estas proteínas se encontraron sobreexpresadas en el proteoma de la estirpe WT con respecto al de algunos mutantes Nit<sup>-</sup>, como los transportadores de arginina/ornitina (W6QUC9) o el de metionina MetN (W6R0A5), la 3-mercaptopiruvato sulfurotransferasa (W6QW22), la arginina *N*-succiniltransferasa (W6R0Z7), la serina hidroximetiltransferasa (W6QUB2) o la fosfo-2-dehidro-3-deoxiheptonato aldolasa (W6QXX6), esta última sobreexpresada en el proteoma de WT respecto a los proteomas de todos los mutantes Nit<sup>-</sup>. La fosfoserina aminotransferasa y las enzimas implicadas en el metabolismo de la lisina y la histidina no presentaron una expresión diferencial en el análisis proteómico mutantes Nit<sup>-</sup> vs. WT (Fig. 35). Otras proteínas, como un transportador de aminoácidos de tipo ABC (W6QVL9), un transportador de poliaminas (W6QZR6), la arginina desaminasa (W6R686), la histidina amonio-liasa (W6R2H0) o la L-serina deshidratasa (W6R2F7), no variaron su expresión en el estudio WT cianuro vs. amonio, aunque éstas se reprimieron en el proteoma de la estirpe WT cuando se comparó con el proteoma del mutante NitA<sup>-</sup> y con algunos proteomas de otros mutantes Nit<sup>-</sup> (Fig. 35).

En cuanto al metabolismo de bases, nucleósidos y nucleótidos, también se encontraron sobreexpresadas en el proteoma de WT/cianuro (vs. amonio) un transportador de nucleósidos de tipo ABC (W6QZK3), la N<sup>5</sup>-CAIR ribonucleótido sintasa (W6QP07), N<sup>5</sup>-CAIR ribonucleótido mutasa (W6QX02), xantina fosforribosiltransferasa (W6QS38), glicinamida ribonucleótido sintetasa (W6QQH7), oxidorreductasa A/2OG-Fe(II) oxigenasa (W6QTZ4), fosforribosilformilglicinamida sintasa (W6QT42), desoxiguanosinatrifosfato trifosfohidrolasa (W6QVK9), guanilato quinasa (W6R8R7), timidilato sintasa (W6RL10), dihidroorotasa (W6QXN0), aspartato carbamoiltransferasa (W6QXX2), dihidropirimidina deshidrogenasa (W6QSH6) y dihidropirimidinasa (W6RAR6). En el análisis proteómico de los mutantes Nit<sup>-</sup> vs. WT, se encontraron de forma exclusiva o inducida en el proteoma de la estirpe WT, cuando se comparó con los proteomas de los mutantes NitC<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup>, la N<sup>5</sup>-CAIR ribonucleótido mutasa (W6QX02), xantina fosforribosiltransferasa (W6QS38), desoxiguanosinatrifosfato trifosfohidrolasa (W6QVK9), dihidropirimidina deshidrogenasa (W6QSH6) y timidilato sintasa ((W6RL10). La enzima ADP-ribosa pirofosfatasa (W6QSZ2) y un transportador de citosina/purinas/uracilo/tiamina/alantoína (W6QPS4) también se encontraron inducidas en el proteoma de la estirpe WT respecto a los proteomas de estos mutantes, pero no presentaron expresión diferencial en el análisis proteómico WT cianuro vs amonio. Curiosamente, las dos subunidades de la ribonucleósidodifosfato reductasa (W6QTT2 y W6R0E8) se han encontrado inducidas en el proteoma de la estirpe WT, comparado con el proteoma de todos los mutantes Nit<sup>-</sup>, pero no han variado su expresión en el análisis proteómico WT cianuro vs. amonio (Fig. 35).

Por otro lado, entre las proteínas relacionadas con el metabolismo del carbono que se han encontrado inducidas en el proteoma WT/cianuro (vs. amonio), destacan la citrato sintasa (W6RFP6), varias aconitasas (W6QWH8, W6QXI3, W6QX86), la isocitrato deshidrogenasa (W6QU60), la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (W6QXN9), tres subunidades de la succinato deshidrogenasa (W6RFX0, W6QV55 y W6R327), la fumarato hidratasa (W6RD81), la isocitrato liasa (W6REY3), la malato sintasa (W6QP71), la oxalacetato descarboxilasa (W6QYF7), la piruvato quinasa (W6QUZ6), la subunidad de unión a FAD de la glicolato oxidasa (W6QS11), dos subunidades de la formiato deshidrogenasa (W6QSE5 y W6RAP3), el transportador de citrato DctM (W6RB28), el transportador de dicarboxilatos DctQ (W6QRQ2), la fosfoglicolato fosfatasa (W6R1L7) y la 2-dehydro-3-desoxifosfogluconato aldolasa/4-hidroxi-2-oxoglutarato aldolasa (W6QVH1) (Fig. 35). En el análisis proteómico de los mutantes Nit<sup>-</sup> vs. WT, tan solo se encontraron inducidos en el proteoma de la estirpe WT con respecto al proteoma de la mayoría de los mutantes Nit<sup>-</sup>, la formiato deshidrogenasa (W6QSE5), el transportador de citrato DctM (W6RB28), el transportador de dicarboxilatos DctQ (W6QRQ2), la fosfoglicolato fosfatasa (W6R1L7) y la 2-dehydro-3-desoxifosfogluconato aldolasa/4-hidroxi-2-oxoglutarato aldolasa (W6QVH1) (Fig. 35).

En cuanto a la cadena de transporte electrónico y síntesis de ATP, se encontraron inducidas en el proteoma WT cianuro (comparado con WT/ amonio) la ubiquinol-citocromo *c* reductasa (W6R187), un citocromo *c*<sub>550</sub> (W6R3F4), varias subunidades de la citocromo *c* oxidasa Cco (W6RDK8, W6QYC5, y W6RGJ0) y Cbb3 (W6RGI6, W6QVW1 y W6QWY4), varias subunidades de la NADH-quinona reductasa translocadora de sodio (W6R0P5 y W6QVI4) y varios componentes de la ATP sintasa (W6R9G5, W6R2W1, W6R4E1, W6R9H1 y W6R2W6). Por otro lado, la subunidad CcoH de la citocromo *c* oxidasa (W6RGJ0) y la subunidad D de la NADH-quinona reductasa translocadora de sodio (W6QVI4) se encontraron inducidas en la estirpe WT respecto a la mayoría de los mutantes Nit<sup>-</sup> (Fig. 35).

En el análisis proteómico de la estirpe silvestre en medios con cianuro o amonio, se encontraron de forma exclusiva o inducidas por cianuro varias proteínas del metabolismo de polihidroxicanoatos, incluyendo las proteínas asociadas a gránulos de polihidroxicanoatos PhaI (W6QSQ4) y PhaF (W6RAY6), y la polihidroxicanoato despolimerasa PhaZ (W6QR86). Una de las proteínas asociadas a gránulos de polihidroxicanoatos PhaI (W6QSQ4) también se encontró inducida en el proteoma de WT comparado con los proteomas de los mutantes NitA<sup>-</sup> y NitE<sup>-</sup> (Fig. 35).

Relacionadas con la biosíntesis de cofactores se encontraron diversas proteínas inducidas en el proteoma WT/cianuro (vs. amonio), entre las que cabe destacar proteínas de la ruta de síntesis del grupo hemo, porfobilinógeno desaminasa (W6QXF9) y uroporfirinógeno-III

sintetasa (W6QS62); de la biotina, tales como la adenosilmetionina-8-amino-7-oxononanoato aminotransferasa (W6QSG5), de la tiamina, la fosfometilpirimidina sintasa (W6RB74); del tetrahidrofolato, la metilentetrahidrofolato reductasa (W6RAR3), formiltetrahidrofolato desformilasa (W6R034), la 7-carboxi-7-deazaguanina sintasa (W6R051) y la pterina-4alfa-carbinolamina deshidratasa (W6QV91); del pantotenato, la pantotenato sintetasa (W6QRK2); del cofactor de molibdeno, la proteína B (W6RE56), la molibdoquelatasa molibdopterina (W6QTB1) y la molibdopterina sintasa adeniltransferasa (W6QZN0); de centros sulfoférricos, la proteína NfuA (W6RFE4) y la proteína IscU (W6R0Q7); de la riboflavina, la riboflavina sintasa (W6R0F5) y la proteína RibD (W6R1P1); del nicotinato, la nicotinato fosforibosiltransferasa (W6QXD1); y del ácido fólico, la pterina-4alfa-carbinolamina deshidratasa (W6QV91). Algunas de estas proteínas se sobreexpresaron en el proteoma de la estirpe WT con respecto a los proteomas de algunos mutantes Nit<sup>-</sup>, entre la que destacan la adenosilmetionina-8-amino-7-oxononanoato aminotransferasa (W6QSG5), la nicotinato fosforibosiltransferasa (W6QXD1), la 7-carboxi-7-deazaguanina sintasa (W6R051), la riboflavina sintasa (W6R0F5), la proteína IscU (W6R0Q7), la proteína NfuA (W6RFE4), la fosfometilpirimidina sintasa (W6RB74) y la pterina-4alfa-carbinolamina deshidratasa (W6QV91). Por el contrario, la dihidrofolato reductasa (W6RL04) se encontró reprimida en el proteoma de la estirpe WT con respecto a los proteomas de los mutantes NitC<sup>-</sup> y NitE<sup>-</sup>. La mayoría de las proteínas inducidas por cianuro en el análisis WT cianuro vs. amonio, no cambiaron su expresión en el estudio mutantes Nit<sup>-</sup> vs. WT cianuro (Fig. 35).

Un gran número de proteínas sobreexpresadas por cianuro en el proteoma de la estirpe WT (vs. amonio), participan en la defensa frente al estrés oxidativo, entre las que se encontraron dos tiorredoxinas (W6QS83 y W6R0G4), la superóxido dismutasa (W6R013) y alquilhidroperóxido reductasas (W6QZ60, W6RIJ1 y W6QXK3). Algunas de estas proteínas también se sobreexpresaron en la estirpe WT respecto a algunos mutantes Nit<sup>-</sup>, principalmente en los proteomas de los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> (Fig. 35).

Algunas proteínas del sistema CRISPR (W6RBZ4 y W6R3S5) se sobreexpresaron en el proteoma WT/cianuro, mientras que la proteína W6QZ01 se reguló negativamente por cianuro en el análisis WT (cianuro vs. amonio). Estas proteínas también se sobreexpresaron en los proteomas de la mayoría de los mutantes Nit<sup>-</sup> (3 proteomas de 5) con respecto a la estirpe WT. Por otro lado, proteínas pertenecientes a este sistema que no variaron su expresión en el estudio WT cianuro vs. amonio, sí mostraron inducción en los proteomas de la mayoría de los mutantes Nit<sup>-</sup>, entre las que se incluyen las proteínas W6QS95, W6R8X4, WR2A2 y W6RLS9 (Fig. 35). Otras proteínas que se encontraron inducidas por cianuro en el análisis proteómico de la estirpe silvestre (amonio vs cianuro) correspondieron a aquellas involucradas

en quimiotaxis. La mayoría de estas se encontraron reguladas negativamente en la estirpe WT respecto a los proteomas de la mayoría de mutantes Nit<sup>-</sup> (Fig. 35).

Otras proteínas inducidas por cianuro en el análisis WT cianuro vs. amonio fueron *N*-acetiltransferasa de la familia GCN5 (W6RA13) y diguanilato ciclase (W6R067), entre otras. La mayoría de estas proteínas se sobreexpresaron en la estirpe WT respecto a diferentes mutantes Nit<sup>-</sup> (Fig. 35).

Por último, y en cuanto a proteínas reguladoras que se encontraron sobreexpresadas en el proteoma WT/cianuro, se incluyen reguladores transcripcionales de las familias TetR (W6RBU5), Fis (W6QYX0), GntR (W6QY51, W6QWV0), MarR (W6QY91, W6QZ93), CRP/FNR (W6QVX1), LysR (W6QY41), IclR (W6RK21) y CsrA (W6RDY8). La mayoría de estas proteínas se sobreexpresaron en el proteoma de la estirpe WT, principalmente cuando se comparó con los proteomas de los mutantes NitC<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup>. Los reguladores W6QUW6, W6R243, W6QY91 y W6QY41 se sobreexpresaron en la estirpe WT comparada con todos los mutantes Nit<sup>-</sup>. Por el contrario, el regulador de tipo CNP/FNR (W6QVX1) se sobreexpresó solo en los mutantes NitA<sup>-</sup> y NitE<sup>-</sup>.

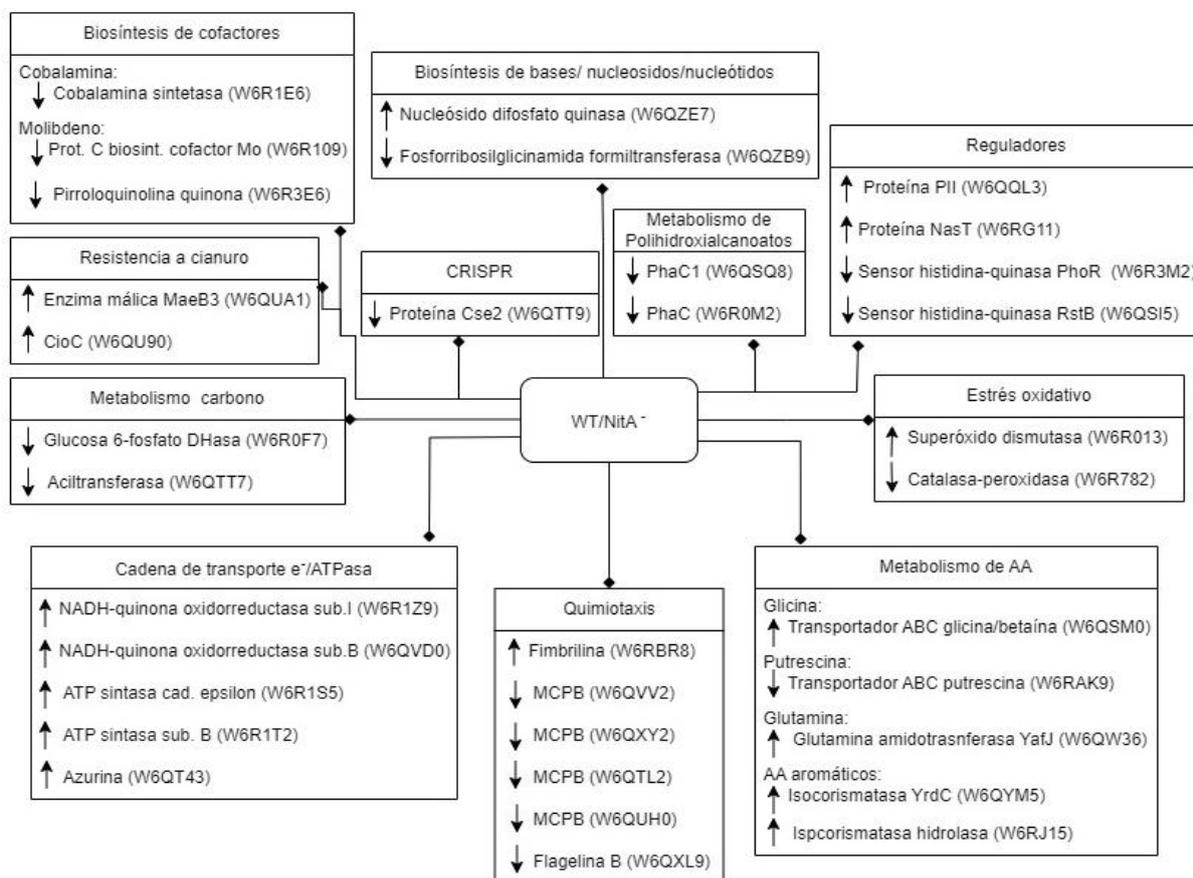
---

### **Análisis de las proteínas con expresión diferencial identificadas específicamente en el proteoma de cada mutante Nit<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344**

---

Cuando se compararon los proteomas del mutante NitA<sup>-</sup> y de la estirpe WT de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, el número de proteínas con expresión diferencial fue 383, de las que 156 sólo se identificaron de forma específica en el análisis NitA<sup>-</sup> vs. WT (Tabla S4). Las proteínas inducidas en la estirpe WT (o reprimidas en el mutante NitA<sup>-</sup>) estaban relacionadas con la resistencia a cianuro, como la enzima málica MaeB3 (W6QUA1) y un componente de la oxidasa terminal insensible a cianuro CioC (W6QU90); con el transporte y metabolismo de aminoácidos como la glicina, incluyendo el transportador de glicina/betaína (W6QSM0); de putrescina, como el transportador de putrescina (W6RAK9); de la glutamina, incluyendo la glutamina amidotransferasa (W6QW36); y de aminoácidos aromáticos, tales como la isocorismatasa (W6QYM5) y la isocorismatasa hidrolasa (W6RJ15) (Fig. 36). También se encontraron inducidas en el proteoma de la estirpe WT proteínas implicadas en el metabolismo de bases/nucleósidos/nucleótidos, como la nucleósido-difosfato quinasa (W6QZE7); en la cadena de transporte electrónico y síntesis de ATP, como las subunidades de la NADH-quinona oxidoreductasa (W6R1Z9 y W6QVDO), las subunidades beta y epsilon de la ATP sintasa (W6R1S5 y W6R1T2) y la azurina (W6QT43); y de respuesta a estrés oxidativo, como la superóxido dismutasa (W6R013). Además, inducidas en el proteoma de la

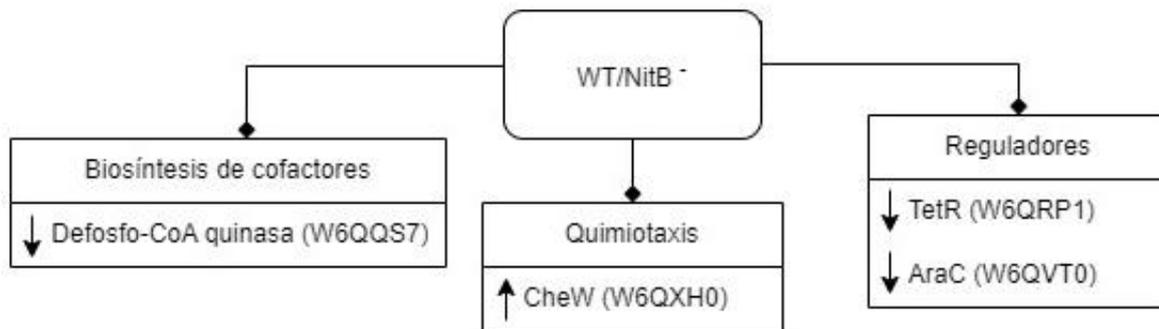
estirpe WT (vs. NitA<sup>-</sup>) se identificaron proteínas reguladoras, tales como la proteína reguladora del metabolismo del nitrógeno PII (W6QQL3), la proteína antiterminadora de la transcripción con dominio ANTAR NasT (W6RG11) (Fig. 36). Entre las proteínas reguladas positivamente en el mutante NitA<sup>-</sup> (o reprimidas en WT) de biosíntesis *de novo* de purinas, como la fosforribosilglicinamidaformil transferasa (BN5\_2793/W6QZB9); del metabolismo del carbono, tales como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (W6R0F7); de la síntesis de polihidroxicanoatos, incluyendo la polihidroxicanoato polimerasa PhaC1 (W6QSQ8) y la polihidroxicanoato sintasa PhaC (W6R0M2); de biosíntesis de cofactores, incluyendo del grupo hemo la proteína E de biosíntesis de pirroquinolina quinona (W6R3E6), del molibdeno la proteína C (W6R109), y de la cobalamina la cobalamina sintetasa (W6R1E6); proteínas asociadas al sistema CRISPR (W6QTT9); y reguladores como PhoR (W6R3M2) (Fig. 36).



**Figura 36. Proteínas relevantes expresadas diferencialmente entre la estirpe WT comparada con el proteoma del mutante NitA<sup>-</sup> *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.** Las flechas hacia arriba significan inducción (sobreexpresión o exclusividad) en el proteoma de la estirpe WT comparado con el proteoma de la estirpe mutante NitA<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Las flechas hacia abajo representan represión en el proteoma de WT, comparado con el proteoma del mutante NitA<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

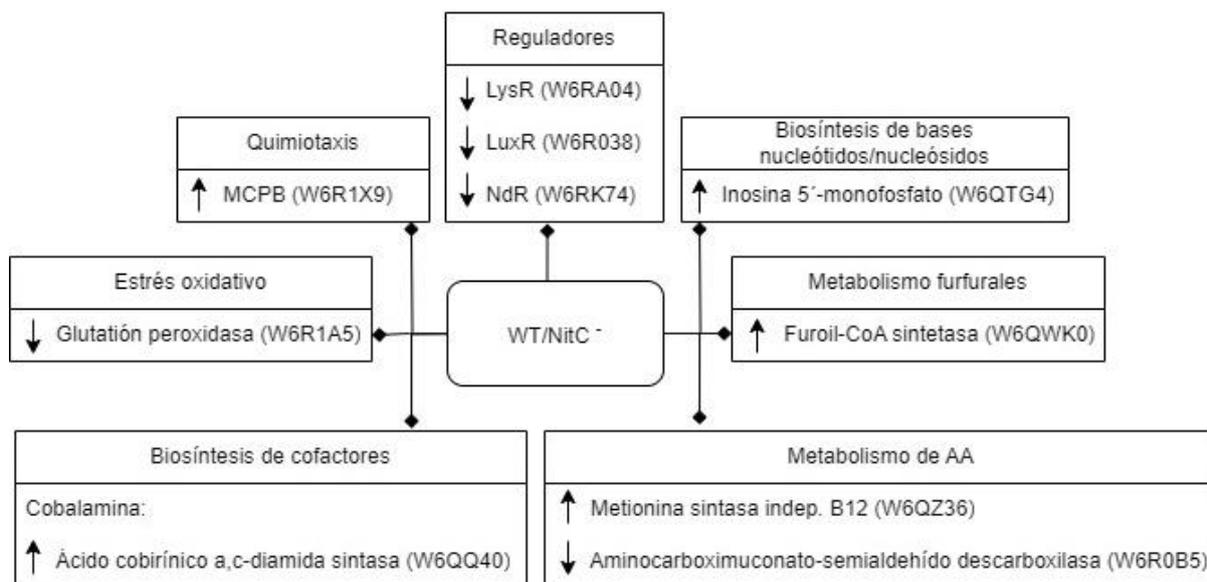
En el análisis comparativo NitB<sup>-</sup> vs. WT se identificaron de forma específica 11 proteínas expresión diferencial entre las que se incluyeron una proteína relacionada con la quimiotaxis, CheW (W6Q40), que se encontró inducida en la estirpe WT (Fig. 37), mientras que otras se

encontraron reprimidas en el proteoma de WT, incluyendo la pantotenato/CoA defosfo-CoA quinasa (W6QQS7) y los reguladores TetR (W6QRP1) y AraC (W6QVT0) (Fig. 37; Tabla S5).



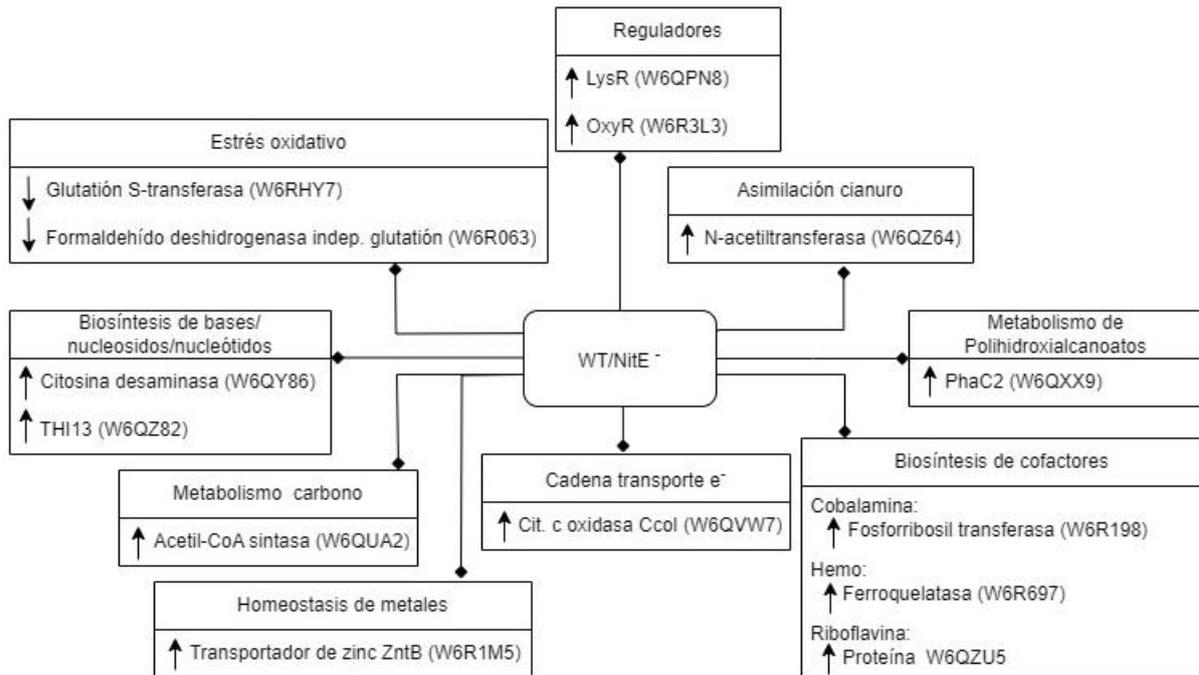
**Figura 37. Proteínas relevantes expresadas diferencialmente entre la estirpe WT comparada con el proteoma del mutante NitB<sup>-</sup> *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.** Las flechas hacia arriba significan inducción (sobreexpresión o exclusividad) en el proteoma de la estirpe WT comparado con el proteoma de la estirpe mutante NitB<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Las flechas hacia abajo representan represión en el proteoma de WT, comparado con el proteoma del mutante NitB<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

En el análisis proteómico WT vs NitC<sup>-</sup> (Tabla S6) se identificaron 26 proteínas con expresión diferencial que no se encontraron afectadas en el resto de los estudios proteómicos. De estas, 15 se encontraron reguladas positivamente en la estirpe WT, entre las que se incluyen enzimas que participan en la biosíntesis de purinas, como la inosina-5'-monofosfato (W6QTG4); del metabolismo de aminoácidos, como la metionina sintasa independiente de vitamina B12 (W6QZ36); del metabolismo del carbono/degradación de furfurales, la furoil-CoA sintetasa (W6QWK0); biosíntesis de cobalamina, incluyendo la ácido cobirínico, a, c-diamida sintasa (W6QQ40) y quimiotaxis, proteína McpB (W6R1X9). Entre las 11 proteínas reguladas negativamente en WT (o positivamente en el mutante NitC<sup>-</sup>) se identificaron proteínas implicadas en metabolismo de la lisina/picolinato, como la aminocarboximuconato-semialdehído descarboxilasa (W6R0B5); la glutatión peroxidasa (W6R1A5); y los reguladores transcripcionales LysR (W6RA04), LuxR (W6R038) y NrdR (W6RK74) (Fig. 38, Tabla S6).



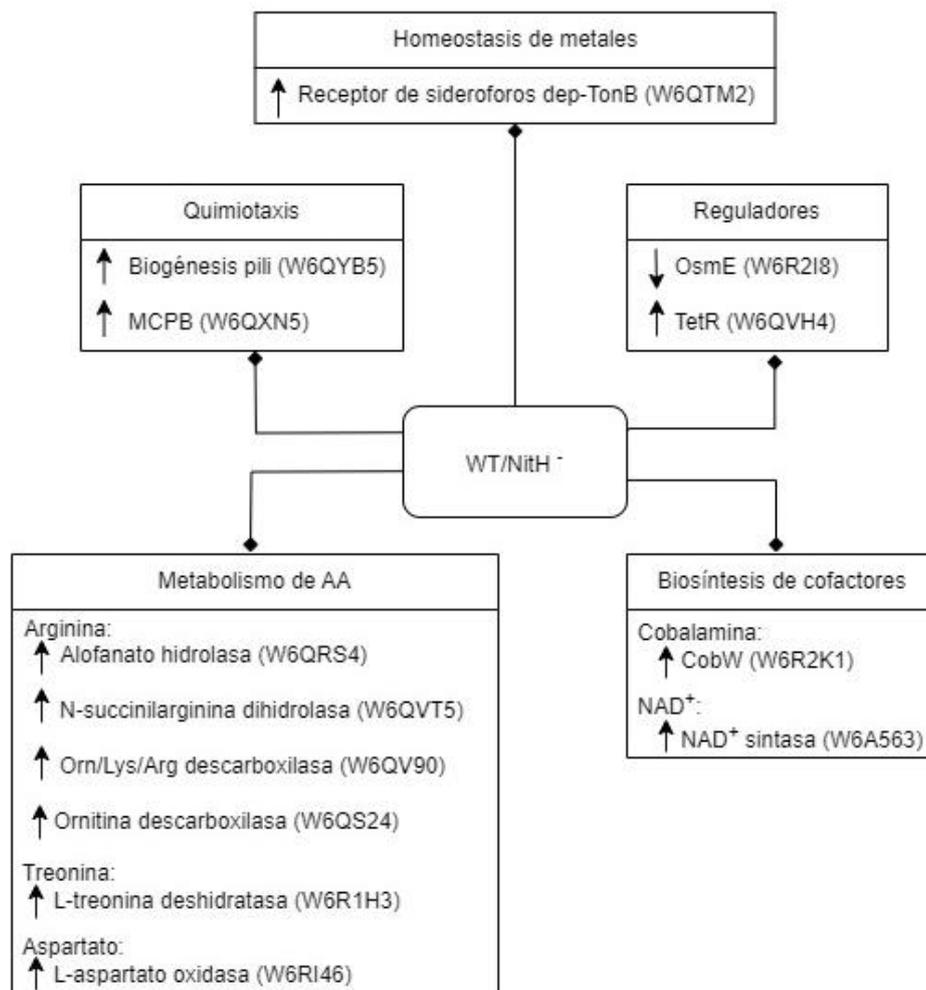
**Figura 38. Proteínas relevantes expresadas diferencialmente entre la estirpe WT comparada con el proteoma del mutante NitC<sup>-</sup> *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.** Las flechas hacia arriba significan inducción (sobrexpresión o exclusividad) en el proteoma de la estirpe WT comparado con el proteoma de la estirpe mutante NitC<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Las flechas hacia abajo representan represión en el proteoma de WT, comparado con el proteoma del mutante NitC<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

En el análisis proteómico comparativo WT vs. NitE<sup>-</sup> en cianuro (Tabla S7) se identificaron 37 proteínas con una expresión diferencial que fueron únicas de este estudio. La gran mayoría de estas proteínas (89 %) se regularon positivamente en la estirpe WT, incluyendo proteínas del proceso asimilación de cianuro, como la *N*-acetiltransferasa de la superfamilia GNAT (W6QZ64); en homeostasis de metales, el transportador de zinc ZntP (W6R1M5); en metabolismo de bases/nucleósidos/nucleótidos, la citosina desaminasa (W6QY86), la proteína THI13 implicada en la síntesis de pirimidina (W6QZ82); en el metabolismo del carbono, la acetil-CoA sintasa (W6QUA2); en la cadena de transporte electrónico, la proteína CcoI (W6QVW7); en la biosíntesis de cofactores, la ferroquelatasa (W6R697), la fosforribosiltransferasa (W6R198) y la proteína W6QZU5 implicada en la síntesis de riboflavina; en síntesis de polihidroxicanoatos de cadena media, la polihidroxicanoato sintasa, clase II PhaC2 (W6QXX9) (Fig. 39). También presentaron una regulación positiva en la estirpe WT, en comparación con el mutante NitE<sup>-</sup>, varios reguladores transcripcionales, tales como LysR (W6QPN8) y OxyR (W6R3L3). Por otro lado, algunas proteínas reprimidas en el proteoma de la estirpe WT (o inducidas en el mutante NitE<sup>-</sup>) fueron la glutación S-transferasa (W6RH7) y la formaldehído deshidrogenasa independiente de glutación (W6R063) (Fig. 39).



**Figura 39. Proteínas relevantes expresadas diferencialmente entre la estirpe WT comparada con el proteoma del mutante NitE<sup>-</sup> *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.** Las flechas hacia arriba significan inducción (sobreexpresión o exclusividad) en el proteoma de la estirpe WT comparado con el proteoma de la estirpe mutante NitE<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Las flechas hacia abajo representan represión en el proteoma de WT, comparado con el proteoma del mutante NitE<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

El análisis proteómico WT vs. NitH<sup>-</sup> (Tabla S8), mostró 41 proteínas diferencialmente expresadas que a su vez no fueron identificadas en otros análisis proteómicos. De éstas, la gran mayoría se encontraron inducidas en el proteoma de la estirpe WT, entre las que se identificaron proteínas implicadas en homeostasis de metales, como el receptor de sideróforos dependiente de TonB (W6QTM2); en el metabolismo de la arginina, tales como la alofanato hidrolasa (W6RS4), la *N*-succinilarginina dihidrolasa (W6QVT5), la ornitina/lisina/arginina descarboxilasa (W6QV90) y otra ornitina descarboxilasa (W6QS24); de la treonina, incluyendo la L-treonina deshidratasa (W6R1H3) y la L-aspartato oxidasa (W6R146); de biosíntesis de cobalamina, como CobW (W6R2K1) y la NAD<sup>+</sup> sintetasa (W6R563); y el regulador TetR (W6QVH4) (Fig. 40). Por el contrario, el regulador OsmE (W6R2I8) se encontró reprimido en el proteoma de la estirpe WT (Fig. 40).



**Figura 40. Proteínas relevantes expresadas diferencialmente entre la estirpe WT comparada con el proteoma del mutante NitH<sup>-</sup> *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.** Las flechas hacia arriba significan inducción (sobreexpresión o exclusividad) en el proteoma de la estirpe WT comparado con el proteoma de la estirpe mutante NitH<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Las flechas hacia abajo representan represión en el proteoma de WT, comparado con el proteoma del mutante NitH<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

## Discusión

La bacteria alcalófila *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es un microorganismo modelo ampliamente estudiado, ya que presenta una resistencia muy elevada al cianuro, hasta 30 mM, asimilándolo como única fuente de nitrógeno mediante la inducción de la nitrilasa NitC (Luque-Almagro *et al.*, 2011b; Estepa *et al.*, 2012). La nitrilasa NitC pertenece a la subfamilia 1 de nitrilasas y está codificada por el gen *nitC* de la agrupación génica *nit1C*. Esta agrupación génica se encuentra muy conservada en diferentes phyla de bacterias (Podar *et al.*, 2005). Entre las proteínas codificadas por la agrupación génica *nit1C* se encuentran el regulador transcripcional NitA de tipo Fis y dependiente de  $\sigma^{54}$ , la nitrilasa NitC, la proteína de la superfamilia de enzimas dependientes de S-adenosilmetionina NitD, la N-acetiltransferasa de la familia GNAT NitE, la proteína con actividad 5'-aminoimidazol ribonucleótido sintetasa (fosforribosilformilglicinamida ciclo-ligasa; AIRS) NitF, la oxidorreductasa dependiente de FAD NitH y las proteínas de función desconocida NitB y NitG. Los genes estructurales *nitBCDEFGH* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se cotranscriben y se inducen por cianuro, aunque hay un cierto nivel basal de este transcrito en hambre de nitrógeno, mientras que se reprimen por amonio (resultados no publicados del grupo de investigación BIO117). Si bien la diversidad de transformaciones que podrían llevar a cabo las proteínas Nit no permite predecir una posible función de éstas en base a su homología con otras proteínas Nit presentes en otros géneros bacterianos, como *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Verrucomicrobium*, *Synechocystis*, *Synechococcus* y *Photorhabdus*, aunque su conservación en estos microorganismos podría deberse a la presión selectiva ejercida por el cianuro y a la necesidad de supervivencia en presencia de éste.

En *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y *P. fluorescens* NCIMB 11764 se ha descrito que la nitrilasa NitC participa en la asimilación de cianuro (Kunz *et al.*, 1998; Estepa *et al.*, 2012). Además, mutantes de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en los genes *nitA*, *nitB* y *nitC* perdieron la capacidad de asimilar cianuro de forma eficiente (Estepa *et al.*, 2012). Considerando estos resultados previos, una de las hipótesis iniciales de este trabajo se basó en demostrar que todos los genes pertenecientes a la agrupación génica *nit1C* están involucrados en la asimilación de cianuro. En este trabajo se ha ampliado el número de mutantes deficientes en proteínas codificadas por la agrupación génica *nit1C*, obteniéndose mediante análisis mutacional las estirpes NitD<sup>-</sup> y NitF<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Fig. 28 y 29). Además, se ha procedido a la caracterización fisiológica de todos los mutantes Nit<sup>-</sup>, de los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitB<sup>-</sup> y NitC<sup>-</sup>, previamente descritos en otros trabajos, de los mutantes NitE<sup>-</sup>, NitG<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup>, disponibles en el grupo de investigación BIO117 y de los mutantes NitD<sup>-</sup> y NitF<sup>-</sup>, realizados en este trabajo. Para llevar a cabo el análisis fisiológico de los mutantes Nit<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en presencia de amonio o cianuro,

como única fuente de nitrógeno, las células se precultivaron en cloruro de amonio 2 mM. Cuando éste se consumió (transcurridas aproximadamente 24 h) y alcanzándose una situación de hambre de nitrógeno, se procedió a añadir a los cultivos cianuro sódico o cloruro amónico a una concentración 2 mM (este fue considerado el tiempo cero de las curvas de crecimiento). En medios con amonio se observó que todos los mutantes eran capaces de crecer y consumir esta fuente de nitrógeno de forma similar a la estirpe silvestre. En cuanto a la caracterización de los mutantes Nit<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en presencia de cianuro, como única fuente de nitrógeno, se encontró que los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitB<sup>-</sup>, NitC<sup>-</sup>, NitD<sup>-</sup> y NitE<sup>-</sup> presentaron un crecimiento claramente inferior al mostrado por la estirpe silvestre, mientras que los mutantes NitF<sup>-</sup>, NitG<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> alcanzaron un crecimiento más próximo al de la estirpe WT (Fig. 30). En cuanto al consumo de cianuro del medio, se observó una bajada inicial de la concentración de cianuro en la estirpe WT y en los mutantes Nit<sup>-</sup>, posiblemente debido a la reacción química ente el 2-oxoglutarato del medio y el cianuro. Previamente se ha demostrado que en condiciones de hambre de nitrógeno la estirpe CECT 5344 acumula 2-oxoglutarato en respuesta a la limitación de este nutriente (Estepa *et al.*, 2012). Transcurrida esta fase inicial, las estirpes WT y NitG<sup>-</sup> fueron capaces de consumir completamente el cianuro, mientras que el resto de mutantes Nit<sup>-</sup> fueron incapaces de consumir todo el cianuro del medio (Fig. 30). Estos resultados apoyan estudios previos sobre el papel relevante de las proteínas NitA, NitB y NitC en la asimilación de cianuro, y, además, sugiere que las proteínas NitD, NitE y NitH también podrían ser necesarias para la asimilación de cianuro en la estirpe CECT 5344. Cuando se determinó la actividad nitrilasa específica NitC, se observó que el mutante NitG<sup>-</sup> presentó una actividad similar a la del WT, indicando que la proteína NitG no es esencial para la degradación de cianuro en la estirpe CECT 5344. La actividad nitrilasa del mutante NitH<sup>-</sup> resultó ser un 80 % de la de WT, los mutantes NitD<sup>-</sup> y NitF<sup>-</sup> mostraron una actividad entre el 45-52 % de la mostrada por WT, mientras que los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitB<sup>-</sup>, NitC<sup>-</sup> y NitE<sup>-</sup> tan solo mostraron una actividad residual (Tabla 13). Estos resultados demuestran que, aunque las proteínas NitD y NitF pueden ser requeridas para llevar a cabo una degradación óptima de cianuro por la estirpe CECT 5344, éstas no son esenciales para este proceso degradativo, al contrario que las proteínas NitA, NitB, NitC y NitE. La considerable pérdida de actividad nitrilasa en los mutantes NitB y NitC, junto con la ausencia de función conocida para la proteína NitB, podrían sugerir la posible formación de un complejo enzimático NitB/NitC, aunque estudios posteriores son necesarios para determinar esta hipótesis. Por otro lado, la actividad nitrilasa basal observada en los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitB<sup>-</sup>, NitC<sup>-</sup> y NitE<sup>-</sup> sugiere la posibilidad de que en dichos mutantes se exprese otra enzima con actividad nitrilasa que podría ser la responsable del escaso crecimiento de dichos mutantes en medios con cianuro, aunque podría ser relevante para la resistencia a cianuro de estas estirpes mutantes Nit<sup>-</sup>.

En este trabajo se han realizado distintos análisis proteómicos, por un lado, se ha comparado los proteomas de WT en cianuro y amonio; y, por otro lado, los proteomas de los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitB<sup>-</sup>, NitC<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> y el proteoma de WT en cianuro. Estos estudios han permitido conocer los mecanismos moleculares que intervienen en la biodegradación de cianuro en la estirpe CECT 5344 y el papel que juegan las proteínas Nit en este proceso. En estudios anteriores se identificó el proteoma de la estirpe CECT 5344 cultivada en condiciones cianotróficas utilizando electroforesis bidimensional de limitada resolución, y en un trabajo posterior se llevó a cabo un análisis proteómico cuantitativo mediante LC-MS/MS utilizando el residuo cianurado de la joyería como fuente de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2008; Ibáñez *et al.*, 2017). En este trabajo se ha realizado un análisis proteómico cuantitativo sin marcaje de la bacteria *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivada en medio mínimo con cianuro sódico frente a amonio como condición control, utilizando una técnica más resolutoria, lo que ha permitido identificar un mayor número de proteínas y caracterizar los procesos metabólicos necesarios que posibilitan la resistencia y asimilación de cianuro. De las 1 246 proteínas identificadas con expresión diferencial del proteoma de la estirpe WT con cianuro o con amonio, el 96 % presentó una regulación positiva por cianuro, con 324 proteínas exclusivas en cianuro y 875 sobreexpresadas en esta condición (Fig. 31). Considerando que hay 4 431 proteínas codificadas por el genoma de la estirpe CECT 5344, en este análisis se ha identificado el 28,12 % del total de proteínas, lo que indica que el cianuro tiene un efecto inductor considerable sobre el proteoma de la estirpe CECT 5344, y esto pone de manifiesto la complejidad de los mecanismos que la bacteria utiliza para contrarrestar el efecto tóxico de este compuesto y llevar a cabo su asimilación. Por otro lado, en el análisis proteómico WT vs. mutantes Nit<sup>-</sup>, se encontró que el número de proteínas con expresión diferencial fue similar, excepto en el proteoma del mutante NitB<sup>-</sup>, con un número de proteínas considerablemente inferior (Tabla 14). Este resultado está reforzado por el análisis de componentes principales (PCA) de los datos proteómicos obtenidos para los mutantes Nit<sup>-</sup> y la estirpe WT, en el que situó el proteoma del mutante NitB<sup>-</sup> próximo al de la estirpe WT (Fig. 32). Estos resultados sugieren que, a diferencia de las proteínas NitA, NitC, NitE y NitH, la proteína NitB tiene una función específica sin gran repercusión sobre otros procesos biológicos. En los mutantes NitB<sup>-</sup>, NitC<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup>, las proteínas con expresión diferencial fueron en su mayoría (77-93 %) reguladas negativamente en los mutantes (Tabla 14). Por lo tanto, la pérdida de cada una de estas proteínas Nit de forma individual o conjunta provoca un efecto negativo desde un punto de vista proteómico. La pérdida de la proteína reguladora NitA no tuvo este efecto tan negativo, ya que el número de proteínas con expresión diferencial, tanto inducidas como reprimidas en el mutante NitA, se encontró más equilibrado (Tabla 14). El análisis de las proteínas con expresión diferencial entre los distintos mutantes Nit<sup>-</sup> y la estirpe WT también reveló que 389 de estas proteínas se encontraron afectadas en varios mutantes Nit<sup>-</sup>

(Fig. 33). El mayor número de proteínas compartidas se encontró entre los mutantes NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> (Fig. 33). Este resultado confirmó la estrecha posición de los proteomas de estos dos mutantes en el análisis PCA (Fig. 32). Este análisis también mostró que el proteoma del mutante NitA<sup>-</sup> se encontraba alejado tanto de la estirpe silvestre como del resto de mutantes Nit<sup>-</sup>, probablemente debido a la naturaleza reguladora de la proteína NitA como activador transcripcional en respuesta a cianuro. Por lo tanto, la proteína NitA podría regular, además de la expresión de los genes pertenecientes a la agrupación génica *nit1C*, la expresión de otros genes implicados en procesos de carácter más general que podrían estar directa o indirectamente relacionados con la resistencia y asimilación de cianuro en la estirpe CECT 5344. El análisis de componentes principales realizado con los resultados proteómicos reveló que en todos los casos las réplicas biológicas se encontraron agrupadas, lo que confirmó la validez de los análisis proteómicos realizados (Fig. 32).

Una gran cantidad de procesos metabólicos se inducen en la estirpe WT en respuesta a cianuro (vs. amonio), incluyendo todas proteínas estructurales Nit (Fig. 35), las cuales están codificadas por la agrupación génica *nit1C*, y que están implicadas con una mayor o menor relevancia, como se ha mencionado anteriormente, en la asimilación de cianuro. En el estudio comparativo entre WT vs. mutantes Nit<sup>-</sup> la gran mayoría de proteínas con expresión diferencial se encontraron inducidas/exclusivas en WT (o reprimidas/ausentes en los proteomas de los mutantes Nit<sup>-</sup>) (Fig. 35). Es de resaltar que la mutación de los genes *nit* conlleva no sólo la pérdida de la proteína codificada por el gen mutado, sino también la represión e incluso la pérdida de otras proteínas Nit podrían estar relacionadas entre sí. Se descartó que este resultado se debiese a un efecto polar de las mutaciones sobre los genes situados aguas debajo de las mutaciones, ya que todos los mutantes analizados en este trabajo fueron construidos insertando el casete de resistencia a antibióticos en la misma orientación que el gen mutado, orientación en la que se ha demostrado que estos casetes no presentan efecto polar. Además, el efecto represor de las mutaciones se observó incluso sobre proteínas codificadas por genes situados aguas arriba del gen mutado. En el caso de la interacción de las proteínas NitB y NitC podría explicarse por la posibilidad de que estén formando un complejo enzimático, como se ha mencionado anteriormente, ya que esta hipótesis también explicaría la ausencia de la actividad nitrilasa en los mutantes NitB<sup>-</sup> y NitC<sup>-</sup> (Tabla 13). Curiosamente, en el proteoma del mutante NitA<sup>-</sup>, tan solo se han encontrado ausentes las proteínas NitB, NitC y NitH (o exclusivas en la estirpe WT), un efecto negativo de la mutación que podría deberse al papel inductor de NitA sobre la agrupación génica *nit1C*, aunque hasta el momento no se ha demostrado de forma experimental su posible función como regulador positivo.

Por otro lado, en el análisis WT cianuro vs. amonio se han identificado una gran cantidad de proteínas exclusivas del proteoma en cianuro que están implicadas en la resistencia a este compuesto y que están codificadas por la agrupación génica *cioAB-nit4* (Fig. 35), lo que indica que estos genes tienen un papel relevante en la resistencia y detoxificación de cianuro. En esta agrupación génica se encuentran los genes *cioAB* que codifican la oxidasa terminal insensible a cianuro, esencial para la respiración celular en presencia de cianuro. Además, en esta agrupación génica, como se ha mencionado en el capítulo II, se encuentra codificada la nitrilasa Nit4, la cual usa el cianoderivado 3-cianoalanina como sustrato (Acera *et al.*, 2017; Pérez *et al.*, 2021), aunque este compuesto se ha descartado como posible intermediario en la degradación de cianuro en la estirpe CECT5344, demostrándose que la 3-cianoalanina es asimilada a través de la nitrilasa Nit4 en presencia de cianuro, mientras que es NitC es la enzima la que la metaboliza en ausencia de cianuro (Pérez *et al.*, 2021). También se encuentran de forma exclusiva en WT/cianuro (vs. amonio), las proteínas codificadas por la agrupación génica *cioAB-nit4* que participan en el metabolismo de aminoácidos, como la metionina sintasa independiente de vitamina B12 MetE, la fosfoserina aminotransferasa SerC3, la histidinol-fosfato aminotransferasa HisC3, la acetilornitina aminotransferasa ArgD, la 4-hidroxitetrahidropicolinato sintasa DapA, entre otras. La caracterización fisiológica y proteómica del mutante DapA<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 ha permitido demostrar que la 4-hidroxitetrahidropicolinato sintasa es esencial para la síntesis de lisina, pero también para la producción de dipicolinato, un quelante intracelular de hierro esencial en presencia de cianuro, ya que este compuesto presenta una alta afinidad por metales, comprometiendo su biodisponibilidad dentro o fuera de la célula (Olaya-Abril *et al.*, 2020). También perteneciente a esta agrupación génica *cioAB-nit4*, se encuentra un regulador transcripcional MocR, el cual pertenece a la familia GntR y contiene como cofactor piridoxal fosfato, y que posiblemente actúe como un represor de los genes *cioAB-nit4* en ausencia de cianuro (resultados no publicados del grupo de investigación BIO117). El regulador MocR encontrado de forma exclusiva en el proteoma de WT/cianuro (vs. amonio), tampoco se detectó en el proteoma de la mayoría de mutantes Nit<sup>-</sup>. En el caso de NitA<sup>-</sup> este regulador no varió su expresión respecto a WT (Fig. 35). El hecho de que MocR no cambie su expresión en el proteoma del mutante NitA<sup>-</sup>, sugiere que no hay interacción entre ambas proteínas reguladoras y que posiblemente no se requiera la represión de los genes *cioAB-nit4* mediante MocR cuando no se encuentran inducidos los genes *nit* a través del regulador NitA. En cuanto al resto de proteínas codificadas por la agrupación *cioAB-nit4* en los análisis mutantes Nit<sup>-</sup> vs. WT, estas cambiaron su expresión estando ligeramente más inducidas en el proteoma WT (o reprimidas en proteoma de los mutantes Nit<sup>-</sup>, excepto en NitB<sup>-</sup>). Este resultado sugiere una posible relación entre ambas agrupaciones génicas *nit1C* y *cioAB-nit4*, ya que al presentar los mutantes Nit<sup>-</sup> una capacidad menor de asimilación de cianuro, la cantidad de este compuesto

dentro de la célula también se podría ver reducida (Fig. 30) y, por lo tanto, los mecanismos de resistencia a este tóxico se inducirán menos.

Otras proteínas identificadas en el análisis proteómico WT cianuro vs. amonio, y que se encontraron reguladas positivamente por cianuro, fueron la cianasa CynS, que convierte el cianato en amonio y dióxido de carbono, y el transportador de cianato de tipo ABC CynABD (Fig. 35). Estas proteínas están codificadas en la agrupación génica *cynFABDS*, responsable de la asimilación de cianato en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2008; Sáez *et al.*, 2019), aunque previamente se descartó la participación del cianato en la ruta de asimilación de cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2008). Hasta la fecha se desconoce el significado fisiológico del efecto inductor del cianuro sobre la agrupación génica responsable de la asimilación de cianato, aunque este podría estar mediado por la homología que presentan los reguladores transcripcionales CynF y NitA pertenecientes a la misma familia de reguladores de tipo Fis dependiente de  $\sigma^{54}$ . Es de destacar que en los proteomas de los mutantes NitB<sup>-</sup> y NitC<sup>-</sup> no se detecta que las proteínas codificadas por la agrupación génica *cynFABDS* cambien su expresión con respecto al proteoma del WT (Fig. 35), sugiriendo que si no hay metabolización del cianuro no se producen intermediarios de degradación de este compuesto tóxico que induzcan la expresión de los genes *cyn* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Otra observación en este sentido está relacionada con el hecho de que en el proteoma del mutante NitA<sup>-</sup>, en el que no se encuentra el activador transcripcional específico de los genes estructurales *nit*, también hay una ausencia de la proteína CynS (Fig. 35), ya que prácticamente este mutante no asimila cianuro.

Como se ha mencionado anteriormente, el cianuro es un potente quelante de hierro debido a sus características químicas, lo que provoca que en presencia de cianuro la biodisponibilidad de este metal sea muy limitada. Esta limitación de hierro inducida por la presencia de cianuro se describió previamente en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, encontrándose que el regulador transcripcional Fur (Ferric uptake regulator) se indujo por cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2007; Olaya-Abril *et al.*, 2020), y además podría ser diana de los sRNA649 y sRNA258 (Capítulo I; Olaya-Abril *et al.*, 2019). En bacterias Gram negativas, como la estirpe CECT 5344, el regulador transcripcional Fur es el encargado de la homeostasis del hierro a través de una doble funcionalidad, actuando tanto como sensor citoplasmático de hierro y como efector de la respuesta. Esta segunda función permite la modulación de la expresión de numerosos genes diana responsables directos de la captación de hierro (Becerra *et al.*, 2011). Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro de alta afinidad que las bacterias secretan al medio en el proceso de captación de Fe<sup>3+</sup>, debido a la escasa solubilidad de este metal a pH neutro. El complejo ferri-sideróforo es captado por

receptores específicos de la membrana externa, cuya expresión se induce frente a la escasez de hierro. La unión del ferri-sideróforo al receptor de la membrana externa conlleva un cambio conformacional de la región periplásmica, la cual interactúa con la proteína TonB, que forma parte del complejo proteico TonB-ExbD-ExbB. Este complejo proporciona la energía necesaria para el transporte del ferri-sideróforo y su posterior entrada al citoplasma por medio de transportadores tipo ABC asociados a la membrana interna (Latorre *et al.*, 2018). En el análisis proteómico WT cianuro vs. amonio se ha identificado el regulador Fur sobreexpresado por cianuro, varios transportadores de hierro, y una ferritina y bacterioferritina implicadas en el almacenamiento intracelular de hierro (Fig. 35). También se han identificado inducidos por cianuro en este estudio un componente ATPasa de arsenito, así como transportadores y reguladores implicados en la resistencia y detoxificación de otros metales, como magnesio/cobalto, zinc y cobre. Además, inducidas en el proteoma de WT en cianuro, se han identificado proteínas de reparación y ensamblaje de centros sulfoférricos, como la proteína ErpA (Fig. 35), ya que el cianuro provoca el daño de este cofactor por su elevada afinidad por el hierro. En cuanto a la inducción por cianuro en el proteoma de WT de un componente de un sistema extrusor de arsenito implicado en la resistencia a este metal, podría deberse a que ambos tóxicos compartan la inducción a través de alguna respuesta celular común, aunque hasta la fecha este mecanismo es desconocido (Biełło *et al.*, 2023). Hay que resaltar que tan solo algunos transportadores de metales, TonB y la proteína EprA se encontraron de forma exclusiva en el proteoma de WT (o ausentes en mutantes Nit<sup>-</sup>) en el estudio proteómico mutantes Nit<sup>-</sup> vs. WT (Fig. 35), sugiriendo que la homeostasis de metales a través de los mecanismos descritos anteriormente, y la asimilación de cianuro a través de las proteínas Nit, son procesos que ocurren de forma simultánea durante la asimilación de cianuro pero están muy poco relacionados entre sí en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. En el caso de las proteínas del metabolismo del carbono, de la cadena de transporte electrónico/fosforilación oxidativa y del metabolismo de polihidroxicarboxilatos, identificadas en el análisis proteómico WT cianuro vs. amonio, tampoco se encontraron afectadas en gran medida en el estudio proteómico mutantes Nit<sup>-</sup> vs. WT (Fig. 35), por lo que probablemente estos procesos tampoco tienen una relación directa con la agrupación génica *nit1C*. Entre las proteínas del ciclo del carbono identificadas en el estudio proteómico WT cianuro vs. amonio, la mayoría se sobreexpresaron por cianuro, como las malato-quinona oxidorreductasas MqoA y MqoB (no mostrado). En *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se ha descrito que los procesos de asimilación y resistencia a cianuro se encuentran conectados a través de una malato:quinona oxidorreductasa, que cede los electrones desde el malato a la oxidasa insensible a cianuro, produciendo oxalacetato, que reacciona con el cianuro para generar la correspondiente cianhidrina (Luque-Almagro *et al.*, 2011b). En el proteoma de los mutantes Nit<sup>-</sup> no se han encontrado desreguladas ningunas de las dos Mqo. Hasta la fecha se desconoce cuál de las

dos Mqo participa en este proceso de asimilación de cianuro. También se identificaron las enzimas citrato sintasa e isocitrato liasa pertenecientes al ciclo glioxilato, confirmando resultados previos en los que células cultivadas con cianuro presentaron valores de actividad para estas enzimas mayores que los observados en células cultivadas con amonio (Luque-Almagro *et al.*, 2011b). Posiblemente, la inducción de estas enzimas está encaminada a producir más oxalacetato en presencia de cianuro como mecanismo para su eliminación/asimilación, si bien, este proceso es independiente del sistema Nit, ya que, estas dos enzimas no se encontraron afectadas en los proteomas de los mutantes Nit<sup>-</sup>. Otra proteína sobreexpresada por cianuro en el análisis WT cianuro vs. amonio es el transportador de citrato DctM. Este transportador podría ser relevante para la adquisición de hierro, ya que el citrato es un compuesto con capacidad quelante que podría contribuir a la adquisición de metales, pero también a la protección frente al estrés oxidativo o la detoxificación de metales tóxicos (Ahmed y Holmström, 2014). Este gen se ha identificado como posible diana del sRNA258. Como se ha discutido en el capítulo I, la incapacidad de crecer en el residuo cianurado y algunos metales del mutante DctM<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 apoya el papel del citrato como un quelante extracelular de metales como el hierro (Fig. 17). Además, este transportador está directamente ligado a la asimilación de cianuro y las proteínas Nit, como revela su represión en todos los mutantes Nit<sup>-</sup>, excepto NitA<sup>-</sup> (Fig. 35).

En la estirpe WT el cianuro sobreexpresó varias proteínas codificadas en una agrupación génica que, según estudios previos (Manso *et al.*, 2015), está implicada en el metabolismo de polihidroxicanoatos de cadena media (Fig. 35). Aunque en este estudio se identificaron polihidroxicanoatos tanto de cadena media como de cadena corta en células cultivadas con cianuro, en este trabajo no se han identificado las proteínas codificadas por la agrupación génica responsable de la síntesis de polihidroxicanoatos de cadena corta. En los mutantes NitA<sup>-</sup> y NitE<sup>-</sup>, la proteína asociada a gránulos PhaC no se ha detectado (Fig. 35) También se sobreexpresan por cianuro (vs. amonio), en la estirpe WT, varias subunidades de la citocromo c oxidasa y la ATP sintasa (diana sRNA649) (Fig. 35). Probablemente, la inhibición de la citocromo c oxidasa por cianuro, con la consiguiente disminución en la producción de ATP, conlleva a una sobreexpresión de estas proteínas como un mecanismo compensador.

También se regularon de forma positiva en la estirpe WT en condiciones cianotróficas (vs. amonio) proteínas implicadas en la asimilación de fuentes de nitrógeno como el nitrato y la urea (Fig. 35). Entre estas se encontraron las nitrato y nitrito reductasas asimiladoras, y tres componentes de la ureasa, enzima responsable de la asimilación de la urea y diana de los sRNA 649 y sRNA 680 (Fig. 35). En la mayoría de los casos estas proteínas se identificaron en el análisis de los mutantes Nit<sup>-</sup> vs. WT, donde se sobreexpresaron en la estirpe silvestre

respecto a los mutante NitC<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y/o NitH<sup>-</sup> (Fig. 35), lo que sugiere una posible relación entre la agrupación génica *nit1C* y la asimilación de estas fuentes de nitrógeno en la estirpe CECT 5344. Entre las proteínas sobreexpresadas por cianuro (vs. amonio) en la estirpe silvestre se encuentra NasS (Fig. 35), una proteína que junto con NasT participan en la regulación de la asimilación de nitrato en otras bacterias (Luque-Almagro *et al.*, 2017). La ausencia de nitrato y urea en los medios de cultivo, así como la baja concentración de cianuro utilizada (2 mM) debido a su alta toxicidad, indican que la sobreexpresión de los sistemas de asimilación de nitrato y urea podría ser debida no al cianuro directamente, sino a la limitación de nitrógeno que conllevan las condiciones cianotróficas. Así, entre las proteínas reguladas positivamente por cianuro (vs. amonio) en la estirpe WT se encontraron las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa (GS/GOGAT, diana del sRNA149) (Fig. 35), sistema encargado de asimilar amonio cuando este se encuentra en concentraciones muy bajas, y que confirman la escasez de nitrógeno asociada a las condiciones cianotróficas. Estas enzimas no presentaron una expresión diferencial en el análisis proteómico de los mutantes Nit<sup>-</sup> vs. WT (Fig. 35). En la estirpe WT también se sobreexpresaron por cianuro (vs. amonio) las nitrilasas/C-N hidrolasas Nit2, Nit5, Nit6 y Ni7 (Fig. 35). Si bien el análisis mutacional de estas nitrilasas/C-N hidrolasas realizado en este trabajo no muestra un fenotipo diferente respecto a la estirpe WT en las condiciones estudiadas con cianuro o CNA, no se descarta que alguna de estas nitrilasas tenga la capacidad de utilizar cianhidrinas como sustrato y posibilite una actividad nitrilasa basal o un ligero crecimiento con cianuro en ausencia de la nitrilasa/C-N hidrolasas NitC (Tabla 13). Sin embargo, las nitrilasas/C-N hidrolasas Nit2, Nit5 y Nit6 se sobreexpresaron en la estirpe WT en comparación con los mutantes NitC<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup>. Por el contrario, la C-N hidrolasa Nit7 no presentó diferencias de expresión entre la estirpe silvestre y los mutantes Nit<sup>-</sup>, por lo que esta C-N hidrolasa podría ser la responsable de la actividad nitrilasa basal observada en estos mutantes.

Varias proteínas implicadas en el metabolismo de diferentes aminoácidos se sobreexpresan en la estirpe WT en respuesta a cianuro, principalmente aminoácidos como la lisina, ornitina, arginina, serina, histidina o metionina (Fig. 35). Durante la síntesis de lisina, las enzimas diaminopimelato epimerasa y diaminopimelato descaboxilasa sintetizan compuestos con actividad quelante que pueden aumentar la biodisponibilidad del hierro en condiciones cianotróficas. Además, la ornitina y la arginina son aminoácidos que también posibilitan la síntesis de sideróforos a través de poliaminas como la espermidina y la putrescina (Beckmann *et al.*, 2013). En el análisis proteómico de los mutantes Nit<sup>-</sup> vs WT en condiciones cianotróficas, estas proteínas presentaron un perfil de expresión variable, encontrándose en unos casos sobreexpresadas en la estirpe silvestre y en otros en los distintos mutantes Nit<sup>-</sup> (Fig. 35), lo que sugiere que la agrupación génica *nit1C* tiene influencia

sobre el metabolismo de los aminoácidos, aunque se desconoce la base de esta posible relación. El metabolismo de aminoácidos en la estirpe CECT 5344 se encuentra, además, posiblemente regulado por los sRNA222, sRNA258, sRNA431 y sRNA649, según se describió en el capítulo 1.

En el análisis WT cianuro vs. amonio se sobreexpresaron por cianuro un gran número de proteínas que participan en el metabolismo de bases nitrogenadas, nucleósidos y nucleótidos (Fig. 35). Entre estas se encontró una proteína paróloga (W6QRW1) a la proteína NitF codificada en la agrupación génica *nit1C* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. La sobreexpresión por cianuro de estas dos fosforibosilglicinamida formiltransferasas, estando incluso una de ellas codificada por la agrupación génica *nit1C*, indica que la biosíntesis *de novo* de purinas podría tener una especial relevancia durante la biodegradación de cianuro. También se encontraron sobreexpresadas por cianuro proteínas implicadas en la biosíntesis *de novo* de pirimidinas y en la degradación tanto de purinas como de pirimidinas. El efecto positivo del cianuro sobre el metabolismo de nucleótidos podría tener como objetivo contrarrestar una posible inhibición de la síntesis de nucleótidos a nivel enzimático o por la reacción del cianuro con alguno de los intermediarios de estas rutas biosintéticas. Muchas de estas enzimas del metabolismo de nucleótidos sobreexpresadas por cianuro (vs. amonio) se sobreexpresaron en la estirpe silvestre respecto a los mutantes NitC<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup>, por lo que la agrupación génica *nit1C* también podría estar implicada, probablemente de forma indirecta, en el efecto positivo del cianuro sobre el metabolismo de nucleótidos.

También fue relevante el número de proteínas sobreexpresadas por cianuro en la estirpe WT (vs. amonio) que participan en la biosíntesis de cofactores, como el tetrahidrofolato, el cofactor de molibdeno, el piridoxal fosfato y la nicotinamida adenina dinucleótido (Fig. 35, Tablas S3-S8). El cianuro es una molécula muy reactiva que reacciona con el cofactor de molibdeno, lo que conllevaría a la sobreproducción de enzimas implicadas en la síntesis de este cofactor para compensar el efecto negativo del cianuro sobre este. Las enzimas implicadas en la síntesis del cofactor de molibdeno no se afectaron en los mutantes Nit<sup>-</sup> respecto a la estirpe silvestre. En el caso del tetrahidrofolato, el piridoxal fosfato y la nicotinamida adenina dinucleótido, estos cofactores no reaccionan químicamente con el cianuro, por lo que su disminución en condiciones cianotróficas se debería a un efecto indirecto. La nicotinamida adenina dinucleótido es una coenzima esencial que participa en reacciones redox y posibilita la obtención de energía a través de la fosforilación oxidativa. La sobreexpresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de nicotinamida adenina dinucleótido en condiciones cianotróficas, podría constituir un mecanismo compensador del efecto negativo que ejerce el cianuro sobre la fosforilación oxidativa. En este trabajo se han

identificado, entre las proteínas sobreexpresadas por cianuro, enzimas implicadas en la biosíntesis de nicotinamida adenina dinucleótido, tanto de la ruta *de novo* a partir de aspartato como la L-aspartato oxidasa (BN5\_2909/W6RI46), así como de la ruta de reciclaje de nicotinamida como la nicotinato fosforibosiltransferasa (BN5\_2965/W6QXD1) (Fig. 35, Tabla S3-S8) (Gakière *et al.*, 2018; Sorci *et al.*, 2010).

Cuatro proteínas implicadas en la formación de biofilm y codificadas en una misma agrupación génica se identificaron en los análisis proteómicos realizados en este trabajo. Dos de estas proteínas (proteína de exportación del polisacárido de la cápsula y manosa-6-fosfato isomerasa) se sobreexpresaron por cianuro (vs. amonio) en la estirpe WT (Fig. 35), lo que podría indicar que en condiciones cianotróficas la estirpe CECT 5344 tendría tendencia a formar biofilms. En el análisis proteómico de los mutantes Nit<sup>-</sup> vs WT, las cuatro proteínas se sobreexpresaron en el mutante NitA<sup>-</sup> y la mayoría también en los mutantes NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> (Fig. 35). Estos datos sugieren que en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 la formación de biofilm podría estar regulada negativamente por NitA<sup>-</sup> o por la asimilación de cianuro.

El cianuro sobreexpresó varias proteínas de defensa frente al estrés oxidativo, como la catalasa, la superóxido dismutasa, varias alquilhidroperóxido reductasas y otras relacionadas con el metabolismo del glutatión como la glioxilasa y la lactoglutatión liasa (Fig. 35), ambas enzimas participan en la detoxificación de metilglioxal y otros aldehídos reactivos en presencia de GSH, que confiere tolerancia a estrés oxidativo (Creighton y Hamilton, 2001). Este efecto, descrito en estudios previos realizados en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, tanto a nivel transcriptómico como proteómico, podría ser consecuencia de un aumento de la concentración de especies reactivas de oxígeno en condiciones cianotróficas por el efecto inhibitor del cianuro sobre la cadena de transporte electrónico (Luque-Almagro *et al.*, 2007; 2015). El escaso efecto de las mutaciones Nit<sup>-</sup> sobre estas proteínas (Fig. 35), reveló que estas no están relacionadas con la asimilación de cianuro a través de la agrupación génica *nit1C*. A diferencia de las enzimas de resistencia al estrés oxidativo, las proteínas pertenecientes al sistema CRISPR si presentaron una expresión diferencial en el análisis proteómico de los mutantes Nit<sup>-</sup> vs. WT encontrándose sobreexpresadas en los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> (Fig. 35). Además, los genes que codifican estas proteínas se han identificado como posibles dianas de los sRNA258 y sRNA649. Sin embargo, el cianuro sobreexpresó en la estirpe WT (vs amonio) sólo un número limitado de estas proteínas. Un perfil de expresión similar en los dos análisis proteómicos fue también el presentado por proteínas que participan en el proceso de quimiotaxis (Fig. 35). Estos datos sugieren que el regulador NitA<sup>-</sup> podría participar, directa o indirectamente, en la regulación del sistema de defensa frente a DNA exógeno CRISPR y de la quimiotaxis, y que la sobreexpresión de estos

sistemas en los mutantes  $\text{Nit}^-$  podría compensar el efecto negativo causado por el cianuro sobre estos mutantes. La quimiotaxis es el mecanismo por el que muchas bacterias se movilizan siguiendo el gradiente de concentración de un determinado compuesto (Matilla y Krell, 2023). Este proceso es mediado por quimiorreceptores que reconocen moléculas señal denominadas quimioefectores. La unión del quimioefector al quimiorreceptor desencadena una cascada de señalización que tiene como diana última el flagelo. Este sistema se caracteriza por el requerimiento de una gran cantidad de energía, tanto para expresar las proteínas necesarias para la señalización como para la fuerza motriz necesaria para el funcionamiento del flagelo. La mayoría de quimioefectores identificados presentan valor metabólico. Además, los genes de motilidad y quimiotaxis también se inducen en condiciones de escasez de nutrientes. Por lo tanto, el principal beneficio de la quimiotaxis propuesto hasta el momento es el acceso a nutrientes (Matilla y Krell, 2023). La sobreexpresión de estos sistemas de quimiotaxis y motilidad en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en condiciones cianotróficas podría deberse a la limitación de nitrógeno asociada a dichas condiciones, pero tampoco se descarta la posibilidad del papel quimioefector del cianuro. Hasta la fecha no se ha descrito esta función para el cianuro, por lo que dicha hipótesis habría que estudiarla experimentalmente. Aunque el elevado requerimiento energético de estos sistemas es inicialmente incompatible con el efecto negativo del cianuro sobre la capacidad energética de la bacteria, los sistemas de resistencia y compensación energética que induce la estirpe CECT 5344 en condiciones cianotróficas podrían permitir la activación de estos mecanismos.

Un gran número de proteínas reguladoras se encontraron sobreexpresadas en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en condiciones cianotróficas (vs. amonio), muchas de las cuales también se sobreexpresaron en la estirpe WT en el análisis proteómico de los mutantes  $\text{Nit}^-$  vs WT (Fig. 35). Entre estas se identificaron proteínas de tipo HTH ("helix-turn-helix"), incluyendo reguladores pertenecientes a la familia GntR, que tienen PLP como cofactor. Estos reguladores generalmente actúan como represores de genes implicados en el metabolismo de la glucosa, metabolismo de aminoácidos o síntesis de vitaminas, entre otras vías metabólicas (Rigali *et al.*, 2002; Tramonti *et al.*, 2018). Precisamente, entre las dianas de sRNA649 se identificó el gen BN5\_1352, que codifica el regulador GntR. Para determinar la posible implicación de este regulador en la asimilación de cianuro se construyó un mutante deficiente en dicho gen, pero los resultados obtenidos revelaron que no había diferencias fisiológicas respecto a la estirpe silvestre en las condiciones estudiadas (resultados no mostrados), aunque probablemente, no se ha encontrado un fenotipo distinto en las condiciones estudiadas debido a su carácter represor.

Otras proteínas identificadas en este trabajo sobreexpresadas por cianuro (vs. amonio) en la estirpe WT fueron las proteínas FtsZ y FtsX, que participan en la división celular. Estas proteínas podrían favorecer la división celular en unas condiciones cianotróficas no favorables. En el análisis proteómico de los mutantes Nit<sup>-</sup> vs WT, estas proteínas se sobreexpresaron en la estirpe WT (Fig. 35), lo que podría estar relacionado con el escaso crecimiento de algunos mutantes Nit<sup>-</sup> en condiciones cianotróficas (Fig. 30).

Centrándonos en el análisis individual de cada mutante Nit<sup>-</sup>, para el mutante NitA<sup>-</sup> se identificaron un gran número de proteínas específicamente afectadas (Fig. 36). En bacterias, los reguladores transcripcionales dependientes de  $\sigma$ -54, como NitA, tienen un papel regulador central en procesos celulares como la señalización mediada por fosfotransferencia, el transporte y asimilación de ácidos carboxílicos y metabolitos que contienen nitrógeno, y procesos que involucran una interacción física de los organismos con su entorno, como la colonización de un huésped, la formación de biopelículas o la motilidad bacteriana. Muchas proteínas involucradas en estos procesos se identificaron en el análisis proteómico entre el mutante NitA<sup>-</sup> y la estirpe WT en condiciones cianotróficas, incluyendo biosíntesis de cofactores, biosíntesis de bases/nucleósidos/nucleótidos, metabolismo del carbono, de polihidroxialcanoatos y aminoácidos, cadena de transporte electrónico y estrés oxidativo, entre otros (Fig. 36). Entre estas proteínas se encontró sobreexpresada en el proteoma de la estirpe silvestre la enzima málica MaeB, que cataliza la descarboxilación oxidativa del malato a piruvato. La sobreproducción en la estirpe CECT 5344 de oxalacetato, y probablemente también de piruvato, tiene un papel fundamental en la asimilación de cianuro, ya que estos cetoácidos reaccionan con el cianuro para formar cianhidrinas que son posteriormente asimiladas a través de NitC (Estepa *et al.*, 2012). Por lo tanto, en este mutante estaría impedida tanto la asimilación de las cianhidrinas por NitC como la formación de algunas cianhidrinas, como la del piruvato, lo que implicaría una mayor toxicidad del cianuro. Una consecuencia de esta toxicidad elevada del cianuro en el mutante NitA<sup>-</sup> podría ser el efecto negativo observado sobre un alto número de proteínas ribosómicas y de la cadena de transporte de electrones (Tabla S4). No se descarta que este efecto represor específico del mutante NitA<sup>-</sup> fuese debido a que NitA tuviese un papel regulador principal, más allá del control de la agrupación génica *nit1C*. De hecho, a pesar de que el mutante NitA<sup>-</sup> se encuentra en condiciones de limitación de nitrógeno por la imposibilidad de asimilar cianuro, la proteína reguladora PII del metabolismo del nitrógeno fue identificada exclusivamente en la estirpe silvestre (vs. NitA<sup>-</sup>). Esto significa que la proteína reguladora PII dependería del regulador NitA, aunque se desconoce si esta relación es directa o indirecta. La biosíntesis de cofactores como el molibdeno o la cobalamina, se encontró sobreexpresada en este mutante. En el resto de mutantes Nit<sup>-</sup> también se encontraron afectados en algunas proteínas de la

síntesis de cobalamina, sin embargo, estos se sobreexpresaron en la estirpe silvestre. La mutación en el gen *nitA* también afectó a las proteínas de defensa al estrés oxidativo, ya que se identificó una superóxido dismutasa sobreexpresada en la estirpe WT mientras que una catalasa se encontró reprimida. También se encontró reprimida en la estirpe WT (vs *NitA*<sup>-</sup>) una proteína del sistema CRISPR. Este efecto fue específico del mutante *NitA*<sup>-</sup>, aunque como se describió anteriormente, también se identificaron proteínas de este sistema sobreexpresadas en varios mutantes (Fig. 35). Según los resultados obtenidos en este trabajo, el mutante *NitA*<sup>-</sup> sobreexpresa una compleja respuesta, probablemente para poder sobrevivir en condiciones extremadamente adversas debido a la alta toxicidad de cianuro o por la falta de un regulador principal, basada en la resistencia frente al estrés oxidativo, la quimiotaxis, la biosíntesis de purinas, la síntesis de cofactores o la formación de biopelículas, entre otros procesos biológicos.

En el caso del mutante *NitB*<sup>-</sup>, el escaso número de proteínas con expresión diferencial y exclusivas en este mutante (Fig. 37), confirmó que *NitB* no tiene una función adicional a la de su participación en la asimilación de cianuro. En el análisis proteómico del mutante *NitC*<sup>-</sup> en medios con cianuro se identificaron 26 proteínas con expresión diferencial que no se encontraron afectadas en el resto de mutantes. Estas proteínas participan en varios procesos biológicos similares a los identificados para el mutante *NitB*<sup>-</sup>, aunque también se afectó de forma específica una proteína que participa en el metabolismo de furfurales. La enzima ácido cobirínico a,c-diamida sintasa, que participa en la biosíntesis de cobalamina, y la metionina sintasa independiente de B12, se sobreexpresaron en la estirpe WT respecto al mutante *NitC*<sup>-</sup>, lo que indica que en este mutante la síntesis de metionina se encuentra muy afectada aunque se desconoce su relación directa con la detoxificación/asimilación de cianuro en la estirpe CECT 5344 (Fig. 38).

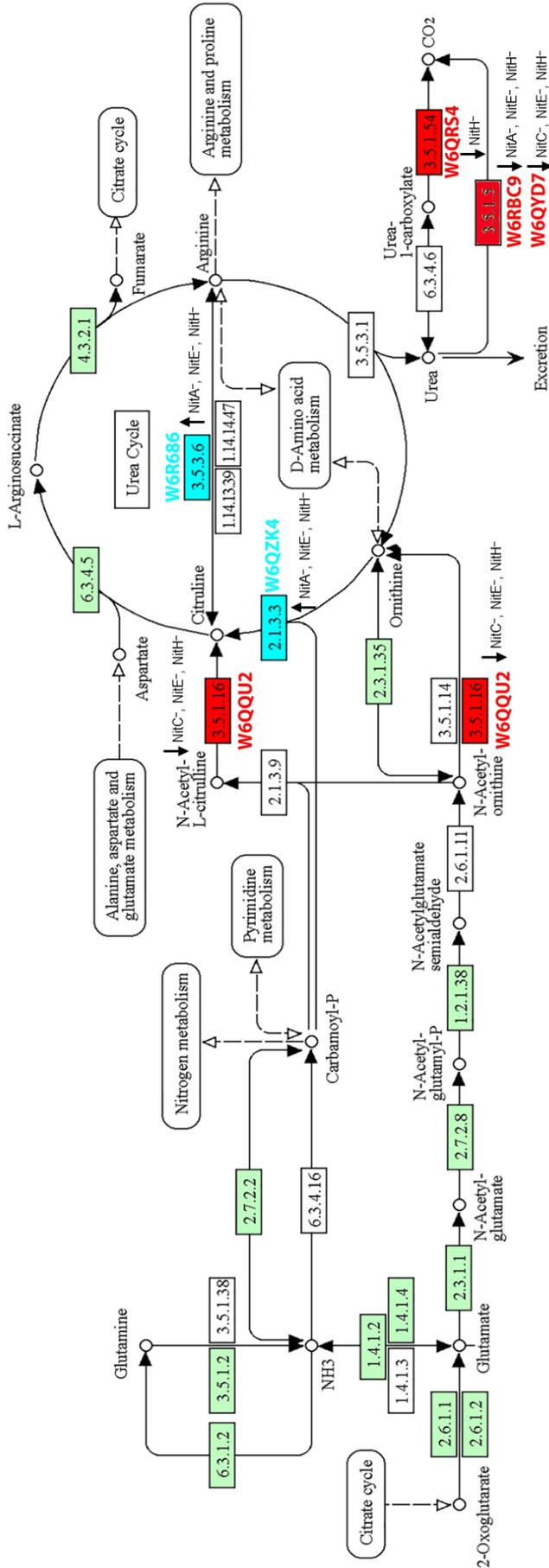
El proteoma del mutante *NitE*<sup>-</sup> reveló que la falta de esta proteína generó un efecto represor, afectando específicamente a proteínas involucradas en la biosíntesis cofactores, como la cobalamina, el grupo hemo o la riboflavina; la biosíntesis de bases/nucleósidos/nucleótidos y de cofactores, el estrés oxidativo, el metabolismo del carbono y de polihidroxicarboxilatos o la homeostasis de metales como el Zn (Fig. 39). El número elevado de proteínas expresadas diferencialmente entre las estirpes silvestre y el mutante *NitE*<sup>-</sup> podría deberse no sólo al efecto directo por la pérdida de la posible función *N*-acetiltransferasa de *NitE*, sino también a un efecto indirecto de la mutación. La acetilación es una modificación postraduccional reguladora que está tan extendida como la fosforilación en diferentes procesos biológicos. La familia de las *N*-acetiltransferasas relacionadas con GCN5 (GNAT) se caracteriza por transferir un grupo acetilo desde el acetil-CoA al grupo amino de

un sustrato específico. Estos sustratos pueden ser muy diversos, desde pequeños metabolitos como los aminoácidos hasta metabolitos secundarios como los antibióticos. En la familia GNAT, el grupo acetilo se puede transferir al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina o al grupo  $\alpha$ -amino de un residuo N-terminal (Favrot *et al.*, 2016). Los miembros de esta familia GNAT catalizan una modificación común, pero comparten una escasa identidad de secuencia (Vetting *et al.*, 2005). La importancia de esta modificación se ha establecido progresivamente en las últimas décadas, y ahora se sabe que ocurre con múltiples propósitos moleculares en proteínas, poliaminas, toxinas, ARNt y componentes de la pared celular (Burckhardt y Escalante-Semerena, 2020). Recientemente, se ha demostrado que las enzimas GNAT están asociadas al riboswitch de guanidina (Lenkeit *et al.*, 2020; Salvail *et al.*, 2020). La enzima acetil-coenzima A sintetasa (BN5\_0941/W6QUA2) de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 sólo se identificó en este análisis comparativo, como proteína exclusiva de WT, así como las proteínas N- $\alpha$ -fosforibosiltransferasa (BN5\_1590/W6R198) y hemo sintasa (BN5\_3346/W6R697), pudiendo tener estas proteínas una relación directa con la N-acetiltransferasa codificada por el gen *nitE* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. En el análisis específico mutante NitE<sup>-</sup> vs WT también se identificó una N-acetiltransferasa que podría desempeñar la misma función que NitE, sin embargo, esta enzima se encontró sobreexpresada en la estirpe silvestre. En el análisis proteómico mutante NitE<sup>-</sup> vs WT también se encontró una sobreexpresión de enzimas del metabolismo de la L-arginina en la estirpe silvestre y la represión en dicha estirpe de numerosas proteínas relacionadas con la formación de biopelículas (Fig. 35, Tabla S7). La L-arginina se ha asociado con la formación de biopelículas, además de virulencia y resistencia a antibióticos (Scribani-Rossi *et al.*, 2022). Algunas especies del género *Pseudomonas* se caracterizan por producir fuertes biopelículas difíciles de erradicar y por una extraordinaria versatilidad metabólica que puede favorecer la asimilación de energía y carbono/nitrógeno en múltiples condiciones ambientales. Las biopelículas confieren protección frente a ambientes hostiles, como el tratamiento con antibióticos y la respuesta inmune del huésped en caso de infecciones. Además, actúa como sensor de disponibilidad de nutrientes y, a su vez, readapta su metabolismo para finalmente sintonizar su propia formación y dispersión. En este proceso, uno de los nutrientes más importantes es el aminoácido L-arginina, un metabolito crucial que sostiene el crecimiento bacteriano como fuente de carbono y nitrógeno. En condiciones de bajo oxígeno, la L-arginina también puede servir para generar ATP, permitiendo así que las bacterias sobrevivan en ambientes anaeróbicos. Además, en este mutante se identificó la proteína de biogénesis de citocromo oxidasa Ccol (W6QVW7), identificada en el capítulo I como una de las posibles dianas del sRNA649.

El análisis proteómico entre la estirpe silvestre y el mutante NitH<sup>-</sup> en presencia de cianuro reveló que, al igual que otros mutantes Nit<sup>-</sup>, la pérdida de NitH conlleva un efecto específico de sobreexpresión sobre el proteoma de la estirpe silvestre CECT 5344, afectando a proteínas involucradas en la biosíntesis de aminoácidos, especialmente de la arginina, la biosíntesis de cofactores, la homeostasis de metales y quimiotaxis (Fig. 40). El número de proteínas expresadas diferencial y significativamente fue considerable, lo que indica que la función oxidorreductasa dependiente de FAD de la proteína NitH tendría un papel importante en condiciones cianotróficas. Entre las proteínas que sólo presentaron expresión diferencial entre la estirpe silvestre y el mutante NitH<sup>-</sup> se encontraron proteínas que participan en la producción de nicotinamida adenina dinucleótido (Fig. 40). Varias vías oxidativas dependen de la capacidad de las células para oxidar NADH, FADH<sub>2</sub> y UQH<sub>2</sub> mediante el uso de enzimas conocidas como flavoproteínas o FAD oxidorreductasas (Verdin, 2015; Bogachev *et al.*, 2018; Harold *et al.*, 2019). Las flavoproteínas oxidorreductasas incluyen a las piridina nucleótido-disulfuro oxidorreductasas, como la glutatión reductasas, las tiorredoxina reductasas y las alquil hidroperóxido reductasas; a las ferredoxina-NAD<sup>+</sup> reductasas; las NADH oxidasas y las NADH peroxidasas (Eggink *et al.*, 1990; Kuriyan *et al.*, 1991; Ross y Claiborne, 1992). Todas las flavoproteínas citadas están implicadas en la oxidación del NADH, mediante la reducción de FAD a FADH<sub>2</sub> y su reoxidación a FAD mediante la reducción UQ a UQH<sub>2</sub>. La oxidación alterada del NADH en las células puede determinar una relación NADH/NAD<sup>+</sup> elevada, con el consiguiente aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden desencadenar la apoptosis (Amoedo *et al.*, 2016). Por lo tanto, la regulación y el mantenimiento de las proporciones adecuadas de NADH/NAD<sup>+</sup>, así como de FADH<sub>2</sub>/FAD y UQH<sub>2</sub>/UQ, pueden ser cruciales para la viabilidad celular. En este análisis se han identificado 2 FAD oxidorreductasas, BN5\_3348/W6R0X5 y BN5\_3604/W6R709, además de NitH, exclusivas de la estirpe silvestre. Sin embargo, el mutante NitH<sup>-</sup> no sobreexpresó ninguna FAD oxidorreductasa, probablemente debido a que otra enzima podría estar supliendo la función de NitH sin una alteración en su expresión.

En el mutante NitH<sup>-</sup> también se sobreexpresan en la estirpe silvestre las enzimas L-treonina deshidratasa (dependiente de PLP), que cataliza la desaminación de treonina en 2-cetobutirato y amonio; y la aspartato oxidasa (dependiente de FAD), que cataliza la desaminación de aspartato en oxalacetato. Ambas enzimas podrían estar encargadas de generar oxoácidos en la estirpe WT en presencia de cianuro los cuales reaccionarían con el cianuro para formar cianhidrinas y restar toxicidad al mismo. Esta capacidad se ha perdido en el mutante NitH<sup>-</sup>.

Considerando de forma global todas las proteínas con expresión diferencial entre la estirpe silvestre y los distintos mutantes Nit<sup>-</sup>, se puso de relieve que el metabolismo de la arginina podía presentar especial relevancia en el efecto ocasionado por las mutaciones generadas en los distintos genes *nit*. En la ruta de biosíntesis de arginina se identificaron cinco reacciones catalizadas por enzimas cuya expresión se encontró afectada en varios mutantes Nit, principalmente en NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> (Fig. 41). La enzima que cataliza la desacetilación de la N-acetil-L-citrulina y la N-acetil-ornitina se encontró reprimida en los mutantes NitC<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup>. En el caso de las enzimas ornitina carbamoiltransferasa y arginina desaminasa se sobreexpresaron en los mutantes NitA<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup>, mientras que dos subunidades de la ureasa se reprimieron en estos tres mutantes. Sólo en el análisis NitH<sup>-</sup> vs WT se identificó una alofanato hidrolasa sobreexpresada en la estirpe silvestre en la ruta de biosíntesis de la arginina, así como tres enzimas la *N*-succinilarginina dihidrolasa, la arginina descarboxilasa y la ornitina descarboxilasa que participan en el metabolismo de la arginina (Fig. 42). La *N*-succinilarginina dihidrolasa fue identificada como una posible diana del sRNA149 en el capítulo I. Las enzimas citosina desaminasa y flavina-monoamina oxidasa, también del metabolismo de la arginina, se reprimieron en los mutantes NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup> (Fig. 42). La arginina es considerada un nutriente pleiotrópico por ser un aminoácido proteinogénico y una fuente de carbono, de nitrógeno y de energía. Además, diferentes trabajos han propuesto la existencia de un pool intracelular de arginina que, a través del segundo mensajero c-di-GMP ejercería un papel modulador sobre la formación de biofilm o la síntesis de poliaminas (Scribani-Rossi *et al.*, 2022). Las poliaminas son un grupo de metabolitos que pueden afectar a la división y proliferación celular mediante el control de la expresión génica, la replicación del DNA y la biosíntesis de proteínas. Además, la arginina y las poliaminas también han sido propuestas como moduladores de la síntesis de sideróforos y la tolerancia al estrés oxidativo (Scribani-Rossi *et al.*, 2022). En este trabajo se ha descrito que los mutantes Nit están afectados en la síntesis de poliaminas y en la formación de biofilm. En este último caso se identificaron proteínas sobreexpresadas en los mutantes Nit<sup>-</sup> que forman parte del sistema de dos componentes SagS/HptB/HsbR que desencadena la formación de biofilm, así como proteínas involucradas en la biosíntesis de polisacáridos. Además, entre las proteínas reguladas positivamente en la estirpe silvestre cuando esta se comparó con los mutantes NitC<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup>, se encontró una diguanilato ciclasa, enzima responsable de la síntesis de GMPc, mientras que sobreexpresada en varios mutantes Nit<sup>-</sup> se identificó la enzima que degrada el GMPc (GMPc fosfodiesterasa). Estos resultados, junto con la sobreexpresión en la estirpe silvestre del componente CbrB del sistema de transducción de la señal CbrA/CbrB, que controla la degradación de arginina a través del activador ArgR en *P. aeruginosa*, sugieren que la respuesta a las mutaciones en algunos genes *nit* podría estar mediada por la arginina y el segundo mensajero GMPc (Nishijyo *et al.*, 2001).



**Figura 41. Ruta de biosíntesis arginina afectada en los mutantes Nit<sup>-</sup>.** Se muestran las proteínas reprimidas (rojo) e inducidas (azul) en los mutantes Nit<sup>-</sup>, según el análisis proteómico comparativo WT vs. mutantes Nit<sup>-</sup> de *P. pseudocaligenes* CECT 5344. Figura realizada con la herramienta KEGG Mapper (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/search.html>).



En el análisis proteómico de los mutantes Nit<sup>-</sup> también se identificaron una gran cantidad de enzimas involucradas tanto en la biosíntesis de purinas y pirimidinas como en la degradación y reciclaje de estos compuestos. Respecto a la biosíntesis, se identificaron proteínas de la síntesis *de novo* de purinas, como la N<sup>5</sup>-CAIR mutasa (W6QX02), regulada negativamente en los mutantes NitC<sup>-</sup>, NitE<sup>-</sup> y NitH<sup>-</sup>, la fosforribosilglicinamidaformil transferasa, sobreexpresada en el mutante NitA<sup>-</sup>, y la inosina-5'-monofosfato, regulada negativamente en el mutante NitC<sup>-</sup> (Fig. 43).

También se identificaron proteínas de la síntesis *de novo* de pirimidinas (BN5\_4212/W6R8R3) y de la biosíntesis de ribonucleótidos (BN5\_3261/W6QZE7 y BN5\_4217/W6R8R7) y desoxirribonucleótidos (BN5\_1290/W6R0E8, BN5\_1291/W6QTT2, BN5\_3261/W6QZE7 y BN5\_4027/W6RL10). Entre las enzimas de degradación se encontraron sólo para la degradación de timina y uracilo (BN5\_0328/W6QQZ8, BN5\_0329/W6QSH6). También se identificaron enzimas relacionadas con el reciclaje de nucleótidos de purina, como la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa HPRT (BN5\_3435/W6QZV0), que cataliza la conversión de las bases púricas, hipoxantina y guanina, en sus correspondientes nucleótidos (IMP y GMP, respectivamente), utilizando como cosustrato el fosforibosilpirofosfato (PRPP), la xantina fosforibosiltransferasa XPRT (BN5\_0169/W6QS38), que cataliza la conversión reversible de xantina a XMP, y la d-GTPasa (BN5\_1424/W6QVK9), que cataliza la hidrólisis del dGTP (Fig. 43).

Por último, otra ruta metabólica en la que se identificaron varias enzimas afectadas en el análisis proteómico de los mutantes Nit<sup>-</sup> vs WT, fue la ruta de biosíntesis de folato (Fig. 44). La enzima dihidrofolato reductasa, que cataliza la síntesis de tetrahydrofolato y tetrahydrobiopterina, se encontró sobreexpresada en los mutantes NitC y NitE, mientras que la enzima fosfometilpirimidina sintasa, que cataliza tres reacciones en la síntesis de folato, se reprimió en todos los mutantes Nit<sup>-</sup> (Fig. 44). El tetrahydrofolato es necesario para la síntesis de ácidos nucleicos y, por lo tanto, para una correcta división celular. El efecto de las mutaciones en los distintos genes *nit* sobre las enzimas que participan en la síntesis de este cofactor sugiere una posible relación entre este cofactor, la asimilación de cianuro y la síntesis/modificación de bases nitrogenadas.

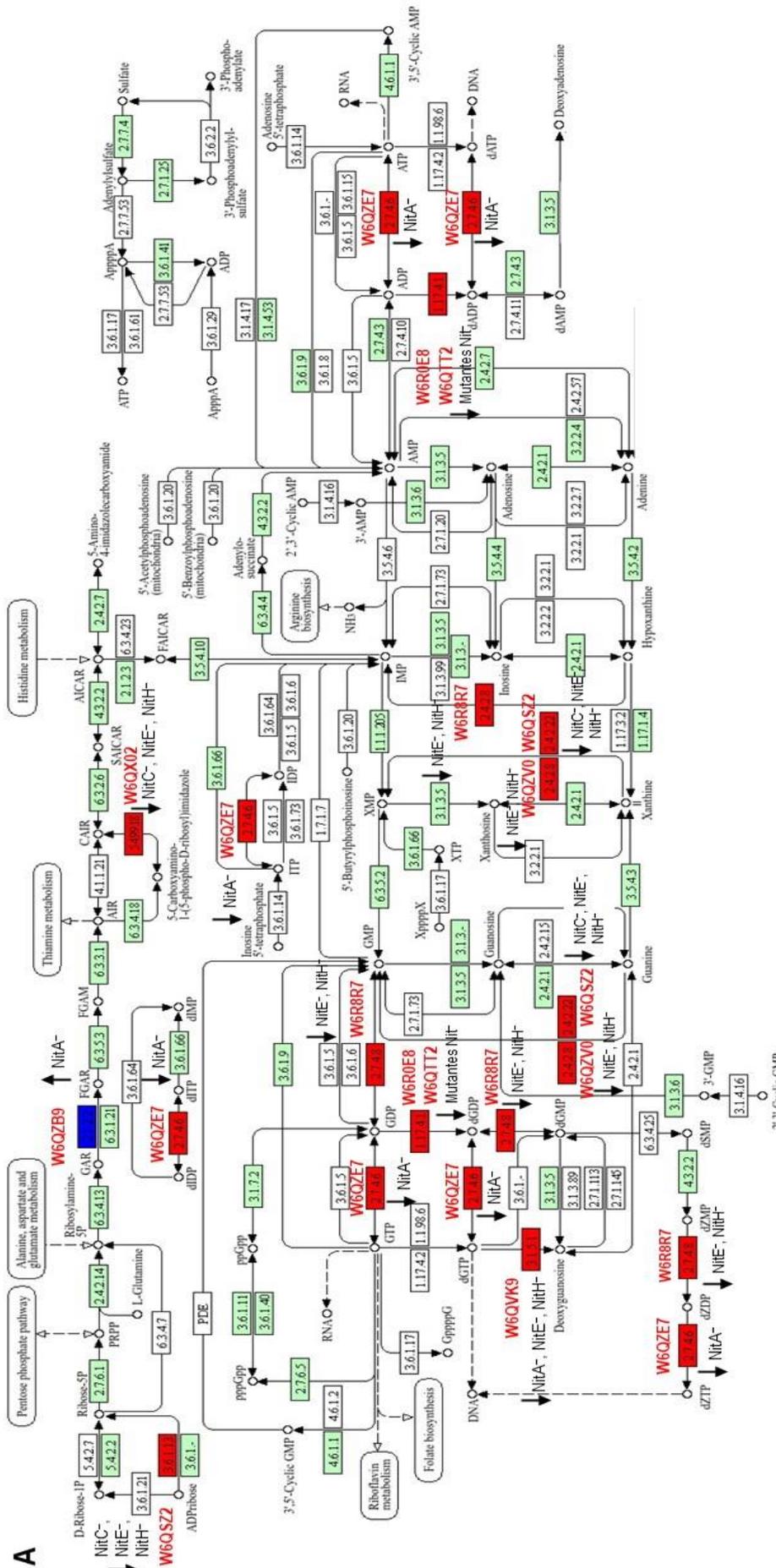


Figura 43. Ruta de biosíntesis de novo y de recuperación de bases/nucleósidos/nucleótidos afectadas en los mutantes Nit<sup>-</sup>. (A) Metabolismo de purinas; (B) Metabolismo de pirimidinas. Se muestran las proteínas reprimidas (rojo) e inducidas (azul) en los mutantes Nit<sup>-</sup>, según el análisis proteómico comparativo WT vs. mutantes Nit<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Figura realizada con la herramienta KEGG Mapper (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/search.html>).



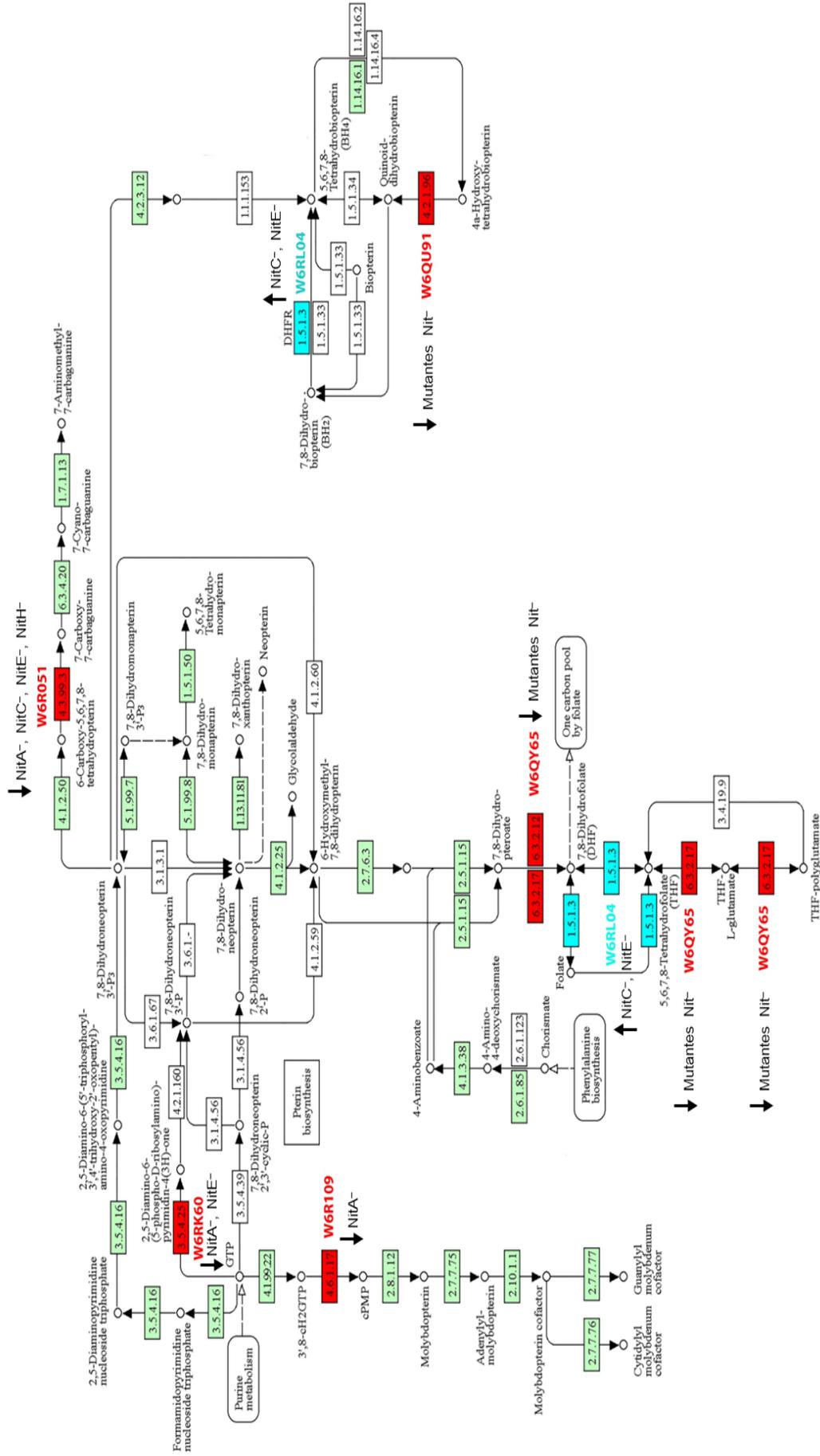


Figura 44. Ruta de biosíntesis de folato afectada en los mutantes Nit<sup>-</sup>. Se muestran las proteínas reprimidas (rojo) e inducidas (azul) en los mutantes Nit<sup>-</sup>, según el análisis proteómico comparativo WT vs. mutantes Nit<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Figura realizada con la herramienta KEGG Mapper (<https://www.genome.jp/kegg/mapper/search.html>).





# Conclusiones



## Conclusiones

1. Se han identificado 16 pequeños RNAs implicados en la regulación del proceso de degradación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Estos pequeños RNAs presentaron una expresión diferencial en el residuo cianurado de la joyería o cianuro sódico. Entre las dianas de estas moléculas reguladoras se han identificado distintos componentes codificados por las agrupaciones génicas *nit1C*, *cioAB-nit4*, *mer*, *ure* y *gln*; y algunos genes específicos como el transportador de citrato *dctM*.
2. El mutante *DctM*<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 mostró un crecimiento significativamente menor que la estirpe silvestre en presencia del residuo joyero o en presencia de metales, indicando que el citrato podría tener un papel relevante como quelante de metales, como el hierro, durante el proceso de detoxificación/asimilación de cianuro.
3. Se ha descrito una nueva ruta de asimilación de la 3-cianoalanina, independiente de *Nit4*, en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, la cual ocurre a través de la formación de un nitrilo que es sustrato de la nitrilasa *NitC*, actuando la 3-cianoalanina como inductor de esta nitrilasa en ausencia de cianuro.
4. El cianuro causó mayoritariamente un efecto inductor sobre el proteoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Entre las proteínas inducidas por cianuro se encontraron aquellas codificadas por las agrupaciones génicas *nit1C*, *cioAB-nit4*, *cyn* y otras implicadas en la asimilación de carbono, fuentes de nitrógeno alternativas, biosíntesis de nucleósidos/nucleótidos y cofactores, homeostasis de hierro y defensa frente a estrés oxidativo.
5. El análisis fisiológico de los mutantes *Nit*<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 ha revelado que las proteínas *NitA*, *NitB*, *NitC* y *NitE* son necesarias para llevar a cabo el proceso de degradación de cianuro, si bien las proteínas *NitD* y *NitF* también se requieren para una degradación óptima de este compuesto tóxico.
6. La caracterización proteómica de la respuesta a cianuro de los mutantes *Nit*<sup>-</sup> de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 ha mostrado una estrecha relación de estas proteínas con los procesos de asimilación y resistencia a cianuro, homeostasis de metales, asimilación de nitrato/nitrito y urea, metabolismo de aminoácidos, de especial relevancia con la ruta de biosíntesis de arginina, metabolismo de bases/nucleósidos/nucleótidos y biosíntesis de cofactores, destacando la ruta de síntesis del ácido fólico, ya que el tetrahidrofolato tiene un papel crucial, de manera directa o indirecta, en el metabolismo de nucleótidos.





# Bibliografía



## Bibliografía

- Acera, F., Carmona, M. I., Castillo, F., Quesada, A., & Blasco, R. (2017). A cyanide-Induced 3-cyanoalanine nitrilase in the cyanide-assimilating bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain CECT 5344. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(9). <https://doi.org/10.1128/AEM.00089-17>
- Adkins, R., & Ross, J. (2021). *Environmental Biotechnology* (Ed-Tech Press). 331. ISBN 10: 1788821653 / ISBN 13: 9781788821650
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbioly Biotechnology*. May;7(3):196-208. doi: 10.1111/1751-7915.12117.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402.
- Alvillo-Rivera, A., Garrido-Hoyos, S., Buitrón, G., Thangarasu-Sarasvathi, P., & Rosano-Ortega, G. (2021). Biological treatment for the degradation of cyanide: A review. *Journal of Materials Research and Technology*, 12, 1418–1433. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.03.030>
- Amoedo, N. D., Punzi, G., Obre, E., Lacombe, D., De Grassi, A., Pierri, C. L., & Rossignol, R. (2016). AGC1/2, the mitochondrial aspartate-glutamate carriers. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(10), 2394–2412. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.011>
- Anderson, P. M. (1980). Purification and properties of the inducible enzyme cyanase. *Biochemistry*, 19:2882-2
- Asmus, E., & Garschagen, H. (1953). The use of barbituric acid for the photometric determination of cyanide and thiocyanate. *Z Analytical Chemistry*., 138:414-42
- Babalola, O. O., & Ayangbenro, A. S. (2019). Draft genome sequence of *Pseudomonas koreensis* strain AB36, isolated from gold mining soil. *Microbiology Resource Announcements*, 8(20). <https://doi.org/10.1128/MRA.00175-19>
- Banerjee, S. B. (2002). Corporate environmentalism: the construct and its measurement. *Journal of Business Research*, 55(3), 177–191. [https://doi.org/10.1016/S0148-2963\(00\)00135-1](https://doi.org/10.1016/S0148-2963(00)00135-1)
- Barber, C. V. & Vaughan, R. (1998). Poison and profits: cyanide fishing in the Indo-Pacific. *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, vol. 40, issue 8, pp. 4-9. 10.1080/00139159809604600
- Baxter, J., & Cummings, S. P. (2006). The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9057-y>
- Becerra, G., Blasco, R., Quesada, A., Merchán, F., & Igeño, M. I. (2011). Role of Fur on cyanide tolerance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Biochemical Society Transactions*, 39(6), 1854–1858. <https://doi.org/10.1042/BST20110706>

- 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
- Beckmann, N., Schaffner, L., Schrettl, M., Binder, U., Talasz, H., Lindner, H., & Haas, H. (2013). Characterization of the link between ornithine, arginine, polyamine and siderophore metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS one*. 8. e67426. 10.1371/journal.pone.0067426
- Bhalla, T. C., Kumar, V., Kumar, V., Thakur, N., & Savitri. (2018). Nitrile metabolizing enzymes in biocatalysis and biotransformation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185(4), 925–946. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2705-7>
- Blumer, C., & Haas, D. (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Archives of Microbiology*, 173(3), 170–177. <https://doi.org/10.1007/s002039900127>
- Bogachev, A. V., Baykov, A. A., & Bertsova, Y. V. (2018). Flavin transferase: The maturation factor of flavin-containing oxidoreductases. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), 1161–1169. <https://doi.org/10.1042/BST20180524>
- Bradford, 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 (1): 248–256. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brysk, M. M., Corpe, W. A., & Hankes, L. V. (1969).  $\beta$ -Cyanoalanine formation by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Bacteriology*, 97(1), 322–327. <https://doi.org/10.1128/jb.97.1.322-327.1969>
- Burckhardt, R. M., & Escalante-Semerena, J. C. (2020). Small-molecule acetylation by GCN5-related *N*-acetyltransferases in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(2). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00090-19>
- Cabello, P., Luque-Almagro, V. M., Olaya-Abril, A., Sáez, L. P., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2018). Assimilation of cyanide and cyano-derivatives by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: From omic approaches to biotechnological applications. *FEMS Microbiology Letters*, 365(6). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny032>
- Castillo, F., Roldán, M. D., Huertas, M. J., Caballero, F. J., Moreno-Vivian, C., & Martínez-Luque, M. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Madrid: Editorial Tebar, S. L. 978-84-7360-211-2
- Castric, P. A., & Strobel, G. A. (1969). Cyanide metabolism by *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry*, 244(15), 4089–4094. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36388-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36388-3)
- Chaudhary, S., Yadav, S., Singh, R., Sadhotra, C., & Patil, S. A. (2022). Extremophilic electroactive microorganisms: Promising biocatalysts for bioprocessing applications. *Bioresour Technol*, 347, 126663. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126663>
- Chhiba-Govindjee, V. P., van der Westhuyzen, C. W., Bode, M. L., & Brady, D. (2019). Bacterial nitrilases and their regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(12), 4679–4692. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09776-1>
- Choi, S. C., Chung, Y. S., Lee, Y. G., Kang, Y., Park, Y. J., Park, S. U., & Kim, C. (2020). Prediction of dhurrin metabolism by transcriptome and metabolome analyses in *Sorghum*. *Plants*, 9(10), 1390. <https://doi.org/10.3390/plants9101390>

## Bibliografía

- Cox J. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26:1367–13
- Creighton, D. J., & Hamilton, D. S. (2001). Brief history of glyoxalase I and what we have learned about metal ion-dependent, enzyme-catalyzed isomerizations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 387(1), 1–10. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2253>
- da Silva-Filho, P. M., Araújo, I., Falcao, N. R., Abreu, D. S., de França, L. G., Silva, E. H., & Longhinotti, E. (2022). Nitroprusside—expanding the potential use of an old drug using nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00661>
- Daghio, M., Aulenta, F., Vaiopoulou, E., Franzetti, A., Arends, J. B. A., Sherry, A., Suárez-Suárez, A., Head, I. M., Bestetti, G., & Rabaey, K. (2017). Electrobioremediation of oil spills. *Water Research*, 114, 351–370. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.030>
- Dash, R. R., Gaur, A., & Balomajumder, C. (2009). Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *Journal of Hazardous Materials*, 163(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.051>
- Dubey, S. K., & Holmes, D. S. (1995). Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11(3), 257–265. <https://doi.org/10.1007/BF00367095>
- Dutta, T., & Srivastava, S. (2018). Small RNA-mediated regulation in bacteria: A growing palette of diverse mechanisms. *Gene*, 656, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.02.068>
- Ebbs, S. (2004). Biological degradation of cyanide compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(3), 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.03.006>
- Eggink, G., Engel, H., Vriend, G., Terpstra, P., & Witholt, B. (1990). Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of Molecular Biology*, 212(1), 135–142. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90310-I](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90310-I)
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00337.x>
- Fairbrother, L., Shapter, J., Brugger, J., Southam, G., Pring, A., & Reith, F. (2009). Effect of the cyanide-producing bacterium *Chromobacterium violaceum* on ultraflat Au surfaces. *Chemical Geology*, 265(3–4), 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2009.04.010>
- Favrot, L., Blanchard, J. S., & Vergnolle, O. (2016). Bacterial GCN5-related *N*-acetyltransferases: From resistance to regulation. *Biochemistry*, 55(7), 989–1002. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01269>
- Fitzsimmons, A., Hainaut, O., Meech, K. J., Jehin, E., Moulane, Y., Opitom, C., Yang, B., Keane, J. V., Kleyna, J. T., Micheli, M., & Snodgrass, C. (2019). Detection of CN gas in interstellar object 2I/Borisov. *The Astrophysical Journal Letters*, 885(1), L9. <https://doi.org/10.3847/2041-8213/ab49fc>

- Fruzangohar, M., Ebrahimie, E., Ogunniyi, A. D., Mahdi, L. K., Paton, J. C., & Adelson, D. L. (2013). Comparative GO: a Web application for comparative gene ontology and gene ontology-based gene selection in bacteria. *PLoS ONE*, 8: e58759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058759>
- Gakière, B., Hao, J., de Bont, L., Pétriacq, P., Nunes-Nesi, A., & Fernie, A. R. (2018). NAD<sup>+</sup> biosynthesis and signaling in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 37(4), 259–307. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1505591>
- Gautheret, D., & Lambert, A. (2001). Direct RNA motif definition and identification from multiple sequence alignments using secondary structure profiles. *Journal of Molecular Biology*, 313(5), 1003–1011. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5102>
- Gleadow, R. M., & Møller, B. L. (2014). Cyanogenic glycosides: synthesis, physiology, and phenotypic plasticity. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 155–185. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040027>
- Gottesman, S., & Storz, G. (2011). Bacterial Small RNA Regulators: Versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(12), a003798–a003798. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003798>
- Gray, W. R. (1972). Methods in Enzymology. Vol. XI (C. H. W. Hirs, ed.). *Academic Press*, 25, 12 1-151
- Green MR y Sambrook. J. (2012). Molecular cloning: A laboratory Manual, 4 ed. *Cold Spring, Harbor Laboratory Press*.
- Griss, J., Vizcaino, JA., Cote, RG., Perez- Alpi, E., Birim, M., Hermjakob, H., & Riverol-Reisinger, F. (2013). The Proteomics Identifications (PRIDE) database and associated tools: Status in 2013. *Nucleic Acids Research*, 1:41. <https://doi: 10.1093/nar/gks1262>
- Gupta, N., Balomajumder, C., & Agarwal, V. K. (2010). Enzymatic mechanism and biochemistry for cyanide degradation: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1–3), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.038>
- Gurbuz, F., Ciftci, H., Akcil, A., & Karahan, A. G. (2004). Microbial detoxification of cyanide solutions: A new biotechnological approach using algae. *Hydrometallurgy*, 72(1–2), 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2003.10.004>
- Harold, L. K., Antoney, J., Ahmed, F. H., Hards, K., Carr, P. D., Rapson, T., Greening, C., Jackson, C. J., & Cook, G. M. (2019). FAD-sequestering proteins protect mycobacteria against hypoxic and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 294(8), 2903–5814. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006237>
- Harris, R. E., & Knowles, C. J. (1983). The conversion of cyanide to ammonia by extracts of a strain of *Pseudomonas fluorescens* that utilizes cyanide as a source of nitrogen for growth. *FEMS Microbiology Letters*, 20(3), 337–341. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1983.tb00143.x>
- Hatzfeld, Y., Maruyama, A., Schmidt, A., Noji, M., Ishizawa, K., & Saito, K. (2000).  $\beta$ -Cyanoalanine synthase is a mitochondrial cysteine synthase-like protein in spinach and Arabidopsis. *Plant Physiology*, 123(3), 1163–1172. <https://doi.org/10.1104/pp.123.3.1163>
- Heinemann, U., Engels, D., Bürger, S., Kiziak, C., Mattes, R., & Stolz, A. (2003). Cloning of a nitrilase gene from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 and heterologous expression

## Bibliografía

- and characterization of the encoded protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4359–4366. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4359-4366.2003>
- Heldt, H. W., & Piechulla, B. (2021). Special metabolites fulfill specific biological and ecological functions in plants. In *Plant Biochemistry* (pp. 373–389). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818631-2.00016-7>
- Hendry-Hofer, T. B., Patrick, C. Ng., Witeof, A. E., Mahon, S. B., Brenner, M., Boss, G. R., & Bebart, V. S. (2019). A review on ingested cyanide: Risks, clinical presentation, diagnostics, and treatment challenges. *Journal of Medical Toxicology*, 15(2), 128–133. <https://doi.org/10.1007/s13181-018-0688-y>
- Herrero, M., de Lorenzo, V., & Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistant selection markers for cloning a stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal Bacteriology*, 172:6557-6
- Holmqvist, E., & Wagner, E. G. H. (2017). Impact of bacterial sRNAs in stress responses. *Biochemical Society Transactions*, 45(6), 1203–1212. <https://doi.org/10.1042/BST20160363>
- Ibáñez I. (2018). Biorremediación de residuos industriales cianurados de la joyería por la bacteria alcalófila *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Ucopress*
- Ibáñez, I., Cabello, P., Luque-Almagro, V. M., Sáez, L. P., Olaya, A., De Medina, V. S., De Castro, M. D., Moreno-Vivián, C., & Roldán, MD. (2017). Quantitative proteomic analysis of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in response to industrial cyanide-containing wastewaters using Liquid Chromatography- Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LCMS/ MS). *PLoS ONE*, 12(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172908>
- Igeño, M. I., Becerra, G., Guijo, M. I., Merchán, F., & Blasco, R. (2011). Metabolic adaptation of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 to cyanide: role of malate–quinone oxidoreductases, aconitase and fumarase isoenzymes. *Biochemical Society Transactions*, 39(6), 1849–1853. <https://doi.org/10.1042/BST20110714>
- Islam, S. (2022). Cyanide at the origin of metabolism. *Nature Chemistry*, 14(2), 123–125. <https://doi.org/10.1038/s41557-021-00883-z>
- Jez, J. M. (2019). Plant nitrilase: A new job for an old enzyme. *Biochemical Journal*, 476(7), 1105–1107. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190060>
- Jones, L. B., & Kunz, D. A. (2019). Draft genome sequence of the cyanotroph *Pseudomonas monteilii* BCN3. *Microbiology Resource Announcements*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/MRA.01322-18>
- Jünemann, S. (1997). Cytochrome *bd* terminal oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1321(2), 107–127. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00046-7)
- Justo Arevalo, S., Zapata Sifuentes, D., Cuba Portocarrero, A., Brescia Reátegui, M., Monge Pimentel, C., Farage Martins, L., Marques Pierry, P., Morais Piroupo, C., Guerra Santa Cruz, A., Quiñones Aguilar, M., Shaker Farah, C., Setubal, J. C., & da Silva, A. M. (2022). Genomic characterization of *Bacillus safensis* isolated from mine tailings in Peru and evaluation of its cyanide-degrading enzyme CynD. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(14). <https://doi.org/10.1128/aem.00916-22>

- Kallergi, A., Asin-Garcia, E., Martins dos Santos, V. A., & Landeweerd, L. (2021). Context matters. *EMBO Reports*, 22(1). <https://doi.org/10.15252/embr.202051227>
- Kanehisa, M., & Sato, Y. (2020). KEGG Mapper for inferring cellular functions from protein sequences. *Protein Science*, 29:28–35. <https://doi.org/10.1002/pro.3711>
- Kery, M. B., Feldman, M., Livny, J., & Tjaden, B. (2014). TargetRNA2: Identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), 124–129. <https://doi.org/10.1093/nar/gku317>
- Kim, D. W., Ahn, J. H., & Cha, C. J. (2022). Biodegradation of plastics: Mining of plastic-degrading microorganisms and enzymes using metagenomics approaches. *Journal of Microbiology*, 60(10), 969–976. <https://doi.org/10.1007/s12275-022-2313-7>
- Kumano, T., Suzuki, T., Shimizu, S., & Kobayashi, M. (2016). Nitrile-synthesizing enzyme: Screening, purification and characterization. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 62(4), 167–173. <https://doi.org/10.2323/jgam.2016.02.003>
- Kumar, R., Saha, S., Dhaka, S., Kurade, M. B., Kang, C. U., Baek, S. H., & Jeon, B.-H. (2017). Remediation of cyanide-contaminated environments through microbes and plants: a review of current knowledge and future perspectives. *Geosystem Engineering*, 20(1), 28–40. <https://doi.org/10.1080/12269328.2016.1218303>
- Kunz, D. A., Chen, J.-L., & Pan, G. (1998). Accumulation of  $\alpha$ -keto acids as essential components in cyanide assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4452–4459. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.11.4452-4459.1998>
- Kuriyan, J., Krishna, T. S. R., Wong, L., Guenther, B., Pahler, A., Williams, C. H., & Model, P. (1991). Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. *Nature*, 352(6331), 172–174. <https://doi.org/10.1038/352172a0>
- Latorre, M., Quenti, D., Travisany, D., Singh, K. V., Murray, B. E., Maass, A., & Cambiazo, V. (2018). The role of fur in the transcriptional and iron homeostatic response of *Enterococcus faecalis*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01580>
- Lee, J., Mahon, S. B., Mukai, D., Burney, T., Katebian, B. S., Chan, A., Bebarta, V. S., Yoon, D., Boss, G. R., & Brenner, M. (2016). The vitamin b12 analog cobinamide is an effective antidote for oral cyanide poisoning. *Journal of Medical Toxicology*, 12(4), 370–379. <https://doi.org/10.1007/s13181-016-0566-4>
- Lenkeit, F., Eckert, I., Hartig, J. S., & Weinberg, Z. (2020). Discovery and characterization of a fourth class of guanidine riboswitches. *Nucleic Acids Research*, 48(22), 12889–12899. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1102>
- Li, L., Huang, D., Cheung, M. K., Nong, W., Huang, Q., & Kwan, H. S. (2013). BSRD: A repository for bacterial small regulatory RNA. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 233–238. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1264>
- Logsdon M. J., Hagelstein, K., & Mudder, T. I. (2000). Review of: “The Management of Cyanide in Gold Extraction”. Mudder: International Council of Metals and the Environment. *International Journal of Surface Mining, Reclamation and Environment*, 14(4), v–v. <https://doi.org/10.1080/13895260008953333>

## Bibliografía

- Luque-Almagro, V. M., Blasco, R., Huertas, M. J., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., & Roldán, M. D. (2005a). Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 168–169. <https://doi.org/10.1042/BST0330168>
- Luque-Almagro, V. M., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Roldán, M. D., García-Gil, L.J., Castillo, F., & Blasco, R. (2005b). Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 940–947. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.940>
- Luque-Almagro, V. M., Huertas, M. J., Roldán, M. D., 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. *Environmental Microbiology*, 9(6), 1541–1549. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01274.x>
- Luque-Almagro, V. M., Huertas, M. J., Sáez, L. P., Luque-Romero, M. 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 and Environmental Microbiology*, 74(20), 6280–6288. <https://doi.org/10.1128/AEM.00916-08>
- Luque-Almagro, V. M., Blasco, R., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., & Roldán, M. D. (2011a). Bacterial cyanide degradation is under review: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a case of an alkaliphilic cyanotroph. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), 269–274. <https://doi.org/10.1042/BST0390269>
- Luque-Almagro, V. M., Merchán, F., Blasco, R., Igeño, M. I., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Castillo, F., & Roldán, M. D. (2011b). Cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involves a malate:quinone oxidoreductase and an associated cyanide-insensitive electron transfer chain. *Microbiology*, 157(3), 739–745. <https://doi.org/10.1099/mic.0.045286-0>
- 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., & Blasco, R. (2013). Draft whole genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Environmental Microbiology*, 15(1), 253–270. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02875.x>
- Luque-Almagro, V. M., Escribano, M. P., Manso, I., Sáez, L. P., Cabello, P., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2015). DNA microarray analysis of the cyanotroph *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in response to nitrogen starvation, cyanide and a jewelry wastewater. *Journal of Biotechnology*, 214, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.09.032>
- Luque-Almagro, V. M., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2016). Biodegradation of cyanide wastes from mining and jewellery industries. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.12.004>
- Luque-Almagro, V. M., Manso, I., Sullivan, M. J., Rowley, G., Ferguson, S. J., Moreno-Vivián, C., Richardson, D. J., Gates, A. J., & Roldán, M. D. (2017). Transcriptional and translational adaptation to aerobic nitrate anabolism in the denitrifier *Paracoccus denitrificans*. *Biochemical Journal*, 474(11), 1769–1787. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170115>

- Luque-Almagro, V. M., Cabello, P., Sáez, L. P., Olaya-Abril, A., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2018). Exploring anaerobic environments for cyanide and cyano-derivatives microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 1067–1074. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8678-6>
- Machingura, M., Salomon, E., Jez, J. M., & Ebbs, S. D. (2016). The  $\beta$ -cyanoalanine synthase pathway: beyond cyanide detoxification. *Plant, Cell & Environment*, 39(10), 2329–2341. <https://doi.org/10.1111/pce.12755>
- Malmir, N., Fard, N. A., Mgwatyu, Y., & Mekuto, L. (2021). Cyanide hydratase modification using computational design and docking analysis for improved binding affinity in cyanide detoxification. *Molecules*, 26(6), 1799. <https://doi.org/10.3390/molecules26061799>
- Malmir, N., Fard, N. A., Aminzadeh, S., Moghaddassi-Jahromi, Z., & Mekuto, L. (2022). An overview of emerging cyanide bioremediation methods. *Processes*, 10(9), 1724. <https://doi.org/10.3390/pr10091724>
- Mandel M. & Higa. A. (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *Journal Molecular Biology.*, 53:154-162.
- Manso, I., Ibáñez, I., de la Peña, F., Sáez, L. P., Luque-Almagro, V. M., Castillo, F., Róldan, M. D., Prieto, M. A., & Moreno-Vivián, C. (2015). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a cyanide-degrading bacterium with by-product (polyhydroxyalkanoates) formation capacity. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0267-8>
- Margalef, F. (1998). Ecología. Biología y Ciencias de la Vida. (Ecología. E. Omega., Ed.). 978-84-282-0405-7
- Markande, A. R., Patel, D., & Varjani, S. (2021). A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresource Technology*, 330, 124963. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124963>
- Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J., & Křen, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International*, 35(1), 162–177. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.018>
- Matilla, M. A., & Krell, T. (2023). Targeting motility and chemotaxis as a strategy to combat bacterial pathogens. *Microbial Biotechnology*, 16(12), 2205–2211. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14306>
- McClure, R., Balasubramanian, D., Sun, Y., Bobrovskyy, M., Sumbly, P., Genco, C. A., Vanderpool, C. K., & Tjaden, B. (2013). Computational analysis of bacterial RNA-Seq data. *Nucleic Acids Research*, 41(14), 1–16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt444>
- Mediavilla, J. J. V., Perez, B. F., de Cordoba, M. C. F., Espina, J. A., & Ania, C. O. (2019). Photochemical degradation of cyanides and thiocyanates from an industrial wastewater. *Molecules*, 24(7), 1373. <https://doi.org/10.3390/molecules24071373>
- Mekuto, L., Alegbeleye, O. O., Ntwampe, S. K. O., Ngongang, M. M., Mudumbi, J. B., & Akinpelu, E. A. (2016). Co-metabolism of thiocyanate and free cyanide by *Exiguobacterium acetylicum* and *Bacillus marisflavi* under alkaline conditions. *3 Biotech*, 6(2), 173. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0491-x>

## Bibliografía

- Mekuto, L., Ntwampe, S. K. O., Mudumbi, J. B. N., Akinpelu, E. A., & Mewa-Ngongang, M. (2017). Metagenomic data of free cyanide and thiocyanate degrading bacterial communities. *Data in Brief*, 13, 738–741. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2017.06.049>
- Mekuto, L., Ntwampe, S. K. O., & Mudumbi, J. B. N. (2018). Microbial communities associated with the co-metabolism of free cyanide and thiocyanate under alkaline conditions. *3 Biotech*, 8(2), 93. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1124-3>
- Mills, E. M., Gunasekar, P. G., Pavlakovic, G., & Isom, G. E. (2002). Cyanide-induced apoptosis and oxidative stress in differentiated PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 67(3), 1039–1046. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67031039.x>
- Morrison, G. R. (1971). Microchemical determination of organic nitrogen with Nessler reagent. *Analytical Biochemistry*, 43(2), 527–532. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90283-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90283-1)
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5(7), 621–628. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1226>
- Motaung, T. E., Albertyn, J., Kock, J. L. F., & Pohl, C. H. (2012). *Cryptococcus cyanovorans* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from cyanide-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(5), 1208–1214. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.034181-0>
- Nath, A. K., Roberts, L. D., Liu, Y., Mahon, S. B., Kim, S., Ryu, J. H., Werdich, A., Januzzi, J. L., Boss, G. R., Rockwood, G. A., MacRae, C. A., Brenner, M., Gerszten, R. E., & Peterson, R. T. (2013). Chemical and metabolomic screens identify novel biomarkers and antidotes for cyanide exposure. *The FASEB Journal*, 27(5), 1928–1938. <https://doi.org/10.1096/fj.12-225037>
- Nava-Alonso, F., Elorza-Rodríguez, E., Uribe-Salas, A., & Pérez-Garibay, R. (2007). Análisis químico de cianuro en el proceso de cianuración revisión de los principales métodos. *Revista de Metalurgia (Madrid)*, 43(1), 20–28. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.2007.v43.i1.48>
- Naveena, K., Chinniah, C., & Shanthi, M. (2021). Cyanogenic glycosides and plant-herbivore interactions. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9(1), 1345–1350. <https://doi.org/10.22271/j.ento.2021.v9.i1s.8327>
- Nishijyo, T., Haas, D., & Itoh, Y. (2001). The CbrA–CbrB two-component regulatory system controls the utilization of multiple carbon and nitrogen sources in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 40(4), 917–931. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02435.x>
- Nitzan, M., Rehani, R., & Margalit, H. (2017). Integration of bacterial small RNAs in regulatory networks. *Annual Review of Biophysics*, 46, 131–148. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-034058>
- Nolan, L. M., Harnedy, P. A., Turner, P., Hearne, A. B., & O'Reilly, C. (2003). The cyanide hydratase enzyme of *Fusarium lateritium* also has nitrilase activity. *FEMS Microbiology Letters*, 221(2), 161–165. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00170-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00170-8)
- Offerman, W. R. (2003). Oligo primer analysis software in Introduction to bioinformatics: A theoretical and practical approach. (S. A. K. and D. D. Womble, Ed.). *Humana Press Inc*. ISBN : 978-1-58829-241-4

- Olaya-Abril, A., Hidalgo-Carrillo, J., Luque-Almagro, V. M., Fuentes-Almagro, C., Urbano, F. J., Moreno-Vivián, C., Richardson, D. J., & Roldán, M. D. (2018). Exploring the denitrification proteome of *Paracoccus denitrificans* PD1222. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01137>
- Olaya-Abril, A., Luque-Almagro, V. M., Pérez, M. D., López, C. M., Amil, F., Cabello, P., Sáez, L. P., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2019). Putative small RNAs controlling detoxification of industrial cyanide-containing wastewaters by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *PLoS ONE*, 14(2), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212032>
- Olaya-Abril, A., Pérez, M. D., Cabello, P., Martignetti, D., Sáez, L. P., Luque-Almagro, V. M., Moreno-Vivián, C., & Roldán, M. D. (2020). Role of the dihydrodipicolinate synthase DapA1 on iron homeostasis during cyanide assimilation by the alkaliphilic bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00028>
- Olaya Abril, A., Biello, K., Rodríguez-Caballero, G., Cabello, P., Sáez, L., Moreno-Vivián, C., Luque-Almagro, V. & Roldán, M. D. (2024). Bacterial tolerance and detoxification of cyanide, arsenic and heavy metals: Holistic approaches applied to bioremediation of industrial complex wastes. *Microbial biotechnology*. 17, e14399. [10.1111/1751-7915.14399](https://doi.org/10.1111/1751-7915.14399)
- Oliva, G., Sahr, T., & Buchrieser, C. (2015). Small RNAs, 5' UTR elements and RNA-binding proteins in intracellular bacteria: Impact on metabolism and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(3), 331–349. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv022>
- Omura, H. (2003). Purification, characterization and gene cloning of thermostable O-acetylserine sulfhydrylase forming  $\beta$ -cyanoalanine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(5), 470–475. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80047-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80047-6)
- Oró, J., Kimball, A., Fritz, R., & Master, F. (1959). Amino acid synthesis from formaldehyde and hydroxylamine. *Archives of Biochemistry Biophys*, 85, 115-130
- O'Reilly, C., & Turner, P. D. (2003). The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes - A comparative study. *Journal of Applied Microbiology*, 95(6), 1161–1174. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02123.x>
- Pace, H. C., Hodawadekar, S. C., Draganescu, A., Huang, J., Bieganowski, P., Pekarsky, Y., Croce, C. M., & Brenner, C. (2000). Crystal structure of the worm NitFhit Rosetta Stone protein reveals a Nit tetramer binding two Fhit dimers. *Current Biology*, 10(15), 907–917. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00621-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00621-7)
- Palmer, M. Y., Cordiner, M. A., Nixon, C. A., Charnley, S. B., Teanby, N. A., Kisiel, Z., Irwin, P. G. J., & Mumma, M. J. (2017). ALMA detection and astrobiological potential of vinyl cyanide on Titan. *Science Advances*, 3, e17000-22. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700022>
- Panter, K. E. (2018). Cyanogenic glycoside-containing plants (Gupta RC, Ed.). *Veterinary Toxicology. Academic Press*. 935-940. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00064-7>
- Panwar, P., Williams, T. J., Allen, M. A., & Cavicchioli, R. (2022). Population structure of an Antarctic aquatic cyanobacterium. *Microbiome*, 10(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01404-x>

## Bibliografía

- Papenfort, K., Espinosa, E., Casadesús, J., & Vogel, J. (2015). Small RNA-based feedforward loop with AND-gate logic regulates extrachromosomal DNA transfer in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34) e4772-e4781. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507825112>
- Park, J. M., Trevor Sewell, B., & Benedik, M. J. (2017). Cyanide bioremediation: the potential of engineered nitrilases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(8), 3029–3042. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8204-x>
- Park, S., & Ely, R. L. (2009). Whole-genome transcriptional and physiological responses of *Nitrosomonas europaea* to cyanide: Identification of cyanide stress response genes. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(6), 1645–1653. <https://doi.org/10.1002/bit.22194>
- Patil, Y. B., & Paknikar, K. M. (2000). Biodetoxification of silver-cyanide from electroplating industry wastewater. *Letters in Applied Microbiology*, 30(1), 33–37. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00648.x>
- Payá, G., Bautista, V., Camacho, M., Castejón-Fernández, N., Alcaraz, L., Bonete, M.-J., & Esclapez, J. (2018). Small RNAs of *haloferax mediterranei*: Identification and potential involvement in nitrogen metabolism. *Genes*, 9(2), 83. <https://doi.org/10.3390/genes9020083>
- Pérez, M. D., Olaya-Abril, A., Cabello, P., Sáez, L. P., Roldán, M. D., Moreno-Vivián, C., Luque-Almagro, V. M. (2021). Alternative pathway for 3-cyanoalanine assimilation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 under noncyanotrophic conditions. *Microbiology Spectrum* 9:e00777-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00777-21>
- Piotrowski, M., Scho, S., Weiler, E. W., & Nit, A. (2001). The *Arabidopsis thaliana* isogene NIT4 and its orthologs in *Tobacco* encode 3-cyano-L-alanine hydratase / nitrilase \* known from species not belonging to the *Brassicaceae*. 276(4), 2616–2621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007890200>
- Podar, M., Eads, J. R. & Richardson, T. H. (2005). Evolution of a microbial nitrilase gene family: a comparative and environmental genomics study. *BMC Evolutionary Biology* 5, 42. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-5-42>
- Pollak, P., Romeder, G., Hagedorn, F, Heinz-Peter, G. (2002). Nitriles: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH. [https://doi.org/10.1002/14356007.a17\\_363](https://doi.org/10.1002/14356007.a17_363)
- Quesada, A., Guijo, M. I., Merchán, F., Blázquez, B., Igeño, M. I., & Blasco, R. (2007). Essential role of cytochrome *bd*-related oxidase in cyanide resistance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5118–5124. <https://doi.org/10.1128/AEM.00503-07>
- Rahman, S. F., Kantor, R. S., Huddy, R., Thomas, B. C., van Zyl, A. W., Harrison, S. T. L., & Banfield, J. F. (2017). Genome-resolved metagenomics of a bioremediation system for degradation of thiocyanate in mine water containing suspended solid tailings. *Microbiology Open*, 6(3), e00446. <https://doi.org/10.1002/mbo3.446>
- Ramalingam, S., Bahuguna, A., Al-Ansari, M. M., Shanmugam, G., Al-Humaid, L., Lee, J. S., & Kim, M. (2022). Whole-genome analysis guided molecular mechanism of cyanogenic glucoside degradation by yeast isolated from *Prunus mume* fruit syrup. *Chemosphere*, 307, 136061. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136061>

- Raza K. (2012). A novel anticlustering filtering algorithm for the prediction of genes as a drug target. *American Journal Biomedical Engineering*, 2:206–211
- Reese, M. G. (2000). Computational prediction of gene structure and regulation in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Universität Hohenheim*
- Reese, M. G. (2001). Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computers and Chemistry*, 26(1), 51–56. [https://doi.org/10.1016/S0097-8485\(01\)00099-7](https://doi.org/10.1016/S0097-8485(01)00099-7)
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 12507–12515. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110968200>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). EdgeR: A bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Robson, R. L., Jones, R., Robson, R. M., Schwartz, A., & Richardson, T. H. (2015). *Azotobacter* genomes: The genome of *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 (ATCC 4412). *PLoS ONE*, 10(6), e0127997. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127997>
- Rodríguez, A., Castrejón-Godínez, M. L., Salazar-Bustamante, E., Gama-Martínez, Y., Sánchez-Salinas, E., Mussali-Galante, P., Tovar-Sánchez, E., & Ortiz-Hernández, M. L. (2020). Omics approaches to pesticide biodegradation. *Current Microbiology*, 77(4), 545–563. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01916-5>
- Roldán, M. D., Olaya-Abril, A., Sáez, L. P., Cabello, P., Luque-Almagro, V. M., & Moreno-Vivián, C. (2021). Bioremediation of cyanide-containing wastes. *EMBO Reports*, 22(11), 1–5. <https://doi.org/10.15252/embr.202153720>
- Ross, R. P., & Claiborne, A. (1992). Molecular cloning and analysis of the gene encoding the NADH oxidase from *Streptococcus faecalis* 10C1. *Journal of Molecular Biology*, 227(3), 658–671. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90215-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90215-6)
- Sáez, L. P., Cabello, P., Ibáñez, I., Luque-Almagro, V. M., Roldán, M. D., & Moreno-Vivián, C. (2019). Cyanate assimilation by the alkaliphilic cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: Mutational analysis of the cyn gene cluster. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20123008>
- Sakai, T., Yanase, H., Sawada, M., & Tonomura, K. (1981). Formation of  $\beta$ -cyanoalanine by cyanide-resistant strain *Enterobacter* sp. 10-1. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(9), 2053–2062. <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864837>
- Salvail, H., Balaji, A., Yu, D., Roth, A., & Breaker, R. R. (2020). Biochemical validation of a fourth guanidine riboswitch class in Bacteria. *Biochemistry*, 59(49), 4654–4662. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00793>
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., & Pühler A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145(1), 69–73. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7)

## Bibliografía

- Scribani-Rossi, C., Barrientos-Moreno, L., Paone, A., Cutruzzolà, F., Paiardini, A., Espinosa-Urgel, M., & Rinaldo, S. (2022). Nutrient sensing and biofilm modulation: The example of L-arginine in *Pseudomonas*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4386. <https://doi.org/10.3390/ijms23084386>
- Seiler, N. (1970). Use of the dansyl reaction in biochemical analysis. *Methods of Biochemical Analysis*, 18, 259–33
- Shakir, F. K., Audilet, D., Drake 3rd, A. J., Shakir, K. M. (1994). A rapid protein determination by modification of the Lowry procedure. *Analytical Biochemistry*, 216(1):232-3. doi: 10.1006/abio.1994.1031
- Sharma, M., Akhter, Y., & Chatterjee, S. (2019). A review on remediation of cyanide containing industrial wastes using biological systems with special reference to enzymatic degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 70. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2643-8>
- Sharma, P., Singh, S. P., Iqbal, H. M. N., & Tong, Y. W. (2022). Omics approaches in bioremediation of environmental contaminants: An integrated approach for environmental safety and sustainability. *Environmental Research*, 211, 113102. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113102>
- Sharma, V. K., Yngard, R. A., Cabelli, D. E., & Clayton Baum, J. (2008). Ferrate(VI) and ferrate(V) oxidation of cyanide, thiocyanate, and copper(I) cyanide. *Radiation Physics and Chemistry*, 77(6), 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2007.11.004>
- Simon R. & Priefer U, P. A. (1983). Broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology*, 1:784-791
- Smith, K. E., House, C. H., Arevalo, R. D., Dworkin, J. P., & Callahan, M. P. (2019). Organometallic compounds as carriers of extraterrestrial cyanide in primitive meteorites. *Nature Communications*, 10(1), 2777. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10866-x>
- Solórzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnology and Oceanography*, 14(5), 799–801. <https://doi.org/10.4319/lo.1969.14.5.0799>
- Solovyev, V., & Salamov, A. (2011). Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. In metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies (Li RE, ed). *Nova Science Publishers*, 61–78. ISBN 978-1-61668-682-6
- Sorci, L., Blaby, I., De Ingeniis, J., Gerdes, S., Raffaelli, N., de Crécy Lagard, V., & Osterman, A. (2010). Genomics-driven reconstruction of *Acinetobacter* NAD metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 39490–39499. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.185629>
- Storz, G., Vogel, J., & Wassarman, K. M. (2011). Regulation by small RNAs in bacteria: Expanding frontiers. *Molecular Cell*, 43(6), 880–891. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.022>
- Tang, P., Hseu, Y.-C., Chou, H.-H., Huang, K.-Y., & Chen, S. Ching. (2010). Proteomic analysis of the effect of cyanide on *Klebsiella oxytoca*. *Current Microbiology*, 60(3), 224–228. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9529-1>
- Terada, A., Komatsu, D., Ogawa, T., Flamandita, D., Sahlan, M., Nishimura, M., & Yohda, M. (2022). Isolation of cyanide-degrading bacteria and molecular characterization of its cyanide-degrading

- nitrilase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(1), 183–189. <https://doi.org/10.1002/bab.2095>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Reserch*, 22:4673-46
- Tramonti, A., Nardella, C., Salvo, M. L., Pascarella, S., & Contestabile, R. (2018). The MocR-like transcription factors: pyridoxal 5'-phosphate-dependent regulators of bacterial metabolism. *The FEBS Journal*, 285(21), 3925–3944. <https://doi.org/10.1111/febs.14599>
- Tran, Q., Lee, H., Jung, J. H., Chang, S.-H., Shrestha, R., Kong, G., Park, J., Kim, S.-H., Park, K.-S., Rhee, H.-W., Yun, J., Cho, M.-H., Kim, K. P., & Park, J. (2022). Emerging role of LETM1/GRP78 axis in lung cancer. *Cell Death & Disease*, 13(6), 543. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04993-5>
- Tshala-Katumbay, D. D., Ngombe, N. N., Okitundu, D., David, L., Westaway, S. K., Boivin, M. J., Mumba, N. D., & Banea, J.-P. (2016). Cyanide and the human brain: Perspectives from a model of food (cassava) poisoning. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1378(1), 50–57. <https://doi.org/10.1111/nyas.13159>
- Van-Iterson, M., Boer, J. M., & Menezes, R. X. (2010). Filtering, FDR and power. *BMC Bioinformatics*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-450>
- Verdin, E. (2015). NAD<sup>+</sup> in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science*, 350(6265), 1208–1213. <https://doi.org/10.1126/science.aac4854>
- Vetting, M. W., S. de Carvalho, L. P., Yu, M., Hegde, S. S., Magnet, S., Roderick, S. L., & Blanchard, J. S. (2005). Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433(1), 212–226. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.003>
- Vilo, C. A., Benedik, M. J., Kunz, D. A., & Dong, Q. (2012). Draft genome sequence of the cyanide-utilizing bacterium *Pseudomonas fluorescens* Strain NCIMB 11764. *Journal of Bacteriology*, 194(23), 6618–6619. <https://doi.org/10.1128/JB.01670-12>
- Wani, A. K., Akhtar, N., Naqash, N., Rahayu, F., Djajadi, D., Chopra, C., Singh, R., Mulla, S. I., Sher, F., & Américo-Pinheiro, J. H. P. (2023). Discovering untapped microbial communities through metagenomics for microplastic remediation: recent advances, challenges, and way forward. *Environmental Science and Pollution Research*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25192-5>
- Wibberg, D., Luque-Almagro, V. M., Igeño, I., Bremges, A., Roldán, M. D., Merchán, F., Sáez, L. P., Guijo, M. I., Manso, I., Macías, D., Cabello, P., Becerra, G., Ibáñez, I., Carmona, I., Escribano, M. P., 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. 175, 67–68. *Journal of Biotechnology, Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.004>
- Wibberg, D., Bremges, A., Dammann-kalinowski, T., Maus, I., Igeño, I., Vogelsang, R., Köning, C., Luque-Almagro, V. M., Roldán, M. D., Sczyrba, A., Moreno-vivián, C., Blasco, R., Pühler, A., & Schlüter, A. (2016). Finished genome sequence and methylome of the cyanide-degrading

## Bibliografía

- Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain CECT5344 as resolved by single-molecule real-time sequencing. *Journal of Biotechnology*, 232, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.008>
- Wu, H., Feng, Y., Li, H., Wang, H., & Wang, J. (2018). Co-metabolism kinetics and electrogenesis change during cyanide degradation in a microbial fuel cell. *RSC Advances*, 8(70), 40407–40416. <https://doi.org/10.1039/C8RA08775J>
- Yanase, H., Sakai, T., & Tonomura, K. (1982). Microbial Utilization of 3-Cyano-L-alanine by *Pseudomonas* sp. *Agriculture and Biology Chemistry*. 131 46(12), 2925–2932
- Yoshikawa, K., Adachi, K., Nishijima, M., Takadera, T., Tamaki, S., Harada, K., Mochida, K., & Sano, H. (2000).  $\beta$ -Cyanoalanine production by marine bacteria on cyanide-free medium and its specific inhibitory activity toward cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 718–722. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.718-722.2000>
- Young, C. A. & Jordan, T. S. (2000). Cyanide remediation; Current and past technologies. *Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research*, 104-129
- Zagobelny, M., Bak, S., Rasmussen, A. V., Jørgensen, B., Naumann, C. M., & Lindberg Møller, B. (2004). Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. *Phytochemistry*, 65(3), 293–306. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.016>
- Zampolli, J., Zeaiter, Z., Di Canito, A., & Di Gennaro, P. (2019). Genome analysis and -omics approaches provide new insights into the biodegradation potential of *Rhodococcus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1069–1080. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9539-7>
- Zerbe, N. F., & Wagner, B. K. J. (1993). Use of vitamin B12 in the treatment and prevention of nitroprusside-induced cyanide toxicity. *Critical Care Medicine*, 21(3), 465–467. <https://doi.org/10.1097/00003246-199303000-00027>
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>





**Material**

**Suplementario**

















**Tabla S2. Proteínas diferencialmente expresadas en células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivadas en CNA y amonio como control.** Se muestran aquellas proteínas significativamente sobreexpresadas ( $FC \geq 2$ ) y reguladas negativamente ( $FC \leq 2$ ). Se indica "CNA" o "N" para indicar que esas proteínas han sido detectadas exclusivamente en las condiciones de CNA o amonio, respectivamente.

Uniprot ID	Gene locus	Protein Name	Fold Change 3-CNA/N	p value
W6R1F1	BN5_4010	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein 1	29.27	0.00902
W6QXC5	BN5_0151	Flavin monoamine oxidase-related protein (EC 1.4.3.4)	18.90	0.001126
W6QQH3	BN5_0593	ABC-type branched-chain amino acid transport systems periplasmic component-like protein	15.71	9.68E-05
W6QQC6	BN5_0543	Transglutaminase domain-containing protein	13.10	0.000153
W6QVA5	BN5_2229	Aminotransferase (EC 2.6.1.-)	12.42	0.005628
W6RKJ4	BN5_3761	Extracellular solute-binding protein	11.33	4.92E-05
W6RAC3	BN5_0149	Putative endoribonuclease L-PSP	10.42	0.003533
W6QWF0	BN5_2246	Uncharacterized protein	9.06	0.00036
W6RC44	BN5_0830	Basic membrane lipoprotein	8.92	0.004173
W6R077	BN5_3958	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	8.86	0.000307
W6R374	BN5_2245	Uncharacterized protein	8.28	0.013879
W6QPA6	BN5_0150	Cytochrome C6	7.50	0.00221
W6RKV8	BN5_3962	Nitrogen regulation protein NR(I)	7.13	0.010376
W6QUE9	BN5_1006	Putative amino-acid ABC transporter-binding protein	6.92	4.76E-05
W6QTP6	BN5_0719	Extracellular solute-binding protein	6.89	0.000352
W6R0L4	BN5_3207	Basic membrane protein A2 Immunodominant antigen P39	6.70	0.013968
W6QRZ0	BN5_1113	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.5.3)	6.15	0.000353
W6R989	BN5_4427	Bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4B (EC 3.5.5.1)	5.30	0.000125
W6RL49	BN5_4062	Uncharacterized protein	4.19	3.32E-05
W6QSQ8	BN5_0414	Poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase (EC 2.3.1.-)	4.04	0.002035
W6QYV0	BN5_3096	Porin D (EC 3.4.21.-)	3.99	0.000201
W6RLB1	BN5_4130	Putative tyrosine-protein kinase epsB (EC 2.7.10.-)	3.57	0.002342
W6QSB1	BN5_0783	Alcohol dehydrogenase (EC 1.-.-.-)	3.44	0.00214
W6QUT3	BN5_1646	Small heat shock protein	3.41	4.96E-06
W6R5D0	BN5_3027	ABC-type Fe <sup>3+</sup> transport system periplasmic component-like protein	3.03	0.010231
W6QY54	BN5_3194	Spermidine/putrescine import ATP-binding protein potA (EC 3.6.3.31)	2.98	0.001015
W6QTK8	BN5_1649	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH (EC 3.4.24.-)	2.89	0.000135
W6RAR6	BN5_0330	Dihydropyrimidinase (EC 3.5.2.2)	2.69	0.002578
W6R0J6	BN5_4079	Membrane-bound lytic murein transglycosylase F	2.65	0.002607
W6R1J1	BN5_1650	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase with PAS/PAC and GAF sensor(S)	2.60	0.011154
W6RE08	BN5_1524	Fumarate hydratase class II (Fumarase C) (EC 4.2.1.2)	2.51	0.00211
W6QZT0	BN5_2953	Outer membrane porin F	2.47	0.000784
W6R104	BN5_1497	Threonine aldolase, low-specificity (EC 4.1.2.5)	2.42	0.002792
W6R2P1	BN5_2079	Uncharacterized protein	2.41	0.032577
W6QP71	BN5_0124	Malate synthase G (EC 2.3.3.9)	2.40	0.001647
W6QXK5	BN5_0267	Polyamine-transporting ATPase (EC 3.6.3.31)	2.38	0.00169
W6RJX5	BN5_3557	SMC domain-containing protein	2.38	0.02707
W6RDM2	BN5_1373	MOSC domain-containing protein 1 (EC 1.-.-.-)	2.38	0.01127
W6QW62	BN5_1647	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC (EC 3.1.21.-)	2.37	0.001478
W6R782	BN5_3669	Catalase-peroxidase (CP) (EC 1.11.1.21) (Peroxidase/catalase)	2.36	0.002267
W6QY03	BN5_0432	Type IV pilus assembly protein PilQ	2.35	0.000493
W6RE45	BN5_1567	Bacterial luciferase family protein (EC 1.14.-.-)	2.35	0.00041
W6RKY3	BN5_3997	Aldehyde dehydrogenase	2.35	0.001177
W6RB40	BN5_0465	Pyruvate dehydrogenase E1 component (EC 1.2.4.1)	2.31	0.001132
W6QYJ4	BN5_2987	Branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein	2.31	0.003671
W6R2G4	BN5_3896	NADPH:quinone oxidoreductase 1 (EC 1.6.5.2)	2.28	0.012844
W6QRD3	BN5_0876	Acetyl-CoA acetyltransferase (EC 2.3.1.9)	2.27	0.008966
W6QS11	BN5_0127	Glycolate oxidase FAD binding subunit (EC 1.1.3.15)	2.25	0.004133
W6R036	BN5_1154	Uncharacterized protein	2.23	0.001496
W6RJ11	BN5_3198	Cyanuric acid amidohydrolase (EC 3.5.2.15)	2.21	1.72E-05
W6QPL1	BN5_0266	Putrescine transport system substrate-binding protein	2.21	0.000791
W6R0Q0	BN5_4131	Putative capsule polysaccharide export protein	2.20	0.002776
W6QZS8	BN5_1079	Thiol:disulfide interchange protein DsbC (EC 5.3.4.1)	2.19	0.029955
W6QYW7	BN5_3493	GTP cyclohydrolase 1 type 2 homolog	2.18	0.004652

W6RAL1	BN5_0265	Putrescine transporter periplasmic protein	2.18	0.010339
W6RKK5	BN5_3776	Putative serine protein kinase, PrkA	2.17	0.005105
W6QY80	BN5_2877	Acyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.3)	2.11	0.020333
W6R2R6	BN5_4453	Uncharacterized protein	2.11	0.020883
W6QXS8	BN5_2222	Peptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding protein	2.11	0.005626
W6ROM8	BN5_1380	3-ketoacyl-CoA thiolase (EC 2.3.1.16) (Acetyl-CoA acyltransferase)	2.10	0.006996
W6R155	BN5_3910	Acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein (EC 1.3.99.-)	2.08	0.004137
W6QX86	BN5_2542	Aconitate hydratase (Aconitase) (EC 4.2.1.3)	2.06	0.00482
W6QZM8	BN5_1034	Zinc-containing alcohol dehydrogenase superfamily (EC 1.1.1.1)	2.06	0.019585
W6QSM0	BN5_0374	Substrate-binding region of ABC-type glycine betaine transport system	2.02	0.004894
W6QYH1	BN5_2967	dCTP deaminase (EC 3.5.4.13) (Deoxycytidine triphosphate deaminase)	2.00	0.019621
W6R9G5	BN5_4497	ATP synthase F1 subunit beta (EC 3.6.3.14)	-2.00	0.012385
W6RKF5	BN5_3697	30S ribosomal protein S10	-2.02	0.014467
W6QYL1	BN5_3372	50S ribosomal protein L25 (General stress protein CTC)	-2.03	0.002583
W6REP1	BN5_1748	Trigger factor (TF) (EC 5.2.1.8) (PPIase)	-2.03	0.013627
W6QZG2	BN5_2833	Elongation factor Ts (EF-Ts)	-2.03	0.006244
W6R1Y8	BN5_3701	30S ribosomal protein S12	-2.06	0.003883
W6QQU7	BN5_0278	Resolvase	-2.06	0.001294
W6QXP5	BN5_0322	ATP-dependent RNA helicase RhlE (EC 3.6.4.13)	-2.06	0.00047
W6QQH7	BN5_0598	Phosphoribosylamine-glycine ligase (EC 6.3.4.13) (GARS)	-2.07	0.014492
W6QPN0	BN5_0286	33 kDa chaperonin (Heat shock protein 33 homolog) (HSP33)	-2.10	0.002295
W6R2W1	BN5_4498	ATP synthase gamma chain (ATP synthase F1 sector gamma subunit)	-2.14	0.003105
W6QZF3	BN5_3673	30S ribosomal protein S11	-2.17	0.023631
W6R1W4	BN5_3691	50S ribosomal protein L22	-2.18	0.013758
W6QP53	BN5_0119	Phosphate-specific transport system accessory protein PhoU	-2.18	0.012711
W6R1S5	BN5_4496	ATP synthase epsilon chain (ATP synthase F1 sector epsilon subunit)	-2.20	0.012936
W6R168	BN5_3925	Malate synthase G (EC 2.3.3.9)	-2.21	0.001359
W6QVX3	BN5_1543	Ribosomal protein S12 methyltransferase RimO (EC 2.8.4.4)	-2.21	0.029528
W6RJL0	BN5_3457	Cell division protein FtsZ	-2.28	0.000106
W6QSW2	BN5_0985	Saccharopine dehydrogenase (EC 1.5.1.7)	-2.30	0.005949
W6R9H1	BN5_4502	ATP synthase subunit c	-2.34	0.003953
W6R0I3	BN5_3670	50S ribosomal protein L17	-2.36	0.011325
W6RKB4	BN5_3682	30S ribosomal protein S8	-2.37	0.001522
W6R1X7	BN5_4198	Laminin subunit gamma-1	-2.38	0.029022
W6QVW1	BN5_2446	Cytochrome c oxidase, cbb3-type, subunit II (EC 1.9.3.1)	-2.39	0.009391
W6R648	BN5_3281	Uncharacterized protein	-2.40	0.031909
W6RJ83	BN5_3304	Uncharacterized protein	-2.41	0.014647
W6R197	BN5_3491	Adenylyl-sulfate kinase (EC 2.7.1.25) (EC 2.7.7.4)	-2.44	0.005591
W6REY3	BN5_1853	Isocitrate lyase (EC 4.1.3.1)	-2.44	0.015809
W6R1C9	BN5_4326	D-methionine-binding lipoprotein metQ	-2.47	0.000654
W6R0P7	BN5_3705	50S ribosomal protein L10	-2.47	0.024309
W6RKD3	BN5_3687	30S ribosomal protein S17	-2.55	0.00991
W6QVT3	BN5_2025	Uncharacterized protein	-2.58	0.004059
W6R7C1	BN5_3694	50S ribosomal protein L23	-2.61	0.014851
W6QWY4	BN5_2448	Cbb3-type cytochrome c oxidase subunit	-2.71	0.004478
W6R0J3	BN5_3680	50S ribosomal protein L18	-2.73	0.010259
W6R473	BN5_4434	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA (EC 1.8.4.11)	-2.78	0.000616
W6QZL4	BN5_3693	50S ribosomal protein L2	-2.91	0.000297
W6QZU8	BN5_2968	Cold shock protein (Beta-ribbon, CspA family)	-2.92	0.015161
W6R1T2	BN5_4501	ATP synthase subunit b (ATP synthase F(0) sector subunit b)	-3.00	0.033557
W6QT34	BN5_0536	30S ribosomal protein S18	-3.05	0.016286
W6RA44	BN5_0118	Phosphate import ATP-binding protein PstB (EC 3.6.3.27)	-3.37	0.005045
W6QWP5	BN5_2353	Uncharacterized protein	-3.39	0.002236
W6QS66	BN5_0209	Alginate regulatory protein AlgP	-3.47	0.001636
W6R202	BN5_4203	50S ribosomal protein L28	-3.48	0.011133
W6R3E0	BN5_2326	50S ribosomal protein L20	-3.77	0.00457
W6RJPF	BN5_3492	Sulfate adenylyltransferase subunit 2 (EC 2.7.7.4)	-3.78	8.76E-05
W6RLE3	BN5_4165	Antioxidant, AhpC/Tsa family (EC 1.11.1.15)	-4.08	0.003468
W6QXZ3	BN5_0422	50S ribosomal protein L31	-4.12	0.034866
W6QZG6	BN5_3683	30S ribosomal protein S14	-4.32	0.008732
W6R788	BN5_3674	30S ribosomal protein S13	-4.33	0.011453
W6RE84	BN5_1603	Glutamate dehydrogenase	-11.42	0.000253
W6RLN9	BN5_4250	NAD(P)(+) transhydrogenase (AB-specific) (EC 1.6.1.2)	-12.01	0.006448
W6QRT0	BN5_0092	Cytochrome c oxidase subunit 2 (EC 1.9.3.1)	CNA	-

W6RA38	BN5_0113	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (EC 3.5.1.28)	CNA	-
W6QQG6	BN5_0126	Glycolate oxidase iron-sulfur subunit	CNA	-
W6RA91	BN5_0128	Glycolate oxidase, subunit GlcD (EC 1.1.3.15)	CNA	-
W6RAA1	BN5_0139	ABC transporter, solute-binding component	CNA	-
W6QQI9	BN5_0142	ABC transporter, ATP-binding component (EC 3.6.3.21)	CNA	-
W6QPN4	BN5_0291	ATP-binding protein of ABC transporter	CNA	-
W6RAQ9	BN5_0315	Protein-glutamate methyltransferase CheB (EC 3.1.1.61)	CNA	-
W6QQZ8	BN5_0328	Dihydropyrimidine dehydrogenase (EC 1.3.1.2)	CNA	-
W6QSH6	BN5_0329	Glutamate synthase (EC 1.4.1.13)	CNA	-
W6QXQ0	BN5_0332	N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase (EC 3.5.1.87)	CNA	-
W6QSI1	BN5_0334	Methyl-accepting chemotaxis protein I	CNA	-
W6QXX9	BN5_0412	Polyhydroxyalkanoate synthase, class II (EC 2.3.1.-)	CNA	-
W6QRB2	BN5_0438	Fis family transcriptional regulator	CNA	-
W6QST4	BN5_0439	ABC-type transporter periplasmic component protein	CNA	-
W6QQ44	BN5_0451	UPF0061 protein BN5_0451	CNA	-
W6QYC6	BN5_0544	Hypothetical protein	CNA	-
W6RBC9	BN5_0552	Urease accessory protein UreG	CNA	-
W6QQF7	BN5_0578	Urease subunit alpha (EC 3.5.1.5) (Urea amidohydrolase subunit alpha)	CNA	-
W6QYH5	BN5_0589	ABC transporter related	CNA	-
W6QRS0	BN5_0590	ABC transporter related	CNA	-
W6RBH5	BN5_0592	Inner-membrane translocator	CNA	-
W6QS16	BN5_0683	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (EC 2.7.3.9)	CNA	-
W6RBV5	BN5_0715	Oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATPase subunit	CNA	-
W6QR22	BN5_0761	Acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein	CNA	-
W6RBZ4	BN5_0770	Uncharacterized protein	CNA	-
W6QTV4	BN5_0784	Pseudouridine synthase (EC 5.4.99.-)	CNA	-
W6RC47	BN5_0835	ABC transporter, ATP-binding protein (EC 3.6.3.17)	CNA	-
W6QZ59	BN5_0852	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase-related, FMN-binding (EC 1.4.3.5)	CNA	-
W6QZK3	BN5_1009	Putative ATP-binding component of a transport system	CNA	-
H9N5E0	BN5_1630	Sigma-54-dependent transcriptional regulator (Transcriptional regulator)	CNA	-
H9N5E1	BN5_1632	Nitrilase (EC 3.5.5.7)	CNA	-
H9N5E5	BN5_1635	AIR synthase related protein domain protein (AIR synthase-like protein)	CNA	-
H9N5D8	BN5_1637	FAD dependent oxidoreductase (FAD-dependent oxidoreductase)	CNA	-
W6REF7	BN5_1648	Phospholipase D/Transphosphatidylase (EC 2.7.8.-)	CNA	-
W6QUX8	BN5_1661	RecBCD enzyme subunit RecD (EC 3.1.11.5) (Exonuclease V subunit RecD)	CNA	-
W6QTY0	BN5_1774	Methyl-accepting chemotaxis protein tlpB	CNA	-
W6QVA7	BN5_1826	Acyl-CoA dehydrogenase family protein	CNA	-
W6QU68	BN5_1874	Replication-associated recombination protein A	CNA	-
W6RF21	BN5_1905	Histidinol-phosphate aminotransferase (EC 2.6.1.9)	CNA	-
W6RF39	BN5_1925	Aliphatic nitrilase (EC 3.5.5.7)	CNA	-
W6QXA8	BN5_2056	Putative CheW protein (EC 2.7.13.3)	CNA	-
W6QUU3	BN5_2114	Nitrate transporter periplasmic component	CNA	-
W6RFM9	BN5_2123	Assimilatory nitrite reductase (Subunit) (EC 1.7.1.4)	CNA	-
W6R2U2	BN5_2125	Nitrate reductase (EC 1.7.99.4)	CNA	-
W6QVA8	BN5_2234	Amidotransferase	CNA	-
W6QVB9	BN5_2244	Transglutaminase domain-containing protein	CNA	-
W6QWF9	BN5_2256	Putative two-component response regulator	CNA	-
W6RG67	BN5_2293	UPF0502 protein BN5_2293	CNA	-
W6R3G9	BN5_2367	Extracellular solute-binding protein	CNA	-
W6QWV0	BN5_2413	GntR family transcriptional regulator	CNA	-
W6QYC5	BN5_2449	Cytochrome c oxidase accessory protein, cbb3-type, CcoG	CNA	-
W6R3S8	BN5_2477	Nitroreductase	CNA	-
W6QX60	BN5_2518	Metallo-beta-lactamase family protein (EC 3.1.2.6)	CNA	-
W6QZD5	BN5_2808	S-formylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.12)	CNA	-
W6QY32	BN5_2822	Acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase (UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase) (EC 2.3.1.129)	CNA	-
W6QYG7	BN5_2962	Penicillin amidase family protein (EC 3.5.1.11)	CNA	-
W6QZX4	BN5_2993	Uracil-DNA glycosylase (UDG) (EC 3.2.2.27)	CNA	-
W6QZY9	BN5_3008	3-hydroxyacyl-CoA-acyl carrier protein transferase (EC 2.4.1.-)	CNA	-
W6QYM4	BN5_3018	Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) (Serine methylase) (EC 2.1.2.1)	CNA	-
W6R002	BN5_3024	Peptidase M14, carboxypeptidase A	CNA	-
W6QXL2	BN5_3048	6-phosphogluconate dehydratase (EC 4.2.1.12)	CNA	-
W6R5J7	BN5_3085	Holliday junction ATP-dependent DNA helicase RuvB (EC 3.6.4.12)	CNA	-
W6QXS7	BN5_3119	Putative quercetin 2,3-dioxygenase PA3240 (EC 1.13.11.24)	CNA	-

W6R097	BN5_3122	Probable septum site-determining protein MinC	CNA	-
W6QZ82	BN5_3191	Pyrimidine biosynthesis enzyme TH13	CNA	-
W6R0K2	BN5_3192	3-ketoacyl-(Acyl-carrier-protein) reductase (EC 1.1.1.100)	CNA	-
W6RJ07	BN5_3193	Dihydroorotase (EC 3.5.2.3)	CNA	-
W6R5Z8	BN5_3200	Uncharacterized protein	CNA	-
W6R622	BN5_3235	Periplasmic oligopeptide-binding protein	CNA	-
W6QZC3	BN5_3236	Acetamidase/formamidase (EC 3.5.1.4)	CNA	-
W6R0U1	BN5_3308	Butyryl-CoA:acetate CoA transferase (EC 2.8.3.5)	CNA	-
W6RJF8	BN5_3397	PhoH family protein	CNA	-
W6R6I9	BN5_3444	Response regulator receiver modulated diguanylate cyclase (EC 3.1.1.61)	CNA	-
W6R6Q1	BN5_3509	ABC transporter related (EC 3.6.3.27)	CNA	-
W6QZ64	BN5_3598	GCN5-related N-acetyltransferase (EC 2.3.1.48)	CNA	-
W6R709	BN5_3604	Oxidoreductase FAD-binding region (EC 1.17.1.1)	CNA	-
W6QZR6	BN5_3762	Polyamine-transporting ATPase (EC 3.6.3.31)	CNA	-
W6R822	BN5_4009	Polyamine-transporting ATPase (EC 3.6.3.31)	CNA	-
W6R1Q3	BN5_4128	1,4-beta-D-xylan xylohydrolase (EC 3.2.1.37)	CNA	-
W6R1R3	BN5_4138	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase (EC 1.1.1.133)	CNA	-
W6R0Y2	BN5_4196	Uncharacterized protein	CNA	-
W6R277	BN5_4268	Breakpoint cluster region protein (EC 2.7.11.1)	CNA	-
W6R2I3	BN5_4383	Uncharacterized protein PYRAB12460	CNA	-
W6R420	BN5_4384	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	CNA	-
W6QQE5	BN5_0116	Phosphate transport system permease protein	N	-
W6QS38	BN5_0169	Xanthine phosphoribosyltransferase (XPRTase) (EC 2.4.2.22)	N	-
W6QPC3	BN5_0171	ATP-dependent DNA helicase Rep (EC 3.6.4.12)	N	-
W6RAS2	BN5_0335	Cytochrome c	N	-
W6RBB8	BN5_0542	UPF0313 protein BN5_0542	N	-
W6QS04	BN5_0663	Type II secretion system protein	N	-
W6QTM2	BN5_0694	TonB-dependent siderophore receptor	N	-
W6QRB3	BN5_0856	50S ribosomal protein L27	N	-
W6QSN9	BN5_0908	DNA repair protein RecN (Recombination protein N)	N	-
W6QU71	BN5_0909	Protein GrpE (HSP-70 cofactor)	N	-
W6QRJ2	BN5_0933	30S ribosomal protein S15	N	-
W6QRY4	BN5_1103	Uncharacterized protein	N	-
W6R0C8	BN5_1270	Putative peptidase (EC 3.4.-.-)	N	-
W6RDQ8	BN5_1420	Uncharacterized protein yggL	N	-
W6QUC9	BN5_1488	Arginine/ornithine transport protein AotP (EC 3.6.3.-)	N	-
W6QTH8	BN5_1644	Uncharacterized protein	N	-
W6R1R4	BN5_1740	Cytosine-specific methyltransferase (EC 2.1.1.37)	N	-
W6R378	BN5_2250	Uncharacterized protein	N	-
W6QWF4	BN5_2251	Coenzyme PQQ synthesis protein F (EC 3.4.99.-)	N	-
W6R3E6	BN5_2337	Coenzyme PQQ synthesis protein E (Pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein E)	N	-
W6RGJ0	BN5_2450	Cytochrome c oxidase accessory protein CcoH	N	-
W6QW61	BN5_2565	Chromosome partition protein Smc	N	-
W6RI39	BN5_2899	Ribonuclease 3 (EC 3.1.26.3) (Ribonuclease III) (RNase III)	N	-
W6QYQ0	BN5_3050	Methylglyoxal synthase (MGS) (EC 4.2.3.3)	N	-
W6RIW6	BN5_3173	Uncharacterized protein	N	-
W6RIZ3	BN5_3183	ISPpu14, transposase Orf3	N	-
W6R634	BN5_3255	Uncharacterized protein	N	-
W6R0Q7	BN5_3267	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU	N	-
W6R0R5	BN5_3277	Queuine tRNA-ribosyltransferase (EC 2.4.2.29) (Guanine insertion enzyme) (tRNA-guanine transglycosylase)	N	-
W6R0S0	BN5_3283	Permease YjgP/YjgQ family protein	N	-
W6RJH8	BN5_3427	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	N	-
W6QZ26	BN5_3480	Cytochrome b	N	-
W6R6Z2	BN5_3589	PAS/PAC sensor signal transduction histidine kinase	N	-
W6R775	BN5_3664	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase (EC 1.1.1.133)	N	-
W6R7C9	BN5_3704	50S ribosomal protein L7/L12	N	-
W6R290	BN5_3816	Uncharacterized protein	N	-
W6RKS8	BN5_3917	Biotin synthase (EC 2.8.1.6)	N	-
W6R047	BN5_3928	DNA polymerase III, epsilon subunit (EC 2.7.7.7)	N	-
W6RKV5	BN5_3957	tRNA sulfurtransferase (EC 2.8.1.4) (Sulfur carrier protein ThiS sulfurtransferase) (Thiamine biosynthesis protein ThiI) (tRNA 4-thiouridine synthase)	N	-

W6R8C8	BN5_4121	Integrase	N	-
W6R108	BN5_4201	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase 1 (EC 3.1.1.61)	N	-
W6R8S5	BN5_4227	Uncharacterized protein	N	-
W6R959	BN5_4392	Probable tonB-dependent receptor yncD	N	-
W6RM88	BN5_4500	ATP synthase subunit delta (ATP synthase F(1) sector subunit delta)	N	-

**Tabla S2. Proteínas diferencialmente expresadas en células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivadas en Residuo y amonio como control.** Se muestran aquellas proteínas significativamente sobreexpresadas ( $FC \geq 2$ ) y reguladas negativamente ( $FC \leq 2$ ). Se indica "R" o "N" para indicar que esas proteínas han sido detectadas exclusivamente en las condiciones de Residuo o amonio, respectivamente.

Uniprot ID	Gene locus	Protein Name	Fold Change R/N	p value
W6QYV6	BN5_0702	Heavy metal translocating P-type ATPase (EC 3.6.3.4)	453.86	0.004078
W6R260	BN5_1907	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase (HTPA synthase) (EC 4.3.3.7)	155.94	9.68E-06
W6R265	BN5_1912	Nitrilase (EC 3.5.5.1)	147.93	0.001059
W6QTM2	BN5_0694	TonB-dependent siderophore receptor	15.06	0.011624
W6R1F1	BN5_4010	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein 1	11.32	0.028131
W6QQH3	BN5_0593	ABC-type branched-chain amino acid transport systems periplasmic component-like protein	8.70	0.000488
W6QQC6	BN5_0543	Transglutaminase domain-containing protein	8.11	4.93E-05
W6QWF0	BN5_2246	Uncharacterized protein	7.09	0.000742
W6R0L4	BN5_3207	Basic membrane protein A2 Immunodominant antigen P39	6.82	0.013247
W6R374	BN5_2245	Uncharacterized protein	6.48	0.025679
W6QXC5	BN5_0151	Flavin monoamine oxidase-related protein (EC 1.4.3.4)	5.94	0.007128
W6RKV8	BN5_3962	Nitrogen regulation protein NR(I)	5.51	0.016608
W6R077	BN5_3958	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	5.36	0.000139
W6RAC3	BN5_0149	Putative endoribonuclease L-PSP	5.32	0.011032
W6RC44	BN5_0830	Basic membrane lipoprotein	4.97	0.005558
W6QY03	BN5_0432	Type IV pilus assembly protein PilQ	4.89	0.000288
W6QY43	BN5_2354	ABC transporter periplasmic protein	4.85	0.002581
W6QQS0	BN5_0248	Binding protein component of ABC iron transporter	4.37	0.003051
W6QUE9	BN5_1006	Putative amino-acid ABC transporter-binding protein	4.24	0.000287
W6QZT0	BN5_2953	Outer membrane porin F	4.17	0.000194
W6QPA6	BN5_0150	Cytochrome C6	4.00	0.017826
W6RFI0	BN5_2077	Uncharacterized protein	3.94	0.002635
W6QYV0	BN5_3096	Porin D (EC 3.4.21.-)	3.73	0.002437
W6QTP6	BN5_0719	Extracellular solute-binding protein	3.68	0.002009
W6QTN7	BN5_1245	Soluble aldose sugar dehydrogenase yliI (EC 1.1.5.-)	3.64	0.003355
W6QXK4	BN5_2157	Outer membrane lipoprotein OprI	3.19	0.002117
W6RDL1	BN5_1358	Probable malate:quinone oxidoreductase (EC 1.1.5.4) (MQO) (Malate dehydrogenase [quinone])	2.99	0.010765
W6QS11	BN5_0127	Glycolate oxidase FAD binding subunit (EC 1.1.3.15)	2.98	0.002118
W6RE08	BN5_1524	Fumarate hydratase class II (Fumarase C) (EC 4.2.1.2)	2.90	0.001361
W6R2G4	BN5_3896	NADPH:quinone oxidoreductase 1 (EC 1.6.5.2)	2.85	0.003237
W6RL49	BN5_4062	Uncharacterized protein	2.79	0.000581
W6QPR3	BN5_0321	UPF0312 protein BN5_0321	2.76	0.003084
W6RKJ4	BN5_3761	Extracellular solute-binding protein	2.68	0.002496
W6RCF1	BN5_0962	Cyclic nucleotide-binding protein	2.64	0.004196
W6QW62	BN5_1647	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC (EC 3.1.21.-)	2.57	0.000587
W6QR96	BN5_0836	Short chain dehydrogenase	2.55	0.011163
W6QWW6	BN5_1894	Uncharacterized protein	2.50	0.003231
W6QWAO	BN5_1657	Lipoprotein heavy metal/multidrug efflux protein	2.46	0.025461
W6RFJ3	BN5_2092	Copper resistance B	2.34	0.013394
W6QUT3	BN5_1646	Small heat shock protein	2.31	6.07E-05
W6R2R6	BN5_4453	Uncharacterized protein	2.29	0.0112
W6QSM0	BN5_0374	Substrate-binding region of ABC-type glycine betaine transport system	2.28	0.005657
W6QVZ5	BN5_2095	Outer membrane porin, OprD family	2.25	0.001812
W6R5A3	BN5_3001	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (HIBADH) (EC 1.1.1.31)	2.23	0.006138

W6QTK8	BN5_1649	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH (EC 3.4.24.-)	2.20	0.00032
W6R8G1	BN5_4152	Porin D (EC 3.4.21.-)	2.17	0.017064
W6R1W7	BN5_1805	Uncharacterized protein	2.16	0.009127
W6R782	BN5_3669	Catalase-peroxidase (CP) (EC 1.11.1.21) (Peroxidase/catalase)	2.15	0.000213
W6QQ88	BN5_0496	Outer membrane channel protein	2.13	0.011837
W6RB40	BN5_0465	Pyruvate dehydrogenase E1 component (EC 1.2.4.1)	2.12	0.002093
W6R0J6	BN5_4079	Membrane-bound lytic murein transglycosylase F	2.10	0.012521
W6R8V0	BN5_4267	Putative virulence effector protein	2.09	0.017482
W6R5D0	BN5_3027	ABC-type Fe <sup>3+</sup> transport system periplasmic component-like protein	2.08	0.028457
W6QQ57	BN5_0466	Glutamate-ammonia-ligase adenylyltransferase (EC 2.7.7.42)	2.06	0.002189
W6RK30	BN5_3612	Putative periplasmic binding protein	2.06	0.015052
W6QYW7	BN5_3493	GTP cyclohydrolase 1 type 2 homolog	2.05	0.014667
W6RKK5	BN5_3776	Putative serine protein kinase, PrkA	2.03	6.00E-06
W6QZ51	BN5_0842	Beta-alanine-pyruvate transaminase (EC 2.6.1.18)	2.01	0.004145
W6R3F0	BN5_2342	PQQ-containing dehydrogenase	2.01	0.008395
W6R2H7	BN5_2024	ATP-dependent RNA helicase DeaD (EC 3.6.4.13) (Cold-shock DEAD box protein A)	-2.06	0.006563
W6QZM4	BN5_3703	DNA-directed RNA polymerase subunit beta (RNAP subunit beta) (EC 2.7.7.6)	-2.06	0.001582
W6R6R3	BN5_3519	Leucine--tRNA ligase (EC 6.1.1.4) (Leucyl-tRNA synthetase) (LeuRS)	-2.09	0.031037
W6QQ48	BN5_0456	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase J (EC 2.1.1.266) (23S rRNA (adenine(2030)-N6)-methyltransferase) (23S rRNA m6A2030 methyltransferase)	-2.11	0.004557
W6R5P9	BN5_3130	Lon protease (EC 3.4.21.53) (ATP-dependent protease La)	-2.11	0.009075
W6QP53	BN5_0119	Phosphate-specific transport system accessory protein PhoU	-2.12	0.027154
W6QZF3	BN5_3673	30S ribosomal protein S11	-2.14	0.007446
W6R197	BN5_3491	Adenylyl-sulfate kinase (EC 2.7.1.25) (EC 2.7.7.4)	-2.14	0.010155
W6QUD1	BN5_0981	Chromosome segregation ATPase	-2.15	0.00345
W6RJP2	BN5_3487	Cell division protein ZapE (Z ring-associated protein ZapE)	-2.20	0.013662
W6R0I3	BN5_3670	50S ribosomal protein L17	-2.23	0.005529
W6QV37	BN5_1751	Lon protease (EC 3.4.21.53) (ATP-dependent protease La)	-2.25	0.011532
W6RKA2	BN5_3672	30S ribosomal protein S4	-2.27	0.001459
W6R2W1	BN5_4498	ATP synthase gamma chain (ATP synthase F1 sector gamma subunit)	-2.29	0.004028
W6QYJ1	BN5_0604	Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit (EC 6.4.1.2)	-2.29	0.000733
W6QXF0	BN5_0187	Diaminopimelate epimerase (DAP epimerase) (EC 5.1.1.7)	-2.30	0.006955
W6RDN8	BN5_1393	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.-)	-2.32	0.005137
W6QQ64	BN5_0001	Chromosomal replication initiator protein DnaA	-2.34	0.015373
W6QTT2	BN5_1291	Ribonucleoside-diphosphate reductase (EC 1.17.4.1)	-2.36	0.000523
W6RKW1	BN5_3967	Chaperone protein clpB	-2.39	0.004408
W6QXP5	BN5_0322	ATP-dependent RNA helicase RhlE (EC 3.6.4.13)	-2.43	0.000424
W6QUZ6	BN5_1206	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	-2.45	0.011678
W6QYI6	BN5_0599	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH [Includes: IMP cyclohydrolase (EC 3.5.4.10) (ATIC) (Inosinicase) (IMP synthase); Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase (EC 2.1.2.3) (AICAR transformylase)]	-2.50	0.006144
W6QQU7	BN5_0278	Resolvase	-2.52	0.000922
W6REY3	BN5_1853	Isocitrate lyase (EC 4.1.3.1)	-2.59	0.00341
W6REZ0	BN5_1863	Isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42)	2.60	0.001035
W6R034	BN5_1149	Formyltetrahydrofolate deformylase (EC 3.5.1.10) (Formyl-FH(4) hydrolase)	-2.64	0.007736
W6R2X2	BN5_4508	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG	-2.71	0.001106
W6R0J3	BN5_3680	50S ribosomal protein L18	-2.71	0.024036
W6QZN2	BN5_1039	2-isopropylmalate synthase (EC 2.3.3.13) (Alpha-IPM synthase) (Alpha-isopropylmalate synthase)	-2.71	0.022605
W6R6R8	BN5_3524	Transcriptional regulator, XRE family	-2.71	0.006106
W6R473	BN5_4434	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA (Protein-methionine-S-oxide reductase) (EC 1.8.4.11) (Peptide-methionine (S)-S-oxide reductase) (Peptide Met(O) reductase)	-2.73	0.001245
W6QSV0	BN5_0970	Acetolactate synthase (EC 2.2.1.6)	-2.74	0.008406
W6QS70	BN5_0214	Putative ABC transporter ATP-binding protein yheS	-2.79	0.01661
W6R168	BN5_3925	Malate synthase G (EC 2.3.3.9)	-2.82	0.000802
W6QYV7	BN5_3483	50S ribosomal protein L13	-2.83	0.000383
W6QUZ9	BN5_1686	UDP-N-acetyl-D-mannosamine dehydrogenase (EC 1.1.1.-)	-3.01	0.001474
W6QSW2	BN5_0985	Saccharopine dehydrogenase (EC 1.5.1.7)	-3.02	0.001183
W6R1N1	BN5_1685	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (EC 5.1.3.14)	-3.09	0.000118
W6RC63	BN5_0860	Probable malate:quinone oxidoreductase (EC 1.1.5.4) (MQO) (Malate dehydrogenase [quinone])	-3.09	0.003636

W6QUJ2	BN5_1560	GTP pyrophosphokinase (EC 2.7.6.5)	-3.12	0.01887
W6QT13	BN5_1030	Uncharacterized protein	-3.25	0.000822
W6R3W8	BN5_4334	Import inner membrane translocase, subunit Tim44	-3.29	0.001146
W6QZF8	BN5_3678	50S ribosomal protein L30	-3.54	0.00159
W6RJL0	BN5_3457	Cell division protein FtsZ	-3.64	0.000549
W6R3I5	BN5_2387	3-isopropylmalate dehydratase small subunit (EC 4.2.1.33) (Alpha-IPM isomerase) (IPMI) (Isopropylmalate isomerase)	-3.77	0.001181
W6R0E8	BN5_1290	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta (EC 1.17.4.1)	-3.85	0.000317
W6QNV1	BN5_0004	DNA gyrase subunit B (EC 5.99.1.3)	-4.20	0.003094
W6RC60	BN5_0855	50S ribosomal protein L21	-4.78	0.001448
W6R202	BN5_4203	50S ribosomal protein L28	-5.42	0.002343
W6RKD3	BN5_3687	30S ribosomal protein S17	-5.84	0.000183
W6QWS7	BN5_2388	3-isopropylmalate dehydratase large subunit (EC 4.2.1.33) (Alpha-IPM isomerase) (IPMI) (Isopropylmalate isomerase)	-5.97	0.000421
W6RLE3	BN5_4165	Antioxidant, AhpC/Tsa family (EC 1.11.1.15)	-6.06	0.004526
W6RA44	BN5_0118	Phosphate import ATP-binding protein PstB (EC 3.6.3.27) (ABC phosphate transporter) (Phosphate-transporting ATPase)	-7.00	0.007325
W6RLN9	BN5_4250	NAD(P)(+) transhydrogenase (AB-specific) (EC 1.6.1.2)	-7.53	0.001154
W6RE84	BN5_1603	Glutamate dehydrogenase	-8.03	0.000431
W6RJP7	BN5_3492	Sulfate adenyltransferase subunit 2 (EC 2.7.7.4) (ATP-sulfurylase small subunit) (Sulfate adenylate transferase) (SAT)	-15.46	2.67E-05
W6QWV7	BN5_0025	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase B (EC 2.1.1.-)	N	-
W6QX52	BN5_0105	Probable GTP-binding protein EngB	N	-
W6QQE5	BN5_0116	Phosphate transport system permease protein	N	-
W6QQK7	BN5_0168	Cytochrome c5-like protein	N	-
W6QPC3	BN5_0171	ATP-dependent DNA helicase Rep (EC 3.6.4.12)	N	-
W6RAQ0	BN5_0310	Response regulator receiver protein	N	-
W6QR20	BN5_0348	Lipoprotein, putative	N	-
W6QSW5	BN5_0469	Lipopolysaccharide heptosyltransferase I (EC 2.4.-.-)	N	-
W6QQ70	BN5_0476	Glycosyl transferase, family 2 (EC 2.4.-.-)	N	-
W6QY48	BN5_0477	Uncharacterized protein	N	-
W6RB57	BN5_0480	Capsule polysaccharide export protein	N	-
W6RBB8	BN5_0542	UPF0313 protein BN5_0542	N	-
W6QQD1	BN5_0548	Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase (EC 3.2.2.n1)	N	-
W6QQV2	BN5_0691	Peptide chain release factor 3 (RF-3)	N	-
W6RBV0	BN5_0710	tRNA/tmRNA (uracil-C(5))-methyltransferase (EC 2.1.1.-) (EC 2.1.1.35) (tRNA (uracil(54)-C(5))-methyltransferase) (tRNA(m5U54)-methyltransferase) (RUMT) (tmRNA (uracil(341)-C(5))-methyltransferase)	N	-
W6QS68	BN5_0743	CBS domain-containing protein	N	-
W6RBX9	BN5_0745	PhoH family protein	N	-
W6QTY1	BN5_0814	Hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family protein	N	-
W6QRB3	BN5_0856	50S ribosomal protein L27	N	-
W6QSI8	BN5_0858	Glutamate 5-kinase (EC 2.7.2.11) (Gamma-glutamyl kinase) (GK)	N	-
W6QRE4	BN5_0886	Beta-lactamase domain-containing protein	N	-
W6QRF6	BN5_0896	Nitroreductase (EC 1.-.-.-)	N	-
W6QSN9	BN5_0908	DNA repair protein RecN (Recombination protein N)	N	-
W6QRI7	BN5_0928	Ribosome maturation factor RimP	N	-
W6QRJ2	BN5_0933	30S ribosomal protein S15	N	-
W6QUH1	BN5_1031	Adenine-specific DNA-methyltransferase (EC 2.1.1.172)	N	-
W6QRX5	BN5_1088	Oxidoreductase, GMC family (EC 1.1.99.1)	N	-
W6QSC0	BN5_1238	Phosphonates import ATP-binding protein PhnC (EC 3.6.3.28)	N	-
W6R0C8	BN5_1270	Putative peptidase (EC 3.4.-.-)	N	-
W6RDG8	BN5_1303	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer	N	-
W6R0H3	BN5_1320	CAIB/BAIF family protein (EC 2.8.3.16)	N	-
W6R0T3	BN5_1432	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, putative (EC 3.1.4.46)	N	-
W6RDS2	BN5_1435	Lipoprotein-releasing system transmembrane protein lolC	N	-
W6RDT9	BN5_1455	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (EC 2.3.1.39)	N	-
W6QUC9	BN5_1488	Arginine/ornithine transport protein AotP (EC 3.6.3.-)	N	-
W6RDY8	BN5_1500	Carbon storage regulator homolog	N	-
W6QVX3	BN5_1543	Ribosomal protein S12 methylthiotransferase RimO (S12 MTTase) (S12 methylthiotransferase) (EC 2.8.4.4) (Ribosomal protein S12 (aspartate-C(3))-methylthiotransferase) (Ribosome maturation factor RimO)	N	-
W6QTH8	BN5_1644	Uncharacterized protein	N	-
W6R1R4	BN5_1740	Cytosine-specific methyltransferase (EC 2.1.1.37)	N	-
W6R238	BN5_1886	Response regulator in two-component regulatory system	N	-

W6R327	BN5_2180	Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor subunit	N	-
W6R360	BN5_2225	Peptide ABC transporter, putative ATP-binding protein (EC 3.6.3.25)	N	-
W6QWF4	BN5_2251	Coenzyme PQQ synthesis protein F (EC 3.4.99.-)	N	-
W6QXV6	BN5_2252	tRNA-dihydrouridine(20/20a) synthase (EC 1.3.1.-) (EC 1.3.1.91) (U20- specific dihydrouridine synthase) (U20-specific Dus) (tRNA-dihydrouridine synthase A)	N	-
W6RG60	BN5_2283	Uncharacterized protein	N	-
W6R3E6	BN5_2337	Coenzyme PQQ synthesis protein E (Pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein E)	N	-
W6QXK9	BN5_2657	Nitrogen regulation protein NR(I)	N	-
W6R4M0	BN5_2738	Uncharacterized protein	N	-
W6QXW7	BN5_2749	2,4-dienoyl-coa reductase FADH1, putative (EC 1.3.1.34)	N	-
W6QX50	BN5_2875	ATP-dependent helicase HrpA (EC 3.6.1.-)	N	-
W6RI39	BN5_2899	Ribonuclease 3 (EC 3.1.26.3) (Ribonuclease III) (RNase III)	N	-
W6QYQ0	BN5_3050	Methylglyoxal synthase (MGS) (EC 4.2.3.3)	N	-
W6QYS5	BN5_3076	7-cyano-7-deazaguanine synthase (EC 6.3.4.20)	N	-
W6RIZ3	BN5_3183	ISPpu14, transposase Orf3	N	-
W6R634	BN5_3255	Uncharacterized protein	N	-
W6R0R5	BN5_3277	Queuine tRNA-ribosyltransferase (EC 2.4.2.29) (Guanine insertion enzyme) (tRNA-guanine transglycosylase)	N	-
W6R0S0	BN5_3283	Permease YjgP/YjgQ family protein	N	-
W6QZI3	BN5_3307	3-oxoacid CoA-transferase (EC 2.8.3.5)	N	-
W6QYG6	BN5_3315	Beta-lactamase domain-containing protein	N	-
W6QYV2	BN5_3478	Glutathione S-transferase domain-containing protein (EC 2.5.1.18)	N	-
W6R6W3	BN5_3564	Lipoyl synthase (EC 2.8.1.8) (Lip-syn) (LS) (Lipoate synthase) (Lipoic acid synthase) (Sulfur insertion protein LipA)	N	-
W6R6Z2	BN5_3589	PAS/PAC sensor signal transduction histidine kinase	N	-
W6R1P1	BN5_3646	Riboflavin biosynthesis protein RibD	N	-
W6R775	BN5_3664	dTDP-4-dehydrothiamine reductase (EC 1.1.1.133)	N	-
W6QZN4	BN5_3717	Bifunctional ligase/repressor BirA (Biotin operon repressor) (Biotin-- [acetyl-CoA-carboxylase] ligase) (EC 6.3.4.15) (Biotin--protein ligase) (Biotin-[acetyl-CoA carboxylase] synthetase)	N	-
W6R290	BN5_3816	Uncharacterized protein	N	-
W6R2H4	BN5_3906	Acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein (EC 1.3.99.-)	N	-
W6RKS8	BN5_3917	Biotin synthase (EC 2.8.1.6)	N	-
W6R047	BN5_3928	DNA polymerase III, epsilon subunit (EC 2.7.7.7)	N	-
W6RKV5	BN5_3957	tRNA sulfurtransferase (EC 2.8.1.4) (Sulfur carrier protein ThiS sulfurtransferase) (Thiamine biosynthesis protein Thil) (tRNA 4-thiouridine synthase)	N	-
W6R1C2	BN5_3980	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase (EC 2.1.1.33) (tRNA (guanine(46)-N(7))-methyltransferase) (tRNA(m7G46)-methyltransferase)	N	-
W6R0C3	BN5_4008	UPF0064 protein yccW	N	-
W6R1M3	BN5_4097	Poly(3-hydroxyalkanoate) synthetase (EC 3.1.1.-)	N	-
W6R8C8	BN5_4121	Integrase	N	-
W6R108	BN5_4201	Chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase 1 (EC 3.1.1.61)	N	-
W6R8R3	BN5_4212	Orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) (OPRTase) (EC 2.4.2.10)	N	-
W6RLS9	BN5_4295	Uncharacterized protein	N	-
W6RLW8	BN5_4345	Alpha/beta hydrolase fold (EC 3.-.-.-)	N	-
W6R1I6	BN5_4391	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD (EC 1.11.1.15)	N	-
W6R959	BN5_4392	Probable tonB-dependent receptor yncD	N	-
W6R1N7	BN5_4451	Putative HTH-type transcriptional regulator ykgD	N	-
W6R9H7	BN5_4507	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G (EC 2.1.1.170) (16S rRNA 7-methylguanosine methyltransferase) (16S rRNA m7G methyltransferase)	N	-
W6RA91	BN5_0128	Glycolate oxidase, subunit GlcD (EC 1.1.3.15)	R	-
W6RAA1	BN5_0139	ABC transporter, solute-binding component	R	-
W6QS35	BN5_0164	D-amino acid dehydrogenase (EC 1.4.99.-)	R	-
W6QQU2	BN5_0273	Acetylornithine deacetylase (EC 3.5.1.-) (EC 3.5.1.16)	R	-
W6QSE5	BN5_0294	Formate dehydrogenase, alpha subunit (EC 1.2.1.2)	R	-
W6RAP3	BN5_0295	Sulfurtransferase FdhD	R	-
W6QXM7	BN5_0297	LysM domain/BON superfamily protein	R	-
W6QXQ0	BN5_0332	N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase (EC 3.5.1.87)	R	-
W6QSI1	BN5_0334	Methyl-accepting chemotaxis protein I	R	-
W6QST4	BN5_0439	ABC-type transporter periplasmic component protein	R	-
W6RB18	BN5_0440	ABC transporter inner membrane subunit protein	R	-
W6QQ36	BN5_0441	ABC transporter/ATPase component protein	R	-

W6QY14	BN5_0442	Cyanate hydratase (Cyanase) (EC 4.2.1.104) (Cyanate hydrolase)	R	-
W6QQ40	BN5_0446	Cobyrinic acid a,c-diamide synthase (EC 6.3.5.10)	R	-
W6QQA3	BN5_0516	ADP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase (EC 4.2.1.136) (EC 5.1.99.6) (ADP-dependent NAD(P)HX dehydratase) (NAD(P)H-hydrate epimerase) (NAD(P)HX epimerase)	R	-
W6QY94	BN5_0517	Uncharacterized protein	R	-
W6RBC9	BN5_0552	Urease accessory protein UreG	R	-
W6QQF7	BN5_0578	Urease subunit alpha (EC 3.5.1.5) (Urea amidohydrolase subunit alpha)	R	-
W6QYH5	BN5_0589	ABC transporter related	R	-
W6QRS0	BN5_0590	ABC transporter related	R	-
W6RBH5	BN5_0592	Inner-membrane translocator	R	-
W6QS16	BN5_0683	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (EC 2.7.3.9)	R	-
W6QQW2	BN5_0701	MerR family transcriptional regulator	R	-
W6QTN1	BN5_0704	Heavy metal transport/detoxification protein	R	-
W6RC47	BN5_0835	ABC transporter, ATP-binding protein (EC 3.6.3.17)	R	-
W6RCL0	BN5_1022	TRAP-type uncharacterized transport system periplasmic component-like protein	R	-
W6QT87	BN5_1095	Uncharacterized protein	R	-
W6RD56	BN5_1172	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family (EC 1.-.-.-)	R	-
W6QSC5	BN5_1243	Nuclear receptor binding factor related protein (EC 1.3.1.38)	R	-
W6RDF9	BN5_1293	Putative transcriptional regulator ycf27	R	-
W6RDK8	BN5_1353	Protein ccoG	R	-
W6QSP1	BN5_1354	Nitrite/sulfite reductase, hemoprotein beta-component, ferredoxin-like:nitrite and sulphite reductase 4Fe-4S region (EC 1.8.1.2)	R	-
W6R0K4	BN5_1355	Uncharacterized protein	R	-
W6R0L7	BN5_1370	Pirin-like protein CC_1473	R	-
W6QT28	BN5_1491	Arginine N-succinyltransferase (EC 2.3.1.109)	R	-
H9N5E1	BN5_1632	Nitrilase (EC 3.5.5.7)	R	-
H9N5E3	BN5_1633	Radical SAM domain-containing protein (Radical SAM domain-containing proteinBiotin synthase-related enzymeRibosomal RNA large subunit methyltransferase N) (EC 2.1.1.-)	R	-
H9N5E4	BN5_1634	Acetyltransferase (GCN5-related N-acetyltransferase)	R	-
H9N5E5	BN5_1635	AIR synthase related protein domain protein (AIR synthase-like protein)	R	-
H9N5D8	BN5_1637	FAD dependent oxidoreductase (FAD-dependent oxidoreductase)	R	-
W6R243	BN5_1892	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator ywbl	R	-
W6RF13	BN5_1895	Uncharacterized protein	R	-
W6QU90	BN5_1901	Uncharacterized protein	R	-
W6R254	BN5_1902	Terminal oxidase subunit I (EC 1.10.3.-)	R	-
W6QWX6	BN5_1904	Phosphoserine aminotransferase (EC 2.6.1.52)	R	-
W6RF21	BN5_1905	Histidinol-phosphate aminotransferase (EC 2.6.1.9) (Imidazole acetol-phosphate transaminase)	R	-
W6QU95	BN5_1906	Acetylmethionine aminotransferase (ACOAT) (EC 2.6.1.11)	R	-
W6QWY1	BN5_1909	Methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.5.1.20)	R	-
W6RF25	BN5_1910	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	R	-
W6QUB2	BN5_1921	Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) (Serine methylase) (EC 2.1.2.1)	R	-
W6RF39	BN5_1925	Aliphatic nitrilase (EC 3.5.5.7)	R	-
W6QUS9	BN5_2098	CzcB family heavy metal RND efflux membrane fusion protein	R	-
W6R2R4	BN5_2099	Outer membrane efflux protein	R	-
W6QUU3	BN5_2114	Nitrate transporter periplasmic component	R	-
W6QW12	BN5_2116	Nitrate ABC transporter, ATPase subunits C and D (EC 3.6.3.31)	R	-
W6QXH1	BN5_2122	Protein kinase (EC 2.7.1.-)	R	-
W6RFM9	BN5_2123	Assimilatory nitrite reductase (Subunit) (EC 1.7.1.4)	R	-
W6QUV5	BN5_2124	Nitrite reductase (NAD(P)H) small subunit (EC 1.7.1.4)	R	-
W6R2U2	BN5_2125	Nitrate reductase (EC 1.7.99.4)	R	-
W6QV68	BN5_2194	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB (EC 1.8.4.12) (Peptide-methionine (R)-S-oxide reductase)	R	-
W6QVB9	BN5_2244	Transglutaminase domain-containing protein	R	-
W6QWF9	BN5_2256	Putative two-component response regulator	R	-
W6RG67	BN5_2293	UPF0502 protein BN5_2293	R	-
W6QY34	BN5_2344	Metallo-lactamase	R	-
W6R3G9	BN5_2367	Extracellular solute-binding protein	R	-
W6QWV0	BN5_2413	GntR family transcriptional regulator	R	-
W6QYC5	BN5_2449	Cytochrome c oxidase accessory protein, cbb3-type, CcoG	R	-
W6R3S8	BN5_2477	Nitroreductase	R	-
W6RGP7	BN5_2510	RND family efflux transporter MFP subunit	R	-

W6RHH5	BN5_2731	Uncharacterized protein	R	-
W6QZP0	BN5_2918	Putative tricarboxylic transport membrane protein	R	-
W6R002	BN5_3024	Peptidase M14, carboxypeptidase A	R	-
W6QXM0	BN5_3058	FMN-dependent NADH-azoreductase (EC 1.7.-.-) (Azo-dye reductase)	R	-
W6QXM5	BN5_3063	Oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding subunit (EC 1.18.1.2)	R	-
W6QXS7	BN5_3119	Putative quercetin 2,3-dioxygenase PA3240 (EC 1.13.11.24)	R	-
W6R622	BN5_3235	Periplasmic oligopeptide-binding protein	R	-
W6QZC3	BN5_3236	Acetamidase/formamidase (EC 3.5.1.4)	R	-
W6R0W2	BN5_3333	Carbamate kinase	R	-
W6RJF8	BN5_3397	PhoH family protein	R	-
W6R6I9	BN5_3444	Response regulator receiver modulated diguanylate cyclase (EC 3.1.1.61)	R	-
W6R6N0	BN5_3489	Alpha/beta fold family hydrolase-like protein	R	-
W6QZ48	BN5_3583	MORN repeat-containing protein	R	-
W6R0H4	BN5_3660	MotA/TolQ/ExbB proton channel	R	-
W6RKG4	BN5_3716	Type III pantothenate kinase (EC 2.7.1.33) (PanK-III) (Pantothenic acid kinase)	R	-
W6RKJ9	BN5_3771	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.262) (4-(phosphohydroxy)-L-threonine dehydrogenase)	R	-
W6R7X3	BN5_3959	Uncharacterized protein	R	-
W6R822	BN5_4009	Polyamine-transporting ATPase (EC 3.6.3.31)	R	-
W6R8A0	BN5_4096	Phasin-like protein	R	-
W6R1Q3	BN5_4128	1,4-beta-D-xylan xylohydrolase (EC 3.2.1.37)	R	-
W6R8K7	BN5_4197	Putative glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	R	-
W6R131	BN5_4211	Keratin, type II cytoskeletal 75	R	-
W6R257	BN5_4248	Glutaryl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.8.6)	R	-
W6R8X4	BN5_4292	Uncharacterized protein	R	-
W6R420	BN5_4384	Putative oxidoreductase (EC 1.1.1.-)	R	-
W6R446	BN5_4409	Outer membrane efflux protein	R	-

**Tabla S2. Proteínas diferencialmente expresadas en células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 cultivadas en CNA y residuo.** Se muestran aquellas proteínas significativamente sobreexpresadas ( $FC \geq 2$ ) y reguladas negativamente ( $FC \leq 2$ ). Se indica "CNA" o "R" para indicar que esas proteínas han sido detectadas exclusivamente en las condiciones de CNA o residuo, respectivamente.

Uniprot ID	Gene locus	Protein Name	Fold Change CNA/R	p value
W6QWU9	BN5_2775	Uncharacterized protein	47.42	0.001024
W6QYH5	BN5_0589	ABC transporter related	8.91	0.000694
W6QQB2	BN5_0076	Extracellular solute-binding protein	6.32	0.018374
W6QVA5	BN5_2229	Aminotransferase (EC 2.6.1.-)	6.18	0.00042
W6R989	BN5_4427	Bifunctional nitrilase/nitrile hydratase NIT4B (EC 3.5.5.1)	5.63	4.46E-05
W6RKJ4	BN5_3761	Extracellular solute-binding protein	4.23	9.97E-05
W6RJP7	BN5_3492	Sulfate adenyltransferase subunit 2 (EC 2.7.7.4)	4.08	0.000563
W6RKW1	BN5_3967	Chaperone protein clpB	4.02	0.008259
W6QRZ0	BN5_1113	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.5.3)	3.98	1.21E-05
W6QSQ8	BN5_0414	Poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase (EC 2.3.1.-)	3.73	0.014692
W6QUJ2	BN5_1560	GTP pyrophosphokinase (EC 2.7.6.5)	3.64	0.008589
W6QX15	BN5_0075	Acetylpolyamine aminohydrolase (EC 3.5.1.98)	3.54	0.002772
W6RLB1	BN5_4130	Putative tyrosine-protein kinase epsB (EC 2.7.10.-)	3.28	0.002407
W6QUZ6	BN5_1206	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)	3.27	0.001894
W6QWS7	BN5_2388	3-isopropylmalate dehydratase large subunit (EC 4.2.1.33)	3.19	4.55E-05
W6QXC5	BN5_0151	Flavin monoamine oxidase-related protein (EC 1.4.3.4)	3.18	1.21E-05
W6R3W8	BN5_4334	Import inner membrane translocase, subunit Tim44	2.89	0.000183
W6RC60	BN5_0855	50S ribosomal protein L21	2.85	0.001538
W6QTJ2	BN5_0654	NADH dehydrogenase (EC 1.6.99.3)	2.70	0.00629
W6RBH5	BN5_0592	Inner-membrane translocator	2.69	0.004146
W6R5P9	BN5_3130	Lon protease (EC 3.4.21.53) (ATP-dependent protease La)	2.67	0.000383
W6R0E8	BN5_1290	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit beta (EC 1.17.4.1)	2.63	0.002532
W6R1F1	BN5_4010	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein 1	2.59	0.006257
W6QXK5	BN5_0267	Polyamine-transporting ATPase (EC 3.6.3.31)	2.56	0.001286
W6RD85	BN5_1207	Universal stress protein E	2.55	0.001381

W6R822	BN5_4009	Polyamine-transporting ATPase (EC 3.6.3.31)	2.54	0.001585
W6QXQ0	BN5_0332	N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase (EC 3.5.1.87)	2.48	0.019617
W6R0M8	BN5_1380	3-ketoacyl-CoA thiolase (EC 2.3.1.16) (Acetyl-CoA acyltransferase)	2.43	0.013043
W6QUZ9	BN5_1686	UDP-N-acetyl-D-mannosamine dehydrogenase (EC 1.1.1.-)	2.42	0.002407
W6QZK4	BN5_3332	Ornithine carbamoyltransferase (OTCase) (EC 2.1.3.3)	2.42	0.006331
W6R3I5	BN5_2387	3-isopropylmalate dehydratase small subunit (EC 4.2.1.33)	2.41	0.00618
W6RFP6	BN5_2138	Citrate synthase	2.38	8.05E-05
W6QY54	BN5_3194	Spermidine/putrescine import ATP-binding protein potA (EC 3.6.3.31)	2.34	0.001656
W6QYV7	BN5_3483	50S ribosomal protein L13	2.33	7.88E-05
W6RKD3	BN5_3687	30S ribosomal protein S17	2.29	0.008624
W6R0A0	BN5_1229	ABC transporter, binding protein	2.28	0.004159
W6R2X2	BN5_4508	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification enzyme MnmG	2.25	0.000516
W6QT13	BN5_1030	Uncharacterized protein	2.25	0.000192
W6QSR7	BN5_1379	Fatty acid oxidation complex (EC 1.1.1.35) (EC 4.2.1.17) (EC 5.1.2.3)	2.24	3.71E-06
W6QSV0	BN5_0970	Acetolactate synthase (EC 2.2.1.6)	2.24	0.012951
W6QQ48	BN5_0456	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase J (EC 2.1.1.266)	2.21	0.001192
W6R342	BN5_4098	Phosphate acetyl/butaryl transferase (EC 2.3.1.8)	2.18	0.013414
W6RHN5	BN5_2779	Nitrate reductase (EC 1.7.99.4)	2.18	0.002548
W6RHY4	BN5_2859	Glutamate synthase (NADPH) (EC 1.4.1.13)	2.16	0.001745
W6QQ64	BN5_0001	Chromosomal replication initiator protein DnaA	2.09	0.001716
W6QYA7	BN5_2902	Elongation factor 4 (EF-4) (EC 3.6.5.n1) (Ribosomal back-translocase LepA)	2.09	0.014808
W6QYJ1	BN5_0604	Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit (EC 6.4.1.2)	2.08	0.000201
W6R1N1	BN5_1685	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (EC 5.1.3.14)	2.03	4.54E-07
W6QVB9	BN5_2244	Transglutaminase domain-containing protein	2.03	0.003559
W6R1Q8	BN5_4133	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase/mannose-6-phosphate isomerase (EC 2.7.7.22)	2.02	0.001117
W6QVL9	BN5_2346	ABC transporter, solute binding protein	-2.01	0.016581
W6QVZ5	BN5_2095	Outer membrane porin, OprD family	-2.04	0.001224
W6QY03	BN5_0432	Type IV pilus assembly protein PilQ	-2.08	0.005334
W6R2R0	BN5_2094	Uncharacterized protein	-2.12	0.021446
W6RFJ3	BN5_2092	Copper resistance B	-2.12	0.001431
W6RK91	BN5_3662	OmpW family outer membrane protein	-2.13	0.003553
W6QTN7	BN5_1245	Soluble aldose sugar dehydrogenase yliI (EC 1.1.5.-)	-2.13	0.001305
W6QS62	BN5_0204	Uroporphyrinogen-III synthetase (EC 4.2.1.75)	-2.15	0.024321
W6R1T3	BN5_4158	Sulfate-binding protein	-2.17	0.001663
W6RDL1	BN5_1358	Probable malate:quinone oxidoreductase (EC 1.1.5.4) (MQO) (Malate dehydrogenase [quinone])	-2.21	0.005648
W6QXH5	BN5_2127	Outer membrane porin F	-2.22	0.002247
W6R1T2	BN5_4501	ATP synthase subunit b (ATP synthase F(0) sector subunit b)	-2.24	0.00461
W6R3F0	BN5_2342	PQQ-containing dehydrogenase	-2.31	0.000697
W6R3F4	BN5_2347	Cytochrome c550	-2.48	0.000596
W6R1C9	BN5_4326	D-methionine-binding lipoprotein metQ	-2.52	0.002685
W6QSI2	BN5_0853	3-ketoacyl-(Acyl-carrier-protein) reductase (EC 1.1.1.100)	-2.53	0.000252
W6R4U4	BN5_2831	Ribosome-recycling factor (RRF) (Ribosome-releasing factor)	-2.69	0.002506
W6RC58	BN5_0850	10 kDa chaperonin (GroES protein) (Protein Cpn10)	-2.74	0.028267
W6RFI0	BN5_2077	Uncharacterized protein	-2.89	0.000454
W6QY43	BN5_2354	ABC transporter periplasmic protein	-2.98	0.000276
W6QSL9	BN5_0888	OmpA/MotB domain-containing protein	-3.01	0.000566
W6QXK4	BN5_2157	Outer membrane lipoprotein OprI	-3.15	0.001355
W6QXN7	BN5_3079	OmpA domain-containing protein	-3.24	0.001928
W6R788	BN5_3674	30S ribosomal protein S13	-3.65	0.014629
W6QQS0	BN5_0248	Binding protein component of ABC iron transporter	-4.33	2.13E-05
W6QS44	BN5_1148	Transcriptional regulator, putative	-5.21	0.007786
W6QWM8	BN5_1817	Uncharacterized protein	-5.89	7.53E-05
W6QWP5	BN5_2353	Uncharacterized protein	-6.59	0.028153
W6QZ36	BN5_2694	5-methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate--homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14) (Cobalamin-independent methionine synthase) (Methionine synthase, vitamin-B12 independent isozyme)	-7.74	0.002967
H9N5D8	BN5_1637	FAD dependent oxidoreductase (FAD-dependent oxidoreductase)	-11.91	2.08E-05
W6QUU3	BN5_2114	Nitrate transporter periplasmic component	-12.13	4.22E-05
W6R2U2	BN5_2125	Nitrate reductase (EC 1.7.99.4)	-24.11	0.001979
H9N5E2	BN5_1631	Uncharacterized protein	-24.63	7.63E-06
W6RFM9	BN5_2123	Assimilatory nitrite reductase (Subunit) (EC 1.7.1.4)	-32.97	6.43E-05
W6R265	BN5_1912	Nitrilase (EC 3.5.5.1)	-53.39	6.7E-08

H9N5E5	BN5_1635	AIR synthase related protein domain protein (AIR synthase-like protein)	-70.09	0.000161
H9N5E1	BN5_1632	Nitrilase (EC 3.5.5.7)	-70.61	8.25E-06
W6RK11	BN5_3592	Acyl-CoA dehydrogenase family protein	-95.30	1.16E-06
W6QYV6	BN5_0702	Heavy metal translocating P-type ATPase (EC 3.6.3.4)	-130.94	5.45E-05
W6R260	BN5_1907	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase (HTPA synthase) (EC 4.3.3.7)	-139.07	2.44E-05
W6QST4	BN5_0439	ABC-type transporter periplasmic component protein	-190.04	2.36E-05
W6RF21	BN5_1905	Histidinol-phosphate aminotransferase (EC 2.6.1.9) (Imidazole acetol-phosphate transaminase)	-243.78	4.07E-06
W6QUA1	BN5_1911	NADP-dependent malic enzyme (EC 1.1.1.40)	-322.79	1.76E-05
W6QWV7	BN5_0025	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase B (EC 2.1.1.-)	CNA	-
W6QRT0	BN5_0092	Cytochrome c oxidase subunit 2 (EC 1.9.3.1)	CNA	-
W6QX52	BN5_0105	Probable GTP-binding protein EngB	CNA	-
W6QQG6	BN5_0126	Glycolate oxidase iron-sulfur subunit	CNA	-
W6QQI9	BN5_0142	ABC transporter, ATP-binding component (EC 3.6.3.21)	CNA	-
W6QQK7	BN5_0168	Cytochrome c5-like protein	CNA	-
W6QPN4	BN5_0291	ATP-binding protein of ABC transporter	CNA	-
W6QXM4	BN5_0292	ABC permease	CNA	-
W6RAQ9	BN5_0315	Protein-glutamate methyltransferase CheB (EC 3.1.1.61)	CNA	-
W6QQZ8	BN5_0328	Dihydropyrimidine dehydrogenase (EC 1.3.1.2)	CNA	-
W6QSH6	BN5_0329	Glutamate synthase (EC 1.4.1.13)	CNA	-
W6QXX9	BN5_0412	Polyhydroxyalkanoate synthase, class II (EC 2.3.1.-)	CNA	-
W6QRB2	BN5_0438	Fis family transcriptional regulator	CNA	-
W6QSW5	BN5_0469	Lipopolysaccharide heptosyltransferase I (EC 2.4.-.-)	CNA	-
W6QY48	BN5_0477	Uncharacterized protein	CNA	-
W6RB57	BN5_0480	Capsule polysaccharide export protein	CNA	-
W6QYC6	BN5_0544	Hypotetical protein	CNA	-
W6QQV2	BN5_0691	Peptide chain release factor 3 (RF-3)	CNA	-
W6RBV0	BN5_0710	tRNA/tmRNA (uracil-C(5))-methyltransferase (EC 2.1.1.-) (EC 2.1.1.35) (tRNA (uracil(54)-C(5))-methyltransferase) (tRNA(m5U54)-methyltransferase) (RUMT) (tmRNA (uracil(341)-C(5))-methyltransferase)	CNA	-
W6RBV5	BN5_0715	Oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATPase subunit	CNA	-
W6QS68	BN5_0743	CBS domain-containing protein	CNA	-
W6RBX9	BN5_0745	PhoH family protein	CNA	-
W6QR22	BN5_0761	Acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein	CNA	-
W6RBZ4	BN5_0770	Uncharacterized protein	CNA	-
W6QTY1	BN5_0814	Hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) family protein	CNA	-
W6QSI8	BN5_0858	Glutamate 5-kinase (EC 2.7.2.11) (Gamma-glutamyl kinase) (GK)	CNA	-
W6QRE4	BN5_0886	Beta-lactamase domain-containing protein	CNA	-
W6QRI7	BN5_0928	Ribosome maturation factor RimP	CNA	-
W6QZK3	BN5_1009	Putative ATP-binding component of a transport system	CNA	-
W6RDB7	BN5_1247	Conserved virulence factor B	CNA	-
W6RDG8	BN5_1303	Methyl-accepting chemotaxis serine transducer	CNA	-
W6R0H3	BN5_1320	CAIB/BAIF family protein (EC 2.8.3.16)	CNA	-
W6R0T3	BN5_1432	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, putative (EC 3.1.4.46)	CNA	-
W6RDS2	BN5_1435	Lipoprotein-releasing system transmembrane protein lolC	CNA	-
W6QU83	BN5_1448	Pseudouridine synthase (EC 5.4.99.-)	CNA	-
W6RDT9	BN5_1455	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase (EC 2.3.1.39)	CNA	-
W6QVX3	BN5_1543	Ribosomal protein S12 methylthiotransferase RimO (S12 MTTase) (S12 methylthiotransferase) (EC 2.8.4.4) (Ribosomal protein S12 (aspartate-C(3))-methylthiotransferase) (Ribosome maturation factor RimO)	CNA	-
H9N5E0	BN5_1630	Sigma-54-dependent transcriptional regulator (Transcriptional regulator)	CNA	-
W6REF7	BN5_1648	Phospholipase D/Transphosphatidylase (EC 2.7.8.-)	CNA	-
W6QTY0	BN5_1774	Methyl-accepting chemotaxis protein tlpB	CNA	-
W6QVA7	BN5_1826	Acyl-CoA dehydrogenase family protein	CNA	-
W6QU68	BN5_1874	Replication-associated recombination protein A	CNA	-
W6R238	BN5_1886	Response regulator in two-component regulatory system	CNA	-
W6QXA8	BN5_2056	Putative CheW protein (EC 2.7.13.3)	CNA	-
W6RG09	BN5_2223	Inner membrane ABC transporter permease protein	CNA	-
W6R360	BN5_2225	Peptide ABC transporter, putative ATP-binding protein (EC 3.6.3.25)	CNA	-
W6QVA8	BN5_2234	Amidotransferase	CNA	-
W6RG60	BN5_2283	Uncharacterized protein	CNA	-
W6QVK2	BN5_2331	FAD dependent oxidoreductase (EC 1.4.3.-)	CNA	-
W6QX60	BN5_2518	Metallo-beta-lactamase family protein (EC 3.1.2.6)	CNA	-
W6R4B2	BN5_2641	Flagellar motor switch protein FlIM	CNA	-

W6QXK9	BN5_2657	Nitrogen regulation protein NR(I)	CNA	-
W6R4M0	BN5_2738	Uncharacterized protein	CNA	-
W6QXW7	BN5_2749	2,4-dienoyl-coa reductase FADH1, putative (EC 1.3.1.34)	CNA	-
W6QZD5	BN5_2808	S-formylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.12)	CNA	-
W6QY32	BN5_2822	Acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase (EC 2.3.1.129)	CNA	-
W6QYG7	BN5_2962	Penicillin amidase family protein (EC 3.5.1.11)	CNA	-
W6QXD1	BN5_2965	Nicotinate phosphoribosyltransferase (NAPRTase) (EC 6.3.4.21)	CNA	-
W6QZX4	BN5_2993	Uracil-DNA glycosylase (UDG) (EC 3.2.2.27)	CNA	-
W6QZY9	BN5_3008	3-hydroxyacyl-CoA-acyl carrier protein transferase (EC 2.4.1.-)	CNA	-
W6QXJ7	BN5_3031	ABC transporter, ATP-binding protein (EC 3.6.3.31)	CNA	-
W6QYS5	BN5_3076	7-cyano-7-deazaguanine synthase (EC 6.3.4.20)	CNA	-
W6R097	BN5_3122	Probable septum site-determining protein MinC	CNA	-
W6QZ82	BN5_3191	Pyrimidine biosynthesis enzyme THI13	CNA	-
W6R0K2	BN5_3192	3-ketoacyl-(Acyl-carrier-protein) reductase (EC 1.1.1.100)	CNA	-
W6RJ07	BN5_3193	Dihydroorotase (EC 3.5.2.3)	CNA	-
W6R5Z8	BN5_3200	Uncharacterized protein	CNA	-
W6QZI3	BN5_3307	3-oxoacid CoA-transferase (EC 2.8.3.5)	CNA	-
W6R0U1	BN5_3308	Butyryl-CoA:acetate CoA transferase (EC 2.8.3.5)	CNA	-
W6QYG6	BN5_3315	Beta-lactamase domain-containing protein	CNA	-
W6QZU5	BN5_3430	Riboflavin biosynthesis protein (EC 2.7.1.26) (EC 2.7.7.2)	CNA	-
W6QYV2	BN5_3478	Glutathione S-transferase domain-containing protein (EC 2.5.1.18)	CNA	-
W6QYY4	BN5_3513	Nucleotide-binding protein BN5_3513	CNA	-
W6R6W3	BN5_3564	Lipoyl synthase (EC 2.8.1.8) (Lip-syn) (LS) (Lipoate synthase)	CNA	-
W6R709	BN5_3604	Oxidoreductase FAD-binding region (EC 1.17.1.1)	CNA	-
W6R1P1	BN5_3646	Riboflavin biosynthesis protein RibD	CNA	-
W6QZN4	BN5_3717	Bifunctional ligase/repressor BirA (Biotin operon repressor) (Biotin--[acetyl-CoA-carboxylase] ligase) (EC 6.3.4.15) (Biotin--protein ligase) (Biotin-[acetyl-CoA-carboxylase] synthetase)	CNA	-
W6QZR6	BN5_3762	Polyamine-transporting ATPase (EC 3.6.3.31)	CNA	-
W6QZS5	BN5_3772	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase A (EC 2.1.1.182) (16S rRNA (adenine(1518)-N(6)/adenine(1519)-N(6))-dimethyltransferase) (16S rRNA dimethyladenosine transferase) (16S rRNA dimethylase) (S-adenosylmethionine-6-N', N'-adenosyl(rRNA) dimethyltransferase)	CNA	-
W6R2H4	BN5_3906	Acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein (EC 1.3.99.-)	CNA	-
W6R1C2	BN5_3980	tRNA (guanine-N(7)-)-methyltransferase (EC 2.1.1.33)	CNA	-
W6R0C3	BN5_4008	UPF0064 protein yccW	CNA	-
W6R1M3	BN5_4097	Poly(3-hydroxyalkanoate) synthetase (EC 3.1.1.-)	CNA	-
W6R1R3	BN5_4138	dTDP-4-dehydrothiamine reductase (EC 1.1.1.133)	CNA	-
W6R8R3	BN5_4212	Orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) (OPRTase) (EC 2.4.2.10)	CNA	-
W6RLW8	BN5_4345	Alpha/beta hydrolase fold (EC 3.-.-.-)	CNA	-
W6R2I3	BN5_4383	Uncharacterized protein PYRAB12460	CNA	-
W6R1I6	BN5_4391	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD (EC 1.11.1.15)	CNA	-
W6R1K1	BN5_4411	Heavy metal sensor histidine kinase (EC 2.7.13.3)	CNA	-
W6R1N7	BN5_4451	Putative HTH-type transcriptional regulator ykgD	CNA	-
W6R9H7	BN5_4507	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase G (EC 2.1.1.170) (16S rRNA 7-methylguanosine methyltransferase) (16S rRNA m7G methyltransferase)	CNA	-
W6QS35	BN5_0164	D-amino acid dehydrogenase (EC 1.4.99.-)	R	-
W6RAP3	BN5_0295	Sulfurtransferase FdhD	R	-
W6QXM7	BN5_0297	LysM domain/BON superfamily protein	R	-
W6RAS2	BN5_0335	Cytochrome c	R	-
W6RB18	BN5_0440	ABC transporter inner membrane subunit protein	R	-
W6QQ36	BN5_0441	ABC transporter/ATPase component protein	R	-
W6QY14	BN5_0442	Cyanate hydratase (Cyanase) (EC 4.2.1.104) (Cyanate hydrolase)	R	-
W6QQ40	BN5_0446	Cobyrinic acid a,c-diamide synthase (EC 6.3.5.10)	R	-
W6QQA3	BN5_0516	ADP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase (EC 4.2.1.136) (EC 5.1.99.6) (ADP-dependent NAD(P)HX dehydratase) (NAD(P)H-hydrate epimerase) (NAD(P)HX epimerase)	R	-
W6QTM2	BN5_0694	TonB-dependent siderophore receptor	R	-
W6QQW2	BN5_0701	MerR family transcriptional regulator	R	-
W6QTN1	BN5_0704	Heavy metal transport/detoxification protein	R	-
W6QU71	BN5_0909	Protein GrpE (HSP-70 cofactor)	R	-
W6QT87	BN5_1095	Uncharacterized protein	R	-
W6RD56	BN5_1172	Oxidoreductase, short chain dehydrogenase/reductase family (EC 1.-.-.-)	R	-
W6QSC5	BN5_1243	Nuclear receptor binding factor related protein (EC 1.3.1.38)	R	-

W6QSN1	BN5_1344	Glucokinase (EC 2.7.1.2)	R	-
W6RDK8	BN5_1353	Protein ccoG	R	-
W6QSP1	BN5_1354	Nitrite/sulfite reductase, hemoprotein beta-component. ferredoxin-like:nitrite and sulphite reductase 4Fe-4S region (EC 1.8.1.2)	R	-
W6R0K4	BN5_1355	Uncharacterized protein	R	-
W6R0L7	BN5_1370	Pirin-like protein CC_1473	R	-
W6RDQ8	BN5_1420	Uncharacterized protein yggL	R	-
W6QT28	BN5_1491	Arginine N-succinyltransferase (EC 2.3.1.109)	R	-
H9N5E3	BN5_1633	Radical SAM domain-containing protein (Radical SAM domain-containing proteinBiotin synthase-related enzymeRibosomal RNA large subunit methyltransferase N) (EC 2.1.1.-)	R	-
H9N5E4	BN5_1634	Acetyltransferase (GCN5-related N-acetyltransferase)	R	-
W6QWG0	BN5_1737	Uncharacterized protein	R	-
W6QWL0	BN5_1797	Phosphohistidine phosphatase SixA (EC 3.1.3.-)	R	-
W6RF01	BN5_1878	Putative glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	R	-
W6R243	BN5_1892	Uncharacterized HTH-type transcriptional regulator ywbl	R	-
W6RF13	BN5_1895	Uncharacterized protein	R	-
W6RF17	BN5_1900	Sulfite reductase (NADPH) hemoprotein beta-component (EC 1.8.1.2)	R	-
W6QU90	BN5_1901	Uncharacterized protein	R	-
W6R254	BN5_1902	Terminal oxidase subunit I (EC 1.10.3.-)	R	-
W6QWX6	BN5_1904	Phosphoserine aminotransferase (EC 2.6.1.52)	R	-
W6QU95	BN5_1906	Acetylmethionine aminotransferase (ACOAT) (EC 2.6.1.11)	R	-
W6QWY1	BN5_1909	Methylenetetrahydrofolate reductase (EC 1.5.1.20)	R	-
W6RF25	BN5_1910	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	R	-
W6QUB2	BN5_1921	Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) (Serine methylase) (EC 2.1.2.1)	R	-
W6QUS9	BN5_2098	CzcB family heavy metal RND efflux membrane fusion protein	R	-
W6QW12	BN5_2116	Nitrate ABC transporter. ATPase subunits C and D (EC 3.6.3.31)	R	-
W6QXH1	BN5_2122	Protein kinase (EC 2.7.1.-)	R	-
W6QUV5	BN5_2124	Nitrite reductase (NAD(P)H) small subunit (EC 1.7.1.4)	R	-
W6QV68	BN5_2194	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrB (EC 1.8.4.12) (Peptide-methionine (R)-S-oxide reductase)	R	-
W6R378	BN5_2250	Uncharacterized protein	R	-
W6QY34	BN5_2344	Metallo-lactamase	R	-
W6QWQ0	BN5_2358	Uncharacterized protein	R	-
W6QW03	BN5_2491	Patatin-like protein	R	-
W6R4J6	BN5_2697	Solvent efflux pump periplasmic linker srpA	R	-
W6QZP0	BN5_2918	Putative tricarboxylic transport membrane protein	R	-
W6QXM0	BN5_3058	FMN-dependent NADH-azoreductase (EC 1.7.-.-) (Azo-dye reductase)	R	-
W6QXM5	BN5_3063	Oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding subunit (EC 1.18.1.2)	R	-
W6RIW6	BN5_3173	Uncharacterized protein	R	-
W6R0Q7	BN5_3267	Iron-sulfur cluster assembly scaffold protein IscU	R	-
W6RJH8	BN5_3427	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (EC 5.2.1.8)	R	-
W6R6N0	BN5_3489	Alpha/beta fold family hydrolase-like protein	R	-
W6R1I7	BN5_3591	Uncharacterized protein	R	-
W6QZ57	BN5_3593	Beta-lactamase domain-containing protein	R	-
W6R7C9	BN5_3704	50S ribosomal protein L7/L12	R	-
W6R2F9	BN5_3891	TRAP dicarboxylate transporter, DctP subunit	R	-
W6R087	BN5_3968	UPF0001 protein	R	-
W6RL44	BN5_4057	UPF0176 protein CPS_4798	R	-
W6R8A0	BN5_4096	Phasin-like protein	R	-
W6R8K7	BN5_4197	Putative glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	R	-
W6R8X4	BN5_4292	Uncharacterized protein	R	-
W6R2L1	BN5_4408	Uncharacterized protein	R	-
W6R446	BN5_4409	Outer membrane efflux protein	R	-
W6RM88	BN5_4500	ATP synthase subunit delta (ATP synthase F(1) sector subunit delta)	R	-