

Nx	ácido nalidíxico
OAA	oxalacetato
OAA-CN	cianhidrina del oxalacetato
CNO⁻	cianato
OGCN	2-hidroxinitrilo del 2-oxoglutarato
p/v	peso/volumen
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Pfam	familias de proteínas
PHA	polihidroxialcanoatos
PHB	polihidroxitirato
Pir-CN	cianhidrina del piruvato
pK_a	constante de disociación de un ácido
qPCR	“quantitative polymerase chain reaction”
R-CN	nitrilos
RD	Real Decreto
rDNA	DNA ribosómico
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
RR	regulador de respuesta
RT-PCR	“reverse transcription-polymerase chain reaction”
SAM	S-adenosilmetionina
SCAI	servicio central de apoyo a la investigación (UCO)
scl-PHA	polihidroxialcanoatos de cadena corta

SDS	dodecil sulfato sódico
SOD	superóxido dismutasa
TAO	AOX (oxidasa alternativa) del parásito <i>Trypanosoma brucei</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	tampón Tris-HCl, EDTA
TEG	trietilenglicol
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
tRNA	ácido ribonucleico transferente
UCO	Universidad de Córdoba
UQ	ubiquinol/ubiquinona
UQH₂	ubiquinol reducido
V	voltios
V/h	voltios/hora
v/v	volumen/volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución de los principales focos contaminantes en España.	9
Figura 2.	Clasificación de las distintas formas de cianuro.	10
Figura 3.	Estructura química del hexacianoferrato.	11
Figura 4.	Formación de adenina a partir de cinco unidades de HCN en solución acuosa.	13
Figura 5.	Oxígeno reductasas respiradoras.	17
Figura 6.	Estructura general de la oxidasa alternativa TAO de <i>Trypanosoma brucei</i> .	18
Figura 7.	Biosíntesis de cianuro.	24
Figura 8.	Producción de oro a partir del mineral mediante la utilización del proceso de cianuración.	30
Figura 9.	Rutas metabólicas de asimilación de cianuro.	34
Figura 10.	Degradación biológica de nitrilos.	36
Figura 11.	Agrupación génica <i>nit1C</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	39
Figura 12.	Componentes de la cadena de transporte de electrones en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	41
Figura 13.	Análisis proteómico diferencial de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 en cianuro comparado con nitrato.	70
Figura 14.	Inducción de NitB y NitG por cianuro.	73
Figura 15.	Inducción de NitB por glicolonitrilo en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	73
Figura 16.	Composición aminoacídica de NitB y NitG.	74
Figura 17.	Predicción de estructura secundaria y sitios de unión de NitB y NitG.	75
Figura 18.	Estructuras secundarias predominantes en las proteínas NitB y NitG.	76
Figura 19.	Alineamiento de las proteínas NitB y NitG de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con homólogos de otros	78

	microorganismos.	
Figura 20.	Agrupación génica <i>nit1C</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	79
Figura 21.	Organización génica <i>nit1C</i> de diferentes microorganismos.	82
Figura 22.	Ausencia de la agrupación <i>nit1C</i> en especies de <i>Pseudomonas</i> estrechamente relacionadas con <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	82
Figura 23.	Análisis transcripcional de la agrupación génica <i>nit1C</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 por RT-PCR.	83
Figura 24.	Análisis cuantitativo de la expresión de los genes <i>nitA</i> y <i>nitC</i> mediante qPCR.	84
Figura 25.	Comprobación de las mutaciones en las estirpes NitA ⁻ , NitB ⁻ y NitC ⁻ mediante PCR.	85
Figura 26.	RT-PCR de la región <i>nitE-nitF</i> en los mutantes NitA ⁻ , NitB ⁻ y NitC ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> .	86
Figura 27.	Crecimiento y consumo de cianuro por las estirpes silvestre y mutantes NitA ⁻ , NitB ⁻ y NitC ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> .	87
Figura 28.	Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante NitB ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con amonio, cianuro o glicolonitrilo como fuente de nitrógeno.	87
Figura 29.	Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante NitB ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con cianuro.	88
Figura 30.	Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante NitC ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con cianuro.	89
Figura 31.	Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante NitB ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con diferentes cianhidrinas.	90
Figura 32.	Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante NitB ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con los nitrilos 3-cianoalanina o lactonitrilo.	91
Figura 33.	Crecimiento y producción de amonio de las estirpes silvestre y mutante NitB ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con glutaronitrilo.	92

Figura 34.	Actividad nitrilasa en las estirpes silvestre y mutantes NitB ⁻ y NitC ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 en medios con distintas fuentes de nitrógeno.	94
Figura 35.	Dominios conservados en CynS de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	96
Figura 36.	Agrupación génica <i>cynS</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	97
Figura 37.	Entorno génico de los genes <i>dapA</i> de la dihidropicolinato sintasa, <i>serC</i> de la fosfoserina aminotransferasa y <i>orf1</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	97
Figura 38.	Entorno génico del gen <i>sodB</i> que codifica la superóxido dismutasa de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 inducida por cianuro.	98
Figura 39.	Entorno génico del gen <i>dps</i> de la ferritina de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 inducida por cianuro.	99
Figura 40.	Relación filogenética de la ferritina de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con homólogos de otras estirpes de <i>Pseudomonas</i> .	99
Figura 41.	Entorno génico del gen de la fosfoserina aminotransferasa de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 inducida por cianuro.	100
Figura 42.	Relación filogenética de la proteína Fpr de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con homólogos de otras estirpes de <i>Pseudomonas</i> .	100
Figura 43.	Árbol filogenético de varias estirpes de <i>Pseudomonas</i> basado en las proteínas GyrB y RpoD.	104
Figura 44.	Filogenia de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 en función de su genoma.	105
Figura 45.	Clasificación de las posibles enzimas codificadas en el genoma de la estirpe CECT5344.	110
Figura 46.	Identificación y clasificación de los genes de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 que participan en la transducción de la señal.	112
Figura 47.	Perfil de los sistemas de transducción de la señal en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	113

Figura 48.	Distribución de categorías funcionales según la base de datos Pfam en varias estirpes de <i>Pseudomonas</i> .	115
Figura 49.	Análisis de componentes principales basado en la clasificación funcional COG.	116
Figura 50.	Genes que codifican proteínas de transducción de la señal en diferentes estirpes de <i>Pseudomonas</i> .	117
Figura 51.	Comparación de genomas de estirpes cianotrofas y no cianotrofas del género <i>Pseudomonas</i> .	118
Figura 52.	Abundancia de nitrilasas en <i>Pseudomonas</i> .	119
Figura 53.	Alineamiento de las nitrilasas de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 y matriz de distancia de las mismas.	120
Figura 54.	Relaciones evolutivas de las nitrilasas de distintos organismos.	121
Figura 55.	Entornos génicos de las nitrilasas de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	121
Figura 56.	Sintenia de los operones <i>cio1</i> , <i>cio2</i> y <i>cio3</i> de <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	123
Figura 57.	Árbol filogenético de los genes <i>phaC1</i> y <i>phaC2</i> de las sintasas de PHA de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 y cepas bacterianas estrechamente relacionadas.	126
Figura 58.	Genes de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 relacionados con el metabolismo de compuestos aromáticos.	127
Figura 59.	Agrupación génica de la degradación de ácido furánico en <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	129
Figura 60.	Ruta de asimilación de cianuro en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Tipos de contaminación.	8
Tabla 2.	Organismos cianogénicos.	24
Tabla 3.	Incidentes históricos producidos por residuos industriales cianurados.	27
Tabla 4.	Tratamientos físico-químicos de eliminación de cianuro.	32
Tabla 5.	Organismos capaces de degradar nitrilos.	37
Tabla 6.	Estirpes bacterianas usadas en este trabajo.	49
Tabla 7.	Antibióticos utilizados.	50
Tabla 8.	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	58
Tabla 9.	Identificación de proteínas inducidas por cianuro (2D-PAGE).	71
Tabla 10.	Características de las proteínas inducidas por cianuro.	72
Tabla 11.	Análisis comparativo BLASTP de las proteínas inducidas por cianuro.	72
Tabla 12.	Propiedades físico-químicas de NitB y NitG determinadas a partir de su secuencia aminoacídica.	76
Tabla 13.	Matrices de identidad de NitB y NitG.	77
Tabla 14.	Características de las proteínas codificadas por la agrupación génica <i>nit1C</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	80
Tabla 15.	Identidad de las proteínas Nit de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con homólogos de otras especies bacterianas.	81
Tabla 16.	Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante NitC ⁻ de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 con distintos nitrilos como única fuente de nitrógeno.	93
Tabla 17.	Resultados de la secuenciación y ensamblaje del genoma de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.	103
Tabla 18.	Distribución filogenética de los genes de la estirpe CECT5344.	106
Tabla 19.	Genes de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 adquiridos mediante transferencia horizontal.	107
Tabla 20.	Clasificación de los genes de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344	108

en función de la localización celular de las proteínas que codifican.

Tabla 21.	Clasificación de los genes codificantes de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 según varias bases de datos funcionales.	109
Tabla 22.	Clasificación funcional de los genes codificantes de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 según las bases de datos COG y Pfam.	110
Tabla 23.	Clasificación funcional de los genes codificantes de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 según TIGRfam.	111
Tabla 24.	Características del genoma de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 y otras estirpes de <i>Pseudomonas</i> .	114

Resumen

La ruta de asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 transcurre a través de un nitrilo formado por la reacción química del cianuro con el oxalacetato, siendo este último acumulado como consecuencia de la acción conjunta de una malato:quinona oxidoreductasa (MQO) y la oxidasa terminal resistente a cianuro (CioAB) (Luque-Almagro *et al.*, 2011b). Los nitrilos pueden ser convertidos en amonio por la acción de una nitrilasa o un sistema nitrilo hidratasa/amidasa.

Con el objetivo de elucidar la ruta de asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, se ha analizado el proteoma de este microorganismo en condiciones cianotróficas frente a nitrato como fuente de nitrógeno como control. En este estudio se identificaron proteínas relacionadas con la ruta de asimilación de cianuro en la estirpe CECT5344, que aparecían inducidas por cianuro, como NitB y NitG, cuyos genes se encuentran localizados en la agrupación génica *nit1C*. Además de NitB y NitG, de función desconocida, la agrupación génica *nit1C* codifica un regulador transcripcional del tipo Fis dependiente de σ^{54} (NitA), una nitrilasa (NitC), una proteína que pertenece a la superfamilia S-adenosilmetionina (NitD), un miembro de la superfamilia N-aciltransferasa (NitE), un polipéptido de la familia AIRS/GARS (NitF) y una oxidorreductasa dependiente de NADH (NitH). Un análisis transcripcional mediante RT-PCR determinó que los genes *nitBCDEFGH* se cotranscriben, mientras que el gen regulador *nitA* se transcribe de forma divergente. Además, resultados obtenidos por RT-PCR confirman que la expresión de los genes *nitBCDEFGH* está inducida por cianuro y reprimida por amonio. La relación entre el cianuro y el grupo de genes *nit1C* queda patente por el fenotipo de los mutantes deficientes *nitA*, *nitB* y *nitC*, incapaces de usar complejos cianuro-metálicos o 2-hidroxinitrilos como única fuente de nitrógeno. Todos estos datos indican que la nitrilasa NitC, junto con la proteína NitB, utilizan de forma específica determinados nitrilos alifáticos como sustrato, entre los que se encuentran el formado durante la asimilación de cianuro (Estepa *et al.*, 2012).

Además, entre las proteínas inducidas por cianuro se identificaron una dihidropicolinato sintasa (DapA), una fosfoserina transaminasa (SerC) y una proteína de función desconocida (Orf1), las tres codificadas por genes del operón *cio*, una cianasa (CynS), la proteína S6 de la subunidad ribosomal 30S (RpsF), una superóxido dismutasa (SodB), la ferritina (Dps), una oxidorreductasa (Fpr) y un factor de elongación P (EF-P). Una vez identificadas, estas proteínas se han analizado funcionalmente y se han

localizado en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 los genes correspondientes, así como los genes adyacentes. La inducción de estas proteínas en condiciones cianotróficas sugiere que el metabolismo del cianuro incluye, además de la resistencia y asimilación de este tóxico, otros procesos biológicos relacionados con el metabolismo del cianato y de algunos aminoácidos, el estrés oxidativo y la homeostasis de hierro, entre otros.

Por otra parte, el conocimiento en profundidad y la interpretación de la secuencia génica de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, así como el análisis comparativo frente a organismos no cianotrofos ha permitido entender algunos de los mecanismos implicados en la resistencia y asimilación de cianuro, lo que permitiría conducir a la posterior mejora del proceso de biodegradación de cianuro. Además, el estudio del genoma de la estirpe CECT5344 permitirá explorar la capacidad de este organismo para ser utilizado en procesos de biorremediación de residuos cianurados en los que se encuentran metales y otros tóxicos (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014).

En este trabajo se muestran y discuten los resultados de la secuenciación del genoma de *P. pseudoalcaligenes*, así como el estudio del análisis filogenético y evolutivo de la cepa, estableciéndose de esta manera relaciones con otras especies en base a los genomas secuenciados de las mismas, entre las que destaca *P. mendocina* ymp relacionada con *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. El estudio de las características del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha sido completado con un análisis comparativo frente a los genomas de otras especies de *Pseudomonas*, encontrándose así semejanzas y diferencias en cuanto a la distribución génica funcional. Por último, se muestra un análisis del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en relación con los genes implicados probablemente en los procesos de asimilación de cianuro y residuos cianurados, tales como los codificantes de nitrilasas y aquellos implicados en la resistencia a cianuro como los constituyentes del operón *cio* que codifican la oxidasa terminal insensible a cianuro. Finalmente, se discute la presencia de genes implicados posiblemente en otros procesos con una alto potencial biotecnológico, tales como la producción de bioplásticos y la biodegradación de diversos contaminantes.

Abstract

The cyanide assimilation pathway in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 occurs through a chemical reaction of cyanide and 2-oxaloacetate to produce a cyanohydrin (2-hydroxynitrile). Cyanide causes 2-oxaloacetate accumulation in the media as consequence of the cyanide-insensitive terminal oxidase (CioAB) coupled to a malate:quinone oxidoreductase (MQO) that converts L-malate into 2-oxaloacetate. Nitriles can be converted into ammonium by the action of either a nitrilase or a nitrile hydratase/amidase system (Luque-Almagro *et al.*, 2011b).

To elucidate the cyanide assimilation pathway in *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, the whole proteome of this bacterium has been analyzed under cyanotrophic conditions. In this study cyanide has been used as the sole nitrogen source for growth, a control with nitrate as an alternative nitrogen source has been also performed. Two cyanide-induced proteins of unknown function, NitB and NitG, have been identified by 2D-PAGE/MALDI-TOF/TOF. These proteins are encoded by the *P. pseudoalcaligenes nit1C* gene cluster that, in addition to NitB and NitG, also codes for a σ^{54} -dependent transcriptional regulator (NitA), a nitrilase (NitC), a protein that belongs to the S-adenosylmethionine superfamily (NitD), a member of the *N*-acyltransferase superfamily (NitE), a polypeptide of the AIRS/GARS family (NitF), and an NADH-dependent oxidoreductase (NitH). Transcriptional RT-PCR and qPCR analyses have revealed that the *nitBCDEFGH* genes were co-transcribed, whereas the regulatory *nitA* gene was divergently transcribed. Additionally, *nitBCDEFGH* gene expression was induced by cyanide and repressed by ammonium. The involvement of the *nit1C* gene cluster in the cyanide degradation pathway of *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 has been demonstrated by the phenotype of the *nitA*⁻, *nitB*⁻ and *nitC*⁻ mutant strains of *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, which were unable to growth with sodium cyanide, cyanide-metal complexes or 2-hydroxynitriles as the sole nitrogen source. These results suggested that the nitrilase NitC, probably in association with the NitB protein, uses certain aliphatic nitriles as substrates, including the cyanohydrin formed during the cyanide assimilation pathway in *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Estepa *et al.*, 2012).

Other cyanide-induced proteins found in this proteomic study were a dihydrodipicolinate synthase (DapA), a phosphoserine transaminase (SerC) and a protein of unknown function (Orf1). The three proteins are encoded by genes located at the *cio* gene cluster that codes for the cyanide-insensitive respiration system. Additional proteins induced by cyanide were a cyanase (CynS), a 30S ribosomal subunit protein (RpsF), a superoxide dismutase (SodB), a ferritin (Dps), an oxidoreductase (Fpr), and a P-elongation factor (EF-P). Following

protein identification, some of these proteins were functionally analysed and the genetic context of their genes studied. The induction of these proteins under cyanotrophic conditions suggests that the metabolism of cyanide in *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 is based on a complex mechanism of resistance and assimilation of this toxic compound, with the involvement of other biological processes related to metabolism of cyanate and some amino acids, oxidative stress, and iron homeostasis, among others.

In-depth knowledge and understanding of *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 whole gene sequence as well as the comparative analysis with non-cyanotrophic microorganisms has allowed to understand some of the mechanisms involved in the resistance and assimilation of cyanide, which would lead to further improvement of the cyanide biodegradation process by the strain CECT5344. The study of the genome of *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 will allow exploring the ability of this microorganism to be applied in the bioremediation of cyanide wastewater containing metals and other toxic chemicals (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014). In this work, the results of the whole genome sequence of *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 are shown and discussed. A phylogenetic and evolutionary analysis of the strain CECT5344 based on the whole genome sequence was performed. The comparative analysis of the genome of *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 against the genomes of other *Pseudomonas* strains revealed similarities and differences at functional gene level. The analysis of genes involved in cyanide assimilation and resistance, such as nitrilase genes and the *cio* gene clusters for cyanide-insensitive respiration, is also shown. The presence of genes involved in other processes with high biotechnological potential, such as the production of polyhydroxyalkanoates and biodegradation of aromatic pollutants is also described.

Introducción

1. La contaminación ambiental

La contaminación ambiental se define como la presencia en el medio ambiente de cualquier agente o combinación de agentes (físicos, químicos o biológicos) en formas y concentraciones que puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o el bienestar de la población, o bien, para la vida vegetal o animal. La contaminación ambiental, derivada del presente modelo de desarrollo, comenzó a hacerse más patente en la Revolución Industrial, ya que hasta el siglo XIX la economía se basaba en la agricultura, y los productos derivados de esta actividad eran fácilmente eliminados y/o reciclados en la naturaleza. Durante la era industrial se sustituyeron las fuentes de energía renovables por combustibles fósiles y el gasto energético por persona y día ascendió notablemente. Así, a pesar de las ventajas sociales que supuso el desarrollo industrial, esta actividad ocasionó un fuerte impacto contaminante en la biosfera como consecuencia de la gran cantidad de productos tóxicos y subproductos que originaba y entraban a formar parte del medio ambiente, interaccionando con él y deteriorándolo.

La contaminación ambiental está causada tanto por compuestos inorgánicos como orgánicos. A pesar de que la mayoría de los compuestos inorgánicos entran en los ciclos biogeoquímicos de una forma natural, los problemas de contaminación aparecen cuando la actividad de la sociedad industrializada aumenta la cantidad de material inorgánico, superando la capacidad de bioacumulación de la microflora autóctona. Además de una producción excesiva, la toxicidad del compuesto también determina el grado de contaminación. Los problemas de contaminación ocasionados por compuestos inorgánicos, entre los que se encuentran metales pesados, nitrito, cianuro, cianato, etc., se originan como consecuencia de las actividades mineras (drenaje ácido provocado por la oxidación microbiana del hierro y del azufre), agrícolas (uso excesivo de abonos nitrogenados) e industriales (producción de residuos o vertidos). Muchos de los contaminantes son considerados xenobióticos, es decir, compuestos extraños desde un punto de vista metabólico, debido fundamentalmente a su corta historia de existencia. Por esta razón, los procesos selectivos y adaptativos naturales aún no han tenido tiempo de operar dado que generalmente son lentos desde la perspectiva de la escala de tiempo del ser humano (Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005). A este respecto, durante el último siglo, la industria química de síntesis orgánica ha experimentado un notable desarrollo, lo que ha ocasionado la liberación al medio de una enorme variedad de compuestos orgánicos xenobióticos que ocasionan graves problemas de contaminación. Entre estos compuestos se encuentran hidrocarburos halogenados (propelentes, disolventes, refrigerantes e insecticidas), compuestos nitroaromáticos (explosivos, disolventes, plaguicidas, etc.), bifenilos policlorados (plastificantes, aislantes-refrigerantes,

etc.), dioxinas, sulfonatos alquilbencílicos (detergentes) y polímeros sintéticos (envoltorios y materiales de empaquetado). En otras ocasiones, el problema de la contaminación ambiental por compuestos orgánicos no es debido a su naturaleza xenobiótica, sino a la cantidad de ellos que se vierte en un determinado punto, como es el caso de los accidentes en el transporte de petróleo. Hasta hace relativamente poco tiempo las políticas gubernamentales no prestaban especial atención a los residuos industriales y apenas se tomaban medidas contra los responsables de vertidos tóxicos. Como consecuencia de importantes desastres medioambientales y de salud pública ocurridos en las últimas décadas (derrame de petróleo del *Exxon Valdez* en Alaska en 1989 y del *Prestige* en España en 2002, escape de metilisocianato en la planta de *Union Carbide* en Bhopal en 1984, escape de dioxinas en *Seveso* en 1976, etc.), y la reciente tragedia ocurrida en Tianjin (China) en la que múltiples explosiones acontecidas en una terminal de contenedores produjeron la liberación de cianuro. Se ha producido una concienciación social que ha provocado el surgimiento de movimientos ecologistas y la promulgación de una legislación medioambiental más restrictiva.

En función del medio afectado se distinguen tres tipos de contaminación: hídrica, atmosférica y del suelo (Tabla 1). A este respecto, el agua es uno de los recursos naturales más importantes del que disponemos, y debido a la contaminación, su calidad puede verse alterada. En España, la contaminación de las aguas subterráneas resulta fundamentalmente de los vertidos urbanos, de la industria o de la infiltración de los fertilizantes procedentes de la agricultura intensiva, y por las deyecciones del ganado.

Tabla 1. Tipos de contaminación.

Parámetro	Tipo	Ejemplos
Proceso causante	Natural	Erupciones volcánicas, cenizas, incendios, alteración de rocas.
	Antropogénica	Minas, industrias, vehículos, aplicaciones químicas (plaguicidas, pesticidas, fertilizantes...).
Tipo de contaminante	Biológicos	Organismos (bacterias, virus, protozoos...) y restos orgánicos (toxinas, proteínas urinarias...)
	Físicos	Ruido y vibraciones; radiaciones, temperatura, humedad, velocidad del aire, presión atmosférica, campos eléctricos y magnéticos.
	Químicos	Cianuros, cianatos, cloruros, sulfatos, nitratos, carbonatos...
Medio afectado	Hidrosfera	Nitratos, nitritos ...
	Atmósfera	Clorofluorocarburos (CFC), Óxidos de nitrógeno (NOx) ...
	Suelo	Fertilizantes, plaguicidas...

La contaminación en los ríos españoles puede ser de tipo orgánico o inorgánico y se expresa mediante el índice de calidad general que se elabora combinando 23 parámetros que influyen en la composición, posible toxicidad,

capacidad de albergar la vida, fenómenos de eutrofización u otros rasgos de los que depende la calidad de las aguas fluviales.

Dado que la cantidad de residuos generada por habitante y año presenta un crecimiento constante debido a la explosión demográfica actual enmarcada en un modelo de desarrollo no sostenible, los residuos también constituyen una importante fuente de contaminación y degradación ambiental. Por ello, las sociedades desarrolladas, entre ellas España, promueven sistemas de recogida selectiva de residuos, así como su posterior gestión, reciclado o reutilización (Instituto Geográfico Nacional - Centro Nacional de información geográfica del Ministerio de fomento de España).

Según un informe de Greenpeace publicado en 2008, la industria española reconoce el vertido al agua de 1.219.709 toneladas de contaminantes al año y la contaminación atmosférica provoca en España 16.000 muertes prematuras anualmente (Informe de Greenpeace, 2008). En la figura 1 se especifican los principales focos contaminantes del país en el año 2010 según el Instituto Geográfico Nacional.

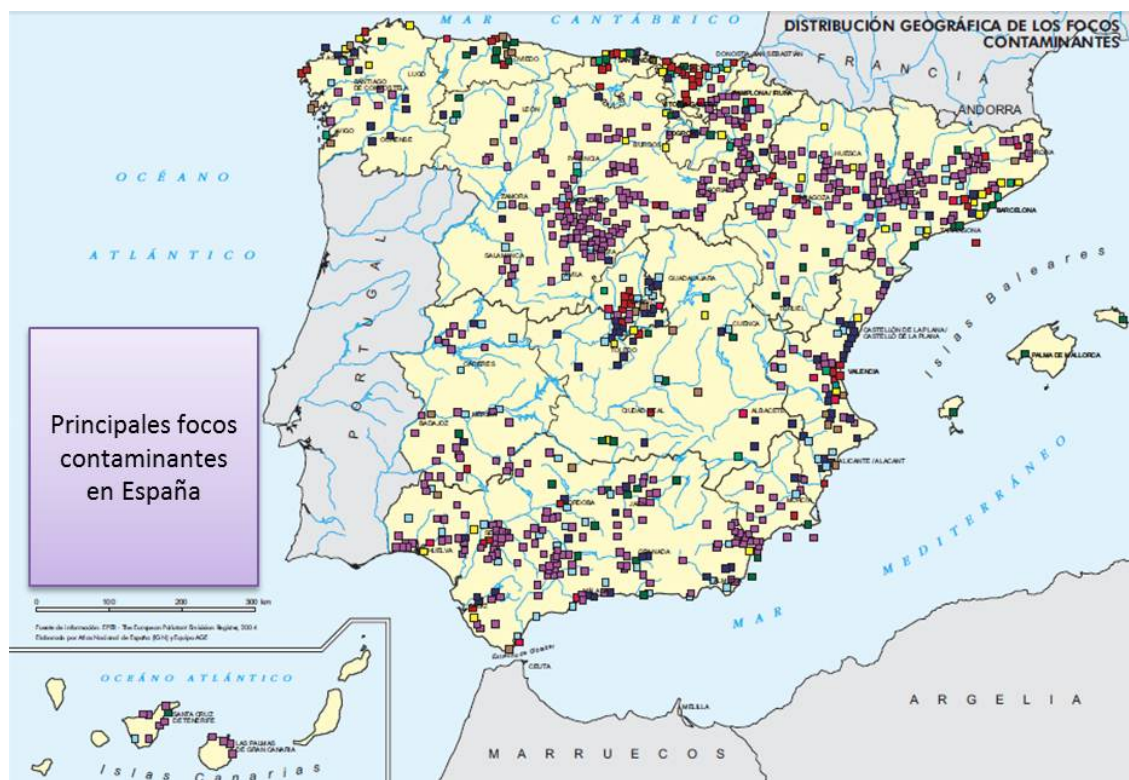


Figura 1. Distribución de los principales focos contaminantes en España (año 2010). Fuente: Instituto Geográfico Nacional (IGN). La mayoría se corresponden con la cría intensiva de ovejas y cerdos (violeta), el resto son instalaciones de combustión (verde oscuro), industria variadas, tales como del metal (rojo), de los minerales (azul oscuro), química (amarillo), del papel (rosa) y otras (marrón). Por último, algunos focos están relacionados con espacios de gestión de residuos (azul claro) y con tratamientos con disolventes (verde claro).

2. Formas químicas del cianuro

El cianuro puede estar en la naturaleza en formas muy variadas, incluyendo el gas ácido cianhídrico (HCN), las sales NaCN o KCN que son solubles en agua, y numerosos complejos cianuro-metálicos con un mayor o menor grado de solubilidad (Fig. 2). Las propiedades y naturaleza de estas formas de cianuro se pueden explicar en base al grupo ciano ($-\text{C}\equiv\text{N}$), el cual presenta un enlace σ , dos enlaces π y dos orbitales anti-enlazantes desocupados. Los dos primeros orbitales de su estructura se llenan con el número máximo de electrones, mientras que los demás se encuentran vacíos, debido a que los orbitales σ y π ($1+2$) se encuentran completos, el cianuro se comporta como un halógeno. Sin embargo, este comportamiento no explica la formación de complejos cianurados con los metales de la serie de transición tales como Fe, Co, Ni, Cu y Zn. Dichos complejos se forman por la generación de orbitales híbridos formados por los orbitales anti-enlazantes desocupados y los orbitales “d” (parcial o totalmente llenos) de los metales de transición. La contribución de un par de electrones (ya sean de los metales o del grupo ciano) se conoce como “enlace recíproco”, y explica la estabilidad de los complejos cianurados con metales. Por otra parte, la elevada reactividad del ión cianuro se debe a su triple enlace, el cual puede romperse fácilmente.

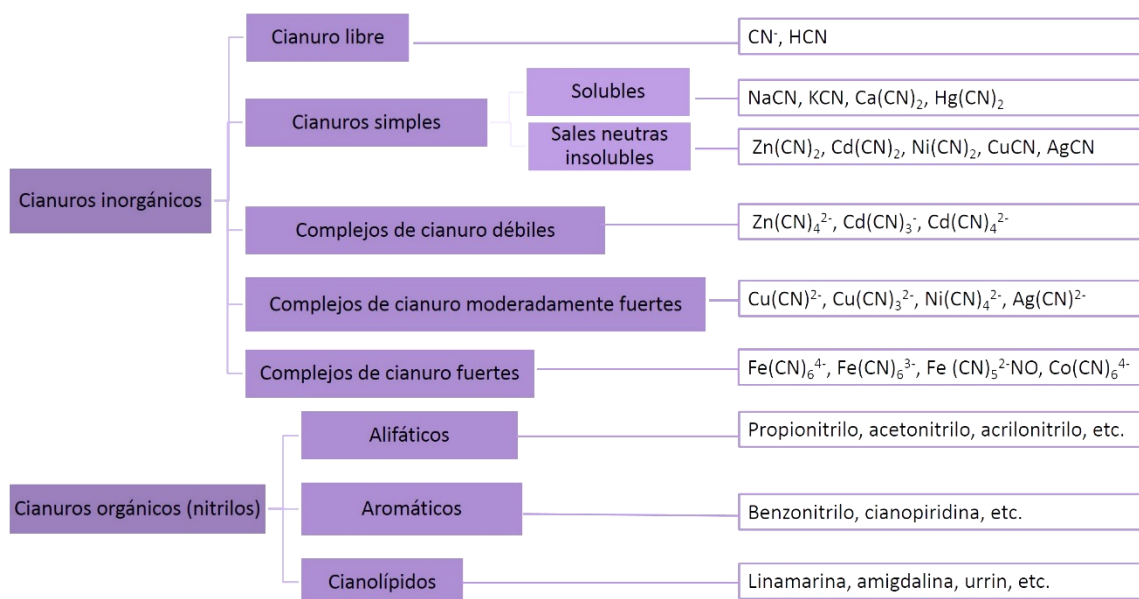


Figura 2. Clasificación de las distintas formas de cianuro. Las formas en las que puede presentarse el cianuro en la naturaleza pueden clasificarse en cianuros inorgánicos y orgánicos.

Los cianuros libres se definen como las formas de cianuro en forma de gas (HCN) o iónica (CN⁻), respectivamente, que son liberadas por la disociación

de compuestos cianurados simples o complejos. En disolución acuosa, las dos formas de cianuro libre se encuentran en equilibrio según la reacción 1, dependiendo su proporción relativa del pH del medio.



Debido al pK_a relativamente elevado del par CN^-/HCN (9,2), es muy importante mantener las disoluciones que contienen cianuro a un pH superior a dicho pK_a para evitar así su pérdida en forma de HCN. El HCN tiene un punto de ebullición bajo (25,6 °C) y una presión de vapor alta (27,5 °C), lo que facilita su evaporación.

Los cianuros simples pueden definirse como sales del ácido cianhídrico que se disuelven completamente en disolución acuosa, produciendo cationes libres y el anión cianuro. La existencia de complejos de cianuro con diversos metales pesados es consecuencia de su elevada afinidad por éstos. Entre los complejos cianuro-metálicos podemos encontrar formas muy estables, tales como el hexacianoferrato $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (Fig. 3), con una constante de disociación de hasta 10^{-52} M, y formas menos estables, como el $[\text{Zn}(\text{CN})_4]^{2-}$ con una constante de disociación de 10^{-17} M. La estabilidad de estos compuestos depende del metal que forma parte del complejo, del pH y del potencial rédox del medio en el que se encuentran (Luque-Almagro, 2005).

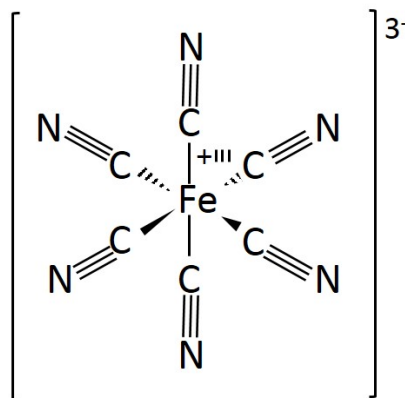


Figura 3. Estructura química del hexacianoferrato. Estos complejos, a pesar de estar clasificados como inertes debido a su gran estabilidad química, se pueden disociar lentamente por fotólisis en presencia de radiación ultravioleta, con la consiguiente liberación de cianuro libre al medio.

Los compuestos orgánicos que poseen el grupo funcional ciano unido a un alquilo son denominados nitrilos según la nomenclatura IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Los nitrilos ($\text{R}-\text{C}\equiv\text{N}$), o cianuros orgánicos, están ampliamente distribuidos en la biosfera, producidos tanto de forma natural como artificial (Banerjee *et al.*, 2002). Las plantas son

los principales productores de nitrilos en la naturaleza, fundamentalmente en forma de glucósidos cianogénicos y cianolípidos. Los glucósidos cianogénicos, que forman parte del metabolismo secundario de las plantas, se pueden definir químicamente como β -glucósidos de α -hidroxinitrilos y derivan en su mayoría de aminoácidos alifáticos y aromáticos (Møller y Seigler, 1999; Zagrobelny *et al.*, 2004). Su hidrólisis es la responsable de la producción de la mayor parte del cianuro generado por las plantas cianogénicas.

3. Papel del cianuro en el origen prebiótico de compuestos orgánicos

Actualmente las teorías más aceptadas sobre el origen de la vida en la Tierra se basan en la evolución química prebiótica, durante la cual se formaron moléculas orgánicas a partir de precursores inorgánicos (N_2 , CO_2 , H_2O , NO , CO , HCl , H_2 , HCN , etc.). Posteriormente, la organización de estas moléculas en la primera protocélula dio paso a la evolución biológica. Según numerosos estudios, el origen de la vida habría sido imposible de no ser por el importante papel jugado por el cianuro, junto con la formamida, en la síntesis de biomoléculas como aminoácidos y purinas (Fig. 4). Paradójicamente, uno de los compuestos más tóxicos para la mayoría de los seres vivos probablemente ha sido un precursor prebiótico de biomoléculas esenciales para la vida.

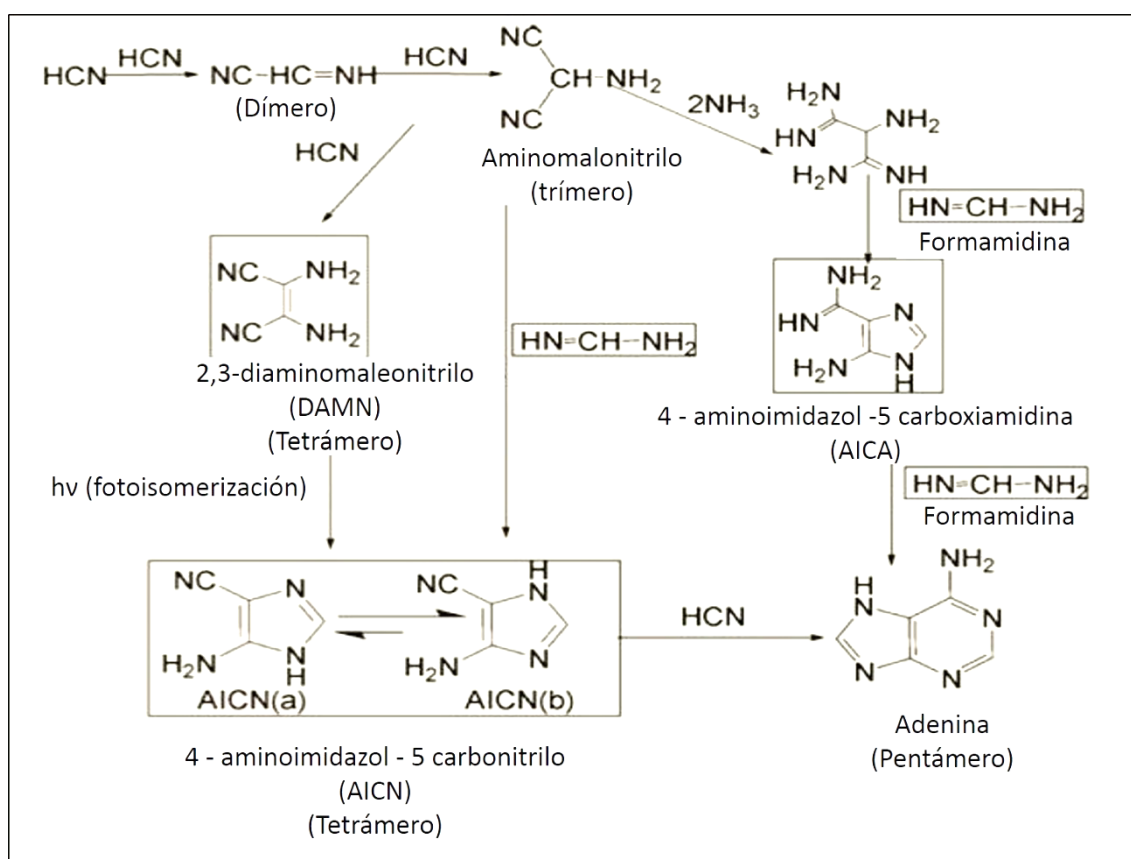


Figura 4. Formación de adenina a partir de cinco unidades de HCN en solución acuosa. Adaptación de McGlynn *et al.*, 2010.

Un gran número de trabajos reconocen que la polimerización de HCN a través de reacciones de condensación es una de las transformaciones moleculares que resultaron de gran importancia para el origen de la vida. Hace más de 200 años, Proust describió que la polimerización de HCN en solución acuosa da lugar a la formación de numerosas biomoléculas constituyentes de

los sistemas biológicos. Entre estas biomoléculas se incluyen las purinas adenina (Fig. 4), hipoxantina, guanina y xantina. La producción de purinas a partir de HCN sugiere que estas pudieron haber servido como las primeras bases nitrogenadas implicadas en la formación de ácidos nucleicos y por lo tanto, responsables de las funciones biológicas. Holm y colaboradores en el año 2006 especularon que el boro estabilizó las moléculas de ribosa formadas en áreas hidrotermales a través de la síntesis de purinas formadas como se explica anteriormente, dando lugar a la formación de los primeros ribonucleósidos (Holm *et al.*, 2006; McGlynn *et al.*, 2010). Es de resaltar que, si bien la síntesis abiótica de purinas a partir de cianuro fue un proceso exotérmico relativamente simple, la biosíntesis enzimática de este compuesto constituye una ruta energéticamente costosa y de una gran complejidad.

Una de las principales limitaciones que tiene la hipótesis que involucra al cianuro en el origen de la vida es que dicho fenómeno tuvo lugar en un ambiente acuoso, condiciones en las que la formación de cianuro es menos probable que en condiciones gaseosas. A pesar de este inconveniente, Holm y Neubeck (2009) han postulado que en la fase prebiótica, durante la fase temprana de subducción de los márgenes convergentes de las placas oceánicas, se dieron las condiciones idóneas para la formación de HCN a partir de precursores formados en ambientes hidrotermales. La energía necesaria para la formación de cianuro sería suministrada por la energía geotérmica producida durante el proceso de subducción, mientras que la alcalinización e hidratación posterior del manto favorecería la polimerización del HCN y la consiguiente formación de compuestos orgánicos (Fig. 4).

4. Toxicidad y resistencia a cianuro

El cianuro ha sido utilizado ampliamente desde la antigüedad por su acción rápida y letal con fines homicidas o suicidas. Ya en la antigua Roma fue usado por el emperador Nerón para envenenar a miembros de su familia. Además, el cianuro ha sido utilizado como arma química así como en las cámaras de gas de forma recurrente a lo largo de la historia. Por otra parte, en 1978, más de 900 seguidores de una secta protagonizaron un multitudinario suicidio en Guyana usando para ello cianuro. Más actual es conocido el suicidio de Ramón Sampedro en 1998. Cabe destacar que el envenenamiento involuntario por cianuro de origen natural en seres humanos está relacionado, frecuentemente, con la ingestión de alimentos cianogénicos como la yuca, causante de la enfermedad denominada konzo.

La toxicidad del cianuro depende de su estructura química, de su estabilidad y de su biodisponibilidad, siendo la forma más tóxica el cianuro libre (HCN y CN^-), y las menos, los complejos cianurometálicos más estables (Dubey y Holmes, 1995). El cianuro tiene alta afinidad por metales, por lo que se combina rápidamente con el hierro presente en la citocromo *c* oxidasa, enzima terminal de la cadena respiratoria (complejo IV), inhibiendo su actividad. La inhibición de esta enzima bloquea la fosforilación oxidativa, disminuyendo la concentración de ATP en la célula y provocando la muerte celular. Dubey y Holmes (1995) describieron que esta enzima mitocondrial se inhibe completamente por una concentración de cianuro 33 nM. La unión del cianuro a la citocromo *c* oxidasa es compleja y depende del estado redox de la enzima. Algunos autores han propuesto la existencia de dos formas o estados de esta enzima, las formas unible y no unible a cianuro. Se considera forma unible a la enzima en un estado parcialmente reducido, mientras que formas no unibles corresponden con todos los demás estados redox de la enzima (Quiroga y Olmos, 2009). En mamíferos, el mecanismo de acción del cianuro es considerablemente más complejo que en el resto de organismos, debido a que, además de la inhibición de la citocromo *c* oxidasa, existen otros factores que contribuyen a la toxicidad de este compuesto: a) inhibición de la hemoglobina, enzima responsable del transporte de oxígeno a todos los tejidos a través de la sangre, b) alteración de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, ocasionando disfunciones en la actividad motora, y c) inducción de la apoptosis. A pH fisiológico el cianuro se encuentra, debido a su elevado pK_a , en forma de ácido cianhídrico, el cual atraviesa rápidamente las membranas por un mecanismo de difusión simple. Así, en humanos, el cianuro se absorbe por piel y mucosas y puede penetrar en el organismo por vía inhalatoria, oral, conjuntival y dérmica, esta última vía de entrada se debe a su efecto corrosivo sobre la piel y su moderada liposolubilidad (Antonini *et al.*, 1996; Mills *et al.*, 1996; Shou *et al.*, 2002; Mathangi y Namasivayam, 2004). La absorción de sales de cianuro por vía gastrointestinal es más lenta que la

absorción por inhalación del gas cianhídrico, y se ve afectada por la presencia de alimentos. La presencia de una elevada cantidad de alimentos diluye la dosis de cianuro, mientras que la tasa de liberación de iones cianuro depende de la acidez. Cuando el cianuro penetra en el organismo es distribuido por todo el cuerpo a través de la sangre, provocando hipoxia citotóxica en todos los tejidos. Uno de los principales órganos sobre el que actúa el cianuro es el sistema nervioso central. Debido a la importancia de la respiración celular en este órgano, su inhibición provoca graves alteraciones neurológicas, ocasionando en último término la muerte del individuo (Luque-Almagro, 2005). La dosis de cianuro que mata al 50% de la población humana expuesta, que se define como la dosis letal promedio (LD50), es $1,52 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ vía intravenosa y $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ cuando el cianuro penetra a través de la piel. En humanos, a bajas concentraciones de cianuro se produce un proceso natural de detoxificación en el que participan sulfotransferasas intracelulares, entre las que destaca la rodanasa. Esta enzima cataliza la adición de azufre al cianuro de modo irreversible, formando tiocianato. Este derivado cianurado tiene menos toxicidad que el cianuro y es eliminado a través de la orina (Quiroga y Olmos, 2009).

Debido a la elevada toxicidad del cianuro, y con el fin de proteger la salud de la población, la mayoría de los países desarrollados han establecido unos límites muy estrictos de concentración de cianuro en el agua destinada a consumo humano. En España, la concentración máxima de cianuro permitida en aguas para el consumo es de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (RD 140/2003, de 7 de febrero), mientras que en Estados Unidos y en el resto de países europeos la legislación vigente no es menos restrictiva (Luque-Almagro, 2005).

Al igual que en eucariotas, en procariotas la toxicidad del cianuro radica principalmente en la inhibición de la oxidasa terminal de la cadena de transporte electrónico, la cual transfiere cuatro electrones desde el citocromo c al O_2 para dar lugar a dos moléculas de agua. Además, la elevada afinidad del cianuro por el hierro también podría ocasionar una disminución de la biodisponibilidad de este metal esencial para la mayoría de bacterias. Por lo tanto, aquellos organismos capaces de crecer en presencia de cianuro requieren mecanismos de resistencia que posibiliten el correcto funcionamiento de la respiración celular y la captación de hierro en condiciones de escasez de dicho metal (Luque-Almagro *et al.*, 2007). La respiración celular en presencia de cianuro es posible debido a la existencia de oxidasas terminales resistentes a cianuro, las cuales se pueden clasificar en dos tipos (Fig. 5): a) oxidasas alternativas AOX, y b) oxidasas insensibles a cianuro CIO. Las AOX se encuentran en procariotas y en las mitocondrias de plantas superiores, hongos, protistas y algunos animales. Se caracterizan por usar ubiquinol reducido (UQH_2) en lugar de citocromo c como donador de electrones, contienen un sitio activo con carboxilato di-hierro y no están acopladas a la transferencia de carga

a través de membrana para la producción de fuerza protomotriz. Las oxidasas alternativas insensibles a cianuro CIO pertenecen a la familia citocromo *bd* y están presentes en procariotas. Los citocromos *bd* son quinol oxidasas que usan ubiquinol o metaquinol como sustratos, contienen un sitio activo di-hemo, y contribuyen a la producción de fuerza protomotriz. Las citocromo *bd* oxidasas son complejos heterodiméricos que contienen 3 grupos hemo (*b558*, *b595* y *d*), mientras que en las oxidasas CIO el grupo hemo *d* se reduce drásticamente, e incluso desaparece, siendo reemplazado por el grupo hemo *b*. A pesar de que AOX y CIO comparten su insensibilidad a cianuro, la secuencia aminoacídica de ambos tipos de oxidasas no presenta homología (Quesada *et al.*, 2007; Borisov *et al.*, 2011). Hasta el momento, únicamente se ha resuelto la estructura de una oxidasa terminal insensible a cianuro, la AOX (TAO) del parásito *Trypanosoma brucei* (Fig. 6). Estudios cristalográficos revelan que TAO contiene cuatro monómeros por unidad asimétrica que se asocian para formar un homodímero. Cada monómero está formado por un brazo largo Nt, seis hélices largas ($\alpha1-\alpha6$) y cuatro hélices cortas (s1-s4). Las hélices largas se organizan de forma antiparalela, con $\alpha2$, $\alpha3$, $\alpha5$ y $\alpha6$ formando un haz de cuatro hélices que acomodan el centro activo en su interior (Shiba *et al.*, 2013).

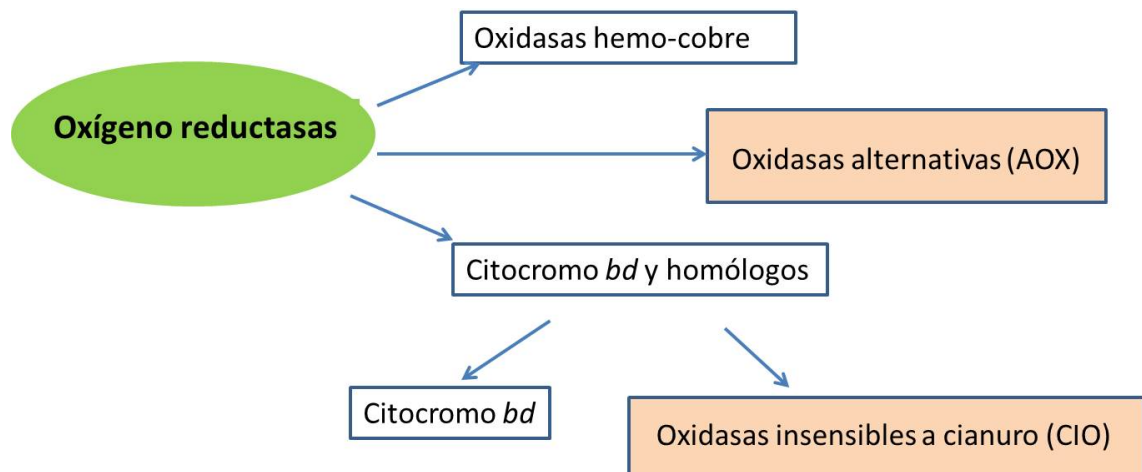


Figura 5. Oxígeno reductasas respiradoras. Entre las oxígeno reductasas respiratorias se encuentran oxidasas que contienen hemo-cobre, oxidasas alternativas y citocromos tipo *bd*.

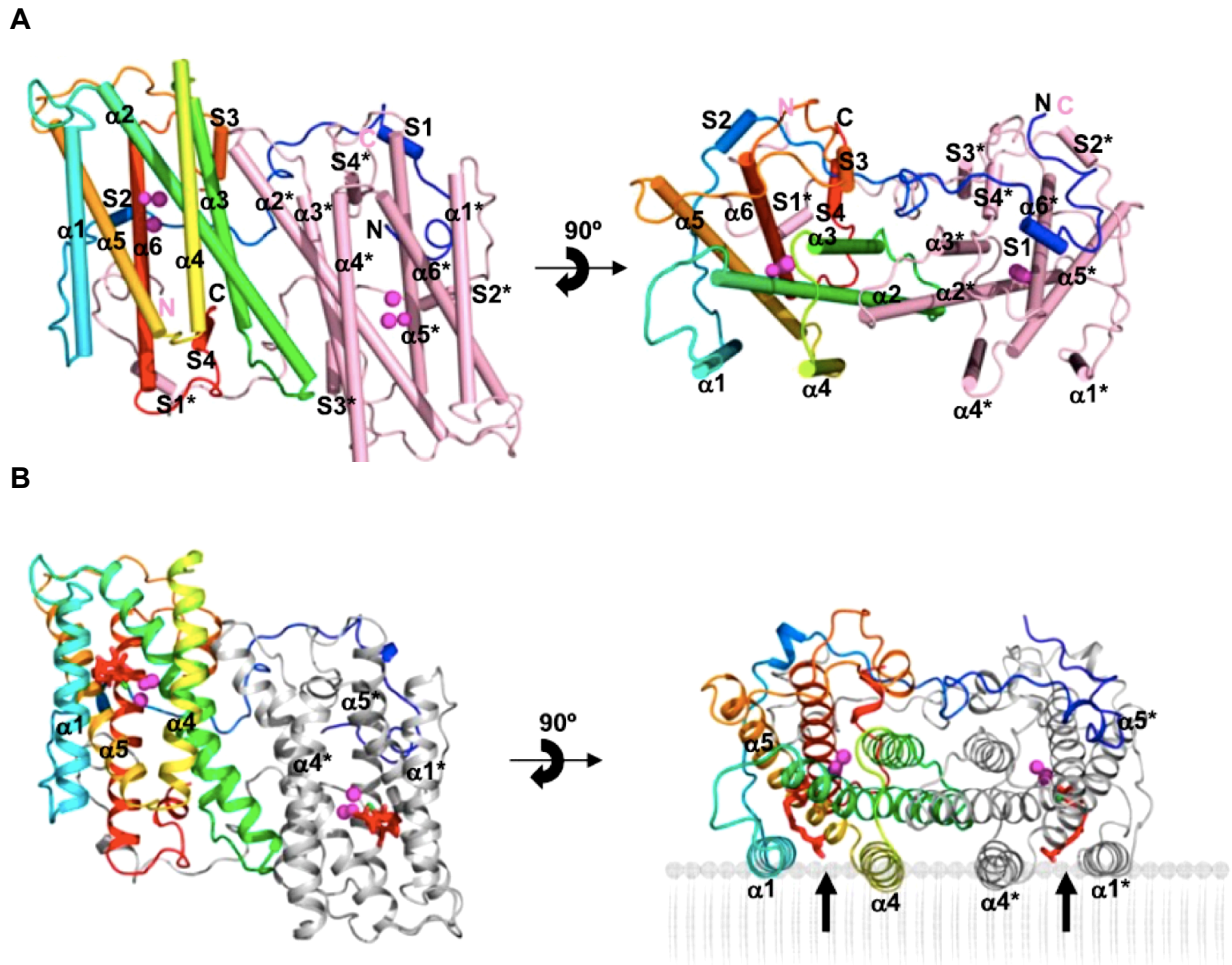


Figura 6. Estructura general de la oxidasa alternativa TAO de *Trypanosoma brucei*. **A.** Estructura dimérica de TAO vista perpendicularmente (izquierda) y de forma paralela (derecha) a los haces de hélices. Las hélices están representadas por cilindros. La cadena A está representada por cilindros de diferentes colores desde el azul (N terminal) hasta el rojo (C terminal), mientras que la cadena B es de color rosa. **B.** Estructura del complejo TAO-ligando (AF27790H). El ligando está representado por los bastones rojos, mientras que las cadenas A y B de TAO son representadas por hélices de distintos colores (azul a rojo desde el extremo N terminal al C terminal) y gris respectivamente. La cavidad de unión del ligando se encuentra señalada por dos flechas (Shiba *et al.*, 2013).

Las oxidasas insensibles a cianuro se encuentran presentes en numerosas especies bacterianas, tales como *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Staphylococcus carnosus*, *Campylobacter jejuni* y *Zymomonas mobilis*. Los genes que codifican esta proteína son *cioA* y *cioB*, integrantes del operón *cio*, que ha sido secuenciado en algunos organismos como *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y *P. aeruginosa*. Algunos estudios implican directamente a estas enzimas en la

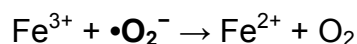
resistencia a cianuro. En *P. aeruginosa* se ha demostrado que el cianuro induce la oxidasa alternativa insensible a cianuro, mientras que en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se ha comprobado que CioA posibilita la actividad respiratoria en presencia de cianuro, así como el crecimiento en cianuro como única fuente de nitrógeno, indicando que esta oxidasa alternativa es esencial en el metabolismo del cianuro en esta estirpe (Quesada *et al.*, 2007; Kawakami *et al.*, 2010).

Por otra parte, tal y como se ha descrito, el ion CN^- es altamente reactivo y se une a metales como el hierro. Esto supone un problema adicional al bloqueo de la cadena de transporte de electrones, ya que el hierro es un metal fundamental tanto para reacciones redox como para funciones estructurales. Por ello, y debido a la baja disponibilidad de Fe^{2+} soluble en el medioambiente, las células pueden secretar quelantes de hierro denominados sideróforos, para la captación y/o pueden evitar la salida del hierro citoplásmico hacia el exterior, mediante su asociación a proteínas especializadas de la superfamilia de las ferritinas. Estas proteínas forman una envoltura prácticamente esférica que encierra gran cantidad de átomos de hierro ocupándose así de la detoxificación de los iones ferrosos en el interior celular (Stryer *et al.*, 2003; Smith, 2004). En procariotas se diferencian dos subfamilias de ferritinas: las bacterioferritinas (BFRs) y las ferritinas bacterianas (Ftns). Se han identificado homólogos de Ftn también en arqueobacterias. Todas estas ferritinas actúan solubilizando y almacenando gran cantidad de hierro biológicamente seguro y disponible para la célula. Las ferritinas de procariotas pueden actuar al menos de dos maneras diferentes. Por un lado el centro ferroxidasa actúa como verdadero centro catalítico y dirige la oxidación del ión Fe^{2+} en la cavidad de oxidación; por otro lado el centro actúa como un “poro cerrado de hierro” mediante la oxidación de Fe^{2+} y la posterior transferencia del Fe^{3+} resultante hacia la cavidad central. Así, exhiben una amplia variedad en los mecanismos para la mineralización de hierro. La base de estas diferencias yace en las diferencias estructurales alrededor y en los centros catalíticos. Sin embargo, parece que las diferencias más sutiles también deben ser importantes en el control de la química del hierro de estas proteínas (Le Brun *et al.*, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, muchos organismos necesitan sintetizar quelantes de hierro para evitar el déficit de este metal en el medioambiente. Los sideróforos son moléculas solubles en soluciones acuosas, con una masa molecular comprendida entre 500 y 1000 Da, que están especializadas en mecanismos de captación de Fe^{3+} (Dybas *et al.*, 1995). Para asimilar el hierro presente en el medioambiente muchos microorganismos, incluyendo bacterias, levaduras y hongos, solubilizan el hierro presente en precipitados insolubles, que son parte de polímeros hidróxidos. Los sideróforos son producidos también por numerosas especies de plantas superiores. A este respecto se han identificado más de 500 tipos de sideróforos (Boukhalfa y

Crumbliss, 2002). Algunas especies producen más de un tipo de sideróforos, como *E. coli* que puede producir enterobactina y ferricromo, y *Pseudomonas*, cuyos principales sideróforos son la pioverdina y la pioquelina (Huertas *et al.*, 2006).

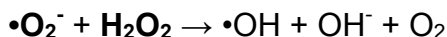
Por otra parte, como consecuencia del bloqueo de la oxidasa terminal de la cadena de transporte electrónico se pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) y el radical anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), las cuales son potencialmente dañinas para la célula. Como consecuencia de este estrés oxidativo, normalmente se desencadena la reacción de Haber-Weiss (Koppenol, 2001), a través de la cual se generan radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) a partir de peróxido de hidrógeno y superóxido. En la primera etapa el radical anión superóxido interactúa con una traza de metal presente en la célula, por ejemplo Cu²⁺ o Fe³⁺, generando la especie reducida del metal (Hu y Ribbe, 2012).



El segundo paso es una reacción de Fenton, en la que a partir de peróxido de hidrógeno se forma el radical hidroxilo, al tiempo que se reoxida el metal:



La reacción de Haber-Weiss neta es:



La mayoría de las enzimas que producen las especies reactivas de oxígeno contienen uno de estos metales por lo que la presencia de estos en los sistemas biológicos de forma no complejada (en una proteína u otro tipo de protección del complejo metálico) puede aumentar significativamente el nivel de estrés oxidativo. Los radicales hidroxilo generados a través de la reacción de Fenton pueden dar lugar a modificaciones de los aminoácidos (por ejemplo, la formación de *m*-tirosina y *o*-tirosina a partir de fenilalanina), hidratos de carbono, iniciar la peroxidación de lípidos, y oxidar nucleobases. A este respecto, se ha demostrado que en muchas bacterias la combinación del cianuro con el peróxido de hidrógeno tiene una clara actividad bacteriostática (Mahaseth y Kuzminov, 2015) que se debe en gran medida al ciclo catalítico que induce el peróxido de hidrógeno en el interior de la célula, cuando este se encuentra en presencia de hierro citoplásmico. La célula puede reducir la reacción de Fenton disminuyendo las concentraciones de peróxido de hidrógeno, así como de radical anión superóxido y de hierro libre intracelular.

Las especies reactivas de oxígeno actúan como sustratos de diversas enzimas protectoras frente a estrés oxidativo como son las peroxidasas, catalasas y superóxido dismutasas. De esta manera, catalasas y peroxidasas catalizan la destoxificación del peróxido de hidrógeno, evitando así el posible daño oxidativo causado por este compuesto tóxico, mientras que las superóxido dismutasas neutralizan los radicales superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$).

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7), presentes en animales, plantas y microorganismos, pueden usar gran cantidad de sustratos orgánicos e inorgánicos como donadores de H en presencia de H_2O_2 , catalizando la reacción $\text{RH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{R}$. Estas enzimas están formadas por una cadena peptídica con grupos hemo (Vicuna, 2005). En el caso de que la concentración de H_2O_2 en la célula sea elevada las catalasas (EC 1.11.1.6) lo eliminan mediante la formación de H_2O y O_2 (Scibior y Czczot, 2006).

Las superóxido dismutasas (SODs) son quizás las enzimas más importantes a este respecto, ya que neutralizan los radicales superóxido catalizando la conversión de dos de estos radicales en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. El peróxido de hidrógeno formado por la SOD y otras enzimas se neutraliza por la acción de la catalasa (Stryer *et al.*, 2003), por lo que ambas enzimas (SOD y catalasa) protegen a las células de los subproductos tóxicos, los cuales son generados en la reducción incompleta del oxígeno.

Debido a la importancia que supone la protección frente al estrés oxidativo, las SODs se encuentran en todos los organismos aerobios, pudiéndose diferenciar tres enzimas independientes: las superóxido dismutasas con cobre y zinc (Cu, Zn-SODs), las SODs específicas para hierro o manganeso, o que funcionan con cualquiera de los dos (Fe-SODs, Mn-SODs o Fe/Mn-SODs), y las SODs que usan níquel (Ni-SODs). En bacterias, la actividad SOD puede estar asociada a un centro con hierro, aunque es más común que contenga manganeso. A pesar de las similitudes existentes entre los sitios activos de Fe-SODs y Mn-SODs, los mecanismos redox son claramente distintos debido a las diferencias entre los iones $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ y $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$ (Miller, 2004). La estructura cuaternaria de las Mn-SODs y Fe-SODs es variable, pudiéndose encontrar en formas diméricas o tetraméricas dependiendo del organismo al que pertenezcan. Comúnmente ambas suelen ser diméricas con subunidades de alrededor de 20 000 Da. En *Pseudomonas ovalis* la SOD es una proteína homodimérica con un átomo de hierro por cada monómero. Aproximadamente la mitad de cada subunidad está constituida por α -hélices y tres láminas antiparalelas (Bond *et al.*, 2000).

Todos los procesos derivados de estrés oxidativo y su regulación, así como la osmorregulación del hierro en la célula, están estrechamente

relacionados. Así, se ha podido demostrar que el fenotipo de mutantes de *E. coli* y *Bacillus subtilis* carentes de SOD citoplásmica puede ser revertido mediante quelantes de hierro tales como dipicolinato, dihidrodipicolinato o tetrahidrodipicolinato los cuales generan niveles elevados de hierro libre intracelular a través de la desrepresión del regulador de captación de hierro Fur (Maringanti e Imlay, 1999).

5. Fuentes de producción de cianuro

La producción de cianuro puede tener un origen natural o antropogénico. A este respecto, a pesar de ser un compuesto altamente tóxico, el cianuro es producido y liberado por numerosos organismos, constituyendo estos las fuentes naturales de producción de cianuro. En cuanto a sus fuentes antropogénicas o artificiales, el cianuro es liberado en numerosos procesos industriales (Rajesh *et al.*, 2008), los cuales se describirán posteriormente.

5.1. Fuentes de producción naturales

El cianuro es un metabolito a término o un producto intermediario en diversos sistemas biológicos, incluyendo microorganismos, plantas y animales (Luque-Almagro, 2005). La síntesis biológica de cianuro, denominada cianogénesis, se descubrió en plantas en 1803, mientras que en microorganismos se demostró por primera vez en el hongo *Marasmius oreades* (Knowles, 1976). En bacterias el cianuro es producido por un número reducido de especies de *Pseudomonas* (Tabla 2), principalmente *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Chromobacterium violaceum* y algunas cianobacterias. Aproximadamente 300 especies de hongos pertenecientes a 52 géneros son cianogénicos, los cuales incluyen cepas de los géneros *Clitocybe*, *Marasmius*, *Pholiota*, *Polyporus* y *Tricholoma* (McAfee y Taylor, 1999). Respecto a las plantas cianogénicas se han contabilizado aproximadamente 2600 especies con dicha capacidad, incluyendo helechos, gimnospermas y angiospermas (Møller y Seigler, 1999; Vetter, 2000; Zagrobelny *et al.*, 2004). Entre estas plantas se incluyen especies con importancia agrícola y alimenticia, tales como el almendro (280-2.500 mg CN⁻·Kg⁻¹), el durazno, el bambú (hasta 8.000 mg CN⁻·Kg⁻¹), la judía (2.100 mg CN⁻·Kg⁻¹), la yuca (377.500 mg CN⁻·Kg⁻¹ en las hojas y 138 mg CN⁻·Kg⁻¹ en la raíz), el castaño de Cajú, el cerezo, la patata, el sorgo y la soja. Como refleja la Tabla 2, en el reino animal la síntesis biológica de cianuro está restringida a los artrópodos (miriápodos e insectos). Si bien todos los artrópodos cianogénicos son capaces de sintetizar glucósidos cianogénicos *de novo*, muchos lepidópteros poseen la capacidad de secuestrar los producidos por sus plantas hospedadoras (Zagrobelny *et al.*, 2004).

Existen diferentes rutas de biosíntesis de cianuro que se pueden clasificar en función de la producción o no de intermediarios cianurados estables (Fig. 7). En bacterias, hongos y algas la cianogénesis transcurre sin la formación de estos intermediarios, mientras que en plantas y artrópodos se generan intermediarios cianurados. En el caso de la producción de cianuro por las proteínas HydG, HypF e HypE de maduración de las FeFe-hidrogenasas, la concentración de cianuro producida es muy baja y no se consideran procesos de cianogénesis propiamente dichos.

Tabla 2. Organismos cianogénicos.

Bacteria	<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>Burkholderia cenocepacia</i> , <i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. entomophila</i> , <i>P. aureofaciens</i> , <i>Anacystis nidulans</i> , <i>Nostoc muscorum</i> , <i>Plectonema boryanum</i>	
Fungi	<i>Marasmius oreades</i> , <i>Pholiota aurea</i> , <i>Stemphyllus loti</i> , <i>Gloeocercospora sorghii</i> , <i>Pleurotopus sp.</i> , <i>Clitocybe sp.</i> , <i>Polyporus sp.</i> , <i>Tricholoma sp.</i> , <i>Leptosphaeria maculans</i> .	
Plantae	ORGANISMO	GLUCÓSIDO
	<i>Prunus</i> (almendro, cerezo, ciruelo, melocotonero, albaricoquero), <i>Malus</i> (manzano) y <i>Pirus</i> (peral).	Amigdalina
	<i>Eucalyptus</i>	Purasina
	<i>Sambucus</i> (sauco)	Sambunigrina
	<i>Vicia</i> (haba)	Vicianina
	<i>Sorghum</i> (sorgo)	Durrina
	<i>Taxus</i> (tejo)	Taxifilina
	<i>Phaseolus</i> (judía), <i>Linum</i> (lino), <i>Manihot</i> (mandioca), <i>Trifolium</i> (Trébol), <i>Lotus</i> , <i>Dimorpihothea</i> y	Linamarina
	<i>Acacia</i> .	Acacipetalina
<i>Triglochin</i> (junco)	Triglocina	
Animalia	Miriápodos (diplópodos y quilópodos) Insectos (lepidópteros, coleópteros y heterópteros)	

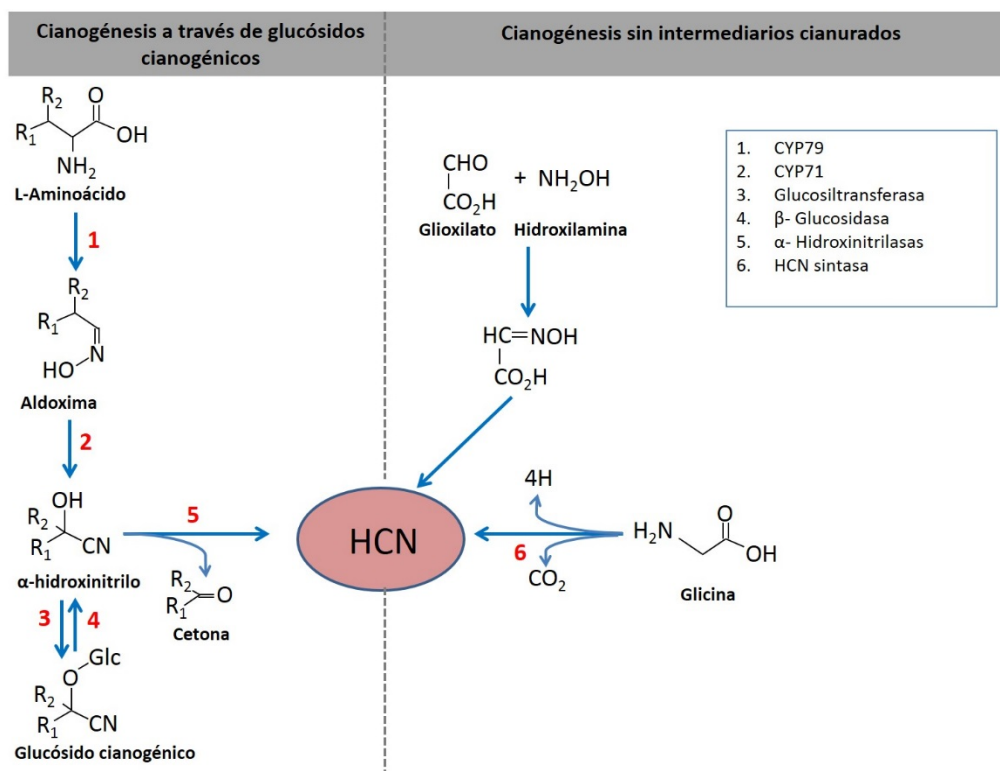


Figura 7. Biosíntesis de cianuro. La producción biológica de cianuro puede transcurrir con o sin la formación de intermediarios cianurados. CYP79 y CYP71: citocromos P450 (Adaptación de Knowles, 1988; Laville *et al.*, 1998; Blumer y Dieter, 2000; Møller, 2010).

5.1.1. Cianogénesis a través de glucósidos cianogénicos

Los glucósidos cianogénicos son glucósidos de α -hidroxinitrilos (cianhidrinas) derivados de aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) y aromáticos (fenilalanina y tirosina). Actualmente se conocen más de 60 glucósidos cianogénicos diferentes. La biosíntesis de glucósidos cianogénicos en plantas y animales se lleva a cabo a partir de los aminoácidos mediante la acción consecutiva de dos citocromos P450 (CYP79 y CYP71), con la formación de una aldoxima y un α -hidroxinitrilo como intermediarios (Fig. 7). Posteriormente, la degradación de estos glucósidos cianogénicos, y la consiguiente producción de cianuro, es catalizada por las enzimas β -glucosidasa y α -hidroxinitrilo liasa (Møller y Seygler, 1999; Vetter, 2000; Zagrobelny *et al.*, 2004). En plantas la biosíntesis de cianuro no sólo se produce a través de la producción y posterior degradación de glucósidos cianogénicos y cianolípidos, sino que también se generan pequeñas cantidades de cianuro durante la producción de etileno. Tan sólo se consideran cianogénicas aquellas plantas que producen concentraciones elevadas de cianuro a través de glucósidos cianogénicos (Poulton, 1998).

5.1.2. Cianogénesis sin formación de intermediarios cianurados

La producción de cianuro en bacterias forma parte del metabolismo secundario, ya que es máxima durante la transición de la fase exponencial a la estacionaria y está influenciada por factores como la concentración en el medio de hierro, fosfato y oxígeno. La síntesis de cianuro en este caso se lleva a cabo por la enzima HCN sintasa, que produce CO_2 y HCN a partir de glicina (Fig. 7), aunque, el papel de otros aminoácidos en dicha producción no está muy claro (Blumer y Dieter, 2000). En *P. fluorescens* CHA0 y *P. aeruginosa* PAO la HCN sintasa podría estar localizada en la membrana citoplasmática, lo que ocasionaría la liberación de HCN en el periplasma (Pessi y Haas, 2004). En las algas cianogénicas los precursores utilizados durante la síntesis de cianuro son el glioxilato, la hidroxilamina y la D-histidina (Knowles, 1988).

5.1.3. Funciones de la cianogénesis

Debido a la toxicidad del cianuro, la principal función de la cianogénesis es defensiva. En plantas la producción de cianuro participa en la defensa química frente a patógenos y herbívoros debido a su sabor amargo y por la destrucción tisular que provoca. Algunos herbívoros, así como insectos que se alimentan fundamentalmente de plantas cianogénicas han adquirido la habilidad de metabolizar estos glucósidos cianogénicos o bien, de secuestrarlos para usarlos en defensa de posibles depredadores y para otros fines. A medida que se han ido desarrollado más estudios sobre la cianogénesis, se ha determinado que la producción de cianuro está implicada

en procesos muy importantes en el ciclo de vida de plantas y artrópodos. En las larvas de la mariposa cianogénica *Zygaena filipendulae* se ha observado transferencia de glucósidos cianogénicos durante el apareamiento, así como la participación del ácido cianhídrico en la atracción masculina y en el metabolismo del nitrógeno (Zagrobelyny *et al.*, 2008). En plantas la cianogénesis posee funciones adicionales, como son el transporte y reserva de glúcidos y nitrógeno reducido.

En bacterias la producción de cianuro se desarrolla como un mecanismo de biocontrol en la competencia interespecífica en diferentes nichos ecológicos. Por otro lado, la producción de cianuro por determinados microorganismos es considerada como un factor de virulencia tanto para humanos, como es el caso de pacientes con fibrosis quística infectados por *P. aeruginosa* (Sanderson *et al.*, 2008; Anderson *et al.*, 2010), como para plantas. El cianuro producido por la especie fitopatógena *P. entomophila* actúa como factor de virulencia que contribuye a su poder patogénico. Además se ha descrito que el cianuro producido por bacterias presentes en la rizosfera participa en la regulación de las interacciones multitróficas de dicho hábitat, afectando así a la colonización de microorganismos como *Bacillus subtilis* (Rudrappa *et al.*, 2008).

5.2. Producción antropogénica

Desde sus primeros usos comerciales en Nueva Zelanda hace más de un siglo, en el año 1889, el cianuro ha sido utilizado ampliamente por la industria en todo el mundo. Este compuesto constituye uno de los pilares fundamentales para la industria química, debido tanto a la facilidad con la que reacciona con otras sustancias como a su composición de carbono y nitrógeno. La producción industrial de cianuro a nivel mundial asciende a 2-3 millones de toneladas anuales (Luque-Almagro, 2005a). En el mundo hay tres productores primarios de residuos cianurados: Dupont (Estados Unidos), ICI (Inglaterra) y Degussa Corporation (Alemania). La mayor parte del cianuro (80%) es utilizado en la síntesis de compuestos orgánicos, como nitrilos, *nylon* y plásticos acrílicos, así como en la fabricación de pinturas, adhesivos, cosméticos, colorantes, medicamentos, agentes quelantes, etc. El cianuro se usa también en aplicaciones fotográficas y en la producción de caucho sintético. En algunas ocasiones este tóxico se ha utilizado como fungicida, insecticida y raticida. Además, tanto el humo generado en la combustión de polímeros que contienen nitrógeno como el procedente de los cigarrillos provoca contaminación por HCN en el aire (Luque-Almagro, 2005). Otras aplicaciones industriales incluyen la galvanoplastia, el procesamiento de metales y el endurecimiento de acero, constituyendo estas actividades una fuente muy importante de residuos industriales cianurados enriquecidos en metales donde la forma de cianuro predominante son los complejos cianuro-metálicos (Luque-Almagro *et al.*, 2003; Luque-Almagro *et al.*, 2005b; Huertas *et al.*, 2006). La minería es uno de los

sectores que genera más residuos cianurados, ya que utiliza aproximadamente el 20% de la producción mundial de cianuro.

Los nitrilos son una forma de cianuro producidos tanto de forma natural como artificial en una gran variedad de industrias. Estos compuestos son utilizados como disolventes, productos farmacéuticos, plaguicidas y como intermediarios en la síntesis orgánica de aminas, amidas, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas y compuestos heterocíclicos (Banerjee *et al.*, 2002). Entre los nitrilos más ampliamente utilizados como herbicidas se encuentran los halobenzonitrilos (bromoxinilo, clorotalonilo, diclorobencilo e ioxinilo).

Como consecuencia del uso industrial tan extendido del cianuro se han registrado numerosos incidentes y desastres medioambientales, algunos de los cuales se presentan en la Tabla 3. Este tipo de acontecimientos han originado numerosas protestas de grupos ecologistas en contra de la utilización industrial del cianuro.

Tabla 3. Incidentes históricos producidos por residuos industriales cianurados.

Tipo	Año	Localización	Descripción
Derrames y fugas	1984	Bhopal (India)	Escape de isocianato de metilo en una fábrica de pesticidas propiedad de la compañía estadounidense Union Carbide. 30.000 muertos y 500.000 heridos.
	1995	Guyana	Derrame de más de 3,2 billones de litros de cianuro por el derrumbe de una presa en la mina de oro Omai.
	2000	Papúa Nueva Guinea	Derrame al océano de cianuro sódico procedente de la mina Lihir.
		Rumanía	Derrame de cianuro procedente de mina de oro cerca de Baia Mare en el noroeste de Rumanía.
		Guyana	Escape provocado de nuevo por la mina de oro Omai.
	2001	China	Derrame hacia el río Luohe de 11 toneladas de cianuro sódico.
		Ghana	Dos derrames en el mes de octubre, de miles de metros cúbicos de aguas contaminadas con cianuro y metales pesados procedentes de la ruptura de tanques en mina de oro.
	2002	Nevada (USA)	Dos derrames de 24.000 L y 40000 L de cianuro debido a la actividad de dos minas (Rawhide Mine y Twin Creeks).
	2003	Ghana	Derrame de cianuro producido por una mina de oro (Tarkwa).
		Nicaragua	Vertido de cianuro hacia el río Bambana procedente por una compañía minera canadiense (Hemconic).
		Oeste de Honduras	Gran derrame de cianuro hacia el río Lara procedente de la Mina de San Andrés.
		Norteamérica	Derrame procedente de la mina Briggs en Balleratt.

	2004	Ghana	Dos derrames de cianuro procedentes de minas de oro (Compañía canadiense "Bogoso Gold Limited" y "Prestea Sankofa Goldmine").	
		Australia	Dos derrames de cianuro y metales pesados a aguas subterráneas, procedentes "Kalgoorlie Gold".	
		Papua Nueva Guinea	Derrame producido en el desmantelamiento de la mina "Misima", filial de "Placer Dome".	
		China	Siete escapes de ácido cianhídrico procedentes de una mina de oro en Beijing (Huairou). Murieron tres personas y 15 fueron hospitalizadas.	
		Nueva Zelanda	Derrame de 180 litros de cianuro.	
		Rumanía	Derrame de 10 toneladas cianuro hacia el río Siret.	
	2005	Rumanía	Derrame procedente de explotación minera "Bursa" hacia el río Tisza.	
		Filipinas	Dos derrames de cianuro procedentes de la mina "Lafayette".	
		Laos	Derrame de cianuro procedente de la mina de oro "Phu Bia" perteneciente a una compañía australiana.	
		Ghana	Derrame al río Kubekro por una filial de "Bogoso Gold Limited".	
	2006	Ghana	Derrame de tanques de cianuro de "Bogoso Gold Limited".	
	Accidentes en el transporte	1998	Kyrcyzstan	Derrame durante el transporte de cianuro a la mina Kumtor en Kirguistán con casi dos toneladas de cianuro de sodio en las aguas superficiales locales, provocando 4 muertos y cientos de heridos.
		2000	Papúa Nueva Guinea	Derrame durante el transporte de cianuro de sodio, de la compañía minera australiana "Dome Resources" que contaminó un importante sistema acuático en la selva de Papúa Nueva Guinea.
		2002	Australia	Derrame de 400 litros de cianuro.
2003		Taiwán	Derrame durante el transporte, originando la hospitalización de más de 100 personas en el Condado de Taichung por el consumo de agua contaminada.	
Otros	1994	Sudáfrica	Muerte de 10 mineros por la ruptura de una presa en la mina de oro Harmony con la consecuente liberación de barro contaminado con cianuro.	
	2002	México	Secuestro en mina de 8 toneladas de cianuro.	
		Tejas (USA)	Se produjo el secuestro de camiones cargados con cianuro y se comprobó el robo de parte de este.	
	2003	Nueva York (USA)	Potencial ataque terrorista con ácido cianhídrico.	
2015	Tianjin (China)	Dos explosiones en una bodega en el puerto donde se almacenaban productos químicos peligrosos e inflamables como cianuro de sodio. Más de 100 muertos y cientos de heridos.		

5.2.1. El cianuro y la minería

Por sus características químicas el cianuro es capaz, en condiciones ligeramente oxidantes, de disolver el oro contenido en el mineral. El proceso de disolución de metales se denomina lixiviación, mientras que la disolución de oro por cianuro se denomina específicamente cianuración (Fig. 8). El primer trabajo bien documentado sobre la solubilidad del oro en soluciones de cianuro data de 1783 (Scheele, Suecia). La química oro-cianuro se estudió activamente a mediados del siglo XIX, alrededor de 1840, cuando George Richards Elkington (Inglaterra) desarrolló una patente aplicando el uso de soluciones de cianuro potásico en el electropulido del oro y la plata. En 1846 Elsner (Alemania) estudió la función del oxígeno en la disolución del oro mediante soluciones de cianuro, describiendo la “Ecuación de Elsner” (Reacción 4, Fig. 8). La primera planta de cianuración a escala industrial comenzó a funcionar en la Mina Crown (Nueva Zelanda) en 1889, y hacia 1904 los procesos de cianuración también estaban en marcha en Sudáfrica, Australia, Estados Unidos, México y Francia (Logsdon *et al.*, 1999). Por consiguiente, a comienzos del siglo XX el uso del cianuro en la extracción de oro a partir de las menas ya era una tecnología metalúrgica plenamente establecida. La industria del oro moderna utiliza cianuro casi exclusivamente como agente de lixiviación. A pesar de que se han intentado utilizar otros agentes complejantes como la tiourea, cloruros y otros haluros, la alta rentabilidad y disponibilidad del cianuro, así como la solubilidad de sus complejos metálicos hacen de este compuesto prácticamente el único agente lixivante que es utilizado en la extracción de oro y plata en la actualidad.

El proceso de extracción de oro comienza triturando y moliendo el mineral hasta partículas de un tamaño de menos de un milímetro de diámetro. En algunos casos una parte del oro puede ser recuperado de este material como partículas discretas de oro utilizando técnicas de separación por gravedad. La cianuración se puede llevar a cabo en tanque o en pila. La lixiviación en tanque es el método convencional de lixiviación de oro, en el cual el oro se lixivía directamente en tanques. En el proceso de lixiviación del oro en pila, el mineral triturado se coloca en grandes pilas a través de las cuales se hace gotear una solución de cianuro. Una vez disuelto por la acción del cianuro, el oro es recuperado de la disolución por precipitación con zinc o por adsorción a carbón activado granular (Mudder *et al.*, 2001). En algunos países en desarrollo, la minería artesanal a pequeña escala emplea una vieja técnica para la recuperación de oro que no utiliza cianuro. Esta técnica, denominada amalgama con mercurio, también entraña graves riesgos para el medioambiente y la salud de la población (Logsdon *et al.*, 1999).

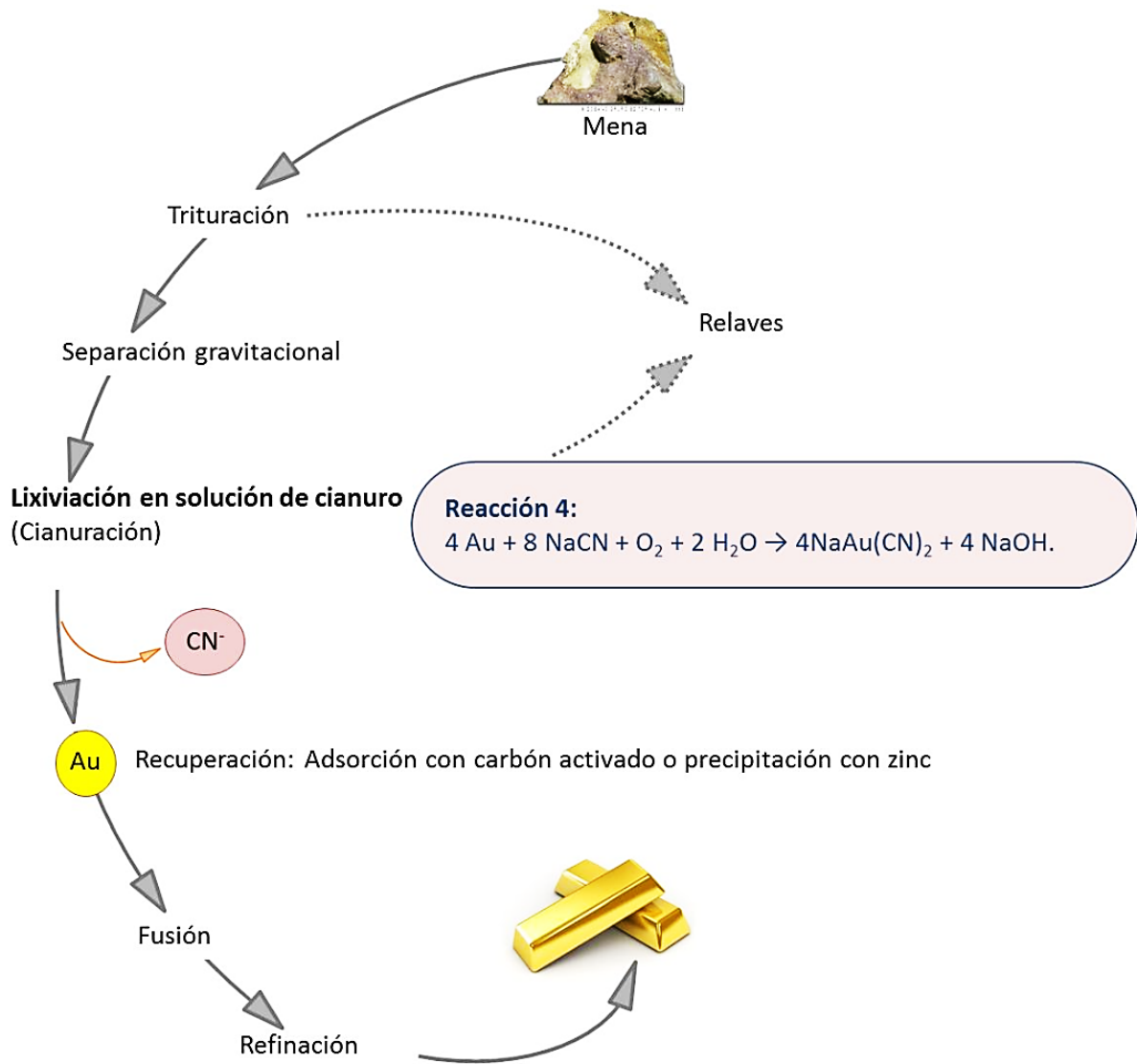


Figura 8. Producción de oro a partir del mineral mediante la utilización del proceso de cianuración. Las etapas del proceso de extracción del oro incluyen un paso de tratamiento con cianuro para la lixiviación de oro.

La frecuente utilización de cianuro en la minería ha provocado en varias ocasiones graves problemas de contaminación ambiental (Tabla 3). En enero del 2000, la rotura de una balsa minera situada en el noroeste de Rumanía (Baia Mare) provocó el vertido de aproximadamente 100.000 metros cúbicos de residuos cianurados al río Tisza, importante afluente del Danubio, originando la muerte de millones de peces y dañando gravemente el ecosistema existente en la zona. Este derrame, que afectó a más de 1.000 Km de los ríos Tisza y Danubio, es considerado por algunos especialistas como el mayor desastre medioambiental ocurrido en Europa después de la explosión en 1986 de la planta nuclear de Chernobil (Ucrania).

5.2.2. Utilización del cianuro en la joyería

La joyería es otra actividad industrial que utiliza frecuentemente cianuro, fundamentalmente en procesos de electropulido y galvanoplastia, en los que las piezas metálicas son abrillantadas o recubiertas por determinados metales (plata, oro, cromo, rodio, etc.) mediante una diferencia de potencial. Este tratamiento confiere a las piezas tanto motivos decorativos como características funcionales de gran valor, fundamentalmente resistencia a la corrosión, al ataque de sustancias químicas o a la fricción y el rayado. Como consecuencia de la gran cantidad de cianuro utilizado en estos procesos y de la escasa proporción de metal que es depositado en la pieza, esta actividad genera un residuo con elevadas concentraciones de cianuro y metales (Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, V, Au, etc.), lo que lo convierte en un residuo potencialmente peligroso para el medio ambiente y la salud humana. Debido a su elevada toxicidad, los residuos de la joyería son considerados por la normativa europea como residuos peligrosos.

En Córdoba, la joyería constituye una actividad industrial muy extendida y de gran importancia económica. Sin embargo, esta actividad genera un residuo cianurado cifrado en aproximadamente 4-5 toneladas al año. El elevado grado de clandestinidad y atomización de este sector hace suponer que el volumen real de residuo producido supera con creces la cantidad actualmente declarada, lo que conllevaría la existencia de vertidos de cianuro incontrolados. Además de los generados por la joyería, Gemasur S.L. gestiona en Córdoba 20 toneladas/año de residuos cianurados producidos por la industria aeronáutica y metalúrgica. Todos los residuos cianurados recogidos por esta empresa son posteriormente enviados a gestores finales en países como Holanda, Bélgica y Alemania, donde son eliminados mediante incineración. Según datos de la Consejería de Medio Ambiente la producción declarada de residuos peligrosos conteniendo cianuros inorgánicos en esta comunidad autónoma ronda las 40 toneladas anuales, y son generados principalmente por la industria química y los sectores de la metalurgia, la empresa textil, de la madera y muebles, de cueros e industrias diversas. En cuanto a los cianuros orgánicos, no se suelen superar las 8 toneladas de residuos conteniendo este tipo de contaminantes. De estos informes que la Junta de Andalucía elabora anualmente se desprende que Huelva es la provincia andaluza que mayor cantidad de residuos cianurados producidos declara (Luque-Almagro, 2005).

6. Tratamientos de eliminación de cianuro

La elevada toxicidad del cianuro obliga a que los residuos industriales que contienen este compuesto sean sometidos a un tratamiento de descontaminación. Actualmente existen diversos procedimientos de eliminación de cianuro, los cuales se pueden clasificar en técnicas físico-químicas y en tratamientos biológicos. Si bien los métodos físico-químicos han sido frecuentemente utilizados desde hace mucho tiempo, el aislamiento de microorganismos cianotrofos y el estudio del metabolismo del cianuro en estos organismos está posibilitando la aplicación de técnicas de biorremediación. Los distintos tratamientos se basan en la separación y reutilización del cianuro o bien en su destrucción y conversión en productos menos tóxicos.

6.1. Tratamientos físico-químicos

Los residuos cianurados son descontaminados a menudo mediante tratamientos físico-químicos (Tabla 4). Sin embargo, estos tratamientos incluyen técnicas que suelen ser efectivas solamente con cianuro libre y complejos cianuro-metálicos débiles, siendo difícil la eliminación del cianuro unido fuertemente a metales. Los métodos físico-químicos de eliminación de cianuro se basan fundamentalmente en la estabilización y en la oxidación química (Tabla 4). La estabilización es un proceso donde se mezclan diversos reactivos con el cianuro para minimizar tanto su velocidad de migración como su toxicidad. Estos métodos tienen la ventaja de que recuperan el cianuro y puede volver a reutilizarse. Los métodos más usados para la eliminación del cianuro son los basados en procesos oxidativos, que transforman el cianuro a compuestos menos tóxicos mediante la adición de un agente oxidante. A diferencia de los métodos de estabilización, la oxidación química destruye el cianuro e imposibilita su reutilización.

Tabla 4. Tratamientos físico-químicos de eliminación de cianuro.

	Método		Observaciones
	ESTABILIZACIÓN	Adsorción mediante carbón activado	
Precipitación de cianuro libre		-Adición de un exceso de hierro. -Formación de azul de Prusia, KFe[Fe(CN) ₆].	
Intercambio iónico		Complejos cianuro-metálicos Resinas de intercambio aniónico	
OXIDACIÓN QUÍMICA	Método	Reacciones	Observaciones
	Cloración alcalina	$\text{NaCN} + \text{Cl}_2 \rightarrow \text{CNCl} + \text{NaCl}$	Método más antiguo
		$\text{CNCl} + 2 \text{NaOH} \rightarrow \text{NaCNO} + \text{H}_2\text{O} + \text{NaCl}$	Requiere pH básico
	Ozonización	$\text{NaCN} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NaCNO} + \text{O}_2$	Elevado coste
	Peróxido de hidrógeno	$\text{NaCN} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{NaCNO} + \text{H}_2\text{O}$	Utiliza Cu como catalizador
Dióxido de azufre	$\text{NaCN} + \text{SO}_2 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaCNO} + \text{H}_2\text{SO}_4$		

El cianuro puede ser tratado con clorina o hipoclorito para producir cloruro de cianógeno, que en condiciones alcalinas reacciona para formar cianato sódico, mucho menos tóxico, que posteriormente se oxida mediante cloración, dando lugar a dióxido de carbono y nitrógeno. Aunque este método es muy eficiente en la eliminación de cianuro de aguas contaminadas, presenta importantes inconvenientes. La cloración no es efectiva en complejos de cianuro con algunos metales como níquel o plata. Además, este método produce lodos, que requieren licencias para su eliminación. Otra desventaja es su elevado coste, debido a la gran cantidad de clorina que se necesita en el proceso. Además, si la clorina se adiciona en exceso, incrementa el contenido de sólidos en el agua, lo que imposibilita su reciclaje, ya que resulta tóxica para los organismos acuáticos (Rajesh *et al.*, 2008).

Otros métodos incluyen la oxidación por peróxido de hidrógeno, catalizada por cobre, la ozonación, la descomposición electrolítica, etc. Sin embargo, éstos requieren equipos y mantenimientos que resultan muy caros. Los múltiples inconvenientes que presentan los métodos físico-químicos hacen necesario el desarrollo de otros métodos más baratos y menos dañinos para el medio ambiente. Una alternativa consiste en la eliminación biológica del cianuro.

6.2. Tratamientos biológicos

Los tratamientos biológicos de eliminación de cianuro se basan en la resistencia desarrollada por algunos microorganismos a este tóxico y a su capacidad metabólica de asimilar este compuesto. La biodegradación de cianuro presenta una serie de ventajas con respecto a los tratamientos físico-químicos, como su bajo coste, la escasa infraestructura requerida, la alta eficiencia, la no utilización ni generación de compuestos tóxicos y la posibilidad de tratamiento *in situ*. Como desventaja, la alta estabilidad química de algunos complejos cianuro-metálicos imposibilita en muchos casos su biodegradación, además, es necesario que esta se desarrolle en condiciones alcalófilas para evitar la volatilización del mismo en forma de ácido cianhídrico (HCN). Durante los últimos años el uso creciente de microorganismos inmovilizados en técnicas de biorremediación está permitiendo desarrollar procesos cada vez más eficaces y menos costosos (Luque-Almagro, 2005). A pesar de que la biotecnología supone una alternativa atractiva a los tratamientos físico-químicos, su aplicación ha sido muy escasa hasta el momento. Esto se debe principalmente a que los residuos industriales cianurados suelen ser mezclas complejas de contaminantes muy tóxicos y diversos (amonio, fenol, cianato, tiocianato, metales, etc.) que pueden interferir en el proceso de bioeliminación de cianuro. No obstante, en los últimos años se están llevando a cabo estudios de biodegradación de cianuro, tanto a escala de laboratorio como utilizando

biorreactores, con aguas residuales cianuradas de las industrias de gasificación del carbón, alimentaria (de la yuca), siderúrgica y minera. Uno de los sectores industriales donde estas prácticas son más habituales es la minería. El primer tratamiento biológico de eliminación de cianuro a escala industrial se llevó a cabo hace 20 años en Estados Unidos, en la mina Homestake. El proceso, desarrollado por Mudder y Whitlock en 1984, consta de varios pasos: a) biodegradación de cianuro de forma oxidativa por un cultivo mixto formado por varias especies de *Pseudomonas*, b) eliminación de metales mediante adsorción y c) oxidación del amonio formado durante la degradación de cianuro por bacterias nitrificantes. La degradación biológica de cianuro resultó ser más barata que el tratamiento químico con H_2O_2 utilizado previamente en dicha mina, ya que bajaron en un 60% los costes de capital y en un 29% los costes operativos (Luque-Almagro, 2005).

Además de la creación de plantas de biodegradación de cianuro, algunas empresas biotecnológicas han lanzado al mercado productos biológicos (células enteras o enzimas purificadas) destinados a la descontaminación de residuos cianurados. Una de estas empresas, “Novo Industries”, comenzó a comercializar hace algunos años, con el nombre de “CYANIDASE”, preparaciones de la estirpe *Alcaligenes xylosoxidans* subs. *denitrificans* capaces de degradar cianuro (Luque-Almagro, 2005).

Si bien en algunos casos se han desarrollado tratamientos de eliminación de cianuro basados en la fitorremediación, la mayoría de los procesos de biodegradación emplean microorganismos que tienen la capacidad de utilizar el cianuro como fuente de nitrógeno (Luque-Almagro, 2005a). Hasta el momento se han descrito cuatro tipos de rutas por las que el cianuro es asimilado: hidrolíticas, oxidativas, reductivas y de transferencia/sustitución (Fig. 9).

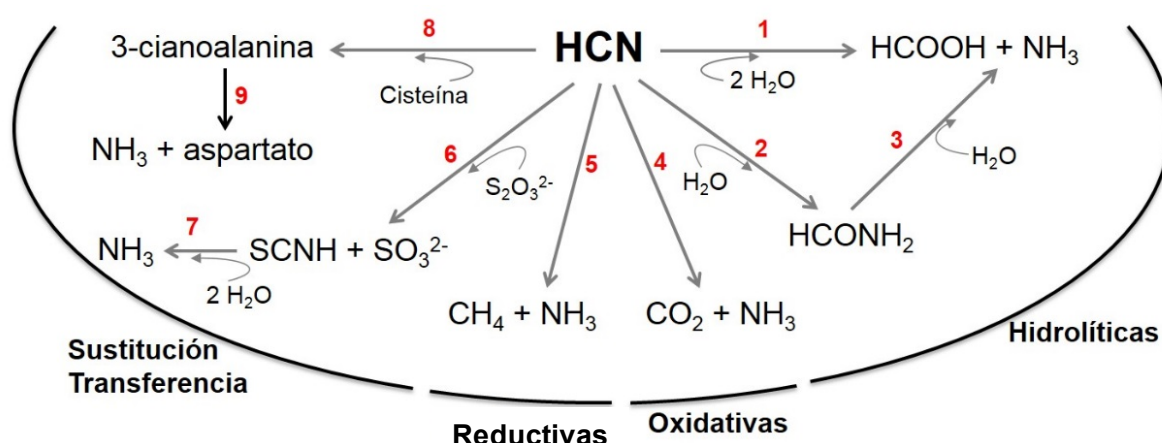


Figura 9. Rutas metabólicas de asimilación de cianuro. Las reacciones enumeradas en la figura están catalizadas por las siguientes enzimas: 1, cianidasa; 2, cianuro hidratasa; 3, formamidasa; 4, cianuro dioxigenasa; 5, nitrogenasa; 6,

rodanasa; 7, tiocianato hidrolasa; 8, 3-cianoalanina sintasa; 9, nitrilasa o nitrilo hidratasa/amidasa (Ebbs, 2004; Luque-Almagro *et al.*, 2011a).

En las reacciones oxidativas de degradación de cianuro se genera amonio y dióxido de carbono por la acción de una cianuro dioxigenasa. Aunque en diversas revisiones se ha sugerido la existencia de una segunda reacción oxidativa de asimilación de cianuro catalizada por una cianuro monooxigenasa, capaz de producir cianato, esta reacción nunca ha sido demostrada experimentalmente. Respecto a la ruta reductiva de asimilación de cianuro, este compuesto se ha descrito como un sustrato más, junto al N_2 y otros, de la nitrogenasa. Esta enzima, cuando utiliza cianuro como sustrato, produce amonio y metano como productos. En las rutas de sustitución/transferencia se han descrito dos intermediarios de la asimilación de cianuro, el tiocianato y la 3-cianoalanina. El tiocianato puede producirse *in vivo* por la acción de la enzima rodanasa, una tiosulfato-cianuro sulfotransferasa. Esta forma cianurada puede ser posteriormente degradada a amonio y dióxido de carbono o a amonio y sulfuro de carbonilo ($O=C=S$), reacción en este último caso catalizada por la enzima tiocianato hidrolasa (Ebbs, 2004; Luque-Almagro *et al.*, 2011a).

Las reacciones de hidrólisis están catalizadas principalmente por una cianuro hidratasa, que produce formamida como intermediario, o una cianidasa (cianuro dihidratasa), generándose en ambos casos ácido fórmico y amonio como productos. La cianuro hidratasa es propia, fundamentalmente, de hongos, y está muy conservada entre especies, mientras que la cianidasa es principalmente bacteriana. Mediante un mecanismo hidrolítico similar al que desarrollan estas dos enzimas actúan también otras dos enzimas que utilizan cianuros orgánicos (nitrilos; R-CN) como sustratos, las nitrilasas y las nitrilo hidratasas. Muchos de los nitrilos producidos de forma natural o artificial son altamente tóxicos, y a diferencia del cianuro inorgánico, además son mutagénicos y carcinogénicos. Por lo tanto, la hidrólisis enzimática de estos compuestos es un método eficaz no sólo para la producción de un amplio espectro de amidas y ácidos carboxílicos útiles para determinados procesos industriales, sino también para la biorremediación de residuos industriales ricos en cianuros orgánicos.

La degradación de nitrilos tiene tanto una función de destoxificación como de asimilación de nitrógeno a través de amonio, fundamentalmente en bacterias. En plantas los nitrilos están presentes en numerosas rutas, incluyendo procesos de biosíntesis de cianolípidos y glicósidos cianogénicos, así como en la degradación de glucosinolatos y destoxificación de cianuro. Las nitrilasas (EC 3.5.5.1) convierten los nitrilos en sus correspondientes ácidos carboxílicos y amonio, con la liberación ocasional de amidas, mientras que las nitrilo hidratasas (EC 4.2.1.84) catalizan la formación de las correspondientes

amidas a partir de nitrilos, y estas a su vez son hidrolizadas por amidasas (EC 3.5.1.4) a ácidos carboxílicos y amonio (Fig. 10).

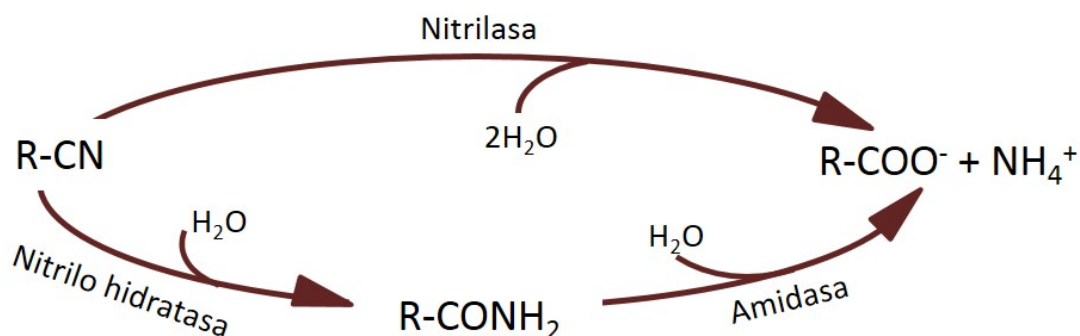


Figura 10. Degradación biológica de nitrilos. Los nitrilos pueden ser transformados biológicamente a amonio de forma directa, por la acción de una nitrilasa, o a través de un intermediario, por la acción consecutiva de una nitrilo hidratasa y una amidasa.

Las nitrilasas han sido objeto de numerosos estudios debido a su posible aplicación en biocatálisis de químicos e intermediarios farmacéuticos, así como en los tratamientos de efluentes tóxicos (Gong *et al.*, 2012), por lo que su mecanismo de acción ha sido elucidado en detalle. Desde que se descubriera la primera nitrilasa en la década de los 60 se han identificado numerosas nitrilasas en una amplia variedad de organismos, incluyendo bacterias, hongos filamentosos, levaduras y plantas (Tabla 5). Muchos de estos organismos han sido usados como fábricas biológicas para la producción de ácidos carboxílicos a partir de nitrilos a escala industrial. La primera bacteria capaz de metabolizar nitrilos que se estudió se identificó dentro del género *Pseudomonas*, y posteriormente esta actividad se ha identificado en bacterias pertenecientes a otros géneros como *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* y *Corynebacterium*. Numerosas nitrilasas han sido clonadas, sobreexpresadas y purificadas, e incluso usadas en procesos industriales.

Por otra parte, las nitrilo hidratatasas, también están ampliamente distribuidas en procariontas (proteobacterias, actinobacterias, cianobacterias y firmicutes). Las nitrilo hidratatasas de procariontas constan de dos subunidades (α y β), codificadas por genes separados. La subunidad α posee un dominio conservado de unión a metal (hierro o cobalto), jugando dichos iones un papel crucial en la reacción catalítica. Los genes codificantes de las subunidades α y β , se encuentran presentes también en el genoma de algunos eucariotas (Tabla 5), en los que están parcialmente fusionados. Además, estudios recientes han demostrado la existencia de dichos genes en el último ancestro común a todos los eucariotas (Marron *et al.*, 2012).

Tabla 5. Organismos capaces de degradar nitrilos (Gong *et al.*, 2012; Marron *et al.*, 2012).

Organismos con actividad nitrilasa	
Bacterias	<i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> <i>Acinetobaeter sp.</i> , <i>A. faecalis</i> <i>Nocardia sp.</i> , <i>N. globerula</i> <i>Brevibacterium strain</i> <i>Rhodococcus rhodochrous</i> , <i>R. erythropolis</i> <i>Comamonas testosteroni</i> <i>Klebsiella ozaenae</i> <i>Bacillus pallidus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> <i>Pyrococcus abyssi</i> <i>Acidovorax facilis</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Halomonas nitrilicus</i> <i>Alcaligenes sp.</i> <i>Streptomyces sp.</i> <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> <i>Geobacillus pallidus</i>
Hongos filamentosos	<i>Penicillium sp.</i> <i>Gibberella sp.</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. niger K1</i> <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i>
Levaduras	Especies de los géneros: <i>Candida</i> , <i>Pichia</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Debaryomyces</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Williopsis</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Aureobasidium</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Rhodotorula</i>
Plantas	<i>Brassica rapa</i> , <i>Sinapis alba</i> , <i>S. arvensis</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Brassicaceae</i> , <i>Lotus japonicus</i>
Organismos con actividad nitrilo hidratasa	
Bacterias	Especies de los géneros: <i>Proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> , <i>Cyanobacteria</i> y <i>Firmicutes</i>
Protozoos coanoflagelados	<i>Monosiga brevicollis</i> , <i>Salpingoeca rosetta</i> , <i>Stephanoeca diplocostata</i>
Protistas	<i>Thecamonas trahens</i> , <i>Bigelowiella natans</i>
Algas	<i>Aurecococcus anophagefferens</i> , <i>Emiliana huxleyi</i> , <i>Fragilariopsis cylindrus</i> .
Plantas	<i>Salix arctica</i>

Las nitrilasas son miembros de una superfamilia que comprende 13 clases de enzimas diferentes que muestran una significativa homología estructural. En esta superfamilia se incluyen nitrilasas microbianas (nitrilasas, cianuro dihidratadas y cianuro hidratadas), amidasas alifáticas, amidohidrolasas y aciltransferasas con diferentes especificidades de sustratos. Se conocen alrededor de 200 secuencias de nitrilasas. Además, la actividad de hidrólisis de nitrilos se ha identificado en 40 especies distintas de microorganismos que incluyen bacterias y levaduras. Estructuralmente la mayoría de nitrilasas tienen una subunidad de 30 a 45 kDa que se asocia para formar oligómeros de 4 a 22 subunidades, o espirales activas de longitud variable. Las excepciones son la nitrilasa de 76 kDa de *Fusarium solani*, las nitrilasas monoméricas de *Arthrobacter sp.* cepa J1, y la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 (Thuku *et al.*, 2009).

En base a los sustratos usados, las nitrilasas se pueden agrupar en tres categorías: nitrilasas aromáticas, nitrilasas alifáticas y arilacetonnitrilasas. Las primeras tienen una elevada afinidad por nitrilos aromáticos y heterocíclicos, y están presentes sobre todo en bacterias y hongos. La mejor caracterizada es la nitrilasa de *Rhodococcus rhodochrous* J1. Existe una amplia variedad en cuanto al sustrato se refiere, así las enzimas de *R. rhodochrous* J1 y *Rhodococcus* NCIMB 11216 (antiguamente *Nocardia*) podrían hidrolizar acrilonitrilo y propionitrilo, respectivamente, una vez estas enzimas han sido activadas por benzonitrilo. Aunque las nitrilasas alifáticas bacterianas son capaces de hidrolizar benzonitrilo, la velocidad de hidrólisis de este sustrato es mínima en comparación con la de nitrilos alifáticos. Estas enzimas están más extendidas en plantas y bacterias. Por último, las arilacetonnitrilasas son generalmente enzimas enantioselectivas que muestran actividad con benzonitrilo y, en ocasiones, con nitrilos alifáticos. En particular, las pertenecientes a *Pseudomonas fluorescens* EBC191 pueden convertir 2-acetoxibutanonitrilo a su correspondiente ácido, mostrando mayor especificidad que la nitrilasa alifática de *Synechocystis* sp. 6803 (Thuku *et al.*, 2009).

El mecanismo de degradación de nitrilos vía nitrilasa se encuentra muy conservado en bacterias y plantas. Por ejemplo, la nitrilasa NIT4 codificada por el gen *pinA*, cataliza la hidrólisis de 3-cianoalanina, un nitrilo muy común en el entorno de algunas plantas. Así, en plantas, el cianuro sería convertido en 3-cianoalanina, que posteriormente se destoxificaría por acción de una nitrilasa a ácido aspártico y amonio, usando la enzima NIT4. Por otra parte, se ha comprobado que el gen *pinA* de la especie bacteriana *Pseudomonas fluorescens* SBW25 también se induce en presencia de β -ciano-L-alanina, así como por cianuro y cisteína, precursores de ésta (Howden *et al.*, 2009). Así, de todas las rutas de degradación de cianuro descritas hasta el momento, sólo en esta participan el nitrilo 3-cianoalanina como intermediario, formado por la acción de una 3-cianoalanina sintasa en una reacción de adición a partir de cianuro y serina o glicina. En algunos casos se ha descrito también la producción de asparagina, lo que indica que esta nitrilasa podría tener también actividad nitrilo hidratasa/amidasa. La 3-cianoalanina se identificó por primera vez en 1962 en la leguminosa *Vicia faba* como probable toxina causante de latirismo y posteriormente en otras plantas, entre las que se encuentran *Lupinus angustifolius*, *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa* y la briofita *Physcomitrella patens* y en bacterias tales como *Cromobacterium violaceum*, varias especies del género *Pseudomonas*, así como las bacterias acianogénicas *Bacillus magaterium* y *E. coli*. En esta ruta, la 3-cianoalanina sintasa, reemplaza el grupo tiol de la cisteína por el cianuro. Dicha enzima fue catalogada inicialmente como hidratasa, pero años más tarde se determinó una actividad nitrilasa en las mismas semillas (*Lupinus angustifolius*), que por acción de la misma enzima, da lugar tanto a asparagina como a aspartato y

amonio a partir de nitrilo. La enzima posee cuatro veces más actividad hidratasa, de ahí que no se detectase actividad nitrilasa en un principio. El gen que codifica dicha nitrilasa es homólogo a *nit4* de las 3-cianoalanina nitrilasas/hidratasas de *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum* y *Oryza sativa*, entre otros. Los genes *nit4* forman un grupo ancestral en las plantas superiores que se ha diversificado, dando lugar a otras nitrilasas. Las plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *nit4* aumentan la resistencia este compuesto, mientras que los mutantes son más sensibles. El hecho de que el gen no sea esencial para el crecimiento pero no se haya perdido en la evolución, indica que juega un papel importante en el metabolismo del organismo. En el caso de bacterias, diferentes moléculas pueden ser usadas como andamio para unir el cianuro originando β -cianoalanina. Cisteína, cistina, *o*-acetilserina o serina, entre otras, pueden proporcionar el sustrato de tres átomos de carbono para ser utilizado en estas reacciones de sustitución mediadas por piridoxal fosfato. La enzima responsable en la mayoría de los casos es la cisteína sintasa. Sin embargo, se ha purificado una enzima con actividad 3-cianoalanina sintasa a partir de *Cromobacterium violaceum*, relacionada específicamente con la síntesis de 3-cianoalanina (Piotrowski *et al.*, 2001; Acera-Hernández, 2011). Además de la 3-cianoalanina como intermediario de la asimilación de cianuro, recientemente se ha descrito también la formación de un α -hidroxinitrilo (cianhidrina), durante la utilización de cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2011b).

Si bien en la mayoría de los casos los genes que codifican las nitrilasas se encuentran localizados en ambientes génicos no conservados, los homólogos del gen *nitC* sí se localizan en una agrupación génica conservada, denominada *nit1C* (Fig. 11). A pesar de que la agrupación *nit1C* está ampliamente distribuida en determinados microorganismos, hasta el momento no se le ha asignado una función fisiológica (Podar *et al.*, 2005).

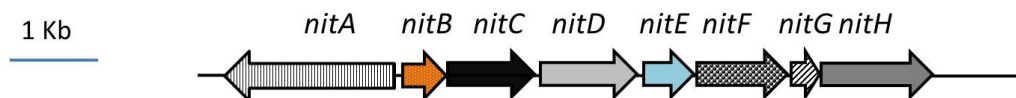


Figura 11. Agrupación génica *nit1C* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. *nitA*, regulador transcripcional con GAF, dominio de unión a ATPasa; *nitB*, función desconocida; *nitC*, nitrilasa; *nitD*, miembro de la familia S-adenosilmetionina (SAM); *nitE*, N-acetiltransferasa relacionada con GCN-5; *nitF*, miembro de la familia AIRS (también llamada GARS); *nitG*, función desconocida; *nitH*, flavina oxidorreductasa dependiente de NADH.

6.2.1. Metabolismo del cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

La estirpe *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 se aisló mediante técnicas de enriquecimiento con cianuro a partir de lodos recolectados del río Guadalquivir a su paso por Córdoba (España). Esta cepa bacteriana se caracteriza por crecer en condiciones alcalinas con cianuro como única fuente de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2005a, b; Huertas *et al.*, 2006), lo que evita la volatilización del cianuro como HCN y la convierte en un potencial candidato a ser usado en procesos de biorremediación y biodegradación de cianuro. Estudios previos realizados en la estirpe CECT5344 han permitido caracterizar en gran medida la asimilación de cianuro en este organismo, el cual también asimila otras formas cianuradas como el cianato, complejos cianuro-metálicos, nitrilos y otros cianoderivados naturales o artificiales. El cianuro induce en este microorganismo una oxidasa alternativa resistente a cianuro, la cual ha sido caracterizada por Quesada *et al.* (2007). La capacidad de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 de asimilar el cianuro de residuos procedentes de la industria joyera ricos en metales y de acumular PHA, polímeros utilizados para la fabricación de bioplásticos (Manso *et al.*, 2015) le confiere a este organismo un gran potencial biotecnológico para su aplicación en procesos de descontaminación de residuos industriales cianurados. Otras aplicaciones biotecnológicas de este microorganismo han sido desarrolladas mediante la utilización de la enzima cianasa, que ha sido purificada, inmovilizada y aplicada en la construcción de un biosensor de cianato (Luque-Almagro *et al.*, 2003).

La acumulación de amonio en medios con cianuro y en presencia de L-metionina-D,L-sulfoxina, un inhibidor de la glutamina sintetasa, demostró que la degradación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es un proceso asimilador (Luque-Almagro *et al.*, 2005b). La inducción de la cianasa por cianuro sugirió inicialmente la presencia de una ruta oxidativa de asimilación de cianuro en este organismo, pero sin embargo un mutante defectivo en la actividad cianasa capaz de asimilar cianuro descartó esta hipótesis (Luque-Almagro *et al.*, 2008). Posteriormente, se ha descrito que durante la asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 una malato:quinona oxidorreductasa (MQO) asociada a una oxidasa alternativa insensible a cianuro, permite acumular y excretar un α -cetoácido, identificado como oxalacetato, que reacciona químicamente con el cianuro formando un 2-hidroxinitrilo o cianhidrina (Luque-Almagro *et al.*, 2011b) (Fig. 12).

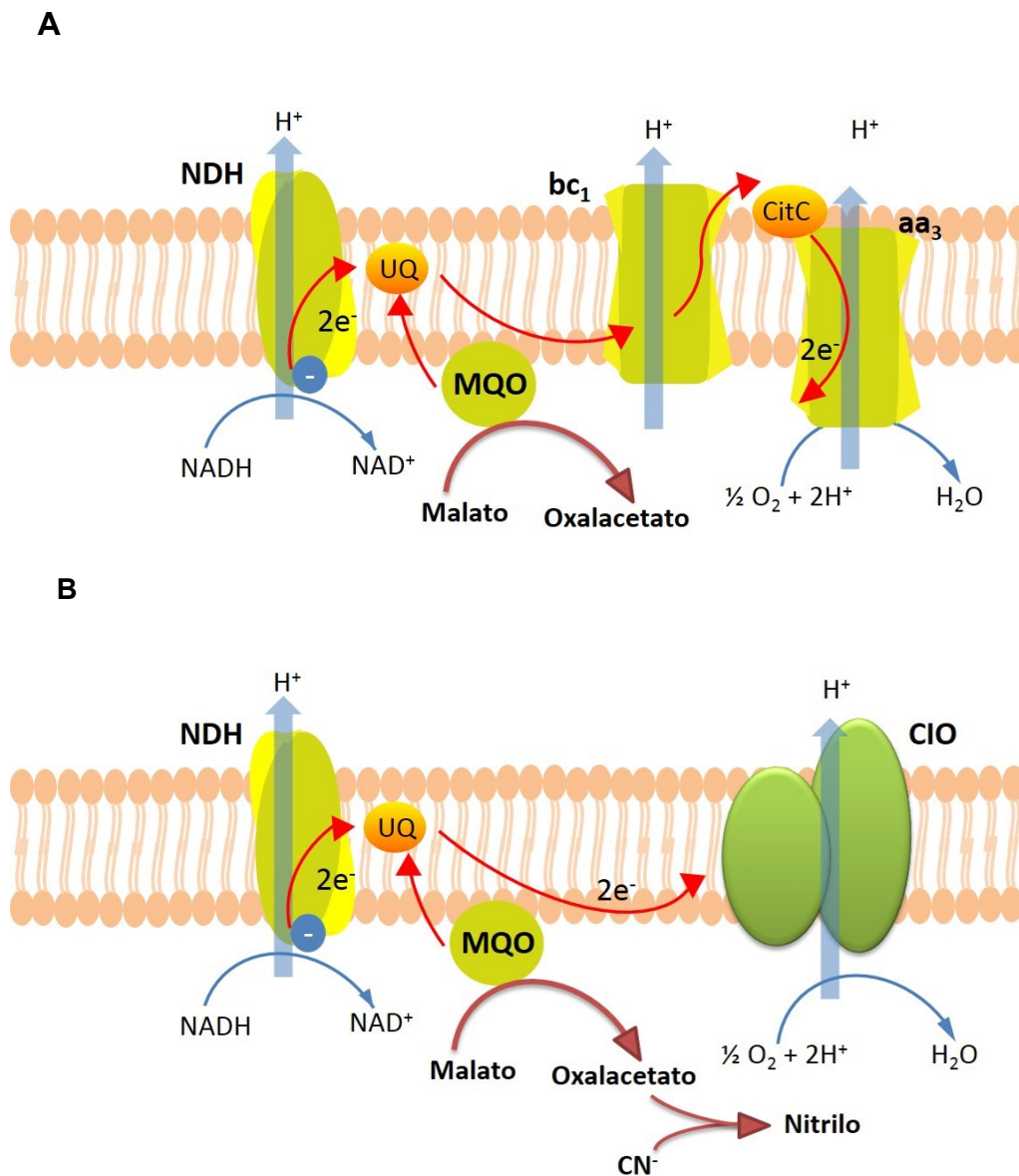


Figura 12. Componentes de la cadena de transporte de electrones en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. En ausencia (A) o presencia (B) de cianuro. La degradación de cianuro incluye la producción temprana de oxalacetato debido a la inducción del ciclo glioxilato y el sistema de respiración insensible a cianuro, a través de la oxidasa alternativa CIO. Abreviaturas: CIO, oxidasa insensible a cianuro; NDH, NADH: ubiquinona oxidorreductasa (Complejo I); citC citocromo C; bc_1 ubiquinona citocromo C oxidorreductasa (Complejo III); aa_3 , citocromo oxidasa (complejo IV); MQO, malato:quinona oxidorreductasa; UQ, ubiquinol/ubiquinona (modificado de Luque-Almagro *et al.*, 2011b).

6.2.2. Genómica y proteómica de la asimilación de cianuro

Las técnicas de secuenciación de DNA han evolucionado de forma exponencial en los últimos años, lo que ha permitido secuenciar un elevado número de genomas, fundamentalmente bacterianos. La genómica ha

confirmado la enorme versatilidad metabólica presente en procariontes, un hecho contrastado previamente mediante diversos estudios no genómicos. Esta versatilidad metabólica es la base de los procesos de biorremediación, permitiendo a estos microorganismos asimilar y transformar una amplia variedad de compuestos químicos bajo diferentes condiciones ambientales. Cabe destacar la excepcional diversidad y adaptabilidad de las bacterias del género *Pseudomonas*, el cual contribuye de forma importante a un elevado número de procesos biodegradativos (Wasi *et al.*, 2013). Hasta el momento se han secuenciado 520 estirpes del género *Pseudomonas*, las cuales se incluyen en 49 especies (según NCBI). Entre estos organismos se incluyen estirpes capaces de degradar diversos compuestos tóxicos como nitroaromáticos, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, colorantes azoicos, etc (Esteve-Núñez *et al.*, 2001; Lalucat *et al.*, 2006; Puvaneswari *et al.*, 2006). Actualmente existen dos estirpes de *Pseudomonas* capaces de asimilar cianuro cuyo genoma ha sido secuenciado. El primer organismo cianotrófico secuenciado fue *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014), y posteriormente se secuenció la estirpe asimiladora de cianuro *P. fluorescens* NCIMB 11764 (Vilo *et al.*, 2012). Además, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y *P. pseudoalcaligenes* KF707 son las dos únicos miembros de la especie *P. pseudoalcaligenes* secuenciados hasta el momento, si bien actualmente existen otros dos proyectos de secuenciación en marcha, los correspondientes a las estirpes de *P. pseudoalcaligenes* MTCC 5210 (Project ID. 20259; Central leather Research Institute) y NBRC 14167 (BioProject Accession PRJDB224; National Institute of Technology and Evaluation).

La proteómica es una técnica ampliamente utilizada en el estudio del efecto que distintos factores medioambientales pueden ejercer sobre el proteoma de un organismo. A pesar del potencial de esta metodología, la disponibilidad de datos genómicos limita la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas. Un estudio proteómico llevado a cabo con *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha revelado que el cianuro induce, además de una respiración resistente a cianuro, una compleja respuesta que implica mecanismos de homeostasis de hierro, resistencia a estrés oxidativo y regulación del metabolismo del nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2007).

Objetivos

Los principales objetivos de la tesis doctoral fueron:

1. Análisis proteómico de la bacteria cianotrofa *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta a cianuro.
2. Caracterización bioquímica de la ruta de asimilación de cianuro y sus derivados en la estirpe silvestre y en estirpes mutantes afectadas en el proceso de asimilación de cianuro.
3. Secuenciación, análisis y estudio comparativo del genoma de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344.

Materiales y Métodos

1. Material biológico

El microorganismo objeto de estudio en este trabajo ha sido la bacteria alcalófila *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro, 2005). El resto de microorganismos utilizados también se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Estirpes bacterianas usadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344		
Silvestre	Resistente a ácido nalidíxico	Luque-Almagro, 2005
NitA⁻	Mutante en el gen <i>nitA</i> (Kan ^R)	Estepa <i>et al.</i> , 2012
NitB⁻	Mutante en el gen <i>nitB</i> (Gen ^R)	Estepa <i>et al.</i> , 2012
NitC⁻	Mutante en el gen <i>nitC</i> (Gen ^R)	Estepa <i>et al.</i> , 2012
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	Lac ⁻ , huésped para plásmidos con el gen <i>lacZ</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
S17-1	Tra ⁺ , huésped para plásmidos movilizables <i>mob</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983

2. Medios y condiciones de cultivo

2.1. Medios

El medio rico de crecimiento utilizado para *E. coli* y *P. pseudoalcaligenes* fue el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989). Para *Pseudomonas* se utilizó el medio mínimo M9, descrito por Maniatis *et al.* (1982), en el que se varió la fuente de nitrógeno según el experimento.

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

Los antibióticos específicos de cada estirpe se añadieron una vez enfriados los medios estériles, a las concentraciones y en los disolventes que se especifican en la Tabla 7.

Tabla 7. Antibióticos utilizados

Antibiótico	Concentración en la solución stock (mg·mL ⁻¹)	Concentración en el medio (µg·mL ⁻¹)	Disolvente
Ampicilina (Ap)	100	100	H ₂ O
Kanamicina (Km)	25	25	H ₂ O
Gentamicina (Gm)	20	20	H ₂ O
Ác. nalidíxico (Nx)	10	10	NaOH (0,1 M)

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

Para la selección de las colonias en base a la expresión del gen de la β-galactosidasa, en la estirpe DH5α de *E. coli*, se empleó medio sólido LB suplementado con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 55 mg·L⁻¹ y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal) a una concentración de 40 mg·L⁻¹, añadidos al medio estéril antes de que solidificara.

2.2. Condiciones de cultivo

P. pseudoalcaligenes CECT5344 se cultivó aeróbicamente a 30 °C y con una agitación constante de 220 rpm, proporcionada por un incubador orbital refrigerado New Brunswick Scientific C24 (Edison, NJ-USA). Se emplearon matraces Erlenmeyer de 0,1 L y 2 L de capacidad, llenos hasta un 25% y 20% de su capacidad, respectivamente. Dichos matraces se cerraron con algodón hidrófobo estéril.

Para realizar las curvas de crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en presencia de cianuro, las células se precultivaron en medio M9 con 50 mM de acetato sódico y 2 mM de NH₄Cl. Transcurridas 24 h, cuando se consumió todo el amonio, se añadió 2 mM de NaCN, considerándose ese momento el tiempo cero de la curva de crecimiento.

2.3. Síntesis de cianhidrinas

Las cianhidrinas utilizadas se sintetizaron *in vitro* en medio mínimo M9 mezclando el 2-oxoácido correspondiente 200 mM y NaCN 10 mM. Dicha solución se mantuvo en agitación durante 15 min y se midió la desaparición de CN⁻ mediante la determinación de la concentración de cianuro para comprobar la correcta síntesis.

3. Determinaciones analíticas

3.1. Medida del crecimiento celular

El crecimiento de la bacteria se determinó por turbidimetría midiendo la absorbancia a 600 nm.

3.2. Determinación de la concentración de cianuro

La concentración de cianuro se determinó siguiendo el método de Asmus y Garschagen (1953). A 2,5 mL de muestra, convenientemente diluida se le añadió 0,1 mL de cloramina T al 1% (p/v) y se incubó durante 1 min, transcurrido ese tiempo se añadieron 0,3 mL del reactivo B, compuesto por 3 g de ácido barbitúrico, 15 mL de piridina, 3 mL de HCl y agua hasta 50 mL. A los 8 min se midió la absorbancia a 578 nm, interpolando el valor obtenido en una recta patrón realizada con NaCN.

3.3. Determinación de la concentración de amonio

Para determinar la concentración de amonio se utilizó el método de medida descrito por Solorzano (1969), según el cual se usaron 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 disuelto en agua al 0.5%. Se conservó en una botella protegida de la luz durante no más de un mes.
- 3) Reactivo C: Solución alcalina. Se disolvieron 10 g de citrato trisódico y 0,5 g de hidróxido de sodio en 50 mL de agua.
- 4) Reactivo D: Solución de hipoclorito sódico. Se diluyó 1 mL de hipoclorito sódico con 7 mL de agua. Esta solución se descompone lentamente con lo que fue revisada periódicamente.
- 5) Reactivo E. Solución oxidante. Este reactivo se preparó en el momento de su uso, para ello se mezclaron 20 mL del reactivo C con 5 mL del reactivo D.

Para llevar a cabo la medida, se mezclaron 100 μ L de muestra con 2,7 mL de agua y posteriormente se le añadieron los reactivos A, B y E (0,2 mL de A y B; 0,5 mL de E). Tras una hora y media se midió la absorbancia a 640 nm que se interpoló en una recta patrón realizada con cloruro amónico.

3.4. Determinación de 2-oxoácidos

La determinación de 2-oxoácidos se realizó espectrofotométricamente a 520 nm utilizando el método de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (Borchers, 1977). A 250 μL de muestra se le añadieron 50 μL de NaOH 0,6 N y la mezcla se incubó a 100 °C durante 10 min. Seguidamente se añadieron 100 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina al 0,1% preparada en HCl 2 N, manteniéndose esta mezcla a 100 °C durante 4 min. Tras 10 min a temperatura ambiente se añadieron 500 μL de NaOH 2,5 N, y después de 11 min se midió su absorbancia a 520 nm. Además, la concentración de oxalacetato (tiempo de retención =10,1 min) y de otros compuestos orgánicos, también se determinó mediante HPLC en un equipo de *System Gold* equipado con un detector de diodos en batería (*diode array*), modelo 168 (*Beckman Instruments Inc.*). Para la cromatografía de intercambio aniónico se utilizó una columna AMINEX HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm (Bio-Rad). Como fase móvil se empleó H_2SO_4 8 mM a un flujo constante de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y la detección se realizó a 210 nm.

3.5. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó mediante dos métodos distintos. Por un lado, se usó el método descrito por Bradford (1976). Los reactivos para la determinación de proteína fueron suministrados por la casa comercial Biorad (*Bio-Rad Dye reagent concentrate*). A 0,8 mL de muestra se añadieron 0,2 mL de colorante comercial, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia de la muestra a 595 nm. La concentración de proteína se determinó utilizando como patrón una solución de albúmina bovina (BSA). Además, se usó también el método de Lowry modificado (Shakir *et al.*, 1994) según el cual a 0,3 mL de muestra se le añadió 1 mL de reactivo A, que contenía Na_2CO_3 185 mM, NaOH 98,1 mM, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,39 mM y $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. Se agitó e incubó a 37 °C y se esperó 3 min antes de añadir 0,25 mL de reactivo de *Folin Ciocalteau* diluido a la mitad con agua. Tras incubar otros 3 min a 37 °C se midió la absorbancia a 750 nm y su valor se interpoló en una recta patrón obtenida con BSA.

4. Técnicas de manipulación del DNA

4.1. Aislamiento del DNA total de *P. pseudoalcaligenes*

Una parte alícuota de 1,5 mL de un cultivo de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, cultivado durante 24 h, se centrifugó a 10 000 rpm durante 2 min. El precipitado celular se resuspendió en 567 μL de tampón TE (Tris-HCl 10 mM + EDTA 1 mM, pH 8), agregando 3 μL de proteinasa K ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y 30 μL de SDS (10%). El tubo se mezcló por inversión y se incubó a 37 °C durante 1 h para producir la lisis celular. Posteriormente, se añadió 100 μL de cloruro sódico 5 M, mezclando fuertemente durante unos segundos. Después de añadir 80 μL de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 10% se incubó a 65 °C durante 10 min, se adicionó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) agitando fuertemente. La mezcla se centrifugó durante 5 min a 11 000 rpm. La fase superior se recuperó, se le agregó un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 11 000 rpm. Después de recuperar la fase superior se le añadieron 2 μL de RNasa ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y se incubó la mezcla durante 30 min a 37 °C. A continuación, se agregó un volumen igual de isopropanol, y después de mantener el tubo a -20 °C durante 1 h, se centrifugó 5 min a 11 000 rpm, desechando el sobrenadante y lavando el precipitado dos veces con etanol al 70%. Por último, la mezcla se centrifugó durante 5 min a 11 000 rpm, se secó el precipitado y se resuspendió en 10-30 μL de tampón TE o agua destilada estéril, según el caso.

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

4.2. Extracción del DNA plasmídico

Para obtener el DNA con la calidad y la concentración necesarias para su secuenciación ($\approx 1,5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), se emplearon columnas del kit “High pure plasmid isolation” (Roche) y del kit “QIAprep miniprep system” (QIAGEN). El protocolo de extracción y los tampones utilizados fueron los recomendados por la casa comercial. El método consiste en una lisis alcalina de las células seguida de una cromatografía de intercambio aniónico, en la cual el DNA es retenido y lavado selectivamente, lo que permite la eliminación de la mayor parte del RNA, proteínas, sales y otros contaminantes celulares.

4.3. Cuantificación del DNA

Dependiendo de la calidad del método de extracción utilizado, se siguieron diferentes procedimientos para la cuantificación de los ácidos nucleicos. Cuando el material fue de suficiente pureza se utilizó el método espectrofotométrico, mediante el cual se tomó 1 μL de muestra conteniendo el DNA, que se diluyó en agua y se midió su absorbancia a 260 y a 280 nm.

Para el cálculo de la concentración de DNA se consideró un valor estándar de $A_{260\text{nm}}=1$ para soluciones de DNA bicatenario con una concentración de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La pureza del DNA se estimó por la relación entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm, considerándose de buena calidad cuando esta relación era próxima al valor 1,8. En otros casos, se estimó la cantidad de DNA visualizándolo en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, en el cual se incluían además muestras de patrones de varias concentraciones conocidas. Dado que la fluorescencia de los ácidos nucleicos en presencia de bromuro de etidio es directamente proporcional a la cantidad de DNA presente, la concentración de las muestras se estimó por comparación de sus fluorescencias relativas respecto a las que presentaron las muestras control.

4.4. Digestión del DNA con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión del DNA con las endonucleasas de restricción contenían: 0,5 μg de DNA, 1 μL de tampón de restricción (10x) y 0,5 unidades de la enzima de restricción en un volumen final de 10 μL completados con H_2O . Las condiciones utilizadas fueron las recomendadas por las diferentes casas comerciales (Roche y Pharmacia) con respecto a los tampones requeridos, así como a las temperaturas y a los tiempos óptimos para una mayor eficiencia de las diferentes enzimas. En las digestiones del DNA con dos o más enzimas de restricción se empleó el tampón específico en el que más eficientemente actuaron las enzimas utilizadas o el tampón One-Phor-All (Pharmacia).

4.5. Electroforesis del DNA

La electroforesis del DNA se llevó a cabo utilizando geles de agarosa al 0,8% (p/v) preparados en tampón TAE, que contenía Tris-acético 40 mM (pH 8) y EDTA 0,5 M (Sambrook *et al.*, 1989). A cada 5 μL de disolución de DNA se le añadió 1 μL de tampón de carga 6X que contenía glicerol al 30% (v/v), azul de bromofenol al 0,3% (p/v) y azul de xilencianol al 0,3% (p/v). La mezcla se depositó en un pocillo del gel, sumergido en una cubeta con tampón TAE. La separación se realizó por electroforesis horizontal a 40-80 V durante 2 h

aproximadamente. Para visualizar el DNA en los geles, éstos se tiñeron en una solución de bromuro de etidio ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 15 min y después se expusieron a radiación ultravioleta (220 nm) en un transiluminador y se fotografiaron con un sistema BIO-RAD (Gel Doc 1000). El tamaño de los fragmentos de DNA se estimó por interpolación en curvas logarítmicas del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, utilizando como patrón los fragmentos de DNA del fago lambda digerido con las enzimas *HindIII* o *EcoRI*, por separado o conjuntamente.

4.6. Recuperación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa

Para la recuperación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa se utilizó el sistema comercial de Qiagen (QIAquick Gel Extraction), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.7. Ligación del DNA

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

4.8. Transformación de células de *E. coli*

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

4.9. Preparación de células competentes

Las células se cultivaron en LB durante 12 h ($A_{600\text{nm}} \leq 1,5$). El cultivo se diluyó 50 veces con el mismo medio y se incubó otras 2 horas hasta obtener una $A_{600\text{nm}}$ de 0,5 aproximadamente (equivalente a 5×10^7 células $\cdot\text{mL}^{-1}$). Se centrifugó a 4 000 rpm durante 5 min y el precipitado celular se resuspendió en

la mitad del volumen de partida con una solución fría de CaCl₂ 50 mM. Se incubó en hielo durante 30 min y se volvió a centrifugar a 4 000 rpm durante 5 min. Las células competentes obtenidas se resuspendieron en una décima parte del volumen inicial con la solución fría de CaCl₂ 50 mM.

4.10. Transformación de las células competentes

La mezcla de transformación contenía: 10 µl de la mezcla de ligación, 200 µl de la suspensión de células competentes y 100 µl de un tampón compuesto por: Tris-HCl 10 mM (pH 7,5); CaCl₂ 10 mM; y MgCl₂ 10 mM. La muestra se dejó 30 min en hielo y posteriormente se incubó a 42 °C durante 2,5 min. Después se añadieron 700 µl de medio LB, se incubó 45 min a 37 °C y se extendió en placas selectivas con los antibióticos correspondientes.

4.11. Transferencia de plásmidos por conjugación

La movilización de plásmidos a *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se realizó mediante conjugación biparental (Herrero *et al.*, 1990), en la que participaron únicamente las cepas donadora *E. coli* S17-1 y la receptora *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Los transconjugantes de la cepa CECT5344 se seleccionaron en medio mínimo que contenía los antibióticos adecuados para la selección del receptor del plásmido transferido.

4.12. Secuenciación de fragmentos de DNA

La secuenciación de DNA plasmídico y de pequeños fragmentos de DNA amplificados por PCR se realizó utilizando los secuenciadores automáticos modelos ABI 310 y ABI 377 de Perkin Elmer del servicio de secuenciación del SCAI (UCO). Para ello, se usaron, según los casos, los cebadores universales *forward*, *reverse*, T3 y T7, junto con terminadores marcados con cromóforos fluorescentes y la enzima Taq polimerasa (Perkin Elmer), según las instrucciones recomendadas por el fabricante.

4.13. Reacción de amplificación en cadena (“PCR”) con la DNA polimerasa termorresistente

Las reacciones de amplificación del DNA se realizaron en un termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf). Para la amplificación de los fragmentos se utilizó el sistema Expand High Fidelity PCR (Roche). Cada reacción de PCR contenía, además del DNA y la DNA polimerasa, los cebadores correspondientes, una mezcla de desoxirribonucleótidos y el tampón especificado por la casa comercial. Los oligonucleótidos utilizados como

cebadores en las reacciones de amplificación de DNA se muestran en la Tabla 8. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min, tuvieron lugar 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min de apareamiento a la temperatura adecuada para cada pareja de cebadores y 1 min de extensión por cada kb de DNA molde; a estos 30 ciclos le siguieron 7 min a 72 °C para finalizar una posible extensión incompleta de los productos de PCR. Ocasionalmente, los productos obtenidos tras la amplificación se purificaron utilizando el sistema comercial “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) para eliminar los cebadores y los dNTPs; también se recurrió a separar el DNA mediante electroforesis y recuperar el fragmento de interés.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
NitR-A	ACACCACCACCGAGCCGACGATG
NitR-B	GGAAATCTCCGCCACCACGCTGC
HPA	TGCTGGCGGCAAGCTTCATGTCGACGA <i>HindIII</i>
HPB	CAGCACGCAGGCCGGATCCATCGCCCT <i>BamHI</i>
NitF	TACGGATCCCGGTCAACAACCAGATCAAGGCGTTCAT <i>BamHI</i>
NitR	CCCAAGCTTGATTGAGCATCGGCACCATCGCTGTAT <i>HindIII</i>
nitA-1	CTTCAGGATGGAGTCGCTCTGCCCGA
nitA-2	CGCCTGCATGATGCCCTTGAGGAAC
NitR5'	GCAGCGTGGTGGCGGAGATTTTC
Hyp1-3'	CGTGATGGATCTGCGTTTGCTGATG
Nit5'	GGGGCTGACGATGGCGGTGAAG
nitC-1	TGAGCGTATGGTCTGGGGGCAGGG
nitC-2	CGCCGCATGAATCTGCTCGCCATC
NitA	GCTCGGATGGTGGTGTGCGCTGGG
NitRA	ACACCACCACCGAGCCGACGATG
NitRB	GGAAATCTCCGCCACCACGCTGC
Hyp1-5'	AGCGATGGTGTGGAAGGTGATGAGGG
SAM 3'	CTGGCGGCAATGGGCGTCTACC
nitE-1	CTCGGTGGCAGGCTTGACCAGCAG
nitE-2	TGGTCAACGAGGCGGTGTCACGAGC
AIRS 5'	ACGGGCATCACCTGCGGCA
AIRS 3'	CAGGTGCGGGTGGGCGGCG
nitG-1	GCATTGAGGGCGTTCTCGGCACG
nitG-2	GCGGCTTCCGAGCGGGTCAAGGAT
Flavo 5'	CTTGCGGGCGTGCCGTCACA
nitCD1	GCTTCGTGGTCAACGCCACCGCCTG
nitCD2	CAGAGCCACTGCCGCGGTAACGGCA
16SF	TGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAA
16SR	GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTT
16S-1	GGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAGG
16S-2	TTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGG
RpoB-3	CGCTGGTGAGCAAGGGGGATCAGGT
RpoB-4	CGCTCGGACAGGCAGATGGAGTCTTC

5. Análisis proteómico

Las células se cultivaron en matraces de 2 L con medio M9 conteniendo amonio (2 mM) como fuente de nitrógeno. Transcurridas 24 h, una vez consumido el amonio, se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 min. Después de descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron en medio fresco M9 con NaCN o KNO₃ (2 mM). Las células se recogieron en fase exponencial (A_{600nm} 0,7) cuando la fuente de nitrógeno se había consumido en un 80%. La centrifugación de las células se realizó a 10 000 rpm durante 15 min a 4 °C. Una vez descartado el sobrenadante, las células se lavaron con una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) y se centrifugaron de nuevo a 13 000 rpm durante 10 min, y por último, se congelaron a -80 °C. Antes de usar, las células se descongelaron y se resuspendieron en Tris-HCl 40 mM (pH 8), posteriormente fueron tratadas con RNasa (17 µg·mL⁻¹) y DNasa (17 µg·mL⁻¹). Además, se les añadió una mezcla de inhibidores de proteasas que contenía fluoruro de metilfenilsulfonilo (7 µg·mL⁻¹), leupeptina (2 µg·mL⁻¹) y pepstatina (3 µg·mL⁻¹). Las células se rompieron en un sonicador aplicando 90 W de potencia durante tres pulsos de 5 s. Las células se mantuvieron en hielo en todo momento. Los lisados obtenidos se centrifugaron durante 60 min a 13 000 rpm para eliminar las células enteras y los restos celulares. La fracción soluble fue concentrada usando centricones Biomax 5K (Millipore).

Las muestras se prepararon de acuerdo con el procedimiento que se describe a continuación. Partes alícuotas que contenían 400 µg de proteína, en el caso de los geles teñidos con azul de Coomassie, y 150 µg, en el caso de los geles teñidos por fluorescencia con SYPRO® (Biorad), se diluyeron con el tampón de solubilización, el cual contenía: urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v), DTT (2,3-dihidroxibutano-1,4-ditiol) 50 mM, IPG buffer 1% (v/v) y trazas de azul de bromofenol. Las muestras se diluyeron hasta un volumen final de 200 µL. La mezcla se incubó en un agitador durante 45 min a temperatura ambiente. En todas las centrifugaciones llevadas a cabo, las muestras de mantuvieron a 4 °C en una centrífuga refrigerada.

5.1. Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)

El isoelectroenfoco (IEF) se realizó usando el sistema IPGphor de Pharmacia. Las tiras de IEF utilizadas fueron de 11 cm (Pharmacia) con un intervalo de pH 4,7-5,9. Las muestras, previamente centrifugadas a 12.000 rpm durante 5 min, se aplicaron en los sarcófagos de cerámica y encima de cada una se colocó, hacia abajo, la tira de gel de IEF. Posteriormente los geles se cubrieron con aceite mineral. Para una completa absorción de la proteína y rehidratación de los geles se llevó a cabo una rehidratación pasiva (sin aplicar

voltaje) durante 12 h. Tanto la rehidratación como el programa de IEF se realizaron a una temperatura de 20 °C y durante el IEF se aplicó una corriente de 50 μA por gel. El IEF comenzó con una corriente de 500 V durante 1 h, posteriormente, se aplicó una corriente de 1 000 V durante 1 h y por último, se mantuvo a 8 000 V hasta alcanzar 18 000 V/h.

Después del IEF las tiras de IPG se equilibraron a temperatura ambiente durante 15 min en tampón de equilibrado que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 8, urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v), DTT ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y trazas de azul de bromofenol. Después de este tratamiento, las tiras de IPG se incubaron durante 15 min en el mismo tampón, pero con yodoacetamida ($25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en lugar de DTT.

La segunda dimensión SDS-PAGE se realizó usando el sistema Hoefer SE 600 (Pharmacia). Las tiras de IPG equilibradas, se colocaron en geles de poliacrilamida al 12% y los marcadores estándar se aplicaron en papel Whatmann en un extremo de la tira de IPG, sobre el gel de poliacrilamida. Finalmente, el gel IEF y los marcadores se sellaron con una solución de agarosa al 0,5%. La electroforesis se llevó a cabo a 20 °C en dos pasos: paso 1, a 15 mA por gel durante 15 min; paso 2, a 30 mA por gel durante 5 h (Luque-Almagro *et al.*, 2007).

5.2. Tinción de geles de poliacrilamida

Se llevaron a cabo dos métodos de tinción de geles. La tinción de azul de Coomassie contenía Coomassie Brilliant blue G250 ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y R250 ($0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), metanol (5%), etanol (42,5%) y ácido acético (10%). Los geles se incubaron con la solución azul de Coomassie agitando suavemente durante 2 h. El desteñido de los geles se llevó a cabo en dos pasos; primero se lavó con una solución de desteñido rápido varias veces que contenía ácido acético (10%) y de etanol (30%) y posteriormente se lavó con una solución de desteñido lenta de ácido acético (7%), durante 24 h. Finalmente, los geles se lavaron con H_2O y se mantuvieron a 4 °C. Los geles se escanearon con el ImageScanner de Pharmacia y posteriormente se analizaron mediante el software ImageMaster 2D v.3.1 (Pharmacia). En dicho análisis se identificaron aquellos “spots” cuyos cambios, tanto cualitativos como cuantitativos, se consideraron más significativos. Por otra parte, se llevó a cabo una tinción fluorescente en réplicas de los geles realizados. En primer lugar, los geles se incubaron con una solución de fijación (metanol 10%, ácido acético 7%) durante 30 min. Posteriormente, se procedió con una incubación en SYPRO® (Sigma) durante 12 horas aproximadamente, pasado dicho tiempo, se le eliminó el SYPRO® y se le añadió de nuevo solución de fijación durante 30 min, y por último, se lavaron con agua incubándolas durante 30 min. Todas las incubaciones

anteriores se llevaron a cabo en una agitación suave. Los geles se escanearon con un equipo de captura de imágenes de fluorescencia con láser de 3 longitudes de onda (BioRad Mod FX Multi-imager) y se analizaron con el software ImageMaster 2D v.3.1 (Pharmacia).

5.3. Identificación de proteínas

Se eligieron los “spots” expresados diferencialmente en base a sus diferencias de volumen normalizado en ambos geles para proceder a la identificación proteica, la cual fue llevada a cabo en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Se usaron las huellas peptídicas generadas por MALDI-TOF para identificar las proteínas mediante diversas herramientas bioinformáticas disponibles en Internet, como Mascot (<http://www.matrixscience.com>), DeepView y ProteinProspector (<http://www.spectroscopynow.com>).

6. Análisis transcripcional por RT-PCR Y qPCR

El análisis transcripcional se llevó a cabo mediante RT-PCR. Las células utilizadas se cultivaron en medio M9 con amonio 2 mM durante 24 h, tiempo en el cual se consumió todo el amonio, posteriormente se adicionaron diferentes fuentes de nitrógeno tales como cianuro 2 mM, amonio 3 mM, o amonio 3 mM junto con cianuro 2 mM. Como control se utilizó un cultivo al cual no se le añadió nitrógeno adicional. Cuando se consumió aproximadamente el 50% de la fuente de nitrógeno, las células se recogieron y se lavaron con tampón TEG, que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 8.0), glucosa 1% y EDTA 10 mM. La extracción de RNA se llevó a cabo con el “Qiagen RNA extraction kit” (RNeasy midi kit). El RNA se trató con DNasa “en columna” con RNase-free DNase set (Qiagen) y posteriormente en un tratamiento “post-columna” con DNase I (Ambion). La concentración y pureza de las muestras de RNA se determinó en un espectrofotómetro ND1000 (Nanodrop Technologies). La síntesis de cDNA total se llevó a cabo en 20 μ L finales con 500 ng de RNA, dNTPs 0,7 mM, 200 U de la retrotranscriptasa “SuperScript II Reverse Transcriptase” (Invitrogen), y hexámeros aleatorios 3,75 mM (Applied Biosystems). Las muestras se calentaron inicialmente a 65 °C durante 5 min y posteriormente se incubaron a 42 °C durante 50 min, seguida de una incubación a 70 °C durante 15 min. Se utilizaron 2 μ L de cDNA como molde en reacciones de PCR con los oligonucleótidos especificados en la Tabla 8 siguiendo el programa de PCR que se detalla a continuación: desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 min, seguida de 30 ciclos de amplificación (94 °C, 30 s; 65 °C, 30 s y 69 °C, 1 min). La PCR se completó con una incubación adicional de 72 °C durante 10 min.

Para la RT-qPCR a tiempo real el aislamiento de RNA y la síntesis de cDNA se llevó a cabo como se indicó anteriormente. En este caso el cDNA se purificó usando el “Favorprep Gel/PCR purification kit” de Favorgen, determinándose posteriormente su concentración en un espectrofotómetro ND1000. Se utilizó el “iQ5 Multicolour Real-Time PCR Detection System” (Bio-Rad) en una reacción de 25 μ l reaction (volumen final) que contenía: 2 μ l de cDNA diluido (12,5; 2,5 y 0,5 ng) y 0,2 mM de cada oligonucleótido: NitA-1 y NitA-2 (para el gen *nitA*), NitC-1 y NitC-2 (para el gen *nitC*), RpoB-3 y RpoB-4 (para *rpoB*), y 12,5 ml de “iQ SYBR Green Supermix” (Bio-Rad). Los cDNAs diana y las muestras de referencia se amplificaron tres veces en reacciones de PCR separadas. Las muestras se desnaturalizaron inicialmente calentando a 95 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de amplificación (95 °C, 30 s; unión de los cebadores, 60 °C, 30 s; elongación y adquisición de la señal, 72 °C, 30 s). Para la cuantificación relativa de los valores de fluorescencia se utilizó una curva de calibrado usando diluciones seriadas de 80 a 0.008 ng de DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. La normalización de los datos se realizó usando el gen de referencia (“housekeeping”) *rpoB*.

7. Obtención de los mutantes en los genes *nitA*, *nitB* y *nitC* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

La construcción del mutante NitB⁻ se llevó a cabo amplificando un fragmento de DNA de 1,2 kb a partir del DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 usando los oligonucleótidos HPA y HPB (Tabla 8). El producto de PCR obtenido se clonó en el vector movilizable pK18mob como un fragmento *HindIII/BamHI* que contenía dos sitios de restricción internos para *PstI* en la región central del gen *nitB* y que fueron usados para introducir un “cassette” de resistencia a gentamicina (Gm). Este “cassette” de resistencia a Gm fue aislado del vector pMS255 (Becker *et al.*, 1995) como un fragmento *EcoRI* y posteriormente clonado en pBluescriptKS, de donde se obtuvo como un fragmento *PstI*.

El mutante NitC⁻ se construyó mediante amplificación de un fragmento de PCR de 1,3 kb que contenía el gen *nitC* completo. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos NitF y NitR (Tabla 8), clonando posteriormente el producto obtenido en el vector pGEM-T easy (Promega). El “cassette” de resistencia a gentamicina se introdujo en esta construcción como un fragmento *Sall* de 1,1 kb en la región central de *nitC* y previamente digerida con la enzima de restricción *XhoI*. El fragmento *HindIII/BamHI* de aproximadamente 2,4 kb fue clonado en el vector movilizable pK18mob.

Por último, el mutante NitA⁻ se generó por amplificación de un fragmento de PCR de 0,5 kb que contenía una región interna de *nitA*, para lo que se utilizaron los oligonucleótidos NitR-A y NitR-B (Tabla 8). Este fragmento se clonó en pGEM-T easy y fue recuperado como un fragmento *EcoRI* que fue clonado en pK18mob.

Los vectores movilizables conteniendo los respectivos genes interrumpidos se introdujeron mediante conjugación con la estirpe receptora *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 desde la estirpe donadora *E. coli* S17-1. Las estirpes mutantes NitB⁻ y NitC⁻ de *P. pseudoalcaligenes* se generaron por inserción de un “cassette” de resistencia al antibiótico gentamicina como se describió anteriormente, insertándose en una determinada orientación para evitar efecto polar de la mutación aguas abajo. El mutante NitA se obtuvo por inserción del vector pK18mob, con un “cassette” de resistencia a kanamicina, a través de un único evento de recombinación. La presencia de los “cassettes” de resistencia a Km o Gm en los mutantes fue confirmada por resistencia a estos antibióticos y por PCR.

8. Secuenciación y análisis del genoma de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

8.1. 454-Pirosecuenciación y ensamblaje del genoma de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

El DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se secuenció usando la técnica de pirosecuenciación 454 a través de la amplificación y secuenciación de una región de rDNA 16S. Un análisis BLASTn reveló que la secuencia *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 correspondiente a dicha región muestra una alta similitud con secuencias disponibles de otras especies del género *Pseudomonas*. Se evaluó la calidad del DNA mediante electroforesis en gel y se estimó la cantidad mediante un método basado en la fluorescencia usando el kit “Quant-iT PicoGreen dsDNA” (Invitrogen) y el Tecan Infinite 200 Microplate Reader (Tecan Deutschland GmbH).

Se generó así una librería del genoma completo usando 5 µg de DNA genómico y el kit “GS FLX General Library Preparation” (Roche) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Además, se generó una librería “3K Long-Tag Paired end” usando 5 µL de DNA genómico y el kit “GS FLX Paired-end Library Preparation” (Roche) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se usaron lecturas “Paired end” para determinar la orientación y posiciones relativas de los contigs producidas por la secuenciación *de novo* y el ensamblaje. Se amplificaron las librerías de DNA por PCR de emulsión y se secuenciaron usando la secuenciación FLX (454 Life Sciences, Roche). Después de la secuenciación y el procesamiento de los datos en crudo, se realizó un ensamblaje *de novo* usando el software “De Novo Assembler” versión 2.0.01.14 usando los ajustes predeterminados. La ordenación de los supercontigs se llevó a cabo como se describió previamente (Wibberg *et al.*, 2011). Después de mapear la cepa de referencia *P. mendocina ymp* usando el programa bioinformático r2cat (Husemann y Stoye, 2010) y el análisis de las lecturas de extremos protuberantes de los supercontigs, se pudieron ordenar todos los supercontigs y se localizaron en posiciones concretas del genoma ensamblado. Los datos de la secuencia de nucleótidos del cromosoma circular están disponibles en el EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute database) de CAIG01000001 a CAIG01000024 (<http://0-www.ncbi.nlm.nih.gov.ilsprod.lib.neu.edu/Traces/wgs/?val=caig#>).

8.2. Anotación del genoma y análisis bioinformático

Inicialmente se usó el sistema GenDB 2.0 (Meyer *et al.*, 2003) para realizar una predicción y anotación automática. Las regiones intergénicas se analizaron por la ausencia de secuencias codificantes por el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Las anotaciones automáticas se revisaron manualmente comparando las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas con genomas relacionados depositados en las bases de datos NCBI mediante el uso de BLASTN, BLASTP y BLASTX (Altschul *et al.*, 1997). Usando la herramienta en línea Uniprot, se hizo una búsqueda de cada una de las proteínas para analizar las características de estas, y además se buscaron los dominios funcionales conservados en distintas bases de datos como Pfam. Para determinar los genes que codifican las proteínas identificadas mediante proteómica y analizar los entornos génicos de estos genes se usó la base de datos NCBI nucleotídica a través del genoma de *P. pseudoalcaligenes*.

8.3. Análisis filogenético de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

Se llevaron a cabo análisis moleculares filogenéticos usando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de evolución JTT (Jones *et al.*, 1992). Para representar la historia evolutiva del taxón analizado, se tuvo en cuenta el árbol “bootstrap” consenso deducido a partir de 300 réplicas (Felsenstein, 1985). No se representaron las ramas correspondientes con particiones cuyos valores de “bootstrap” fueron inferiores al 50%. El porcentaje de árboles replicados en los cuales los taxones se encuentran agrupados según el “bootstrap test” (300 réplicas) se muestra junto a las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol inicial resultante de la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente de la siguiente manera. Cuando el número de sitios comunes fue menor a 100 o menos de una cuarta parte del número total de sitios, se usó el método de máxima parsimonia; además se usó el método BIONG con una matriz de distancia MCL. El árbol está dibujado a escala y las longitudes de sus ramas están medidas según el número de sustituciones por sitio. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Para el análisis filogenético de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en relación con los miembros de la familia de *Pseudomonaceas* completamente secuenciados, se usó la herramienta para la comparación genómica EDGAR (Blom *et al.*, 2009). Para ello, a través de EDGAR, se calculó el “core genome” de todas las cepas seleccionadas, y en base en estos datos, se calcularon todas las distancias filogenéticas a través de múltiples alineamientos de secuencia. Posteriormente, se dedujeron los árboles filogenéticos a partir de alineamientos génicos concatenados, usando la herramienta PHYLIP (Felsenstein, 1995, Blom *et al.*, 2009).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la comparación entre el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 frente al de otras cepas de dicha familia se realizó usando el programa EDGAR, útil para establecer dichas relaciones entre genomas procariotas (Blom *et al.*, 2009). Dicho análisis incluye análisis de sintenia, diagramas Venn, identificación de genes ortólogos, así como los genes compartidos entre dichas cepas o únicos de cada una. Por otra parte, con el fin de visualizar reordenamientos en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en comparación con el cromosoma de *P. mendocina ymp*, cepa altamente relacionada con esta, se usó el software “Artemis Comparison Tool” (Carver *et al.*, 2005).

Resultados

Capítulo 1

Análisis proteómico de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

1. Análisis proteómico diferencial de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en condiciones cianotróficas

Un estudio proteómico preliminar en esta bacteria reveló que el cianuro induce varias proteínas relacionadas con los mecanismos de defensa en respuesta al déficit de hierro, daño oxidativo y el estrés por escasez de nitrógeno usando amonio como control (Luque-Almagro *et al.*, 2007). Sin embargo, la ausencia de la secuencia del genoma completo de esta bacteria en ese momento limitó la identificación de manchas, obtenidas por un análisis 2D-PAGE, a tan sólo cinco proteínas (CN0, CN1, CN2, CN3 y CN4), ninguna de ellas involucradas en la asimilación de cianuro. Una vez secuenciado el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2013), y con el objetivo de identificar la posible ruta de utilización de cianuro en esta cepa, se procedió a realizar un análisis proteómico diferencial más extenso, comparándose el proteoma de la estirpe CECT5344 en condiciones cianotróficas frente a medios con nitrato. Para ello, se cultivó *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en medio mínimo M9 (Sambrook y Russell, 2001) con acetato sódico como fuente de carbono y con cianuro 2 mM o nitrato 2 mM (control) como única fuente de nitrógeno. Después de consumirse aproximadamente el 70% de la fuente de nitrógeno, se recogieron las células y se rompieron por cavitación, centrifugándose los extractos crudos y recogiendo los sobrenadantes. Estos sobrenadantes, que constituyen la fracción subcelular soluble, se analizaron mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. En la figura 13 se muestran los geles bidimensionales en los que se utilizó la fracción soluble procedente de cultivos con nitrato o cianuro. En estos geles se contabilizaron 12 manchas presentes en cianuro y ausentes en nitrato, las cuales se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI/TOF-TOF según se especifica en Materiales y Métodos, presentándose los resultados en la Tabla 9. De las 12 manchas identificadas, tan sólo la ferritina fue coincidente en ambos análisis proteómicos. Las manchas 3 y 4 fueron identificadas como NitB, indicando dos isoformas de la misma proteína. Esta proteína NitB, y la proteína NitG también identificada (mancha 6), son proteínas de función desconocida, sin embargo ambas están codificadas por genes localizados cerca de un gen que codifica una nitrilasa que podría estar implicada en la asimilación de cianuro. Entre las manchas restantes inducidas por cianuro se identificaron una dihidropicolinato sintasa (DapA), una fosfoserina aminotransferasa (SerC) y una proteína de función desconocida (Orf1), todas ellas codificadas por genes localizados en el operón *cio1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Otras manchas identificadas fueron la cianasa (CynS), una proteína S6 de la subunidad ribosomal 30S, una

superóxido dismutasa (SodB), la ferritina (Dps), una oxidorreductasa (Fpr) y el factor de elongación P (Fig. 13, Tabla 9).

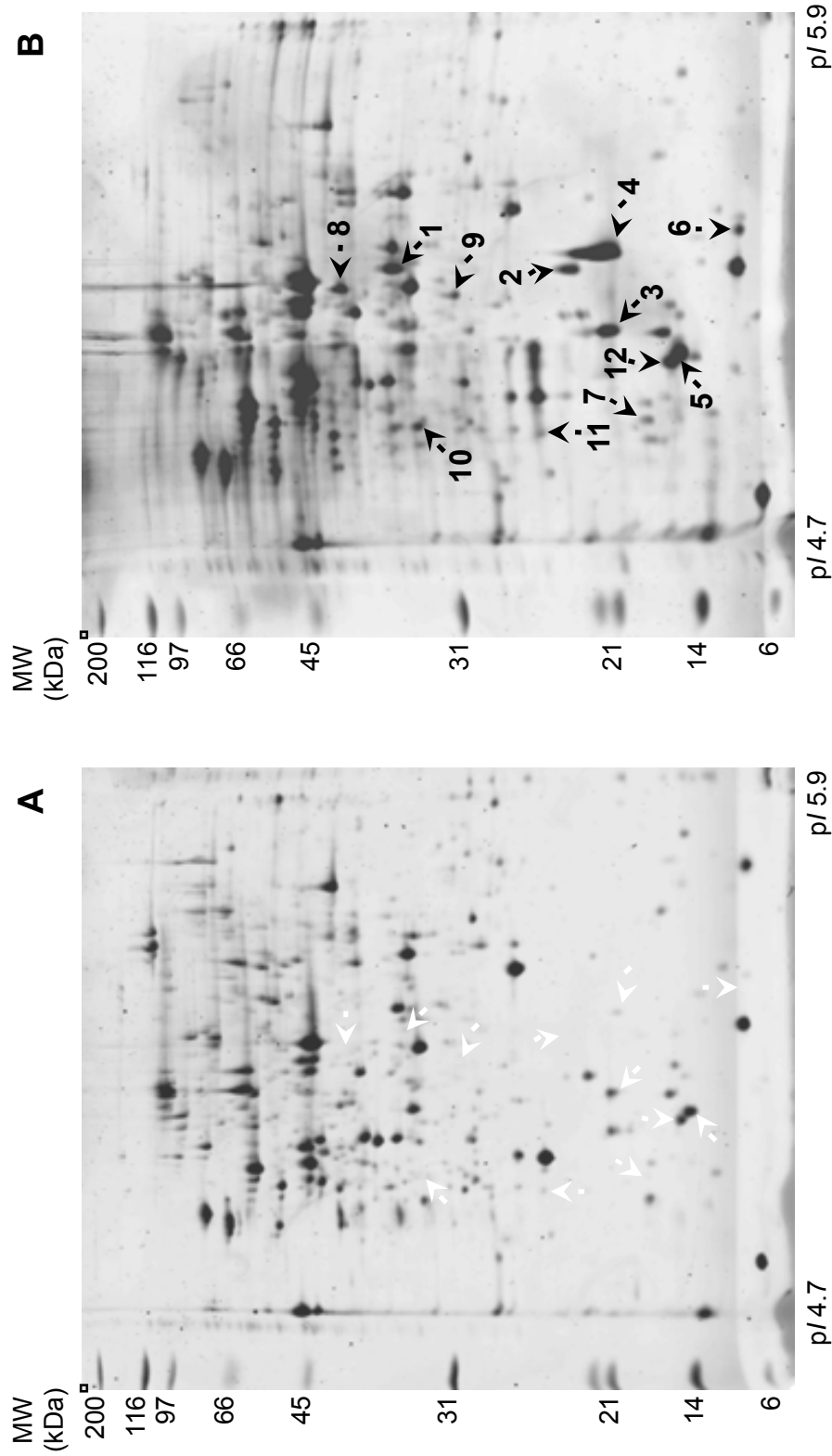


Figura 13. Análisis proteómico diferencial de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en cianuro comparado con nitrato. *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se cultivó en medio mínimo (pH 9,5) con acetato 50 mM y con nitrato 2 mM (A) o cianuro 2 mM (B) como única fuente de nitrógeno. Los gels se tiñeron con Sypro y las diferencias observadas, fundamentalmente cualitativas, entre ambas condiciones se marcaron y se mandaron a identificar mediante espectrometría de masas. Las flechas negras indican manchas inducidas por cianuro, mientras que las flechas blancas indican ausencia de mancha. Este experimento se realizó por triplicado, presentándose los gels más representativos.

Tabla 9. Identificación de proteínas inducidas por cianuro (2D-PAGE).

Mancha	Proteína	Nº Acceso ^a	Cobertura (%) ^b	Péptidos (C.I.) ^c	Gen
1	Dihidropicolinato sintasa (DapA)	I7K7V2	66,25	MGLIPEGMR (99.998) LHSPGPGFDLIDPPPAR (100) MHELCTAALAGDLATVR(100) AVVEAGDGPVILYDVPSR (100)	BN5_01626
2	Proteína función desconocida (Orf1)	I7JJT5	45,91	VVIEFPK (100) TRVVIEFPK (99.97)	BN5_01632
3 y 4	Proteína función desconocida (NitB)	H9N5E2	80,60	AINPLDVMDLR (99,994) DGDFLVNYEEK (100) FALQALYGGTEK (100) VLLYGGVQLGVQR (100) GFPTLGNEAFPGHLAVN (100)	BN5_02401
5	Cianasa (CynS)	I7K0H3	71,23	AVPTDPLIYR (100) FYEMINVYGETIK (100)	BN5_00446
6	Proteína función desconocida (NitG)	H9N5D9	53,33	AENALNAASER (100) DVKGFYCSSAMDTLSALR (100) GFEGGQVQILDMQTAHAGQV NSGWSSF (100)	BN5_02396
7	Proteína ribosomal S6 de la subunidad ribosomal 30S (RpsF)	I7IXB6	70,00	YNDAVIR (99.805) ALAELEDNFR (100) LIEEDGGKIHR (99.657) RQLAYAINNVHK (99.996) ALAELEDNFRYNDVIR (99.89)	BN5_00536
8	Fosfoserina transaminasa (SerC)	I7K2H2	52,40	FGLIYAGAQK (100) DILYNQIDR (100) SGFYVNDISHADR (100) SADFEVMAEQMSR (96.971) YVNEVAYR (99.996) NEFFGDALK (100) EFITEHLPR (100) MREPGDYLIER (99.898) LIYYPTVTREPFENQGR (99.995)	BN5_01629
9	Oxidorreductasa (Fpr)	I7JIR0	69,10	QVVYTENAAR (100) VISVDLPTTIVR (100) EVNLSYISGEDYVFMPEYNS YELR (98.993)	BN5_01004
10	Factor de elongación P (EF-P)	I7K2B0	70,00	QVVYTENAAR (100) VISVDLPTTIVR (100) EVNLSYISGEDYVFMPEYNS YELR (98.993)	BN5_01527
11	Superóxido dismutasa (SodB)	I7K5A1	27,40	SLEEIVK (99.938) FKEEFSK (99.938)	BN5_02889
12	Ferritina (Dps)	I7K1D3	43,58	ALGFPAPGTAAAYAR (99.988)	BN5_00976

a, base de datos UniProt.

b, porcentaje de la proteína cubierta por los péptidos identificados mediante espectrometría de masas.

c, intervalo de confianza en la identificación de los péptidos.

Tabla 10. Características de las proteínas inducidas por cianuro.

Proteína	Longitud (aa)	Mr (Da)	pI
DapA	320	33727	5,36
Orf1	159	17787	5,37
CynS	146	16367	5,12
RpsF	140	16305	4,84
SerC	366	40730	5,31
Fpr	259	29609	5,33
EF-P	190	21416	4,80
SodB	193	21337	5,13
Dps	156	17345	5,18
NitB	160	17783	5,42
			5,20
NitG	105	11557	5,46

Un análisis comparativo de las proteínas inducidas por cianuro reveló que en la mayoría de los casos la mayor identidad se presentó con homólogos de otras *Pseudomonas* (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis comparativo BLASTP de las proteínas inducidas por cianuro.

Proteína	Proteína con máx. identidad	Identidad (%)	Organismo
DapA	Dihidropicolinato sintasa	74	<i>Burkholderia terrae</i>
Orf1	Proteína de función desconocida	58	<i>Burkholderia terrae</i>
CynS	Cianasa	100	<i>Pseudomonas mendocina</i>
RpsF	Proteína S6 ribosomal 30S	98	<i>Pseudomonas fulva</i>
SerC	Fosfoserina transaminasa	75	<i>Burkholderia terrae</i>
Fpr	Reductasa Ferredoxina-NADPH	99	<i>Pseudomonas mendocina</i>
EF-P	Factor de elongación P	99	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
SodB	Superóxido dismutasa	99	<i>Pseudomonas mendocina</i>
Dps	Ferritina	99	<i>Pseudomonas mendocina</i>
NitB	Proteína de función desconocida	94	<i>Pseudomonas viridiflava</i> UASWS0038 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>theae</i> ICMP
NitG	Proteína de función desconocida	63	<i>Pseudomonas</i> sp. Cf1164

2. Inducción de NitB y NitG por cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

2.1. NitB y NitG en el estudio proteómico diferencial

Para confirmar la inducción de NitB y NitG por cianuro y/o nitrilos, además de cultivar las células con cianuro y nitrato (Fig. 13), se realizó un análisis proteómico adicional con la fracción soluble de células cultivadas con amonio o glicolonitrilo como fuente de nitrógeno. En este caso se detectó la proteína NitB en presencia de glicolonitrilo, pero no en amonio (Fig. 15).

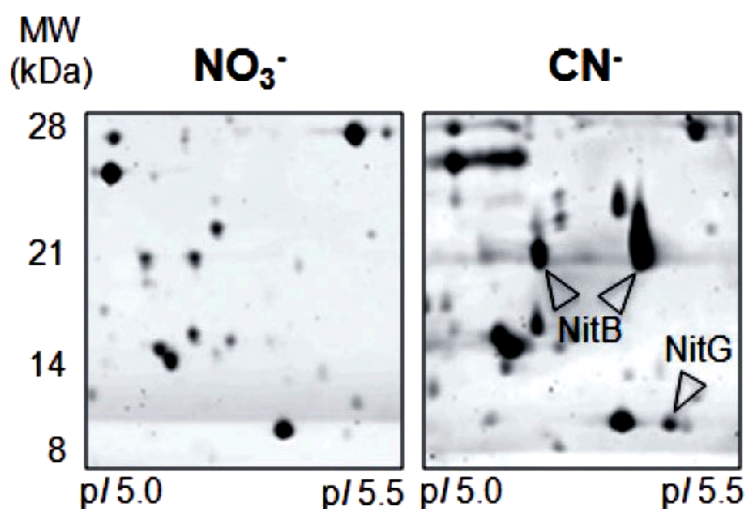


Figura 14. Inducción de NitB y NitG por cianuro. Se muestra en detalle una región del gel 2D-PAGE de la Figura 13. Las proteínas NitB y NitG fueron identificadas en tres geles realizados con muestras independientes.

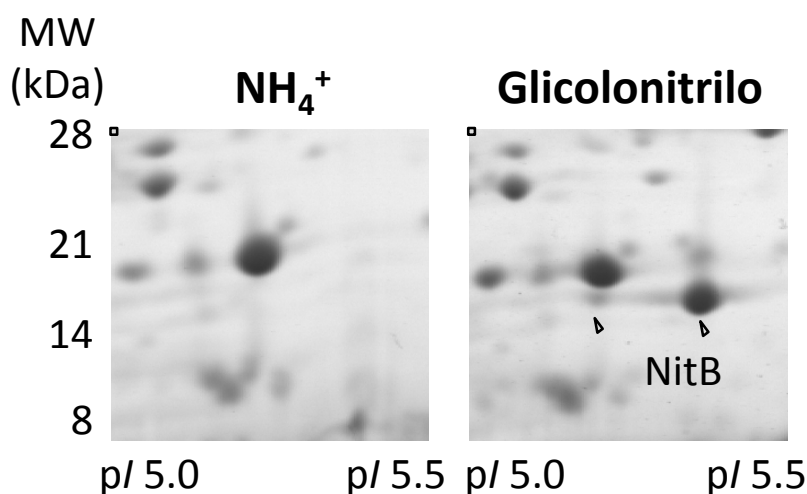


Figura 15. Inducción de NitB por glicolonitrilo en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Las dos isoformas de NitB fueron identificadas en tres cultivos independientes que contenían glicolonitrilo como fuente de nitrógeno. La proteína NitB estuvo ausente en geles 2D-PAGE obtenidos con células cultivadas con amonio.

NitB y NitG son dos proteínas de 160 y 105 aminoácidos (17,8 y 11,6 kDa de masa molecular), respectivamente, pero como se puede observar en las figuras 14 y 15, la proteína NitB presenta dos isoformas de distinto punto isoelectrónico. NitB y NitG son dos proteínas de función desconocida. Según la base de datos de familias de proteínas Pfam (Punta *et al.*, 2012), NitG carece de dominios conservados, mientras que NitB posee un dominio conservado DrsE, localizado entre los aminoácidos 35 y 154, que se corresponde con una proteína soluble de pequeño tamaño que podría estar implicada en la reducción de azufre intracelular (Pott y Dahl, 1998).

2.2. Análisis de NitB y NitG

El análisis de la secuencia aminoacídica de NitB reveló que esta proteína es rica en los aminoácidos leucina (11,9%), glicina (10%), alanina (9,4%) y glutamato (8,8%) (Fig. 16). El carácter hidrofóbico de la leucina hace que este aminoácido se encuentre fundamentalmente en α -hélices, la glicina está presente en zonas flexibles que podrían corresponder a giros, y el glutamato se localiza frecuentemente en los sitios activos de las enzimas. En el caso de NitG la glicina y la leucina son también abundantes, 8,6% y 7,6% respectivamente, aunque los aminoácidos con mayor porcentaje son la serina (11,4%) y la alanina (11,4%) (Fig. 16). La serina suele jugar un papel importante en la función catalítica de muchas enzimas, siendo muy común en los centros activos de estas, y además su grupo hidroxilo es altamente reactivo, siendo capaz de formar enlaces con gran variedad de sustratos polares, mientras que la alanina se encuentra en abundancia en la mayoría de proteínas, no relacionándose este aminoácido con conformaciones secundarias concretas.

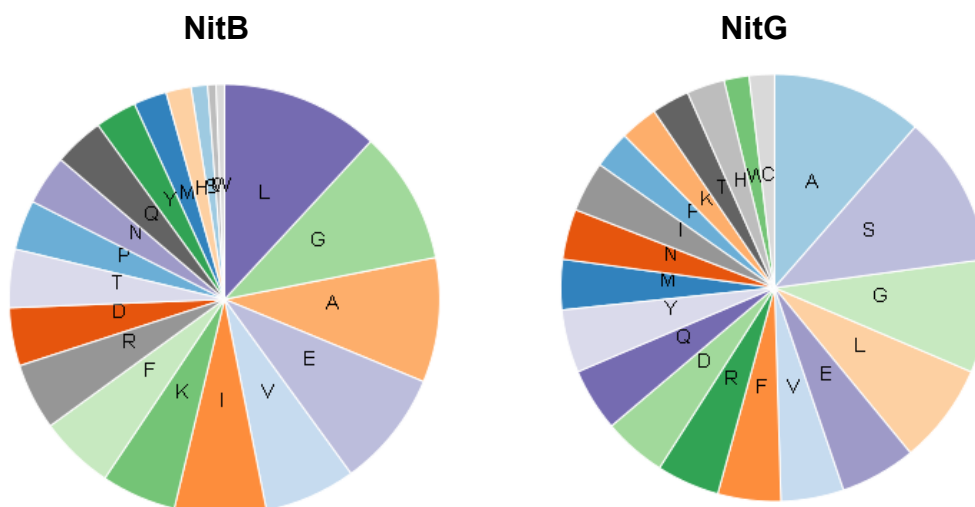


Figura 16. Composición aminoacídica de NitB y NitG. Análisis realizado con el programa PredictProtein.

Mediante el programa "PredictProtein" (<http://www.predictprotein.org>) (Rost *et al.*, 2004) se llevó a cabo una predicción estructural de NitB y NitG, cuyos resultados se presentan en las Figuras 17 y 18.

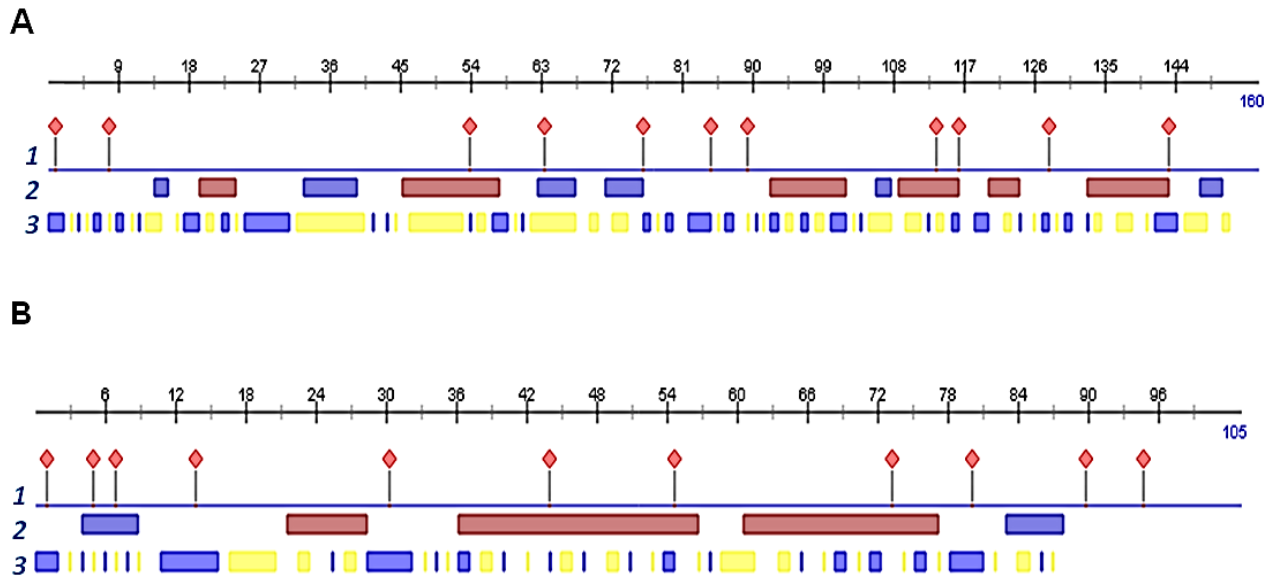


Figura 17. Predicción de estructura secundaria y sitios de unión de NitB (A) y NitG (B) según el programa "PredictProtein". 1. Posibles sitios de unión con otras proteínas; 2. Estructuras secundarias (las regiones azules representan las láminas β , mientras que las rojas se corresponden con las α -hélices) 3. Exposición de los residuos aminoacídicos (los fragmentos azules representan regiones proteicas expuestas, mientras que los fragmentos amarillos regiones ocultas).

Los datos obtenidos para las estructuras secundarias indican que tanto NitB como NitG tienen conformaciones tipo hélice que ocupan gran parte de su estructura, siendo mayor la proporción de éstas en NitG. También poseen láminas tipo β en menor proporción (Figs. 17 y 18). Por otra parte, se observó que la mayoría de aminoácidos de NitG se encuentran expuestos, mientras que en NitB ocurre lo contrario (Fig. 17), lo cual concuerda con la alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos en su secuencia (Fig. 16). Además, en ambas se detectaron 11 posibles puntos de unión a proteínas (Fig. 17), con residuos frecuentemente localizados en la interfaz proteína-proteína en interacciones proteicas (Ofrañ y Rost, 2007).

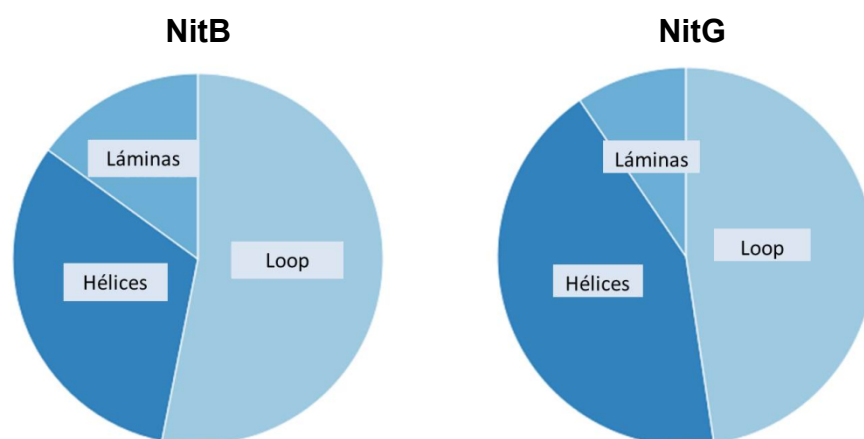


Figura 18. Estructuras secundarias predominantes en las proteínas NitB y NitG. Análisis realizado con el programa PredictProtein.

El análisis de la secuencia de NitB y NitG con diferentes programas informáticos indica que estas proteínas tienen una localización citoplasmática. Mediante el programa *ProtParam* se determinaron algunas propiedades físico-químicas de NitB y NitG en base a su secuencia (Tabla 12).

Tabla 12. Propiedades físico-químicas de NitB y NitG determinadas a partir de su secuencia aminoacídica.

Proteína	Coefficiente de extinción ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Vida media (h)	Índice de inestabilidad	Índice alifático
NitB	12 950	>10	36,36	102,44
NitG	18 450 a 18 575	>10	46,02	69,81

Según estos resultados, NitB es más estable que NitG, ya que esta última posee un índice de inestabilidad superior a 40. De acuerdo al índice alifático, NitB también presenta mayor termoestabilidad.

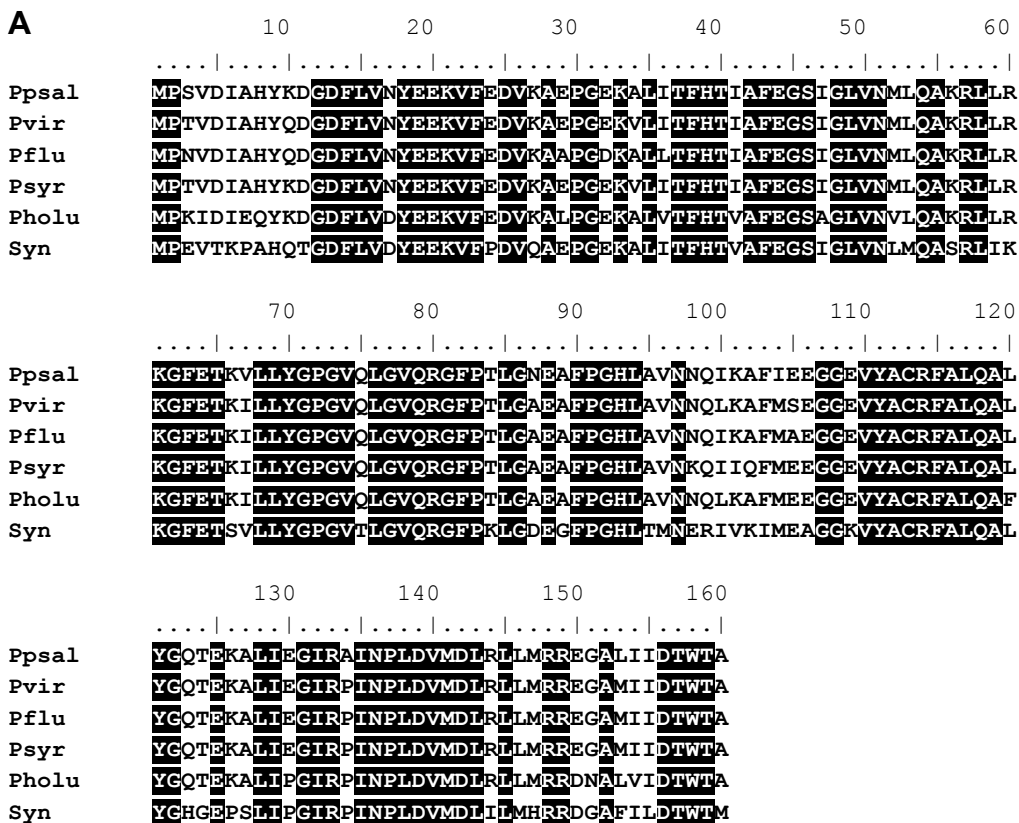
Un análisis comparativo de secuencias (BLAST) de NitB y NitG de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 evidenció que ambas proteínas presentan homólogos en otros miembros del género *Pseudomonas*, incluyendo *Pseudomonas sp.* CF1164, *Pseudomonas sp.* GM55 PMI31, *Pseudomonas sp.* GM33 PMI26, *P. syringae* pv. *theae* ICMP 3923, *P. viridiflava* UASWS0038 y *P. fluorescens* NCIMB 11764. También presentan una alta homología con las proteínas NitB y NitG de otros géneros bacterianos tales como *Photorhabdus luminescens* subesp. *laumondii* TT01 y *Synechocystis sp.* PCC 6803 (Tabla 13).

Tabla 13. Matrices de identidad de NitB y NitG.

MATRIZ DE IDENTIDAD DE NitB (%)							MATRIZ DE IDENTIDAD DE NitG (%)					
	Ppsal	Pvir	Pflu	Psyr	Pholu	Syn	Ppsal	Pvir	Pflu	Psyr	Pholu	Syn
Ppsal	100	93.7	93.1	93.7	87.5	71.8	100	54.6	51.8	46.8	37.1	33.3
Pvir	93.7	100	95.6	96.2	88.1	71.2	54.6	100	65.7	45.0	36.1	34.2
Pflu	93.1	95.6	100	93.7	87.5	70.6	51.8	65.7	100	45.0	37.0	34.2
Psyr	93.7	96.2	93.7	100	86.8	71.8	46.8	45.0	45.0	100	36.9	32.4
Pholu	87.5	88.1	87.5	86.8	100	70.0	37.1	36.1	37.0	36.9	100	38.5
Syn	71.8	71.2	70.6	71.8	70.0	100	33.3	34.2	34.2	32.4	38.5	100

Ppsal: *P. pseudoalcaligenes* CECT5344; **Pvir:** *Pseudomonas viridiflava*; **Pflu:** *Pseudomonas fluorescens*; **Psyr:** *Pseudomonas syringae*; **Pholu:** *Photorhabdus luminescens*; **Syn:** *Synechocystis* sp. PCC6803.

El alineamiento múltiple de NitB y NitG de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con algunos homólogos revela que NitB está muy conservada en distintas estirpes bacterianas, mientras que el grado de conservación de NitG es menor (Fig. 19).



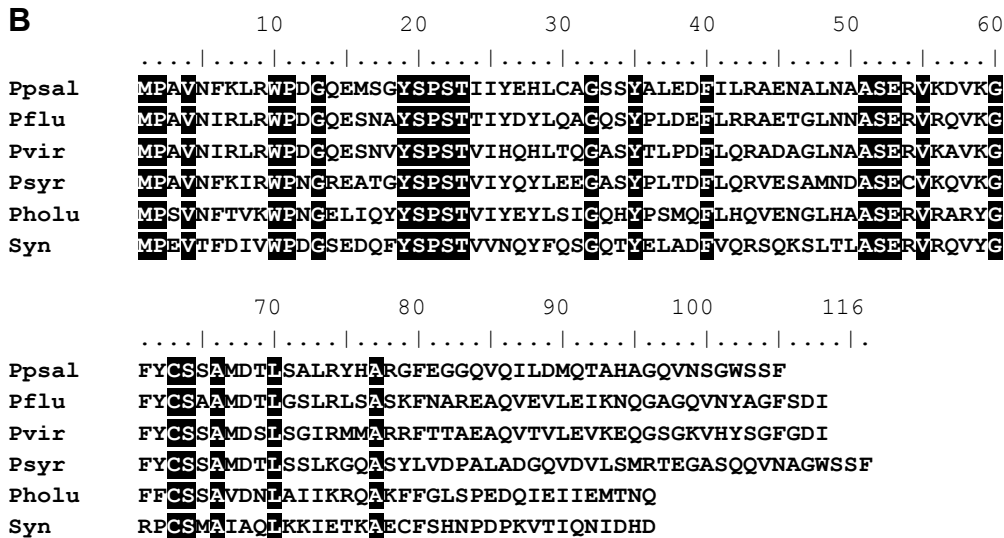


Figura 19. Alineamiento de las proteínas NitB (A) y NitG (B) de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con homólogos de otros microorganismos. Ppsal: *P. pseudoalcaligenes* CECT5344; **Pflu:** *Pseudomonas fluorescens*; **Pvir:** *Pseudomonas viridiflava*; **Psyr:** *Pseudomonas syringae*; **Pholu:** *Photorhabdus luminescens*; **Syn:** *Synechocystis* sp. PCC6803. Los aminoácidos marcados en negro son idénticos en todos los microorganismos mostrados, mientras que los marcados en gris son similares.

En la matriz de identidad (Tabla 13) se constata que se obtienen mayores niveles de identidad en la proteína NitB, alcanzando valores por encima del 90%. Los valores máximos de identidad se dan con las tres especies del género *Pseudomonas*. En el caso de NitG, el máximo valor de identidad es de 54,6%, correspondiéndose con *P. viridiflava*, seguida de las otras dos especies de *Pseudomonas*.

2.3. La agrupación génica *nit1C* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

A partir de las proteínas NitB y NitG inducidas por cianuro y glicolonitrilo se identificaron en el genoma de la estirpe CECT5344 los genes *nitB* y *nitG*, que las codifican. Estos dos genes se localizan en la misma región del genoma, formando parte de una agrupación génica denominada *nit1C*, previamente descrita por su participación en la degradación de nitrilos (Podar *et al.*, 2005), que incluye el gen *nitC* que codifica una posible nitrilasa. Esta agrupación génica *nit1C* de aproximadamente 7,8 kb (Acceso GenBank JF748722), incluye además otros seis genes (Fig. 20).

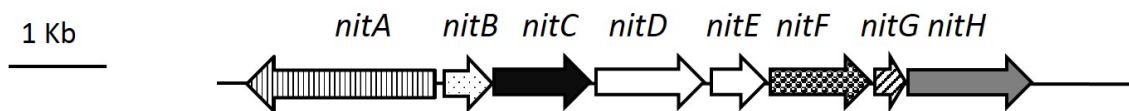


Figura 20. Agrupación génica *nit1C* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. En la agrupación génica *nit1C* se encuentran ocho genes que codifican las siguientes proteínas: NitA, regulador transcripcional con GAF (factor de activación gamma interferón), dominio de unión a ATPasa; NitB, proteína de función desconocida; NitC, nitrilasa; NitD, miembro de la familia S-adenosilmetionina (SAM); NitE, N-aciltransferasa relacionada con GCN-5; NitF, miembro de la familia AIRS/GARS; NitG, proteína de función desconocida; NitH, flavina oxidorreductasa dependiente de NADH.

En esta agrupación génica existe un solapamiento de 14 pb entre los genes *nitC* y *nitD* y de 8 pb entre *nitE* y *nitF*. Además, hay una región intergénica de 221 pb entre *nitA* y *nitB*. En base a estudios comparativos de secuencia, el gen *nitA* codifica un regulador transcripcional del tipo Fis dependiente de σ^{54} ; el producto del gen *nitC* presenta homología con nitrilasas de la subfamilia 1 (Podar *et al.*, 2005); *nitD* codifica una proteína con homología a miembros de la superfamilia S-adenosilmetionina (SAM), que participan en la rotura de los enlaces C-H durante la biosíntesis de vitaminas, coenzimas y antibióticos, así como en la reparación y modificación de ácidos nucleicos (Wang y Frey, 2007); el gen *nitE* codifica un miembro de la superfamilia N-aciltransferasa (GNAT), que utiliza acil-CoA para acilar determinados sustratos (Vetting *et al.*, 2004); el producto del gen *nitF* presenta homología con miembros de la familia AIRS (también llamada GARS), que presentan actividad fosforribosilglicinamida sintetasa formiltransferasa o fosforribosilglicinamida fosforribosilaminoimidazol sintetasa, necesarias para la síntesis *de novo* de purinas; y *nitH*, un gen que codifica una flavina oxidorreductasa dependiente de NADH. Algunas características de las proteínas codificadas en esta agrupación se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Características de las proteínas codificadas por la agrupación génica *nit1C* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

Gen	Proteína	Nº de acceso*	Posible Función	Longitud (aa)	Mr (Da)	pI
BN5_02402	NitA	H9N5E0	Regulador transcripcional dependiente de σ 54	640	72.568	6,00
BN5_02401	NitB	H9N5E2	Función desconocida	160	17.783	5,42
BN5_02400	NitC	H9N5E1	Nitrilasa	326	35.825	5,57
BN5_02399	NitD	H9N5E3	Miembro de la superfamilia S-adenosilmetionina (SAM)	366	38.943	6,49
BN5_02398	NitE	H9N5E4	Miembro de la superfamilia N-aciltransferasa (GNAT)	186	21.520	6,50
BN5_02397	NitF	H9N5E5	Miembro de la familia AIRS	340	36.245	5,03
BN5_02396	NitG	H9N5D9	Función desconocida	105	11.557	5,46
BN5_02395	NitH	H9N5D8	Oxidorreductasa dependiente de NADH	421	46.535	6,30

*En la base de datos Uniprot

Al igual que ocurre con NitB y NitG, el resto de proteínas codificadas por la agrupación génica *nit1C* de la estirpe CECT5344 presentan alta homología con proteínas de otras especies de *Pseudomonas* y otros microorganismos (Tabla 15). Miembros de α -, β -, γ - y δ -proteobacterias, enterobacterias y cianobacterias presentan homólogos a las proteínas Nit de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

Tabla 15. Identidad de las proteínas Nit de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con homólogos de otras especies bacterianas.

Proteína	<i>P. fluorescens</i> NCIMB 11764	<i>P. viridiflava</i> UASWS0038	<i>P. syringae</i> pv. <i>theae</i> ICMP 3923	<i>P. sp.</i> CF1164	<i>P. sp.</i> GM55 PM131	<i>P. sp.</i> GM33 PM126	<i>Photorabdus</i> <i>luminiscens</i> subesp. <i>laumondii</i> TT01	<i>Synechocystis</i>
NitA	73	74	74	75	74	74	57	57
NitB	93	94	94	93	92	92	88	72
NitC	80	81	83	83	88	88	80	60
NitD	82	81	79	81	81	81	64	55
NitE	67	67	62	65	65	64	53	49
NitF	67	66	66	68	66	68	50	42
NitG	60	56	60	63	62	62	45	33
NitH	79	78	76	76	78	78	58	57

Homología expresada en porcentaje de identidad.

En negrita se marca la máxima identidad.

La agrupación génica *nit1C* se encuentra en otros microorganismos. El operón *nit1C* presenta los mismos genes y en el mismo orden en otras *Pseudomonas* (Fig. 21). Por otra parte, la agrupación *nit1C* varía en otros géneros bacterianos con respecto a *Pseudomonas*, tal y como se muestra en la Figura 21. Así, en algunos casos esta agrupación incluye el gen *gst*, mientras que en otros casos el gen regulador está ausente o es de tipo *gntR*. Incluso en algunas especies como *Rhodococcus jostii* RHA1 el operón contiene dos genes que codifican posibles nitrilasas.

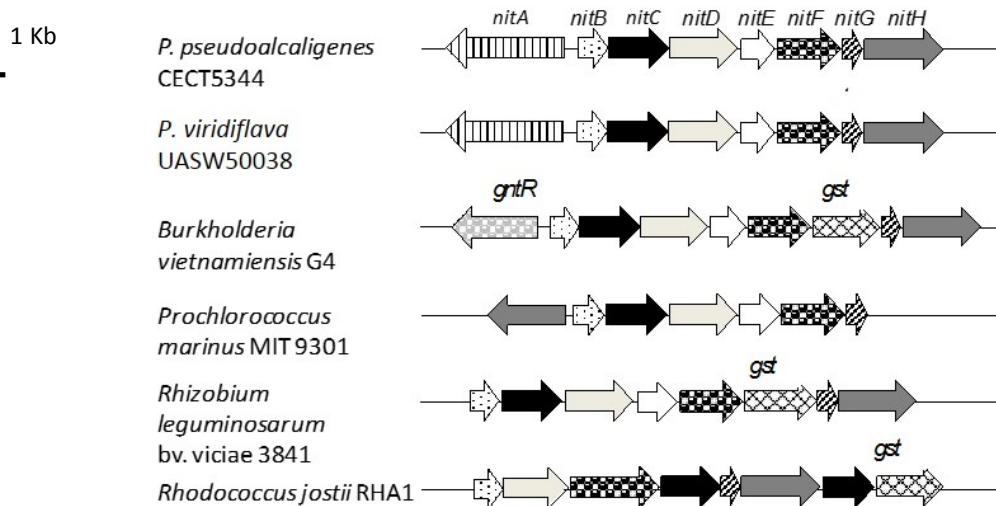


Figura 21. Organización génica *nit1C* de diferentes microorganismos. El gen *nitC* se marca en negro. Los genes *gst* y *gntR* codifican una glutatión S-transferasa y un regulador transcripcional, respectivamente.

Mientras que *nit1C* se encuentra en algunas especies de *Pseudomonas*, esta agrupación génica está ausente en otras especies que no asimilan cianuro de este género, pero estrechamente relacionadas con *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 como *P. mendocina* y *P. stutzeri* (Fig. 22).

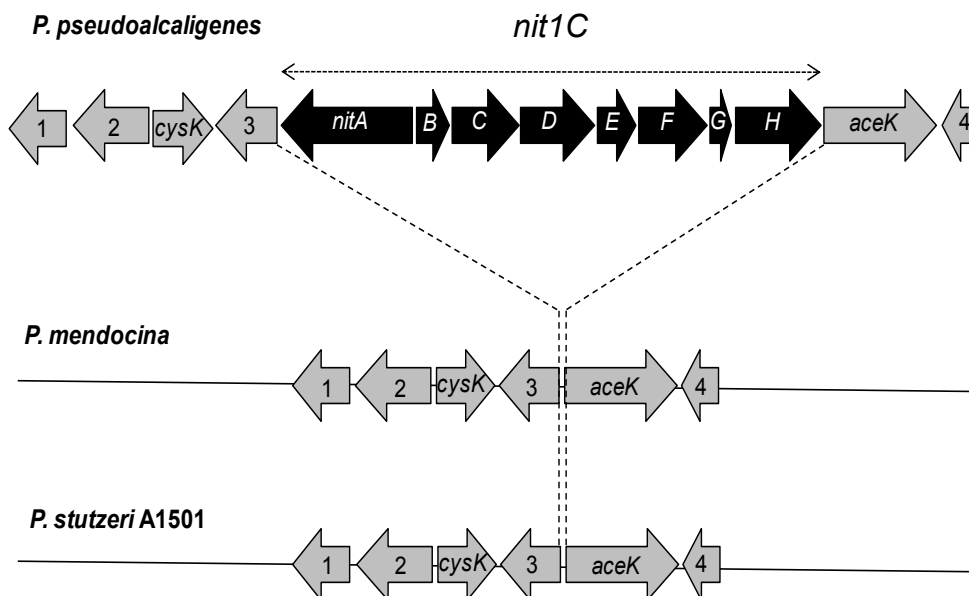


Figura 22. Ausencia de la agrupación *nit1C* en especies de *Pseudomonas* estrechamente relacionadas con *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Abreviaturas: *cysK*, cisteína sintasa; *aceK*, isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa. Números: 1. BN5_02407, Pmen_1788 y PST_2477 codifican una ATPasa de la familia AAA; 2. BN5_02406, Pmen_1789 y PST_2475 codifican una proteína de función desconocida; 3. BN5_02403, Pmen_1791 y PST_2474 codifican un transportador de carboxilato/aminoácidos/amina; 4. BN5_02392, Pmen_1793 y PST_2473 codifican una proteína de tipo β -lactamasa.

2.4. Análisis transcripcional de la agrupación génica *nit1C*

La agrupación génica *nit1C* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 presenta algunos genes que se encuentran solapados. Además, el gen *nitA* presenta una orientación opuesta a los genes *nitBCDEFGH*, sugiriendo que *nit1C* se transcribe al menos en dos unidades transcripcionales, *nitA* y *nitBCDEFGH*. Para confirmar esta hipótesis, así como su función en la degradación de cianuro, se llevó a cabo un análisis transcripcional mediante RT-PCR utilizando las parejas de oligonucleótidos que amplifican zonas de unión entre los distintos genes *nit* (Fig. 23A). Para ello, se utilizaron RNAs de células cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno y acetato como fuente de carbono, y se procedió a la síntesis de cDNA, que se utilizó posteriormente como molde para la amplificación por PCR de los fragmentos que comprenden los extremos de genes contiguos. Como se observa en la Figura 23, a partir del mRNA obtenido de células cultivadas con cianuro se obtuvieron las bandas correspondientes con los oligonucleótidos que unen *nitBC*, *nitCD*, *nitDE*, *nitEF*, *nitFG* y *nitGH*, mientras que no se obtuvo banda con los oligonucleótidos que unen *nitAB* (Fig. 23B). En el caso de los mRNA de amonio no se obtuvo amplificación con ninguna de las parejas de oligonucleótidos utilizadas (Fig. 23B). Como gen de referencia se utilizó el que codifica el RNA ribosómico 16S.

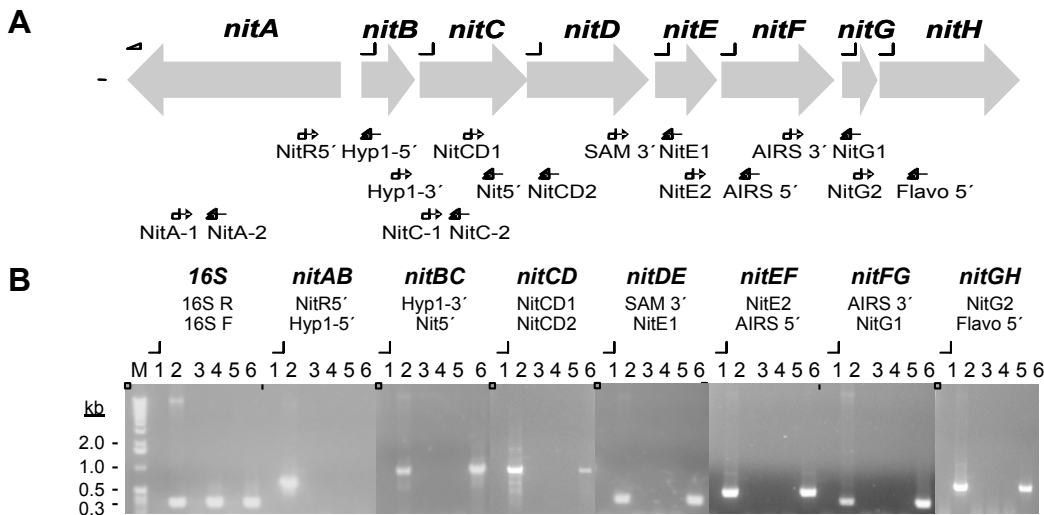


Figura 23. Análisis transcripcional de la agrupación génica *nit1C* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 por RT-PCR. A. Localización en *nit1C* de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR. **B.** Reacciones de RT-PCR con el mRNA aislado de la estirpe silvestre (WT) a partir de células cultivadas sin nitrógeno o con cianuro. Las células se cultivaron inicialmente con amonio 2 mM. Transcurridas 24 h, tiempo durante el cual los cultivos alcanzaron una A_{600nm} de aproximadamente 0,25 y utilizaron todo el amonio, se añadió al medio cianuro 2 mM (calles 5 y 6) o ninguna fuente de nitrógeno adicional (calles 3 y 4). M, marcador molecular X (Roche); calle 1, control negativo sin cadena molde; calle 2, control

positivo con DNA genómico como cadena molde; calles 3 y 4, reacciones RT-PCR con RNA aislado de células cultivadas en hambre de nitrógeno (-N), sin o con retrotranscriptasa, respectivamente; calles 5 y 6, reacciones RT-PCR con RNA aislado de células cultivadas con cianuro, sin o con retrotranscriptasa, respectivamente.

Para confirmar estos resultados, así como para cuantificar la expresión del gen regulador *nitA* y del gen *nitC* de la nitrilasa en diferentes fuentes de nitrógeno, se procedió a realizar RT-qPCR a partir del mRNA obtenido de células cultivadas con cianuro, amonio, cianuro y amonio, o en condiciones de hambre de nitrógeno (-N). Según los resultados obtenidos, *nitA* presentó valores de expresión basales en las cuatro condiciones estudiadas, no apreciándose diferencias significativas entre ellas. En el caso de *nitC*, su expresión en -N, amonio o amonio y cianuro fue basal y similar a la obtenida para *nitA*, pero la cantidad de transcrito correspondiente al gen estructural *nitC* en cianuro aumenta considerablemente. En estas condiciones cianotróficas la expresión de *nitA* fue aproximadamente 40 veces más baja que la expresión del gen *nitC* (Fig. 24).

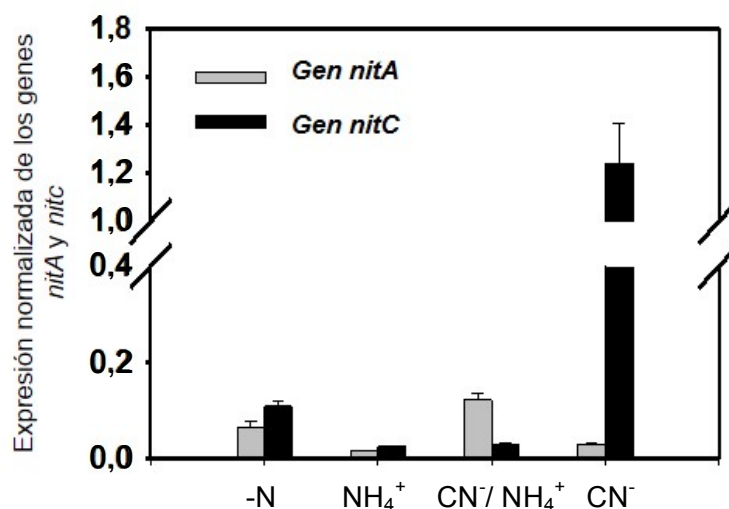


Figura 24. Análisis cuantitativo de la expresión de los genes *nitA* y *nitC* mediante qPCR. Los mRNA utilizados se aislaron de células de *P. pseudoalcaligenes* cultivadas con distintas fuentes de nitrógeno. Las barras de error representan la desviación estándar, calculada a partir de los resultados de tres experimentos independientes.

2.5. Obtención y caracterización fisiológica de mutantes deficientes en los genes *nitA*, *nitB* y *nitC*

El análisis proteómico y transcripcional mostrado indica que el cianuro induce expresión de los genes pertenecientes a la agrupación *nit1C*. Para estudiar la posible implicación de los genes *nit* en la asimilación de cianuro en

la estirpe CECT5344 se llevó a cabo la construcción de tres mutantes, en el gen regulador *nitA*, en el gen *nitB* que codifica una proteína de función desconocida y en el gen *nitC* que codifica la nitrilasa. El mutante NitA⁻ se construyó insertando en la región central de dicho gen el plásmido pK18mob que contiene un casete de resistencia a kanamicina. Los mutantes NitB⁻ y NitC⁻ se construyeron por inserción de un casete de resistencia a gentamicina. Los mutantes NitB⁻ y NitC⁻ se comprobaron mediante PCR amplificando la zona de inserción y comparando los resultados con los obtenidos para la estirpe silvestre. En ambos casos la inserción del “cassette” de resistencia a gentamicina incrementó en 1,1 kb la longitud del fragmento amplificado por PCR respecto a la estirpe silvestre (Fig. 25). Para confirmar la mutación en el mutante NitA⁻ se llevó a cabo una PCR con un oligonucleótido del gen *nitA* y otro del “cassette” de resistencia a kanamicina del plásmido pK18mob, obteniéndose amplificación en la estirpe mutante y ninguna amplificación en la estirpe silvestre (resultado no mostrado).

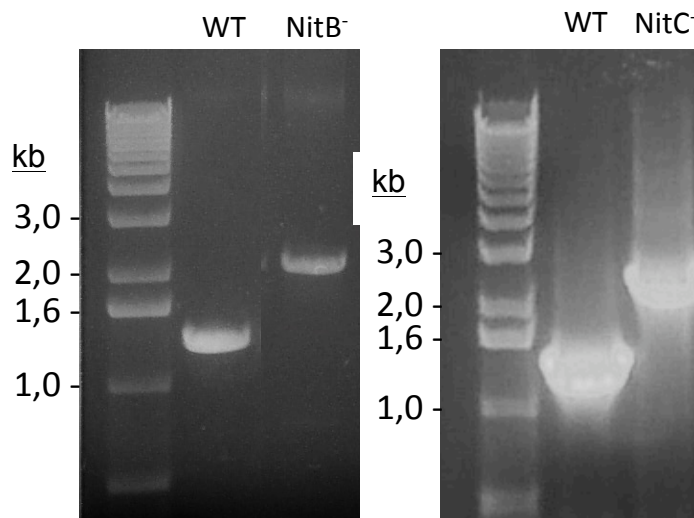


Figura 25. Comprobación de las mutaciones en las estirpes NitB⁻ y NitC⁻ mediante PCR. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se muestran en la Tabla 8.

Debido a la orientación del gen *nitA* su mutación no conlleva efecto polar sobre el resto de genes *nit*, sin embargo, los mutantes NitB⁻ y NitC⁻ si pueden presentar efecto polar aguas abajo de la inserción. Para estudiar el posible efecto polar de estas dos mutaciones se analizó la expresión de los genes situados aguas abajo usando los oligonucleótidos NitE2 y AIRS 5' (Fig. 23A y Tabla 8) para la región *nitE-nitF*. Para ello se llevó a cabo una RT-PCR con el mRNA de células de la estirpe silvestre y los mutantes NitB⁻ y NitC⁻, junto con NitA⁻ como control, cultivadas con cianuro. También se analizó como control la expresión del gen que codifica el RNA ribosómico 16S en todas las muestras. En las cuatro estirpes analizadas se observó la banda correspondiente al gen 16S, mientras que en el caso de la región *nitE-nitF* se observó banda en todas

las muestras excepto en la muestra obtenida del mutante NitA⁻ (Fig. 26). En ausencia de retrotranscriptasa (control negativo), no se amplificó banda en ninguna muestra. Estos datos descartaron el efecto polar de las mutaciones introducidas en los genes *nitB* o *nitC*, y además pusieron de manifiesto el papel positivo de NitA en la expresión del resto de genes de la agrupación génica *nit1C*.

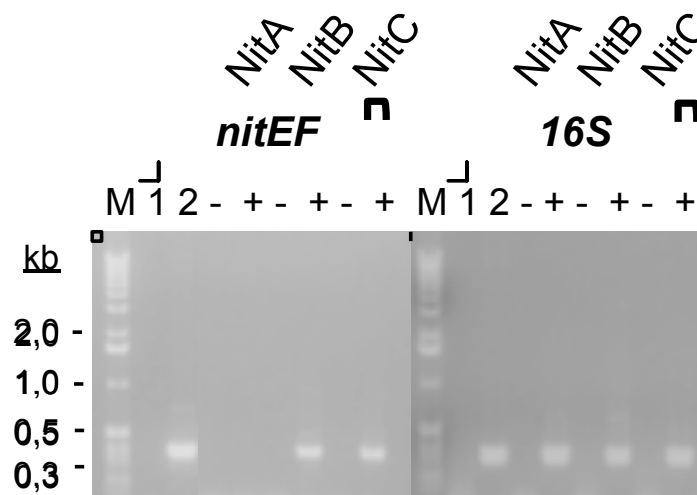


Figura 26. RT-PCR de la región *nitE-nitF* en los mutantes NitA⁻, NitB⁻ y NitC⁻ de *P. pseudoalcaligenes*. RNAs procedentes de células cultivadas con cianuro se analizaron mediante RT-PCR con los oligonucleótidos NitE2/AIRS 5' de la región *nitE-nitF*, y como control los oligonucleótidos 16SR/16SF correspondientes al gen que codifica el RNA ribosómico 16S. M, marcador de masa molecular; calle 1, control negativo sin molde; calle 2, control positivo con DNA genómico como molde; calles -, reacciones sin retrotranscriptasa; calles +, reacciones con retrotranscriptasa.

Una vez generados los mutantes NitA⁻, NitB⁻ y NitC⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se realizó su caracterización fisiológica en medios con cianuro como única fuente de nitrógeno. Para ello, la estirpe silvestre y los mutantes NitA⁻, NitB⁻ y NitC⁻ se precultivaron en medio mínimo con acetato 50 mM y amonio 2 mM durante 24 h, y una vez que se consumió todo el amonio, se añadió cianuro 2 mM y se determinó el crecimiento y la concentración de cianuro en el medio a lo largo del experimento (Fig. 27). Como se puede observar, la estirpe silvestre fue la que experimentó mayor crecimiento y consumo de cianuro. El fenotipo de los mutantes NitB⁻ y NitC⁻ fue similar, prácticamente nulo crecimiento y acumulación de 400 μ M de cianuro en el medio de cultivo (Fig. 27). Curiosamente, el mutante NitA⁻ creció algo más que los otros mutantes, siendo sin embargo la concentración de cianuro en el medio superior, aproximadamente 700 μ M. Como se detallará más adelante, la disminución de cianuro en los cultivos inoculados con los mutantes NitA, NitB y NitC no se debió a un consumo real de cianuro, sino a la formación y acumulación de una cianhidrina formada durante la asimilación de cianuro.

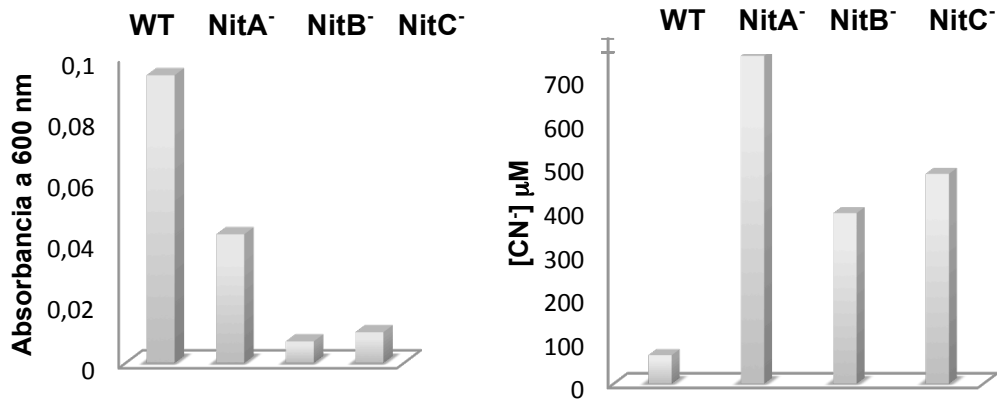


Figura 27. Crecimiento y consumo de cianuro por las estirpes silvestre y mutantes NitA⁻, NitB⁻ y NitC⁻ de *P. pseudoalcaligenes*. Las células se precultivaron con amonio 2 mM durante 24 h, tiempo durante el cual se consumió todo el amonio. En este momento se adicionó NaCN 2 mM. Los datos representados corresponden a un experimento representativo de cuatro realizados.

Una vez confirmada la implicación de los genes *nit1C* en la asimilación de cianuro se llevó a cabo la caracterización fisiológica de los mutantes realizando curvas de crecimiento en medio mínimo con cianuro o diferentes tipos de nitrilos. La caracterización fisiológica del mutante NitB⁻ reveló que este mutante es incapaz de crecer con cianuro o glicolonitrilo. Con amonio como fuente de nitrógeno este mutante creció de forma similar a la estirpe silvestre (Fig. 28).

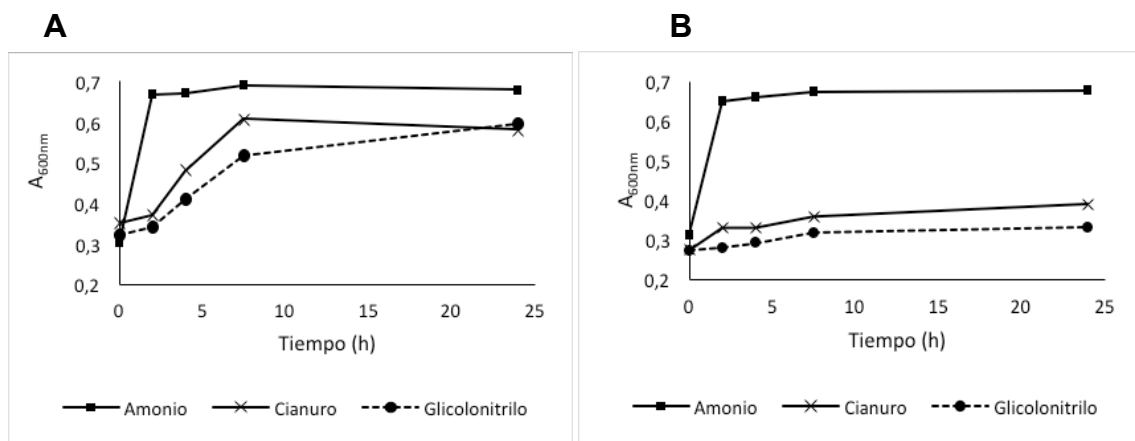


Figura 28. Crecimiento de las estirpes silvestre (A) y mutante NitB⁻ (B) de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con amonio, cianuro o glicolonitrilo como fuente de nitrógeno. Las células se precultivaron con amonio 2 mM durante 24 h, tiempo durante el cual se consumió todo el amonio. En este momento se adicionó 2 mM de la fuente de nitrógeno correspondiente. Los datos representados corresponden a una media realizada para cada punto a partir de tres cultivos independientes para cada estirpe.

Cuando se utilizó cianuro como fuente de nitrógeno, tanto la estirpe silvestre como el mutante NitB⁻ consumieron el cianuro durante la tres primeras horas aproximadamente a la misma velocidad. Sin embargo, mientras que la estirpe silvestre consumió completamente todo el cianuro, la concentración de cianuro en el cultivo de la estirpe mutante NitB⁻ se mantuvo constante a 0,45 mM hasta el final del experimento (Fig. 29).

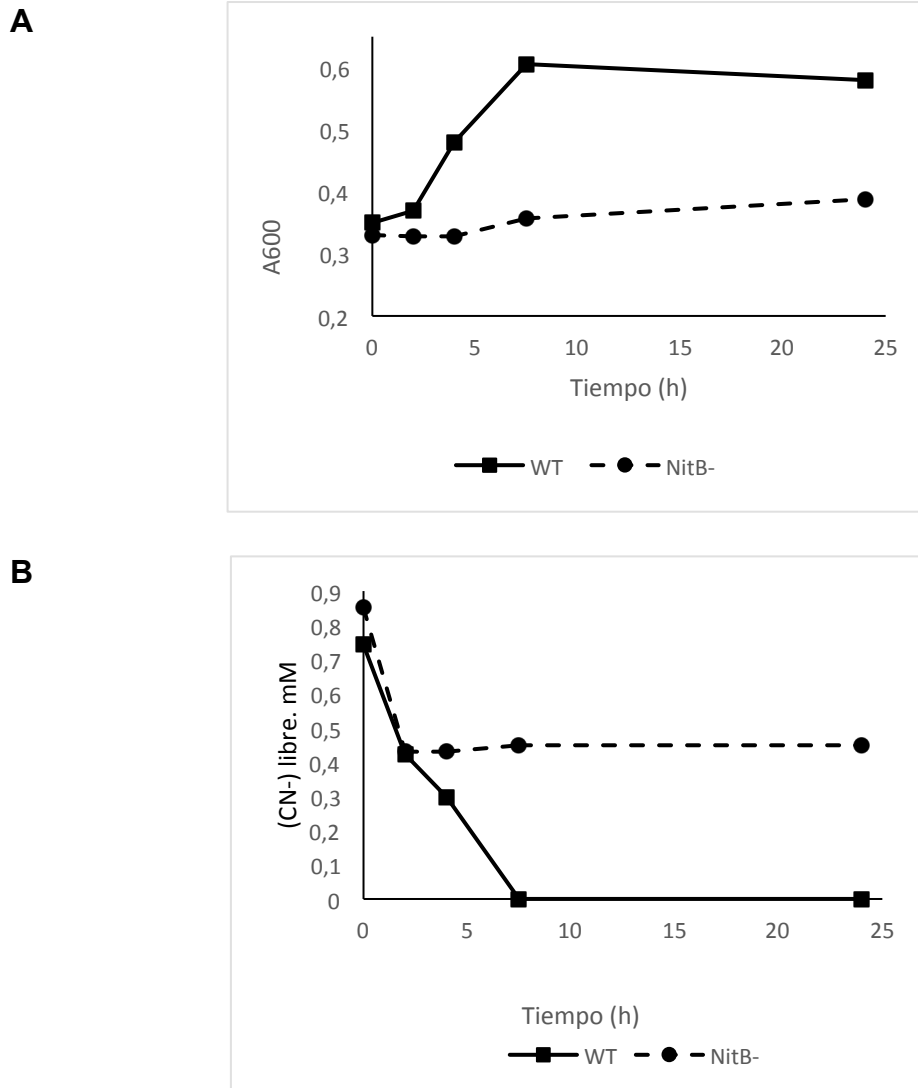


Figura 29. Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante NitB⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con cianuro. Las células se precultivaron con amonio 2 mM durante 24 h, tiempo durante el cual se consumió todo el amonio. En este momento se adicionó cianuro 2 mM, determinándose a partir de este momento tanto el crecimiento (A) como la concentración de cianuro (B) en el medio de cultivo. Los datos representados corresponden a una media realizada de tres cultivos independientes para cada estirpe.

Como se comentó anteriormente, la disminución del cianuro en cultivos inoculados con el mutante NitB⁻ no se debió a la asimilación del cianuro, sino a

la formación y acumulación de una cianhidrina intermediaria de la asimilación de cianuro. Este fenotipo se observó también en el mutante NitC⁻ (Fig. 30).

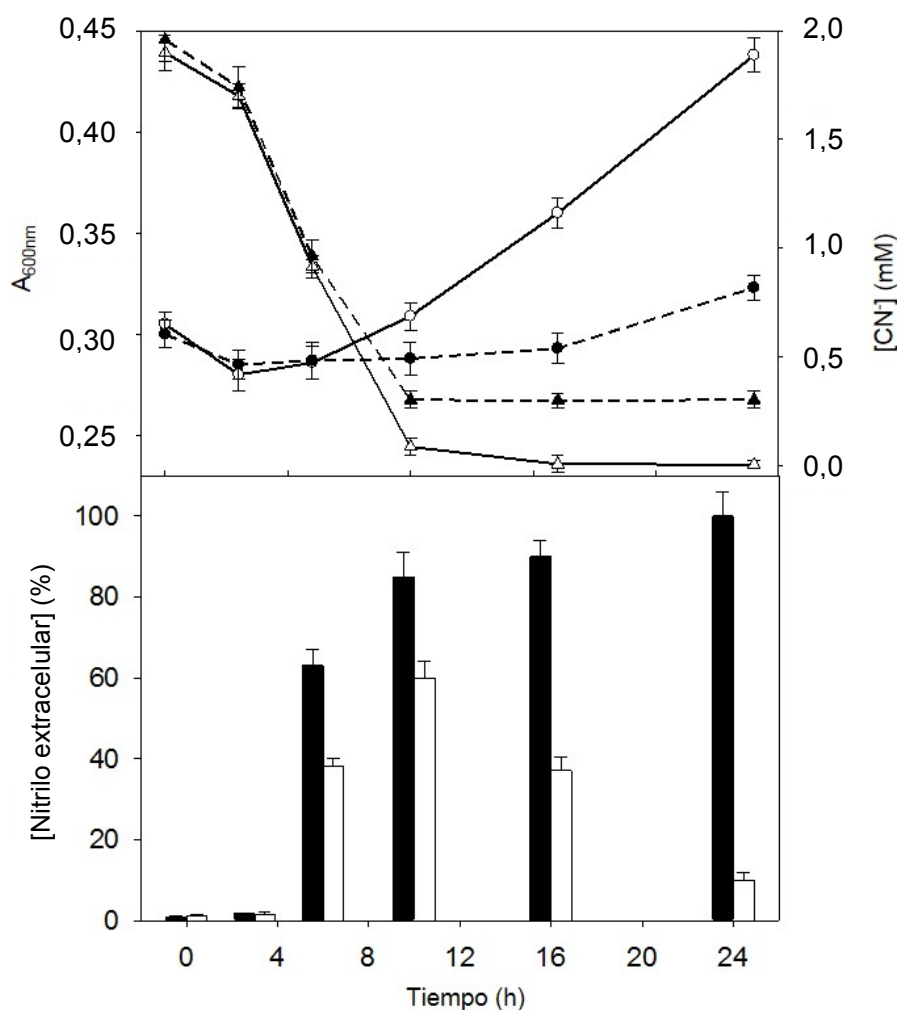


Figura 30. Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante NitC⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con cianuro. Ambas cepas se cultivaron con amonio 2 mM, y cuando se consumió la fuente de nitrógeno se añadió cianuro 2 mM como única fuente de nitrógeno (tiempo 0 en la figura). Se tomaron partes alícuotas a los tiempos indicados y se midió la absorbancia a 600nm de los cultivos de la cepa silvestre (línea continua y círculos vacíos) y el mutante NitC⁻ (línea discontinua y círculos rellenos). La concentración de cianuro en el medio se determinó colorimétricamente (Asmus y Garshchagen, 1953) tanto para la cepa silvestre (línea continua y triángulos vacíos) como en el mutante NitC⁻ (línea discontinua y triángulos rellenos). La producción del nitrilo o cianhidrina se determinó mediante análisis en HPLC tanto en la especie silvestre (barras blancas) como en el mutante NitC⁻ (barras negras). Las barras de error representan la desviación estándar calculada a partir de los resultados de tres experimentos independientes.

Al igual que NitB⁻, el mutante NitC⁻ fue incapaz de crecer en medios con cianuro como única fuente de nitrógeno (Fig. 30). Respecto al consumo de

cianuro, la estirpe silvestre lo consumió completamente a las 16 h de su adición, mientras que en el caso del mutante NitC⁻ la desaparición de cianuro no fue completa, sino que su concentración disminuyó hasta 0,3 mM durante las 10 primeras horas y permaneció constante hasta el final del experimento. Durante la asimilación de cianuro la estirpe silvestre acumuló en el medio un nitrilo de forma transitoria. Este nitrilo, identificado previamente como la cianhidrina del oxalacetato (Luque-Almagro *et al.*, 2011b), es acumulado en el mutante NitC⁻ sin ser posteriormente degradado (Fig. 30).

Para corroborar que las proteínas NitB y NitC son esenciales para la asimilación de la cianhidrina del oxalacetato, intermediario de la asimilación de cianuro, se cultivó la estirpe silvestre y el mutante NitB⁻ con la cianhidrina del oxalacetato y con las cianhidrinas del piruvato y del 2-oxoglutarato. Como estos compuestos no pueden obtenerse comercialmente, se sintetizaron en el laboratorio según se describió en un trabajo previo (Luque-Almagro, 2005).

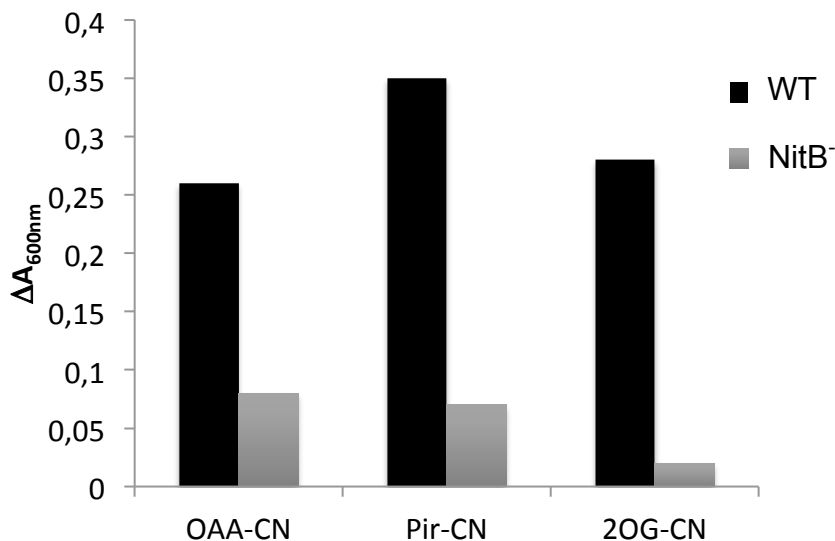


Figura 31. Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante NitB⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con diferentes cianhidrinas. Las células se precultivaron en amonio 2 mM durante 24 horas, momento en el que se centrifugó el cultivo y las células se resuspendieron en medio fresco con las cianhidrinas del oxalacetato (OAA-CN), piruvato (Pir-CN) y 2-oxoglutarato (2OG-CN) a una concentración final de 2 mM.

Como se observa en la Figura 31, a diferencia de la estirpe silvestre el mutante NitB⁻ fue incapaz de crecer con las diferentes cianhidrinas utilizadas, incluida la del oxalacetato. También se procedió a estudiar otros posibles sustratos de la nitrilasa NitC mediante el crecimiento de la estirpe NitB⁻ con la 3-cianoalanina o el lactonitrilo (Fig. 32), y el glutaronitrilo (Fig. 33), a una concentración 2 mM.

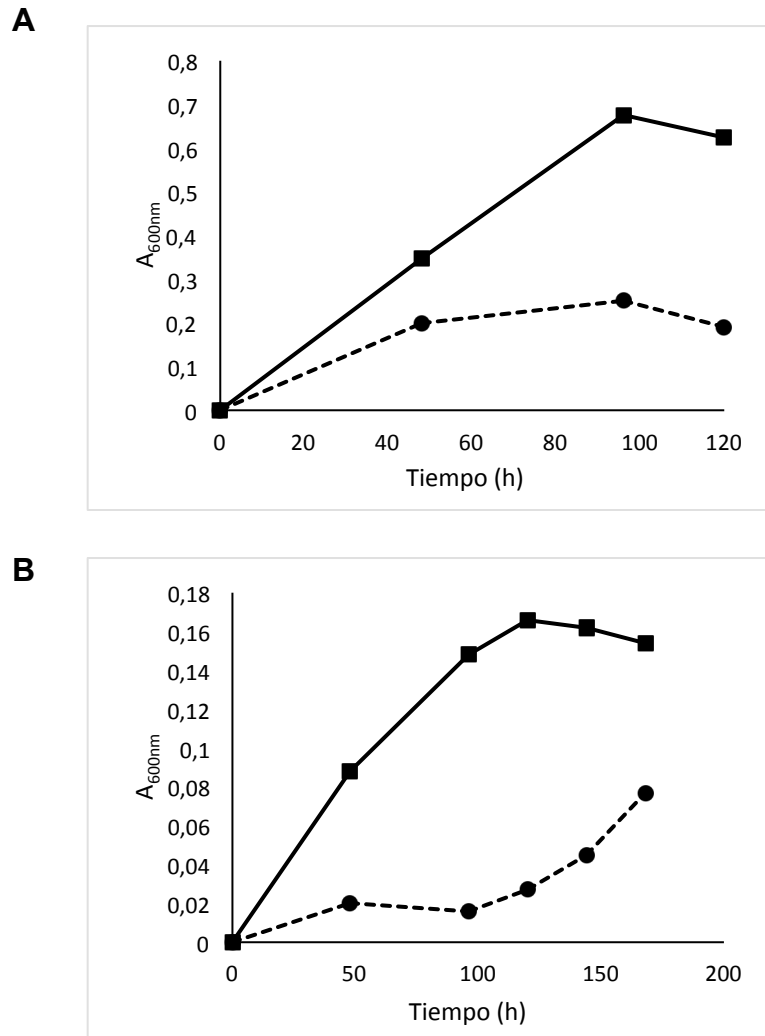


Figura 32. Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante NitB⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con los nitrilos 3-cianoalanina (A) o lactonitrilo (B). El medio M9 (pH 9,5) contenía acetato 50 mM como fuente de carbono y 3-cianoalanina o lactonitrilo 2 mM.

En todos los casos se observó una clara diferencia entre la estirpe silvestre y el mutante NitB⁻ (Figs. 32 y 33), siendo siempre inferior el crecimiento del mutante respecto a la estirpe silvestre. A pesar de esta diferencia, el mutante NitB⁻ creció ligeramente con todos los nitrilos utilizados.

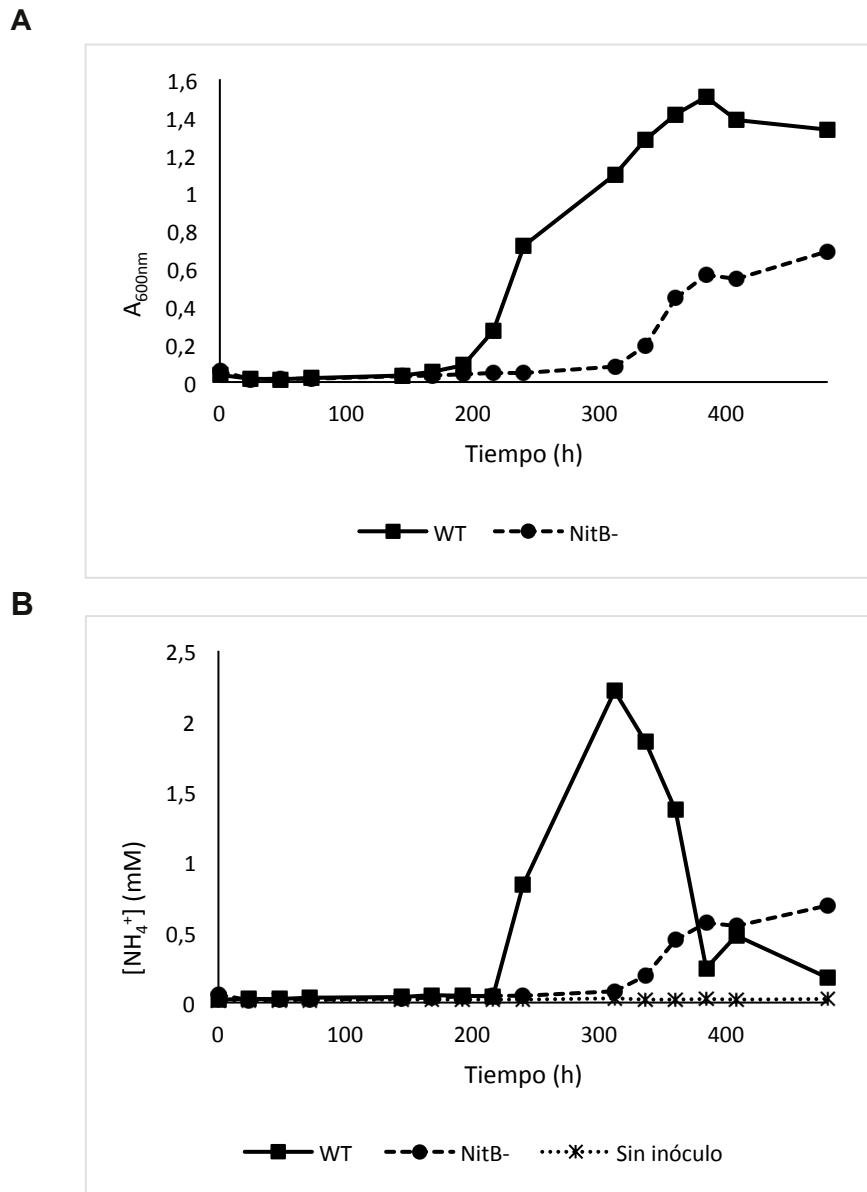


Figura 33. Crecimiento y producción de amonio de las estirpes silvestre y mutante NitB⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con glutaronitrilo. Las células se cultivaron en medio M9 con glutaronitrilo 2 mM como fuente de nitrógeno y acetato 50 mM como fuente de carbono, determinándose el crecimiento (A) y la concentración de amonio (B) en el medio.

Para comprobar que este crecimiento se debió a la utilización del nitrilo, y no a la posible producción química de amonio a partir de los nitrilos en las condiciones de cultivo utilizadas, se utilizó para uno de los nitrilos, el glutaronitrilo, un cultivo control sin inocular, determinándose la concentración de amonio tanto en este cultivo control como en los inoculados con la estirpe silvestre y el mutante NitB⁻. En el cultivo control no se generó amonio a lo largo del experimento, mientras que en los cultivos inoculados si se detectó amonio, con concentraciones máximas de 2 mM en el cultivo de la estirpe silvestre y 0,5 mM en el cultivo del mutante NitB⁻.

Tabla 16. Crecimiento de las estirpes silvestre y mutante NitC⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con distintos nitrilos como única fuente de nitrógeno.

	Nitrilo	Crecimiento [*] WT (%)	Crecimiento [*] NitC (%)	Fórmula linear
Alifáticos	2OG-CN ^a	100 ± 12	17 ± 0,5	HOOCCH ₂ CH ₂ C(OH)CNCOOH
	OAA-CN ^b	83 ± 8	28 ± 1	HOOCCH ₂ C(OH)CNCOOH
	2-Hidroxiisobutironitrilo ^c	22 ± 0,6	5 ± 0,05	(CH ₃) ₂ C(OH)CN
	Glicolnitrilo ^d	75 ± 8	14 ± 0,9	CH ₂ (OH)CN
	Lactonitrilo ^e	47 ± 5	19 ± 1	CH ₃ CH(OH)CN
	Acetonitrilo	0	0	CH ₃ CN
	Acrlonitrilo	0	0	CH ₂ CHCN
	Glutaronitrilo	89 ± 7	8 ± 0,04	NC(CH ₂) ₃ CN
	Undecil cianuro	0	0	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CN
Aromáticos	Benzonitrilo	0	0	C ₆ H ₅ CN
	Mandelonitrilo [†]	0	0	C ₆ H ₅ CH(OH)CN
	o-Tolunitrilo	0	0	CH ₃ C ₆ H ₄ CN
	4- Ácido Cianobenzoico	0	0	CNC ₆ H ₄ COOH
	Ptalonitrilo	0	0	CNC ₆ H ₄ COOH
	2-Etoxibenzonitrilo	0	0	CNC ₆ H ₄ (O)CH ₂ CH ₃
	2-Metoxibenzonitrilo	0	0	CNC ₆ H ₄ (O)CH ₃

*Crecimiento máximo expresado en porcentaje. Un 100% corresponde con una absorbancia a 600nm de 0,360, alcanzada con la cianhidrina (2-hidroxinitrilo) del 2-oxoglutarato como fuente de nitrógeno. La absorbancia inicial fue de 0,005 en todos los casos. Se usaron como fuente de nitrógeno los 2-hidroxinitrilos del 2-oxoglutarato (a), oxaloacetato (b), acetona (c), formaldehído (d), acetaldehído (e) y benzaldehído (f), entre otros.

El fenotipo que presentó el mutante NitC⁻ fue el mismo que se observó con el mutante NitB⁻ con estos nitrilos, es decir, escaso o nulo crecimiento con nitrilos como el glutaronitrilo o los 2-hidroxinitrilos de oxalacetato, 2-oxoglutarato, formaldehído o acetaldehído (Tabla 16). A diferencia de los nitrilos alifáticos, ni la estirpe silvestre ni el mutante NitC⁻ crecieron con nitrilos aromáticos (Tabla 16).

2.6. Determinación enzimática de la actividad nitrilasa

Para confirmar la función de la nitrilasa NitC de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en la degradación de cianuro se procedió a determinar dicha actividad en la estirpe silvestre y los mutantes NitB⁻ y NitC⁻. Todos los intentos que se realizaron para determinar la actividad nitrilasa en extractos acelulares, tanto en la fracción soluble como de membrana procedentes de células cultivadas con cianuro o glutaronitrilo como fuentes de nitrógeno fueron infructuosos. Sin embargo, suspensiones celulares obtenidas de igual forma pero sin proceder a su rotura dieron resultados positivos, lo que indica que esta actividad nitrilasa

podría ser sensible a los distintos métodos de rotura utilizados, sonicación y prensa de French.

Teniendo en cuenta esta limitación, la actividad nitrilasa se ensayó en suspensiones celulares obtenidas a partir de cultivos, tanto de la estirpe silvestre como de los mutantes NitB⁻ y NitC⁻, con amonio 2 mM como fuente inicial de nitrógeno, y a los que transcurridas 24 h se les añadió diferentes fuentes de nitrógeno, incluyendo amonio, nitrato, cianuro y amonio más cianuro, así como las cianhidrinas del 2-oxoglutarato y del oxalacetato, estas últimas sintetizadas *in vitro* como se especifica en la sección “Materiales y Métodos”. Los cultivos se incubaron durante 6 h y posteriormente se recogieron las células mediante centrifugación. El precipitado se resuspendió en tampón fosfato, ajustando la A_{600nm} a 1,7; obteniéndose así la suspensión celular en la que se determinó la actividad nitrilasa mediante la cuantificación del amonio formado a partir del glutaronitrilo como sustrato (Fig. 34).

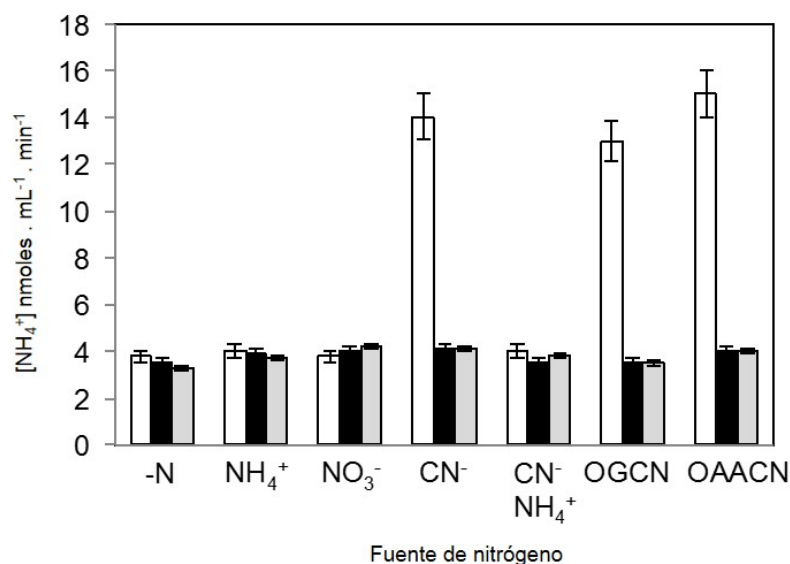


Figura 34. Actividad nitrilasa en las estirpes silvestre y mutantes NitB⁻ y NitC⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en medios con distintas fuentes de nitrógeno. La cepa silvestre (barras blancas) y los mutantes NitB⁻ (barras negras) y NitC⁻ (barras grises) se cultivaron con amonio 2 mM. Cuando se consumió dicho compuesto se añadieron las fuentes de nitrógeno indicadas hasta alcanzar una concentración final de 2 mM. La actividad nitrilasa se ensayó con glutaronitrilo 100 mM como sustrato. La concentración de amonio fue medida como se describe en el apartado de Materiales y Métodos, según el método descrito por Solorzano (1969). -N, sin nitrógeno; OGCN, 2-hidroxinitrilo del 2-oxoglutarato; OAACN, 2-hidroxinitrilo del oxalacetato. Los datos corresponden a la media de cuatro experimentos independientes.

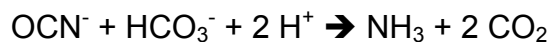
Los resultados obtenidos muestran que en todas las condiciones se detectó un nivel basal de actividad nitrilasa. Sin embargo, las células de la estirpe silvestre cultivadas con cianuro o cianhidrinas presentaron valores máximos de 13-14 $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. La actividad basal ($3,5 \pm 0,5 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) también se detectó en células cultivadas con cianuro y amonio. Usando glicolonitrilo como sustrato se obtuvieron resultados similares, con la máxima actividad alrededor de $9,0 \pm 0,8 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. A diferencia de la estirpe silvestre, en las estirpes mutantes NitB⁻ y NitC⁻ no se observaron valores máximos de actividad nitrilasa con cianuro o cianhidrinas similares a los encontrados en la estirpe silvestre, sino que en todas las condiciones la actividad fue equivalente a la actividad basal observada en la estirpe silvestre en ausencia de los inductores (Fig. 34).

3. Análisis funcional y genómico de otras proteínas inducidas por cianuro

En base a los datos obtenidos en la identificación de las proteínas inducidas en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en presencia de cianuro como única fuente de nitrógeno, se procedió a hacer una búsqueda del entorno génico de cada uno de los genes codificantes.

3.1. Cianasa (CynS)

La cianasa (EC 4.2.1.104) es una enzima que cataliza la reacción:



El análisis de la secuencia de CynS de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 reveló la presencia de tres residuos aminoacídicos (Arg⁸⁷, Glu⁹⁰ y Ser¹¹³) pertenecientes al sitio activo de la proteína (Fig. 35).

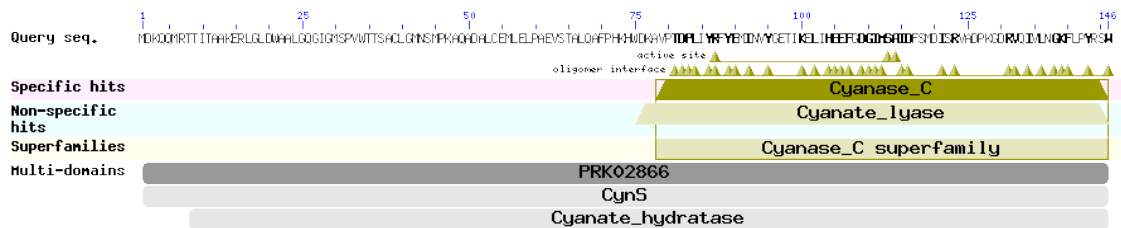


Figura 35. Dominios conservados en CynS de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Según la base de datos de dominios conservados CDD (NCBI).

El gen que codifica la cianasa (*cynS*) se encuentra en un operón (Fig. 36) junto con otros genes que codifican las proteínas CynF (regulador tipo Fis con dominio PAS), CynA (proteína de unión a sustrato de un transportador del tipo ABC), CynB (permeasa del transportador ABC) y CynD (ATPasa del transportador ABC) situados aguas arriba. Los dos genes siguientes situados aguas arriba de estos, *gltD3* y *gltB*, se encuentran en orientación opuesta a los del operón y codifican las dos subunidades de una glutamato sintasa (subunidades α y β respectivamente). Aguas abajo de *cynS* se localizan los genes *hemE* (descarboxilasa de uroporfirinógeno), BN5_00448 y BN5_00449, que codifican una transposasa y una proteína de función desconocida, y *parA*, que codifica una sintasa del ácido cobálico, un precursor de la vitamina B12.

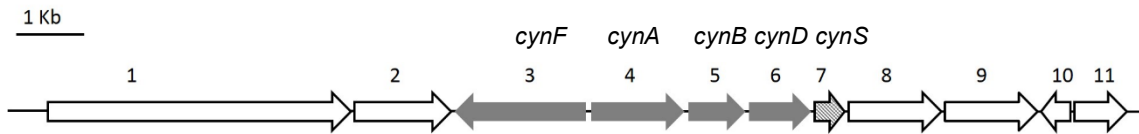


Figura 36. Agrupación génica *cynS* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. 1, *gltB*; 2, *gltD3*; 3, *cynF*; 4, *cynA*; 5, *cynB*; 6, *cynD*; 7, *cynS*; 8, *hemE*; 9, BN5_00448; 10, BN5_00449; y 11, *parA*.

3.2. Dihidropicolinato sintasa (DapA), fosfoserina aminotransferasa (SerC) y proteína Orf1

Los genes que codifican la dihidropicolinato sintasa (DapA), la fosfoserina aminotransferasa (SerC) y la proteína de función desconocida Orf1, forman parte del operón *cio1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, en el que se encuentran los genes que codifican la oxidasa terminal insensible a cianuro CioAB (Quesada *et al.*, 2007). Aguas abajo del gen *dapA* se localizan los genes BN5_01625 (codifica un transportador tipo MFS), *metF* (codifica una metilentetrahidrofolato reductasa), *cysM* (codifica una cisteína sintasa), *maeB* (codifica la enzima málica dependiente de NADP) y *nit4* (codifica una nitrilasa). Aguas arriba del gen *dapA* se encuentran los genes *argD* de una succinildiaminopimelato aminotransferasa e *hisC* de una histinidol-fosfato aminotransferasa, seguidos del gen *serC*, cuyo producto también fue identificado en este estudio proteómico. El gen *orf1* se encuentra aguas arriba de *serC*, junto a los genes *cioA* y *cioB*, que codifican la citocromo oxidasa terminal insensible a cianuro. Aguas arriba de *orf1* se encuentran los genes *sir3* de una sulfito reductasa, *mocR* de un regulador transcripcional de la familia GntR y BN5_01635 que codifica una 2-dehidro-3-desoxifosfogluconato aldolasa (Fig. 37).



Figura 37. Entorno génico de los genes *dapA* de la dihidropicolinato sintasa, *serC* de la fosfoserina aminotransferasa y *orf1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. 1, *nit4*; 2, *maeB*; 3, *cysM*; 4, *metF*; 5, BN5_01625; 6, *dapA*; 7, *argD*; 8, *hisC*; 9, *serC*; 10, *cioB*; 11, *cioA*; 12, *orf1*; 13, *sir3*; 14, *mocR*; y 15, BN5_01635.

3.3. Superóxido dismutasa (SodB)

Los estudios proteómicos realizados desvelaron la inducción por cianuro de una superóxido dismutasa (Fig. 13; Tablas 9 y 10). Según el entorno génico del gen que la codifica (Fig. 38), aguas arriba de este gen *sodB* se encuentran los genes BN5_02884, BN5_02885 y BN5_02886 que codifican proteínas de función desconocida, *moxR*, que codifica la subunidad de una proteasa Clp dependiente de ATP, y BN5_02888, también de función desconocida.

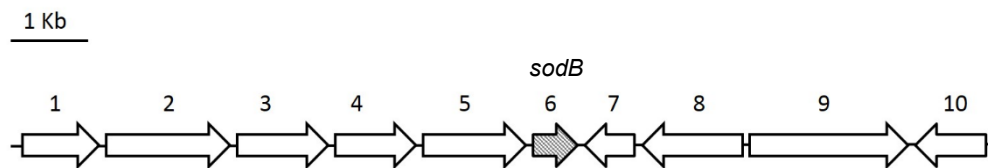


Figura 38. Entorno génico del gen *sodB* que codifica la superóxido dismutasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 inducida por cianuro. 1, BN5_02884; 2, BN5_02885; 3, BN5_02886; 4, *moxR*; 5, BN5_02888; 6, *sodB*; 7, BN5_02890; 8, *amt*; 9, BN5_02892; y 10, BN5_02893.

Aguas abajo se localizan dos genes en una orientación opuesta a *sodB*, BN5_02890 y *amt*, que codifican una proteína de función desconocida y un transportador de amonio, respectivamente, seguidos de los genes BN5_02892 y BN5_02893 que codifican proteínas de función desconocida.

3.4. Ferritina (Dps)

Aguas arriba del gen *dps*, que codifica una ferritina inducida por cianuro (Fig. 39), se localizan dos genes con la misma orientación que este (*cspA1* y BN5_00975) que codifican una proteína de unión a DNA, que podría proteger frente a shock por bajada de temperatura, y una diguanilato ciclasa, respectivamente. Los dos genes siguientes se encuentran en orientación opuesta y son BN5_00972 y *slyX*, que codifican dos proteínas de función desconocida, siendo la proteína que codifica el gen BN5_00972 un miembro de la familia HIT, caracterizada por presentar una triada de histidinas que podría unir zinc. Por otra parte, aguas abajo y en la misma orientación que *dps* se localizan los genes BN5_00977 y BN5_00978 que codifican fosfohidrolasas dependientes de metales. Los tres genes siguientes (*aspS*, BN5_00980 y *ruvC*) codifican una aspartil-tRNA sintetasa, una proteína de función desconocida y una resolvasa de unión “Holliday”, respectivamente.

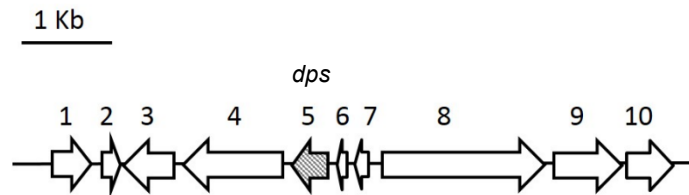


Figura 39. Entorno génico del gen *dps* de la ferritina de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 inducida por cianuro. 1, BN5_00972; 2, *slyX*; 3, *cspA1*; 4, BN5_00975; 5, *dps*; 6, BN5_00977; 7, BN5_00978; 8, *aspS*; 9, BN5_00980; y 10, *ruvC*.

Un análisis filogenético de la ferritina Dps de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con homólogos del género *Pseudomonas* puso de manifiesto dos grupos diferentes, situándose la ferritina de la estirpe CECT5344 en el grupo de *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. stutzeri* y *P. fulva*, entre otras (Fig. 40).

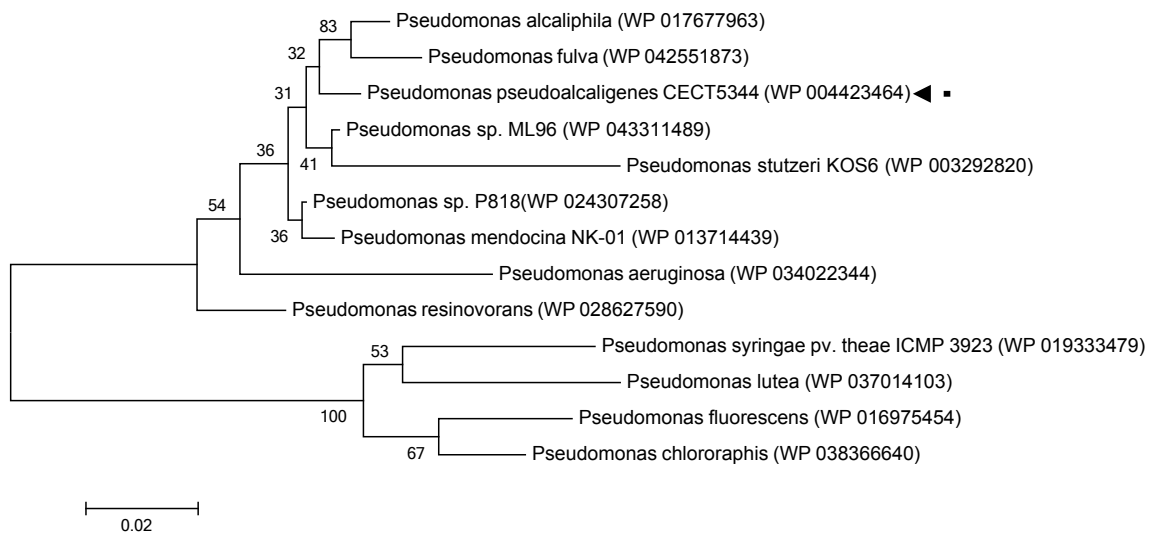


Figura 40. Relación filogenética de la ferritina de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con homólogos de otras estirpes de *Pseudomonas*. El árbol filogenético se realizó usando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) y con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Con una flecha se indica la estirpe *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

3.5. Oxidorreductasa (Fpr)

El gen *fpr* codifica una oxidorreductasa inducida en presencia de cianuro. Como se observa en la Figura 41, aguas arriba del gen *fpr* se localizan BN5_01000 (función desconocida), BN5_01001 (componente de la familia de reguladores transcripcionales LuxR), *dgkA* y *rscR* (regulador transcripcional de

la familia LysR), y aguas abajo se localizan los genes *ppiA* (peptidil-prolil isomerasa), *mhpC* (lactonasa de 3-oxoadipato), BN5_01007 (regulador transcripcional de la familia LysR), BN5_01008 (función desconocida) y *acpD* (NAD(P)H deshidrogenasa).

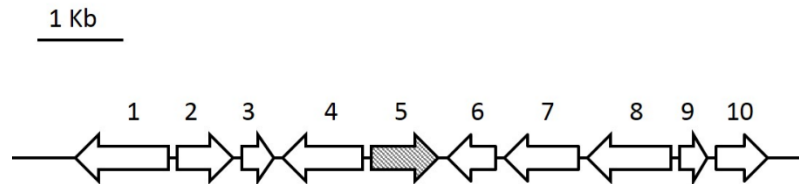


Figura 41. Entorno génico del gen de la fosfoserina aminotransferasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 inducida por cianuro. 1, BN5_01000; 2, BN5_01001; 3, *dgkA*; 4, *rscR*; 5, *fpr*; 6, *ppiA*; 7, *mhpC*; 8, BN5_01007; 9, BN5_01008; y 10, *acpD*.

En un análisis filogenético de la proteína Fpr de distintas estirpes del género *Pseudomonas* se observó que la proteína Fpr de *P. stutzeri* se diferencia del resto de proteínas Fpr presentes en otras especies de *Pseudomonas*. La proteína Fpr de la estirpe CECT5344 se encuentra muy cercana filogenéticamente a la proteína de *P. mendocina* (Fig. 42).

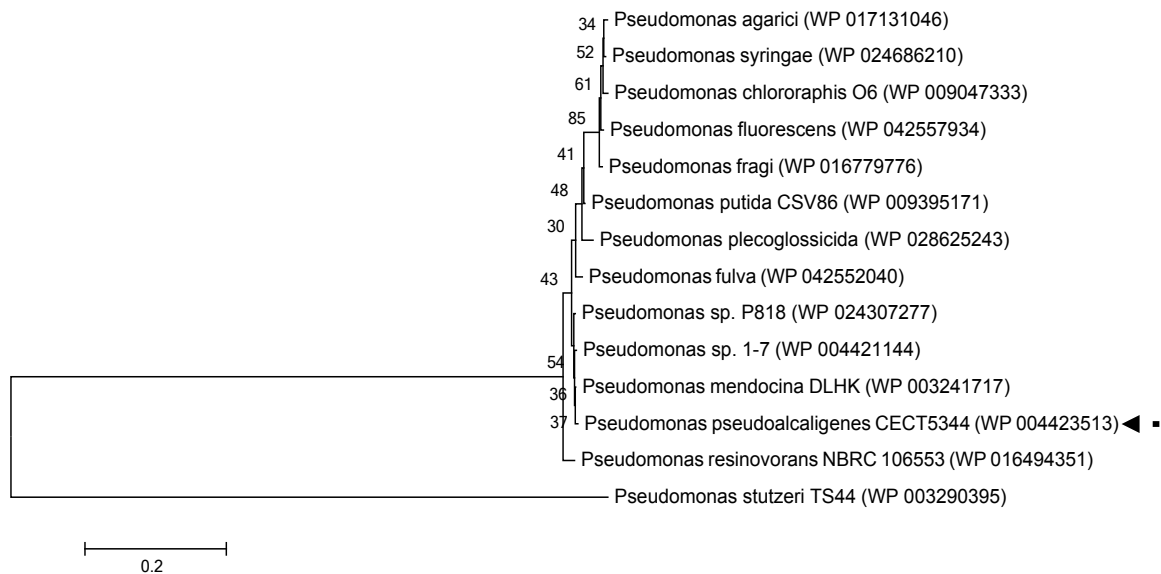


Figura 42. Relación filogenética de la proteína Fpr de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con homólogos de otras estirpes de *Pseudomonas*. El árbol filogenético se realizó usando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). El análisis evolutivo se llevó a cabo con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Con una flecha se indica la estirpe *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

Resultados

Capítulo 2

Genoma de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: caracterización y análisis comparativo

1. Secuenciación y ensamblaje del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

La secuenciación completa del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se llevó a cabo mediante una estrategia combinada consistente en la 454-pirosecuenciación de fragmentos aleatorios de todo el genoma (whole-genome-shotgun) y la estrategia de lecturas pareadas (3K Paired-end). Para cubrir los huecos no secuenciados entre “contigs” se realizaron reacciones de PCR, secuenciándose los amplicones por el método de Sanger. Una vez obtenidas las lecturas especificadas en la Tabla 17, estas se ensamblaron en 11 scaffolds que fueron mapeados usando como referencia el genoma de *Pseudomonas mendocina* ymp. Además, el orden de los scaffolds se llevó a cabo analizando las lecturas de los extremos de dichos scaffolds y mediante el análisis de la cobertura de las lecturas de los contigs. Finalmente se obtuvo un borrador del cromosoma circular de un tamaño de 4,65 Mb, que fue depositado en las bases de datos con el número de acceso PRJEB27. Este genoma tiene un contenido de G+C del 62,37% y su anotación reveló la presencia de 4 384 genes, de los cuales 4320 codifican proteínas.

Tabla 17. Resultados de la secuenciación y ensamblaje del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

Secuenciación		
454-pirosecuenciación	Lecturas	Bases (Millones)
Whole-genome-shotgun	154 259	36
3K Paired-ende	724 771	150

Ensamblaje		
Técnica	Características	
<i>De novo</i>	“Contigs largos” (≥ 500 bp)	164
	“Contigs cortos” (≤ 500 bp)	256
	Longitud total	4,61 Mb
	Lecturas ensambladas	97%
	Cobertura de secuencia	x37
3K Paired-end	“Scaffolds”	11
	Huecos	144
Cierre huecos por PCR	“Contigs”	24
	Longitud total	4,65 Mb

Posterior a este trabajo, se ha secuenciado completamente el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 mediante el ensamblaje de unas pocas lecturas largas obtenida por secuenciación a tiempo real de una sola molécula mediante el sistema PacBio. El tamaño final del genoma completo secuenciado fue de 4,68 Mb, conteniendo un total de 4 513 genes (Wibberg *et al.*, 2014).

2. Estudio taxonómico de la estirpe *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

En estudios previos esta bacteria se clasificó como *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en función de su rRNA 16S (Luque-Almagro *et al.*, 2005b). Una vez secuenciado su genoma, la clasificación taxonómica de este microorganismo se puede realizar de forma más precisa, tanto mediante el análisis comparativo de varias proteínas muy conservadas como a través del análisis de todos los genes. La girasa B (GyrB) y el factor sigma de la RNA polimerasa (RpoD) son dos proteínas muy conservadas que se suelen utilizar para estudios filogenéticos, por lo que ambas proteínas se emplearon para la clasificación taxonómica de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Para ello se utilizaron las secuencias aminoacídicas concatenadas de ambas proteínas pertenecientes a varios miembros de la familia *Pseudomonaceae* (Fig. 43).

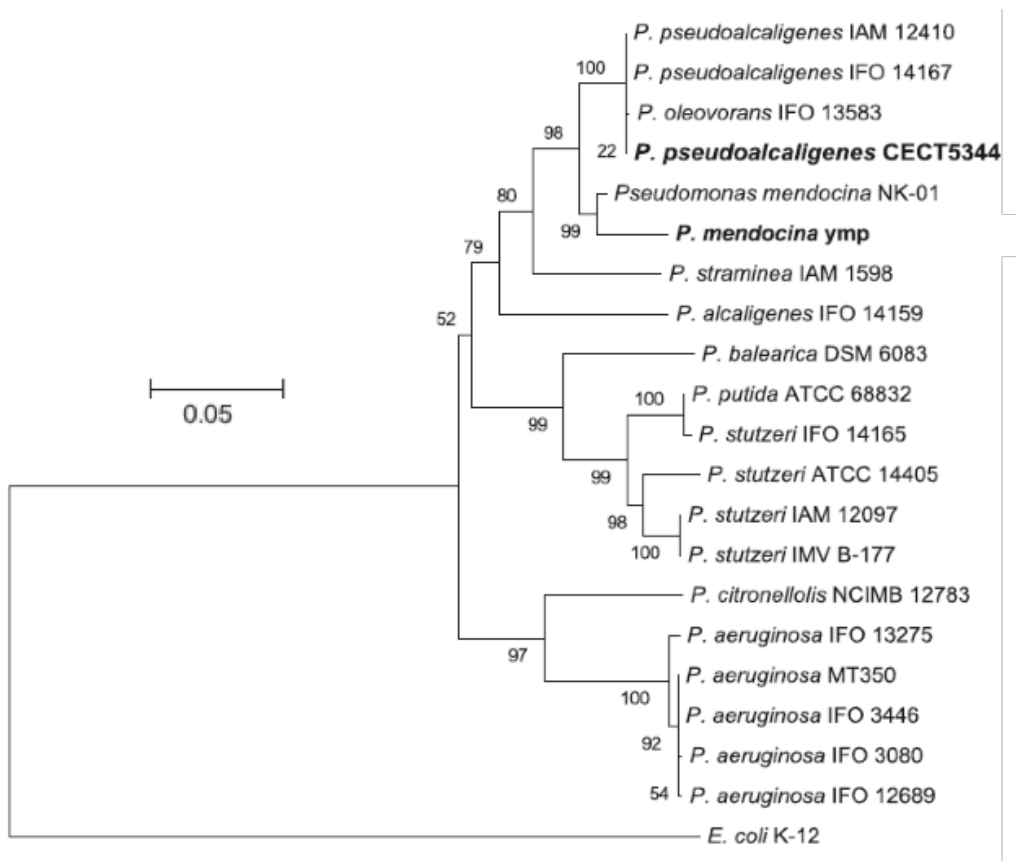


Figura 43. Árbol filogenético de varias estirpes de *Pseudomonas* basado en las proteínas GyrB y RpoD. El análisis filogenético se realizó con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). En negrita se marcan *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y la estirpe ymp de *P. mendocina*. El genoma de esta última fue utilizado como referencia durante el ensamblaje del genoma de la estirpe CECT5344.

En el árbol filogenético obtenido se pueden observar dos grupos diferenciados, uno constituido por *P. aeruginosa* y *P. citronellis*, y otro formado por el resto de especies, incluida *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Fig. 43). Esta estirpe se encuentra cercana a otras estirpes de *P. pseudoalcaligenes* y a *P. oleovorans*. Posteriormente se llevó a cabo un análisis filogenético de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 teniendo en cuenta todos los genes que comparten todas las estirpes de *Pseudomonas* que se utilizaron en este análisis. De acuerdo a los resultados obtenidos la estirpe *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se encuentra más cercana a *P. mendocina* y *P. stutzeri* que a *P. pseudoalcaligenes* KF707 (Fig. 44).

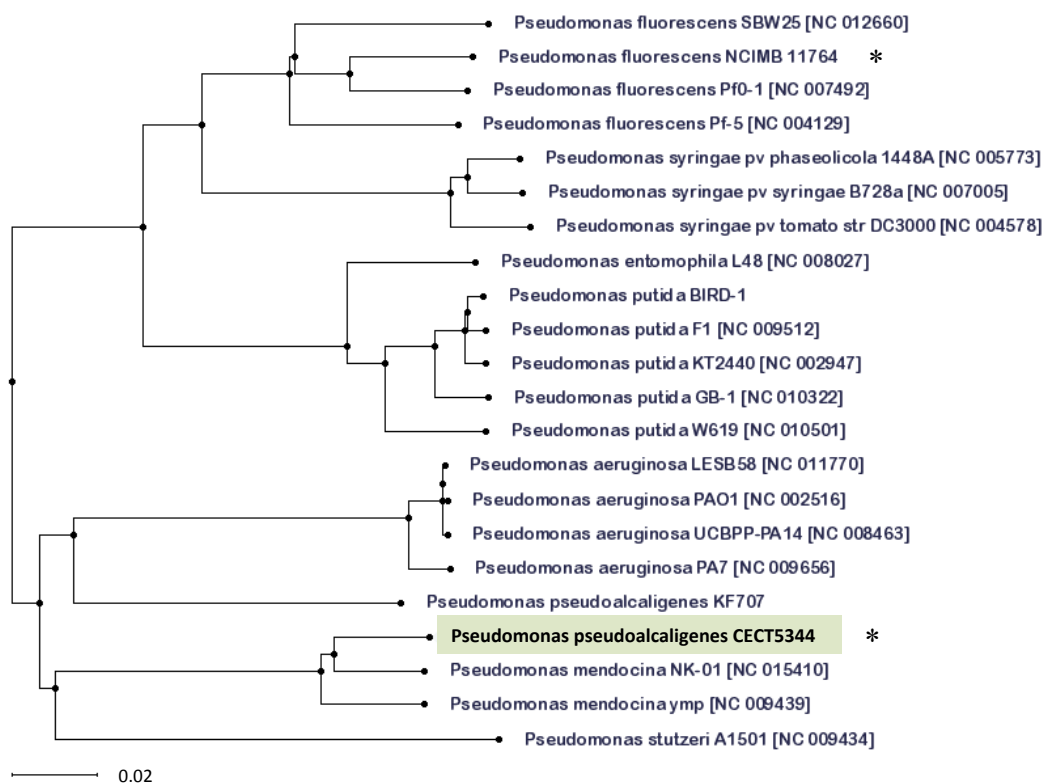


Figura 44. Filogenia de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en función de su genoma. El árbol filogenético se llevó a cabo usando la herramienta EDGAR. Con asteriscos se indican las dos estirpes cianotrofas de *Pseudomonas*.

3. Análisis evolutivo del genoma de la estirpe *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

Con el objetivo de conocer la distribución filogenética de los genes de la estirpe CECT5344 se realizó un análisis comparativo basado en la distribución del mejor resultado BLAST de los genes que codifican proteínas (Tabla 18). Según este análisis, el mayor número de resultados obtenidos con una identidad del 90% corresponde a genes de la clase Bacteroidetes (49,42 % del total de resultados), seguido de Gammaproteobacterias (32,62%).

Tabla 18. Distribución filogenética de los genes de la estirpe CECT5344.

Phylum/Clase	Nº de resultados 90% ^a	% resultados 90% ^b
Actinobacteria	3	0,07
Bacteroidetes	2 135	49,42
Cloroflexi	2	0,05
Cianobacteria	1	0,02
Betaproteobacteria	54	1,25
Gammaproteobacteria	1 409	32,62
No clasificado	10	0,23
No asignado	706	16,34

^aIndica el número de genes de la estirpe CECT5344 que presentaron una identidad al menos del 90% con genes de organismos incluidos en un phylum/clase distinta a la de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

^bResultados expresados en tanto por ciento.

Por otra parte se han identificado genes que podrían haber sido adquiridos por *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 a través de mecanismos de transferencia horizontal (Tabla 19). Para estudiar esta hipótesis se llevó a cabo un análisis muy restrictivo, en el que un gen se consideró adquirido por transferencia horizontal cuando todos los homólogos del análisis BLAST pertenecieron a un organismo incluido en un grupo (Dominio, Phylum, Clase u Orden) diferente al de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Según este análisis, un total de 16 genes de la estirpe CECT5344 habrían sido adquiridos por transferencia horizontal, procediendo el mayor número de ellos (5) del Orden Alteromonadales. Un análisis menos restrictivo, basado en el mejor resultado BLAST de los genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, puso de manifiesto la posible adquisición de 167 genes mediante transferencia horizontal, de los que el mayor número (65) procedería de miembros de la clase Betaproteobacteria. Entre los microorganismos que podrían haber cedido genes mediante transferencia horizontal a *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se encuentran *Alcanivorax dieselolei* B5, *Marinobacter manganoxidans* Mnl7-9, *Klebsiella pneumoniae* KPNIH18, *Citrobacter freundii* 4_7_47CFAA y *Comamonas composti* DSM21721. La mayoría de los genes se presentan de forma aislada, aunque otros genes se localizan en la misma región, indicando una posible transferencia de agrupaciones génicas. En varios casos estas

agrupaciones se encuentran flanqueadas por transposones, lo que apoya la posible transferencia horizontal.

Tabla 19. Genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 adquiridos mediante transferencia horizontal.

Posible origen de la transferencia horizontal (grupo al que pertenece la estirpe CECT5344)	^a En base al mejor resultado	^b En base a todos los resultados
Dominio (Bacteria)		
Virus	1	1
Phylum (Proteobacteria)		
Cyanobacteria	4	-
Verrucomicrobia	1	-
Clase (γ-proteobacteria)		
α -proteobacteria	9	1
β -proteobacteria	60	1
Chlorobia	1	-
δ -proteobacteria	1	1
Orden (Pseudomonadales)		
Aeromonadales	2	-
Alteromonadales	23	5
Burkholderiales	17	2
Chlorobiales	1	-
Chromatiales	2	1
Chroococcales	1	-
Desulfovibrionales	1	-
Enterobacteriales	11	1
Kiloniellales	1	-
Methylococcales	1	-
Nitrosomonadales	1	-
Oceanospirillales	17	1
Rhizobiales	5	-
Rhodocyclales	3	1
Thiotrichales	1	1
Xanthomonadales	3	-

^aGenes que presentan máxima identidad con genes de un grupo distinto al que pertenece *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

^bGenes que presentan homólogos con genes de un grupo distinto al que pertenece *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

4. Transportadores, proteínas transmembrana y proteínas extracelulares de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

El genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 contiene 277 genes que codifican posibles proteínas transportadoras. Entre estos transportadores la mayoría son de tipo ABC (TC:3.A.1), constituyendo el 73% del total. El 21,90% de genes codifican proteínas transmembrana, mientras que el 8,76% proteínas con péptido señal y, por consiguiente, de localización extracitoplásmica (Tabla 20).

Tabla 20. Clasificación de los genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en función de la localización celular de las proteínas que codifican.

Categoría génica	Nº de genes	% del total
Genes que codifican proteínas de la clasificación de transportadores (TC)	277	6,32
Genes que codifican proteínas transmembrana	960	21,90
Genes que codifican proteínas con péptido señal	384	8,76

5. Análisis funcional del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

El análisis funcional de un genoma permite predecir el potencial metabólico de un organismo. En la Tabla 21 se muestra la clasificación de los genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 según diversas bases de datos funcionales y de familias de proteínas. El número de genes a los que se les ha podido asignar una función es escaso según algunas bases de datos (TIGRfam 36,69%, términos IMG 23,88%), pero con otras bases de datos se ha podido establecer una posible función a un elevado porcentaje de genes codificantes (COG 80,91% y Pfam 87,11%).

Tabla 21. Clasificación de los genes codificantes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 según varias bases de datos funcionales.

	Nº genes	% del total
Genes codificantes con predicción de función	3 696	84,31
Genes codificantes de enzimas	1 090	24,86
Genes de candidatos KO basados en enzimas	59	1,35
Genes codificantes de miembros de rutas KEGG	1 205	27,49
Genes codificantes de miembros de KEGG Orthology (KO)	2 264	51,64
Genes codificantes de miembros de rutas MetaCyc	1 071	24,43
Genes codificantes con COGs asignado	3 547	80,91
Genes codificantes con dominios Pfam	3 819	87,11
Genes codificantes con dominios TIGRfam	1 477	33,69
Genes codificantes con términos IMG	1 047	23,88
Genes codificantes de miembros de rutas IMG	353	8,05
Genes codificantes con Lista de Partes	405	9,24
Genes codificantes en agrupaciones parálogas	3 482	79,43

El análisis específico de los genes que codifican enzimas indica que entre éstas las más abundantes son las enzimas con actividad transferasa, seguidas de hidrolasas y oxidoreductasas (Fig. 45). De todos los genes que codifican enzimas se han identificado 19 que codifican histidina quinasa, correspondiéndose con las enzimas más abundantes en este organismo. Entre estos genes que codifican enzimas también se han identificado cuatro genes que codifican nitrilasas (ver apartado 7.1).

El análisis de la secuencia del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con las bases de datos que han asignado posibles funciones a un mayor número de genes codificantes, Pfam y COG, se muestra en la Tabla 22.

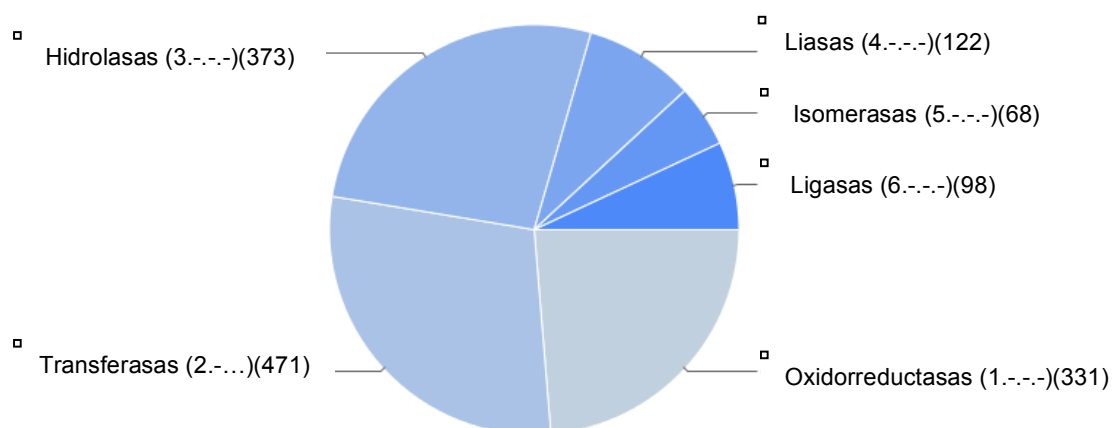


Figura 45. Clasificación de las posibles enzimas codificadas en el genoma de la estirpe CECT5344. Entre paréntesis se indica el número de genes que codifican los distintos tipos de enzimas.

Tabla 22. Clasificación funcional de los genes codificantes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 según las bases de datos COG y Pfam.

Categoría funcional	COG		Pfam	
	Nº genes	% del total (3 938)	Nº genes	% del total (4 545)
Metabolismo y transporte de aminoácidos	357	9,07	142	3,12
Predicción de función general	475	2,06	166	3,65
Producción y conversión de energía	229	5,82	142	3,12
Metabolismo y transporte de lípidos	147	3,73	54	1,19
Traducción, biogénesis y estructura ribosomal	182	4,62	169	3,72
Modificación post-traducciona, recambio de proteínas, chaperonas	156	3,96	99	2,18
Mecanismos de transducción de la señal	272	6,91	98	2,16
Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios	84	2,13	26	0,57
Metabolismo y transporte de coenzimas	161	4,09	112	2,46
Metabolismo y transporte de carbohidratos	129	3,28	58	1,28
Metabolismo y transporte de nucleótidos	82	2,08	45	0,99
Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	215	5,46	108	2,38
Procesamiento y modificación de RNA	1	0,03	-	0
Replicación, recombinación y reparación	278	7,06	191	4,20
Función desconocida	341	8,66	219	4,82
Biogénesis de membrana y pared celular	192	4,88	115	2,53
Control del ciclo celular y división celular	48	1,22	24	0,53
Mecanismos de defensa	59	1,50	10	0,22
Transcripción	304	7,72	69	1,52
Movilidad celular	116	2,95	66	1,45
No clasificadas	837	19,09	2 571	56,57

Según las bases de datos COG y Pfam las categorías funcionales más representadas en el genoma de la estirpe CECT5344 son “metabolismo y transporte de aminoácidos”, “replicación, recombinación y reparación”,

“predicción de función general” y “función desconocida”. Los dominios proteicos Pfam más abundantes entre las posibles proteínas codificadas en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 corresponden a dominios de transportadores y reguladores. Entre los primeros se encuentran los dominios pfam00005 (transportadores de tipo ABC) y pfam00528 (componente de membrana interna de sistemas de transporte dependientes de proteínas de unión), con 66 y 47 genes, respectivamente. Entre los dominios reguladores se encuentran los dominios pfam00072 (dominio receptor del regulador de respuesta), pfam03466 (dominio de unión a sustrato LysR), y pfam00126 (familia LysR correspondiente a proteína reguladora hélice-giro-hélice), con 60, 54 y 48 genes, respectivamente. Entre las categorías funcionales COG, las más abundantes corresponden a COG0583 (regulador transcripcional), COG0840 (proteína de quimiotaxis-aceptores de metilo), COG0834 (sistemas de transducción de la señal/transporte de aminoácidos de tipo ABC) y COG0642 (histidina quinasa de transducción de la señal), con 52, 27, 24 y 23 genes, respectivamente. Según la base de datos TIGRfam (Tabla 23), las categorías funcionales más representadas en el genoma de la estirpe CECT5344 son las de “proteínas de unión y transporte”, “metabolismo energético” y “síntesis de proteínas”. De acuerdo a esta base de datos el genoma contiene dos genes que codifican posibles nitrilasas de la familia sII0784 (TIGR04048).

Tabla 23. Clasificación funcional de los genes codificantes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 según TIGRfam.

Categorías	Nº genes	% del total
Biosíntesis de aminoácidos	72	4,23
Biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y transportadores	117	6,87
Envoltura celular	74	4,35
Procesos celulares	120	7,05
Metabolismo intermediario central	38	2,23
Metabolismo del DNA	81	4,76
Metabolismo energético	160	9,40
Metabolismo de fosfolípidos y ácidos grasos	37	2,17
Proteínas hipotéticas	28	1,65
Funciones de elementos extracromosómicos y móviles	47	2,76
Destino de proteínas	92	5,41
Síntesis de proteínas	157	9,22
Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos	47	2,76
Funciones reguladoras	91	5,35
Transducción de la señal	46	2,70
Transcripción	29	1,70
Proteínas de unión y transporte	188	11,05
Función desconocida	85	4,99
No clasificadas	193	11,34

Las bacterias, y especialmente el género *Pseudomonas*, se caracterizan por poseer una adaptabilidad excepcional a diversos nichos ecológicos, incluyendo aquellos en los que hay presentes compuestos tóxicos. Esta

capacidad se debe en parte a los sistemas reguladores de transducción de la señal, encargados de desencadenar una respuesta celular determinada en respuesta a una señal extracelular. En el estudio de la degradación de un compuesto tóxico resulta crucial el estudio de las proteínas que participan en la red de comunicación que desencadena un tóxico y la respuesta que la célula pone en marcha. Debido a la importancia del estudio de los genes que codifican los sistemas de transducción de la señal en microorganismos capaces de metabolizar determinados compuestos tóxicos, en este trabajo se han identificado y clasificado, según la base de datos MiST2 (Ulrich y Zhulin, 2010), los potenciales genes reguladores de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 que participan en la transducción de la señal (Fig. 46), así como el perfil de los dominios que participan en este mecanismo regulador (Fig. 47).

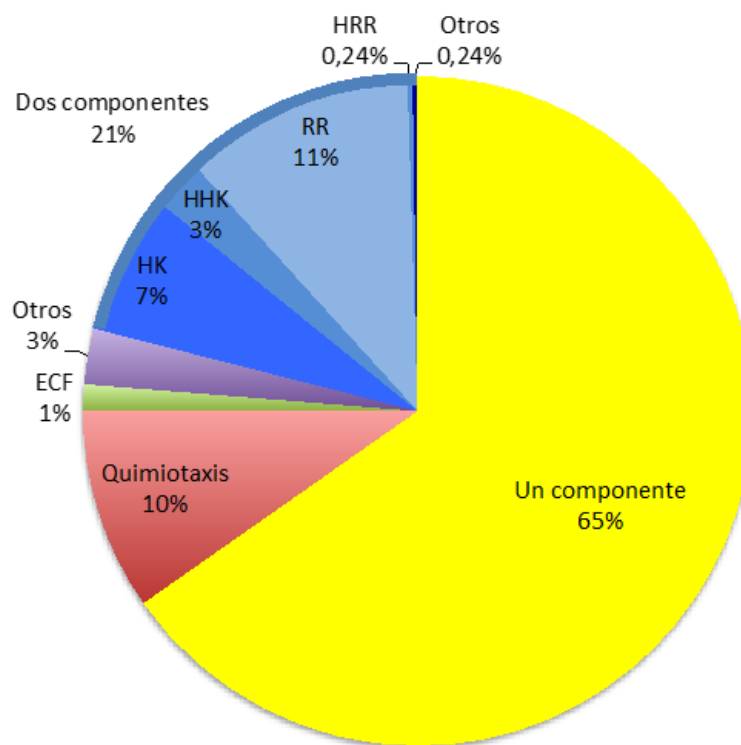


Figura 46. Identificación y clasificación de los genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 que participan en la transducción de la señal. El análisis del genoma se llevó a cabo con la base de datos MiST2. En azul se muestran los sistemas de dos componentes, a excepción de la quimiotaxis que se considera una forma especializada de los sistemas de dos componentes. ECF: factores sigma extracitoplásmicos; HK: histidina quinasa; HHK: híbrido de histidina quinasa; HRR: híbrido de regulador de la respuesta; RR: regulador de respuesta.

En total se han identificado 409 genes que probablemente participan en la transducción de la señal en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. La mayoría de ellos, el 65%, son sistemas de un sólo componente, mientras que los sistemas de dos componentes constituyen el 21% del total. Respecto a las proteínas que

participan en la transducción de la señal en la quimiotaxis, un tipo especial de sistema de dos componentes, se han identificado 40 genes (10%).

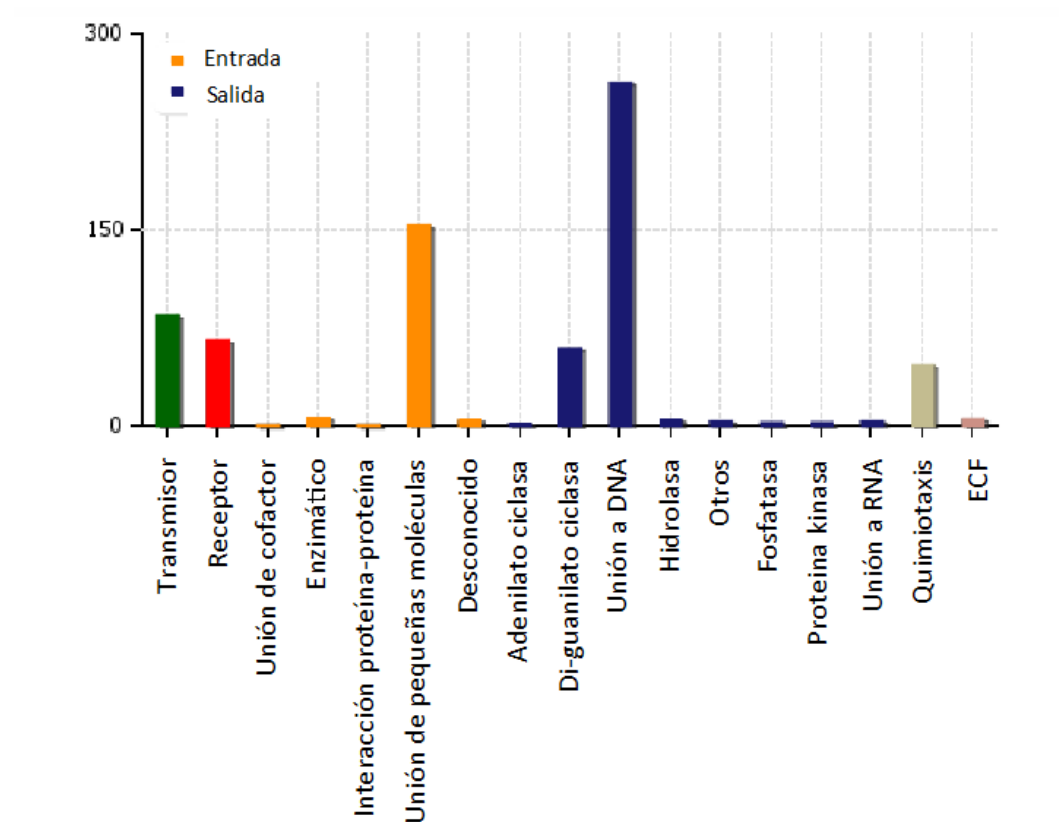


Figura 47. Perfil de los sistemas de transducción de la señal en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Predicción basada en el análisis del genoma y según la base de datos MiST2. Verde: dominios transmisores; rojo: dominios receptores; naranja: dominios de entrada/módulos sensores; azul: dominios de salida/módulos efectores reguladores; beis: dominios relacionados con quimiotaxis; rosa: factores sigma extracitoplásmicos (ECF).

Según el perfil de los sistemas de transducción de la señal identificados en la estirpe CECT5344 el dominio funcional más abundante en la entrada de la señal es el de unión de pequeñas moléculas, mientras que el de salida de la señal es el de unión a DNA (Fig. 47).

6. Análisis comparativo del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

P. pseudoalcaligenes CECT5344 posee un genoma con un tamaño algo inferior a la mayoría de la especies de referencia del género *Pseudomonas* (Tabla 24), pero es de resaltar que el porcentaje de DNA codificante de la estirpe CECT5344 es uno de los mayores de los genomas de *Pseudomonas*.

Tabla 24. Características del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y otras estirpes de *Pseudomonas*.

Estirpe ¹ (Acceso GenBank)	Longitud (pb) ³	G+C (%) ³	Genes ²	Proteínas	Codificante (%) ²	tRNA ²	rRNA ²
Ppsal CECT5344 (PRJEB27)	4 656 168	62,37	4 384	4 320	98,54	61	7
Ppsal KF707 (AJMR00000000)	5 957 359	64,24	6 620	6 512	—	81	27
Pmen ymp (CP000680.1)	5 072 807	64,70	4 730	4 594	90,7	67	12
Paer PAO1 (AE004091.2)	6 264 404	66,6	5 680	5 574	89,8	63	13
Pent L48 (CT573326.1)	5 888 780	64,2	5 293	5 134	89,8	78	22
Pflu Pf0-1 (CP000094.2)	6 438 405	60,6	5 741	5 722	90,0	73	19
Pput KT2440 (AE015451.1)	6 181 863	61,5	5 481	—	87,5	74	22
Pstut A1501 (CP000304.1)	4 567 418	63,9	4 237	4 127	90,3	61	13
Psyr B728a (CP000075.1)	6 093 698	59,2	5 245	—	88,7	64	16

¹Estirpes: Ppsal, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*; Pmen, *Pseudomonas mendocina*; Paer, *Pseudomonas aeruginosa*; Pent, *Pseudomonas entomophila*; Pflu, *Pseudomonas fluorescens*; Pput, *Pseudomonas putida*; Pstut, *Pseudomonas stutzeri*; Psyr, *Pseudomonas syringae*.

²Genes, % codificante y contenido de rRNA y tRNA tomado de la base de datos "Integrated Microbial Genomes" (IMG). Datos de *P. fluorescens* Pf0-1 tomados de Silby *et al.*, 2009.

³Longitud y G+C tomados de [http:// www.Pseudomonas.com](http://www.Pseudomonas.com)

Como se comentó previamente, un análisis evolutivo del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 indicó que la mayoría de sus genes presenta más de un 90% de identidad con genes del *phylum* Bacteroidetes. En *P. pseudoalcaligenes* KF707, *P. mendocina* ymp y *P. fluorescens* NCIMB11764 la mayoría de los genes presentaron una identidad mayor del 90% con genes de Gammaproteobacterias. Respecto a los posibles genes adquiridos mediante transferencia horizontal, al igual que en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, en las estirpes *P. pseudoalcaligenes* KF707, *P. mendocina* ymp y *P. fluorescens*

NCIMB11764 la mayoría de los genes podrían tener su origen en Betaproteobacterias.

La comparación funcional del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con otros genomas reveló que a nivel de COGs o TIGRpfam no se observan apenas diferencias entre las distintas especies de *Pseudomonas* analizadas. Sin embargo, en la distribución funcional según la base de datos Pfam sí se presentan diferencias (Fig. 48). Las dos estirpes de *P. pseudoalcaligenes* se diferenciaron del resto por poseer una mayor proporción de genes para el “procesamiento y modificación del RNA”, “biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios”, y “transcripción”, mientras que la proporción de genes relacionados con “replicación, recombinación y reparación” y “traducción, biogénesis y estructura ribosomal” fue muy inferior en *P. pseudoalcaligenes* respecto a las otras tres especies de *Pseudomonas*.

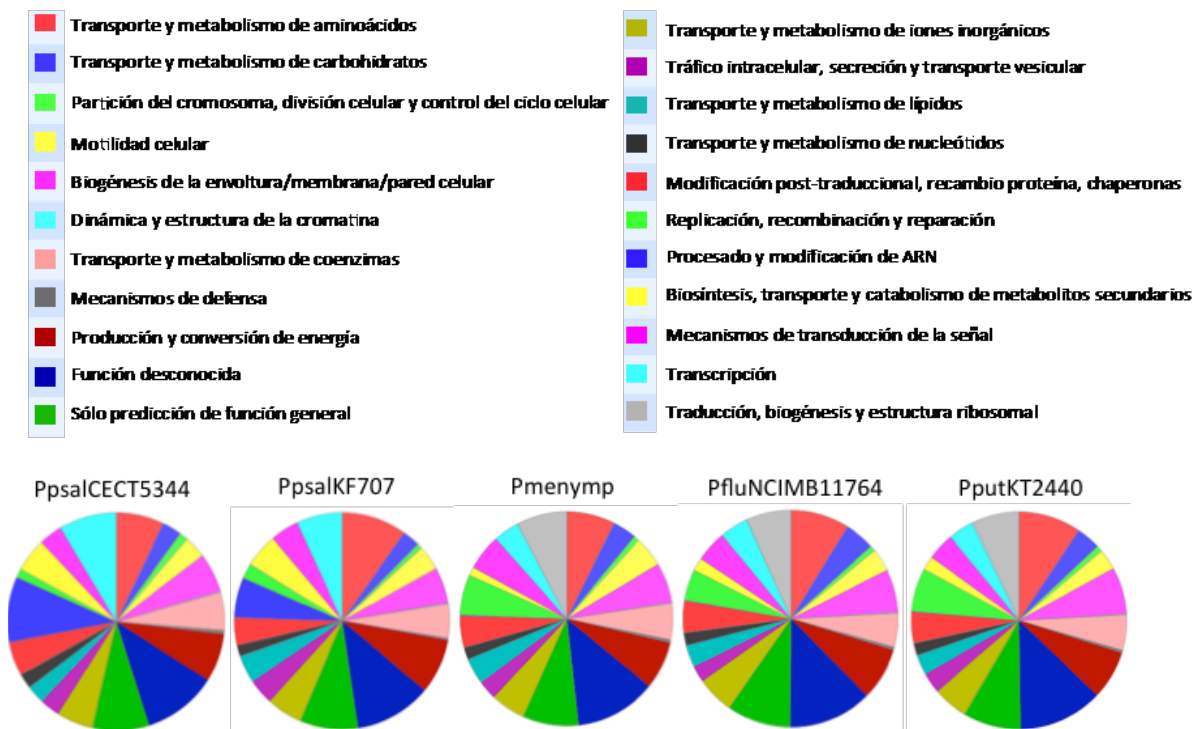


Figura 48. Distribución de categorías funcionales según la base de datos Pfam en varias estirpes de *Pseudomonas*. Ppsal, *P. pseudoalcaligenes*; Pmen, *P. mendocina*; Pflu, *P. fluorescens*; Pput, *P. putida*.

También se llevó a cabo un estudio estadístico más detallado de los datos funcionales obtenidos para un gran número de *Pseudomonas* secuenciadas. Así se realizó un análisis de componentes principales (Fig. 49) utilizando para ello las clasificaciones funcionales COG, Pfam, KO y TIGRfam. En todos los casos, excepto con TIGRfam, se obtuvieron resultados similares en los que *P.*

pseudoalcaligenes CECT5344 se agrupa con *P. agarici*, *P. fulva*, *P. taiwanensis* y *P. putida* KT2440.

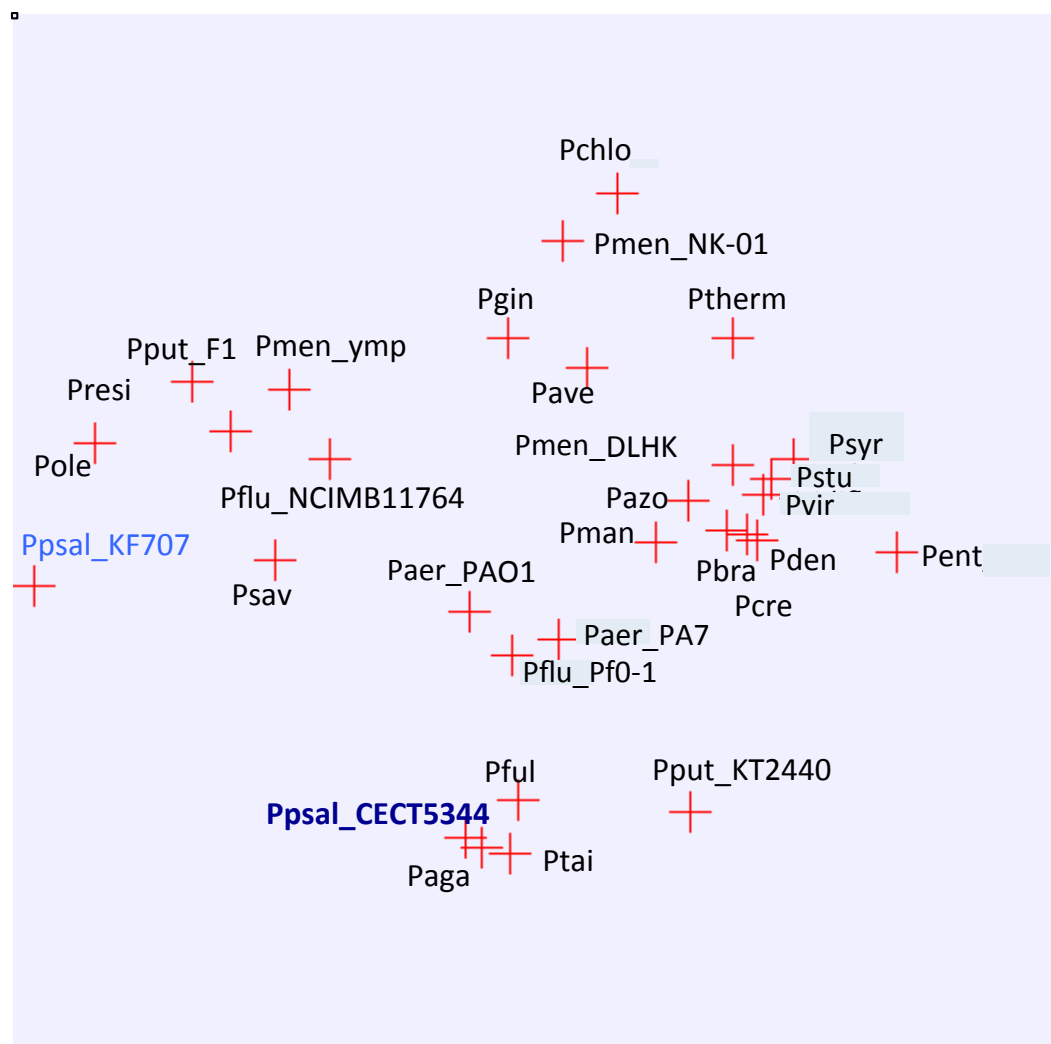


Figura 49. Análisis de componentes principales basado en la clasificación funcional COG. Pchlo: *P. chlororaphis* GP72; Pmem: *P. mendocina*; Pgin: *P. gingeri* NCPPB 3146; Pave: *P. avellanae* BPIC 631; Ptherm: *P. thermotolerans* DSM 14292; Pent: *P. entomophila* L48; Psyr: *P. syringae* pv. *syringae* B728a; Pstu: *P. stutzeri* A1501; Pvir: *P. viridiflava* UASWS0038; Pbra: *P. brassicacearum* NFM 421; Pcre: *P. cremoricolorata* DSM 17059; Pden: *P. denitrificans* ATCC 13867; Pman: *P. mandelii* 36MFCvi1.1; Pazo: *P. azotifigens* DSM 17556; Pful: *P. fulva* 12-X; Ptai: *P. taiwanensis* DSM 21245; Paga: *P. agarici* NCPPB 2289; Paer: *P. aeruginosa*; Psav: *P. savastanoi* pv. *savastanoi*; Pput: *P. putida*; Ppsal: *P. pseudoalcaligenes*.

Los sistemas de transducción de la señal en bacterias son rutas de procesamiento de información que permiten una respuesta celular adaptativa frente a estímulos ambientales. Estos sistemas se clasifican como de un sólo componente, los mayoritarios, de dos componentes, o sistemas específicos, como el que participa en la quimiotaxis o las proteínas de función extracitoplásmica. El número de genes que codifican estos sistemas en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, en comparación con otras estirpes del mismo

género, se presenta en la Figura 50. El número total de estos genes por organismo analizado fue aproximadamente 600, excepto en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, *P. stutzeri* A1501 y *P. mendocina* ymp, que fue inferior. A diferencia de la estirpe CECT5344, la estirpe KF707 de *P. pseudoalcaligenes* fue la que mayor número de estos sistemas de regulación presentó.

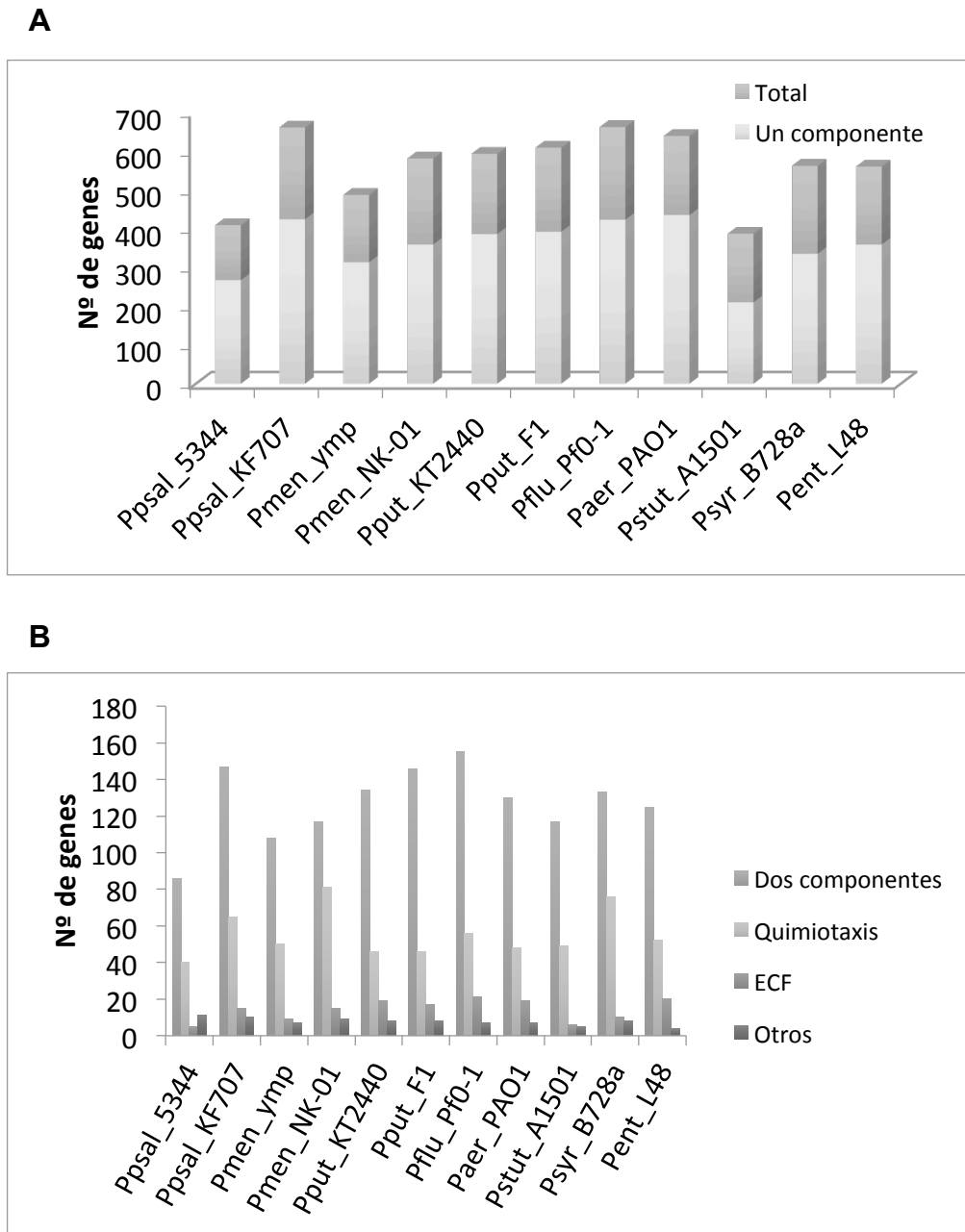


Figura 50. Genes que codifican proteínas de transducción de la señal en diferentes estirpes de *Pseudomonas*. En **A** se incluye el número total de genes que codifican proteínas que participan en sistemas de transducción de la señal, así como los específicos de un solo componente. En **B** se representan los genes que codifican los sistemas de dos componentes y proteínas que participan en otros sistemas específicos. Los datos se obtuvieron de la base de datos MiST2 (<http://mistdb.com>).

Ppsal, *P. pseudoalcaligenes*; Pmen, *P. mendocina*; Pput, *P. putida*; Pflu, *P. fluorescens*; Paer, *P. aeruginosa*; Pstut, *P. stutzeri*; Psyr, *P. syringae*; Pent, *P. entomophila*.

En el caso específico de los sistemas de dos componentes, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 fue la estirpe que menos genes presentó con respecto al resto de estirpes analizadas. La estirpe CECT5344 también presentó menos genes de quimiotaxis que el resto, aunque la diferencia fue menor que en el caso anterior (Fig. 50).

Un estudio preliminar comparativo entre estirpes de *Pseudomonas* cianotrofas (*P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y *P. fluorescens* NCIMB11764) y tres estirpes no cianotrofas (*P. pseudoalcaligenes* KF707, *P. mendocina* ymp y *P. mendocina* NK-01) reveló los genes comunes (“core genome”) y los específicos (“singletons”) de estos dos tipos de *Pseudomonas*. Así, en el esquema de la Figura 51 se observa que de un total de 23 047 genes presentes en todas las especies, alrededor del 9 % (2 082) son exclusivos de las especies cianotrofas, en contraposición con el 40 % (9 191) de los genes presentes únicamente en especies no cianotrofas. Ambos grupos comparten 5 887 genes, alrededor de un 25 % de los genes totales. El análisis detallado de estos genes, así como estudios comparativos que abarquen un mayor número de estirpes, permitirá conocer los genes necesarios o predominantes en los microorganismos capaces de asimilar cianuro.

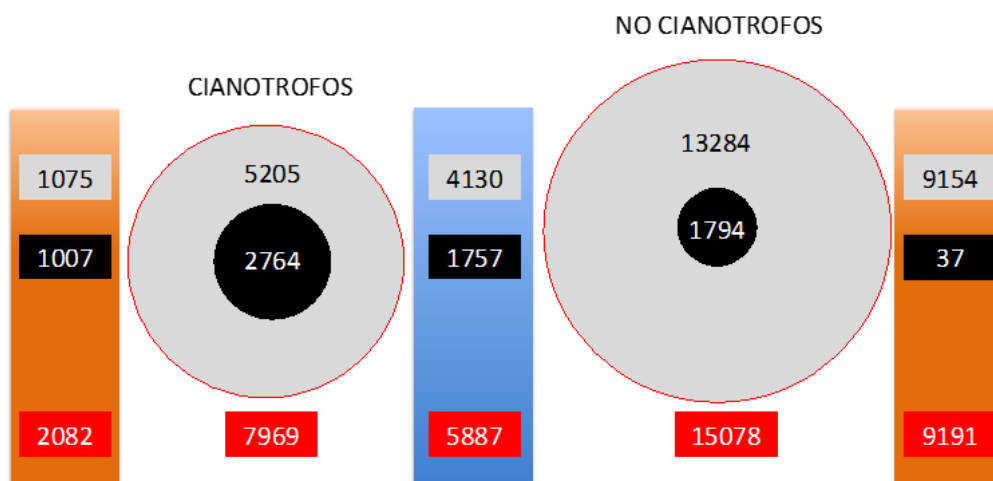


Figura 51. Comparación de genomas de estirpes cianotrofas y no cianotrofas del género *Pseudomonas*. En rojo se representa el pangenoma, en negro el coregenoma y en gris el genoma accesorio. Los resultados encuadrados en azul son los genes compartidos entre estirpes cianotrofas (*P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y *P. fluorescens* NCIMB11764) y no cianotrofas (*P. pseudoalcaligenes* KF707, *P. mendocina* ymp y *P. mendocina* NK-01), mientras que encuadrados en naranja se presentan los genes exclusivos de ambos tipos de organismos.

7. Genes relacionados con el metabolismo del cianuro

7.1. Nitrilasas de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

El genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 codifica 10 miembros de la superfamilia C-N hidrolasa/nitrilasa (Fig. 52), entre las que se encuentran cuatro proteínas pertenecientes a la familia nitrilasa con una actividad potencial de hidrólisis de nitrilos (BN5_01608: Nit1; BN5_04348: Nit2; BN5_02400: Nit3; BN5_01621: Nit4). Si comparamos estos resultados con otras estirpes del género *Pseudomonas* podemos concluir que el número de genes que codifican carbono-nitrógeno hidrolasas varía entre 4 y 11, aunque la mitad de las estirpes analizadas carecen de nitrilasas (Fig. 52). La otra estirpe cianotrofa del género *Pseudomonas*, *P. fluorescens* NCIMB 11764, presentó 5 genes de la superfamilia C-N hidrolasa/nitrilasa, de los que 4 codificaron miembros de la familia nitrilasa (no mostrado).

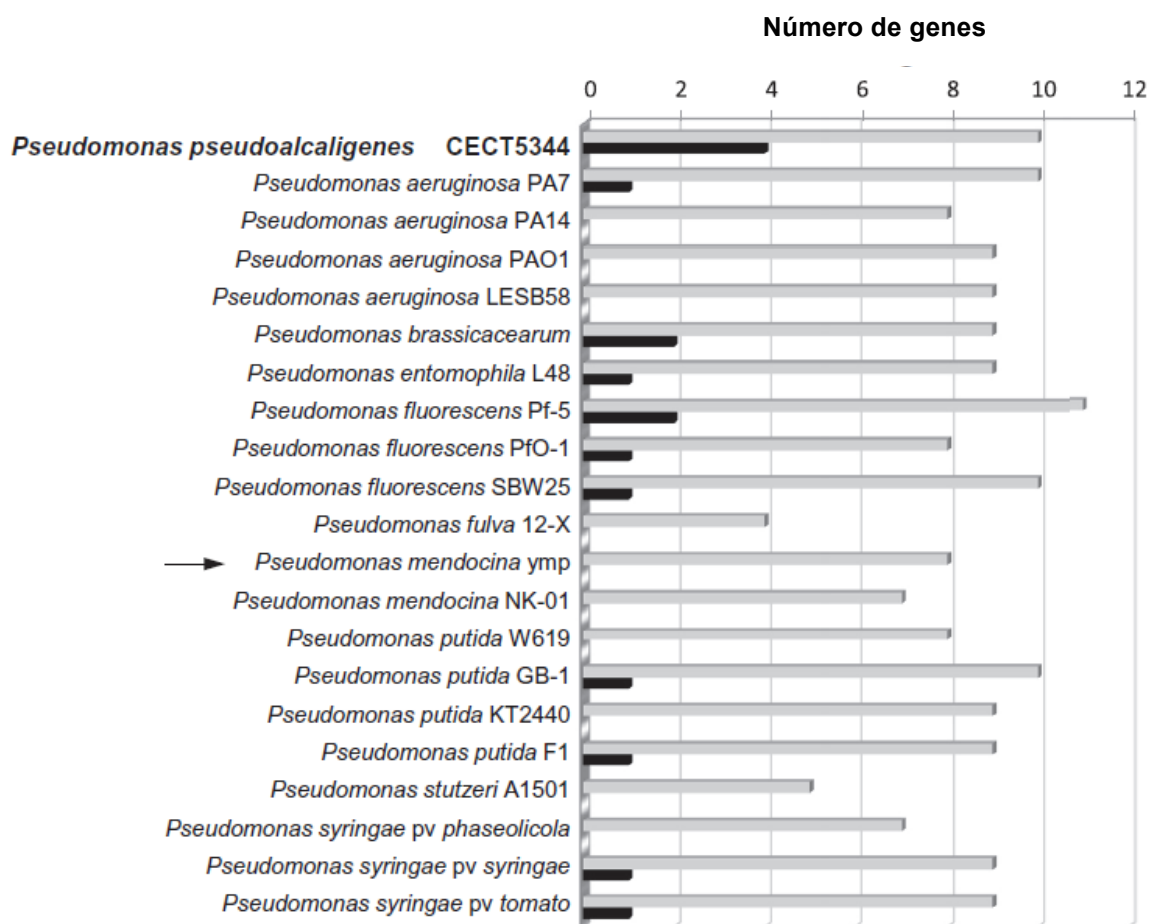


Figura 52. Abundancia de nitrilasas en *Pseudomonas*. Número de genes codificantes de miembros de la superfamilia de hidrolasas de carbono-nitrógeno (barras grises) y familia nitrilasa (barras negras) en los genomas completos del género *Pseudomonas*, incluyendo *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (señalada en negrita) y la cepa no cianotrófica de referencia *P. mendocina* ymp (señalada con una flecha).

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las nitrilasas de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 muestra una estrecha relación entre Nit1 y Nit3 (48% de identidad), así como una alta similitud entre Nit2 y Nit4 (50,8 % de identidad) (Fig. 53). El análisis filogenético de los genes *nit* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 muestra que *nit1* y *nit3* pertenecen a la subfamilia 1 (Fig. 54). El gen *nit3* forma parte del operón *nit1C* descrito en el apartado 2.3 del capítulo 1. Este operón es similar al de otras bacterias (Podar *et al.*, 2005). El gen *nit1* está fuera del operón *nit1C*, y su contexto génico no se conserva en bacterias (Fig. 55).

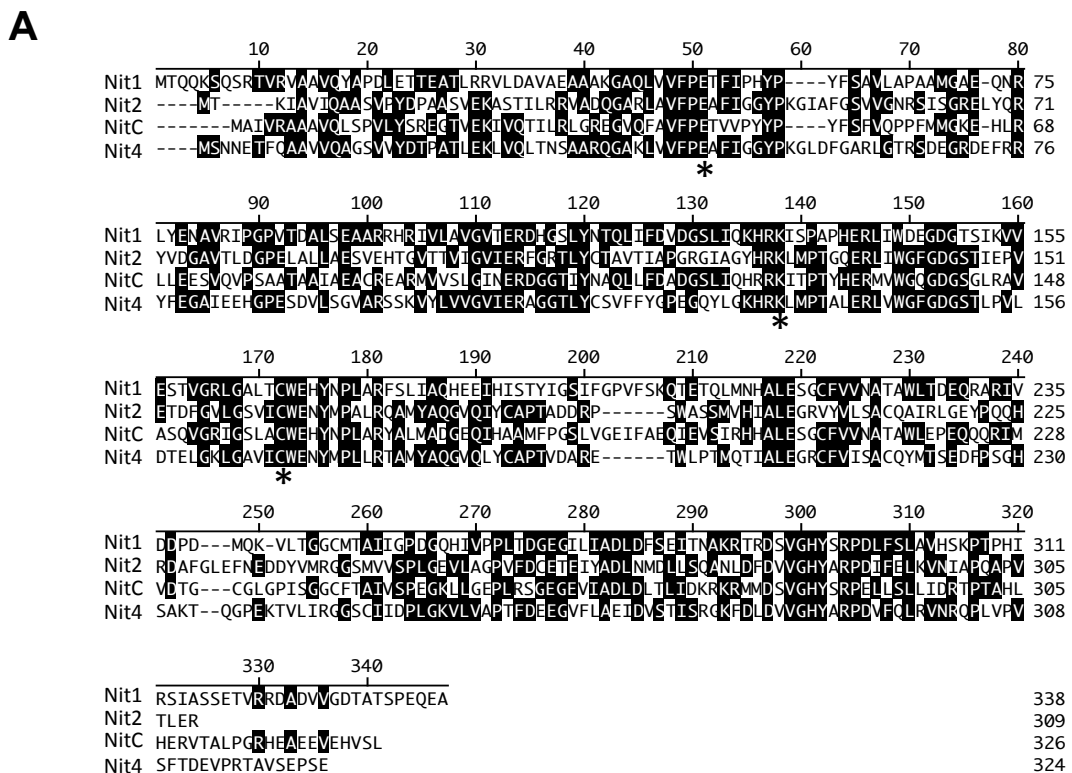


Figura 53. Alineamiento de las nitrilasas de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y matriz de distancia de las mismas. Se usó el método CLUSTALW del programa DNASTAR. La triada catalítica EKC conservada en todas las nitrilasas se presenta señalada con asteriscos. Las regiones del alineamiento marcadas en negro indican aminoácidos idénticos.

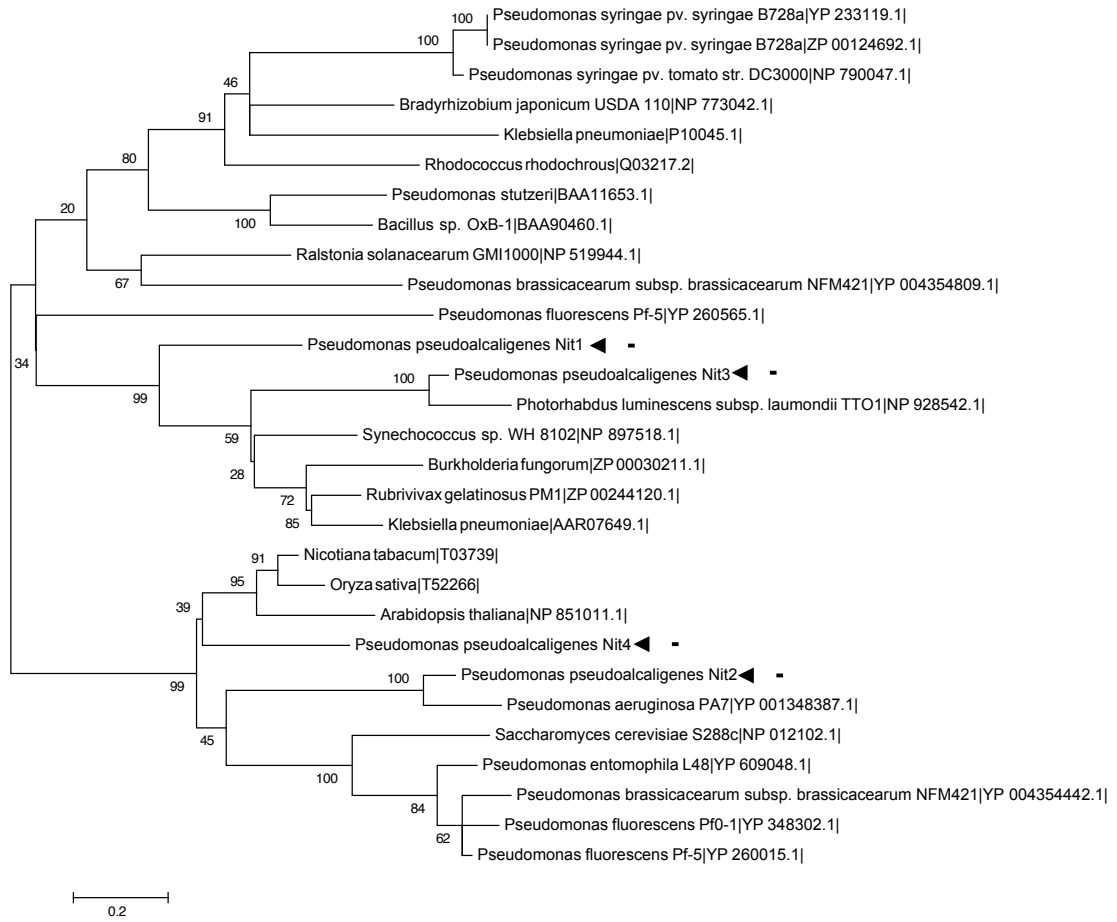


Figura 54. Relaciones evolutivas de las nitrilasas de distintos organismos. En el análisis se usaron 29 secuencias aminoacídicas y se eliminaron regiones con huecos o carentes de datos, obteniéndose al final un total de 168 posiciones. Los números de acceso se encuentran entre paréntesis y las nitrilasas de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se señalan con flechas.

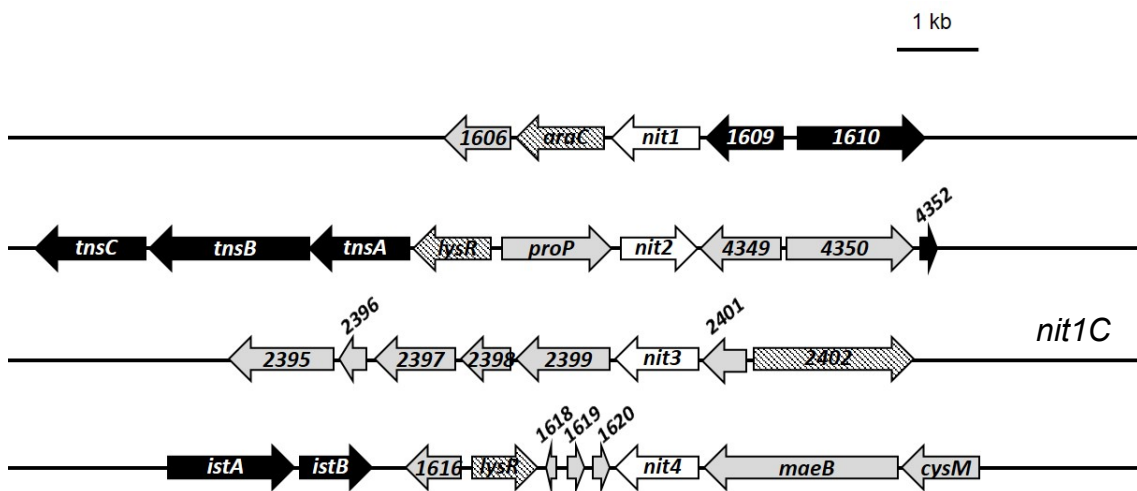


Figura 55. Entornos génicos de las nitrilasas de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Los genes que están representados con flechas de tonalidad similar indican funciones homólogas. Las flechas blancas son los genes que codifican nitrilasas; las flechas

negras representan genes implicados en transposición o elementos genéticos móviles; las flechas con líneas diagonales se corresponden con potenciales genes reguladores y las grises con otros genes flanqueantes; BN5_01606 (posible 3-oxoadipato enol-lactonasa), *araC* (posible regulador transcripcional similar a *araC*, BN5_01607), *proP* (codifica un transportador de citrato, BN5_04347), BN5_04349-50 (posible DNA/RNA helicasa), BN5_02401 (*nitB* de función desconocida), BN5_02399 (*nitD* miembro de la familia S-adenosilmetionina), BN5_01618 (de función desconocida), BN5_01619 (de función desconocida), BN5_01620 (componente intramembrana de sistemas transportadores dependientes de unión a proteínas), *cysM* (cisteína sintasa, BN5_01623), *maeB* (enzima málica dependiente de NADP, BN5_01622).

7.2. Oxidasas terminales de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

El genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 contiene secuencias que codifican tanto citocromo oxidasas como quinol oxidasas. La citocromo oxidasa *cbb3* está codificada, al igual que en otras *Pseudomonaceas* (Pitcher y Watmough, 2004), por una repetición en tándem de dos operones *ccoNOQP* (BN5_02065 y BN5_02058). Estos genes codifican las subunidades catalíticas con hemo b_3 y centro binuclear Cu_b (CcoN), las dos subunidades de citocromo *c* transmembrana con grupos monohemo y dihemo (CcoO y CcoP, respectivamente), y la proteína requerida para la estabilidad del complejo (CcoQ). Aguas abajo de los genes *ccoNOQP* existe un operón, *ccoGHIS* (BN5_02057 a BN5_02054) que codifica proteínas de membrana maduras/accesorias esenciales para el ensamblaje del complejo citocromo *cbb3* (Pitcher y Watmough, 2004). Uno de los mayores determinantes de la expresión del citocromo *cbb3* es el regulador anaeróbico Anr/Fnr (Kawakami *et al.*, 2010), que es codificado por el gen BN5_02050 localizado aguas abajo del operón *ccoGHIS*.

La segunda oxidasa hemo-cobre encontrada en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es la citocromo oxidasa aa_3 , codificada por cuatro genes del operón *coxBA-cox11-cox3* (BN5_00090 a BN5_00093). Los centros binuclear (hemo a_3 - Cu_B) y mononuclear (Cu_A) están presentes en las subunidades I y II (CoxA y CoxB), mientras que Cox11 es una posible proteína de ensamblaje que podría estar implicada en la inserción de cobre en la subunidad I de la oxidasa terminal (Arai, 2011). Los elementos reguladores de los genes *cox*, el factor sigma RpoS y el sensor dual RoxSR codificados por BN5_01265, BN5_03294 y BN5_03293, respectivamente, se han encontrado dispersos en el genoma.

La citocromo *bo* quinol oxidasa es también un miembro de la superfamilia hemo-cobre de oxidasas terminales, pero carece de sitio de unión Cu_A y posee hemo *b* y hemo *o* (Arai, 2011). En *Pseudomonadaceae* el complejo es codificado por el operón *cyoABCDE*, que no está presente en el genoma de *P.*

pseudoalcaligenes CECT5344. Sin embargo, aguas arriba del operón *cio1* se ha detectado un fragmento del primer gen, *cyoA* (BN5_01639).

El genoma de la estirpe CECT5344 contiene tres operones *cio* (Figura 56). En otras *Pseudomonadaceas* sólo se han encontrado uno (*P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. mendocina*) o dos (*P. stutzeri*, *P. fluorescens* y *P. syringae*) operones por genoma. El operón *cio1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 contiene, además de los genes *cioA* y *cioB* (BN5_01631 y BN5_01630), un gen *sir* que codifica una posible sulfito/nitrito reductasa (BN5_01633) y dos secuencias codificantes conservadas que codifican proteínas de función desconocida, BN5_01632 y BN5_01629. El producto codificado por el gen BN5_01629 fue una de las proteínas inducidas por cianuro identificadas mediante 2D-PAGE en este trabajo (capítulo I, apartados 1 y 3.2). Es de resaltar que en los operones *cio1* y *cio3* están presentes también otros genes que codifican posibles proteínas implicadas en la resistencia o detoxificación de cianuro, como genes que codifican un transportador de sulfato y una rodanasa localizados en el operón *cio2*. (Fig. 56). Aguas abajo del operón *cio1* se encuentran los genes *serC* y *dapA*, cuyos productos fueron identificados por proteómica (capítulo I, apartados 1 y 3.2), y el gen *nit4*, que codifica una nitrilasa.

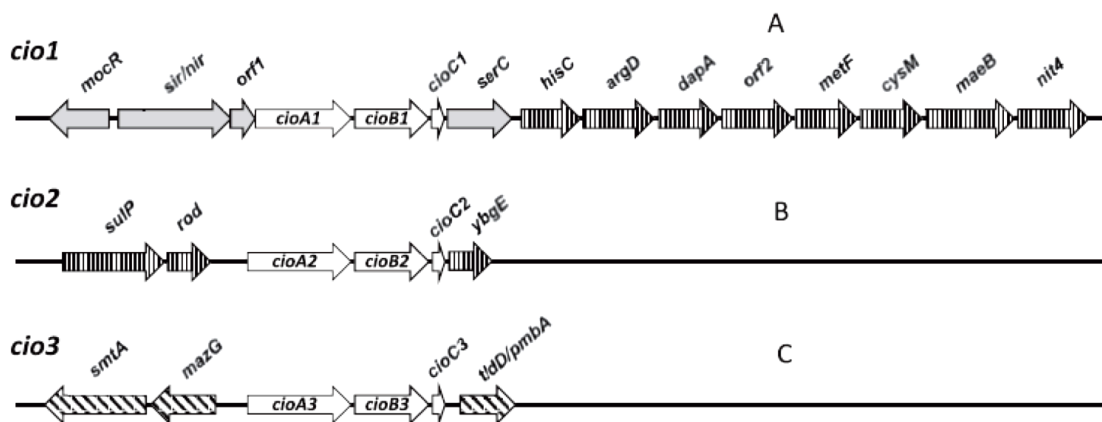


Figura 56. Sintenia de los operones *cio1*, *cio2* y *cio3* de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Flechas blancas: componentes de los operones *cio*. Flechas con líneas verticales: genes posiblemente relacionados con el metabolismo de cianuro, flechas con líneas diagonales: genes flanqueantes.

A. Los genes pertenecientes al operón *cio1* previamente descritos (Quesada *et al.*, 2007) están marcados en gris. *mocR* es el posible regulador, que es transcrito en dirección opuesta a el operón *cio*. Los genes aguas abajo del operón son *serC* (fosfoserina aminotransferasa-BN5_01629), *hisC* (fosfohistidina aminotransferasa-BN5_01628), *argD* (acetil-ornitina aminotransferasa-BN5_01627), *dapA* (dihidrodipicolinato sintasa-BN5_01626), *orf2* (posible transportador de la superfamilia BN5_01625), *metF* (metilentetrahidrofolato reductasa-BN5_01624), *cysM* (cisteína sintasa-BN5_01623), *maeB* (enzima málica-BN5_01622), y (BN5_01621), que es una

posible nitrilasa similar a la 3-cianoalanina nitrilasa descrita en plantas (Piotrowski *et al.*, 2001).

B. Los genes localizados aguas arriba del operón *cio2* son *sulP* (transportador de sulfato-BN5_01987) y *rod* (rodansa-BN5_01986). *YbgE* (BN5_01981) es un gen conservado que está asociado al operón *cyd* en otros genomas bacterianos disponibles, como *Azotobacter vinelandii* DJ y *Pseudomonas stutzeri* ATCC 1758.

C. El gen localizado aguas abajo de *cioC3* codifica una TldD/PmbA (BN5_03385) proteína de la familia (peptidasa U62/modulador de DNA girasa), y aguas arriba de *cioA3* se encuentran *mazG* (BN5_03389) que codifica una posible proteína que tiene un dominio nucleótido pirofosfohidrolasa, y *smtA* (BN5_03390) que codifica una posible metiltransferasa.

8. Otros genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con interés biotecnológico y potencial catabólico

8.1. Metabolismo de polihidroxicanoatos (PHA)

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polioxoésteres biodegradables producidos por un gran número de bacterias en respuesta a condiciones ambientales no óptimas de crecimiento, generadas fundamentalmente por la limitación de algún nutriente. En el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se han identificado tres operones que probablemente están implicados en el metabolismo de PHA. Uno de ellos contiene cuatro genes (*phbR-phaBAC*), que codifican una β -cetotilasa PhaA (BN5_04023), una acetoacetil coenzima A reductasa dependiente de NADPH PhaB (BN5_04022) y una posible polihidroxiacetato (PHA) sintasa PhaC (BN5_04024). El gen *phbR* (BN5_04021) está localizado aguas arriba del gen *phaB* y exhibe una similitud significativa con miembros de la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS. Un segundo operón contiene genes que probablemente codifican una fasina PhaP (BN5_04015) y la proteína reguladora PhaR (BN5_04014). Finalmente, el tercer operón incluye dos genes que codifican posiblemente sintasas PhaC1 (BN5_00417) y PhaC2 (BN5_00415), una proteína reguladora PhaD (BN5_00414), dos posibles sintasas con funciones enzimáticas y reguladoras PhaF (BN5_00413) y PhaI (BN5_00412), y PhaZ (BN5_00416), una posible despolimerasa responsable de la movilización de PHA.

Las PHA sintasas son enzimas clave en la biosíntesis de PHA y catalizan la conversión estereo-selectiva de sustratos (*R*)-3-hidroxiacil-CoA a PHA con la consiguiente liberación de coenzima A. Las PHA sintasas de clase I y clase II comprenden enzimas constituidas por sólo un tipo de subunidad, con masa molecular entre 61 y 73 kDa. Según su especificidad de sustrato, las PHA sintasas de clase I utilizan preferentemente tioésteres de CoA de varios ácidos grasos (*R*)-3-hidroxi conteniendo de 3 a 5 átomos de carbono, mientras que las PHA sintasas de clase II utilizan normalmente tioésteres de CoA de varios ácidos grasos (*R*)-3-hidroxi de 6 a 14 átomos de carbono (Rehm, 2003). PhaC1 y PhaC2 de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 pertenecen a las PHA sintasas de clase II (Fig. 57), mientras que PhaC es un miembro de las PHA sintasas de clase I. Recientemente se ha demostrado que estos genes de la estirpe CECT5344 son funcionales, ya que mutantes incapaces de producir las sintasas PhaC1/PhaC2 y/o PhaC se encuentran considerablemente impedidos en la producción de PHA (Manso *et al.*, 2015).

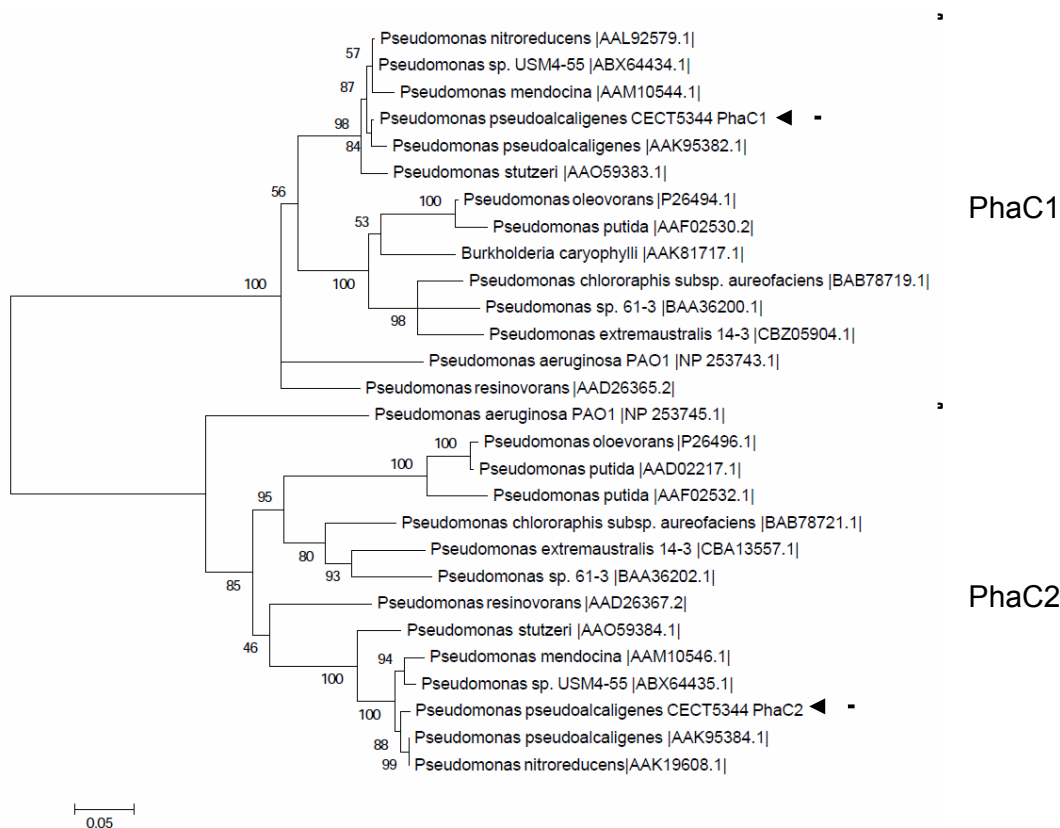


Figura 57. Árbol filogenético de los genes *phaC1* y *phaC2* de las sintasas de PHA de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y cepas bacterianas estrechamente relacionadas. Para el análisis se usaron 28 secuencias aminoacídicas. Se eliminaron todas las regiones con huecos o en las que se carecía de información, obteniéndose al final 490 posiciones. Los números de acceso se encuentran entre paréntesis y las proteínas PhaC de *P. Pseudoalcaligenes* CECT5344 se señalan con flechas.

8.2. Metabolismo de la atrazina en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

La atrazina [2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina] forma parte de la familia de herbicidas s-triazina que se utiliza ampliamente en el control de cultivos de especial relevancia agroalimentaria. El análisis del genoma de *P. pseudoalcaligenes* revela que esta cepa podría metabolizar este tipo de herbicidas ya que contiene algunos genes homólogos a genes descritos previamente, cuyos productos participan en la degradación de atrazina. Estos genes, localizados en diferentes *loci* del genoma, son homólogos a *atzD* (BN5_00871), que codifica una ácido cianúrico hidrolasa, *atzE* (BN5_03287) y *atzF* (BN5_03419), genes que junto con *atzD* codifican las enzimas necesarias para la mineralización del ácido cianúrico. Además, también están presentes en el genoma de la estirpe CECT5344 genes homólogos a los genes *atzABC*

(BN5_01272, BN5_03189 y BN5_01183, respectivamente) responsables de los primeros pasos de la ruta de degradación de herbicidas tipo s-triazina (de Souza *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2001).

8.3. Metabolismo de compuestos aromáticos en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

P. pseudoalcaligenes CECT5344 tiene una región genómica de 23 kb, flanqueada por regiones de inserción (transposasa ISSod6, IS1301; ISRM3), que contiene genes (de BN5_03547 a BN5_03568) que codifican proteínas implicadas posiblemente en el metabolismo de compuestos aromáticos (Fig. 58). Las proteínas codificadas por estos genes exhiben una homología significativa con proteínas de la estirpe *Marinobacter* sp. Mnl7-9. Los genes que se encuentran en esta región codifican proteínas implicadas en la degradación de benzoato vía hidroxilación (*benABD* y *nahTHNKMOLI*). Los genes *benAB* codifican una benzoato 1,2-dioxigenasa y el gen *benD* codifica una deshidrogenasa probablemente implicada en la degradación de benzoato. Los genes *nahTHNKMOLI* codifican enzimas que participan en la ruta inferior de degradación de naftaleno, a través de la cual tiene lugar la rotura en *meta* de los catecoles. Junto a estos genes catabólicos existen otros que codifican transportadores (de BN5_03555 a BN5_03557) que podrían estar implicados en el metabolismo del benzoato y otros compuestos aromáticos. Al final de la región hay dos genes reguladores (BN5_03567 y BN5_03547) cuyos productos son homólogos a las proteínas MarR e IclR. Junto a esta agrupación génica hay dos genes, *pcaH* y *pcaQ*, que podrían codificar la subunidad β de la protocatecuato 3,4-dioxigenasa y un regulador transcripcional que podrían participar en el metabolismo del protocatecuato (Fig. 58).

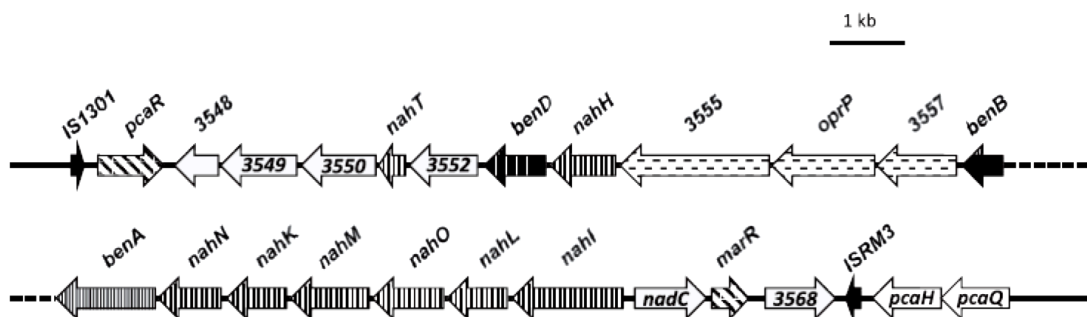


Figura 58. Genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 relacionados con el metabolismo de compuestos aromáticos. Los genes están representados por flechas. Las flechas negras representan elementos de inserción; las flechas con líneas diagonales se corresponden con posibles genes reguladores; flechas punteadas, posibles transportadores; flechas con líneas verticales anchas, posibles genes de la ruta baja degradación de naftaleno. Otros genes incluidos en esta región son

BN5_03548 (probablemente de la familia proteica MutT/nudix), BN5_03549 (proteína oxidorreductasa de unión a FAD), BN5_03550 (posible ácido picolínico decarboxilasa), BN5_03552 (proteína integral de membrana), BN5_03568 (diguanylate quinasa), *nadC* (quinolinato fosforribosiltransferasa- BN5_03566), *pcaH* (subunidad beta de protocatecuato 3,4-dioxigenasa, BN5_03571), *pcaQ* (regulador transcripcional, BN5_03572).

8.4. Genes implicados en el metabolismo de compuestos furánicos

El furano es un anillo aromático heterocíclico de cinco miembros compuesto por cuatro átomos de carbono y uno de oxígeno. El furfural (furano-2-carbaldehído) y el 4-hidroximetil furfural son derivados furanos de especial interés debido a que son subproductos generados durante el pretratamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de bioetanol. *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 tiene un operón (*hmfABCDE*) cuyos genes son homólogos a genes de *Cupriavidus* que están posiblemente implicados en el metabolismo de compuestos furánicos. Sin embargo, no se han encontrado genes homólogos para la transformación de 5-hidroximetil furfural en ácido furóico (Fig. 59).

Los genes *hmfABC* codifican las tres subunidades de la furoil-CoA deshidrogenasa, el gen *hmfD* codifica una furoil-CoA sintasa, y *hmfE* codifica una hidrolasa necesaria para la formación de 2-oxoglutarato (Koopman *et al.*, 2010). La acción consecutiva de HmfD, HmfABC y HmfE produce la conversión catalítica de ácido furóico en 2-oxoglutarato, intermediario del ciclo de Krebs. Curiosamente, aguas abajo del gen *hmfE* hay un gen que codifica un posible transportador de benzoato que no ha sido descrito en otras estirpes degradadoras de furfural. Además, todos los genes presentes en la región entre BN5_02211 (*orf*) y BN5_02200 (*araC*), con la excepción del gen *psfD*, son “singletons” respecto a todos los genomas de *Pseudomonas* usados para la comparación. PsfD es una posible proteína conservada normalmente anotada como factor de maduración para deshidrogenasas que contienen molibdeno, como las deshidrogenasas de xantina y de CO. Posiblemente por este motivo, el gen *psfD* no es un “singleton”, aunque es importante resaltar que la enzima 2-furoil-coenzima deshidrogenasa también es una molibdoenzima similar a la xantina deshidrogenasa y que el gen *psfD* se ha descrito en el contexto de una agrupación génica implicada en el metabolismo del ácido furóico en *Pseudomonas putida* Fu1 (Nichols y Mertens, 2008).

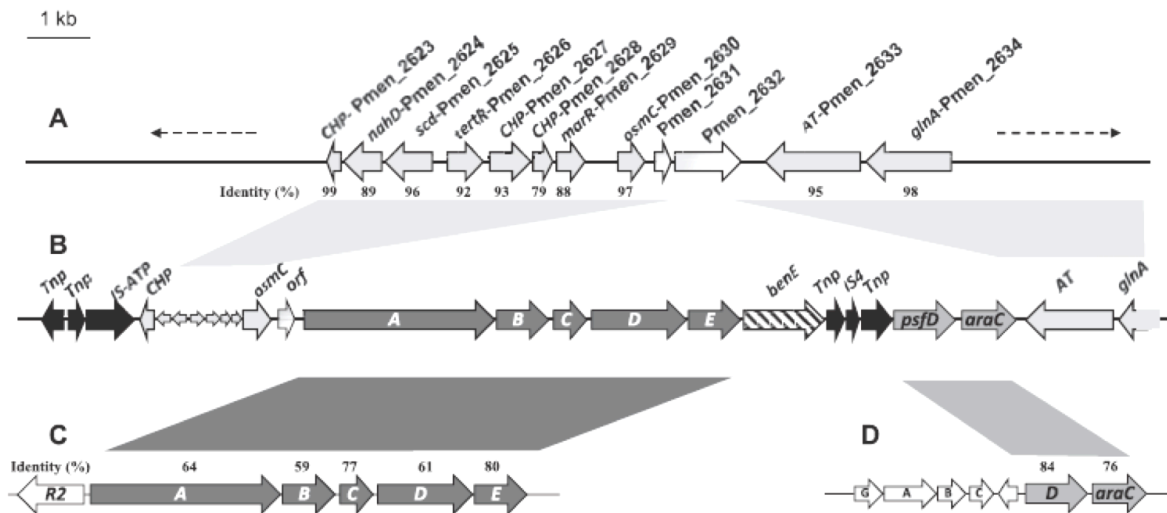


Figura 59. Agrupación génica de la degradación de ácido furánico en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. El color indica el posible origen de los genes basado en la identidad de secuencia, y oscila entre gris claro (*Pseudomonas mendocina* ymp) (A), gris oscuro (*Cupriavidus basilensis* HMF14) (C), y gris medio (*Pseudomonas putida* Fu1) (D). El porcentaje de identidad de los genes homólogos en comparación con la sección del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (B) está indicado debajo de cada gen. Las flechas negras representan genes implicados en la transposición de elementos génicos móviles. La fase abierta de lectura (*orf*) aguas abajo *osmC* en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (B) es un fragmento de un gen de Pmen_2631, aunque Pmen_2632 está ausente en la cepa CECT5344. En su lugar, el genoma de *P. pseudoalcaligenes* alberga un conjunto de genes que podrían estar implicados en la asimilación de compuestos furánicos. El gen *benE* (flecha con líneas diagonales) es idéntico en un 54% al gen codificante de un posible transportador de benzoato de *Thermosediminibacter oceani* DSM 16646 (Toce_0381), pero está ausente en las cepas nombradas anteriormente (Nichols y Mertens, 2008; Koopman *et al.*, 2010).

Discusión

Las bacterias son ampliamente utilizadas en el campo de la biotecnología ambiental, debido a su capacidad para realizar gran cantidad de reacciones químicas. A este respecto, los estudios proteómicos juegan un papel destacado en el estudio de rutas metabólicas celulares, pero el paso limitante en estos estudios es la obtención de la muestra del medioambiente, que en ocasiones es complicada, así como la ausencia de genomas secuenciados en la mayoría de las bacterias, lo que supone un enorme reto en dichas investigaciones. A pesar de estos inconvenientes, la proteómica ofrece una forma dinámica de estudiar la función celular. Finalmente, los resultados obtenidos a través de tales investigaciones, pueden aplicarse con éxito en el tratamiento de aguas residuales, ingeniería metabólica, ecología microbiana y respuesta de microorganismos a estrés ambiental. Las capacidades microbianas tales como deshalogenación, metanogénesis, desnitrificación y reducción del sulfato son algunos ejemplos objeto de estudio para ser aplicados en biotecnología ambiental. Además, el hecho de que algunos microorganismos toleren la radiación y compuestos tóxicos, sean capaces de usar diferentes donadores y aceptores de electrones o de sobrevivir en ambientes extremos los dota de gran interés. Por otra parte, los microorganismos realizan generalmente sus funciones en comunidades, lo que conlleva procesos como intercambio de genes y establecimiento de interacción entre células. Estos fenómenos se conocen muy poco, así como la reacción de dichas comunidades frente a perturbaciones como limitación de nutrientes, desecación, etc. Así, el uso de la proteómica otorga una visión global de las proteínas implicadas en dichos sistemas biológicos, y en relación con otros estudios "ómicos", supone un avance importante en el descubrimiento de estos procesos celulares así como en el desarrollo de la biotecnología ambiental. El campo de la proteómica medioambiental está mucho menos desarrollado que otras aplicaciones proteómicas. La mayoría de los estudios proteómicos publicados se centran en un organismo o célula concretos y se investigan los efectos medioambientales extrapolando datos de condiciones controladas. Uno de los retos en la proteómica ambiental es que las condiciones ambientales no están controladas y es difícil emularlas en el laboratorio. Además, el hecho de que los microorganismos no sean cultivables, los genomas no estén secuenciados o la extracción de las proteínas sea más o menos compleja, son puntos a tener en cuenta para el posible éxito de la investigación.

A este respecto, para la elucidación del metabolismo del cianuro en bacterias se han hecho hasta la fecha dos estudios proteómicos en *Klebsiella oxytoca* y *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. En la primera se detectaron 106 proteínas cuya expresión se alteraba significativamente en presencia de cianuro (1 mM) en relación con las células cultivadas con amonio. Dichas proteínas estaban implicadas en el metabolismo de carbohidratos, nucleótidos, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, respuesta a estrés, etc. Algunas de estas proteínas tienen un papel crucial en la biodegradación y

asimilación de cianuro, como es el caso de la glutamina sintetasa (ruta de incorporación de nitrógeno inorgánico a orgánico), la catalasa (reparadora del estrés oxidativo), la trehalasa y la glicosiltransferasa (procesos de protección celular).

A pesar de su toxicidad, el cianuro es una fuente de nitrógeno para algunos microorganismos. Hasta el momento se han descrito diversas rutas metabólicas a través de las cuales este tóxico puede ser asimilado (Luque-Almagro *et al.*, 2011a). *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria cianotrofa capaz de asimilar cianuro en condiciones alcalinas, una propiedad que le confiere un gran potencial para su utilización en procesos de biorremediación de residuos industriales cianurados. En este trabajo se ha llevado a cabo un análisis proteómico en esta bacteria cianotrofa en respuesta a cianuro, observándose que este compuesto tiene a nivel del proteoma principalmente un efecto inductor (Fig. 13). La estirpe CECT5344 posee una cianasa (CynS) inducible por cianuro, pero estudios previos basados en resultados obtenidos con un mutante CynS⁻ descartaron el cianato como intermediario de la asimilación de cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, ya que esta estirpe mutante es incapaz de crecer con cianato pero asimila cianuro igual que la estirpe silvestre.

El principal objetivo de este trabajo ha sido elucidar la ruta de asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Para ello se ha llevado a cabo un análisis proteómico diferencial basado en la electroforesis bidimensional, una técnica utilizada con éxito en el descubrimiento de la base molecular de los cambios fisiológicos acontecidos en organismos, tanto eucariotas como procariotas, expuestos a contaminación ambiental y diferentes condiciones de estrés (Heim *et al.*, 2003, Rodríguez-Ortega *et al.*, 2003; De Angelis y Gobetti, 2004). Un análisis proteómico previo de respuesta a cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro *et al.* 2007) reveló la inducción por cianuro de proteínas relacionadas con la adquisición de hierro, la respuesta a la limitación de nitrógeno y al estrés oxidativo, pero no permitió identificar ninguna proteína que pudiera participar en la asimilación del cianuro debido a que la secuenciación del genoma completo de la estirpe CECT5344 no estaba disponible.

Actualmente, la reciente secuenciación del genoma de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 ha posibilitado llevar a cabo un nuevo análisis proteómico e identificar mediante huella peptídica MS-MS/MS (MALDI TOF-TOF) la mayor parte de manchas expresadas diferencialmente en las condiciones utilizadas. Entre las proteínas inducidas por cianuro identificadas en este estudio se encuentran NitB y NitG (Fig. 14), que están codificadas por genes pertenecientes a la agrupación génica *nit1C*. Además, el glicolonitrilo también actuó como inductor de la proteína NitB (Fig. 15). Estos resultados,

junto con los obtenidos mediante RT-PCR (Fig. 23) y los ensayos enzimáticos en los que se utilizó glutaronitrilo como sustrato (Fig. 34), confirman que el gen *nitC*, así como el resto de genes de la agrupación génica *nit1C*, se inducen por cianuro. Este es el primer trabajo en el que se describe la presencia de esta agrupación génica *nit1C* en la especie *P. pseudoalcaligenes*, así como su función en la asimilación de cianuro. La agrupación génica *nit1C* de la estirpe CECT5344 contiene un gen regulador, *nitA*, orientado de forma divergente con respecto al resto de genes, *nitBCDEFGH*, que codifican las proteínas de función desconocida NitB y NitG, y una nitrilasa NitC. Esta organización génica es similar a la presente en otros microorganismos, entre los que se encuentran algunas γ -proteobacterias como *Acinetobacter* sp. ATCC 27244, *Photorhabdus luminecens* y *Xenorhabdus nematophila*, así como α - y β -proteobacterias como *Burkholderia vietnamiensis* G4, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, la cianobacteria *Prochlorococcus marinus* MIT 9301 y la bacteria Gram-positiva *Rhodococcus jostii* RHA1 (Fig. 21). A pesar de que la agrupación génica *nit1C* ha sido descrita previamente, en ningún microorganismo se ha descrito su función fisiológica. Sin embargo, entre los genes que forman la agrupación *nit1C* se encuentra *nitC*, un gen que codifica una nitrilasa, lo que sugiere que al menos este gen podría participar en la asimilación de nitrilos como fuente de nitrógeno. Para demostrar que *nitC* codifica una nitrilasa implicada en la degradación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* se construyó un mutante deficiente en este gen. La incapacidad de este mutante de asimilar un tipo específico de nitrilos, 2-hidroxinitrilos o cianhidrinas, así como la ausencia de actividad nitrilasa en células de este mutante cultivadas con este tipo de nitrilos confirmó que NitC es una nitrilasa (Tabla 16, Fig. 34). Este mismo fenotipo fue presentado por un mutante en el gen *nitB*, para el que se descartó un efecto polar sobre el gen *nitC*, lo que sugiere que NitB es esencial para la actividad nitrilasa de NitC. La secuencia aminoacídica de NitB no presenta dominios funcionales a partir de los cuales se pueda inferir una posible función para esta proteína. Una hipótesis es que NitB podría actuar de chaperona para el correcto plegamiento de la nitrilasa NitC. Estudios previos han descrito el requerimiento de chaperonas para la correcta actividad de algunas nitrilasas y nitrilo hidratadas (Layh *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta que un estudio previo describió la participación de un nitrilo, la cianhidrina del 2-oxoglutarato, en la asimilación de cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2011b), la inducción de la agrupación *nit1C* por cianuro planteó la posibilidad de que al menos la nitrilasa NitC participase en la asimilación de cianuro a través de la asimilación del nitrilo formado como intermediario. Los resultados obtenidos con los mutantes NitB⁻ y NitC⁻, los cuales fueron incapaces de asimilar cianuro y acumularon de forma constante el nitrilo formado durante la asimilación de cianuro, confirmaron esta hipótesis (Figs. 28-30). Además del gen *nitC*, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 contiene otros tres genes que codifican nitrilasas (Figs. 52 y 55), algunas de las cuales son también inducidas por cianuro según un estudio transcriptómico reciente (Luque-Almagro *et al.*, 2015). Sin embargo,

el fenotipo mostrado por el mutante NitC⁻ de no crecimiento con cianuro como única fuente de nitrógeno descarta la implicación de estas otras nitrilasas en la asimilación de cianuro. Estas nitrilasas podrían contribuir a la actividad nitrilasa basal detectada de forma constitutiva en distintas fuentes de nitrógeno (Fig. 34). Teniendo en cuenta los anteriores resultados, se puede afirmar que *P. pseudoalcaligenes* presenta una nueva ruta de asimilación de cianuro (Fig. 61) no descrita hasta el momento en ningún otro organismo. Esta ruta consta de cuatro pasos: 1) Acumulación de oxalacetato en el medio en respuesta a cianuro. El oxalacetato acumulado bajo condiciones de cianotrofia se produce por la asociación de una malato:quinona oxidorreductasa (MQO) que produce oxalacetato a partir de L-malato y una oxidasa terminal CioAB que permite la respiración insensible a cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2011b).

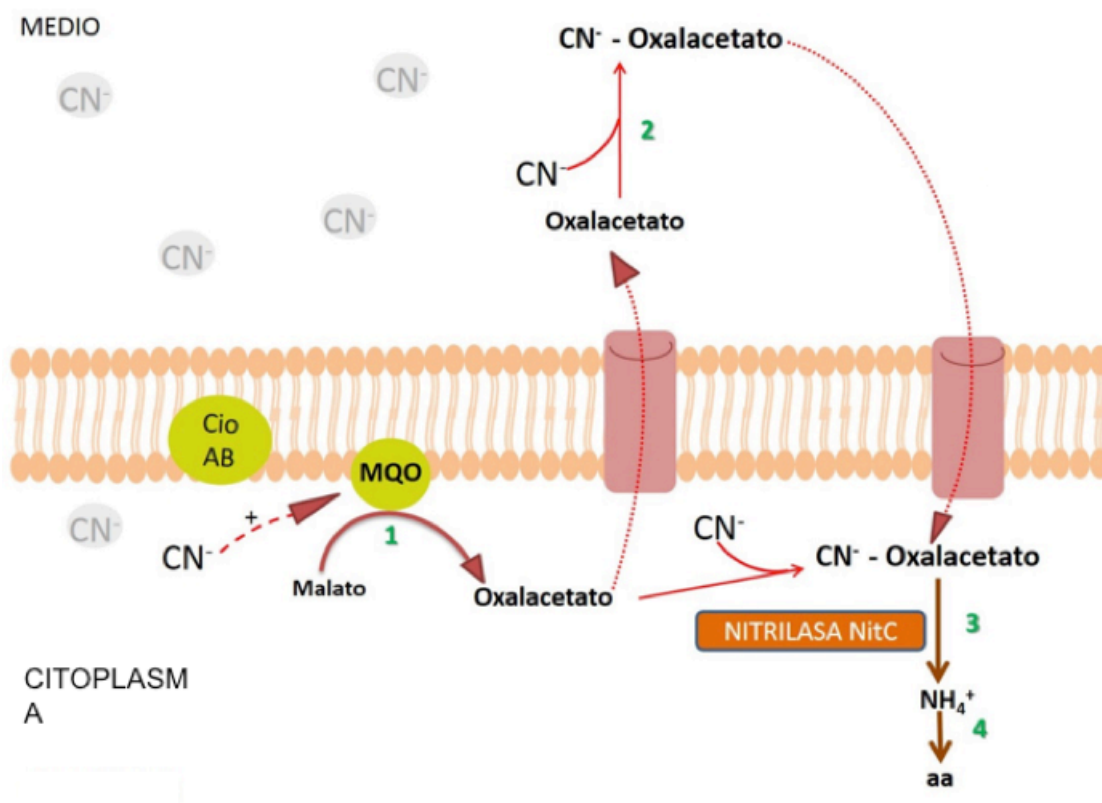


Figura 60. Ruta de asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. 1. En presencia de cianuro, una malato:quinona oxidorreductasa (MQO) asociada a la oxidasa terminal alternativa cataliza la formación de oxalacetato. **2.** El oxalacetato reacciona químicamente con el cianuro dando lugar a la cianhidrina del oxalacetato. **3.** A través de la nitrilasa NitC el nitrilo formado da lugar a amonio. **4.** El amonio es asimilado por la ruta GS/GOGAT.

2) Formación de la cianhidrina del oxalacetato por reacción química entre el oxalacetato formado por la MQO y el cianuro. Esta reacción química entre cianuro y oxalacetato para producir la cianhidrina podría ocurrir tanto dentro como fuera de la célula. Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el

que el cianuro entra en la célula, pero el elevado pKa del HCN (9,2) y el pH del medio de cultivo utilizado en este trabajo (pH 9,5), sugieren que una parte del cianuro podría entrar en la célula por difusión en forma de ácido cianhídrico. No se descartan mecanismos de transporte dependientes de transportadores que usen como sustratos tanto el nitrilo formado en el exterior de la célula como el CN⁻ libre. 3) Conversión de esta cianhidrina (nitrilo) en amonio por la acción de la nitrilasa NitC. Los productos de la agrupación génica *nit1C*, al menos NitB y NitC, son esenciales para esta actividad nitrilasa. 4) Asimilación del amonio generado por la nitrilasa mediante la ruta de la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa (GS/GOGAT).

Entre las rutas de asimilación de cianuro descritas se encuentra una en la que se forma un nitrilo como intermediario, la 3-cianoalanina. Esta ruta se ha descrito en bacterias como *Cromobacterium violaceum*, varias especies del género *Pseudomonas*, y las bacterias no cianogénicas *Bacillus magaterium* y *E. coli*. En este caso la 3-cianoalanina es asimilada a través de un nitrilasa tipo Nit4, como la descrita en *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum* y *Oryza sativa*, entre otros organismos, y a través de enzimas bifuncionales con actividades nitrilasa y nitrilo-hidratasa. Aunque recientemente se ha descrito la inducción del gen que codifica la nitrilasa de la 3-cianoalanina (*nit4*) en células de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 cultivadas con cianuro, hasta el momento no existen evidencias experimentales que demuestren que la 3-cianoalanina es un intermediario en la ruta de degradación de cianuro en este microorganismo (Luque-Almagro *et al.*, 2015).

Los resultados derivados de este trabajo indican que los microorganismos que contengan la agrupación génica *nit1C* podrían tener la capacidad de asimilar nitrilos o cianuro, si pueden responder a este último mediante la producción de 2-oxoácidos que reaccionen con el cianuro. A pesar de describir esta función para NitB y NitC, se desconoce si el resto de genes *nit* también participan en la asimilación de nitrilos. Por otro lado, si bien este estudio avala la participación de la agrupación génica *nit1C* en la asimilación de cianuro, una cuestión que surge es si esta función coincide con la función biológica de estos genes, o si el por el contrario su participación en la asimilación de cianuro es fortuita. En este sentido se ha intentado relacionar la presencia de esta agrupación génica *nit1C* en otros microorganismos con la capacidad de asimilación cianuro. Si bien se desconoce para la mayoría de bacterias que contienen la agrupación *nit1C* su capacidad de asimilar cianuro, existe una estirpe cianotrófica, *P. fluorescens* NCIMB11764, que contiene los genes *nit1C*. Respecto al origen de esta agrupación génica, tanto su distribución entre las distintas especies como el hecho de que los genes flanqueantes del clúster génico *nit1C* de la estirpe CECT5344 tengan una posición en el genoma correlativa a la encontrada en otras *Pseudomonas* como

P. mendocina y *P. stutzeri*, sugieren que los genes *nit* se han adquirido mediante transferencia horizontal (Fig. 22).

La nitrilasa NitC de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 presenta cuatro residuos (Arg129, His168, Glu182 y His185) típicos de nitrilasas que utilizan nitrilos alifáticos, y carece además de los residuos conservados en nitrilasas aromáticas (His129, Asn168 y Met170) (Nikhil *et al.*, 2009). Esto está en consonancia con la especificidad de sustrato encontrada para NitC en este trabajo, ya que según los resultados obtenidos NitC utiliza como sustratos nitrilos alifáticos, y más específicamente las cianhidrinas del oxalacetato y el 2-oxoglutarato (Tabla 16).

En un trabajo previo se describió que la MQO que genera el oxalacetato necesario para la asimilación de cianuro está ligada a una oxidasa terminal insensible a cianuro, lo que implica que en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 la resistencia y la asimilación de cianuro están estrechamente relacionadas (Luque-Almagro *et al.*, 2011b). Como se discutirá más adelante, en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se han identificado tres operones *cio* de resistencia a cianuro que contienen, entre otros, los genes *cioA* y *cioB*. Estos genes codifican proteínas integrales de membrana que se corresponden con las subunidades I y II de la oxidasa terminal resistente a cianuro. En el trabajo realizado por Quesada *et al.* (2007) se determinó que el operón *cio1* es esencial para el crecimiento de la estirpe CECT5344 en presencia de cianuro, ya que un mutante deficiente en el gen *cioA1* fue incapaz de crecer en medios con cianuro. Este operón *cio1* de *P. pseudoalcaligenes* presenta una organización singular (Figs. 37 y 58). El primer gen aguas arriba de los genes *cio1* codifica una posible sulfito/nitrito reductasa dependiente de ferredoxina. Existen también dos marcos abiertos de lectura que codifican productos sin identificar en el extremo 3' de *cioB1* y en el extremo 5' de *cioA1*. El producto de este último gen ha sido una de las proteínas inducidas por cianuro identificadas en este estudio (Fig. 14, Tabla 9), lo que confirma que este operón *cio1* es inducido por cianuro y lo convierte en el principal sistema de respiración insensible a cianuro en este microorganismo. La oxidasa alternativa insensible a cianuro codificada por *cio1* pertenece a la familia citocromo *bd*, cuyos miembros también se encuentran en especies bacterianas como *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Staphylococcus carnosus*, *Campylobacter jejuni* y *Zymomonas mobilis* (Quesada *et al.*, 2007; Kawakami *et al.*, 2009).

La secuenciación del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 puso de manifiesto que aguas abajo del operón *cio1* se localizan fundamentalmente genes que participan en el metabolismo de aminoácidos, además del gen que codifica la nitrilasa Nit4 (Fig. 37). Las proteínas que codifican dos de estos genes, *serC* y *dapA*, una fosfoserina aminotransferasa y una dihidropicolinato sintasa, respectivamente, fueron identificadas en el análisis proteómico llevado

a cabo en este trabajo, siendo ambas inducidas por cianuro (Fig. 14, Tabla 9). Este resultado sugiere que el operón *cio1*, junto con los genes que se encuentran aguas abajo hasta, al menos, el gen *dapA*, podrían constituir una única unidad transcripcional inducible por cianuro. Estos resultados han sido confirmados recientemente en un estudio transcriptómico realizado en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, donde se ha determinado que entre los genes que induce el cianuro se encuentran, además del operón *cio1*, todos los genes situados aguas abajo de este operón, hasta el gen *nit4* que codifica la nitrilasa de la 3-cianoalanina (Luque-Almagro *et al.*, 2015). La función de los genes *cio1* en la resistencia a cianuro es clara, sin embargo se desconoce la función que podrían desempeñar el resto de genes, incluyendo *serC* y *dapA*, en el metabolismo del cianuro. Para conocer la relación de estos genes con el cianuro se requieren experimentos adicionales.

El cianato ha sido propuesto anteriormente como posible intermediario de la degradación de cianuro, aunque hasta el momento no se ha podido demostrar experimentalmente. En la bacteria cianotrofa *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, que es capaz de utilizar cianato (OCN^-) como única fuente de nitrógeno para su crecimiento, se detectó la inducción de una enzima que cataliza la conversión de cianato a amonio en extractos celulares crudos cultivados con cianato, hecho que no se produjo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Dicha actividad era específica para el cianato y dependiente de bicarbonato, sugiriendo así que la utilización de cianato en este organismo está facilitada por una enzima cianasa (cianato amidohidrolasa; EC 3.5.5.3), tal y como se describió anteriormente en *E. coli* y *Flavobacterium sp* (Kunz y Nagappan, 1989). Sin embargo, esta enzima no es inducible por cianuro, como se demostró en estudios anteriores en *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764, donde las actividades de la cianuro oxigenasa, inducida por cianuro, y la cianasa, inducida por cianato, son fisiológicamente distintas (Dorr y Knowles, 1989).

En estudios anteriores en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 se ha podido detectar la inducción de la actividad cianasa en presencia de cianuro o cianato, lo que no ocurre con amonio o nitrato como fuente de nitrógeno. Este resultado sugirió que en esta bacteria el cianato podría ser un intermediario en la ruta de degradación del cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2005b). Por otra parte, también se clonó y analizó el operón *cynF-S* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, en el que los genes *cynA*, *cynB* y *cynD* codifican un transportador del tipo ABC, el gen *cynS* codifica la cianasa y el gen *cynF* codifica un regulador transcripcional dependiente de σ^{54} , que no está presente en otros operones *cyn* bacterianos. Un mutante en el gen *cynS* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 fue incapaz de crecer con cianato como única fuente de nitrógeno, pero mostró la misma resistencia a este compuesto que la estirpe silvestre cuando se utilizó una fuente de nitrógeno adicional, indicando

que la cianasa tiene función asimiladora. Al contrario de lo que ocurrió con cianato, este mutante creció con cianuro igual que la estirpe silvestre, por lo que se puede afirmar que la ruta de asimilación de cianuro es independiente de la asimilación de cianato (Luque-Almagro *et al.*, 2007).

Por otra parte, como se ha descrito anteriormente, el ion CN^- reacciona fácilmente con metales como el hierro, afectando así a la homeostasis de este metal en la célula. Como consecuencia, en presencia de cianuro *P. pseudoalcaligenes* podría sintetizar sideróforos, que actúan como quelantes de hierro (Huertas *et al.*, 2006). En este trabajo, como se aprecia en la Tabla 9, se ha observado que la bacteria sintetiza ferritina (Dps) en presencia de cianuro (Figs. 13 y 40; Tablas 9 y 10), una proteína implicada en el almacenamiento de hierro citoplásmico en forma de esferas que engloban un elevado número de átomos de hierro (Stryer *et al.*, 2003; Smith, 2004).

La homeostasis del hierro está estrechamente ligada con el estrés oxidativo (Maringanti e Imlay, 1999), que se puede generar en las células bajo numerosas condiciones, como en presencia de cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2007). En estudios proteómicos diferenciales anteriores se detectaron proteínas relacionadas con el estrés respiratorio causado por cianuro, tales como una proteína de la fracción de membrana con una elevada similitud con proteínas HSP de choque térmico que se sintetizan en respuesta a varios tipos de estrés. En *P. pseudoalcaligenes* las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen en presencia de cianuro y podrían inducir daños en las proteínas de membrana, hecho que se previene con la acción de esta chaperona. En el presente trabajo, una de las proteínas inducidas por cianuro fue identificada como una superóxido dismutasa (Tablas 9 y 10, Figs. 13 y 39), que está implicada directamente en contrarrestar el estrés oxidativo neutralizando los radicales superóxido mediante la conversión de estos en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Por lo tanto, en este estudio se confirma que la producción de especies reactivas de oxígeno es un efecto tóxico adicional provocado por el cianuro, y que por lo tanto cualquier microorganismo cianotrofo debe poseer los mecanismos de resistencia necesarios para poder combatir las ROS generadas en presencia de cianuro.

La segunda parte de este trabajo se ha centrado en el estudio de las características del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 así como su análisis comparativo con respecto a otras cepas. Cabe destacar que, la cantidad de genomas secuenciados está aumentando considerablemente en los últimos años debido a los nuevos métodos de secuenciación masiva (Shendure y Hanlee, 2008). En 2006 existían alrededor de 1 500 proyectos de secuenciación, de los que 294 eran genomas completos (Liolios *et al.*, 2006). Actualmente, según la base de datos genómica GOLD (Genome On Line Database) hay 3 031 genomas secuenciados completamente y publicados, y

más de 27 000 en proceso de secuenciación, ensamblaje o anotación. En el género *Pseudomonas* se han secuenciado completamente 157 genomas, de los que se encuentran publicados 145, y existiendo al menos 1 200 procesos de secuenciación en curso. El genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha sido el primero completamente secuenciado tanto en esta especie como de un organismo cianotrofo (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014).

La información generada en la secuenciación de genomas permite estimar el potencial metabólico de un organismo. A algunos genes no se les puede asignar una posible función por similitud de secuencia, por lo que el conocimiento y asignación de funciones para estos genes, así como su implicación en las distintas funciones celulares, representa actualmente uno de los principales retos de la genómica. Por otro lado, cabe destacar los beneficios de la genómica comparativa con el fin de comprender la diversidad bioquímica de las distintas especies. La ingente información que está generando la genómica está permitiendo la identificación de funciones útiles que podrían aplicarse en procesos de biorremediación, sanidad o agricultura (Fraser *et al.*, 2000).

A pesar de que se ha descrito un gran número de bacterias capaces de degradar cianuro, algunas de las cuales pertenecen al género *Pseudomonas* (Harris and Knowles, 1983; Watanabe *et al.*, 1998), el número de genomas secuenciados de bacterias cianotrofas es muy escaso, limitándose a las estirpes *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2013) y *P. fluorescens* NCIMB11764 (Vilo *et al.*, 2012). Como se ha indicado, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 no sólo ha sido la primera estirpe cianotrofa secuenciada, sino que también ha sido la primera estirpe de la especie *P. pseudoalcaligenes* secuenciada. Posteriormente se ha secuenciado el genoma de *P. pseudoalcaligenes* KF707 (Triscari-Barberi *et al.*, 2012) y el genoma de *P. pseudoalcaligenes* MTCC 5210 se encuentra en proyecto de secuenciación (proyecto: 20259). Cabe destacar que si bien para *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, *P. pseudoalcaligenes* KF707 y *P. fluorescens* NCIMB11764 se han obtenido borradores del genoma, las diferencias en cuanto a la calidad de las secuencias obtenidas son considerables. El borrador del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 estaba inicialmente constituido por 11 scaffolds o supercontigs (Tabla 17), mientras que los genomas de *P. pseudoalcaligenes* KF707 y *P. fluorescens* NCIMB 11764 se ensamblaron en 255 y 120 supercontigs, respectivamente. Además, posteriormente se ha cerrado el genoma de la estirpe CECT5344 completándose la secuencia de los huecos existentes para la anotación completa del genoma (Wibberg *et al.*, 2014), lo que aún no se ha logrado en las otras estirpes mencionadas. La longitud del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (4,6 Mb) es menor que la de *P. pseudoalcaligenes* KF707 (6,5 Mb) y *P. fluorescens* NCIMB 11764 (8,4 Mb), estando además por debajo de la longitud media del género *Pseudomonas* (6-9

Mb) (Silby *et al.*, 2009). En bacterias, la longitud de un genoma suele estar relacionada con el tipo de hábitat en el que crecen, de forma que los microorganismos con genomas más pequeños suelen ser más versátiles que los que tienen genomas más grandes (Sabath *et al.*, 2013). El análisis del genoma de la estirpe CECT5344, así como el de otras bacterias cianotrofas puede contribuir al conocimiento de los mecanismos de resistencia y asimilación de cianuro que tienen lugar en este tipo de microorganismos. Además, el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha revelado que, como se ha puesto de manifiesto en este trabajo, esta bacteria posee un elevado potencial biotecnológico (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Metodológicamente, la secuenciación del genoma de la estirpe CECT5344 ha permitido la realización de los estudios transcriptómicos y proteómicos presentados en este trabajo.

El género *Pseudomonas*, descrito por primera vez en 1894, contiene especies aisladas de todos los tipos de hábitats, siendo sus miembros extremadamente diversos y con una amplia capacidad catabólica. Durante mucho tiempo ha existido controversia en torno a la taxonomía del género, pero gracias a las técnicas moleculares actuales se está consiguiendo una clasificación más acertada. Actualmente, el género *Pseudomonas* comprende 128 especies (Peix *et al.*, 2009). En trabajos previos, la bacteria objeto de este estudio se clasificó según su rRNA 16S como *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2005b). Una vez secuenciado su genoma, la clasificación taxonómica de este microorganismo se puede realizar de forma más precisa, tanto mediante el análisis comparativo de proteínas muy conservadas, como GyrB y RpoD, como a través del análisis de todos los genes ortólogos que comparten todas las especies del género *Pseudomonas*. En el primer caso, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se sitúa junto a otras estirpes de *P. pseudoalcaligenes* (Fig. 43), mientras que teniendo en cuenta todos los genes ortólogos la estirpe CECT5344 se sitúa junto a *P. mendocina* (Fig. 44). Con la otra estirpe de *P. pseudoalcaligenes* secuenciada, la cepa KF707, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se encuentra algo más distanciada que con *P. mendocina*.

El análisis de la distribución filogenética de los genes de la estirpe CECT5344 reveló que más del 30% de los genes poseen similitud superior al 90% con genes de Gammaproteobacterias, tal y como cabe esperar, ya que es el grupo al que pertenece *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Sin embargo, casi la mitad de dichos resultados son para Bacteroidetes, con un total de 2 135 genes con similitudes superiores al 90% con respecto a bacterias pertenecientes a este grupo (Tabla 18), lo que podría apoyar la teoría de la pertenencia de Bacteroidetes y Proteobacterias al mismo clado, con el filo Gracilicutes como ancestro común, según diversos estudios filogenéticos (Marshall y Goldberg, 2005).

La transferencia horizontal supone un mecanismo evolutivo a través del cual los microorganismos se pueden adaptar rápidamente a condiciones cambiantes en su entorno mediante la adquisición de genes de otros organismos que le confieren dicha capacidad. Según este trabajo, los posibles genes adquiridos por *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 mediante este mecanismo se corresponden principalmente con genes procedentes de Betaproteobacteria, así como de Alteromonadales, Burkholderiales, Oceanospirillales y Enterobacteriales. La mayoría de estos genes se presentan de forma aislada, pero otros genes se localizan en la misma región indicando una posible transferencia de agrupaciones génicas (Tabla 19). En varios casos estas agrupaciones se encuentran flanqueadas por transposones, lo que apoya la posible transferencia horizontal. Entre los microorganismos que podrían haber cedido genes mediante transferencia horizontal a *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se encuentran *Alcanivorax dieselolei* B5 y *Marinobacter manganoxidans* Mnl7-9. *Alcanivorax dieselolei* B5 fue aislada por primera vez en agua marina contaminada con alcanos (Lai *et al.*, 2013). Por otro lado, varios miembros del género *Marinobacter* se han aislado de aguas contaminadas con hidrocarburos (Jurelevicius *et al.*, 2013).

El análisis funcional de un genoma permite predecir la capacidad metabólica de un organismo, mientras que la clasificación funcional del genoma posibilita obtener información adicional. La clasificación de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en base a COGs usando un análisis de componentes principales agrupa a esta estirpe con *P. fulva*, *P. taiwanensis* y *P. agarici* (Fig. 49), lo que sugiere que estas estirpes podrían haber evolucionado en un mismo hábitat. A pesar de que las estirpes CECT5344 y KF707 de *P. pseudoalcaligenes* no se encuentran agrupadas según este análisis, la distribución de COGs en ambas estirpes es similar y difiere de la presente en *P. mendocina* ymp, *P. fluorescens* NCIMB11764 y *P. putida* KT2440. Esta distribución de COGs, caracterizada por una mayor proporción de genes para la replicación, recombinación y replicación, mecanismos de transducción de señales, y translocación, estructura y biosíntesis ribosomal, y una menor proporción de genes relacionados con los mecanismos de defensa y el control del ciclo celular y división celular, podría constituir una señal de identidad de la especie *P. pseudoalcaligenes*.

Otro análisis comparativo de interés es el de genomas de bacterias capaces de asimilar cianuro con genomas de estirpes no cianotrofas. La comparación de los genomas de estos dos tipos de microorganismos podría facilitar la identificación de genes involucrados en la asimilación de cianuro. Si bien organismos con distintas rutas de asimilación de cianuro no compartirían genes responsables de la asimilación, estos organismos podrían compartir otros genes que le confieran la capacidad de crecer en presencia de cianuro.

Con el objetivo de identificar genes responsables del metabolismo del cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se llevó a cabo un análisis comparativo de los genomas de las estirpes *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y *P. fluorescens* NCIMB11764 frente a los genomas de las estirpes *P. pseudoalcaligenes* KF707, *P. mendocina* ymp y *P. mendocina* NK-01. Hay que resaltar que el escaso número de genomas cianotrofos disponibles limita los resultados esperados de este análisis. Se han descrito diferentes rutas de asimilación de cianuro, y los genes responsables de estas rutas para asimilar cianuro deben ser exclusivos de los organismos cianotróficos. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran 2082 genes específicos de organismos cianotrofos, de los que 1075 forman parte del genoma dispensable (accesorio) y 1007 el “coregenome” específico de las dos estirpes cianotrofas, siendo entre estos últimos donde deben localizarse los genes cianotrofos. Significativamente, entre estos genes se localizaron los genes de la agrupación génica *nit1C*, los cuales se han propuesto en el capítulo anterior como esenciales para la asimilación de cianuro. Estos resultados avalan el análisis comparativo e indican que la estirpe *P. fluorescens* NCIMB 11764 también asimila cianuro a través del mismo mecanismo que la estirpe CECT5344. Diferentes estudios han propuesto varias rutas de asimilación de cianuro en *P. fluorescens* NCIMB 11764, pero hasta el momento se desconocía la base genética de este mecanismo asimilador.

En este trabajo se ha demostrado que es esencial la participación de la nitrilasa NitC en la asimilación de cianuro, que tiene lugar a través de un nitrilo como intermediario. Si bien la asimilación de cianuro inorgánico está restringida a unas pocas estirpes bacterianas, existe una gran cantidad de procariontes capaces de usar cianuros orgánicos o nitrilos (R-CN) como fuente de nitrógeno. Los nitrilos constituyen una fuente de nitrógeno apta para los microorganismos que contienen nitrilasas (EC 3.5.5.1). Además de NitC, el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 contiene otros nueve genes pertenecientes a la superfamilia de las C-N hidrolasas/nitrilasas (Fig. 52). Las nitrilasas poseen un considerable potencial biotecnológico ya que el uso de nitrilos en la industria química está ampliamente extendido. La familia de las nitrilasas forma parte de la superfamilia de hidrolasas carbono-nitrógeno (PF00795), un conjunto de enzimas que comparten una significativa homología estructural entre ellas. Los miembros de dicha superfamilia se organizan en 13 ramas, que incluyen amidasas alifáticas, biotinidasas, β -ureidopropionasas, carbamilasas y *N*-aciltransferasas además de las nitrilasas. De las diferentes estirpes de *Pseudomonas* analizadas, curiosamente la única estirpe cianotrofa, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, es la que mayor número de nitrilasas posee, con un total de cuatro (Fig. 54). En contraposición, la estirpe no cianotrofa *P. mendocina* ymp, muy cercana filogenéticamente a la estirpe CECT5344, carece de nitrilasas, lo que sugiere que esta riqueza en nitrilasas podría estar relacionada con el fenotipo cianotrófico de la cepa CECT5344. Como se ha

descrito en este trabajo, de las cuatro nitrilasas de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, NitC es la única esencial para la asimilación de cianuro.

La capacidad de crecer con cianuro no sólo depende de una ruta de asimilación, sino también de mecanismos de resistencia basados principalmente en una cadena de transporte electrónico insensible a cianuro. El genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 contiene genes que codifican tanto citocromo como quinol oxidasas, dos ramas terminales de la cadena respiradora aeróbica presentes en bacterias. Sin embargo, esta estirpe carece de genes para la respiración anaeróbica de nitrógeno, comunes en muchos procariotas (Richardson, 2000). La oxidasa terminal insensible a cianuro es una quinol oxidasa con dos subunidades (I y II), codificada por los genes *cioAB* (Cunningham *et al.*, 1997). Los genes *cio* están altamente relacionados con los genes *cyd* de enterobacterias, donde la oxidasa terminal correspondiente contiene tres grupos prostéticos con diferentes características espectroscópicas: el hemo *b-588*, asociado con la subunidad I, y los hemos *b-595* y *d*, ambos asociados a la subunidad II, que forman un complejo llamado citocromo *bd* (Jünemann, 1997). El genoma de *P. pseudoalcaligenes* contiene tres operones *cio* (Fig. 56), a diferencia de otras *Pseudomonas*, que sólo poseen uno (*P. aeruginosa*, *P. putida* o *P. mendocina*) o dos (*P. stutzeri*, *P. fluorescens* o *P. syringae*) operones. El elevado número de operones *cio* en la estirpe CECT5344 puede estar relacionado con las condiciones ambientales del hábitat natural de esta bacteria. Respecto a las relaciones evolutivas entre las secuencias *cio*, son desconcertantes debido a que las secuencias *cioA* y *cioB* de los operones *cio1* y *cio3* de la estirpe CECT5344 están más estrechamente relacionadas con todos los genes *cio* de cualquier *Pseudomonadaceae*, excepto para una de las dos copias presentes en *P. stutzeri*, cuyas secuencias están a su vez más cercanas a las de la agrupación génica *cio2* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y a los genes *cyd* de *Enterobacteriaceae*. Estos datos sugieren que la transferencia horizontal ha participado en la evolución de los genes *cio* entre estas bacterias. La complejidad de la cadena respiratoria de *P. pseudoalcaligenes*, altamente ramificada y con seis posibles oxidasas terminales diferentes, merece ser comparada con las cadenas respiratorias bien caracterizadas de *P. aeruginosa* (Arai, 2011) y *P. putida* (Ugidos *et al.*, 2008). El posible reemplazamiento de los genes *cyd* y su función en la respiración en condiciones de deficiencia de hierro, el requerimiento de los citocromos *cbb₃* o *aa₃* para el crecimiento en condiciones normales o de escasez, respectivamente, y el papel de las diferentes isoformas del citocromo *bd* bajo diferentes circunstancias metabólicas debería evaluarse en el nuevo escenario respiratorio representado por *P. pseudoalcaligenes*. Es de resaltar que de los tres operones *cio* de la estirpe CECT5344, dos de ellos, *cio1* y *cio2*, presentan genes que codifican proteínas que podrían participar en la resistencia y/o destoxificación de cianuro. Entre estos se encuentran el gen *nit4* (BN5_01621), localizado 8 genes aguas

abajo de *orf1* (Figs. 37 y 58) y que codifica una 3-cianoalanina nitrilasa, así como genes que codifican un transportador de sulfato y una rodanasa localizados en el operón *cio2*. A pesar de la posible relación de estos genes con el metabolismo del cianuro, la elucidación de la ruta de asimilación de cianuro llevada a cabo en este trabajo, así como el papel esencial de los genes *cioAB* del operón *cio1* en la resistencia a cianuro propuesta en un trabajo anterior (Quesada *et al.*, 2007) descartan una función principal de estos genes en estos procesos.

Además de genes que participan en la asimilación/resistencia a cianuro, la secuenciación del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha permitido identificar genes que codifican proteínas que participan en procesos de interés biotecnológico, como la síntesis de bioplásticos, y predecir la capacidad catabólica de este microorganismo en el metabolismo de la atrazina y de compuestos aromáticos y furfúricos. Entre los genes de interés biotecnológico que presenta el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se encuentran genes que podrían participar en el metabolismo de polihidroxicanoatos (PHA). Los PHA son polioxoésteres biodegradables producidos por un gran número de bacterias, que los acumulan en el citoplasma en forma de gránulos de reserva cuando las condiciones ambientales no son óptimas para el crecimiento, principalmente en situaciones de limitación de nitrógeno y exceso de carbono (Anderson y Dawes, 1990; Madison y Huisman, 1999; Luengo *et al.*, 2003). Cuando el carbono se convierte en factor limitante, los PHA acumulados se degradan a oligómeros y monómeros que son utilizados como fuente de carbono y energía (Jendrossek y Handrick, 2002). Los PHA se forman a partir de monómeros de ácidos grasos 3-hidroxilados en los que el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del monómero contiguo (Madison y Huisman, 1999). Los PHA de cadena corta (scl-PHA) contienen monómeros formados por 4 o 5 átomos de carbono, y el prototipo de los scl-PHA es el poli3-hidroxibutirato (PHB), que es considerado como el PHA más común (Madison y Huisman, 1999). Los PHA de cadena media (mcl-PHA) contienen monómeros de 6 a 14 átomos de carbono. Estos son menos abundantes pero algunas especies de *Pseudomonas* los producen en determinadas condiciones (Timm y Steinbuchel, 1990; Luengo *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007). Los polihidroxicanoatos constituyen un campo de investigación de interés ya que tienen un elevado potencial biotecnológico como plásticos renovables y biodegradables (Van der Leij y Witholt, 1995). Los PHA tienen diferentes propiedades físicas y térmicas dependiendo de su composición monomérica. Así, los scl-PHA como el PHB constituyen un material altamente cristalino y frágil, pero existen técnicas para procesarlos como fibras extremadamente fuertes o películas (Aoyagi *et al.*, 2003; Iwata *et al.*, 2003). En contraposición, los mcl-PHA son elásticos y los de PHA copolímeros, constituidos por una mezcla de monómeros scl y mcl, tienen propiedades intermedias, ya que son flexibles y elásticos y sus propiedades

físicas y térmicas varían dependiendo de la proporción de unidades scl y mcl (Matsusaki *et al.*, 2000; Sudesh *et al.*, 2000).

En el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se han encontrado tres agrupaciones génicas que están implicadas en el metabolismo de PHA (Manso *et al.*, 2015). Estas agrupaciones contienen varios genes que codifican PHA sintasas, enzimas clave en la biosíntesis de PHA y que además catalizan la conversión estéreo-selectiva de sustratos (*R*)-3-hidroxiacil-CoA a PHA con la liberación de CoA. En base a su especificidad de sustrato “in vivo” e “in vitro”, las PHA sintasas se clasifican en dos tipos: la clase I, que utiliza preferentemente tiosteres CoA de varios ácidos grasos (*R*)-3-hidroxiolos de 3 a 5 carbonos, y la clase II, que utiliza normalmente tiosteres CoA de varios ácidos grasos (*R*)-3-hidroxiolos de 6 a 14 carbonos (Rehm, 2003). Las PHA sintasas PhaC1 y PhaC2 de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 pertenecen a la clase II de PHA sintasas (Fig. 57), mientras que PhaC es un miembro de la familia de PHA sintasas de clase I. Hasta la fecha sólo *Pseudomonas sp.* 61-3 y *Pseudomonas sp.* USM 4-55 producen un mezcla de homopolímeros P(3HB) y un copolímero aleatorio [P(3HB-co-3HA)] (Matsusaki *et al.*, 1998). Probablemente *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 también posee dos tipos de PHA sintasas con diferente especificidad de sustrato implicadas en la acumulación de PHA, es decir, PHB y PHA sintasas específicas para unidades 3HB y 3HA, respectivamente. Actualmente existen evidencias de la acumulación de PHA en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en presencia de cianuro, y recientemente se ha descrito la naturaleza química de estos biopolímeros (Manso *et al.*, 2015).

Los herbicidas de la familia s-triazina, como la atrazina [2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina], se usan ampliamente en el control de importantes cultivos como el maíz, el sorgo, la caña de azúcar y la piña. El uso extensivo de este tipo de herbicidas, junto con sus propiedades toxicológicas, requiere el desarrollo de estrategias para limpiar áreas en las que se acumulan estos compuestos. Algunos microorganismos, como *Pseudomonas sp.* ADP, entre otros, degradan atrazina, constituyendo así una atractiva posibilidad para la biorremediación de suelos contaminados con herbicidas de tipo s-triazina (Ralebits *et al.*, 2002). En *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se han encontrado genes posiblemente implicados en el metabolismo de la atrazina. Entre estos se encuentran genes homólogos a *atzD* (BN5_03419), *atzE* (BN5_03287) y *atzF* (BN5_03419), los cuales codifican enzimas implicadas en la mineralización del ácido cianúrico. Los genes *atzABC*, BN5_01272, BN5_03189 y BN5_01183, también presentes en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, podrían codificar enzimas que participan en los primeros pasos de las rutas degradativas de este tipo de herbicidas (De Souza *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2001). Estos datos sugieren que si bien esta bacteria sería incapaz de degradar la atrazina, podría sin embargo degradar

otros herbicidas de tipo s-triazina y derivados. Resultados preliminares indican que *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es incapaz de degradar atrazina, aunque sí puede usar intermediarios de la ruta catabólica de la atrazina, la s-triazina y el ácido cianúrico, como fuentes de nitrógeno. Existen numerosos estudios donde se describe que los distintos componentes que participan en el catabolismo de la atrazina, vía hidroxiatrazina, son codificados por elementos génicos móviles como elementos transponibles o plásmidos autotransmisibles (De Souza *et al.*, 1998). En *P. pseudoalcaligenes* los genes *atz* se localizan en diferentes regiones del genoma y no están flanqueados por elementos de inserción, lo que sugiere un origen diferente.

En el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 también se han encontrado genes (BN5_03547-BN5_03568) que podrían estar implicados en la degradación de compuestos aromáticos (Fig. 58), los cuales presentan homología con genes de algunas cepas del género *Marinobacter* aisladas de ambientes marinos contaminados con petróleo y otros compuestos aromáticos, como el naftaleno (Hedlund *et al.*, 2001). Estos genes en la estirpe CECT5344 están flanqueados por elementos móviles (ISSod6 transposasa, IS 1301; ISRM3), lo que sugiere que se trata de un operón catabólico probablemente con un origen evolutivo común a los operones catabólicos localizados en determinados plásmidos (Van der Meer, 2008).

El furano es un anillo aromático heterocíclico compuesto por cuatro carbonos y un átomo de oxígeno. Derivados del furano como el furfural (furano-2-carbaldehído) y el 5-hidroximetilfurfural son de gran interés ya que se forman como subproductos durante el pretratamiento ácido de residuos lignocelulósicos para la producción de bioetanol. La degradación microbiana de compuestos furánicos es de gran interés ya que el furfural y el 5-hidroximetilfurfural son tóxicos para las levaduras responsables del paso de fermentación (Allen *et al.*, 2010). Aunque un gran número de microorganismos son capaces de usar el ácido furánico como fuente de carbono y energía (López *et al.*, 2004; Wierckx *et al.*, 2011), no se conoce completamente la bioquímica y genética de este proceso. Las cepas capaces de degradar 5-hidroximetilfurfural descritas hasta el momento pueden asimilar también furfural, pero no al contrario (Wierckx *et al.*, 2011). *Cupriavidus brasiliensis* HMF14 tiene una agrupación génica implicada en la transformación de 5-hidroximetilfurfural a ácido furoico (Koopman *et al.*, 2010), un intermediario común con la ruta de degradación del furfural. Al igual que ocurre en la ruta de degradación de tolueno, esta ruta puede dividirse en dos partes, la ruta superior en la que se produce la transformación del furfural y/o 5-hidroximetilfurfural a ácido furoico, y la ruta inferior, responsable de la transformación del ácido furoico en intermediarios del ciclo de Krebs (Koopman *et al.*, 2010). *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 tiene una agrupación génica *hmfABCDE* cuyos genes son homólogos a los genes de *Cupriavidus* que

participan en la ruta inferior. Sin embargo, no se han detectado genes homólogos para la transformación de 5-hidroximetilfurfural (Fig. 59). Respecto a los genes presentes en la región comprendida entre BN5_02211 (*orf*) y BN5_02200 (*araC*), exceptuando el gen *psfD* (Fig. 59B), se encuentran únicamente en la cepa CECT5344, comparándola con otras *Pseudomonas*. Por otra parte, el regulador de la familia AraC presente en *P. putida* F1, está también conservado en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Fig. 59). La organización de este *locus*, junto con la presencia de elementos genéticos móviles sugiere firmemente que este operón, relacionado con la asimilación de compuestos furánicos, ha sido adquirido mediante transferencia horizontal.

En conclusión, este es el primer estudio que describe el genoma completo de una estirpe de *P. pseudoalcaligenes*, así como el primero de una bacteria capaz de asimilar cianuro. En el contexto del metabolismo del cianuro es importante resaltar la presencia de tres operones *cio* (Fig. 56) y un inusual elevado número de nitrilasas (Fig. 52). Además, la presencia de genes implicados en la producción de bioplásticos abre la posibilidad de optimizar el proceso de degradación de cianuro con el fin de obtener productos de valor añadido. La secuenciación del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha revelado el potencial catabólico de esta estirpe, por lo que esta estirpe cianotrófica puede ser utilizada en la eliminación simultánea de diferentes tóxicos.

Conclusiones

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

1. El análisis proteómico de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en condiciones cianotróficas ha permitido elucidar la ruta de degradación de cianuro, que incluye la formación de la cianhidrina del oxalacetato, a partir de cianuro y oxalacetato, y su posterior asimilación a través de la nitrilasa NitC.
2. Análisis transcriptómicos han demostrado que la agrupación génica *nit1C* de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, que contiene el gen que codifica la nitrilasa NitC, es inducible por cianuro y se transcribe en dos unidades transcripcionales, *nitA* y *nitB-H*. Los genes *nitB* y *nitC* son esenciales para la asimilación del nitrilo formado durante la degradación de cianuro. La nitrilasa NitC, además de utilizar la cianhidrina del oxalacetato, utiliza otros nitrilos como sustratos. El gen *nitA* de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 codifica un activador transcripcional en respuesta a cianuro.
3. La secuenciación y análisis del genoma de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 ha permitido identificar diferentes agrupaciones génicas implicadas en la degradación de cianuro. El estudio integrativo del análisis del genoma y proteómico ha permitido elucidar otros procesos metabólicos que ocurren durante la asimilación de cianuro, tales como la respiración insensible a cianuro, el metabolismo del cianato y algunos aminoácidos, y el metabolismo de polihidroxicanoatos.

Bibliografía

- Acera-Hernández F (2011). Degradación de derivados cianurados y resistencia al cianuro de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Tesis doctoral*.
- Allen SA, Clark W, McCaffery JM, Cai Z, Lanctot A, Slininger PJ, Liu ZL, Gorsich SW (2010). Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, 3:2.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25:3389-3402.
- Anderson AJ, Dawes EA (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev*, 54:450-472.
- Anderson RD, Roddam LF, Bettiol S, Sanderson K, Reid DW (2010). Biosignificance of bacterial cyanogenesis in the CF lung. *J Cyst Fibros*, 9:158-164.
- Antonini G, Bellelli A, Brunori M, Falcioni G (1996). Kinetic and spectroscopic properties of the cyanide complexes of ferrous haemoglobins I and IV from trout blood. *Biochem J*, 314:533-540.
- Aoyagi Y, Doi Y, Iwata T (2003). Mechanical properties and highly ordered structure of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] films: effects of annealing and two-step drawing. *Polym Degrad Stab*, 79:209-216.
- Arai H (2011). Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, 2:1-13.
- Asmus E, Garschagen H (1953). The use of barbituric acid for the photometric determination of cyanide and thiocyanate. *Z Anal Chem.*, 138:414-422.
- Banerjee A, Sharma R, Banerjee UC (2002). The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60:33-44.
- 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.
- Blom J, Albaum S, Doppmeier D, Puhler A, Vorholter FJ, Zakrzewski M, Goesmann A (2009). EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC Bioinformatics*, 10:154.
- Blumer C, Dieter H (2000). Iron regulation of the *hcnABC* genes encoding hydrogen cyanide synthase depends on the anaerobic regulator ANR rather than on the global activator GacA in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Microbiology*, 146:2417-2424.
- Bond CJ, Huang J, Hajduk R, Flick KE, Heath PJ, Stoddard BL (2000). Cloning, sequence and crystallographic structure of recombinant iron superoxide dismutase from *Pseudomonas ovalis*. *Acta Cryst*, D56:1359-1366.

- Borchers R (1977). Allantoin determination. *Anal Biochem*, 79:612-613.
- Borisov VB, Gennisb RB, Hempb J, Verkhovskyc MI (2011). The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases. *Biochim Biophys*, 1807:1398-1413.
- Boukhalfa H, Crumbliss AL (2002). Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals*, 15:325-339.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-256.
- Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M, Rajandream MA, Barrell BG, Parkhill J (2005). ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics*, 21: 3422–3423.
- Castillo-Rodríguez F (2005). Biotecnología Ambiental. *Tébar S.L.*, ISBN-978-84-7360-211-2.
- Cunningham L, Pitt M, Williams HD (1997). The *cioAB* genes *Pseudomonas aeruginosa* code for a novel cyanide-insensitive terminal oxidase related to the cytochrome *bd* quinol oxidases. *Mol Microbiol*, 24:579-91.
- De Angelis M, Gobetti M (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, 4:106-122.
- De Souza ML, Seffernick J, Martinez B, Sadowsky MJ, Wackett LP (1998). The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *J Bacteriol*, 180:1951-1954.
- Dorr PK, Knowles J (1989). Cyanide oxygenase and cyanase activities of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *FEMS Microbiol lett.* 60:289-294.
- Dybas MJ, Tataro GM, Criddle CS (1995). Localization and characterization of the carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp. strain KC. *Appl Environ Microbiol*, 61:758-762.
- Dubey SK, Holmes DS (1995). Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol*, 11:257-265.
- Ebbs S (2004). Biological degradation of cyanide compounds. *Curr Opin Biotechnol*, 15:231-236.
- Estepa J, Luque-Almagro VM, Manso I, Escribano MP, Martínez-Luque M, Castillo F, Moreno-Vivián C, Roldán MD (2012). The *nit1C* gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involved in assimilation of nitriles is essential for growth on cyanide. *Environ Microbiol Rep*, 4:326-34.
- Esteve-Núñez A, Caballero A, Ramos JL (2001). Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65:335-352.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.

- Felsenstein J (1995). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.57c. Seattle, WA, USA: Department of Genetics, University of Washington.
- Fraser CM, Eisen JA, Salzberg SL (2000). Microbial genome sequencing. *Nature*, 406:799-803.
- Gong JS, Lu ZM, Li H, Shi JS, Zhou ZM, Xu ZH (2012). Nitrilases in nitrile biocatalysis: recent progress and forthcoming research. *Microb Cell Fact*, 11:142.
- Harris R, Knowles CJ (1983). Isolation and growth of a *Pseudomonas* species that utilizes cyanide as a source of nitrogen. *J Gen Microbiol*, 129:1005-1011.
- Hedlund BP, Geiselbrecht AD, Staley JT (2001). Marinobacter strain NCE312 has a *Pseudomonas* like naphthalene dioxygenase. *FEMS Microbiol Lett*, 201:47-51.
- Heim S, Ferrer M, Heuer H, Regenhardt D, Nimtz M, Timmis KN (2003). Proteome reference map of *Pseudomonas putida* strain KT2440 for genome expression profiling: distinct responses of KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 to iron deprivation and a new form of superoxide dismutase. *Environ Microbiol*, 5:1257-1269.
- Herreo M, de Lorenzo V, Timmis KN (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistant selection markers for cloning a stable chromosomal insertion of foreign genes in gramnegative bacteria. *J Bacteriol*, 172:6557-6567.
- Holm NG y Neubeck A (2009). Reduction of nitrogen compounds in oceanic basement and its implications for HCN formation and abiotic organic synthesis. *Geochem Trans*, 10:9.
- Holm NG, Dumont M, Ivarsson M, Konn C (2006). Alkaline fluid circulation in ultramafic rocks and formation of nucleotide constituents: a hypothesis. *Geochem Trans*, 7:7.
- Howden AJ, Harrison CJ, Preston GM (2009). A conserved mechanism for nitrile metabolism in bacteria and plants. *Plant J*, 57:243-253.
- Hu Y, Ribbe MW (2012). Nitrogenase assembly. *Biochim Biophys Acta*, 1827:1112-1122.
- Huertas MJ, Luque-Almagro VM, Martinez-Luque M, Blasco R, Moreno-Vivian C, Castillo F, Roldan MD (2006). Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: role of siderophores. *Biochem Soc Trans*, 34:152-155.
- Husemann P, Stoye J (2010). r2cat: synteny plots and comparative assembly. *Bioinformatics*, 26:570-571.
- Iwata T, Tsunoda K, Aoyagi Y, Kusaka S, Yonezawa N, Doi Y (2003). Mechanical properties of uniaxially cold drawn films of poly([R]-3-hydroxybutyrate). *Polym Degrad Stab*, 79:217-224.

- Jendrossek D, Handrick R (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol*, 56:403-432.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci*, 8:275-282.
- Jünemann S (1997). Cytochrome *bd* terminal oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1321:107-127.
- Jurelevicius D, Alvarez VM, Marques JM, de Sousa Lima LR, Dias Fde A, Seldin L (2013). Bacterial community response to petroleum hydrocarbon amendments in freshwater, marine, and hypersaline water-containing microcosms. *Appl Environ Microbiol*, 79:5927-5935.
- Kawakami T, Kuroki M, Ishii M, Igarashi Y, Arai H (2010). Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 12:1399-1412.
- Knowles CJ (1976). Micro-organisms and Cyanide. *Biol Rev*, 40:652-680.
- Knowles CJ (1988). Cyanide utilization and degradation by microorganisms. *Ciba Foundation Symposium*. 140: Cyanide compounds in biology.
- Koopman F, Wierckx N, de Winde JH, Ruijsenaars HJ (2010). Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 4919-4924.
- Koppenol WH (2001). The Haber-Weiss cycle-70 years later. *Redox Report*, 6:229-234.
- Kunz DA, Nagappan O (1989). Cyanase-mediated utilization of cyanate in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Appl Environ Microbiol*, 55:256-258.
- Lai Q, Wang J, Gu L, Zheng T, Shao Z (2013). *Alcalinovorax marinus* sp., isolated from deep-sea water. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63:4428-4432.
- Lalucat J, Bennasa A, Bosch R, García-Valdés E, Palleroni NJ (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70:510-547.
- Laville J, Blumer C, Von Schroetter C, Gaia V, Defago G, Keel C, Haas D (1998). Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*, 180:3187-3196.
- Layh N, Parrat J, Willetts A (1998). Characterisation and partial purification of an enantioselective arylacetone nitrilase from *Pseudomonas fluorescens* DSM 7155. *J Mol Catal B-Enzym*, 5:467-474.
- Le Brun NE, Crow A, Murphy ME, Mauk AG, Moore GR (2010). Iron core mineralisation in prokaryotic ferritins. *Biochim Biophys Acta*, 1800:732-744.

Liolios K, Tavernarakis N, Hugenholtz P, Kyripides NC (2006). The genomes on line database (GOLD) V.2: a monitor of genome projects worldwide. *Nucl Ac Res*, 34:332-334

Logsdon M, Hagelstein K, Mudder T (1999). The management of cyanide in gold extraction (Booklet). *Int Coun Met Env*, 40.

Lopez MJ, Nichols NN, Dien BS, Moreno J, Bothast RJ (2004). Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 64:125-131.

Luengo JM, García B, Sandoval A, Naharroy G, Olivera EL (2003). Bioplastics from microorganisms. *Curr Opin Microbiol*, 6:251-260.

Luque-Almagro VM, Blasco R, Fernandez-Romero JM, Luque de Castro MD (2003). Flow-injection spectrophotometric determination of cyanate in bioremediation processes by use of immobilised inducible cyanase. *Anal Bioanal Chem*, 377:1071-1078.

Luque-Almagro VM (2005). Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Aplicaciones biotecnológicas. *Tesis Doctoral*.

Luque-Almagro VM, Blasco R, Huertas MJ, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Castillo F y Roldán MD (2005a). Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Biochem Soc Trans*, 33:1.

Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Roldán MD, García-Gil LJ, Castillo F, Blasco R (2005b). Bacterial Degradation of Cyanide and Its Metal Complexes under Alkaline Conditions. *Appl Environ Microbiol*, 71:940-947.

Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Roldán MD, Moreno-Vivián C, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F (2007). The cyanotrophic bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 responds to cyanide by defence mechanisms against iron deprivation, oxidative damage and nitrogen stress. *Environ Microbiol*, 9:1541-1549.

Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Sáez LP, Luque-Romero MM, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD, Blasco R (2008). Characterization of the *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 cyanase, an enzyme that is not essential for cyanide assimilation. *Appl Environ Microbiol* 74:6280-6288.

Luque-Almagro VM, Blasco R, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD (2011a). Bacterial cyanide degradation is under review: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a case of an alkaliphilic cyanotroph. *Biochem Soc Trans*, 39:269-274.

Luque-Almagro VM, Merchán F, Blasco R, Igeño MI, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD (2011b). Cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involves a malate:quinone

oxidoreductase and an associated cyanide-insensitive electron transfer chain. *Microbiol*, 157:739-746.

Luque-Almagro VM, Acera F, Igeño MI, Wibberg D, Roldán MD, Sáez LP, Hennig M, Quesada A, Huertas MJ, Blom J, Merchán F, Escribano MP, Jaenicke S, Estepa J, Guijo MI, Martínez-Luque M, Macías D, Szczepanowski R, Becerra G, Ramirez S, Carmona MI, Gutiérrez O, Castillo F, Manso I, Pühler A, Moreno-Vivián C, Schlüter A, Blasco R (2013). Draft whole genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Environ Microbiol*, 15:253-270.

Madison LL, Huisman (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63:21-53.

Mahaseth T, Kuzminov A (2015). Cyanide enhances hydrogen peroxide toxicity by recruiting endogenous iron to trigger catastrophic chromosomal fragmentation. *Mol Microbiol*, 96:349-367.

Mandel M, Higa A (1970). Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 53:154-162.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.

Manso I, Ibáñez MI, de la Peña F, Sáez LP, Luque-Almagro VM, Castillo F, Roldán MD, Prieto MA, Moreno-Vivián C (2015). *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, a cyanide-degrading bacterium with by-product (polyhydroxyalkanoates) formation capacity. *Microb Cell Fact*, 14:77.

Maringanti S, Imlay JA (1999). An intracellular iron chelator pleiotropically suppresses enzymatic and growth defects of superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 181:3792-802.

Marron AO, Akam M, Walker G (2012). Nitrile hydratase genes are present in multiple eukaryotic multiple supergroups. *PloSOne*, 7:e32867.

Marshall B, Goldberg D (2005). Automatic selection of representative proteins for bacterial phylogeny. *BMC Evol Biol*, 5:31-34.

Martinez B, Tomkins J, Wackett LP, Wing R, Sadowsky MJ (2001). Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J Bacteriol*, 183:5684-5697.

Mathangi DC, Nmasivayam A (2004). Calcium ions: its role in cyanide neurotoxicity. *Food Chem Toxicol*, 42:359-361.

Matsusaki H, Abe H, Doi Y (2000). Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. *Biomacromol*, 1:17-22.

McAfee BJ, Taylor A (1999). A review of the volatile metabolites of fungi found on wood substrates. *Nat tox*, 7:283-303.

- McGlynn SE, Beard TE, Broderick JB, and Peters JW (2010). Life's Origins: Potential for Radical Mediated Cyanide Production on the Early Earth. *J Cosmol*, 10:3315-3324.
- Meyer F, Goesmann A, McHardy AC, Bartels D, Bekel T, Clausen J, Kalinowski J, Linke B, Rupp O, Giegerich R, Pühler A (2003). GenDB-an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucl Ac Res*, 31:2187-2195.
- Miller AF (2004). Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol*, 8:162-168.
- Mills EM, Gunasekar PG, Isom GE, Pavlakovic G (1996). Cyanide-induced apoptosis and oxidative stress in differentiated PC12 cells. *J Neurochem*, 67:1039-1046.
- Møller BL (2010). Functional diversification of cyanogenic glucosides. *Curr Opin Plant Biol*, 13:338-347.
- Møller BL, Seigler DS (1999). Biosynthesis of cyanogenic glucosides, cyanolipids and related compounds. In: Singh, B.K. (Ed.), *Plant Amino Acids. Biochemistry and Biotechnology*, 563-609.
- Mudder TI, Botz MM, Smith A (2001). Chemistry and Treatment of Cyanidation Wastes Mining. *Journal Books Ltd. London*.
- Mudder TI, Whitlock JL (1984). Biological Treatment of Cyanidation Waste Waters. *Mineral and Metallurgical Processing, Society for Mining, Metallurgy, and Exploration*.
- Nichols NN, Mertens JA (2008). Identification and transcriptional profiling of *Pseudomonas putida* genes involved in furoic acid metabolism. *FEMS Microbiol Lett*, 284:52-57.
- Nikhil S, Rekha K, Sodhi JS, Bhalla TC (2009). In Silico Analysis of Amino Acid Sequences in Relation to Specificity and Physicochemical Properties of Some Microbial Nitrilases. *J Proteom Bioinform*, 2:185-192.
- Ofran Y, Rost B (2007). ISIS: Interaction Sites Identified from Sequence. *Bioinformatics*, 23:5-12.
- Pace HC, Brenner C (2001). The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biol*, 2.
- Peix A, Ramirez-Bahena MH, Velazquez E (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet Evol*, 9:1132-1147.
- Pessi G, Haas D (2004). Cyanogenesis in *Pseudomonas*. *JL Ramos. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers*, 3:671-686.

- Piotrowski M, Schönfelder S, Weiler EW (2001). The *Arabidopsis thaliana* isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode β -cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *J Biol Chem*, 276:2616-2621.
- Pitcher RS, Watmough NJ (2004). The bacterial cytochrome *cbb3* oxidases. *Biochim Biophys Acta*, 1655:388-399.
- Podar M, Eads JR, Richardson TH (2005). Evolution of a microbial nitrilase gene family: a comparative and environmental genomics study. *BMC Evol Biol*, 5:42-54.
- Pott AS, Dahl C (1998). Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology*, 144:1881-1894.
- Poulton JE (1998). Cyanide utilization and degradation by microorganisms. *Ciba Foundation Symposium*, 140: Cyanide compounds in biology.
- Prieto MA, de Eugenio LI, Galán B, Luengo JM, Witholt B (2007). Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas*: A Model System in Biology. *Pseudomonas*, Ramos JL, and Filloux (eds). Berlin, Germany: Springer, 5:397-428.
- Punta M, Coggill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer ELL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD (2012). *The Pfam protein families database: Nucl Ac Res*, 40:290-301.
- Puvaneswari N, Muthukrishnan J, Gunasekaran P (2006). Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. *Indian J Exp Biol*, 44:618-26.
- Quesada A, Guijo MI, Merchán F, Blázquez B, Igeño MI, Blasco R (2007). Essential role of cytochrome *bd*-related oxidase in cyanide resistance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Appl Environ Microbiol*, 73:5118-5124.
- Quiroga PN, Olmos V (2009). Revisión de la toxicocinética y la toxicodinamia del ácido cianhídrico y los cianuros. *Acta toxicol Argent*, 17:20-32.
- Rajesh RD, Abhinav G, Chandrajit B (2008). Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *J Hazard Mater*, 163:1-11.
- Ralebits TK, Senior E, van Verseveld HW (2002). Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. *Biodegradation*, 13:11-19.
- Rehm BH (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J*, 376:15-33.
- Richardson DJ (2000). Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology*, 146:551-571.

- Rodríguez-Ortega MJ, Grøsvik BE, Rodríguez-Ariza A, Goksøyr A, López-Barea J (2003). Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics*, 3:1535-1543.
- Rost B, Yachdav G, Liu J (2004). The PredictProtein server. *Nucl Ac Res*, 32:321-326.
- Rudrappa T, Splaine RE, Biedrzycki ML, Bais HP (2008). Cyanogenic Pseudomonads Influence Multitrophic Interactions in the Rhizosphere. *PLoS One*, 3:e2073.
- Sabath N, Ferrada E, Barve A, Wagner A (2013). Growth Temperature and Genome Size in Bacteria Are Negatively Correlated, Suggesting Genomic Streamlining During Thermal Adaptation. *Genom Biol Evol*, 5:966-977.
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4:406-425.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: A laboratory Manual, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanderson KL, Wescombe SM, Kirov A, Champion, Reid DW (2008). Bacterial cyanogenesis occurs in the cystic fibrosis lung. *Eur Resp J*, 32:329-33.
- Scibior D, Czetot H (2006). Catalase: estructura, propiedades and functions. *Postepy Hig Med Dosw*, 60:170-80.
- Shakir FK, Audilet D, Drake III AJ, Shakir KMM (1994). A rapid protein determination by modification of the Lowry procedure. *Anal Biochem*, 216:232-233.
- Shendure J, Hanlee J (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotech*, 26:1135-1145.
- Shiba T, Kido Y, Sakamoto K, Inaoka DK, Tsuge C, Tatsumi R, Takahashi G, Balogun EO, Nara T, Aoki T (2013). Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proc Natl Acad USA*, 110:4580.
- Shou Y, Li N, Li L, Borowitz JL, Isom GE (2002). NF- κ B-mediated up-regulation of Bcl-XS and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis. *J Neurochem*, 81:842-852.
- Silby MW, Cerdeño-Tárraga AM, Vernikos GS, Giddens SR, Jackson RW, Preston GM, Zhang XX, Moon CD, Gehring SM, Godfrey SA, Knight CG, Malone JG, Robinson Z, Spiers AJ, Harris S, Challis GL, Yaxley AM, Harris D, Seeger K, Murphy L, Rutter S, Squares R, Quail MA, Saunders E, Mavromatis K, Brettin TS, Bentley SD, Hothersall J, Stephens E, Thomas CM, Parkhill J, Levy SB, Rainey PB, Thomson NR (2009). Genomic and genetic analyses of

diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol*, 10:51.

Simon R, Prierer U, Pühler A (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology*, 1:784-791.

Smith JL (2004). The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 30:173-185.

Solórzano L (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite method. *Limnol Ocean*, 14:799-801.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2002). *Bioquímica*. 5ª Ed. Reverté, S.A.

Sudesh K, Abe H, Doi Y (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci*, 25:1503-1555.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28:2731-2739.

Thuku RN, Brady D, Benedik MJ, Sewell BT (2009). Microbial nitrilases: versatile, spiral forming, industrial enzymes. *J Appl Microbiol*, 106:703-727.

Timm A, Steinbüchel A (1990). Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol*, 56:3360-3367.

Triscari-Barberi T, Simone D, Calabrese FM, Attimonelli M, Hahn KR, Amoako KK, Turner RJ, Fedi S, Zannoni D (2012). Genome sequence of the polychlorinated-biphenyl degrader *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J Bacteriol*, 194:4426-4427.

Ugidos A, Morales G, Rial E, Williams HD, Rojo F (2008). The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environ Microbiol*, 10:1690-1702.

Ulrich LE, Zhulin IB (2010). The MisST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucl Ac Res*, 38:401-407.

Van der Leij FR, Witholt B (1995). Strategies for the sustainable production of new biodegradable polyesters in plants: a review. *Can J Microbiol*, 41:222-238.

Van der Meer JR (2008). A genomic view on the evolution of catabolic pathways and bacterial adaptation to xenobiotic compounds. In *Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology*. Díaz, E (ed.). Norfolk, UK: Caister Academic Press, 219-267.

Vetter J (2000). Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, 38:11-36.

- Vetting MW, de Carvalho LP, Yu M, Hegde SS, Magnet S, Roderick SL, Blanchard JS (2004). Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys*, 433:212-226.
- Vicuna D (2005). The role of peroxidases in the development of plants and their responses to abiotic stresses. *Doctoral Thesis*. Paper 15. <http://arrow.dit.ie/sciendoc/15>.
- Vilo CA, Benedik MJ, Kunz DA, Dong Q (2012). Draft genome sequence of the cyanide-utilizing bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain NCIMB 11764. *J Bacteriol*, 194:6618-6619.
- Wang SC, Frey PA (2007). S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. *Trends Biochem*, 32:101-110.
- Wasi S, Tabrez S, Ahmad M (2013). Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review. *Environ Monitoring Assess*, 185:8147-8155.
- Watanabe A, Yano K, Ikebukuro K, Karube I (1998). Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. *Microbiology*, 144:1677-1682.
- Wibberg D, Blom J, Jaenicke S, Kollin F, Rupp O, Scharf B, Schneiker-Bekel S, Sczcepanowski R, Goesmann A, Setubal JC, Schmitt R, Pühler A, Schlüter A (2011). Complete genome sequencing of *Agrobacterium* sp. H13-3, the former *Rhizobium lupine* H13-3, reveals a tripartite genome consisting of a circular and a linear chromosome and an accessory plasmid but lacking a tumor-inducing Ti-plasmid. *J Biotechnol*, 155:50-62.
- Wibberg D, Luque-Almagro VM, Igeño MI, Bremges A, Roldán MD, Merchán F, Sáez LP, Guijo MI, Manso MI, Macías D, Cabello P, Becerra G, Ibáñez MI, Carmona MI, Escribano MP, Castillo F, Sczyrba A, Moreno-Vivián C, Blasco R, Pühler A, Schlüter A (2014). Complete genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *J Biotechnol*, 175:67-68.
- Wierckx N, Koopman F, Ruijsenaars H, de Winde J (2011). Microbial degradation of furanic compounds: biochemistry, genetics, and impact. *Appl Microbiol Biotechnol*, 92:1095-1105.
- Zagrobelny M, Bak S, Møller BL (2008). Cyanogenesis in plants and arthropods. *Phytochemistry*, 69:1457-1468.
- Zagrobelny M, Bak S, Rasmussen AV, Jørgensen B, Naumann CM, Møller BL (2004). Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. *Phytochemistry*, 65:293-306.

.