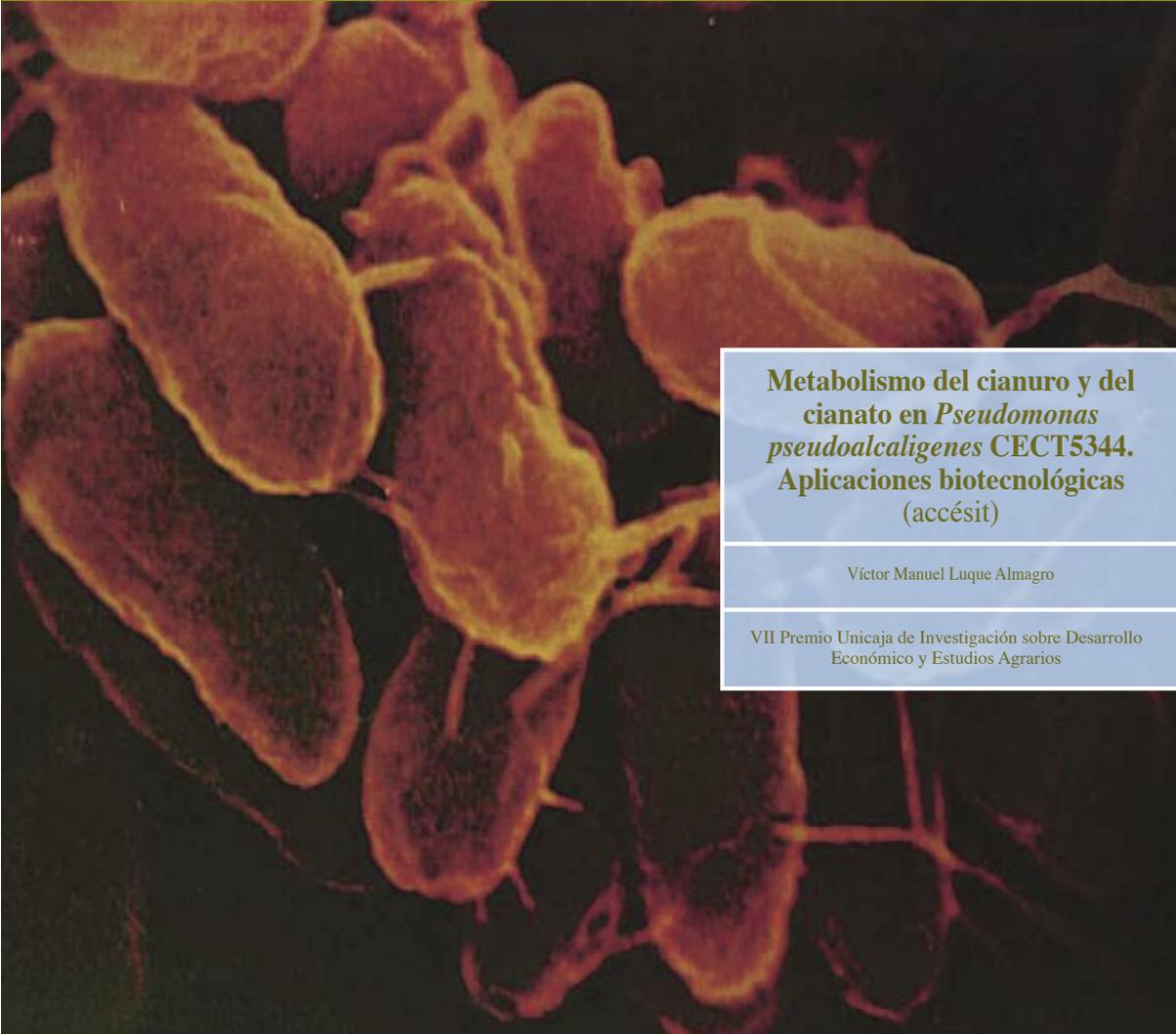


Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Aplicaciones biotecnológicas (accésit)

Víctor Manuel Luque Almagro

VII Premio Unicaja de Investigación sobre Desarrollo Económico y Estudios Agrarios



**Metabolismo del cianuro y del
cianato en *Pseudomonas
pseudoalcaligenes* CECT5344.
Aplicaciones biotecnológicas
(accésit)**

Víctor Manuel Luque Almagro

VII Premio Unicaja de Investigación sobre Desarrollo
Económico y Estudios Agrarios

Reunidos en la Ciudad de Málaga el día 13 de Mayo de 2005 un jurado presidido por Braulio Medel Cámara y compuesto por Isaias Pérez Saldaña, José Javier Rodríguez Alcaide, José Emilio Guerrero Ginel, José Manuel Domínguez Martínez y Francisco Villalba Cabello, decidió por unanimidad conceder a esta investigación un accésit del VII PREMIO UNICAJA DE INVESTIGACIÓN SOBRE DESARROLLO ECONÓMICO Y ESTUDIOS AGRARIOS. El premio fue convocado por Analistas Económicos de Andalucía en el otoño de 2004 y cuenta con el patrocinio de la Fundación UNICAJA.

Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Aplicaciones biotecnológicas

Equipo de Investigación y Edición

Investigación Víctor Manuel Luque Almagro

Coordinación M^a Dolores Fernández-Ortega Jiménez
Gráfica y Administración Rosa Díaz Montañez

**Proyecto,
Realización,
y Edición**



**Analistas
Económicos
de Andalucía**

Producción:

Analistas Económicos de Andalucía

C/ Ancla, nº 2 - 6ª planta. 29015 MÁLAGA

Tel.: 952 22 53 05 - 06

Fax: 952 21 20 73

e-mail: aea@unicaja.es

www.analistaseconomicos.com

D.L.: MA- I.508-2005

I.S.B.N.-10: 84-95191-81-4

I.S.B.N.-13: 978-84-95191-81-6

Papel:  Totally Chlorine-Free

La responsabilidad de las opiniones emitidas en este documento corresponde exclusivamente a los autores que no son, necesariamente, las de UNICAJA o Analistas Económicos de Andalucía.

Reservados todos los derechos. Queda prohibido reproducir parte alguna de esta publicación, su tratamiento informático o la transcripción por cualquier medio, electrónico, mecánico, reprografía y otro sin el permiso previo y por escrito del editor.

© Analistas Económicos de Andalucía, 2005

A Vicky
A mi familia

Agradecimientos

Después de estos cinco años me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido o participado en este trabajo.

En primer lugar, a mis directores, los doctores Francisco Castillo Rodríguez y Rafael Blasco Plá. A Paco, gracias por haberme permitido formar parte de tu grupo de investigación durante todo este tiempo. Trabajar bajo tu tutela me ha enriquecido enormemente a nivel profesional y ha sido para mí todo un lujo. A Rafa, gracias por saber guiar mis primeros pasos en el mundo de la ciencia, por la confianza que siempre has depositado en mí y por estar tan cerca a pesar de la distancia. A los dos, gracias por vuestra excelente labor de dirección.

Quisiera expresar también mis más sincero agradecimiento a mi tutor, el Dr. Manuel Martínez-Luque Romero, por su sabiduría, su valía personal y por mantenerme informado de los artículos más interesante de la revista Nature.

Al director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, el doctor Emilio Fernández Reyes, por permitirme formar parte de esta gran familia.

Al Dr. Conrado Moreno, me gustaría agradecerle su sincera disponibilidad y el interés que siempre ha mostrado por mi trabajo. Gracias también a la Dra. Lola Roldán por toda la ayuda que me ha prestado y por sufrir mi primera charla en inglés. A Javier le agradezco todos esos e-mails tan divertidos que siempre nos envía y que nos han hecho más llevaderos esos días de ciencia no tan buenos.

A mis compañeras de grupo (M^a José, Eva, Paqui, Carmen, Inma, M^a Paz) les doy las gracias por compartir tantos buenos momentos, por estar siempre dispuestas a ayudarme en todo y por esos cafetitos tan amenos que nos hemos tomado. A M^a José también le agradezco la infinita ayuda que me ha prestado con los experimentos. También quiero dar las gracias a las Dras Mónica Gavira y Lara, quienes sufrieron mis inicios y soportaron mis primeras preguntas.

A la Dra. M^a Dolores Luque de Castro, por haberme acogido tan amablemente en su laboratorio del departamento de Química Analítica de la UCO y por permitirme trabajar junto a una persona de tan reconocido prestigio científico y personal. Al Dr. Juan Manuel Fernández Romero, también del departamento de Química Analítica, por haberme introducido en el fascinante mundo de la química analítica y por su amistad. Al Dr. Isidoro García, por haberme acogido en su laboratorio del departamento de Ingeniería Química de la UCO, por ampliar mis conocimientos sobre biorreactores y por su simpatía. A la Dra. Anke Becker, por haberme aceptado en su laboratorio del departamento de Genética de la Universidad de Bielefeld (Alemania).

A los pinedines Goyi, Rosa, Pepe, M^a José, Alfonso, Javi, Esmeralda, Paco y Flavia. A Goyi por sus lecciones de HPLC y por estar siempre ahí cuando lo he necesitado. También gracias a Pedro Piedras por su amistad y sus charlitas en los pasillos. A la gente del grupo de Emilio y a los vecinos veterinarios.

A Conchi e Inés, por su eficiencia en el manejo del papeleo y por el cariño que siempre nos muestran a todos.

A Nuria y Rafa, por haberme suministrado algunas de las fotos presentadas en la Introducción de este trabajo. También doy las gracias a todos aquellos amigos que hacen que tenga presente que existe vida fuera de Rabanales.

Quiero también agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia por concederme una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) que me ha permitido realizar este trabajo.

Gracias a Analistas Económicos de Andalucía (Unicaja) por premiar este trabajo con un accésit en el VII Premio Unicaja de Investigación.

A mi familia, que de un modo u otro siempre han estado ahí. Gracias Rafa por la portada.

Y por último, a una persona muy especial que se merece mucho más que esta tesis. Una persona que siempre ha estado ahí, que me ha apoyado y que me ha escuchado. Una persona a la que a partir de ahora intentaré recompensar por todo el tiempo que le he robado durante la escritura de este trabajo. En definitiva, una persona sin la cual no hubiera sido posible este trabajo. Gracias también a su familia.

Gracias Vicky

Resumen

En Córdoba, la industria joyera genera como consecuencia de su actividad un residuo que contiene elevadas concentraciones de cianuro libre y complejos cianuro-metálicos. Con el objetivo de diseñar un proceso biotecnológico para eliminar estos compuestos tóxicos se ha aislado una bacteria autóctona alcalófila capaz de degradar cianuro en condiciones alcalinas. La bacteria, clasificada como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344, usa cianuro libre o el residuo de la joyería como fuente de nitrógeno para su crecimiento aeróbico. La ruta de degradación de cianuro en esta bacteria transcurre a través de cianhidrinas, mientras que su capacidad de sintetizar sideróforos le permite utilizar complejos cianurados. En cuanto a su regulación, la asimilación de cianuro es un proceso inducible e independiente de la presencia de otras fuentes de nitrógeno, tanto orgánicas como inorgánicas. Una aproximación proteómica ha revelado que en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 el cianuro induce la síntesis de sideróforos, estrés oxidativo y limitación de nitrógeno, condición esta última mediada por la proteína reguladora PII-2.

P. pseudoalcaligenes CECT5344 también es capaz de utilizar como fuente de nitrógeno cianato, un compuesto íntimamente relacionado con el cianuro. El metabolismo del cianato en este microorganismo podría depender de un transportador de bicarbonato y se encuentra bajo control por represión catabólica. Este trabajo establece por primera vez una relación entre el metabolismo del cianato y del cianuro, aunque un mutante en el gen *cynS* indica que el cianato no es un intermediario obligado en la asimilación de cianuro.

Hasta el momento, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es la primera bacteria descrita que degrada cianuro a pH alcalino en ausencia de glucosa, un compuesto que reacciona químicamente con el cianuro (reacción de Killiani). Además, este microorganismo es resistente a elevadas concentraciones de cianuro, asimila cianuro aún en presencia de amonio y nitrato, y degrada algunos de los complejos cianuro-metálicos más recalcitrantes que se conocen. Todas estas características hacen de esta bacteria un perfecto candidato para su uso en procesos biotecnológicos de descontaminación de cianuro, como se ha podido demostrar con la destoxificación en un biorreactor de un residuo producido por la industria joyera. y con la construcción de un biosensor de cianato. Por otro lado, algunas enzimas de esta bacteria también pueden ser utilizadas con propósitos biotecnológicos, como se muestra con la construcción de un biosensor de cianato utilizando la enzima cianasa.

Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Aplicaciones biotecnológicas

Índice

	ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	19
CAPÍTULO I	INTRODUCCIÓN.....	23
I.1.	La contaminación y el medio ambiente.....	23
I.2.	Biotecnología medioambiental.....	24
	Detección y cuantificación de contaminantes ambientales.....	25
	Biorremediación.....	27
I.3.	El cianuro y otros compuestos monocarbonados tóxicos.....	29
	La química del cianuro.....	30
	Fuentes de producción de cianuro.....	33
	Naturales.....	33
	Antropogénicas.....	36
	Toxicidad del cianuro.....	39
	Biodegradación de cianuro.....	40
	Resistencia a cianuro.....	41
	Rutas de degradación de cianuro.....	43
	Tratamientos de eliminación de cianuro.....	49
	Métodos físico-químicos.....	50
	Métodos biológicos.....	51
	El cianato.....	52
	Origen.....	52
	Toxicidad.....	53
	Biodegradación.....	54
I.4	Objetivos.....	57
CAPÍTULO II	MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
II.1.	Material biológico.....	61
	Enriquecimiento selectivo y aislamiento de una cepa degradadora de cianuro.....	61
	Análisis de la secuencia del gen rRNA 16S de la cepa degradadora de cianuro.....	61
	Estirpes bacterianas y plásmidos.....	61
II.2.	Medios y condiciones de cultivo.....	63
	Medios de cultivo.....	63
	Medios líquidos.....	63
	Medios sólidos.....	64
	Condiciones de cultivo.....	64
II.3.	Pureza y mantenimiento de los cultivos.....	65
II.4.	Obtención de extractos acelulares.....	65
	Recolección de células.....	65
	Preparación de extractos acelulares.....	65

II.5.	Purificación de la cianasa.....	66
	Purificación parcial a partir de <i>P. pseudoalcaligenes</i>	66
	Tratamiento térmico	66
	Cromatografía de intercambio iónico	66
	Purificación de la cianasa recombinante de <i>P. pseudoalcaligenes</i> expresada en <i>E. coli</i>	67
	Tratamiento térmico	67
	Fraccionamiento con sulfato amónico	67
II.6.	Caracterización de la cianasa de <i>P. pseudoalcaligenes</i>	67
	Determinación de la temperatura óptima y estabilidad térmica de la enzima	67
	pH óptimo	68
	Determinación de KM	68
	Efecto de posibles inhibidores	68
II.7.	Microscopía electrónica de transmisión.....	68
II.8.	Técnicas de manipulación del DNA	69
	Aislamiento de DNA	69
	Aislamiento del DNA total de <i>P. pseudoalcaligenes</i>	69
	Extracción del DNA plasmídico mediante columnas de intercambio iónico	69
	Cuantificación del DNA.....	70
	Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	70
	Electroforesis de DNA.....	70
	Recuperación de fragmentos de DNA de los geles de agarosa	71
	Ligación del DNA	71
	Transferencia de plásmidos por conjugación.....	72
	Transformación de células de <i>E. coli</i>	72
	Preparación de células competentes	72
	Transformación de las células competentes	72
	Secuenciación del DNA	73
	Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (“PCR”)	73
	Transferencia de DNA a membrana por el método de “Southern blot” e hibridación.....	74
	Hibridación en colonias.....	74
	Mutagénesis.....	75
	Mutagénesis por inserción al azar del transposón Tn5	75
	Interrupción del gen <i>cynS</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> mediante mutagénesis dirigida por doble recombinación homóloga.....	75
	Tratamiento y análisis de secuencias	76

II.9.	Métodos analíticos.....	77
	Medida del crecimiento celular	77
	Determinación de amonio.....	77
	Método colorimétrico (Nessler).....	77
	Método enzimático (Glutamato deshidrogenasa)	77
	Electrodo selectivo de ión amonio	78
	Determinación de nitrato.....	78
	Determinación de nitrito.....	78
	Determinación de cianuro.....	79
	Determinación de cianato	79
	Determinación de formamida.....	79
	Determinación de 2-oxoglutarato.....	79
	Determinación de piruvato	80
	Determinación de α -cetoácidos	80
	Determinación de metabolitos por HPLC	80
	Determinación de la concentración de proteínas.....	80
	Detección de sideróforos.....	81
II.10.	Medida de actividades enzimáticas	82
	Ensayo de la actividad nitrato reductasa.....	82
	Ensayo de la actividad cianuro oxigenasa	82
	Ensayo de la actividad cianidasa.....	82
	Ensayo de la actividad cianuro hidratasa (formamida hidrolíasa)	82
	Ensayo de la actividad cianasa	83
	Ensayo de la actividad β -cianoalanina sintasa (CAS).....	83
	Ensayo de la actividad nitrilasa/nitrilo hidratasa-amidasa... ..	83
	Ensayo de la actividad formamida hidratasa/formamidasa.	83
	Ensayo de la actividad rodanasa.....	84
	Ensayo de la L-asparraginasa	84
II.11.	Biotransformaciones utilizando suspensiones concentradas de células "Resting-cells"	84
II.12.	Electroforesis desnaturizante de proteínas (SDS-PAGE)	84
II.13.	Análisis proteómico	86
	Fraccionamiento subcelular.....	86
	Preparación de la muestra	86
	Electroforesis bidimensional.....	87
	Isoelectroenfoque (IEF)	87
	Equilibrado de las tiras de IEF	87
	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	88
	Tinción de geles.....	88
	Análisis de imagen de los geles.....	89
	Aislamiento de proteínas y análisis mediante espectrometría de masas.....	89

	Identificación de proteínas a partir de los resultados de espectrometría de masas	89
II.14.	Construcción de un biosensor de cianato.....	89
	Instrumentos y aparatos	89
	Reactivos.....	89
	Inmovilización de la cianasa	90
	Diseño del biosensor	91
II.15.	Biorreactor.....	91
II.16.	Tratamiento estadístico de los resultados	91
II.17.	Reactivos y aparatos	91
CAPÍTULO III	RESULTADOS	93
III.1.	Aislamiento, identificación y caracterización de una cepa bacteriana capaz de degradar cianuro en condiciones alcalinas	95
	Aislamiento e identificación de una cepa alcalófila capaz de utilizar cianuro como fuente de nitrógeno.....	95
	Caracterización fisiológica de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	96
	Ultraestructura.....	96
	pH óptimo de crecimiento.....	97
	Perfil de sustratos; degradación de cianuro y otros compuestos relacionados	98
III.2.	Metabolismo del cianuro en <i>Pseudomonas Pseudoalcaligenes</i>	101
	Asimilación de cianuro y optimización del proceso	101
	Resistencia a cianuro y rendimientos celulares	103
	Degradación de complejos cianuro-metálicos	106
	Producción de sideróforos	107
	Ruta de degradación de cianuro en <i>P. pseudoalcaligenes</i> ...	111
	Utilización de posibles intermediarios como fuentes de nitrógeno	111
	Determinación de actividades enzimáticas	113
	Análisis de metabolitos.....	120
	Determinación de α -cetoácidos.....	120
	Análisis de metabolitos mediante HPLC	122
	Regulación del metabolismo del cianuro.....	126
	Inducción de la degradación de cianuro	126
	Efecto de otras fuentes de nitrógeno en la asimilación de cianuro	126
	Efecto del cianuro en la asimilación de amonio, nitrato y nitrito.....	131

	Efecto de algunos aminoácidos en el consumo de cianuro.....	131
	Degradación de cianuro en medio rico	133
	Obtención de un mutante hiperresistente a cianuro	133
	Aproximación proteómica al estudio del metabolismo del cianuro en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	139
III.3.	Metabolismo del cianato en <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT5344	148
	Utilización de cianato como fuente de nitrógeno por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	148
	Crecimiento de la estirpe CECT5344 con cianato como única fuente de nitrógeno.....	148
	Actividad cianasa en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344..	149
	Regulación de la asimilación de cianato.....	152
	Inducción de la actividad cianasa	152
	Efecto de otras fuentes de nitrógeno en la asimilación de cianato	154
	Purificación parcial de la cianasa de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	158
	Clonación y secuenciación del gen que codifica la cianasa de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344. Purificación de la cianasa a partir de su expresión heteróloga en <i>E. coli</i>	159
	Obtención de un mutante de <i>P. pseudoalcaligenes</i> incapaz de utilizar cianato como fuente de nitrógeno.....	164
	Tolerancia a cianato.....	166
III.4.	Aplicaciones biotecnológicas del metabolismo del cianuro y del cianato en <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	168
	Biodegradación de un residuo cianurado procedente de la industria joyera.....	168
	Biodegradación de cianuro en un biorreactor.....	171
	Operación en cultivo discontinuo.....	171
	Operación en cultivo continuo.....	175
	Construcción de un biosensor de cianato.....	176
	Descripción del dispositivo.....	176
	Inmovilización de la cianasa	177
	Optimización de variables.....	180
	Características del método	181
	Aplicación del biosensor	183

CAPÍTULO IV	DISCUSIÓN.....	185
IV.1.	Aislamiento de una cepa bacteriana capaz de degradar cianuro en condiciones alcalinas.....	188
IV.2.	Metabolismo del cianuro en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	190
	Degradación de cianuro libre y complejos cianuro-metálicos, producción de sideróforos y resistencia a cianuro.....	190
	Ruta de degradación de cianuro y control de su metabolismo en <i>P. pseudoalcaligenes</i>	195
IV.3.	Metabolismo del cianato en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	205
	Cianasa de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344	205
	Regulación del metabolismo del cianato y función de la cianasa	209
IV.4.	Aplicaciones biotecnológicas	213
CAPÍTULO V	CONCLUSIONES.....	217
	BIBLIOGRAFÍA.....	221

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A	absorbancia
Ap	ampicilina
Ap^r	resistente a ampicilina
ASB-I4	amidossulfobetaina I4
β-CAS	β-cianoalanina sintasa
CAPS	3-(ciclohexilamino)-I-propanosulfonato
CAS	romo azulol S
CHAPS	3-[(3-cloramidopropil)-dimetilamonio]-I-propano sulfonato)
CHES	ácido 2-[ciclohexilamino] etanosulfónico
C/N	relación carbono/nitrógeno
CTAB	bromuro de cetiltrimetilamonio
2-DE	electroforesis bidimensional
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxinucleasa
dNTPs	desoxinucleótidos
DTE	ditioeritrol
DTT	ditiotreitrol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ERO	especie reactiva de oxígeno
Fig.	figura
g	gramos
GDH	glutamato deshidrogenasa
Gm	gentamicina
Gm^r	resistente a gentamicina
h	hora(s)
HDTMA	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
IEF	isoelectroenfoque
IMER	reactor con enzima inmovilizada
IPTG	isopropil-β-D-galactopiranosido
kb	kilobases
kDa	kilodalton
Kd	constante de disociación
Km	kanamicina
LB	Luria-Bertani
MALDI-TOF	“matriz-assisted laser desorption ionization, time of fly”
MES	ácido 2-morfolinoetano-sulfónico
mg	miligramo(s)
min	minuto(s)
ml	mililitro

MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
MW	peso molecular
μg	microgramos
μl	microlitros
μm	micrómetros
Nx	ácido nalidíxico
Nx^r	resistente a nalidíxico
p/v	relación peso/volumen
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pI	punto isoeléctrico
Pipes	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
PMF	huella peptídica
PMSF	fluoruro de metilfenilsulfonilo
ppm	partes por millón
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
RNA^r	RNA ribosómico
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SDS	dodecil sulfato sódico
TR	tiempo de retención
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidades
UFC	unidades formadoras de colonias
UV	ultravioleta
v/v	relación volumen/volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido



**Introducción y
Objetivos**

Capítulo I



I. INTRODUCCIÓN

I.1 La contaminación y el medio ambiente

Desde siempre las actividades humanas han producido residuos más o menos tóxicos, por lo que la contaminación no puede considerarse un fenómeno reciente. 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. Con la revolución industrial, las actividades económicas pasaron a fundamentarse en la industria y con ella, se produjo un importante despegue económico, científico y técnico. 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. Fue así como se iniciaron los problemas de contaminación. Actualmente, el aumento de la población y el desarrollo de las sociedades industrializadas han potenciado la degradación del medio ambiente debido, entre otros factores, a la gran cantidad de residuos generados que alteran el equilibrio de la naturaleza, a veces de forma irreversible.

La contaminación medioambiental está causada tanto por compuestos orgánicos sintéticos como por compuestos inorgánicos. 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 halocarburos (propelentes, disolventes, refrigerantes e insecticidas), nitroaromáticos (explosivos, disolventes, plaguicidas), 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. Lo mismo ocurre en el caso de los compuestos inorgánicos, la mayoría de los cuales entra dentro de los ciclos biogeoquímicos de una forma natural, pero los problemas de contaminación aparecen cuando la actividad de la sociedad industrializada aumenta la cantidad de material

inorgánico, superando la capacidad 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).

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 los últimos años (derrame de petróleo del *Exon Valdez* en Alaska y del *Prestige* en España, escape de metilisocianato en la planta de Union Carbide en Bhopal, escape de dioxinas en Seveso, etc.), se ha producido una concienciación social que ha provocado un aumento de la preocupación popular, el surgimiento de movimientos ecologistas y, como consecuencia, la promulgación de una legislación medioambiental. Como ejemplo, Gran Bretaña aprobó su primera Ley sobre Residuos Venenosos en 1972 tras un suceso de gran repercusión relacionado con el cianuro. No es que exista una incompatibilidad absoluta entre el desarrollo tecnológico, el avance de la civilización y el mantenimiento del equilibrio ecológico, pero es importante que el hombre sepa armonizarlos. Por esta razón, la adecuada protección y conservación del medio ambiente representa uno de los retos más importantes a los que se enfrenta actualmente la humanidad.

I.2 | Biotecnología medioambiental

En las últimas décadas la aplicación de la biotecnología a los problemas medioambientales ha posibilitado el desarrollo de estrategias encaminadas a resolver los problemas de contaminación, surgiendo así la biotecnología medioambiental. La biotecnología puede no ser una solución completa a la contaminación, pero puede funcionar como parte de un abordaje integrado para su control y eliminación. La biotecnología medioambiental está implicada principalmente en las siguientes áreas:

- Medidas de seguimiento de contaminantes.
- Biorremediación de zonas contaminadas.

DetECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CONTAMINANTES AMBIENTALES

La detección y cuantificación de contaminantes es fundamental tanto para la ejecución de cualquier ley medioambiental como para la aplicación de técnicas de descontaminación en aquellos lugares afectados. Debido a la elevada toxicidad de algunos compuestos, la tecnología debe ser capaz, en muchos casos, de determinar con precisión y consistencia contaminantes a muy bajas concentraciones.

Tradicionalmente la detección de la contaminación ambiental se ha basado en técnicas físico-químicas, como la espectroscopía y la cromatografía, que son potentes técnicas analíticas pero precisan unos laboratorios especializados y una instrumentación compleja y costosa. Como consecuencia de su limitada disponibilidad, en los 20 últimos años han surgido una serie de técnicas analíticas complementarias basadas en el uso de sistemas biológicos, los biosensores. La evolución de estos dispositivos analíticos se ha visto favorecida por el desarrollo paralelo de la bioquímica, la microelectrónica y la informática. Un biosensor puede definirse como un dispositivo que incorpora un elemento sensor biológico unido íntimamente o integrado con un transductor electrónico, el cual transforma la señal bioquímica en una respuesta eléctrica cuantificable (D'Souza, 2001) (Gráfico 1).

El elemento sensor (microzona sensible o zona de reconocimiento) utiliza la especificidad única de las moléculas biológicas, proporcionando así la sensibilidad y especificidad necesarias para detectar compuestos aislados en mezclas complejas. Los componentes biológicos necesitan ser inmovilizados para mantenerlos en contacto con el

transductor. Según el elemento biológico presente en la microzona sensible, el biosensor se puede basar en la interacción específica entre una enzima y su sustrato, en el reconocimiento entre antígeno y anticuerpo, en la

GRÁFICO 1 Componentes básicos de un biosensor

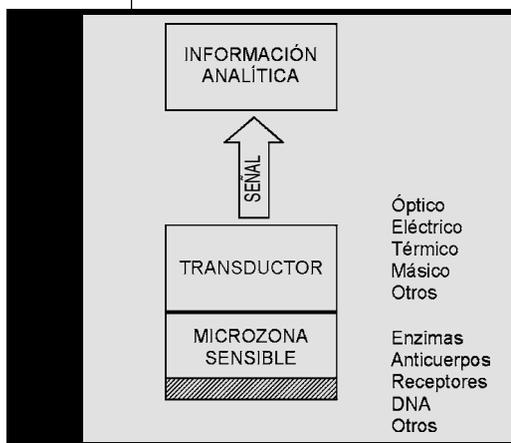
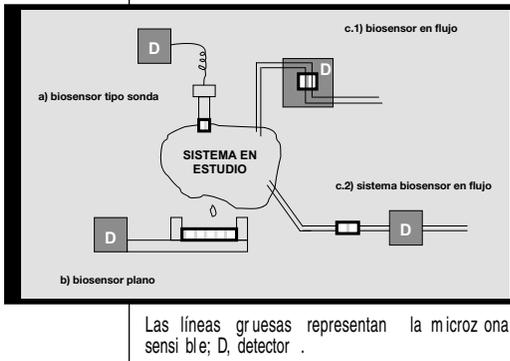


GRÁFICO 2

Clasificación de los biosensores según su forma externa



unión específica de una molécula diana y su receptor, en la alta afinidad entre una cadena de ácido nucleico y su secuencia complementaria, etc (Nakamura, 2003). Además de por el elemento biológico inmovilizado, los biosensores se pueden clasificar atendiendo a diversos criterios, como son la naturaleza

del parámetro medido, la forma de inmovilización del elemento biológico, el tipo de transductor, la relación existente entre la microzona sensible y el transductor, el funcionamiento, la forma externa (Gráfico 2), etc.

Las ventajas de los biosensores frente a otras técnicas analíticas son:

- Detección *on-line*, medidas en tiempo real.
- Respuesta rápida.
- Portátiles en muchos casos.
- Funcionan en mezclas complejas.
- Requieren menor gasto y menos tiempo que los métodos convencionales.
- Muy específicos en su respuesta.
- Alta sensibilidad.

Entre los biosensores utilizados más frecuentemente en la exploración medioambiental destacan aquellos que poseen células microbianas como componente biológico (Belkin, 2003). Estos biosensores microbianos se han aplicado a la determinación de cianuro, nitrito, herbicidas, demanda bioquímica de oxígeno, etc. (D'Souza, 2001). Los biosensores microbianos basados en la fusión de un gen testigo (como los que codifican la β -galactosidasa, la fosfatasa alcalina, la luciferasa o la proteína fluorescente verde) con un promotor que responde a determinados contaminantes medioambientales, y la posterior determinación electroquímica de la expresión génica, constituyen actualmente una herramienta muy potente en la detección de contaminantes (Paitan *et al.*, 2003). Otros biosensores con aplicaciones medioambientales se basan en la unión específica de contaminantes (metales y herbicidas) a moléculas de DNA, en enzimas inmovilizadas que utilizan tóxicos como

sustratos y en el reconocimiento de contaminantes por anticuerpos y moléculas receptoras (Baumner, 2003).

Biorremediación

El principio de infalibilidad microbiana propone que todo compuesto natural puede ser degradado si se dan las condiciones ambientales adecuadas (Alexander, 1965). La certeza de esta afirmación parece probada dado que no existen acumulaciones a gran escala de sustancias orgánicas naturales. La explicación de esta amplia capacidad degradativa característica de los microorganismos radica fundamentalmente en su temprano origen, hace aproximadamente 3,6 giga-años, lo que les ha permitido coexistir durante mucho tiempo con una inmensa variedad de compuestos y desarrollar enzimas capaces de utilizarlos. Además, su elevada capacidad reproductora les posibilita evolucionar de una forma más rápida que los organismos macroscópicos (Dua *et al.*, 2002; Wackett y Hershberger, 2000). Sin embargo, aunque algunos compuestos orgánicos sintéticos pueden ser degradados por el metabolismo microbiano debido a su parecido con algún compuesto natural, muchos son resistentes a la biodegradación. Otros compuestos orgánicos sólo son transformados en presencia de un sustrato metabolizable mediante procesos de cometabolismo o de utilización de cosustratos (Wackett y Hershberger, 2000; Alexander, 1965). La estabilidad biológica de aquellos compuestos resistentes a la biodegradación, denominados recalcitrantes, está relacionada con las características estructurales de la molécula, las limitaciones fisiológicas de los microorganismos y las condiciones ambientales (Alexander, 1999). Además, la reciente liberación al medio ambiente de estos nuevos compuestos no ha permitido todavía la evolución de nuevas capacidades degradativas. Su resistencia a la degradación biológica es la responsable de que estos compuestos experimenten una rápida y amplia difusión por todo el planeta y de que sufran el fenómeno denominado **bioacumulación**. Un contaminante es susceptible de inducir este proceso cuando es a la vez persistente y lipófilo, de forma que es acumulado en el material lipídico de los seres vivos y, consecuentemente, su concentración aumenta a lo largo de la cadena trófica (Atlas y Bartha, 2002). Este fenómeno puede provocar efectos destructivos en niveles tróficos superiores. Las elevadas concentraciones de DDT (hidrocarburo clorado utilizado como plaguicida) detectadas en los niveles tróficos superiores llevaron a la prohibición de su uso en Estados Unidos y en la mayoría de los países desarrollados.

El término **biodegradación** se utiliza con frecuencia para describir transformaciones de todo tipo, incluyendo tanto las que producen

compuestos más complejos que los de partida como la oxidación completa de compuestos orgánicos a sus componentes inorgánicos. Para evitar la ambigüedad de este término se ha propuesto el término **mineralización**, que se define como la degradación total y el reciclado de un compuesto orgánico a sus constituyentes inorgánicos (Atlas y Bartha, 2002). Haciendo uso de la potente capacidad biodegradadora de los microorganismos, ha surgido una nueva solución biotecnológica a los problemas de contaminación ambiental basada en el uso de microorganismos para eliminar contaminantes, la **biorremediación** (Atlas y Pramer, 1990). Para que esta tecnología sea aplicable frente a un contaminante específico es necesario que la sustancia sea biodegradable y que dicho proceso no provoque daños colaterales en el ecosistema (Atlas y Bartha, 2002).

La eliminación biológica de contaminantes se puede llevar a cabo, principalmente, a través de dos estrategias. Por una parte, cuando se trata de compuestos naturales fácilmente biodegradables se puede aumentar la velocidad de degradación potenciando el crecimiento de los microorganismos autóctonos mediante la aplicación de nutrientes, técnica denominada **bioestimulación**. Por otra, cuando se trata de sustancias xenobióticas o relativamente recalcitrantes, la estrategia suele consistir en la inoculación de la zona contaminada con microorganismos degradadores del contaminante en cuestión. Esta última técnica se denomina **biomagnificación** (Atlas y Bartha, 2002). Su bajo coste y la posibilidad de aplicación *in situ* convierten a la biodegradación en una atractiva alternativa a las tecnologías convencionales de descontaminación ambiental. La imposibilidad de aplicar esta tecnología en el lugar donde se produce la contaminación hace necesario a veces el desarrollo de técnicas de biorremediación *ex situ* mediante la utilización de biorreactores (Alexander, 1999). Estos reactores pueden contener microorganismos en suspensión o inmovilizados, así como enzimas. Además, el proceso de biorremediación puede ser continuo o discontinuo, dependiendo de si existe o no un flujo continuo de residuo a través del biorreactor.

A pesar de sus ventajas la biodegradación de contaminantes es limitada, sin embargo la ingeniería genética está posibilitando la obtención de microorganismos modificados genéticamente que poseen un mayor potencial biodegradador (Timmis y Pieper, 1999). Entre estos “biocatalizadores de diseño” (Dua *et al.*, 2002) se pueden encontrar organismos con mayor eficacia de biodegradación o que abarquen un mayor espectro de sustratos contaminantes (Chen *et al.*, 1999), bacterias con múltiples rutas de degradación que posibiliten la eliminación de compuestos recalcitrantes (Brenner *et al.*, 1994), y organismos que actúen como sensores de contaminantes mediante la emisión de bioluminiscencia

(Sayler y Ripp, 2000). Aunque estos microorganismos recombinantes ofrecen importantes beneficios en aplicaciones medioambientales, la imposibilidad de predecir su comportamiento en la naturaleza, junto con la ausencia de una legislación reguladora provocan la reticencia de la sociedad a su utilización. En los últimos años se están desarrollando estrategias de contención encaminadas a impedir tanto la transferencia génica entre los microorganismos manipulados genéticamente y las poblaciones autóctonas (**contención génica**), como la diseminación de los mismos fuera de las zonas contaminadas (**contención biológica**) (Torres *et al.*, 2000; Munthali *et al.*, 1996; Díaz *et al.*, 1994; de Lorenzo, 1994).

Además de los microorganismos, las plantas también constituyen una herramienta muy importante dentro de la biotecnología ambiental. La fitorremediación consiste en la utilización de plantas, asociadas o no con sus microorganismos, para degradar, contener, estabilizar o volatilizar contaminantes ambientales en el suelo, el agua o el aire (Morikawa y Erkin, 2003). Dependiendo de su mecanismo de actuación, se habla de fitodegradación, rizodegradación, fitoacumulación, fitoestabilización o fitovolatilización. La fitorremediación se ha utilizado con frecuencia en la regeneración de zonas contaminadas con metales. Esta “biotecnología verde” representa una solución estética a los problemas de contaminación, aunque presenta el inconveniente de que puede introducir los contaminantes que acumula en la cadena alimenticia. La importancia de las plantas en el contexto de la biotecnología ambiental no radica sólo en su utilización en procesos de descontaminación, como se ha señalado más arriba. A ello hay que sumar el diseño de plantas transgénicas resistentes a enfermedades o a herbicidas biodegradables, cuya utilización permite un menor uso de plaguicidas.

1.3 El cianuro y otros compuestos monocarbonados tóxicos

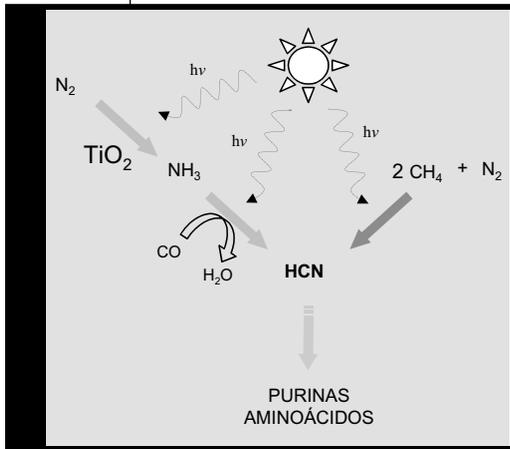
El cianuro es una molécula que presenta dos aspectos muy importantes desde el punto de vista biológico, su elevada toxicidad (que se discutirá más adelante) y su probable participación en el origen de la vida. Actualmente las teorías más aceptadas sobre el origen de la vida en la Tierra se basan en una **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**. El ácido cianhídrico (HCN) se originó en la Tierra probablemente durante los primeros estadios prebióticos a partir de monóxido de carbono, amoníaco y metano (Gráfico 3) (Connell *et al.*, 1997). Recientes investigaciones han demostrado que en algunas zonas desérticas ricas en TiO_2 ocurre una

reducción fotoquímica de N_2 a NH_3 en la superficie del dióxido de titanio, el cual actúa como catalizador. Dicho proceso podría haber proporcionado la fuente de NH_3 necesaria para la síntesis de cianuro en la Tierra prebiótica. Una vez sintetizado, el cianuro probablemente pasó a convertirse en un intermediario crítico en la síntesis de compuestos nitrogenados orgánicos. Esta hipótesis se apoya en una serie de experimentos en los que, a partir de cianuro, se ha conseguido sintetizar aminoácidos (glicina y relacionados) y bases nitrogenadas (adenina y guanina), los constituyentes de las biomoléculas esenciales de la vida (proteínas y ácidos nucleicos)

(Oró, 1977; Shapiro, 1995; Levy *et al.*, 2000; Miyakawa *et al.*, 2002).

GRÁFICO 3

Origen del cianuro y su posible participación en el origen prebiótico de biomoléculas



Es de destacar que la fórmula empírica de la adenina ($C_5H_5N_5$) corresponde a la del pentámero del ácido cianhídrico, es decir, que la polimerización de 5 moléculas de ácido cianhídrico puede dar lugar a 1 molécula de adenina. La aparente paradoja de esta reacción es que una de las

sustancias más tóxicas para la mayoría de los seres vivos sea el precursor prebiótico de una de las moléculas más importantes para la vida.

La química del cianuro

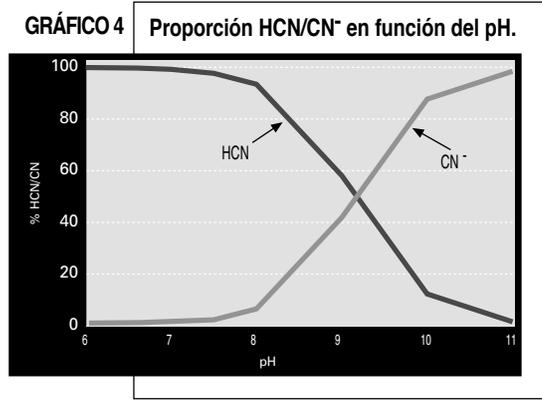
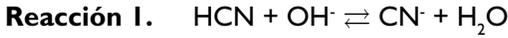
El cianuro es una molécula que se encuentra en la naturaleza en gran variedad de formas (Cuadro I). La gran diversidad y compleja naturaleza de los diferentes compuestos cianurados se puede explicar en función de las características químicas del grupo ciano ($-C\equiv N$). El anión cianuro, formado por un átomo de carbono y uno de nitrógeno, presenta un enlace σ , dos enlaces π y dos orbitales antienlazantes desocupados. Los dos primeros orbitales de su estructura se llenan con el número máximo de electrones, mientras que los otros orbitales están vacíos. Debido a que los orbitales σ y π ($1+2$) están llenos con electrones, el cianuro se comporta como un

halógeno. Sin embargo, su comportamiento pseudohalógeno no puede explicar la formación de complejos cianurados con los metales de la serie de transición como Fe, Co, Ni, Cu y Zn. Los orbitales anti-enlazantes desocupados del ión cianuro pueden formar orbitales híbridos con los orbitales “d” (parcial o totalmente llenos) de los metales de transición. La contribución de un par de electrones (bien del ión cianuro al metal o viceversa) se conoce como “enlace recíproco”, y explica la estabilidad de los complejos cianurados con metales. Por otra parte, el ión cianuro tiene también un triple enlace que puede romperse fácilmente, siendo el responsable de su elevada reactividad.

Los cianuros libres se definen como las formas de cianuro molecular (HCN) e iónica (CN⁻) liberadas en disolución acuosa 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 I**, dependiendo su proporción relativa del pH (Gráfico 4). Debido al relativamente elevado pK_a del HCN/CN⁻ (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.

CUADRO 1 Formas de cianuro

Clasificación	Compuestos
1. Cianuros inorgánicos	
1.1. Cianuro libre	CN ⁻ , HCN
1.2. Cianuros simples	
a) solubles	NaCN, KCN, Ca(CN) ² , Hg(CN) ²
b) sales neutras insolubles	Zn(CN) ² , Cd(CN) ² , Ni(CN) ² , CuCN, AgCN
1.3. Complejos de cianuro débiles	Zn(CN) ₄ ²⁻ , Cd(CN) ₃ ⁻ , Cd(CN) ₄ ²⁻
1.4. Complejos de cianuro moderadamente fuertes	Cu(CN) ₂ ⁻ , Cu(CN) ₃ ²⁻ , Ni(CN) ₄ ²⁻ , Ag(CN) ₂ ⁻
1.5. Complejos de cianuro fuertes	Fe(CN) ₆ ⁴⁻ , Fe(CN) ₆ ³⁻ , Fe(CN) ₅ ²⁻ NO, Co(CN) ₆ ⁴⁻
2. Cianuros orgánicos (nitrilos)	
2.1. Alifáticos	Propionitrilo, acetonitrilo, acrilonitrilo, etc.
2.2. Aromáticos	Benzonitrilo, cianopiridina, etc.
2.3. Glucósidos cianogénicos	Linamarina, amigdalina, durrin, etc.
2.4. Cianolípidos	



CUADRO 2

Estabilidad de diferentes complejos cianuro-metálicos

Nombre ⁽¹⁾	Fórmula	Constante de disociación
Hexacianoferrato (III) (ferricianuro)	[Fe(CN) ₆] ⁻³	1,0 x 10 ⁻⁵²
Hexacianoferrato (II) (ferrocianuro)	[Fe(CN) ₆] ⁻⁴	1,0 x 10 ⁻⁴⁷
Tetracianomercuriato (II)	[Hg(CN) ₄] ⁻²	4,0 x 10 ⁻⁴²
Tricianocuproato (I)	[Cu(CN) ₃] ⁻²	5,0 x 10 ⁻²⁸
Tetracianoniquelato (II)	[Ni(CN) ₄] ⁻²	1,0 x 10 ⁻²²
Dicianoargentato (I)	[Ag(CN) ₂] ⁻¹	1,0 x 10 ⁻²¹
Tetracianocadmio (II)	[Cd(CN) ₄] ⁻²	1,4 x 10 ⁻¹⁷
Tetracianocincato (II)	[Zn(CN) ₄] ⁻²	1,3 x 10 ⁻¹⁷

Fuente: Caruso, 1975.

(1) Los números romanos indican el estado de oxidación del átomo de metal.

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 metales pesados es consecuencia de su elevada afinidad por éstos. Entre los complejos cianuro-metálicos podemos encontrar formas muy estables, con una constante de disociación de hasta 10⁻⁵² M, y formas menos estables (Cuadro 2). 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 halla (Smith y Mudder, 1996). Entre estos compuestos se encuentran los hexacianoferratos, complejos octaédricos muy estables formados por hierro. A pesar de que estos complejos de hierro están

clasificados como inertes debido a su gran estabilidad química, en presencia de luz ultravioleta se pueden disociar lentamente por fotólisis, con la consiguiente liberación al medio de cianuro libre.

Los nitrilos ($R-C\equiv N$) son cianuros orgánicos 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, son β -glucósidos de α -hidroxinitrilos derivados de aminoácidos alifáticos y aromáticos (Zagrobelyny *et al.*, 2004; Møller y Seigler, 1999). Su hidrólisis es la responsable de la producción de la mayor parte del HCN generado por las plantas cianogénicas.

Fuentes de producción de cianuro

El cianuro se produce de forma natural en la biosfera y además es sintetizado y utilizado en una gran variedad de industrias.

Naturales

La síntesis biológica de cianuro (cianogénesis), descubierta por primera vez en plantas en 1803, es un fenómeno muy extendido entre bacterias, algas, hongos, plantas e insectos (Cuadro 3).

En bacterias, la cianogénesis se encuentra limitada a varias especies del género *Pseudomonas* y a *Chromobacterium violaceum*. En estos microorganismos la biosíntesis de cianuro tiene lugar durante la transición de la fase exponencial de crecimiento a la fase estacionaria, y está afectada por la concentración de hierro y fosfato del medio, lo que indica que este proceso forma parte del metabolismo secundario (Askeland y Morrison, 1983). Mientras que sólo algunas algas son capaces de producir cianuro, aproximadamente 300 especies de hongos, pertenecientes a 52 géneros, son cianogénicos (McAfee y Taylor, 1999). Las plantas son los principales productores de cianuro en la naturaleza, ya que aproximadamente 2600 especies diferentes de plantas, incluyendo helechos, gimnospermas y angiospermas, son cianogénicas (Zagrobelyny *et al.*, 2004; Vetter, 2000; Møller y Seigler, 1999). Entre estas plantas se encuentran cultivos de gran importancia económica como la alfalfa, el sorgo, el lino, el bambú, la patata, el algodón y la judía, así como diferentes árboles frutales. En el Cuadro 4 se exponen las concentraciones de cianuro encontradas en algunas plantas. En el reino animal la síntesis biológica de cianuro está restringida a los artrópodos; algunos centípedos, milípedos e insectos (coleópteros, heterópteros y lepidópteros) son capaces de producir cianuro (Nahrstedt, 1988).

CUADRO 3		Organismos cianogénicos
Bacterias		Chromobacterium violaceum
		Pseudomonas aeruginosa
		Pseudomonas chloraphilis
		Pseudomonas fluorescens
Algas		Chlorella vulgaris
		Nostoc muscorum
		Plectonema boryarum
		Anacystis nidulans
Hongos		Marasmius oreades
		Stemphyllium loti
		Gloeocercospora sorghii
Plantas		Almendras
		Manzanas
		Peras
		Cerezas
		Ciruelas
		Melocotón
Animales		Centípedos
		Milípedos
		Insectos (lepidópteros)
		Fuente: Eisler, 1991.

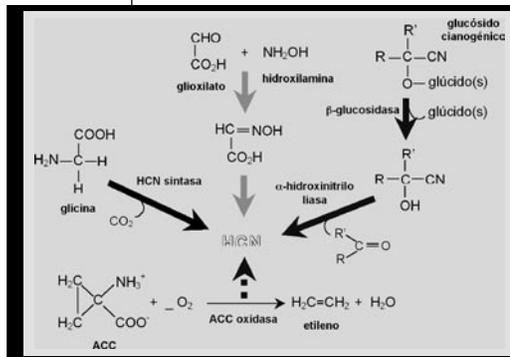
CUADRO 4		Concentración de cianuro presente en algunas plantas
Plantas	Concentración cianuro (mg · kg⁻¹)	
Yuca		
	hojas	377-500
	Raíz	138
Bambú		Máx. 8000
	Judía	2100
Almendras (amargas)		280-2500
	Sorgo	Máx. 2500
		Fuente: Elaboración propia.

Aunque los distintos organismos cianogénicos poseen diferentes rutas de producción de cianuro (Gráfico 5), éstas se pueden clasificar en dos grandes grupos: a) síntesis directa de cianuro (bacterias, algas y hongos) y b) producción de intermediarios cianurados estables (ej. glucósidos cianogénicos) y posterior degradación de éstos para producir cianuro (plantas y artrópodos). En la mayoría de bacterias y hongos el cianuro se sintetiza a partir de la glicina en una reacción catalizada por la HCN sintasa, enzima codificada por los genes *hcnABC* (Pessi y Haas, 2004; Laville et al., 1998). Pessi y Haas (2004) han propuesto recientemente que, en *P. fluorescens* CHA0 y *P. aeruginosa* PAO, esta enzima podría estar localizada en la membrana citoplásmica, lo que ocasionaría la liberación de HCN en el periplasma. En el caso de las algas cianogénicas, los precursores utilizados durante la síntesis de cianuro son el glioxilato, la hidroxilamina y la D-histidina (Knowles, 1988). En las plantas, la biosíntesis de cianuro se produce a través de dos mecanismos, uno asociado a la producción de etileno y otro a la degradación de glucósidos cianogénicos y cianolípidos, aunque tan sólo se consideran cianogénicas aquellas plantas que producen concentraciones elevadas a través del segundo mecanismo (Poulton, 1988). Al igual que en plantas, los artrópodos cianogénicos producen cianuro durante la descomposición de determinados glucósidos cianogénicos, principalmente linamarina y lotaustralina (Nahrstedt, 1988). Si bien todos los artrópodos cianogénicos son capaces de sintetizar *de novo* glucósidos cianogénicos, muchos lepidópteros poseen la capacidad de secuestrar los producidos por sus plantas hospedadoras (Zagrobelny et al., 2004). La biosíntesis de glucósidos cianogénicos en plantas y animales se lleva a cabo mediante la acción consecutiva de dos citocromos P450, con la formación de una aldoxima como intermediario. Posteriormente, la degradación de estos glucósidos cianogénicos, y la consiguiente producción de cianuro, es catalizada por las enzimas β -glucosidi-

Las flechas representan las rutas de biosíntesis de cianuro en bacterias y hongos (negro), en algas (gris claro) y en plantas y animales (gris oscuro, continua). La flecha gris oscura discontinua representa la producción de cianuro en plantas durante la síntesis de etileno a partir del ácido 1-amino-1-ciclopropilcarboxílico (ACC).

GRÁFICO 5

Biosíntesis de HCN en los diferentes organismos cianogénicos



Las flechas representan las rutas de biosíntesis de cianuro en bacterias y hongos (negro), en algas (gris claro) y en plantas y animales (gris oscuro, continua). La flecha gris oscura discontinua representa la producción de cianuro en plantas durante la síntesis de etileno a partir del ácido 1-amino-1-ciclopropilcarboxílico (ACC).

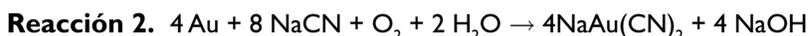
dasa y α -hidroxinitrilo liasa (Zagrobelny *et al.*, 2004; Vetter, 2000; Møller y Seigler, 1999).

El carácter tóxico del cianuro suele conferir a la cianogénesis una función defensiva u ofensiva, dependiendo de los casos. En bacterias, si bien se desconoce actualmente con certeza su función, algunos autores sugieren que la producción de cianuro constituye tanto un factor de virulencia como un mecanismo de biocontrol durante la interacción rizosfera-planta, donde se ha demostrado que el cianuro producido por algunas bacterias evita la proliferación de hongos fitopatógenos (Pessi y Haas, 2004). En *Anacystis nidulans* y *Chlorella vulgaris* el cianuro producido parece desempeñar funciones reguladoras (Pistorius *et al.*, 1979; Solomonson y Spehar, 1979). Normalmente los animales que se alimentan de plantas cianogénicas han evolucionado desarrollando mecanismos de tolerancia a cianuro, por lo que la función más probable de la biosíntesis de cianuro en plantas parece ser la de disuadir a aquellos herbívoros que casualmente se alimentan de este tipo de plantas (Zagrobelny *et al.*, 2004). La presencia de mandelonitrilo en las secreciones defensivas de milípedos, centípedos y algunos escarabajos, junto con el almacenamiento de diferentes glucósidos cianogénicos en aquellas partes del cuerpo que antes entran en contacto con el predador, apoyan también una función defensiva de la cianogénesis en estos animales (Nahrstedt, 1988; Møller y Seigler, 1999).

Antropogénicas

El cianuro se utilizó comercialmente por primera vez en 1889 en Nueva Zelanda, en la extracción y recuperación de oro y plata. Debido a sus características químicas, disponibilidad, efectividad y coste, actualmente este compuesto se utiliza ampliamente en diversos tipos de industrias y es considerado esencial en el mundo moderno. La producción mundial de HCN asciende a 2-3 millones de toneladas anuales (Raybuck, 1992). El 80% de este cianuro se utiliza 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. Otras aplicaciones industriales del cianuro incluyen el procesado de metales, la galvanoplastia y el endurecimiento del acero. En algunas ocasiones este tóxico se ha utilizado como fungicida, insecticida y raticida (ATSDR, 1993). Además, tanto el humo generado en la combustión de polímeros que contienen nitrógeno como el procedente de los cigarrillos provocan contaminación por HCN en el aire (Tsuchiya y Sumi, 1977). La minería es uno de los sectores que genera más residuos cianurados, ya que utiliza aproximadamente el 20% de la producción mundial de cianuro.

En este sector el cianuro es utilizado en la extracción de oro y plata de sus minerales. Por sus características químicas, este compuesto 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**. Este proceso se describe mediante la ecuación de Elsner (Mudder *et al.*, 2001) (Reacción 2):



Una vez disuelto, el oro es recuperado de la disolución por precipitación con cinc o por adsorción a carbón activo granular (Mudder *et al.*, 2001). Su disponibilidad y la solubilidad de sus complejos metálicos hacen del cianuro prácticamente el único agente lixivante que es utilizado en la extracción de oro y plata. La frecuente utilización de cianuro en la minería ha provocado en varias ocasiones graves problemas de contaminación ambiental. En enero del 2000, la rotura de una balsa minera situada en el noroeste de Rumania (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 una planta nuclear en Chernobil (Ucrania). Este tipo de acontecimientos han originado numerosas protestas de grupos ecologistas en contra de la utilización industrial del cianuro.

En la ciudad de Córdoba, la joyería constituye una actividad industrial muy extendida y de gran importancia económica. En este sector, el cianuro es utilizado en procesos de electropulido (Gráfico 6) 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 pesados (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.

GRÁFICO 6

Maquinaria de joyería donde se realiza el electropulido de las piezas mediante la utilización de cianuro



Debido a su elevada toxicidad, los residuos de la joyería son considerados por la normativa europea como residuos peligrosos (Decisión 2000/532/CE). En la legislación española, según la orden MAM 304/2002 de 8 de febrero (publicada en el BOE de 19 de febrero de 2002), los residuos cianurados generados por la industria joyera se incluyen dentro de los residuos de procesos químicos inorgánicos y se les asigna el código 060311.

En Córdoba, la empresa Gemasur, centro de transferencia reconocido por la Junta de Andalucía, retira actualmente 4-5 toneladas/año de residuo cianurado generado por aproximadamente 20 empresas de joyería (fuente: Gemasur). 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. De hecho, durante los años 1999 y 2000, en la provincia de Córdoba se declaró tan sólo la producción de 2 y 0 toneladas de residuos conteniendo cianuros, respectivamente (Informes 2000 y 2001 sobre Medio Ambiente en Andalucía, Junta de Andalucía). Además de los generados por la joyería, Gemasur gestiona en Córdoba 20 toneladas/año de residuos cianurados producidos por la industria aeronáutica y metalúrgica (fuente: Gemasur). 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 (Informe 2002 sobre Medio Ambiente en Andalucía), la producción declarada de residuos peligrosos conteniendo cianuros inorgánicos en el año 2001 en esta comunidad autónoma fue de 40 toneladas, 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, durante este año tan sólo se declararon 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, 1.853 y 58 toneladas durante los años 1999 y 2000, respectivamente.

A pesar de su origen natural, los nitrilos también son producidos de forma 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 (bromoxynil, clorotalonil, diclorobenil e ioxynil).

Toxicidad del cianuro

La toxicidad del cianuro es bien conocida desde hace mucho tiempo. Prueba de ello fue su utilización en la antigua Roma por el emperador Nerón, el cual empleó este compuesto para envenenar a varios miembros de su familia. Debido a su extrema toxicidad, el cianuro ha sido utilizado frecuentemente como arma química a lo largo de la historia y en las cámaras de gas. El cianuro también es uno de los tóxicos más utilizados en los suicidios, como el protagonizado por los seguidores de una secta en 1978, en Guyana, en el que murieron más de 900 personas. Actualmente el cianuro supone un peligro mundial debido a su posible utilización como agente químico tóxico por parte de grupos terroristas. En la naturaleza, el carácter tóxico del cianuro es aprovechado por muchas plantas y algunos insectos como un mecanismo de defensa frente a posibles agresores.

La toxicidad de las diferentes especies de cianuro depende de su forma 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 fuertes (Dubey y Holmes, 1995). El ión cianuro es un potente inhibidor del metabolismo celular, afectando principalmente a la respiración celular y al metabolismo del nitrógeno y del fosfato. La toxicidad del cianuro se debe principalmente a su elevada afinidad por metales, lo que ocasiona su unión a los cofactores metálicos de las metaloenzimas y, en último término, su inhibición. Entre las principales metaloenzimas inhibidas por el cianuro se encuentra la citocromo c oxidasa, enzima terminal de la cadena respiratoria mitocondrial (Gráfico 7). La inhibición de esta enzima bloquea la fosforilación oxidativa, disminuyendo la concentración de ATP en la célula y provocando la

muerte celular. Esta enzima mitocondrial es inhibida completamente por una concentración de cianuro 33 nM (Dubey y Holmes, 1995). Otras enzimas inhibidas por este compuesto son la catalasa, la peroxidasa, la tirosinasa, la ácido ascórbico oxidasa, la fosfatasa, etc. En microorganismos, además de inhibir el crecimiento, se ha descrito que el cianuro altera la morfología celular en *Bacillus pumillus*, modifica la motilidad de *Spirillum volutans*, aumenta el tiempo de generación de *E. coli* y causa mutaciones en *Neurospora crassa* (Dubey y Holmes, 1995). 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 oxidasa, existen otros factores que contribuyen a la toxicidad de este compuesto: a) unión a la hemoglobina, enzima responsable del transporte de oxígeno en la sangre, lo que imposibilita el suministro de oxígeno a los tejidos, b) alteración de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, ocasionando disfunciones en la actividad motora, y c) apoptosis inducida por cianuro (Mathangi y Namasivayam, 2004; Shou et al., 2002; Mills et al., 1996; Antonini et al., 1996). En humanos, el cianuro puede entrar en el cuerpo por inhalación y por vía oral, siendo rápidamente absorbido por el tracto respiratorio y el tubo digestivo. Su efecto corrosivo sobre la piel y su moderada liposolubilidad posibilitan también su absorción a través de la piel (Faust, 1994). Posteriormente, el cianuro es distribuido por todo el cuerpo a través de la sangre, provocando hipoxia citotóxica en todos los tejidos. Uno de los principales órganos sobre los 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. La dosis de cianuro intravenosa que es letal al 50% de la población humana expuesta (LD_{50}) es $1,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, mientras que la LD_{50} cuando el cianuro penetra a través de la piel es de $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

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 aquellas aguas destinadas a consumo humano. En España, la concentración máxima de cianuro permitida en aguas de consumo es de $50,0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (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.

Biodegradación de cianuro

Uno de los factores que determinan el carácter recalcitrante o biodegradable de un compuesto es el tiempo que éste ha estado en

la naturaleza en contacto con las diferentes poblaciones microbianas (Alexander, 1999). El origen prebiótico del cianuro, junto con la presión selectiva que supone su toxicidad, han permitido que muchos seres vivos hayan desarrollado mecanismos de resistencia e incluso rutas asimiladoras de cianuro.

Resistencia a cianuro

Entre los mecanismos de resistencia más importantes desarrollados por algunos seres vivos frente a este tóxico caben destacar: a) la existencia de rutas de degradación de cianuro y b) la presencia de una cadena de transporte de electrones insensible a cianuro. La degradación de cianuro a través de rutas catabólicas supone un mecanismo destoxicador muy importante en algunos organismos. Por otro lado, la extremada sensibilidad al cianuro de la citocromo oxidasa, junto con su papel crucial en la respiración celular, hacen necesaria la presencia de una oxidasa terminal insensible a cianuro en aquellos organismos aeróbicos tolerantes a este tóxico. La primera observación de la existencia de una respiración resistente a cianuro tuvo lugar en plantas (Genevois, 1929).

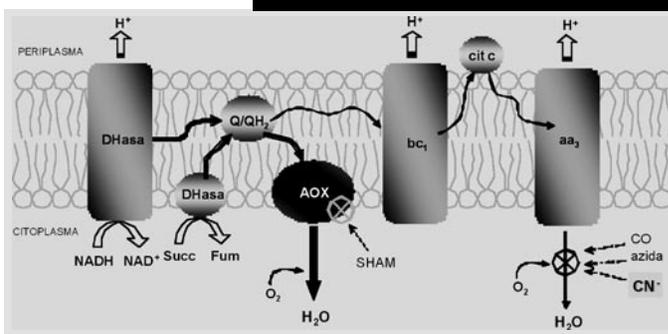
Los mamíferos han desarrollado un mecanismo de resistencia basado en la conversión del cianuro a un compuesto menos tóxico, el tiocianato, el cual es posteriormente eliminado a través de la orina. La enzima que cataliza esta reacción, la rodanasa, está ampliamente distribuida entre los seres vivos, desde bacterias a humanos (Bordo y Bork, 2002). En la mayoría de los animales, el hígado es el órgano que presenta mayor actividad rodanasa pero, sin embargo, también se encuentra una elevada actividad en las células epiteliales del tubo digestivo, en la mucosa de las vías respiratorias y en el córtex del riñón. La terapia utilizada en humanos frente a intoxicaciones provocadas por cianuro se basa principalmente en el incremento de la actividad rodanasa mediante la administración de tiosulfato y otros donadores de azufre. Otros tratamientos incluyen la quelación de cianuro por la hidroxibalamina (vitamina B_{12a}) o sales de cobalto, la conversión, inducida por nitrito, 4-dimetilaminofenol o *p*-aminopropiofenona, de hemoglobina a metahemoglobina, con mayor afinidad por el cianuro que la citocromo oxidasa, y la formación de cianhidrinas, menos tóxicas que el cianuro, por aldehídos.

Los mecanismos de resistencia a cianuro adoptados por las plantas cianogénicas incluyen la destoxicación de cianuro mediante la formación de β -cianoalanina, la inducción de una oxidasa alternativa insensible a cianuro y la compartimentación de los glucósidos cianogénicos y de

las enzimas responsables de su degradación, evitando de esta forma la producción de cianuro en condiciones normales (Poulton, 1988; Vanlerberghe y McIntosh, 1997). Tan sólo en condiciones de rotura tisular, como las ocasionadas por los herbívoros, enzimas y sustratos entran en contacto provocando la liberación de cianuro.

Algunos microorganismos también han desarrollado resistencia a cianuro mediante la adquisición de una ruta de degradación o a través de la inducción de una cadena respiratoria insensible a cianuro. El sistema de transporte de electrones de la mayoría de bacterias contiene múltiples oxidasas terminales con diferente sensibilidad a la inhibición por cianuro. Mientras pequeñas concentraciones de cianuro provocan un cambio cuantitativo en los diferentes componentes de la cadena respiratoria, disminuyendo los citocromos más sensibles y aumentando los más resistentes, concentraciones elevadas (>1 mM) inducen además una oxidasa alternativa insensible a cianuro (Chena y Liu, 1999; Cunningham y Williams, 1995; Ashcroft y Haddock, 1975; Oka y Arima, 1965). Esta oxidasa alternativa es la responsable de la resistencia de la cadena respiratoria al cianuro en muchas bacterias, así como en algunos protistas, hongos, algas y plantas. Esta enzima, presente en la membrana plasmática de bacterias y en la membrana interna mitocondrial de plantas y hongos, es inhibida específicamente por el ácido salicilhidroxámico (SHAM) (Gráfico 7).

GRÁFICO 7 Cadena respiratoria de transporte electrónico



En este esquema se representa el punto de inhibición del cianuro, la posición de la oxidasa alternativa en la cadena respiratoria y el flujo de electrones en presencia (flechas gruesas) o ausencia (flechas delgadas) de cianuro. AOX: oxidasa alternativa. SHAM: salicilhidroxámico. Succ.: succinato. Fum.: fumarato.

En microorganismos se ha descrito que la oxidasa alternativa podría ser una sulfoferro-proteína heterodimérica de 65 kDa, mientras que, en plantas, la oxidasa alternativa es una proteína homodimérica que posee un centro de hierro binuclear en su sitio activo (Veiga *et al.*, 2003; Berthold *et al.*, 2000; Chena y Liu, 1999). A diferencia del resto de oxidasas alternativas, en dos especies alcalófilas de *Bacillus* se ha descrito una oxidasa insensible a cianuro de naturaleza no proteica y que produce H_2O_2 en lugar de H_2O (Higashibata *et al.*, 1998). Tanto en eucariotas como en procariontes, la oxidasa alternativa recibe los electrones directamente del conjunto de quinonas de la membrana, evitando de esta forma el flujo de electrones a través de la citocromo oxidasa, punto de inhibición del cianuro (Gráfico 7).

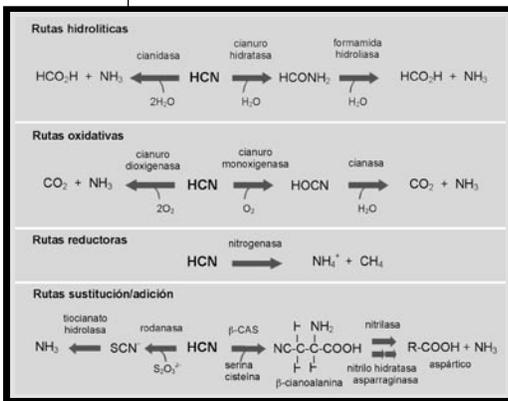
Hasta la fecha se ha descrito la presencia de oxidasas alternativas en varias estirpes bacterianas, siendo las más estudiadas la de *Pseudomonas aeruginosa* y la de *E. coli*. Entre las diferentes oxidasas terminales presentes en *P. aeruginosa* se encuentra la oxidasa insensible a cianuro, codificada por el operón *cioAB* (Cunningham *et al.*, 1997). Recientemente se ha descrito que este operón está regulado a nivel transcripcional por la concentración de O_2 intracelular, induciéndose en condiciones limitantes de O_2 . Esta regulación parece estar mediada a través de la proteína ANR, que controla la expresión de genes en respuesta al O_2 intracelular, y por el regulador transcripcional RoxR (Cooper *et al.*, 2003; Comolli y Donohue, 2002). En plantas, la oxidasa alternativa es regulada principalmente a nivel post-traducciona, mediante un sistema redox sulfidrilo/disulfuro existente entre las dos subunidades y a través de la activación por α -cetoácidos (Rhoads *et al.*, 1998). La sobreexpresión o mutación de los genes *cioAB* de *Pseudomonas aeruginosa* provoca efectos pleiotrópicos relacionados con la división celular y la sensibilidad a antibióticos, lo que sugiere que la oxidasa alternativa posee otras funciones además de conferir resistencia a cianuro (Tavankar *et al.*, 2003). Existen evidencias sobre la participación de esta oxidasa en el balance entre el metabolismo del carbono y el transporte de electrones, y en la defensa frente a especies reactivas de oxígeno (Veiga *et al.*, 2003). En plantas, la oxidasa alternativa también está implicada en la termogénesis de tejidos florales, responsable de la volatilización de compuestos atrayentes de insectos polinizadores (Vanlerberghe y McIntosh, 1997).

Rutas de degradación de cianuro

Tanto procariontes como eucariotas han desarrollado a lo largo de la evolución distintas rutas de degradación de cianuro. En mamíferos y

plantas este tipo de rutas tienen una función detoxificadora, mientras que en los microorganismos el catabolismo del cianuro constituye además un mecanismo asimilador. El cianuro supone tanto una fuente de carbono como de nitrógeno, aunque en la mayoría de los casos sólo es utilizado como fuente de nitrógeno. A pesar de la variedad de rutas degradativas existentes, todas tienen en común la conversión final del cianuro en amonio, compuesto nitrogenado fácilmente asimilable por los microorganismos. Las diferentes rutas de degradación de cianuro se pueden clasificar en cuatro tipos: a) hidrolíticas, b) oxidativas, c) reductoras y d) de sustitución/adición (Gráfico 8) (Ebbs, 2004; Dubey y Holmes, 1995; Raybuck, 1992).

GRÁFICO 8 Rutas de degradación de cianuro



Las rutas hidrolíticas, presentes en algunas bacterias y hongos, se caracterizan por una rotura enzimática del triple enlace C N mediada por una o dos moléculas de agua. Dentro de este tipo de rutas se pueden distinguir dos mecanismos principales: la hidrólisis de cianuro a ácido fórmico y amonio,

catalizada por la enzima cianidasa (cianuro dihidratasa) (EC 3.5.5.1), y la hidratación de cianuro a formamida mediada por la enzima cianuro hidratasa (formamida hidrolasa; EC 4.2.1.66). En algunas ocasiones la formamida y el ácido fórmico son posteriormente metabolizados a través de las enzimas formamida hidratasa (EC 3.5.1.49) y fórmico deshidrogenasa (EC 1.2.1.2), respectivamente. Mientras que la degradación de cianuro mediada por la cianidasa es una ruta muy frecuente en bacterias, la producción de formamida a partir de cianuro es el mecanismo que muchos hongos fitopatógenos han desarrollado para combatir la toxicidad del cianuro producido por las plantas que infectan. Entre las cianidasas hasta ahora descritas se encuentran algunas de elevada masa molecular (300 kDa), como las de *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *denitrificans* DF3 y *Bacillus pumilus* C1, y otras de bajo peso molecular (38 kDa), como las presentes en *Pseudomonas stutzeri* AK61 y *Burkholderia cepacia* C3 (Adjei y Ohta, 2000; Watanabe et al., 1998; Ingvorsen et al., 1991; Meyers et al., 1991).

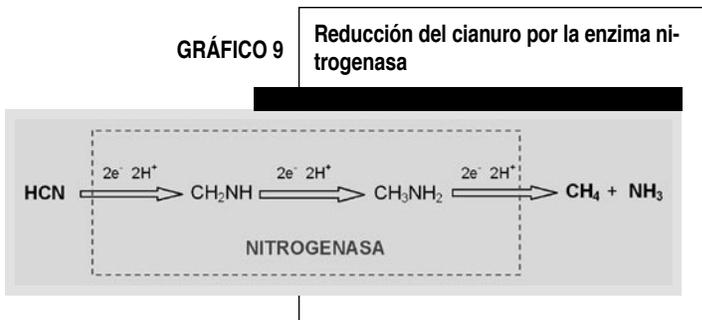
De todas las cianidasas descritas, tan sólo se conoce en detalle la de *B. pumilus* CI, la cual está constituida por 18 subunidades y posee una estructura espiral. Los genes que codifican la cianidasa de *P. stutzeri* AK61 y *B. pumilus* se han clonado, secuenciado y expresado en *E. coli* (Jandhyala et al., 2003; Watababe et al., 1998). En *B. pumilus* algunos estudios sugieren la posibilidad de que el gen que codifica esta enzima y los genes implicados en la esporulación posean mecanismos reguladores similares (Jandhyala et al., 2003). En el año 1972 se describió por primera vez, en el hongo fitopatógeno *Stemphylium loti*, la existencia de una cianuro hidratasa que cataliza la conversión de cianuro en un compuesto menos tóxico, la formamida (Fry y Millar, 1972). A pesar de que esta enzima sólo se encuentra en hongos (*Stemphylium loti*, *Gloeocercospora sorghi*, *Fusarium lateritium*, *Fusarium solani*, *Leptosphaeria maculans*), principalmente fitopatógenos, se ha descrito que la bacteria *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 es capaz de producir formamida durante la degradación de cianuro a través de un mecanismo de reacción aún confuso (Fernández et al., 2004). De todos los hongos conocidos que contienen cianuro hidratasa, sólo *G. sorghi* es incapaz de metabolizar posteriormente la formamida, lo que indica que la degradación de cianuro en este hongo sólo posee carácter destoxificador. Se ha aislado y secuenciado el gen *cht* que codifica la cianuro hidratasa de los diferentes hongos.

Un segundo tipo de rutas, exclusivas de bacterias, utilizan oxigenasas para catalizar la conversión de cianuro en NH_3 y CO_2 . Entre los organismos que han desarrollado rutas oxidativas de degradación de cianuro se encuentra la estirpe BCN6 de *E. coli*, que posee una dioxigenasa capaz de catalizar la oxidación directa de cianuro a NH_3 y CO_2 , y *P. fluorescens* NCIMB 11764, donde se ha estudiado este tipo de rutas más en detalle (Figueira et al., 1996; Harris y Knowles, 1983). Desde su aislamiento en 1983 por Harris y Knowles, son varios los mecanismos propuestos en la degradación de cianuro en *P. fluorescens* NCIMB 11764. Inicialmente se propuso una ruta de asimilación de cianuro basada en la producción de cianhidrinas a partir de cianuro y α -cetoácidos, pero posteriormente se presentaron evidencias de la existencia de varias rutas de conversión de cianuro en esta bacteria, una ruta oxidativa y dos mecanismos hidrolíticos responsables de la producción de fórmico y formamida (Kunz et al., 1994; Kunz et al., 1992). Recientemente se ha purificado una cianuro oxigenasa dependiente de pterina, que cataliza la conversión de cianuro a NH_3 y CO_2 en presencia de NADH (Fernández et al., 2004; Kunz et al., 2001). Fernández et al. han propuesto un mecanismo de reacción según el cual esta oxigenasa produce amonio y fórmico, el cual es posteriormente oxidado por la formiato deshidrogenasa, a través de un intermediario tipo

oxazarina. Además, esta misma enzima generaría durante esta reacción pequeñas cantidades de formamida como subproducto (Fernández *et al.*, 2004).

A pesar de que en varios trabajos se ha propuesto al cianato como posible intermediario de las rutas oxidativas, originado por una cianuro monooxigenasa y posteriormente metabolizado por la cianasa, en ningún caso se ha podido establecer una relación entre la degradación de cianuro y el metabolismo del cianato (Suh *et al.*, 1994; Dorr y Knowles, 1989).

La nitrogenasa es una enzima capaz de reducir una gran variedad de sustratos (N_2 , N_2O , CO , C_2H_2 , N_3^- , H^+ y HCN) (Rivera-Ortiz y Burris, 1975). Esta enorme versatilidad le confiere la capacidad, además de fijar N_2 atmosférico, de degradar cianuro mediante su reducción a metano y amonio (Li *et al.*, 1982). Las bacterias *Rhodospseudomonas gelatinosa*, *Azotobacter chroococcum*, *Azotobacter vinelandii* y *Klebsiella oxytoca* degradan cianuro a través de esta enzima (Liu *et al.*, 1997; Lowe *et al.*, 1989; Kelly *et al.*, 1967). Li *et al.* (1982) demostraron que mientras el ión CN^- inhibe de forma reversible el flujo de electrones a través de la nitrogenasa, el HCN actúa como sustrato de dicha enzima. El mecanismo de reducción del ácido cianhídrico incluye la formación de dos intermediarios parcialmente reducidos, la metilnimina y la metilamina, y la producción de amonio y metano, compuestos totalmente reducidos (Gráfico 9) (Li *et al.*, 1982).



El cianuro es un compuesto nucleófilo y con gran afinidad por el azufre, principalmente por la forma persulfuro ($R-S-S^-$). Estas propiedades han sido aprovechadas por algunos seres vivos para desarrollar mecanismos de detoxificación y asimilación de cianuro basados en reacciones de adición/sustitución. Entre estas rutas cabe destacar la formación de tiocianato a partir de cianuro y un donador de azufre, reacción catalizada por sulfurotransferasas (ST), y la producción de β -cianoalanina

a partir de cianuro y diferentes aminoácidos (Raybuck, 1992). Entre las sulfurotransferasas que catalizan la primera reacción se encuentran la rodanasa (EC 2.8.1.1) y la mercaptopiruvato sulfurotransferasa (EC 2.8.1.2), enzimas que utilizan respectivamente tiosulfato y mercaptopiruvato como donadores de azufre. Ambas enzimas están ampliamente distribuidas entre los seres vivos (animales, plantas, hongos y microorganismos), siendo la rodanasa la enzima responsable de la destoxificación de cianuro en humanos. Esta enzima se encuentra en las mitocondrias del hígado de mamíferos, perfectamente posicionada para impedir la inactivación de la citocromo *c* oxidasa. La rodanasa también parece estar involucrada en la formación de centros sulfo-férricos, en el metabolismo energético e incluso parece tener una actividad tiorredoxina oxidasa (Nazifi *et al.*, 2003). La formación de β -cianoalanina a partir de cianuro y diferentes aminoácidos (L-cisteína en plantas y L-serina en bacterias) es el mecanismo adoptado por algunas bacterias, plantas e insectos para degradar cianuro (Dubey y Holmes, 1995; Witthohn y Naumann, 1984). La β -cianoalanina sintasa (β -CAS; EC 4.4.1.9), enzima que cataliza dicha reacción, se ha descrito en diferentes plantas y en las bacterias *Bacillus megaterium*, *E. coli*, *Enterobacter* sp. 10-1 y *Chromobacterium violaceum*, requiriendo en todos los casos piridoxal fosfato como cofactor (Sakai *et al.*, 1981; Brysk *et al.*, 1969; Castric y Strobel, 1969; Dunnill y Fowden, 1965). Además de β -cianoalanina, *Chromobacterium violaceum* genera durante la degradación de cianuro ácido γ -ciano- α -L-aminobutírico (Brysk y Ressler, 1969). La β -cianoalanina producida por la enzima β -CAS es metabolizada posteriormente a ácido aspártico y amonio, aunque en algunas plantas este intermediario reacciona con un donador de glutamilo para formar el dipéptido γ -glutamil- β -cianoalanina.

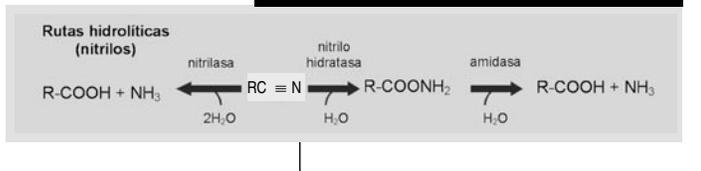
Los mecanismos de destoxificación de cianuro desarrollados por las plantas incluyen tanto la formación de tiocianato como la producción de β -cianoalanina (Meyer *et al.*, 2003). Las sulfurotransferasas de plantas implicadas en la degradación de cianuro se han estudiado en detalle en *Arabidopsis thaliana*, mientras que la enzima β -CAS se ha purificado de *Solanum tuberosum*, *Lathyrus latifolius*, *Spinacia oleracea* y *Arabidopsis thaliana* (Maruyama *et al.*, 2000). En esta última se han identificado y aislado tres genes que codifican tres cisteína sintasas, una de las cuales posee actividad β -CAS *in vivo* (Yamaguchi *et al.*, 2000).

A pesar de que la degradación de cianuro libre está ampliamente distribuida entre los seres vivos, tan sólo un número muy reducido de microorganismos poseen la capacidad de degradar los complejos metálicos de cianuro. Entre las posibles causas se encuentran tanto su elevada

estabilidad como el carácter tóxico de algunos metales que forman parte de estos complejos. Sin embargo, bacterias como *P. putida* BCN3, *Klebsiella* sp. y *P. fluorescens* NCIMB 11764 son capaces de utilizar $K_2Ni(CN)_4$ como fuente de nitrógeno (Silva-Avalos *et al.*, 1990; Rollinson *et al.*, 1987). De igual forma se ha demostrado que las estirpes NCIMB 11764 y P70 de *P. fluorescens* poseen la capacidad de degradar los complejos $K_2Cu(CN)_4$ y $K_4Fe(CN)_6$, respectivamente (Dursun *et al.*, 1999; Rollinson *et al.*, 1987). Finnegan *et al.* (1991) han descrito una bacteria, *Acinetobacter* sp., capaz de degradar un gran número de complejos cianuro-metálicos (de Au, Ag, Cd, Zn, Cu, Fe y Co) mediante un complejo lipoenzimático extracelular. Además de estas bacterias, hongos como *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*, tanto en cultivos puros como formando parte de poblaciones mixtas, son capaces de utilizar los complejos cianurados $K_2Ni(CN)_4$ y $K_4Fe(CN)_6$ como fuentes de nitrógeno (Yanase *et al.*, 2000; Barclay *et al.*, 1998; Barclay *et al.*, 1998). *Cryptococcus humicolus* MCN2 es una levadura capaz de degradar $K_2Ni(CN)_4$ (Kwon *et al.*, 2002). Actualmente se desconocen los mecanismos utilizados en la degradación de los distintos complejos cianuro-metálicos, como es su posible disociación en cianuro libre dentro o fuera de las células, su transporte y su posible actuación como sustratos. Tan sólo se conoce que tanto el cianuro libre como sus formas metálicas son metabolizados por los mismos sistemas enzimáticos.

Al igual que las formas inorgánicas de cianuro, los nitrilos son utilizados por algunos microorganismos como fuentes de carbono y/o nitrógeno. Las enzimas responsables de la degradación de estos compuestos se encuentran principalmente en bacterias, mientras que tan sólo 3 familias de plantas (*Gramineae*, *Cruciferae* y *Musaceae*) y un número limitado de hongos (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) también son capaces de degradarlos (Banerjee *et al.*, 2002). Al igual que las rutas hidrolíticas de cianuro, existen dos tipos de rutas implicadas en la degradación de nitrilos: las nitrilasas (EC 3.5.5.1) catalizan la conversión de los nitrilos en NH_3 y sus correspondientes ácidos, mientras que las nitrilo hidratasa (EC 4.2.1.84) catalizan la formación de amidas a partir de nitrilos, las cuales son posteriormente convertidas en NH_3 y en sus correspondientes ácidos por amidasa (EC 3.5.1.4) (Gráfico 10) (Banerjee *et al.*, 2002). Además de su carácter asimilador, la degradación de nitrilos posee en muchas plantas e insectos una función defensiva. En este último caso la acción de oxigenasas sobre algunos nitrilos genera cianhidrinas (α -hidroxinitrilos), las cuales son posteriormente convertidas en un aldehído y en HCN por oxinitrilasas (hidroxinitrilo liasas) (Banerjee *et al.*, 2002).

GRÁFICO 10 Rutas de degradación de nitrilos



Las nitrilasas, descubiertas hace aproximadamente 40 años, son generalmente enzimas inducibles compuestas por uno o dos tipos de subunidades de diferente tamaño y número. Se ha descrito que estas enzimas poseen cerca del sitio activo varios residuos de cisteína esenciales para su actividad y, a diferencia de las nitrilo hidratatas, no presentan ningún grupo prostético ni cofactor metálico. Las nitrilo hidratatas están constituidas por dos subunidades diferentes, α y β , y poseen como cofactores metálicos Co^{3+} o Fe^{3+} (Precigou *et al.*, 2001). Normalmente los genes que codifican estas enzimas forman parte de un operón que incluye además genes que codifican una amidasa y una proteína reguladora (Kim y Oriol, 2000). Algunas nitrilo hidratatas bacterianas se están utilizando industrialmente como biocatalizadores en la producción de acrilamida, ácido nicotínico, nicotinamida y otros productos de gran interés (Kobayashi y Shimizu, 2000). La elevada homología existente entre las secuencias aminoácidas de cianidasas, cianuro hidratatas y nitrilasas hacen de éstas un grupo de enzimas estrechamente relacionado. Recientemente este tipo de enzimas, junto con algunas amidasas y aciltransferasas, se han incluido en la denominada superfamilia nitrilasa (O'Reilly y Turner, 2003; Pace y Brenner, 2001). A pesar de sus diferentes capacidades catalíticas, la conservación en todas ellas de un residuo de cisteína esencial para su actividad catalítica hace suponer que estas enzimas poseen un mismo mecanismo de reacción (O'Reilly y Turner, 2003).

Tratamientos de eliminación de cianuro

La elevada toxicidad que presentan los residuos industriales cianurados obliga a que éstos sean sometidos a un tratamiento de descontaminación antes de su vertido a la naturaleza. Actualmente existen varios procedimientos para eliminar cianuro, basados tanto en técnicas fisico-químicas como en tratamientos biológicos. Si bien los métodos fisico-químicos han sido los procedimientos más utilizados hasta hoy día, el aislamiento de microorganismos cianogénicos 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 de cianuro o bien en su destrucción y conversión en productos menos tóxicos.

Métodos físico-químicos

Varios son los métodos físico-químicos utilizados en el tratamiento de residuos cianurados (Mudder, 2001; LaGrega, 1996):

- 1) *Estabilización.* En términos generales, la estabilización es un proceso donde se mezclan diversos reactivos con los residuos para minimizar la velocidad de migración de los contaminantes y reducir la toxicidad de éstos. Estos métodos tienen la ventaja de que recuperan el cianuro y puede volver a reutilizarse.
 - a. Adsorción mediante carbón activado.- En este tratamiento el cianuro (adsorbato) soluble es eliminado del agua por contacto con una superficie sólida (adsorbente). En este caso se utiliza carbón adsorbente, el cual es procesado previamente para incrementar significativamente su área superficial interna (carbón activo). Este proceso de descontaminación sólo es aplicable en residuos con cantidades traza de cianuro ($<2,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y requiere un coste elevado debido a la adquisición de carbón nuevo.
 - b. Precipitación de cianuro libre.- Este tratamiento se basa en la adición de un exceso de hierro a las disoluciones cianuradas para formar el complejo insoluble azul de Prusia, $\text{KFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Posteriormente el cianuro precipitado es retirado. Este proceso genera lodos potencialmente tóxicos y muy ácidos.
 - c. Intercambio iónico.- El uso de resinas de intercambio aniónico para la eliminación de cianuros complejados con metales se investigó originalmente en detalle para fines de recuperación de cianuro, habiéndose renovado, en los últimos años, el interés por esta técnica para aplicarla a los efluentes de la minería aurífera canadiense.
- 2) *Oxidación química.* En general, el objetivo de este tipo de métodos es la destoxificación de los residuos por transformación química del cianuro mediante la adición de un agente oxidante. A diferencia de los métodos de estabilización, la oxidación química destruye el cianuro e imposibilita su reutilización. En el Cuadro 5 se detallan los diferentes métodos de oxidación química.

Los principales inconvenientes que presentan estos tratamientos químicos son el requerimiento de agentes oxidantes tóxicos, el elevado coste de infraestructuras y reactivos, y la generación de productos perjudiciales para

el medio ambiente y la salud (cianato, metales, cloruro de cianógeno, etc). El cianato puede ser el producto final del tratamiento o seguir oxidándose posteriormente hasta nitrógeno molecular y CO_2 .

CUADRO 5 Tratamientos químicos de eliminación de cianuro

Método	Reacción	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	$\text{NaCN} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{NaCNO} + \text{HO}_2$	Utilización de Cu como catalizador
Dióxido de azufre	$\text{NaCN} + \text{SO}_2 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaCNO} + \text{H}_2\text{SO}_4$	

En negrita se señalan los agentes oxidantes utilizados en cada tratamiento.
Fuente: Elaboración propia.

Métodos biológicos

A pesar de que la eliminación biológica de cianuro supone una atractiva alternativa a los diferentes tratamientos físico-químicos, esta biotecnología sólo se ha aplicado en muy pocos casos (Dubey y Holmes, 1995). Esto se debe principalmente a que los residuos industriales no sólo contienen cianuro, sino que son 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 a escala de laboratorio, utilizando técnicas de cultivo continuo en biorreactores, con aguas residuales cianuradas de las industrias de gasificación del carbón, alimentaria (de la yuca), siderúrgica y minera (Oliveira *et al.*, 2001; Kang y Park, 1997; Dictor *et al.*, 1997; Suh *et al.*, 1994). Los microorganismos utilizados en estos tratamientos suelen ser cultivos puros, aunque también existen estudios llevados a cabo con poblaciones mixtas que actúan de forma comensal (Kang y Park, 1997).

Uno de los sectores industriales donde más se están poniendo en práctica este tipo de tratamientos es la industria minera (Akcil, 2003). 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 que tiene lugar en esta planta de biodegradación, 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 (Akciç, 2003; Dubey y Holmes, 1995; Whitlock y Mudder, 1998). La degradación biológica de cianuro resultó ser más barata, tanto en costes de capital (60%) como en costes operativos (29%), que el tratamiento químico con H_2O_2 utilizado previamente en dicha mina. 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 xylooxidans* subs. *denitrificans* capaces de degradar cianuro (Raybuck, 1992; Ingvorsen et al., 1991).

Principalmente, las ventajas de los tratamientos biológicos radican en su bajo coste, escasa infraestructura, alta eficiencia, no utilización ni generación de compuestos tóxicos y posibilidad de tratamiento *in situ*. 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 (Kowalska et al., 1998).

El cianato

Su origen, química y toxicidad hacen del cianato un compuesto estrechamente relacionado con el cianuro, por lo que en algunos casos este compuesto es considerado como una forma cianurada más. Además, al igual que el cianuro, algunas evidencias apuntan a que el cianato también pudo intervenir en la síntesis prebiótica de moléculas orgánicas (Orgel, 2004). Los efectos adversos de este compuesto sobre los seres vivos son bien conocidos, si bien su toxicidad es menor que la del cianuro. Sin embargo, hay que tener en cuenta que un derivado de este compuesto, el metil-isocianato, protagonizó en 1984, en Bhopal (India), lo que muchos han considerado el mayor desastre químico mundial, provocando 20.000 muertes y dejando 120.000 enfermos crónicos. A pesar de su toxicidad, el cianato podría desempeñar un papel de considerable importancia en el metabolismo del nitrógeno en bacterias, ya que en algunas cianobacterias se ha descrito que este compuesto actúa como regulador de los principales genes involucrados en la asimilación de carbono y nitrógeno (Suzuki et al., 1996).

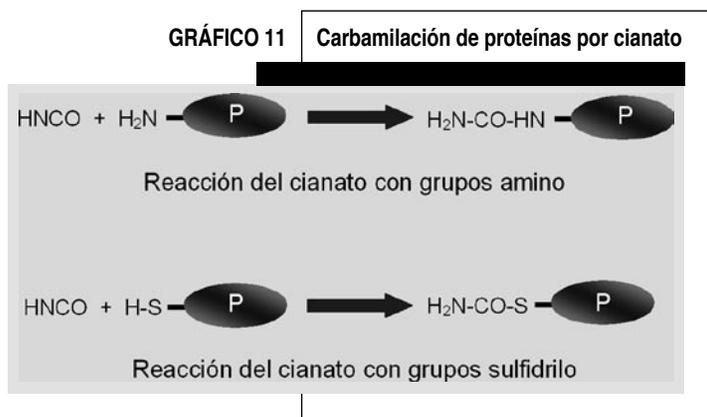
Origen

El cianato se produce tanto de forma natural como por la acción del hombre (Luque-Almagro et al., 2003). En el medio ambiente se origina como consecuencia de la fotooxidación del cianuro, mientras que en los

seres vivos proviene de la descomposición no enzimática del carbamilfosfato y la urea. Con respecto a su origen antropogénico, el cianato es un subproducto generado en los tratamientos químicos de eliminación de cianuro (LaGrega, 1996). Además, este compuesto es ampliamente utilizado como herbicida, como toxina urémica y como precursor en la síntesis de polímeros (Kraus y Kraus, 1998; Koshiishi *et al.*, 1997).

Toxicidad

La toxicidad de la forma reactiva del cianato, el ácido isocianico (HCNO), radica en su capacidad de reaccionar con los grupos nucleofílicos de las proteínas y de formar complejos con metales de transición (Guilloton y Karst, 1987). Concretamente, el cianato reacciona con los grupos amino y tiol de las proteínas, de forma irreversible y reversible respectivamente, a través de reacciones de carbamilación (Gráfico 11) (Qian *et al.*, 1997). La carbamilación mediada por cianato, descrita en enzimas, hormonas, proteínas estructurales y proteínas transportadoras, ocasiona alteraciones tanto estructurales como funcionales (Kraus y Kraus, 1998). Se ha demostrado que la carbamilación de grupos esenciales en la catálisis inactiva enzimas como la papaína, la glutamato deshidrogenasa bovina, la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa de tabaco y la carbamilfosfato sintasa de *E. coli* (Guilloton y Karst, 1987).

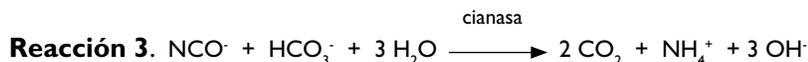


Debido al carácter pseudohaluro del cianato, algunas enzimas son inactivadas por este compuesto como consecuencia de la quelación de metales del sitio activo. Este mecanismo de inhibición se ha descrito en las enzimas anhidrasa carbónica, superóxido dismutasa y carboxipeptidasa

A (Guilloton y Karst, 1987). En el caso de la nitrato reductasa, enzima que participa en la reducción del nitrato, el cianato inhibe su actividad de forma competitiva con respecto al nitrato, aunque al mismo tiempo el carácter oxidante de este compuesto activa la forma reducida de la misma (Guerrero et al., 1981 y 1973). En humanos, estados de uremia provocados por una disfunción renal suelen generar elevadas concentraciones de cianato en el cuerpo, produciendo graves problemas de salud. Por ejemplo, se ha demostrado que la carbamilación mediada por cianato de proteínas del ojo y del riñón causa cataratas y daño renal (Martin y Harding, 1989; Kraus et al., 2001). La carbamilación también provoca alteraciones en la estructura de la membrana de los eritrocitos, modifica la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y favorece infecciones generalizadas y del tracto urinario en pacientes urémicos como consecuencia de la inhibición de la actividad mieloperoxidasa de los neutrófilos (Pieniazek y Gwozdzinski, 2003; Kraus et al., 2001; Qian et al., 1997).

Biodegradación

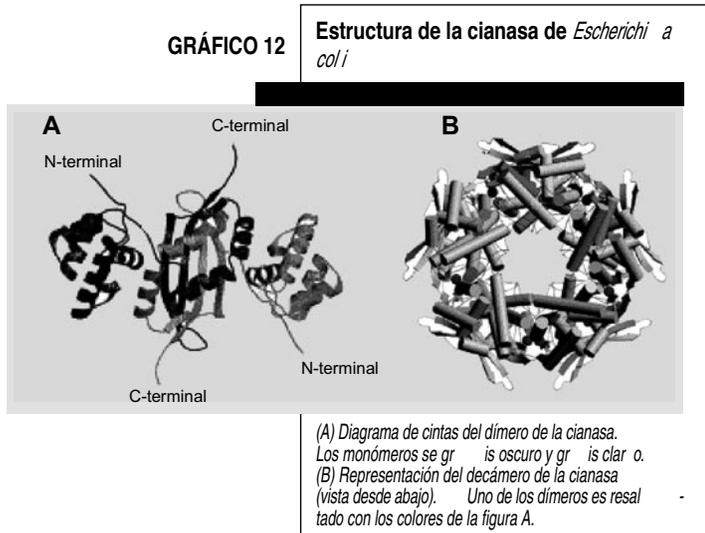
A pesar de su toxicidad, muchas bacterias son capaces de tolerar e incluso utilizar cianato como fuente de nitrógeno. La enzima cianasa (EC 4.3.99.1), que cataliza la bicarbonatolisis de cianato a amonio y CO_2 (Reacción 3), posibilita la utilización de este compuesto como fuente de nitrógeno.



Aunque no se indica en el esquema, el producto de la reacción es en realidad carbamato, que se descompone espontáneamente para producir CO_2 y amonio. Además, el ajuste de la reacción depende del pH y de si tenemos en cuenta o no el equilibrio $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$. La reacción que se presenta está ajustada a pH 8,5.

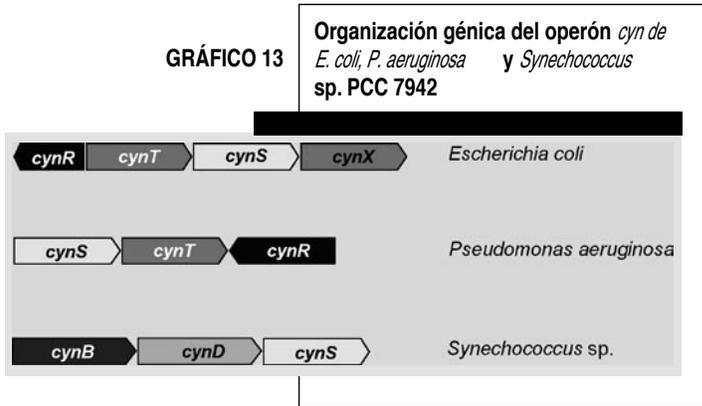
Esta enzima se ha estudiado ampliamente en *E. coli*, aunque también se ha descrito en *Pseudomonas* spp, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov., *Flavobacterium* sp, en las cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Synechococcus* sp. PCC 7942, y en algunas plantas (Guilloton y Hargreaves, 1972; Anderson, 1980; Kunz y Nagappan, 1989; Harano et al., 1997; Wood et al., 1998). Además de la utilización de cianato como fuente de nitrógeno, la cianasa está implicada en la destoxificación de cianato y en la regulación de actividades enzimáticas a través de la modulación de la concentración intracelular de cianato. La determinación de la estructura cristalina de la cianasa de *E. coli* ha revelado que esta enzima es un homodécámero con una simetría 5/2, es decir, los monómeros se ensamblan en dímeros

y estos últimos constituyen el complejo final (Gráfico 12) (Anderson, 1980; Walsh *et al.*, 2000).



El gen que codifica la cianasa, denominado *cynS*, ha sido clonado y secuenciado en varios microorganismos (Harano *et al.*, 1997; Sung *et al.*, 1987a; Sung *et al.*, 1987b). En todos los casos este gen se encuentra formando parte del operón *cyn*, junto con otros genes involucrados en el metabolismo del cianato. Su organización génica en *E. coli* y *P. aeruginosa* es similar, ya que ambos operones poseen en común, además del gen *cynS*, un gen que codifica una anhidrasa carbónica, denominado *cynT* (Gráfico 13) (Sung y Fuchs, 1988). La función de esta enzima es impedir la ausencia de bicarbonato durante la degradación de cianato (Guillotón *et al.*, 1993). Además, tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa* el gen regulador se encuentra en la misma región pero formando parte de otra unidad que se transcribe en dirección opuesta a los genes estructurales. El operón de *E. coli* contiene además un gen que codifica una proteína altamente hidrofóbica que es un transportador de cianato de la familia MFS. Una proteína un 58% similar a la anterior se ha descrito en el genoma de *P. aeruginosa*, pero el transportador de cianato no se encuentra en el mismo operón en esta bacteria. En cianobacterias, el operón *cyn* difiere de los descritos anteriormente. En la estirpe PCC 7942 de *Synechococcus sp.*, junto con el gen *cynS* se encuentran otros dos genes, *cynB* y *cynD*, los cuales codifican el componente integral de membrana y la subunidad de unión a ATP de un transportador tipo ABC estrechamente relacionado

con un transportador de nitrato-nitrito (Gráfico 13) (Harano *et al.*, 1997). En *Synechocystis* sp. PCC 6803, el gen *cynS* se encuentra formando un operón junto con los genes de biosíntesis del cofactor de molibdeno, del cual se desconoce su relación con el metabolismo del cianato (Kaneko *et al.*, 1995).



Estudios llevados a cabo en *E. coli* sobre la regulación del operón *cyn* han demostrado que la proteína CynR es un regulador transcripcional que se une específicamente a su propio promotor y al promotor del operón *cynTSX*. Lamblin y Fuchs (1994), sugieren que el cianato induce un cambio conformacional en la proteína CynR, modificando su interacción con el DNA y facilitando la unión de la RNA-polimerasa al promotor. Por otro lado, CynR reprime su propia transcripción.

I.4 | Objetivos

El uso extendido del cianuro en la sociedad actual suele ocasionar graves problemas de contaminación ambiental, lo que hace necesario el desarrollo de procesos de destoxificación. Actualmente existen diferentes tratamientos físico-químicos de eliminación de cianuro, sin embargo no están exentos de importantes limitaciones. La biorremediación supone una atractiva alternativa a este tipo de métodos, aunque el carácter neutrófilo de la mayoría de microorganismos cianotróficos descritos hasta el momento impide el desarrollo de tratamientos biológicos eficientes como consecuencia de la formación de HCN a pH neutro.

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral fue el desarrollo de un proceso de biodegradación de cianuro en condiciones alcalinas. Los objetivos concretos de este trabajo fueron:

1. Aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de degradar cianuro, y otros compuestos relacionados, en condiciones alcalinas.
2. Determinación de las condiciones óptimas para la degradación de cianuro por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en condiciones alcalinas.
3. Elucidación de la ruta catabólica que emplea *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en la degradación de cianuro.
4. Aplicación biotecnológica de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 en:
 - a. Destoxificación de un residuo cianurado procedente de la industria joyera.
 - b. Desarrollo de un biosensor mediante la utilización de enzimas involucradas en el metabolismo del cianuro.



Materiales y Métodos

Capítulo II

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Material biológico

Enriquecimiento selectivo y aislamiento de una cepa degradadora de cianuro

Como medio selectivo se empleó el medio mínimo M9 (Maniatis *et al.*, 1982) a pH 9,5 con acetato 50 mM y NaCN 2 mM como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. El medio se inoculó con lodos recogidos en la margen izquierda del río Guadalquivir a su paso por Córdoba y se incubó en un Erlenmeyer a 30 °C y 140 rpm en un agitador orbital. Después de 2 semanas el cianuro desapareció completamente, a la vez que aumentó la turbidez del cultivo. El proceso fue repetido 4 veces reinoculando en medio fresco con 1% (v/v) del cultivo previamente crecido. Para la obtención de colonias aisladas se hicieron diluciones del cultivo enriquecido y se esparcieron por la superficie de placas de cultivo con LB-agar. Las colonias individuales con diferentes morfologías se inocularon de nuevo en medio líquido para comprobar su capacidad de degradar cianuro en cultivos axénicos. Sólo un tipo de colonia fue capaz de asimilar cianuro, por lo que se obtuvo un cultivo puro.

Análisis de la secuencia del gen rRNA 16S de una cepa degradadora de cianuro

El gen que codifica la subunidad ribosómica pequeña (rRNA 16S) de la cepa fue amplificado por PCR, utilizando como molde el DNA genómico total y los reactivos del kit Wizard® (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se utilizaron los cebadores universales de eubacterias EUB-8F y EUB-1492R, los cuales corresponden a las posiciones 8 y 1492 del rRNA 16S de *E. coli*. Los productos de PCR obtenidos se limpiaron usando el kit QIAGEN y se secuenciaron por el método Big Dye (Applied Biosystems) en ambos sentidos. Las secuencias directa e inversa así obtenidas se alinearon y manualmente se comprobó una secuencia consenso de alta calidad.

Estirpes bacterianas y plásmidos

En los Cuadros 6 y 7 se resumen las estirpes bacterianas que se han utilizado en este trabajo, así como los plásmidos empleados y sus características más importantes.

CUADRO 6 Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo

Estirpe	Características	Referencia
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>		
CECT5344	Silvestre. Utiliza cianuro como fuente de nitrógeno	Este trabajo
CECT5344N	Mutante espontáneo resistente a Nx	Este trabajo
CECT5344N <i>cynS</i>	Mutante Gm ^r obtenido por inserción del gen de resistencia a gentamicina en el gen <i>cynS</i>	Este trabajo
CECT5344N RC5	Mutante por interposición de Tn5 de la cepa CECT 5344N. Km ^r	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Lac; huésped para diversos plásmidos con gen <i>lacZ</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
S17-1	Tra ⁺ ; huésped para plásmidos movilizables <i>mob</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
Fuente: Elaboración propia.		

CUADRO 7 Plásmidos empleados

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T	Vector (Ap ^r) para la clonación de fragmentos de DNA generados mediante PCR	Promega
pBluescrip SK(+)	Vector de clonación (Ap ^r)	Stratagene
pK18mob δ E	Vector suicida en <i>Pseudomonas</i> derivado de pK18 y 19. (Km ^r)	Schafer <i>et al.</i> , 1994
pMS255	Vector de selección positiva que contiene un casete de resistencia a Gm.	Becker <i>et al.</i> , 1995
pVIC1	Plásmido (Km ^r) derivado del pK18mob δ E que contiene un fragmento de 1,3 kb en el que se incluye el gen <i>cynS</i> .	Este trabajo
pVIC2	Plásmido (Km ^r , Gm ^r) derivado del pVIC1 que contiene inserto un casete de resistencia a Gm en el sitio <i>EcoRI</i> del gen <i>cynS</i> .	Este trabajo
pMH1	Derivado pBluescrip con fragmento <i>Sall</i> de 1.550 pb que contiene la cianasa.	Este trabajo
Fuente: Elaboración propia.		

II.2 Medios y condiciones de cultivo

Medios de cultivo

Medios líquidos

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

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

Como medio habitual de crecimiento para *Pseudomonas* se utilizó el medio M9, descrito por Maniatis et al. (1982), que contenía por litro:

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

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

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

Cuando el medio de cultivo se iba a emplear para estirpes bacterianas resistentes a algún antibiótico, éstos se añadieron una vez enfriados los medios estériles, a las concentraciones y en los disolventes que se especifican en el Cuadro 8.

CUADRO 8 Antibióticos empleados

Antibiótico	Concentración en la solución de almacenamiento (mg·ml ⁻¹)	Concentración en el medio (µg·ml ⁻¹)	Disolvente
Ap Ampicilina	100	100	H ₂ O
Km kanamicina	25	25	H ₂ O
Gm Gentamicina	20	20	H ₂ O
Nx Ác Nalidixico	10	10	NaOH 0,1 M

Fuente: Elaboración propia.

Medios sólidos

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

Cuando la selección de las colonias se realizó utilizando la expresión del gen de la β-galactosidasa, en la estirpe DH5α de *E. coli*, se empleó medio sólido LB suplementado con IPTG (55 mg·l⁻¹) y X-gal (40 mg·l⁻¹), añadidos al medio estéril antes de que solidificara.

Condiciones de cultivo

Las diferentes estirpes de *P. pseudoalcaligenes* se cultivaron aeróbicamente a 30 °C y con una agitación constante de 230 rpm, proporcionada por un incubador orbital refrigerado New Brunswick Scientific C24 (Edison, NJ – USA). Se emplearon tubos de 15 ml o matraces Erlenmeyer de 100 ml a 1 L de capacidad, llenos hasta un 10% de su capacidad con el medio de cultivo correspondiente. Los tubos se cerraron con tapones metálicos y los matraces con algodón hidrófobo estéril.

Para el cultivo de *E. coli* se utilizaron tubos de 15 ml con 3 ml de medio LB, cerrados con tapones metálicos, que se mantuvieron a 37 °C en condiciones de aerobiosis. La agitación fue de 250 rpm y se llevó a cabo en un incubador orbital refrigerado HT (INFORS AG. Bottmingen).

II.3 Pureza y mantenimiento de los cultivos

La pureza de los cultivos se siguió rutinariamente extendiendo sobre medio sólido en una placa de Petri una pequeña cantidad del cultivo extraída en condiciones de esterilidad con un asa de platino.

Las estirpes de *E. coli* y de *P. pseudoalcaligenes* se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medios líquidos LB o M9, respectivamente, con glicerol al 20% (v/v).

II.4 Obtención de extractos acelulares

Recolección de células

Las células de *Pseudomonas* se recogieron por centrifugación a 20.000 g durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una centrífuga refrigerada Beckman Avanti™J-25. Después de retirar el sobrenadante, las células se lavaron dos veces en diferentes tampones, según el ensayo a realizar, y finalmente se resuspendieron en el mismo tampón.

Las células de *E. coli* se recogieron centrifugándolas a 5.000 g en una centrífuga Biofuge 13 (Heraeus), y se resuspendieron en un volumen adecuado del tampón requerido según el experimento.

Preparación de extractos acelulares

Los extractos acelulares de *E. coli* se obtuvieron rompiendo las células por cavitación (sonicador Vibracell/Sonics & Materials Inc. Danbury). Las células de *P. pseudoalcaligenes* se rompieron tanto por ultrasonidos como por diferencia de presión (prensa de French SLM/Aminco, modelo FA-079). La rotura se llevó a cabo con la prensa en dos pasadas a 16.000 psi, y con el sonicador aplicando 90 W durante dos pulsos de 5 s. En ambos casos las células se mantuvieron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en todo momento. Los extractos obtenidos se centrifugaron durante 20 min a 15.000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para eliminar las células enteras y los restos celulares. El sobrenadante obtenido constituyó el extracto libre de células utilizado en los ensayos enzimáticos.

II.5 Purificación de la cianasa

Purificación parcial a partir de *P. pseudoalcaligenes*

Para llevar a cabo esta purificación, la estirpe CECT5344 se cultivó en medio mínimo con cianato 10 mM como única fuente de nitrógeno. Cuando las células alcanzaron la fase exponencial de crecimiento, se recogió el cultivo y se preparó el extracto acelular siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo a 4 °C.

Tratamiento térmico

El extracto acelular se calentó a 70 °C durante 15 min. Después de enfriarlo a 4 °C, el extracto se centrifugó a 20.000 g durante 15 min a 4 °C.

Cromatografía de intercambio iónico

La solución anterior fue sometida a cromatografía de intercambio aniónico en una columna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) instalada en un sistema de cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC, Pharmacia, Uppsala, Suecia). Antes de cargar la muestra, la columna se equilibró con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8). Una vez cargada la muestra, la columna se lavó con el mismo tampón para eliminar las proteínas no unidas y las proteínas retenidas en la columna fueron lavadas por la acción de un gradiente de NaCl y según el siguiente programa: una vez pasados los 5 ml del tampón de equilibrado, se aplicó un gradiente de 0 a 0,3 M de NaCl en 1 min, se mantuvo a 0,3 M durante 3 min, se aplicó un gradiente de separación de 0,3 a 0,6 M durante 10 min, se aumentó la concentración de NaCl de 0,6 a 1 M en 1 min y, finalmente, se mantuvo esta concentración de NaCl durante 3 min. La cromatografía se desarrolló a un flujo de 1 ml·min⁻¹ y se recogieron fracciones de 1 ml. Debido a la limitada capacidad de la columna disponible, la cromatografía se realizó en varias veces, de forma que se cargaba una parte alícuota de la solución anterior tratada térmicamente. En todas las fracciones se determinó la concentración de proteína mediante la absorbancia a 280 nm y la actividad cianasa según se describe posteriormente. Todas las fracciones con actividad cianasa se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración en centricones con un corte de poro de 100 kDa (Centricon-100; Amicon).

Purificación de la cianasa recombinante de *P. pseudoalcaligenes* expresada en *E. coli*

Para llevar a cabo esta purificación se empleó *E. coli* DH5 α transformada con el plásmido pVIC2, que contiene el gen *cynS* de *P. pseudoalcaligenes* expresado constitutivamente. Las células se cultivaron en medio LB y cuando alcanzaron la fase exponencial de crecimiento, se recogieron por centrifugación y se preparó el extracto acelular siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo a 4 °C.

Tratamiento térmico

Al igual que en el caso anterior, el extracto acelular se calentó a 70 °C durante 15 min. Después de enfriar a 4 °C, el extracto se centrifugó a 20.000 g durante 15 min a 4 °C.

Fraccionamiento con sulfato amónico

El sobrenadante anterior se llevó al 40% de saturación en sulfato amónico, añadiendo éste poco a poco. Después de una agitación suave durante 30 min y en frío, la suspensión se centrifugó a 20.000 g durante 20 min. El sobrenadante resultante se recuperó y se llevó al 55% de saturación en sulfato amónico, se agitó y se centrifugó como antes. La pella obtenida se resuspendió en tampón Tris 50 mM (pH 8,5), se dializó en una columna de exclusión molecular PD-10 (Pharmacia Biotech) para eliminar el amonio y finalmente se concentró utilizando centricones Biomax de 5k (Millipore; Ultrafree®-0.5).

II.6 [Caracterización de la cianasa de *P. pseudoalcaligenes*

Determinación de la temperatura óptima y estabilidad térmica de la enzima

La temperatura óptima se determinó realizando el ensayo de la actividad cianasa a distintas temperaturas (20-80 °C). Para ello, la temperatura de todos los reactivos se equilibró previamente a la temperatura del ensayo. En cada ensayo se realizaron controles de degradación no enzimática de cianato, que se sustrajeron a los valores obtenidos en los ensayos con enzima.

Para estudiar la estabilidad térmica de la enzima, se sometieron a temperaturas entre 30 y 70 °C durante 10, 20 y 30 min diversas partes alícuotas de un extracto acelular inicial. Tras enfriarlas en hielo, las muestras se centrifugaron en una centrífuga Biofuge 13 (Heraeus) a máxima velocidad durante 10 min. El sobrenadante se recogió y la actividad se determinó en condiciones estándar de ensayo (30 °C).

pH óptimo

Con objeto de cubrir el intervalo de pH a estudiar (7,5-9,5), la determinación del pH óptimo se llevó a cabo usando mezclas de los tampones MES, BIS-TRIS PROPANO y CAPS, a una concentración de 50 mM cada uno de ellos.

Determinación de la K_M

Para determinar los valores de K_M aparente para el cianato y el bicarbonato se variaron las concentraciones de sustrato en el ensayo, manteniendo fija una concentración saturante del otro sustrato. Para el cálculo de los valores de K_M se emplearon las representaciones de los inversos de las velocidades iniciales de reacción frente a los inversos de las concentraciones de los sustratos utilizadas (Lineweaver-Burk).

Efecto de posibles inhibidores

El efecto de algunos inhibidores sobre la actividad cianasa se estudió, según el caso, incubando el extracto con cada inhibidor previamente al ensayo, o bien añadiendo el inhibidor en la mezcla de reacción.

II.7 | Microscopía electrónica de transmisión

Tanto el procesamiento como la observación de las muestras se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

II.8 Técnicas de manipulación del DNA

Aislamiento de DNA

Aislamiento del DNA total de P. pseudoalcaligenes

Una parte alícuota de 1,5 ml de un cultivo de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 crecido durante toda la noche se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 min. La pella celular se resuspendió en 567 μ l de tampón TE, agregando 30 μ l de SDS (10%) y 3 μ l de proteinasa K (20 mg·ml⁻¹). El tubo se mezcló por inversión y se incubó a 37 °C durante 1 h para producir la lisis celular.

Posteriormente se añadió 100 μ l de NaCl 5 M, mezclando fuertemente por unos segundos. Después de añadir 80 μ l de CTAB (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 fue recuperada, se le agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y centrifugó durante 5 min a 11.000 rpm. Después de recuperar la fase superior se le adicionaron 2 μ l de RNasa (10 mg·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 temperatura ambiente durante 5 min, se centrifugó 5 min a 11.000 rpm, desechando el sobrenadante y lavando la pella dos veces con etanol al 70%. Por último, la mezcla se centrifugó durante 5 min a 11.000 rpm; se secó el precipitado de DNA y se resuspendió en 10-30 μ l de buffer TE o agua bidestilada 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.

Extracción del DNA plasmídico mediante columnas de intercambio iónico

Para obtener el DNA con la calidad y la concentración necesarias para su secuenciación ($\approx 1,5 \mu$ g· μ 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 y otros contaminantes celulares.

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 que se diluyó en agua y se midió su absorbancia a 260 y a 280 nm, frente a un blanco de H_2O . Para el cálculo de la concentración de DNA se consideró un valor estándar de $A_{260}=1$ para soluciones con $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de DNA de cadena doble. 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 a 1,8.

En los 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 a varias concentraciones conocidas. Dado que el nivel de fluorescencia de los ácidos nucleicos en presencia de bromuro de etidio es directamente proporcional a la cantidad de DNA presente, la concentración de las muestras se pudo estimar por comparación de sus fluorescencias relativas respecto de las que presentaban las muestras control.

Digestión del DNA con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión del DNA con las endonucleasas de restricción contenían 0,5 μg de DNA, 0,1 volúmenes 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).

Electroforesis de DNA

La electroforesis de DNA se llevó a cabo utilizando geles de agarosa (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 muestras de DNA se añadió 1 μl de tampón de carga. 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 luz 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.

La composición de los tampones y soluciones utilizados en este proceso fue la siguiente:

- *Tampón de carga*: Glicerol (30% v/v), azul de bromofenol (0,3% p/v) y azul de xilencianol (0,3% p/v).
- *Tampón TAE*: Tris-Base ($4,84 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), ácido acético glacial ($1,14 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$), EDTA- Na_2 0,5 M (pH 8) ($2 \text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$).

Recuperación de fragmentos de DNA de los geles de agarosa

Para la recuperación de fragmentos de DNA de geles de agarosa se utilizaron los sistemas comerciales de Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit) y Qiagen (QIAquick Gel Extraction), siguiendo en cada caso las instrucciones del fabricante.

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 de los DNA 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*.

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 receptora del plásmido de interés. Los transconjugantes de la cepa CECT5344 se seleccionaron en medio mínimo que contenía los nutrientes y los antibióticos adecuados para la selección del receptor del plásmido transferido. Simultáneamente, para calcular el número de células receptoras de *Pseudomonas* presentes en dicha mezcla, se sembraron diluciones seriadas de la mezcla de conjugación en el medio anterior sin antibiótico. La frecuencia de transconjugantes se expresó como el número de transconjugantes en relación al número de receptores.

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.

Preparación de células competentes

Las células se cultivaron en LB durante 12 h ($A_{600} \leq 1,5$). El cultivo se diluyó 50 veces con el mismo medio y se incubó otras 2 horas hasta obtener una A_{600} de 0,5 aproximadamente (equivalente a 5×10^7 células·ml⁻¹). Se centrifugó a 5,000 g durante 5 min y la pella 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. Las células competentes obtenidas se resuspendieron en una décima parte del volumen inicial con la solución fría de CaCl₂ 50 mM.

Transformación de las células competentes

La mezcla de transformación contenía: 10 μ l de la preparación de DNA plasmídico, 200 μ l de la suspensión de células competentes y 100 μ l de un tampón 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 μ l de medio LB, se incubó 45 min a 37 °C y se extendió en placas selectivas con los antibióticos correspondientes.

Secuenciación del DNA

La secuenciación de DNA plasmídico y de los 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 de la 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.

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

Las reacciones de amplificación del DNA de doble cadena 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 a amplificar y la polimerasa, los cebadores correspondientes, una mezcla de desoxinucleótidos y el tampón especificado por la casa comercial.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de amplificación de DNA se muestran en el Cuadro 9.

CUADRO 9		Cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos de DNA
Nombre	Secuencia (5'-3')	
Cyn1F	GATTCCAAGTACCCG W YGATGTATCGCTTC	
Cyn2R	CGCTC R MATGATGCCATCGCCAAATTTYTC	
Cyn3	AAAAGGTACCGTAACCACCTCGTGGACTTTCTG	
Cyn4	AAAAAAGCTTGTGAGGTAGGCAGTGACCG	
Fur1F	AAAGCCGGCCTGA R GTGAC S CTGCCGCG	
Fur2R	GCCGCC W TCRAARTTGTGSGCSAYSACCAGG	
Km-A	ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCA	
Km-B	TTGGTCGGTCATTTCAACCCAGAGT	
Tn5-R	GTTAGGAGGTCACATGGAAGTCAGATCCT	
Tn5-F	CGTTACCATGTTAGGAGGTCACATGGAAGT	

Fuente: Elaboración propia.
W: A ó T; **Y**: C ó T; **R**: A ó G; **M**: A ó C; **S**: C ó G

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 como se describe en el apartado 8.5 de esta sección.

Transferencia de DNA a membrana por el método de “Southern blot” e hibridación

Los fragmentos de DNA, tanto cromosómico como plasmídico, obtenidos por digestión con enzimas de restricción, se separaron electroforéticamente en geles de agarosa y se transfirieron por capilaridad a membranas de nylon de 0,45 µm de diámetro de poro cargadas positivamente (Roche) siguiendo el protocolo de transferencia descrito por Sambrook *et al.* (1989). Finalizada la transferencia, la membrana se lavó en 2xSSC durante 10 min, para eliminar posibles restos de agarosa. La fijación del DNA a la membrana seca se realizó mediante exposición a luz UV (254 nm) durante 3 min o a 80 °C durante 2 h. La hibridación y posterior detección se realizaron con el kit de marcaje y detección con digoxigenina, siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche). Las membranas se hibridaron y se lavaron en condiciones estrictas. El marcaje de la sonda de DNA se hizo con digoxigenina-dUTP mediante extensión con el fragmento Klenow de la DNA-polimerasa de *E. coli*, y utilizando como cebadores una mezcla aleatoria de hexanucleótidos.

Hibridación en colonias

En algunos casos, la existencia de insertos de DNA se comprobó directamente mediante hibridación en colonia. Las colonias de interés se sembraron en medio LB sólido y se cultivaron toda la noche a 30 °C. Una vez crecidas las diferentes colonias, se transfirieron a membranas de nylon. Para ello las membranas se depositaron suavemente sobre las placas, marcando en este momento tanto las placas como las membranas, tratándose éstas últimas como se indica a continuación y siempre con las colonias hacia arriba.

Se colocaron cuatro bandejas con papel Whatman de 3MM, donde los papeles se empaparon con las soluciones y durante el tiempo:

1ª bandeja: 10 min en NaOH 0,5 N + NaCl

2ª bandeja: 5 min en Tris-HCl (pH 8), 1 M

3ª bandeja: 5 min en Tris-HCl (pH 8), 0,5 M + NaCl 1,5 M

4ª bandeja: 7 min en SSC (2x)

Entre una bandeja y otra los papeles de filtro se escurrieron, dejando secar finalmente sobre el papel Whatman. Una vez secos el DNA se fijó a las membranas exponiéndolas a UV (254 nm) durante 3 ó 5 min por cada lado. Las membranas se prehibridaron e hibridaron tal y como se describe en el *apartado 8.11* de esta sección. La localización de los clones positivos en la hibridación se realizó comparando las membranas con las placas originales.

Mutagénesis

Mutagénesis por inserción al azar del transposón Tn5

La mutagénesis por inserción al azar del transposón Tn5 en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se realizó según el método de Simon *et al.* (1983), basado en la transferencia por conjugación de plásmidos movilizables (con los genes *mob*) portadores del transposón Tn5 desde estirpes donadoras de *E. coli* hasta estirpes receptoras de bacterias Gram negativas. Las estirpes donadoras poseen integrado en el cromosoma los genes *tra* del plásmido RP4 requeridos para la transferencia de ácidos nucleicos. Los vectores portadores de Tn5 no pueden mantenerse como tales en las bacterias del género *Pseudomonas* y, por lo tanto, la selección en medios con Km, cuya resistencia está codificada por Tn5, indica la integración al azar del transposón en el genoma de dichas bacterias.

*Interrupción del gen *cynS* de *P. pseudoalcaligenes* mediante mutagénesis dirigida por doble recombinación homóloga*

Para la obtención de un mutante de la estirpe CECT5344 deficiente en el gen *cynS*, que codifica la cianasa, se obtuvo previamente un mutante espontáneo al antibiótico ácido nalidíxico, mutación que servirá posteriormente como marcador de selección. Para la clonación del gen se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes adyacentes a *cynS*. Estos oligonucleótidos, que contenían cada uno dianas para las enzimas de restricción *KpnI* y *HindIII*, se usaron en una reacción de PCR

utilizando como molde DNA total y se obtuvo un fragmento de 1.288 pb que contenía al gen *cynS*. Dicho fragmento se clonó como un fragmento *KpnI* y *HindIII* en el vector pK18mob δ E, que presenta un marcador de resistencia a kanamicina, obteniéndose el vector pVIC1. Para construir el plásmido pVIC2 se insertó el casete que confiere resistencia a gentamicina procedente del plásmido pMS255 en el sitio *EcoRI* que tiene la zona central del gen *cynS*. El plásmido pVIC2 se transfirió mediante conjugación a la estirpe silvestre, obteniéndose mediante recombinación homóloga el mutante *cynS*⁻. Para la selección del mutante se sembraron los transconjugantes en medio rico LB con gentamicina, comprobándose posteriormente la sensibilidad a kanamicina, ya que los clones sensibles a este antibiótico y resistentes a gentamicina son los portadores del gen de la cianasa interrumpido. Para comprobar la inserción del casete se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados y el aumento en el tamaño del fragmento obtenido confirmó la adquisición del casete.

Tratamiento y análisis de secuencias

Para el tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, incluyendo la determinación de las fases abiertas de lectura, los sitios de restricción, uso de codones, perfiles de hidropatía, composición de aminoácidos, etc., se emplearon los programas informáticos DNA Strider v.1.1 (Marck, 1988), SeqEd v. 1.03 (Applied Biosystems, Inc., 1992), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk>) y Genetics Computer Group de la Universidad de Wisconsin (Devereux et al., 1984). La comparación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos con las distintas bases de datos, se realizó con la ayuda de los programas BLAST (Altschul et al., 1990), disponible en el servidor de Internet del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), y FASTA3 (Pearson y Lipman, 1988), disponible en el servidor de Internet del EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/fasta3/>) y TIGR (<http://tigr.org/adb/mdb/mdb.html>), disponible en el servidor de Internet del Institute for Genome Research. El alineamiento de secuencias peptídicas se realizó con el programa ClustalW (Thompson et al., 1994) del paquete informático Lasergene (DNASTAR). Con todos estos programas se usaron las opciones estándar.

II.9 Métodos analíticos

Medida del crecimiento celular

El crecimiento de los cultivos bacterianos se siguió mediante tres métodos:

- a) De forma habitual por turbidimetría, midiendo la absorbancia del cultivo a 600 nm.
- b) Por el aumento de peso seco. Para ello se tomaron 20 ml de cultivo y se filtraron a través de un filtro (0,2 μm de tamaño de poro) previamente pesado. Este se introdujo en una estufa a 80 °C y se volvió a pesar a las 24 h, obteniendo por diferencia el peso seco.
- c) Recuento de células viables. La estimación de células viables en los cultivos, expresada como unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo ($\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$), se realizó mediante diluciones seriadas de los cultivos en tampón M9 (1x) (pH 9,5). De cada dilución se sembraron alícuotas de 0,1 ml en medio sólido (LB).

Determinación de amonio

Método colorimétrico (Nessler)

Para medidas rutinarias se utilizó el método basado en el reactivo de Nessler (Morrison, 1971). A 0,5 ml de muestra se añadió 0,5 ml de reactivo de Nessler (preparado mezclando volúmenes iguales de la solución A: K_2HgI_4 y B: NaOH 1 N) diluido 1:3. Se esperó 5 min y la absorbancia a 420 nm se interpoló en una recta patrón.

Método enzimático (Glutamato deshidrogenasa)

En los experimentos en los que se requirió una elevada sensibilidad, la determinación de amonio se llevó a cabo utilizando la enzima glutamato deshidrogenasa según el método descrito por Bergmeyer y Beutler, 1985. En este método el amonio reacciona con el 2-oxoglutarato y NADH para formar L-glutamato y NAD^+ en presencia de la glutamato deshidrogenasa. La cantidad de NADH consumida en la reacción es estequiométrica con la cantidad de amonio. A la mezcla de reacción (1 ml) se añadió: 50 μmoles de tampón fosfato (pH 7,5), 10 μmoles de 2-oxoglutarato, 0,2 μmoles de NADH, 10 U de L-glutámico deshidrogenasa de hígado bovino (EC 1.4.1.3) (Sigma) y 100 μl de muestra. El ensayo se llevó a cabo a 30 °C determinando continuamente el NADH a 340 nm.

Electrodo selectivo de ión amonio

El electrodo selectivo de amonio se empleó en la determinación de amonio de aquellas muestras que contenían también cianuro, ya que este compuesto ocasionaba interferencias con el método de Nessler.

El electrodo de amonio (Metrohm Ltd. CH-9101 Herisau/Switzerland) consta de una membrana hidrofóbica y permeable a gases, que separa la muestra (líquida) de una solución interna del electrodo que contiene amonio. El amoniaco disuelto en la muestra difunde a través de la membrana hasta que su presión parcial a ambos lados de la membrana es la misma. En cualquier muestra la presión parcial de amoniaco es proporcional a su concentración.

En el procedimiento analítico se utilizaron 5 ml de muestra, a los que se le añadieron 50 μ l de NaOH 10 M inmediatamente antes de la medida para transformar el amonio disuelto en amoniaco. Posteriormente se sumergió el electrodo en la muestra y se esperó hasta que la medida se estabilizó, aproximadamente 1 min. El electrodo se calibró usando tres patrones con concentraciones de amonio conocidas.

Determinación de nitrato

El nitrato se determinó espectrofotométricamente a 210 nm mediante el procedimiento descrito por Cawse (1967). A 1 ml de muestra convenientemente diluida se le añadió 1 ml de ácido sulfámico al 2 % (p/v), para eliminar el nitrito presente. Al cabo de 2 min se añadieron 3 ml de ácido perclórico al 6,75% (v/v) y tras dejar las muestras 30 min a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 210 nm.

Determinación de nitrito

La determinación de nitrito se llevó a cabo mediante el método de diazotación de Snell y Snell (1949). El método requirió el uso de soluciones de sulfanilamida ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) preparada en HCl 2,4 N y de N-naftil-etilendiamino (NNEDA, $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). A 1 ml de muestra se añadieron volúmenes iguales de las soluciones de sulfanilamida y NNEDA. Las muestras se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. En presencia de nitrito se formó un producto de diazotación de color rojizo que se detectó por su absorbancia a 540 nm. La concentración de nitrito se obtuvo por interpolación gráfica de la representación A_{540} frente a las concentraciones de disoluciones patrón.

Determinación 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 añadió 0,1 ml de cloramina T al 1 % (p/v) y se incubó durante 1 min. Transcurrido este tiempo se añadieron 0,3 ml del reactivo B, compuesto por 3 g de ácido barbitúrico, 15 ml de piridina, 3 ml de HCl y agua hasta 50 ml. A los 8 min se midió la absorbancia a 578 nm, interpolando el valor obtenido en una recta patrón realizada con NaCN.

Determinación de cianato

Este método se basó en la conversión de cianato a amonio en medio ácido y posterior determinación de amonio. A 0,9 ml de muestra, convenientemente diluida, se añadieron 0,1 ml de HCl 6 N. Tras incubar a 100 °C durante 1 min, se midió el amonio producido utilizando el método de Nessler.

El biosensor de cianato desarrollado en este trabajo también se utilizó en la medida de cianato en algunos experimentos.

Determinación de formamida

La concentración de formamida se determinó según el método descrito por Powel *et al.*, (1983) y modificado por Schygulla-Banek (1993). A 1 ml de muestra se le añadió 1 ml de NaOH 3,5 M y 1 ml de hidroxilamina 2,3 M. Esta mezcla se incubó a 60 °C durante 10 min y posteriormente se incubó en hielo. A los 10 min se añadió 1 ml de HCl 4 M y 1 ml de FeCl₃ 1,2 M preparado en HCl 75 mM. Tras 10 min a temperatura ambiente se midió su absorbancia a 540 nm y el valor se interpoló en una recta patrón.

Determinación de 2-oxoglutarato

La determinación específica de 2-oxoglutarato se llevó a cabo utilizando la enzima glutamato deshidrogenasa (Burlina, 1985). En presencia de amonio y NADH, la enzima glutamato deshidrogenasa es capaz de transformar el 2-oxoglutarato en glutamato. Según la estequiometría de la reacción, un mol de NADH es oxidado por cada mol de 2-oxoglutarato. La disminución de la concentración de NADH es proporcional a la cantidad de 2-oxoglutarato. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 µmoles de tampón fosfato (pH 7,5), 10 µmoles de NH₄Cl, 0,2 µmoles de NADH, 10 U de L-glutámico deshidrogenasa de hígado bovino

(EC 1.4.1.3) (Sigma) y 100 μl de muestra. El ensayo se llevó a cabo a 30 °C determinando de forma continua la absorbancia a 340 nm.

Determinación de piruvato

La concentración de piruvato se midió de forma específica mediante el método descrito por Lamprecht y Heinz (1985). Este método se basa en la reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa, en la cual el piruvato es reducido a lactato en presencia de NADH. La disminución en la concentración de NADH es proporcional a la cantidad de piruvato reducido. La mezcla de reacción contenía en 1 ml: 50 μmoles de tampón fosfato, 0,2 μmoles de NADH, 100 μl de muestra y 30 U de la enzima L-lactato deshidrogenasa de corazón de pollo (EC 1.1.1.27) (Sigma).

Determinación de α -cetoácidos

La producción de α -cetoácidos se determinó colorimétricamente a 520 nm utilizando el método de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (Borchers, 1977). A 250 μl de muestra se 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. Las rectas patrón realizadas con distintos α -cetoácidos presentaron el mismo coeficiente de extinción molar, lo que permitió la cuantificación de α -cetoácidos en valores absolutos.

Determinación de metabolitos por HPLC

La concentración de ácidos orgánicos, entre los que se encuentran algunos α -cetoácidos, y de formamida se determinó mediante HPLC en un equipo 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.

Determinación de la concentración de proteínas

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

- *Método de Bradford (1976)*. Los reactivos para la determinación de proteína fueron suministrados por la casa comercial Biorad (Bio-Rad Dye reagent concentrate). A 0,8 ml de muestra se añadieron 0,2 ml del colorante comercial, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia de la muestra a 595 nm. La concentración de proteína se determinó utilizando como patrón una solución de albúmina bovina (BSA).
- *Método de Lowry modificado (Shakir et al., 1994)*. A 0,3 ml de muestra se le añadió 1 ml de reactivo A (que contiene 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, se incubó a 37 °C y se esperaron 3 min antes de añadir 0,25 ml de reactivo de Folin Ciocalteau diluido una vez con agua. Después de otros 3 min a 37 °C se midió la absorbancia a 750 nm y su valor se interpoló en una recta patrón obtenida con BSA.

Detección de sideróforos

La producción de sideróforos se detectó utilizando placas indicadoras de dichos compuestos según el método descrito por Schwyn y Neilands (1987). Básicamente, la técnica consiste en la utilización de un compuesto quelante de hierro, el cromo azurol S (CAS), que cambia de color cuando libera el hierro. Por tanto, la producción de sideróforos se estima por el halo que se produce alrededor de las colonias en una placa impregnada Fe-CAS. Para preparar 1 L de medio CAS-agar se disolvieron 60,5 mg de CAS en 50 ml de agua y posteriormente se mezcló con 10 ml de una solución que contenía $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM disuelto en HCl 10 mM. La solución resultante se añadió lentamente y con agitación a otra solución que contenía 72,9 mg de HDTMA disuelto en 40 ml de agua. La mezcla resultante (*solución 1*) se autoclavó. También se autoclavó otra solución (*solución 2*) que contenía 750 ml H_2O , 100 ml medio mínimo M9 (10x), 15 g agar, 30,24 g Pipes y NaOH para ajustar el pH a 6,8. Después de enfriar a 50 °C, se mezclaron 50 ml de la *solución 1* con 450 ml de la *solución 2*, añadiéndose a esta mezcla acetato sódico 50 mM, NH_4Cl 2 mM y $1,5 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ de la solución de trazas del medio M9 descrita anteriormente.

Además del método descrito anteriormente también se utilizaron placas con azul de Prusia para detectar la presencia de sideróforos. El medio se preparó añadiendo 0,75 mM de azul de Prusia soluble (Fluka) a placas con M9-agar (pH 7) y conteniendo acetato 50 mM. El azul de Prusia se añadió a toda la placa o como top-agar disuelto en 1% de agar. La decoloración del medio alrededor de las colonias bacterianas se consideró indicativo de la producción de sideróforos.

II.10 Medida de actividades enzimáticas

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un μmol de producto, o la desaparición de un μmol de sustrato, por minuto.

Ensayo de la actividad nitrato reductasa (EC 1.6.6.2).

La determinación se llevó a cabo midiendo a 540 nm el nitrito formado, según el método descrito por Blasco *et al.*, (1997). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 10 μmoles de KNO_3 , 100 μmoles de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8), 0,2 μmoles de azul de bromofenol, una cantidad conveniente de la suspensión celular, y 5 μmoles de ditionito sódico. El ensayo se incubó a 30 °C durante 10 min y la reacción se paró agitando fuertemente la mezcla. El blanco se obtuvo agitando un duplicado a tiempo cero. La concentración de nitrito se determinó como se indica anteriormente.

Ensayo de la actividad cianuro oxigenasa

La actividad cianuro oxigenasa se determinó siguiendo la oxidación de NADH (0,2 mM) dependiente de NaCN (0,1-2 mM) catalizada por extractos acelulares (Fernández *et al.*, 2004). El ensayo se llevó a cabo a 30 °C a diferentes pHs (7-9) utilizando los tampones apropiados (fosfato y Tris a 50 mM). Al final de los ensayos también se determinó la concentración de cianuro y la aparición de amonio, éste último mediante la utilización de la enzima glutamato deshidrogenasa.

Ensayo de la actividad cianidasa

Esta enzima cataliza la formación de amonio y ácido fórmico a partir de cianuro y agua. Para su ensayo se empleó una mezcla que contenía en un volumen total de 1 ml: 50 μmoles de tampón (fosfato o Tris en un intervalo de pH de 7 a 9), 2 μmoles de NaCN y hasta 5 mg de proteína. La cantidad de amonio producido a diferentes tiempos se midió enzimáticamente con GDH.

Ensayo de la actividad cianuro hidratasa (formamida hidrolasa) (EC 4.2.1.66)

El ensayo de la actividad cianuro hidratasa se llevó a cabo igual que la actividad cianidasa, pero en este caso se midió producción de formamida en lugar de amonio.

Ensayo de la actividad cianasa (EC 4.2.1.104)

La determinación de la actividad cianasa se basó en los métodos utilizados por Anderson (1980) y Kunz y Nagapan (1989). El ensayo contenía en un volumen total de 1 ml: 50 μ moles de tampón Tris-HCl (pH 8,5), 3 μ moles de NaHCO_3 y un volumen apropiado de extracto acelular. La reacción se inició por la adición de 2 μ moles de KOCN. La mezcla de reacción se incubó a 65 °C durante 5-10 min. Posteriormente se determinó el amonio formado a partir del cianato usando el método de Nessler.

Ensayo de la actividad β -cianoalanina sintasa (β -CAS) (EC 4.4.1.9)

La actividad β -CAS se determinó midiendo la desaparición de cianuro en presencia de L-serina, O-acetil-L-serina o L-cisteína. El ensayo, que se llevó a cabo a distintos pHs (7-9), contenía en un volumen total de 1 ml: 50 μ moles de tampón (fosfato o Tris-HCl), 2 μ moles de NaCN, 10 μ moles del sustrato aminoácido y un volumen apropiado de extracto acelular. La reacción se inició por la adición de KCN, y después de incubar durante 30 min a 35 °C se determinó la cantidad de cianuro eliminado.

Ensayo de la actividad nitrilasa/nitrilo hidratasa-amidasa (EC 3.5.5.1)

La determinación de la actividad se llevó a cabo midiendo la cantidad de amonio producido a partir de los diferentes nitrilos utilizados. La mezcla de reacción contenía, en un volumen total de 1 ml: tampón Tris-HCl o fosfato 50 mM (pH 7-9), nitrilo 20 mM y un volumen apropiado de extracto acelular. Esta mezcla se incubó a 35 °C durante 1 h y finalmente se midió el amonio formado utilizando el reactivo de Nessler.

Ensayo de la actividad formamida hidratasa/formamidasa (EC 3.5.1.49)

Esta enzima se determinó siguiendo la conversión enzimática de formamida en amonio. A la mezcla de reacción (1 ml) se añadieron 50 μ moles de tampón (fosfato o Tris en un intervalo de pH de 7 a 9), 2 μ moles de formamida y extracto acelular. El ensayo se realizó a 30 °C y la determinación de amonio se llevó a cabo utilizando el reactivo de Nessler.

Ensayo de la actividad rodanasa (EC 2.8.1.1)

La actividad rodanasa se midió según el método descrito por Ray et al., (2000). El ensayo contenía 50 μ moles de tampón (pH 7-9) (fosfato o Tris-HCl, dependiendo del pH utilizado), 50 μ moles de tiosulfato amónico, 50 μ moles de KCN y extracto acelular en un volumen final de 0,5 ml. La reacción fue iniciada por la adición de KCN, determinándose la concentración de este compuesto a diferentes intervalos de tiempo.

Ensayo de la actividad L-asparaginasa (EC 3.5.1.1)

La actividad L-asparaginasa se determinó midiendo la acumulación de amonio a 420 nm tras la hidrólisis de la L-asparagina por la enzima. La mezcla de reacción contenía en 1 ml: 50 μ moles de tampón Tris-HCl (pH 8,5); 10 μ moles de L-asparagina y una cantidad adecuada del extracto acelular. La mezcla de reacción se incubó el tiempo necesario a 30 °C y la reacción se detuvo por adición del reactivo de Nessler.

II.11 Biotransformaciones utilizando suspensiones concentradas de células (“Resting-cells”)

Algunos experimentos de degradación de cianuro y cianhidrinas se llevaron a cabo utilizando suspensiones concentradas de células. Para ello, las células que se encontraban en fase exponencial se recogieron por centrifugación, se lavaron en tampón M9 (1x) (pH 9,5) y la pella conteniendo las células se resuspendió en un volumen determinado de medio M9 y a una absorbancia de 1,5 a 600nm.

II.12 Electroforesis desnaturante de proteínas (SDS-PAGE)

Para la separación electroforética de proteínas se utilizó el equipo de electroforesis vertical “Mini-PROTEAN II” (Bio-Rad Laboratories, cat. No. 165-2940), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Las electroforesis se realizaron utilizando geles discontinuos de poliacrilamida de 1 mm de espesor, de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). Los geles se prepararon a una concentración de acrilamida del 12% (p/v) en el segmento separador y del 4% (p/v) en el segmento concentrador, manteniéndose una relación entre acrilamida: bisacrilamida de 29:1. La composición de los geles se describe en el Cuadro 10. Las muestras conteniendo proteínas, antes de ser cargadas

en el gel, se mezclaron con un volumen de tampón de carga, preparado al 4X, y la mezcla se incubó a 95 °C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas. El tampón de carga contenía 1,2 ml de Tris-HCl 1 M (pH 6,8), 2 ml de SDS al 20%, 4 ml de glicerol, 2 ml de 2-mercaptoetanol y 0,2 ml de azul de bromofenol al 0,1%, en un volumen total de 10 ml. Las muestras se cargaron en el gel mediante una jeringa Hamilton de 50 µl de volumen. La electroforesis se desarrolló según las instrucciones de la casa comercial (BioRad), durante 30 min a 15 mA por cada gel, hasta que las muestras entraron en el gel separador, y a partir de este momento la corriente se incrementó a 30 mA por gel hasta conseguir una separación adecuada de las proteínas de la muestra. El tampón de electroforesis estaba compuesto por una disolución acuosa conteniendo 1 g de Tris, 4,8 g de glicina y 1,6 ml de SDS al 20%, en un volumen total de 330 ml. Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador comercial “SDS-PAGE Molecular Weight Standars, Broad Range” (Bio-Rad).

CUADRO 10

Composición de los geles empleados en la electroforesis de acrilamida SDS-PAGE

	Gel concentrador	Gel separador
Acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/v)	1,67 ml	6,75 ml
Tris-HCl 1 M (pH 8,8)	-	5,6 ml
Tris-HCl 1 M (pH 6,8)	1,25 ml	-
SDS, 20% (p/v)	50 ml	75 ml
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamina (TEMED)	10 ml	10 ml
H ₂ O	7 ml	2,6 ml
Persulfato amónico, 10% (p/v)	50 ml	100 ml

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla se muestran los componentes utilizados en la preparación del gel concentrador (10 ml) y del gel separador (15 ml). La disolución de acrilamida/bisacrilamida fue suministrada por Biorad.

La tinción de los geles de SDS-PAGE se realizó utilizando Azul de Coomassie R-250. Para ello, los geles se incubaron durante 1 h con agitación continua en una solución que contenía metanol al 40%, ácido acético al 7% y Coomassie R-250 0,1% (p/v). La destinción se realizó en la misma solución pero sin azul de Coomassie R-250.

II.13 | Análisis proteómico

Fraccionamiento subcelular

Para la realización de geles 2D se partió aproximadamente de 600 ml de cultivos de células creciendo en fase exponencial que se recogieron por centrifugación a 20.000 g durante 15 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada Beckman Avanti™J-25. Después de retirar el sobrenadante, las células se lavaron dos veces en un tampón de baja sal (que contiene: KCl 3 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaH_2PO_4 9 mM y NaCl 68 mM). Finalmente las células se resuspendieron en tampón Tris-HCl 40 mM (pH 9) y se congelaron a -80 °C. Justo antes de su uso las células se descongelaron y se les añadió DNasa 65 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y RNasa 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Posteriormente se rompieron en una prensa de French (SLM/Aminco, modelo FA-079) en dos pasadas a 16.000 psi, manteniendo en todo momento las células a 4 °C. A los extractos obtenidos se les añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF 7 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Leupeptina 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y Peptatina A 2,8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y a continuación se centrifugaron durante 20 min a 15.000 g a 4 °C, para eliminar las células enteras y los restos celulares. El sobrenadante obtenido se sometió a ultracentrifugación durante 1h 15 min a 4 °C y 100.000 g en una ultracentrífuga L7 (Beckman). El sobrenadante resultante se utilizó como *fracción soluble* mientras que la pella, lavada 3 veces con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 9), se utilizó como *fracción de membranas*. La fracción soluble se concentró utilizando centricones Biomax de 5k (Millipore; Ultrafree®-0.5).

Preparación de la muestra

De la fracción soluble o de membranas se tomaron volúmenes adecuados, con cantidades comprendidas entre 300 y 450 μg de proteínas, y se completaron hasta 200 μl (para geles de IEF de 11 cm) o 500 μl (para geles de IEF de 24 cm) con tampón de solubilización, que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v), DTT 50 mM, tampón IPG (mezcla de anfólitos) 1% (v/v) y trazas de azul de bromofenol. Para solubilizar las proteínas de la fracción de membrana se utilizó el detergente ASB-14 al 1% en lugar de CHAPS. Para favorecer la solubilidad de las proteínas, esta mezcla se agitó durante 5 min con el vórtex y posteriormente se incubó durante 1 h en agitación y a temperatura ambiente.

Electroforesis bidimensional

Isoelectroenfoque (IEF)

La **primera dimensión** se llevó a cabo usando el sistema IPGphor de Pharmacia. Las tiras de IEF utilizadas fueron de 11 y 24 cm (Pharmacia), así como de diferentes intervalos de pH.

Las muestras, previamente centrifugadas a 12,000 g durante 5 min, se aplicaron en los sarcófagos y encima de cada una se colocó, hacia abajo, un gel de IEF. Posteriormente los geles se cubrieron con aceite mineral. Para una completa absorción de las proteínas y rehidratación de los geles se llevó a cabo una rehidratación pasiva (sin aplicar voltaje) durante 12 h para los geles de 11 cm. En el caso de los geles de 24 cm se realizó una primera rehidratación pasiva durante 1 h y posteriormente una rehidratación activa (30V) durante 12 h. El programa de IEF, que depende de la longitud de los geles, se presenta en el Cuadro 11. En ambos casos tanto la rehidratación como el IEF se llevaron a cabo a 20 °C. Además, durante el IEF se aplicó una corriente de 50 μ A por gel.

Paso	geles de 11 cm		geles de 24 cm	
	Voltaje (V)	Tiempo (h:min)	Voltaje (V)	Tiempo (h:min)
Rehidratación	0	12:00	0	1:00
1	500	1:00	30	12:00
2	1.000	1:00	60	2:00
3	8.000	hasta 18.000 Vhr	500	1:00
4	-	-	1.000	1:00
5	-	-	8.000	hasta 80.000 Vhr

Fuente: Elaboración propia.

Equilibrado de las tiras de IEF

Previamente a la segunda dimensión, los geles de IEF se equilibraron durante 15 min en tampón de equilibrado (Urea 6 M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (p/v) y trazas de azul de bromofenol. Todo esto preparado en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,8)) conteniendo DTT (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), y a continuación otros 15 min en tampón de equilibrado conteniendo yodoacetamida (25 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La **segunda dimensión** de la electroforesis bidimensional se llevó a cabo usando el sistema Hoefer SE 600 (Pharmacia) para los geles 11 cm. Para los geles de 24 cm se utilizó el sistema Ettan DALTtwelve (Pharmacia). Todo el material se lavó cuidadosamente con agua destilada y etanol. Los geles de IEF equilibrados se colocaron posteriormente sobre geles de poliacrilamida al 12,5% para la segunda dimensión. Los marcadores de peso molecular se aplicaron en un trozo de papel Whatmann, el cual se colocó al lado del gel de IEF y sobre el gel de poliacrilamida. Por último, tanto el gel de IEF como el papel con los marcadores se sellaron con agarosa al 0,5%. Las condiciones de electroforesis se presentan en el Cuadro 12.

CUADRO 12		Condiciones de electroforesis			
Paso	geles de 11 cm		geles de 24 cm		
	Intensidad (mA/gel)	Duración (h:min)	Potencia (W/gel)	Duración (h:min)	
1	15	0:15	3	0:30	
2	30	5:00	20	4:30	

Fuente: Elaboración propia.

En ambos casos la temperatura se mantuvo a 20 °C.

Tinción de geles

El revelado de los geles bidimensionales se realizó únicamente mediante la tinción de Coomassie.

Los geles se lavaron con agua destilada y después se incubaron con el reactivo colorante (Coomassie Brilliant blue G250 2g·l⁻¹ y R250 0,5 g·l⁻¹, metanol 5%, etanol 42,5% y ácido acético 10%), agitando suavemente. El tiempo de incubación fue de 2 h para los geles de 11 cm y de 12 h para los geles de 24 cm. A continuación, se retiró el colorante y se procedió a la destinción de los geles en 2 pasos. En un primer paso los geles teñidos se lavaron (2 x 15 min) con una solución de desteñido rápida (etanol 30%, ácido acético 10% y agua 60%). Posteriormente se incubaron durante 12 h con una solución de desteñido lenta (ácido acético 7%). Por último, los geles se lavaron con agua destilada. Los geles pueden mantenerse varios días en agua a 4 °C sin pérdida significativa de tinción. Este tipo de tinción es compatible con las distintas técnicas de identificación de proteínas.

Análisis de imagen de los geles

Los geles se escanearon con el ImageScanner de Pharmacia y posteriormente se analizaron mediante el software ImageMaster 2D v3.1 (Pharmacia). En dicho análisis se identificaron aquellas manchas (proteínas resueltas en la electroforesis bidimensional) cuyos cambios, tanto cualitativos como cuantitativos, se consideraron más significativos.

Aislamiento de proteínas y análisis mediante espectrometría de masas

Las proteínas (manchas) de interés se recortaron del gel utilizando un bisturí previamente lavado con agua destilada y se transfirieron a un tubo Eppendorf. Durante el proceso se usaron guantes de látex para evitar la contaminación de los geles con la queratina humana.

Una vez aisladas, las proteínas fueron enviadas al Centro Nacional de Biotecnología del CSIC (Madrid), donde los péptidos obtenidos por digestión con tripsina fueron analizados mediante MALDI-TOF.

Identificación de proteínas a partir de los resultados de espectrometría de masas

Las huellas de mapas de péptidos generadas por MALDI-TOF se utilizaron para identificar las proteínas mediante diversas herramientas bioinformáticas disponibles en Internet, como: Mascot (<http://www.matrixscience.com>), Profound y ProteinProspector (<http://www.spectroscopynow.com>).

II.14 Construcción de un biosensor de cianato

Instrumentos y aparatos

Como detector se utilizó un espectrofotómetro UV-visible (Unicam 8700 series) equipado con una célula de flujo (178.012-QS Hellma) y un registrador (Knauer). También se utilizó un baño (Selecta), una bomba peristáltica de 4 vías con un selector de velocidad (Gilson Minipuls-3), una válvula de inyección (Rheodyne 5041) y tubos de teflón de 0,5 mm de diámetro.

Reactivos

Solución portadora. Esta solución contenía K_2HPO_4 50 mM (Panreac, Barcelona, España) y $NaHCO_3$ 3 mM (Panreac) ajustada a pH 8.

Reactivo 1. En 250 ml de agua se disolvieron 200 mg de salicilato sódico (Sigma-Aldrich, St Wuentin Fallavier, Francia) y 372 mg de nitroprusiato sódico (Sigma).

Reactivo 2. Este reactivo contenía hipoclorito sódico (Panreac) al 10% y 2 g de hidróxido sódico (Panreac) en 250 ml de agua.

Inmovilización de la cianasa. Para ello se utilizó 3-Aminopropil-trietoxisilano (Aldrich, No. 11,339-5), glutaraldehído (Merk, No. 820603) y vidrio de poro controlado (Sigma, No. PG240-200).

Inmovilización de la cianasa

La enzima cianasa parcialmente purificada se inmovilizó de forma covalente en vidrio de poro controlado según el método descrito por Massom y Townshend (1986). El proceso de inmovilización consistió en tres pasos: 1) lavado del soporte, 2) activación y 3) acoplamiento de la enzima. Aproximadamente 50 mg de vidrio se lavaron durante 30 min con HNO₃ 10% en caliente y con agitación. El vidrio se recuperó mediante filtración y se secó a 100 °C durante 5 min. El proceso de activación consistió en la silanización del vidrio y posterior acoplamiento de glutaraldehído. La silanización se llevó a cabo incubando el vidrio durante 90 min a 90 °C con 5 ml de una solución que contenía 3-aminopropil-trietoxisilano (3-APS) al 10% preparado en tampón acetato amónico 50 mM (pH 5). Después el vidrio se filtró, se lavó con agua destilada y se secó durante 5 min a 100 °C. El acoplamiento de glutaraldehído se llevó a cabo incubando el vidrio durante 30 min en agitación y a temperatura ambiente con 5 ml de glutaraldehído al 12% preparado en tampón fosfato 100 mM (pH 8,5). Posteriormente el vidrio se recuperó por filtración, se lavó con agua destilada y se secó a vacío. A partir de este momento el vidrio se guardó protegido de la luz. Por último, la inmovilización de la enzima en el soporte se realizó añadiendo 50 mg del vidrio activado y seco a un vial que contenía 1 ml de extracto con cianasa preparado en tampón fosfato 100 mM (pH 7). Esta mezcla se incubó a 4 °C durante 6 h, agitando cada 30 min. Finalmente, el vidrio conteniendo la enzima se lavó con agua destilada y se conservó en tampón fosfato 100 mM (pH 7) a 4 °C hasta su uso.

El soporte con la cianasa inmovilizada se empaquetó en tubos de teflón de diferente longitud (1-2 cm) y 0,5 mm de diámetro, obteniéndose de esta forma un reactor con enzima inmovilizada (IMER).

Diseño del biosensor

El biosensor de cianato consta de una bomba peristáltica que impulsa diferentes soluciones a través de un sistema de tubos. La utilización de una válvula de inyección permite la introducción de la muestra en el sistema, la cual atraviesa el IMER conteniendo la cianasa inmovilizada. En el sistema existen dos puntos donde confluyen diferentes soluciones, las cuales se mezclan posteriormente en dos zonas de gran longitud denominadas reactores. El detector consta de una célula de flujo acoplada a un espectrofotómetro que mide de forma continua la absorbancia a 700 nm.

II.15 | Biorreactor

Para los estudios de degradación de cianuro a escala pre-piloto, tanto en continuo como en discontinuo, se empleó un biorreactor Biostat B (Braun Biotech, Melsungen, Alemania) con un volumen de trabajo de 5 l. Este equipo permite controlar y medir la temperatura, la aireación, el pH y el flujo de nutrientes.

Para medir el crecimiento celular y la concentración de cianuro se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo.

II.16 | Tratamiento estadístico de los resultados

Todas las curvas de crecimiento presentes en los *Resultados* se realizaron por triplicado, mostrándose únicamente uno de los experimentos más representativos. Los valores de actividad enzimática mostrados son la media de tres experimentos diferentes, siendo en todos los casos la desviación estándar menor del 10% del valor.

II.17 | Reactivos y aparatos

El residuo de la industria joyera fue amablemente cedido por la empresa GEMASUR. La concentración de cianuro total de este residuo varió entre 15 y 37 M, dependiendo de la muestra, mientras que el cianuro libre varió entre desde 25 mM hasta 1 M (Vallejo-Pecharromás y Luque de Castro, 2002). La diferencia entre cianuro libre y total es debida a la presencia de metales, que forman complejos con el cianuro. El análisis del residuo usado en este trabajo reveló la presencia de 0,76 M de cianuro libre

(20 g·l⁻¹). La concentración de los metales más abundantes, estimada por absorción atómica, fue 3,5 mM Fe, 0,6 mM Cu, 0,76 mM Au y 3,5 mM V (Vallejo-Pecharromán y Luque de Castro, comunicación personal). El pH del residuo fue superior a 13. Cuando se usó como fuente de nitrógeno, el residuo se diluyó en el medio de cultivo para dar la concentración de cianuro libre deseada (normalmente 2 mM que corresponde a 2,63 ml de residuo por litro de medio).

Una solución 12,5 mM de [Cu(CN)₄]²⁻ se preparó mezclando volúmenes iguales de KCN 100 mM (esterilizado por filtración) y CuSO₄ 25 mM (autoclavado). Cuando se utilizó como fuente de nitrógeno, esta solución se diluyó en el medio de cultivo hasta la concentración deseada.

Debido a su no disponibilidad comercial, las cianhidrinas derivadas del 2-oxoglutarato y del piruvato se sintetizaron mezclando volúmenes variables, según la concentración de cianhidrina deseada, de KCN 100 mM y el α-cetoácido correspondiente 100 mM, ambos compuestos esterilizados por filtración. La mezcla se incubó durante 1 h en agitación y a temperatura ambiente.

El resto de reactivos empleados fueron de la máxima pureza disponible comercialmente. El agua destilada y bidestilada se obtuvo a partir de sistemas Milli Ro y Milli Q respectivamente, ambos de Millipore.

Las manipulaciones que requerían esterilidad se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar Telstar PV 100 dotada de luz ultravioleta.

Los espectrofotómetros utilizados durante este trabajo fueron: Beckman (DU 7500) y ThermoSpectronic (Helios ε).



Resultados

Capítulo III

III. RESULTADOS

III.1 Aislamiento, identificación y caracterización de una cepa bacteriana capaz de degradar cianuro en condiciones alcalinas

Aislamiento e identificación de una cepa alcalófila capaz de utilizar cianuro como fuente de nitrógeno

La formación y volatilización de ácido cianhídrico a pH neutro y ácido es uno de los principales factores limitantes en los procesos de degradación biológica de cianuro, por lo que el empleo de un pH básico supondría una mayor eficiencia de dicho proceso. Por este motivo, uno de los requisitos previos de este trabajo fue el aislamiento de una bacteria capaz de degradar cianuro en condiciones alcalinas. El medio empleado para el aislamiento fue el medio mínimo M9 (pH 9,5) con acetato 50 mM y cianuro sódico 2 mM como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Inoculando este medio selectivo con lodos recogidos de la margen izquierda del río Guadalquivir a su paso por Córdoba, se aisló, mediante la técnica de enriquecimiento, una cepa bacteriana capaz de degradar cianuro a pH alcalino y en condiciones aeróbicas. Su identificación se llevó a cabo a

GRÁFICO 14

Secuencia RNAr 16S de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

GTGCTACAAT	UAGAGUUUGA	UCCUGGCUCA	GAUUGAACGC	UGGCGGCAGG	CCUAACACAU	60
GCAAGUCGAG	CGGAUGAAGG	GAGCUUGCUC	CCUGAUUUAG	CGGCGGACGG	GUGAGUAAUG	
CCUAGGAAUC	UGCCUGGUAG	UGGGGGAUAA	CGUUCCGAAA	GGAACGCUAA	UACCCGAUAC	180
GUCCUACGGG	AGAAGACAGG	GGACCUUCGG	GCCUUGCGCU	AUCAGAUAGAG	CCUAGGUCGG	
AUUAGCUAGU	UGGUGAGGUA	AUGGCUCACC	AAGGCGACGA	UCCGUAAUCUG	GUCUGAGAGG	300
AUGAUCAGUC	ACACUGGAAC	UGAGACACGG	UCCAGACUCC	UACGGGAGGC	AGCAGUGGGG	
AAUAUUGGAC	AAUGGGCGAA	AGCCUGAUCC	AGCCAUGCCG	CGUGUGUGAA	GAAGGUCUUC	420
GGAUUGUAAA	GCACUUUAAG	UUGGGAGGAA	GGGCAGUAAG	NUAAUACCUU	GCUGUUUUGA	
CGUUAACGAC	AGAAUAAGCA	CCGGCUAACU	UCGUGCCAGC	AGCCGCGGUA	AUACGAAGGG	540
UGCAAGCGUU	AAUCGGAAUU	ACUGGGCGUA	AAGCGCGCGU	AGGUGGUUCG	UUAAGUUUGA	
UGUGAAAACC	CCGGGCUCA	CCUGGGAACU	GCAUCCAAAA	CUGGCGAGCU	AGAGUACGGU	660
AGAGGGUGGU	GGAAUUUCCU	GUGUAGCCGU	GAAAUCCGUA	GAUAUAGGAA	GGAACACCAG	
UGGCGAAGGC	GACCACCUGG	ACUGAUACUG	ACACUGAGGU	GCGAAAGCGU	GGGGAGCAAA	780
CAGGAUUAGA	UACCUUGGUA	GUCCACGCCG	UAAACGAUAG	UCAACUAGCC	GUUUGGUUCC	
UUGAGAACUU	AGUGGCAGCU	CUAAACGAUU	AAGUUGACCG	CCUGGGGAGU	ACGGCCGCAA	900
GGUUAAAAACU	CAAAUGAAUU	GACGGGGGCC	CGCACAAAGC	GUGGAGCAUG	UGGUUUAAUU	
CGAAGCAACG	CGAAGAACCU	UACCUGGCCU	UGCAUAGCUG	AGAACUUUCC	ANAGAUGGAU	1020
UGGUCCUUC	GGGAACUCAG	ACACAGGUGC	UGCAUGGCUG	UCNUCAGCUC	GUGUCGCUUG	
AAUGUUGGGU	UAAGUCCCGU	UAACGAGCCG	AACCUUGUCC	UAGUUAACAG	CACGUAAUUG	1140
UGGGCACUCU	AAGGAGACUG	CCGGUGACAA	ACCGGAGGAA	GGUGGGGAGU	ACGUCAAAGUC	
AUCAUGGCC	UUAAGGCCAG	GGCUACACAC	GUGCUACAAU	GGCCGGUACA	AAGGGUUGCC	1260
AAGCCCGGAN	NUGGAGCUAA	UCCA	1285			

través de la amplificación del DNA que codifica el RNA ribosómico 16S, secuenciación del mismo y posterior comparación con las secuencias existentes en las bases de datos. Después de un análisis BLAST de esta secuencia, la estirpe aislada se identificó tentativamente, con una similitud del 99%, como *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. La secuencia RNAr 16S de esta estirpe (Gráfico 14), denominada CECT5344, ha sido depositada en la base de datos GenBank con el número de acceso AJ628163.

La estirpe *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 no contiene plásmidos detectables y en medio LB sólido presentó resistencia a los siguientes antibióticos ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$): tetraciclina (10), ampicilina (100), cloranfenicol (10), espectomicina (200). Por el contrario, fue sensible a kanamicina (25) estreptomycinina ((200) y gentamicina (20).

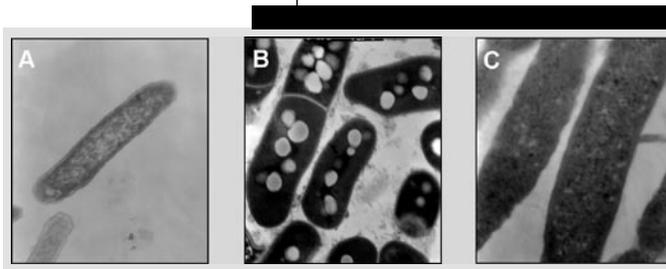
Caracterización fisiológica de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

Ultraestructura

Con objeto de establecer posibles diferencias en cuanto a morfología celular en presencia o ausencia de cianuro, se analizó la ultraestructura de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 mediante microscopía electrónica de transmisión.

Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con amonio, NaCN o el residuo de la joyería (descrito en *Materiales y Métodos*), como fuentes de nitrógeno. Los cultivos se recogieron en la fase exponencial, se prepararon las muestras según instrucciones del Servicio de Microscopía de la

GRÁFICO 15 Ultraestructura de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344



Las micrografías corresponden a células recogidas en fase exponencial cultivadas en: medio mínimo M9 con amonio ($\times 28.000$) (A), NaCN ($\times 25.000$) (B) o el residuo de la joyería ($\times 52.000$) (C) como únicas fuentes de nitrógeno.

Universidad de Córdoba, y se observaron al microscopio electrónico de transmisión. En todas las condiciones la bacteria presentó una morfología bacilar ligeramente curvada, con un tamaño aproximado de 1,5 μm de longitud x 0,4 μm de diámetro (Gráfico 15). Al igual que en amonio, las células cultivadas con el residuo presentaron un citoplasma homogéneo (Gráfico 15A y C). Sin embargo, las células cultivadas con NaCN como única fuente de nitrógeno mostraron una acumulación de gránulos electrodensos con la apariencia típica del material de reserva formado por poli- β -hidroxialcanoatos (Gráfico 15B). La naturaleza química de estos gránulos no ha sido determinada.

pH óptimo de crecimiento

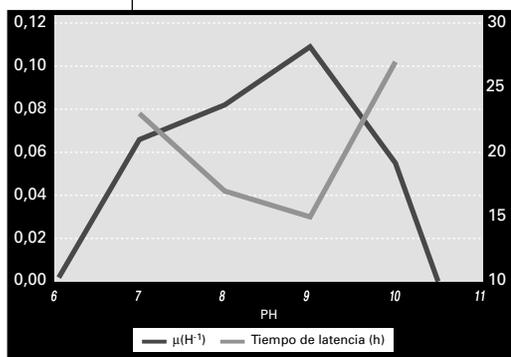
La volatilización del cianuro a pH neutro y ácido ($\text{pK}_a = 9,2$) no aconsejaba su utilización como fuente de nitrógeno en la determinación del pH óptimo de crecimiento de la bacteria. Aunque el amonio se volatiliza a pH alcalino ($\text{pK}_a = 9,3$), tras comprobar que las pérdidas de éste no eran significativas en medios sin inocular se utilizó amonio como fuente de nitrógeno en los experimentos

de optimización. Se realizaron curvas de crecimiento con distintos pHs y, con los resultados obtenidos, se calculó la velocidad específica de crecimiento para cada pH como la pendiente del ajuste lineal del tramo exponencial de la curva de crecimiento. Como se muestra en el Gráfico 16, tanto la velocidad máxima de crecimiento como la mínima fase de latencia tuvieron lugar a pH 9. A pesar de este pH óptimo de crecimiento, la bacteria toleró pHs extremadamente alcalinos (hasta pH 11,5).

Es de destacar que, cuando el pH inicial del medio fue distinto de 9, a medida que la bacteria creció, éste se aproximó al pH óptimo (Gráfico

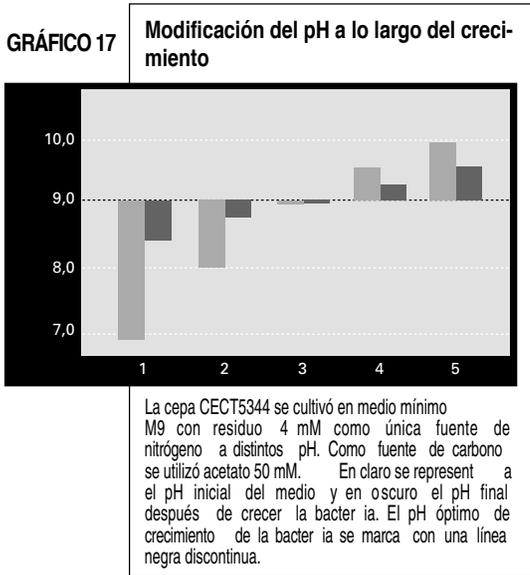
GRÁFICO 16

pH óptimo de crecimiento de *P. pseudocaligenes* CECT5344



La cepa se cultivó en medio mínimo M9 con amonio 5 mM como fuente de nitrógeno a distintos pH. Además del tampón fosfato que contiene el M9, se adicionaron los tampones ácido bórico-tetraborato sódico y carbonato-bicarbonato, ambos a una concentración de 25 mM. Como fuente de carbono se utilizó acetato 50 mM. La velocidad específica de crecimiento se representa como μ .

17). Si bien también se produjo una disminución del pH en los controles sin inocular con los medios a pH superior a 9, la ocurrida en los cultivos inoculados fue mayor.



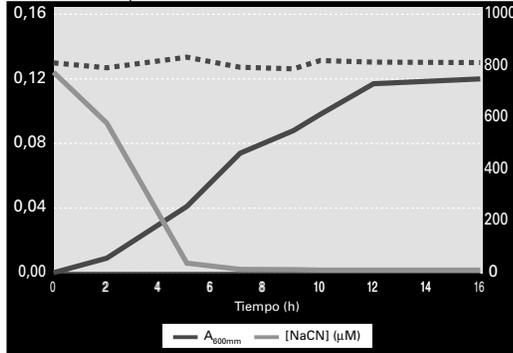
Perfil de sustratos; degradación de cianuro y otros compuestos relacionados

Con el objetivo de conocer qué tipo de sustratos utiliza la estirpe CECT5344, esta bacteria se cultivó aeróbicamente en medio mínimo M9 (pH 9,5) con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Entre estas últimas se emplearon, además de cianuro, compuestos relacionados con él. En los ensayos en los que se estudió la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno se utilizó acetato 50 mM como fuente de carbono. Las fuentes de nitrógeno inorgánicas más comunes que sustentaron el crecimiento de la estirpe CECT5344 fueron amonio, nitrato y nitrito. A pesar de la toxicidad del nitrito, esta bacteria toleró y creció con concentraciones de hasta 15 mM. *P. pseudoalcaligenes* también utilizó fuentes orgánicas de nitrógeno, como la urea y los aminoácidos asparragina, glutamato, serina, cisteína, arginina y ornitina.

Entre los compuestos cianurados, la estirpe CECT5344 utilizó como fuentes de nitrógeno las sales sódica y potásica de cianuro (NaCN y KCN), así como los complejos cianuro-metálicos formados por el hierro (ferrocianuro $K_4Fe(CN)_6$, ferricianuro $K_3Fe(CN)_6$ y ferrocianuro férrico

GRÁFICO 18

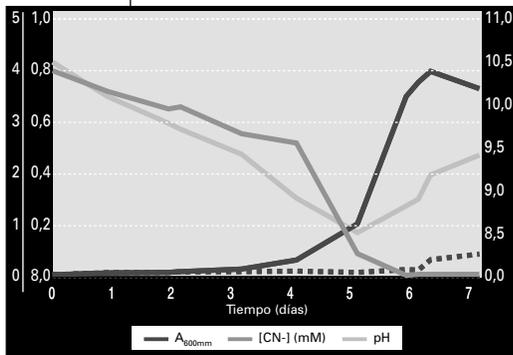
Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con NaCN 1 mM como única fuente de nitrógeno



La cepa se cultivó previamente en medio mínimo M9 (pH 9,5) con acetato 50 mM y NH_4Cl 2 mM como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. Cuando se alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, se adicionó NaCN 1 mM como fuente de nitrógeno. La línea discontinua representa la concentración de cianuro en un medio control sin inocular.

GRÁFICO 19

Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con el residuo de la joyería como única fuente de nitrógeno

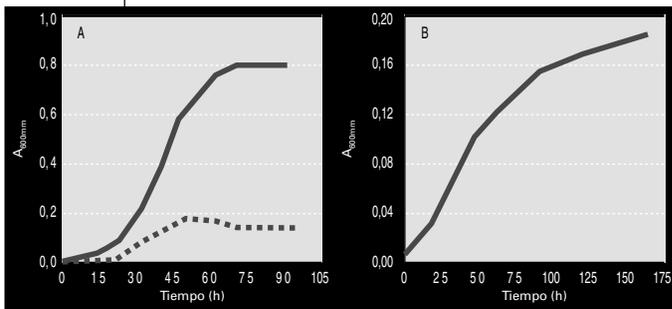


La cepa se cultivó en medio mínimo M9 (pH 9,5) con acetato 50 mM y el residuo de la joyería (cianuro 4 mM) como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. La línea discontinua representa la concentración de cianuro en medio control sin inocular.

$\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) y el cobre ($\text{K}_2\text{Cu}(\text{CN})_4$). El Gráfico 18 muestra el consumo de cianuro y el crecimiento de la estirpe CECT5344 en medio mínimo (pH 9,5) con NaCN 1 mM como única fuente de nitrógeno. En esta gráfica se observa una fase de latencia en el crecimiento de 2 h, tiempo durante el que se consumió aproximadamente el 25% del cianuro inicial. En tan sólo 5 h la bacteria degradó todo el cianuro, mientras que en un control no inoculado la concentración inicial se mantuvo constante durante 16 h. Por otra parte, en un cultivo control al que no se le añadió fuente de nitrógeno no se observó crecimiento (no mostrado).

Como se muestra en el Gráfico 19, esta bacteria también creció en condiciones alcalinas utilizando el cianuro presente en el residuo procedente de los baños electrolíticos de la joyería. La bacteria presentó una fase de latencia de aproximadamente 4 días, tiempo tras el cual alcanzó una $A_{600\text{ nm}}$ de 0,8. En cuanto a la degradación de cianuro, ésta se produjo durante la fase exponencial temprana de crecimiento. Para distinguir el cianuro consumido por la bacteria del eliminado de forma abiótica, se utilizó un medio control sin inocular. La medida de la concentración de cianuro en este medio se llevó a cabo de forma paralela al cultivo inoculado, observándose una pérdida de algo menos del 50% del cianuro inicial. Si bien el pH del medio M9 utilizado fue 9,5, la adición del residuo aumentó el pH hasta 10,5. Durante la fase de latencia éste disminuyó hasta 8,5, momento a partir del cual el pH aumentó progresivamente hasta 9,5, coincidiendo con el crecimiento de la bacteria.

GRÁFICO 20 Utilización de β -ciano-L-alanina (A) y cianoacetamida (B) por *P. pseudoalcaligenes* CECT5344



La cepa se cultivó en medio mínimo M9 (pH 9,5) con uno u otro compuesto como única fuente de nitrógeno a una concentración 2 mM. Como fuente de carbono se utilizó acetato 50 mM. En el caso de la β -cianoalanina, este compuesto también se utilizó como fuente de nitrógeno y carbono (2 mM) (línea discontinua).

Otros compuestos relacionados con el cianuro utilizados como fuente de nitrógeno por esta estirpe fueron el cianato potásico (KOCN), la β -ciano-L-alanina ($C_4H_6N_2O_2$) (Gráfico 20A), el nitroferricianuro sódico ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) y la cianoacetamida ($C_3H_4N_2O$) (Gráfico 20B). En el caso de la β -ciano-L-alanina, el crecimiento máximo alcanzado con 2 mM fue $A_{600nm} = 0,8$ (Gráfico 20A).

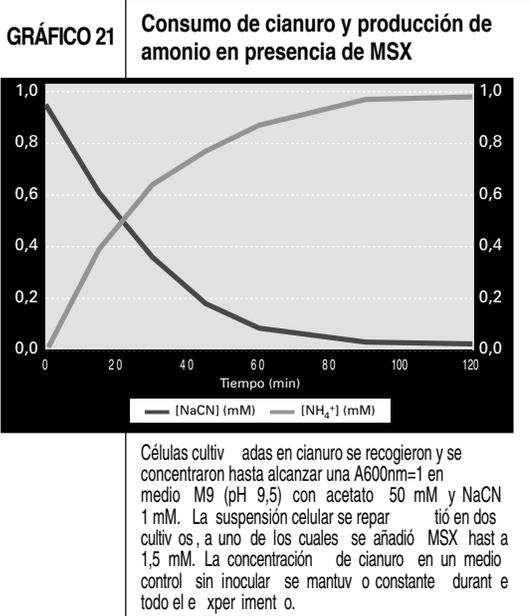
Como fuentes de carbono *P. pseudoalcaligenes* utilizó eficientemente acetato, malato y glucosa, mientras que fue incapaz de crecer con cianuro o cianato como únicas fuentes de carbono. El único compuesto relacionado con el cianuro que la estirpe CECT5344 utilizó como fuente de carbono y nitrógeno fue la β -ciano-L-alanina, si bien en estas condiciones el crecimiento fue muy escaso (Gráfico 20A).

III.2 Metabolismo del cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Asimilación de cianuro y optimización del proceso

Como se expuso en el capítulo anterior, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria capaz de degradar cianuro en condiciones alcalinas (Gráfico 18). Durante este proceso no se detectó amonio en el medio, por lo que para demostrar su carácter asimilador se utilizó MSX (L-metionina-D,L-sulfoximina), un análogo químico de la glutamina que inhibe irreversiblemente la asimilación de amonio a nivel de la glutamina

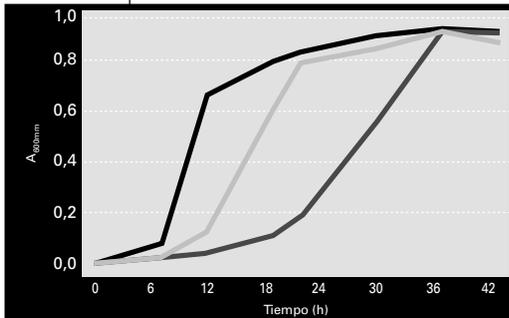
sintetasa (Blasco *et al.*, 2001; Moreno-Vivián *et al.*, 1983; Arp y Zumft, 1983). En presencia de este inhibidor, suspensiones concentradas de células



cultivadas en cianuro catalizaron la conversión estequiométrica de cianuro en amonio, el cual se acumuló en el medio de cultivo (Gráfico 21). Por el contrario, en cultivos no tratados con MSX no se detectó amonio.

GRÁFICO 22

Efecto de diferentes tampones en el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* a pH alcalino



La bacteria se cultivó en medio mínimo M9 (pH 9,5) con acetato 50 mM y NH₄Cl 5 mM (línea negra). Al medio se adicionó también tampón CHES (línea gris claro) o tampón carbonato/bicarbonato (línea gris oscuro), ambos a una concentración 50 mM.

Debido al equilibrio existente entre el ión cianuro y el gas cianhídrico, el pH del medio es un factor clave a tener en cuenta en los tratamientos biológicos de eliminación de cianuro. Con el objetivo de optimizar el proceso de biodegradación se llevó a cabo un estudio de diferentes tampones, así como diferentes formas de cultivo. Inicialmente, los medios fueron inoculados con un 1%

(v/v) de un cultivo crecido previamente en amonio. En estas condiciones, en las que se utilizó el medio mínimo M9 (pH 9,5), las células crecieron y degradaron totalmente el cianuro después de 6 días (Gráfico 19). Durante este tiempo, el pH del medio disminuyó desde 10,5 hasta 8,5. Este pH (inferior al pK_a 9,2 del par HCN/CN⁻) provocó la volatilización de parte del cianuro en forma de HCN. Debido a la incapacidad tamponadora del fosfato a pH alrededor de 9, se utilizaron dos tampones apropiados para estos pH, el CHES (ácido 2-[ciclohexilamino] etanosulfónico) y el carbonato/bicarbonato. En ambos casos, a pesar de que la disminución del pH transcurrió más lentamente, la bacteria aumentó su fase de latencia (Gráfico 22), por lo que el crecimiento y la evaporación de cianuro fue similar en presencia que en ausencia de estos tampones.

Finalmente, para evitar el problema de la formación de HCN, los experimentos se llevaron a cabo usando células precultivadas con una cantidad limitante de amonio (2 mM). El pH inicial del medio (9,5) disminuyó hasta 8,4 después de que la bacteria consumiese todo el amonio, alcanzando una absorbancia aproximada de 0,3 a 600 nm. En este punto, los cultivos aun contenían un exceso de fuente de carbono y otros nutrientes y, por lo tanto, la capacidad de asimilar una fuente

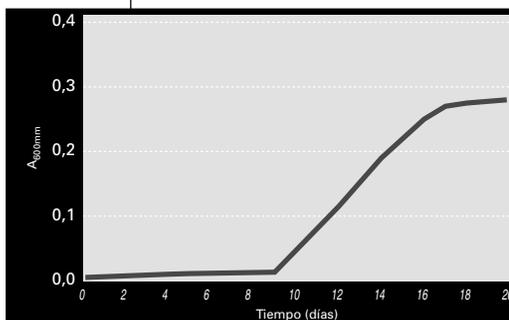
adicional de nitrógeno. En estas condiciones las células consumieron en tan sólo 5 horas una concentración de NaCN 1 mM (Gráfico 18). Además, hay que tener en cuenta que la adición de cianuro aumentó el pH del medio hasta 9,5. Ambos factores, un fuerte inóculo que acorta el tiempo empleado por las células para el consumir el cianuro y la alcalinidad del medio, probablemente contribuyeron a que la evaporación de cianuro en el experimento control (sin inocular) fuese nula (Gráfico 18).

Resistencia a cianuro y rendimientos celulares

En medio mínimo, *P. pseudoalcaligenes* toleró concentraciones hasta 20 mM de cianuro sódico (Gráfico 23), lo que puso de manifiesto la elevada resistencia de la bacteria a este tóxico. En estas condiciones, la fase de latencia fue de 10 días y el crecimiento máximo alcanzado $A_{600nm} = 0,29$. La adición de NaCN, el cual se encontraba preparado en NaOH, aumentó el pH inicial desde 9,5 hasta 11,5. El valor del pH en el momento en el que la bacteria comenzó a crecer fue de 9,7. Durante ese tiempo se evaporó una cantidad de cianuro correspondiente al 85% del inicial.

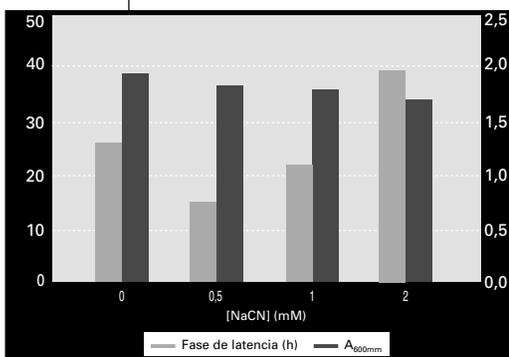
También se estudió la toxicidad del cianuro en medio rico, para

GRÁFICO 23 Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* en condiciones alcalinas con NaCN 20 mM



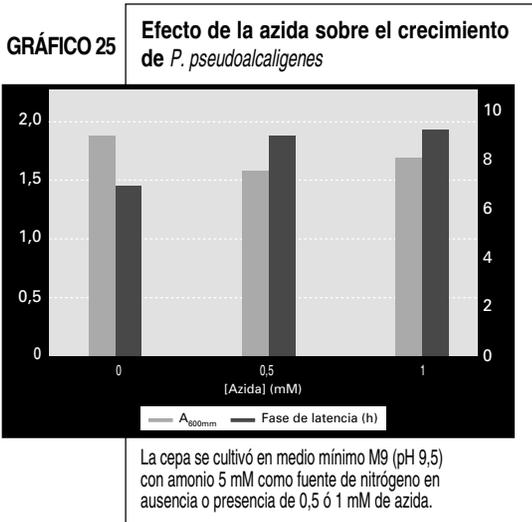
La bacteria se cultivó en medio mínimo M9 (pH 9,5) con acetato 50 mM y NaCN 20 mM.

GRÁFICO 24 Efecto del cianuro sobre el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en medio rico



La cepa CECT5344 se cultivó en medio rico LB a pH 9,5 en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de NaCN, determinándose en cada caso la duración de la fase de latencia y el crecimiento máximo alcanzado.

lo cual la bacteria se inoculó en LB en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de cianuro. El tiempo de latencia aumentó proporcionalmente a la cantidad de cianuro añadida (Gráfico 24). Por el contrario, la A_{600nm} alcanzada en la fase estacionaria disminuyó ligeramente conforme se aumentó la cantidad de cianuro.



La azida es un inhibidor metabólico que actúa, al igual que el cianuro, impidiendo el transporte de electrones de la cadena respiratoria. Ambos compuestos inhiben la transferencia de electrones al oxígeno mediada por la citocromo oxidasa. La diferencia entre ambos radica en que la azida, al no evaporarse, es más estable que el cianuro,

también es menos reactiva y no es una fuente de nitrógeno aprovechable por la bacteria objeto de estudio. Por tanto, para confirmar la presencia de una oxidasa terminal insensible tanto a cianuro como a azida, se realizaron experimentos encaminados a estudiar el efecto de la azida sobre el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes*. Con este objetivo la estirpe CECT5344 se cultivó en medio mínimo M9 (pH 9,5) con amonio 5 mM como fuente de nitrógeno en ausencia o presencia de azida, determinando a lo largo del tiempo el crecimiento celular. En el Gráfico 25 se representa la duración de la fase de latencia y el crecimiento máximo de la bacteria alcanzado en las condiciones descritas. Como se puede observar, la azida incrementó levemente la duración de la fase de latencia y apenas afectó al crecimiento máximo de la bacteria.

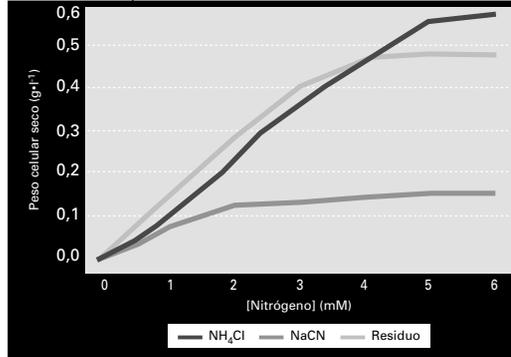
Con el fin de estudiar la eficiencia de la biodegradación, se compararon los rendimientos celulares con amonio, cianuro y el residuo de la joyería. Para ello, se representó la producción celular (mg de masa celular seca $\cdot ml^{-1}$) frente a la concentración de nitrógeno añadido (Gráfico 26). En el caso del residuo, sólo se tomó en cuenta el cianuro libre (la composición del residuo se detalla en *Materiales y Métodos*). La fuente de carbono se mantuvo constante (acetato 50 mM). En todos los casos se obtuvo una re-

lación lineal hasta una determinada concentración de nitrógeno que resulta saturante. Tanto para el amonio como para el cianuro libre del residuo esta concentración fue 5-6 mM, mientras que para el NaCN de 2 mM. Concentraciones mayores de amonio permanecieron en el medio de cultivo, mientras que el exceso de cianuro añadido desapareció, probablemente debido a evaporación en forma de HCN. La pendiente de las zonas lineales obtenidas en el Gráfico 26 constituyen una medida de los rendimientos celulares ($\text{mg peso seco} \cdot \mu\text{mol N}^{-1}$). Este valor fue de 0,13 para el amonio y el residuo, mientras que para el NaCN fue de 0,067, lo que sugiere que parte del cianuro se evapora.

Cuando las células se precultivaron con amonio 2 mM y posteriormente se adicionó NH_4Cl , NaCN o residuo, los tres a una misma concentración, el

GRÁFICO 26

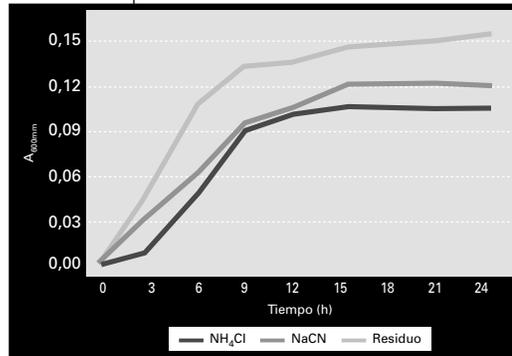
Rendimientos celulares de *P. pseudoalcaligenes* con diferentes fuentes de nitrógeno



Las células crecieron con la concentración indicada de amonio, NaCN y cianuro libre del residuo hasta la fase estacionaria. El peso seco celular estimado como se indica en Materiales y Métodos, se representó frente a la concentración de nitrógeno añadida inicialmente.

GRÁFICO 27

Comparación del crecimiento celular de *P. pseudoalcaligenes* con cianuro, amonio y residuo de la industria joyera



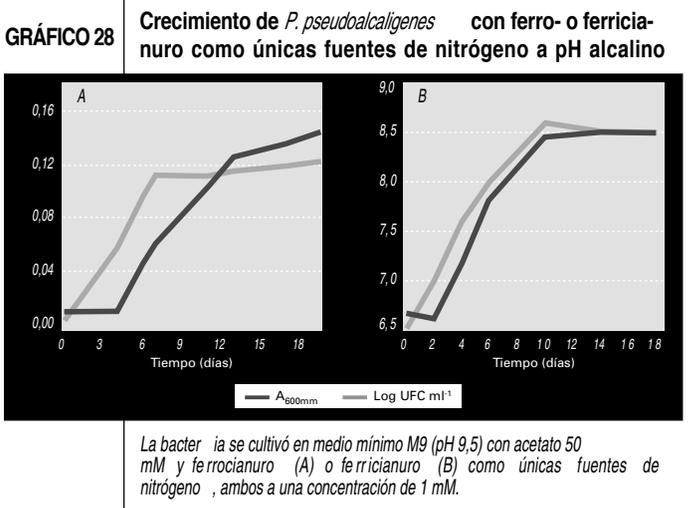
Las células se precultivaron en amonio 2 mM hasta la fase estacionaria ($A_{600\text{nm}} 0,3$). El cultivo se separó en 3 frascos y después de la adición de 1 mM de NaCN, 1 mM de NH_4Cl y residuo (cianuro libre 1 mM), se determinó el crecimiento celular. En un cultivo control al que no se le añadió fuente de nitrógeno la $A_{600\text{nm}}$ permaneció constante (no mostrado).

crecimiento celular obtenido, medido como incremento de la densidad óptica, con amonio y con cianuro fue el mismo, mientras que con el residuo la absorbancia a 600 nm fue mayor (Gráfico 27).

Degradación de complejos cianuro-metálicos

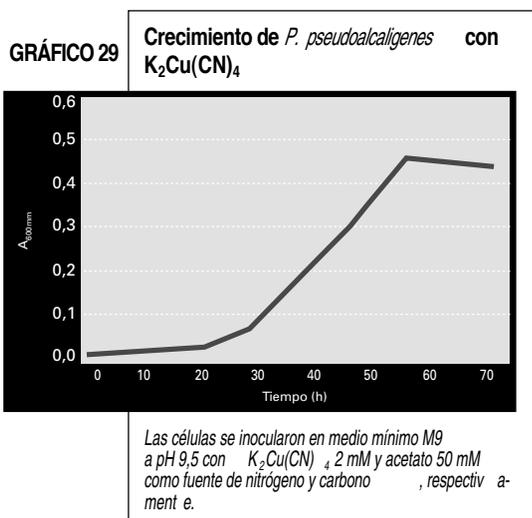
El cianuro se presenta en la naturaleza en una gran diversidad de formas, entre las que se encuentran los complejos cianuro-metálicos. Curiosamente, cuando *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 creció con el residuo de la joyería, el cual contiene una gran cantidad de este tipo de complejos, al final de la fase exponencial de crecimiento el cultivo adquirió un color rojizo como consecuencia de la aparición de un precipitado, identificado como hidróxido férrico. Esta observación sugiere que la estirpe CECT5344 es capaz de usar el cianuro de los complejos cianuro-hierro presentes en el residuo de la joyería, ya que la asimilación del cianuro de estos complejos provoca la aparición de hierro libre, el cual precipita a pH alcalino. Además, como se comentó anteriormente, el crecimiento de la bacteria con el residuo, teniendo sólo en cuenta el cianuro libre, fue mayor que con cantidades equivalentes de NH_4Cl o NaCN , lo que corrobora esta hipótesis (Gráfico 27).

Para confirmar la utilización de complejos por la bacteria se investigó la degradación de varios complejos cianuro-metálicos por *P. pseudoalcaligenes*. Esta bacteria fue capaz de utilizar como fuente de nitrógeno los complejos cianurados de Fe(II) y Fe(III), tanto a pH 9,5 (Gráfico 28) como a pH



7,5 (resultados no mostrados). Aunque en ambos casos el crecimiento alcanzado fue muy escaso ($\Delta A_{600\text{nm}} = 0,15$), el aumento del número de unidades formadoras de colonias indicó que éste es significativo. Otro complejo de hierro utilizado como fuente de nitrógeno por esta bacteria es el ferrocianuro férrico ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) (Gráfico 31).

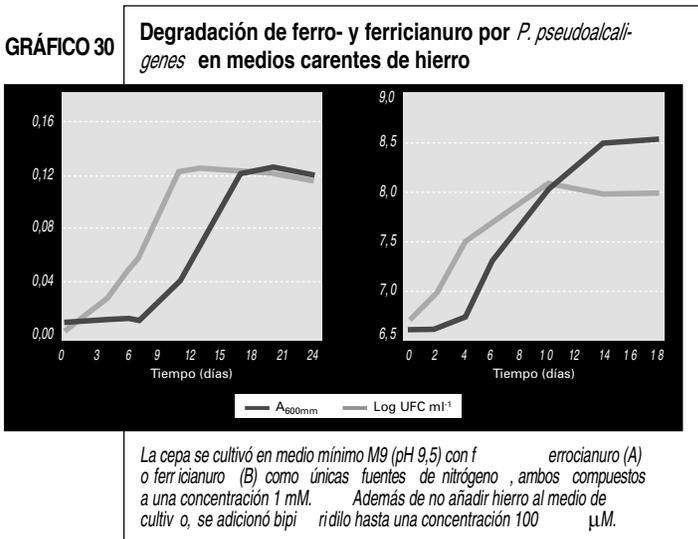
El complejo ($[\text{Cu}(\text{CN})_4]^{2-}$), de menor estabilidad que los formados por el hierro, también sustentó el crecimiento de la estirpe CECT5344 (Gráfico 29). La bacteria toleró e incluso creció a concentraciones hasta 10 mM de este complejo, lo que supone una concentración de cianuro 40 mM. Sin embargo, el crecimiento no fue tan elevado como el obtenido con cantidades equivalentes de amonio.



Producción de sideróforos

La formación de complejos extremadamente estables entre el cianuro y el hierro limita en gran medida la biodisponibilidad de este metal. Por lo tanto, aquellos microorganismos capaces de crecer en presencia de cianuro, y en consecuencia condiciones limitantes de hierro, deben desarrollar un sistema con una elevada afinidad por el metal. Este es el caso de los sideróforos, moléculas de baja masa molecular y elevada afinidad por el hierro producidas por algunos microorganismos en condiciones limitantes de hierro (Andrews *et al.* 2003; Faraldo-Gómez y Sansom, 2003).

Como se mostró anteriormente, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 fue capaz de crecer en medios con NaCN hasta 20 mM, condiciones en las que claramente existe una limitación de hierro. Además, esta bacteria también creció en medios con ferro- o ferricianuro a los que no se adicionó ninguna otra fuente de hierro (resultados no mostrados). Ante la imposibilidad de obtener un medio completamente libre de hierro, debido fundamentalmente a su presencia en cantidades traza en cualquier solución acuosa, se suplementaron los medios con bipyridilo, un potente quelante de hierro. Aun en estas condiciones, la estirpe CECT5344 creció con ferro- o ferricianuro como únicas fuentes de nitrógeno e hierro (Gráfico 30). Respecto a los medios con hierro (Gráfico 28), la presencia de bipyridilo aumentó la fase de latencia en aproximadamente 2 horas, alcanzándose en todos los casos el mismo crecimiento.

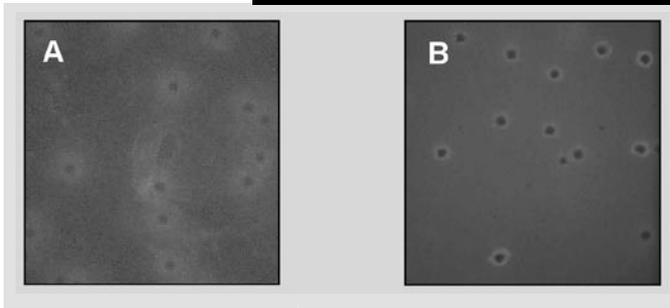


Como se comentó en el apartado anterior, la estirpe CECT5344 creció con el complejo ferrocianuro férrico como única fuente de hierro y nitrógeno. Es evidente que el crecimiento en presencia de este complejo ($K_d = 10^{-52}$ M), requiere la síntesis por parte del microorganismo de uno o varios sideróforos con una afinidad extremadamente elevada por el hierro. La decoloración producida alrededor de las colonias sugiere que la liberación al medio de un sideróforo por parte de la bacteria origina una rotura del complejo azul (Gráfico 31A). Para confirmar la capacidad de la estirpe CECT5344 de sintetizar sideróforos, se utilizó un medio de cultivo específico para la detección de este tipo de compuestos. El ensayo se basa en una competición por el hierro entre el complejo férrico de un

colorante indicador, el cromo azulol S (CAS), y un quelante o sideróforo producido por el microorganismo. Cuando el hierro es eliminado del CAS por el sideróforo, que debe tener una mayor afinidad por el hierro (III), el indicador cambia de color, normalmente de azul a naranja. Estas placas fueron sembradas con células precultivadas con amonio 5 mM, las cuales se recogieron en fase exponencial y se lavaron en medio M9 (sin carbono ni nitrógeno). Para obtener colonias aisladas se realizaron varias diluciones seriadas. Como se puede observar en el Gráfico 31B, las colonias formaron a su alrededor un halo decolorado debido a la eliminación del hierro del complejo verde.

GRÁFICO 31

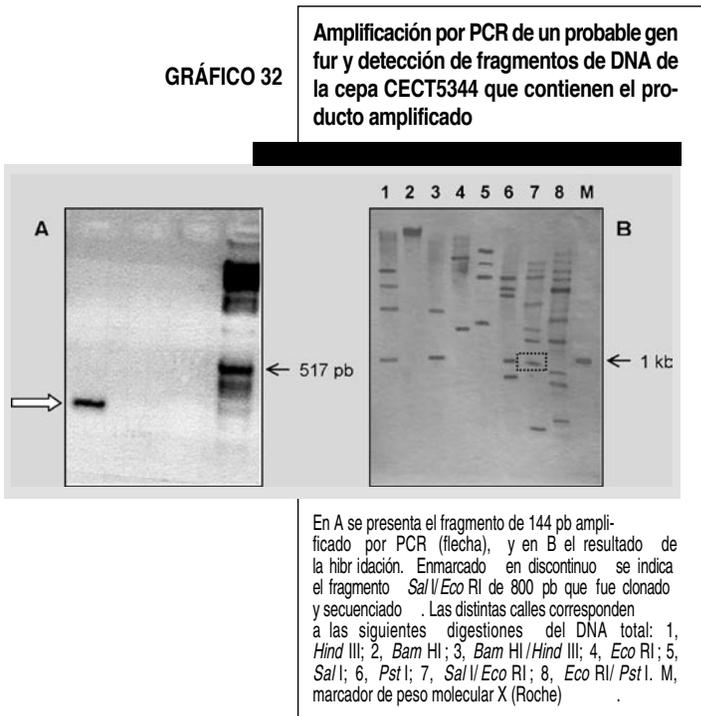
Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* con ferrocianuro férrico como única fuente de nitrógeno e hierro (A) y en medio CAS (B)



Las placas, preparadas según se describe en *Materiales y Métodos*, fueron sembradas con varias diluciones seriadas de una suspensión celular preparada a partir de un cultivo que contenía amonio 5 mM como fuente de nitrógeno.

Fur (**F**erric **u**ptake **r**egulator) es una proteína ampliamente distribuida entre bacterias que actúa como un regulador central del metabolismo del hierro. Uno de los procesos sobre los que actúa es la síntesis de sideróforos, por lo que se consideró de gran interés la búsqueda de una proteína similar en *P. pseudoalcaligenes*. Para ello se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de la secuencia consenso obtenida del alineamiento de las proteínas Fur de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. stutzeri*. La utilización de estos cebadores, denominados fur1F y fur2R, y cuya secuencia se presenta en el Gráfico 9 de *Materiales y Métodos*, dio lugar a la amplificación de un fragmento de DNA de aproximadamente 144 pb (Gráfico 32A), que coincidió con el tamaño esperado. Este fragmento se marcó con digoxigenina, según se describe en *Materiales y Métodos*, y se utilizó como sonda en una hibridación con el DNA total de la estirpe

CECT5344 digerido con diferentes enzimas de restricción. El resultado de la hibridación, mostrado en el Gráfico 32B, reveló un gran número de fragmentos de distintos tamaños. Los fragmentos obtenidos con las enzimas *SalI/EcoRI*, *PstI* y *EcoRI/PstI* se ligaron en el plásmido pBluescriptII K-S. Después de transformar la estirpe DH5 α de *E. coli* con la ligación y transferir las colonias blancas a placas de LB, se llevó a cabo una hibridación en colonia utilizando como sonda el fragmento obtenido por PCR. Esta hibridación dio como positivo un clon que portaba un fragmento *SalI/EcoRI* de aprox. 800 pb.



La secuenciación, análisis y comparación con las bases de datos del fragmento seleccionado reveló que el péptido codificado por dicho fragmento presentaba homología (68% de identidad) con un receptor de ferrisideróforos tipo hidroxamato, de *P. aeruginosa* (FiuA), y no con la proteína Fur para la cual fueron diseñados los oligonucleótidos (Gráfico 33). Esto podría explicarse teniendo en cuenta que Fur es una proteína que posee una secuencia interna conservada de unión a hierro. Probablemente, y debido a que el diseño de los oligonucleótidos utilizados para la detección de Fur se llevó a cabo a partir de zonas conservadas de su secuencia, el producto de PCR obtenido contenía el sitio de unión a hierro. Por lo tanto,

cuando este producto de PCR se utilizó como sonda, hibridó no sólo con fur, sino también con otros genes regulados directamente por este metal, como es el caso del gen *fiuA*, y que también poseen la secuencia de unión a hierro. En este sentido, el elevado número de bandas obtenido en la hibridación con el producto de PCR apoya esta hipótesis.

GRÁFICO 33

Alineamiento de un fragmento de *FiuA* de *P. pseudoalcaligenes* con *FiuA* de *P. Aeruginosa*

<i>P. ae</i> 6	GG-----L P D V T V T I A S E Q A A E T A N G P T R G Y L A N R T A T G T K T D T P L E T	65
<i>P. ps</i> 100	GGT Y S L R K V P E D T L S L Q A M T V S G A E --- E D P L G P T S G Y V A K R S M T G T K T D T P L E T	156
<i>P. ae</i> 66	PR S I S V A T R E Q M Q D R K V Q N L D D A V R Y M P G V I A S S Y G S D S R A D W M K I R G F E P I Q M L D	125
<i>P. ps</i> 157	PR S I S V A T R Q Q M T D R A V H N L D D A V R Y M P G V V A S S F G S D S R S D W L K V R G F K P T Q F L D	216
<i>P. ae</i> 126	GL P L P K G S Y T M A K L E T W N L E R V A V L R G P A S A V Y G Q T P P G G L V D A V S R R P Q T E S S H E	185
<i>P. ps</i> 217	GL P M A V G V Y N N P K L E T W N L E R V A L L R G P A S S V Y G Q T P P G G M L D M V S L R P Q N V A S H E	276
<i>P. ae</i> 186	H Q V I V G N Y N H K Q I S F D S T G K I D D G R F L Y R F S G T G R D S G T T V E H I D D Q R F N L A P S L	245
<i>P. ps</i> 277	V K A E V G N Y N H K Q V S F D S T G P L D D E G R F L Y R V S G V V R D S N T Q V D H I D D K R Y N L A P S L	336
<i>P. ae</i> 246	T W Q F N I A D T T K L T F L G N R D D T G G T S Q F L P L Q G T K	263
<i>P. ps</i> 337	T W N I D D T R L T F L G Q F N R D D T G I T S Q F L P L R G T K	354

El alineamiento se realizó utilizando el programa BLAST (*Materiales y Métodos*). Los aminoácidos idénticos se señalan en claro, mientras que los cambios conservativos se indican en oscuro. La secuencia correspondiente a *P. pseudoalcaligenes* (*P. ps*) se presenta en negra.

Ruta de degradación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes*

La elucidación de la ruta de degradación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se abordó mediante varias aproximaciones: 1) estudio de la utilización, como fuentes de nitrógeno, de posibles intermediarios en la degradación de cianuro, 2) determinación de actividades enzimáticas involucradas en el metabolismo del cianuro en otros microorganismos, y 3) análisis de metabolitos acumulados en el sobrenadante de los cultivos.

Utilización de posibles intermediarios como fuentes de nitrógeno

Normalmente, la participación como intermediario de un compuesto en una ruta catabólica implica que éste también puede ser utilizado como sustrato. Sin embargo, factores como la toxicidad o la imposibilidad de ser transportado al interior celular por transportadores específicos podrían impedir su utilización.

CUADRO 13

Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* con posibles intermediarios de la degradación de cianuro como fuentes de nitrógeno

Intermediario ^a	Crecimiento ^b
Formamida	-
Cianato	+
Tiocianato	-
β -cianoalanina	+
Cianhidrinas	
α -cetoglutarato-CN	+
Piruvato-CN	+

a. Los distintos intermediarios se utilizaron a una concentración 2 mM.

b. El signo “-” indica que no hubo crecimiento, y el signo “+” que hubo un incremento de la absorbancia a 600 nm por encima de 0,3.

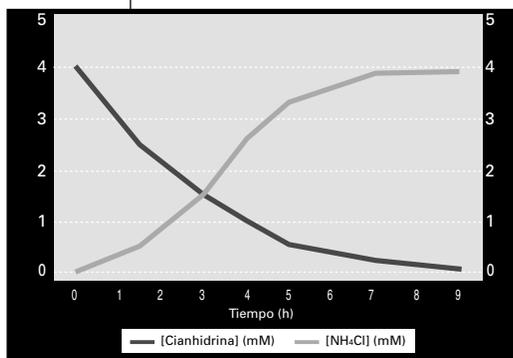
Fuente: Elaboración propia.

De todos los compuestos descritos como intermediarios en la degradación de cianuro (formamida, tiocianato, cianato y β -cianoalanina) (Ebbs, 2004), *P. pseudoalcaligenes* sólo creció con cianato o β -cianoalanina como únicas fuentes de nitrógeno en medio mínimo (pH 9,5) (Cuadro 13). Además, el ácido fórmico, un compuesto producido en las rutas hidrolíticas de degradación de cianuro, no constituyó una fuente de carbono utilizable por esta bacteria.

Si bien los intermediarios más comunes de la degradación de cianuro son los mencionados anteriormente, Kunz y colaboradores también propusieron la participación de cianhidrinas, nitrilos de cetoácidos, en la asimilación de cianuro (Kunz *et al.*, 1998). En el caso de *P. pseudoalcaligenes*, suspensiones celulares concentradas degradaron en condiciones alcalinas las cianhidrinas tanto del 2-oxoglutarato como del piruvato. Tan solo en presencia del inhibidor MSX, las células produjeron amonio de forma estequiométrica al consumir las cianhidrinas, lo que indica que estos compuestos son utilizados como fuente de nitrógeno (Gráfico 34).

GRÁFICO 34

Consumo de la cianhidrina del 2-oxoglutarato y producción de amonio por *P. pseudoalcaligenes* en presencia de MSX



Suspensiones celulares concentradas de la estirpe CECT5344 fueron incubadas con la cianhidrina en el 2-oxoglutarato (4 mM) como única fuente de nitrógeno a pH 9,5. El cultivo se reparó en dos alícuotas, añadiendo a una de ellas MSX 1,5 mM. La descomposición química de la cianhidrina fue despreciable (no mostrado).

Determinación de actividades enzimáticas

Como se describió en la *Introducción* de este trabajo, existe un gran número de enzimas involucradas en la degradación de cianuro. Con el fin de elucidar la ruta de degradación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, se ensayaron todas estas actividades enzimáticas en extractos acelulares obtenidos a partir de células cultivadas con cianuro. Como controles se utilizaron células cultivadas con amonio.

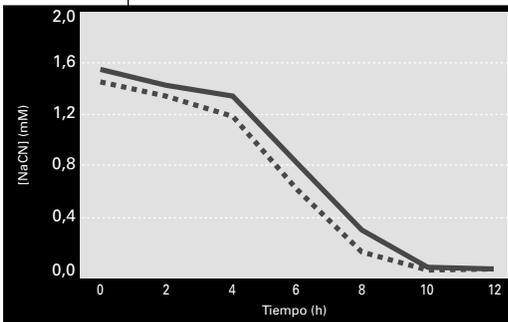
P. pseudoalcaligenes no presentó actividad cianuro hidratasa, enzima que cataliza la hidratación del cianuro para producir formamida. Además, este intermediario no fue sustrato para una posible amidasa (Gráfico 8). De igual forma, extractos acelulares de la estirpe CECT5344 no produjeron amonio ni ácido fórmico a partir de cianuro, reacción catalizada por la enzima cianidasa.

Otro tipo de rutas implicadas en la asimilación de cianuro se basan en mecanismos oxidativos, generando como productos amonio y dióxido de carbono en una reacción catalizada por la enzima cianuro dioxigenasa. En el caso de *P. pseudoalcaligenes*, extractos acelulares de células cultivadas con cianuro no mostraron esta actividad. Dentro de este tipo de rutas,

algunos autores han propuesto el cianato como un posible intermediario, compuesto que se origina por la acción de una cianuro monooxigenasa. La acción posterior de una cianasa produce amonio y CO_2 , y ambas enzimas, monooxigenasa y cianasa, podrían constituir una ruta para la conversión de cianuro en amonio. Sólo extractos acelulares obtenidos a partir de células tratadas con sucesivas adiciones de NaCN 1 mM mostraron un consumo de NADH dependiente de cianuro. Sin embargo, no se detectó amonio como producto de la reacción. El hecho de que no se detecte una actividad cianuro monooxigenasa no quiere decir que no exista, ya que cabe la posibilidad de que las condiciones de ensayo no sean las apropiadas, puede ser necesario un cofactor no añadido, etc. Por lo tanto, se ensayó la siguiente enzima de la posible ruta, la cianasa. El resultado obtenido fue que células cultivadas con NaCN , aunque no con amonio o nitrato, presentaron una elevada actividad cianasa (más de $900 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$). Las células cultivadas con el complejo $[\text{Cu}(\text{CN})_4]^{2-}$ como única fuente de nitrógeno, fueron las que presentaron la máxima actividad cianasa ($10.000 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$). Sin embargo, la inducción de esta actividad no fue exclusiva de medios con cianuro, sino que también se detectó en células cultivadas con urea e incluso en medios carentes de nitrógeno, aunque su actividad específica fue mucho menor.

GRÁFICO 35

Consumo de NaCN por las estirpes silvestres y mutante *cynS*⁻ de *P. pseudoalcaligenes*



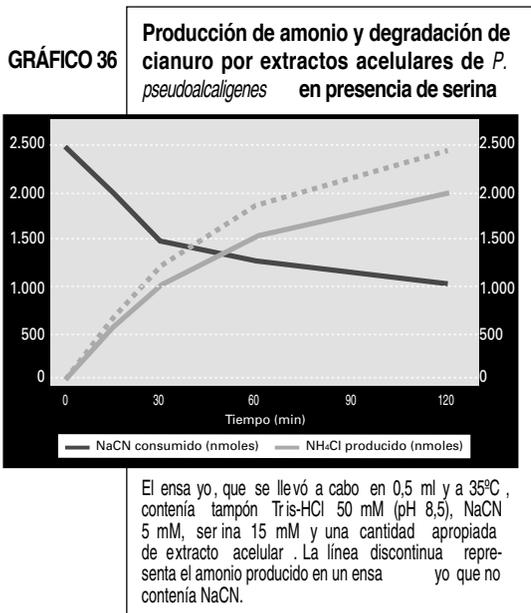
A un cultivo de células de la estirpe silvestre (línea continua) y del mutante *cynS*⁻ (línea discontinua) precultivadas en medio mínimo con amonio 2 mM durante 24 h se les adicionó NaCN 2 mM, determinándose la concentración de cianuro libre a los tiempos indicados.

La generación de un mutante en el gen que codifica la cianasa fue una herramienta clave para comprobar si el cianato es o no un intermediario en la degradación de cianuro. El mutante *cynS*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* presentó una cinética de consumo similar a la estirpe silvestre (Gráfico 35), lo que indica claramente que la cianasa no es una enzima indispensable en la degradación de cianuro.

Algunos microorganismos poseen rutas de degradación de cianuro basadas en reacciones de sustitución/adición. Entre éstas se encuentra la formación y posterior degradación de tiocianato mediante la acción

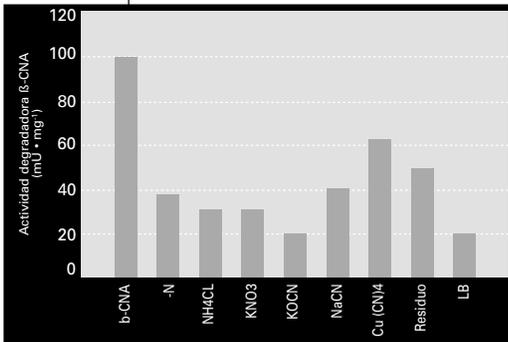
consecutiva de la rodanasa y la tiocianato hidrolasa. Extractos acelulares de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 no mostraron ninguna de estas dos actividades. Dentro de este tipo de rutas también se puede encontrar la β -cianoalanina sintasa (β -CAS), enzima que cataliza la síntesis de β -cianoalanina a partir de cianuro y los aminoácidos serina o cisteína. En extractos crudos, la β -cianoalanina puede ser transformada en asparragina y amonio por acción de una nitrilasa (hidratasa e hidrolasa a la vez), o de la acción consecutiva de una hidratasa (que formaría asparragina) y de una hidratasa. Extractos acelulares de *P. pseudoalcaligenes* obtenidos a partir de células cultivadas con cianuro, amonio, nitrato o el residuo de la joyería catalizaron la formación de amonio y la desaparición de cianuro en presencia de serina o de su derivado O-acetil-serina. La posible actividad β -CAS se inhibió por concentraciones de cianuro superiores a 10 mM, y la reacción no transcurrió en controles a los que se añadió extracto hervido, confirmando el carácter enzimático de la reacción. Sin embargo, un control sin KCN reveló que la aparición de amonio era independiente de la presencia de cianuro. En este control, el amonio producido fue mayor (2,5 μ moles/0,5 ml ensayo) que en el mismo ensayo con KCN 2 mM (2 μ mol/0,5 ml ensayo). Además, el estudio de la estequiometría en este último ensayo reveló que el amonio producido fue mayor que el cianuro desaparecido (Gráfico 36). Por lo tanto, la mayoría del amonio producido parece provenir de la serina, lo que podría ser debido a la acción de una actividad serina deshidratasa, que cataliza la formación de piruvato y amonio a partir de serina.

De hecho, la adición de L-cisteína y L-homoserina, dos análogos de la serina, hasta una concentración 30 mM, inhibieron completamente la aparición de amonio, tanto en presencia como en ausencia de cianuro. Estos resultados parecen indicar que la serina es transformada en amonio y piruvato por una actividad serina deshidratasa. El piruvato formado



reacciona con el cianuro formándose la correspondiente cianhidrina, que podría metabolizarse posteriormente, ya que la cianhidrina del piruvato es asimilable por la bacteria (Cuadro 13). Por lo tanto, se trataba de una actividad enzimática que se caracterizó en su conjunto midiendo la cantidad de amonio formado. En presencia de KCN 2 mM, y teniendo en cuenta el amonio total producido, esta actividad enzimática presentó un pH y temperatura óptimos de 8,5 y 35 °C respectivamente (resultados no mostrados).

GRÁFICO 37
Actividad degradadora de β -cianoalanina en *P. pseudoalcaligenes* cultivada con distintas fuentes de nitrógeno



La actividad se determinó en extractos acelulares obtenidos de células cultivadas en medio mínimo sin nitrógeno, con β -cianoalanina 2 mM (β -CNA), NH₄Cl 5 mM, KNO₃ 5 mM, KOCN 5 mM, NaCN 2 mM, K₂Cu(CN)₄ 2 mM, residuo 4 mM y en LB. En todos los casos las células se recogieron en fase exponencial.

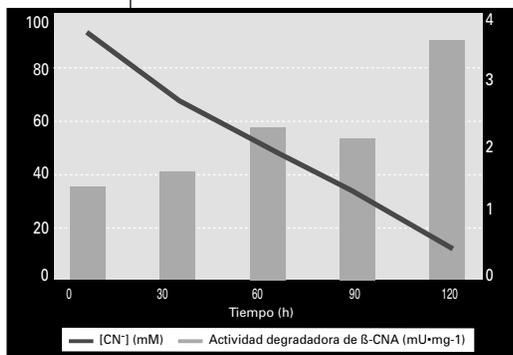
A pesar de que no se detectó actividad β -CAS, quizá debido a la interferencia de la serina deshidratasa, y puesto que la bacteria fue capaz de utilizar β -cianoalanina como única fuente de nitrógeno (Cuadro 16), se procedió a la búsqueda de una posible actividad enzimática degradadora de β -cianoalanina, a la que denominaremos nitrilasa. Dicha actividad, medida como formación de amonio a partir de β -

cianoalanina, se detectó en extractos acelulares obtenidos a partir de células cultivadas con cianuro, pero también estuvo presente tanto en extractos procedentes de células cultivadas en medio mínimo, independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada, como en medio rico (Gráfico 37). La mayor actividad degradadora de β -cianoalanina se detectó en células cultivadas con el sustrato (100 U·g⁻¹), si bien los cultivos con el complejo Cu(CN)₄²⁻ y con el residuo también alcanzaron una actividad relativamente elevada. En el resto, la actividad fue similar y del orden de 20-30 U·g⁻¹. El aminoácido L-alanina no fue sustrato de esta actividad.

Cuando la actividad degradadora de β -cianoalanina se determinó en células cultivadas con el residuo cianurado como única fuente de nitrógeno, dicha actividad aumentó a lo largo del tiempo de forma simultánea al consumo de cianuro libre (Gráfico 38).

GRÁFICO 38

Actividad degradadora de β -cianalaina y consumo de cianuro en células cultivadas con el residuo



A células precultivadas con amonio 2 mM durante 24 h se les añadió hasta 4 mM de cianuro del residuo (t=0) como fuente de nitrógeno adicional. A lo largo del tiempo se determinó tanto la concentración de cianuro libre como la actividad degradadora de β -cianoalanina.

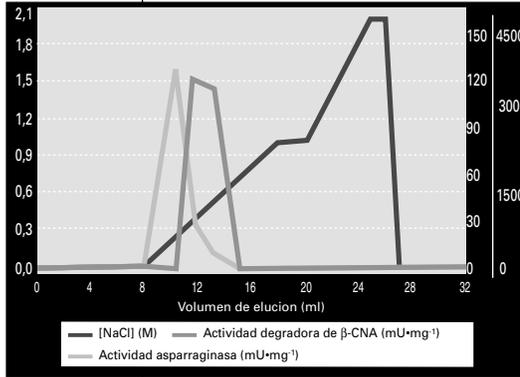
La β -cianoalanina es un nitrilo, por lo que su degradación puede estar mediada por una nitrilasa o por la acción consecutiva de una nitrilo hidratasa y una amidasa. La monohidratación de la β -cianoalanina generaría asparragina, por lo que en este caso la amidasa se correspondería con la asparraginasa. Esta última actividad, que se determinó en extractos acelulares obtenidos a partir de células cultivadas con amonio, cianuro, cianato o el residuo cianurado, presentó siempre un valor similar (aprox. 200 U·g⁻¹). Con el objetivo de conocer el mecanismo de degradación de la β -cianoalanina en la estirpe CECT5344, un extracto acelular con actividad degradadora de β -cianoalanina y asparraginasa se sometió a una cromatografía de intercambio iónico, midiéndose posteriormente en las distintas fracciones obtenidas ambas actividades. Las dos actividades enzimáticas aparecieron muy juntas, aunque sus actividades máximas se detectaron en volúmenes de elución distintos (Gráfico 39).

También se detectó actividad asparraginasa en todas las fracciones donde se encontró actividad degradadora de β -CNA. A continuación se mezclaron las fracciones que contenían ambas actividades y se volvieron a someter a una cromatografía de intercambio iónico, aunque esta vez utilizando un gradiente de NaCl más suave y, por lo tanto, más resolutivo. En esta ocasión el perfil de las dos actividades coincidió completamente, presentando un máximo de actividad en el mismo volumen de elución (resultados no mostrados). Por último, las fracciones con actividad se

mezclaron y se trataron con sulfato amónico. Ninguna de las actividades precipitó tras la adición de sulfato amónico al 30%, mientras que al 60% precipitaron las dos.

GRÁFICO 39

Separación de las actividades asparraginasas y degradadora de β -cianoalanina mediante cromatografía de intercambio iónico



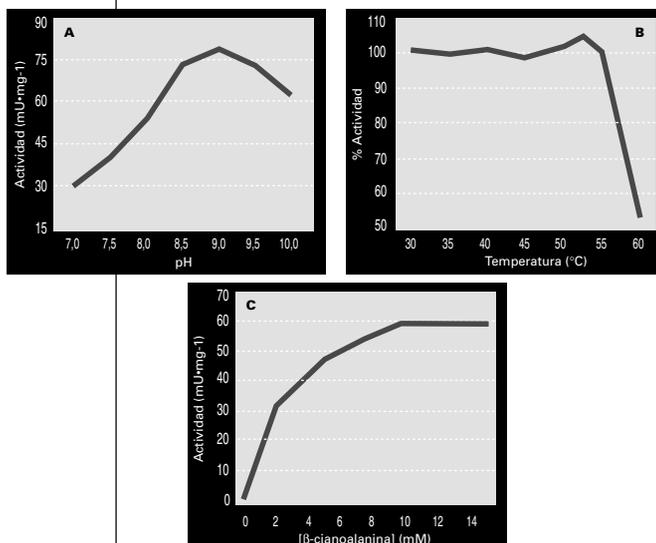
La cromatografía se llevó a cabo en una columna Mono Q HR 5/5 (Phar macia) acoplada a un FPLC . El tampón de trabajo fue Tris-HCl 50 mM y el flujo utilizado 0,5 ml·min⁻¹. Se recogieron fracciones de 1 ml en las que se deter minó la actividad asparraginasas y la actividad degradadora de β -CNA. El lavado de las proteínas retenidas en la columna se llevó a cabo con NaCl a las concentraciones indicadas en la figura.

La actividad degradadora de β -cianoalanina presentó una actividad máxima a pH 9 y una K_M aparente de 2 mM (Gráficos 40A y B). Además, la incubación del extracto que contenía la enzima a distintas temperaturas reveló que dicha enzima es termoestable (Gráfico 40C).

El efecto del EDTA en la actividad se determinó incubando el extracto con el quelante (100 mM), y ensayando posteriormente la actividad, o añadiéndolo directamente a la mezcla de reacción a una concentración hasta 20 mM. En el primer caso la actividad disminuyó sólo un 0,5%, mientras que en el segundo un 20%. Otros nitrilos utilizados como sustratos por extractos acelulares de la estirpe CECT5344 fueron el benzonitrilo y el crotonitrilo, aunque las actividades que presentaron células cultivadas con NaCN como única fuente de nitrógeno fue tan solo de 1 mU·mg⁻¹.

GRÁFICO 40

Efectos del pH, la temperatura y la concentración de sustrato en la actividad degradadora de β -cianoalanina



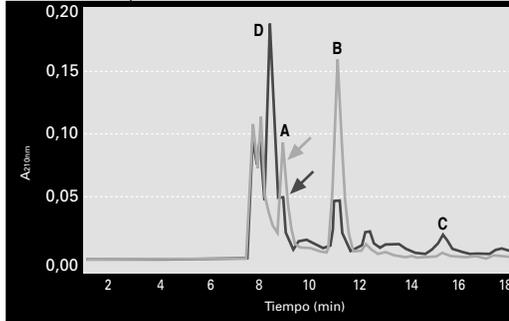
(A) La actividad, ensayada según se describe en *Materiales y Métodos*, se determinó a distintos pH y utilizando una mezcla de 3 tampones. (B) La actividad se midió a pH óptimo con diferentes concentraciones de sustrato. En (C) el extracto se incubó durante 30 min a diferentes temperaturas, determinándose posteriormente la actividad en condiciones óptimas de pH y temperatura.

Como se indicó anteriormente, las cianhidras son nitrilos orgánicos propuestos por algunos autores como intermediarios de la asimilación de cianuro (Kunz *et al.*, 1998). En *P. pseudoalcaligenes*, ensayos *in vitro* con extractos acelulares obtenidos a partir de células cultivadas con NaCN como única fuente de nitrógeno presentaron una actividad enzimática capaz de degradar la cianhidrina del 2-oxoglutarato (Gráfico 41). Además, y a diferencia del control (con extracto hervido), al final del ensayo se detectó amoníaco en la mezcla de reacción. La adición de NADH 2 mM o tetrahidrobiopterina 160 μ M no afectó a la actividad. Cuando los mismos extractos acelulares en los que se detectó esta actividad fueron dializados en una columna de exclusión molecular PD-10, la actividad desapareció completamente.

El 2-oxoglutarato presente inicialmente en el ensayo procedió de la síntesis química de la cianhidrina, donde se utilizó un exceso de 2-oxoglutarato. Como se observa en el cromatograma, gran parte del 2-oxoglutarato desapareció durante el ensayo, transformándose en el compuesto D (TR=8,43 min), según indicó un control que contenía únicamente 2-oxoglutarato. El análisis de la mezcla de reacción tras el período de incubación también reveló el incremento del compuesto C (TR=15,03 min), con respecto al ensayo control.

GRÁFICO 41

Transformación de la cianhidrina del 2-oxoglutarato por un extrato acelular de *P. pseudoalcaligenes*



El ensayo se llevó a cabo a 35 °C en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,5). La mezcla de reacción contenía cianhidrina 4 mM y extracto acelular. El desarrollo de la reacción se hizo inyectando la mezcla en el HPLC tal y como se detalla en *Materiales y Métodos*. La línea clara representa el cromatograma a tiempo cero y la línea oscura el obtenido al transcurrir 1,5 h. A, cianhidrina; B, 2-oxoglutarato. Los compuestos C y D no se identificaron.

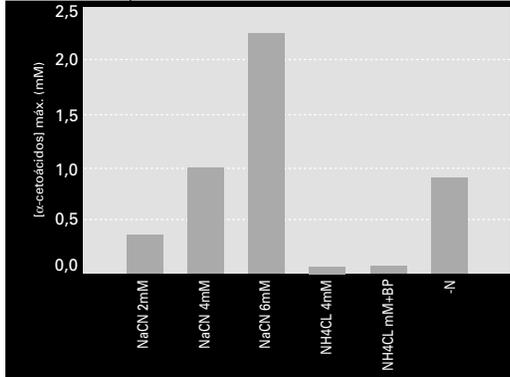
Análisis de metabolitos

Determinación de α -cetoácidos

Los α -cetoácidos fueron propuestos inicialmente como elementos esenciales en la degradación de cianuro en una especie del mismo género que la estirpe CECT5344, *P. fluorescens*. Esto condujo a determinar la posible presencia de este tipo de compuestos durante la degradación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes*. La determinación de α -cetoácidos totales se llevó a cabo en sobrenadantes libres de células obtenidos de suspensiones celulares concentradas a las que se les añadió NaCN o NH_4Cl . Como control se utilizó un cultivo sin ninguna fuente de nitrógeno. El bipyridilo se utilizó para simular condiciones limitantes de hierro y estudiar la posible inducción de la liberación de α -cetoácidos, compuestos con capacidad de quelar metales, bajo estas condiciones. Como se observa en el Gráfico 42, la bacteria produjo α -cetoácidos en medios carentes de nitrógeno, así como en presencia de cianuro. En este último caso la producción de α -cetoácidos fue proporcional a la concentración de cianuro añadida al medio. Por el contrario, en medios con amonio, tanto en presencia como ausencia de bipyridilo, no se detectaron este tipo de compuestos.

GRÁFICO 42

Acumulación de α -cetoácidos en el medio de cultivo en respuesta a distintas condiciones

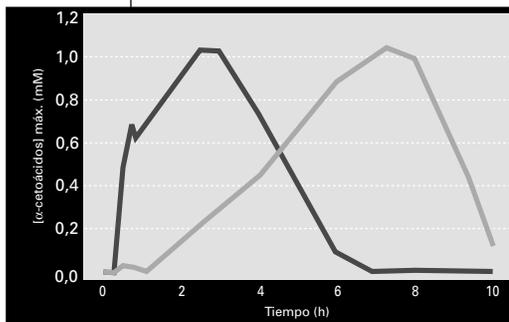


Células cultivadas en amonio se concentraron hasta una A_{600nm} 1,5, añadiéndose posteriormente cianuro, amonio o ninguna otra fuente de nitrógeno. El 2,2'-dipiridilo (BP), un quelante de hierro, se utilizó a una concentración de 300 μ M.

La presencia de pequeñas concentraciones de cianuro como única fuente de nitrógeno puede considerarse condiciones limitantes de nitrógeno, por lo que la producción de α -cetoácidos en estas circunstancias podría deberse a la ausencia de nitrógeno. Para confirmar o rechazar esta hipótesis se determinó la producción de estos compuestos a lo largo del crecimiento de la bacteria en ambas condiciones (Gráfico 43). Curiosamente, a pesar de que en los dos casos la concentración máxima de α -cetoácidos fue similar (1 mM), la respuesta al cianuro fue mucho más rápida que la ocasionada por la ausencia de nitrógeno, alcanzándose la máxima concentración a las 2 y las 8 h, respectivamente. En este punto hay que tener en cuenta que

GRÁFICO 43

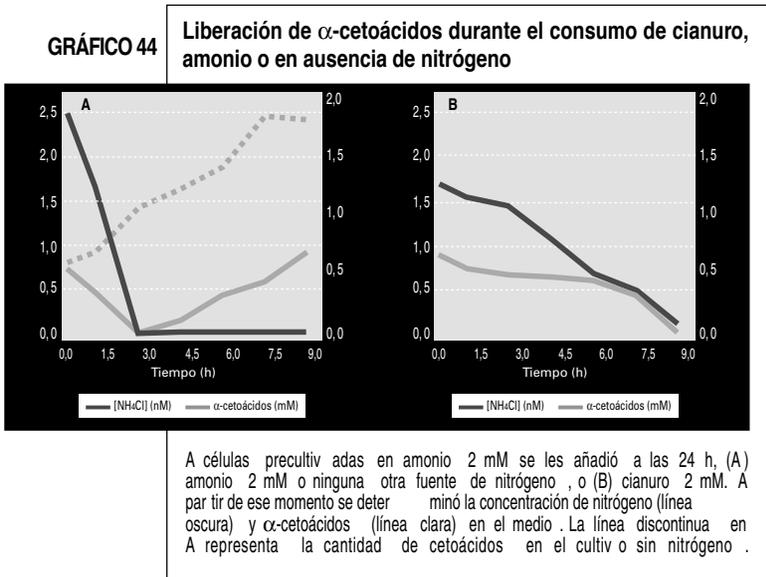
Liberación de α -cetoácidos durante el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* con cianuro o en carencia de nitrógeno



Células cultivadas en amonio se concentraron hasta una A_{600nm} 1,5, añadiéndose posteriormente NaCN 4 mM (línea oscura) o ninguna otra fuente de nitrógeno (línea clara). En los dos casos se añadió acetato 50 mM.

las rectas de calibrado obtenidas con diferentes α -cetoácidos (piruvato, 2-oxoglutarato y oxalato) mediante el método de la fenilhidrazina presentaron el mismo coeficiente de extinción molar, lo que permitió cuantificar de manera absoluta los α -cetoácidos totales.

Además de la determinación de α -cetoácidos en cultivos con suspensiones celulares concentradas, ésta también se llevó a cabo utilizando células precultivadas con amonio 2 mM durante 24 h, a las que se les añadió posteriormente cianuro, amonio o ninguna otra fuente de nitrógeno (Gráfico 44). En los tres casos la concentración inicial de α -cetoácidos fue 0,8 mM. En el cultivo al que se añadió amonio, y de forma paralela a la asimilación del mismo, se produjo también el consumo de α -cetoácidos, los cuales volvieron a acumularse justo en el momento en el que el amonio fue totalmente consumido. La adición de cianuro no produjo la disminución inmediata de α -cetoácidos, sino que éstos permanecieron a una concentración constante durante 6 h. Transcurrido este tiempo, la concentración de cetoácidos comenzó a disminuir y a las 8 h se agotaron simultáneamente el cianuro y los cetoácidos. Finalmente, en ausencia de nitrógeno la bacteria continuó produciendo α -cetoácidos hasta 7 h después, momento en el que se alcanzó la máxima concentración (1,8 mM).

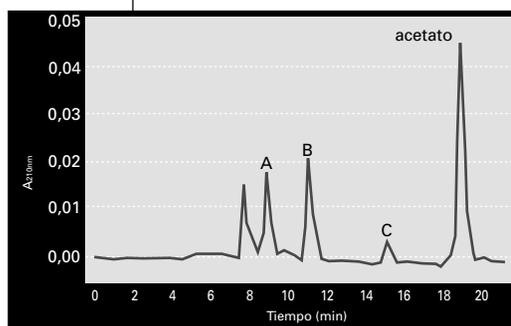


Análisis de metabolitos mediante HPLC

Tras detectar la producción de α -cetoácidos por *P. pseudoalcaligenes* en medios con cianuro, se procedió a identificar mediante HPLC la naturaleza de estos compuestos. Para ello, a células precultivadas en medio mínimo con NH_4Cl 2 mM se les añadió NaCN o NH_4Cl hasta una concentración 5 mM, y cuando la bacteria se encontraba consumiendo activamente estos dos compuestos nitrogenados, los cultivos se recogieron para analizar los sobrenadantes. El cromatograma típico obtenido tras el análisis por HPLC de un sobrenadante de cultivo obtenido durante la degradación de cianuro, y preparado como se expuso en el apartado anterior, se presenta en el Gráfico 45. Es de destacar la presencia de tres picos (A, B y C), exclusivos de cultivos a los que se les suministró cianuro como fuente de nitrógeno. Estos picos presentaron unos tiempos de retención de 8,82 min (A); 10,99 min (B) y 15,03 min (C), correspondiendo los dos primeros a la cianhidrina del 2-oxoglutarato y al 2-oxoglutarato.

La identidad del 2-oxoglutarato se confirmó mediante el ensayo enzimático de la glutamato deshidrogenasa, enzima que reduce este compuesto, en presencia de amonio, a glutamato. El pico no identificado (C) correspondió a un compuesto de mayor fuerza iónica que los dos primeros, mientras que el pico mayoritario (tiempo de retención=18,85) se correspondió con el acetato, compuesto utilizado como fuente de carbono en el medio de cultivo.

GRÁFICO 45 Análisis por HPLC de metabolitos acumulados en el medio de cultivo en presencia de NaCN

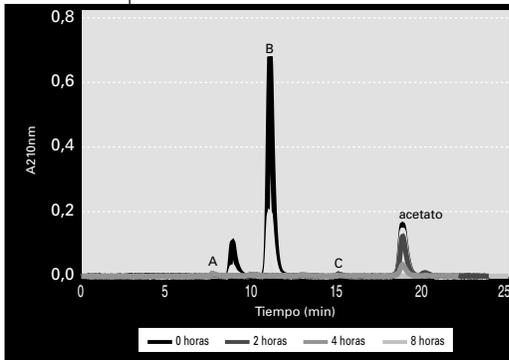


El cromatograma corresponde al sobrenadante de un cultivo de la estirpe CECT5344, a las 10 h de añadir NaCN 5 mM como única fuente de nitrógeno. Los picos identificados corresponden a: (A) cianhidrina del 2-oxoglutarato (8,82 min); (B) 2-oxoglutarato (10,99 min) y acetato (18,85 min).

Durante la degradación de la cianhidrina del 2-oxoglutarato por suspensiones celulares concentradas de *P. pseudoalcaligenes* (Gráfico 46), en

GRÁFICO 46

Cromatogramas de HPLC de los sobrenadantes de un cultivo de *P. pseudoalcaligenes* con la cianhidrina del 2-oxoglutarato como fuente de nitrógeno



Células precultivadas con NaCN fueron resuspendidas en medio M9 (pH 9,5) hasta $A_{600nm} = 1,6$. Como fuente de carbono se añadió acetato hasta una concentración de 50 mM, y como fuente de nitrógeno hasta 4 mM de la cianhidrina del 2-oxoglutarato. Los picos detectados a los distintos tiempos de retención corresponden a: A, cianhidrina del 2-oxoglutarato; B, 2-oxoglutarato; C, TR=15,03 y acetato.

condiciones alcalinas y con acetato como fuente de carbono, se observó la aparición, y posterior desaparición, del compuesto "C" detectado durante la degradación de cianuro, lo que demuestra que es un intermediario en la degradación de dicho compuesto.

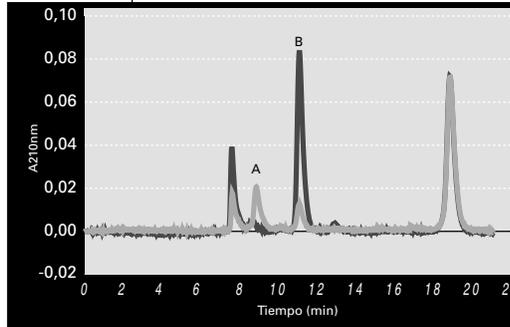
El análisis mediante HPLC de los metabolitos presentes en el sobrenadante de un cultivo precultivado durante 24 horas con amonio 2 mM reveló la presencia de 0,9 mM de 2-oxogluta-

rato, una concentración similar a la de α -cetoácidos totales descrita en el apartado anterior (0,8 mM) (Gráfico 47). Inmediatamente después de añadir cianuro al cultivo, la concentración de 2-oxoglutarato disminuyó hasta 0,1 mM, apareciendo simultáneamente su cianhidrina correspondiente. Al igual que el 2-oxoglutarato, la adición de cianuro provocó la disminución de un pico (TR=7,62 min) no identificado, lo que sugiere que se trata de un compuesto con al menos un grupo carbonilo.

La reacción entre el cianuro y compuestos con grupos aldehídos o cetonas es un hecho bien conocido. Ante la capacidad del 2-oxoglutarato y del piruvato de formar cianhidrinas, se estudió la reacción del cianuro con estos compuestos y la influencia del pH en dicho proceso. Estos experimentos se llevaron a cabo determinando el cianuro libre después de mezclar distintas proporciones de α -cetoácido/cianuro, e incubando las mezclas de reacción a diferentes pH. En el Gráfico 48 se muestran los resultados obtenidos con una proporción α -cetoácido/cianuro de 80/5. Como se puede observar, el cianuro presentó una mayor afinidad por el 2-oxoglutarato en condiciones alcalinas, mientras que a pH ácido el piruvato reaccionó de forma más favorable. Cuando la proporción utilizada fue 80/10 ó 80/20, los resultados obtenidos fueron similares.

GRÁFICO 47

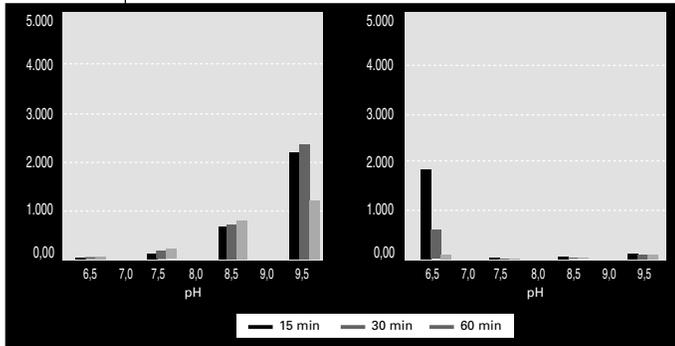
Cromatogramas de HPLC de los sobrenadante de un cultivo de *P. pseudoalcaligenes* en condiciones de ausencia de nitrógeno, antes y después de añadir NaCN



La bacteria se cultivó en medio mínimo (pH 9,5) con amonio 2 mM como única fuente de nitrógeno durante 24 h. En este punto se tomó una muestra del cultivo, se centrifugó, y el sobrenadante se analizó por HPLC (línea oscura). En el mismo momento se añadió al cultivo NaCN 5 mM y el sobrenadante de una muestra se analizó (línea clara). Los picos A y B corresponden, respectivamente, a la cianhidrina del 2-oxoglutarato y al 2-oxoglutarato.

GRÁFICO 48

Influencia del pH en la formación química de las cianhidras del piruvato y del 2-oxoglutarato

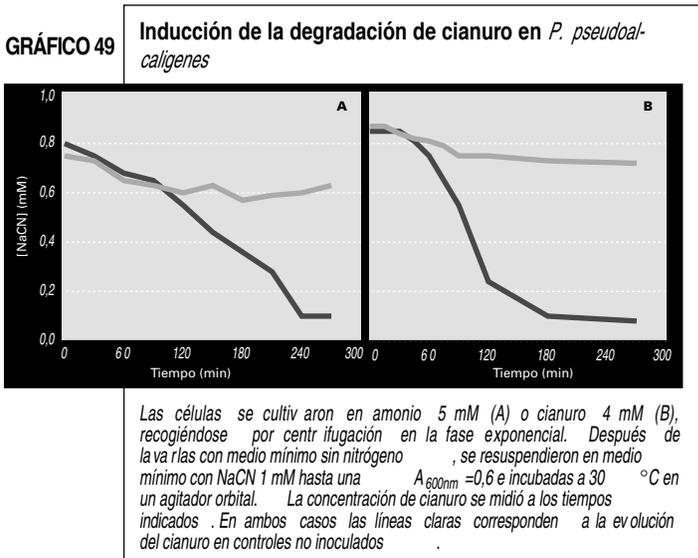


Se prepararon soluciones concentradas de piruvato, 2-oxoglutarato y NaCN, todas en una mezcla de tampones a diferentes pH. Se hicieron dos mezclas, NaCN-piruvato (izquierda) y NaCN-2-oxoglutarato (derecha), ambas con una proporción α -cetoácido/NaCN de 80/5. Estas mezclas se incubaron en agitación (20 rpm) y a temperatura ambiente, determinándose la concentración de cianuro a los tiempos establecidos. A tiempo cero todas las mezclas tuvieron NaCN 5 mM.

Regulación del metabolismo del cianuro

Inducción de la degradación de cianuro

La inducción de las rutas catabólicas por sus sustratos es un hecho muy frecuente en bacterias, aunque en algunos casos este tipo de rutas tienen un carácter constitutivo. Para conocer si la degradación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* es un proceso inducible o constitutivo, se incubaron con cianuro suspensiones celulares concentradas preparadas a partir de células precultivadas en amonio o cianuro, determinándose el consumo de éste a lo largo del tiempo. Como se puede observar en el Gráfico 49, las células precultivadas en cianuro consumieron más rápidamente el cianuro que las precultivadas en amonio, existiendo entre ambas una diferencia algo mayor de una hora. Resulta destacable que las células procedentes de cianuro también necesitaron una fase de adaptación, de casi una hora, antes de comenzar a degradar el cianuro, lo que sugiere la participación de metabolitos extracelulares en la asimilación del mismo.



Efecto de otras fuentes de nitrógeno en la asimilación de cianuro

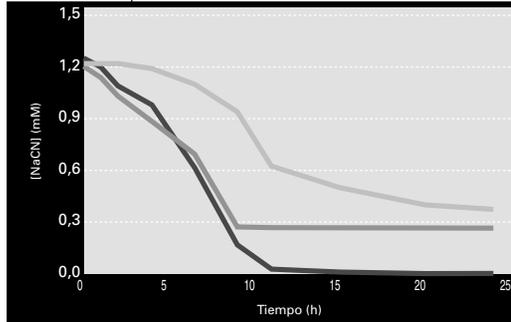
La potenciación de la biodegradación por segundos sustratos o la inhibición del proceso por nutrientes alternativos ha sido ampliamente descrita en la bibliografía. El conocimiento de estos efectos es de gran interés no sólo

para una posterior aplicación, sino también desde el punto de vista de la regulación del proceso. Teniendo en cuenta estos dos aspectos, se estudió la degradación de cianuro en presencia de diferentes fuentes adicionales de nitrógeno, tanto inorgánicas como orgánicas.

En presencia de pequeñas concentraciones de amonio (2 mM) la asimilación de cianuro no se vio afectada aunque, a diferencia de medios sin amonio, la degradación no fue total (Gráfico 50). Ello se debió probablemente a la limitación de la fuente de carbono, ya que cuando se añadió más acetato al medio ambas fuentes de nitrógeno fueron totalmente asimiladas de forma simultánea (Gráfico 51). Por el contrario, concentraciones superiores de amonio (10 mM) retrasaron claramente el consumo de cianuro (Gráfico 50).

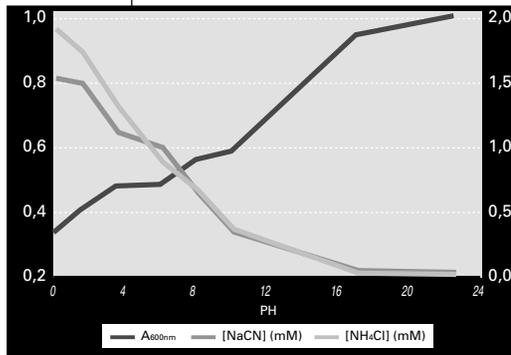
En cuanto al efecto inmediato del amonio sobre el proceso de degradación, su adición a un cultivo que se encontraba consumiendo cianuro no inhibió dicho consumo, no observándose además diferencia alguna en la velocidad

GRÁFICO 50 Efecto del amonio en la degradación de cianuro



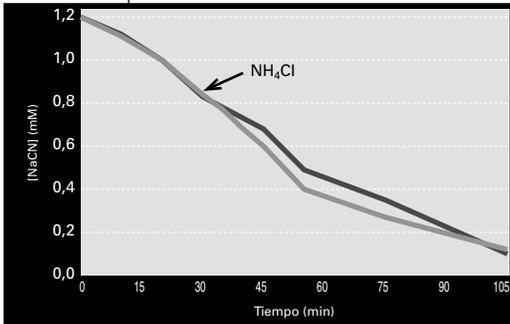
A células precultivadas durante 24h en medio mínimo M9 (pH 9,5) con amonio 2 mM y acetato 50 mM, se les añadió hasta 2 mM de NaCN y diferentes concentraciones de NH_4Cl : 0 mM (oscuro), 2 mM (medio) y 10 mM (claro). La concentración de cianuro se midió a los tiempos indicados.

GRÁFICO 51 Utilización de cianuro por *P. pseudoalcaligenes* en presencia de amonio



A células precultivadas durante 24h en medio mínimo M9 (pH 9,5) con amonio 2 mM y acetato 50 mM, se les añadió NaCN y NH_4Cl , ambos hasta una concentración de 2 mM. También se adicionó una concentración de acetato de 50 mM, que se suma a la que tenía el cultivo inicial.

GRÁFICO 52 Efecto del amonio en la asimilación de cianuro



Células precultivadas con cianuro fueron recogidas en la fase exponencial de crecimiento, resuspendiéndose en medio mínimo M9 (pH 9,5) a una $A_{600nm} = 0,6$, y con 1,5 mM de NaCN como fuente de nitrógeno. A los 30 min de iniciar el experimento, el cultivo se dividió en dos, uno al que se añadió NH_4Cl hasta una concentración de 2 mM (línea oscura), y a otro nada (línea clara).

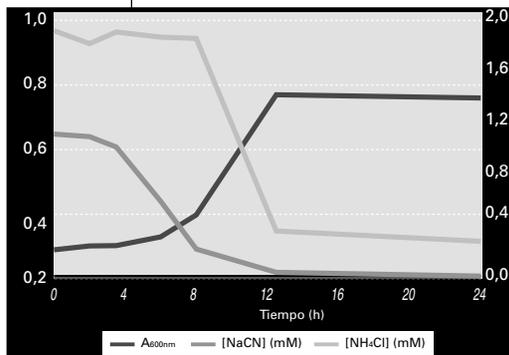
de degradación de cianuro respecto a un cultivo control (Gráfico 52). Durante el tiempo que duró el experimento no varió la concentración de amonio en el sobrenadante (resultado no mostrado).

Al igual que el amonio, el nitrato es una fuente de nitrógeno utilizada frecuentemente por muchas bacterias, por lo que conocer su efecto en la degradación de cianuro es de una gran importancia.

En medios con cianuro y nitrato, *P. pseudoalcaligenes* consumió el nitrato sólo después de degradar completamente el cianuro (Gráfico 53). Como se observa en la Gráfico 54, la primera enzima que participa en la asimilación del nitrato, la nitrato reductasa, se inhibió a pequeñas concentraciones de cianuro. Por el contrario, la azida no ejerció efecto alguno sobre esta actividad.

La adición de nitrato, al igual que ocurrió con el amonio, no afectó al consumo de cianuro, permaneciendo constante la concentración de nitrato hasta el final del experimento (Gráfico 55).

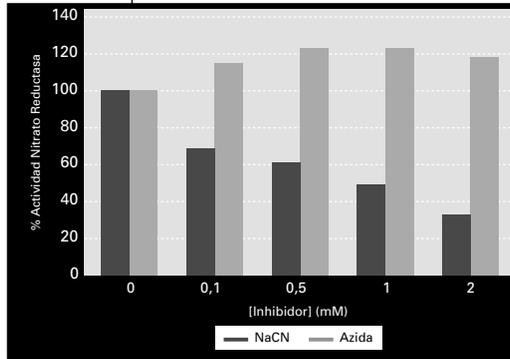
GRÁFICO 53 Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* en medio mínimo con NaCN y KNO_3 como fuentes de nitrógeno



Las células fueron precultivadas en medio mínimo M9 (pH 9,5) con NH_4Cl 2 mM como fuente de nitrógeno. Una vez consumido todo el amonio (24h), se adicionó NaCN y KNO_3 , ambos hasta una concentración de 2 mM.

GRÁFICO 54

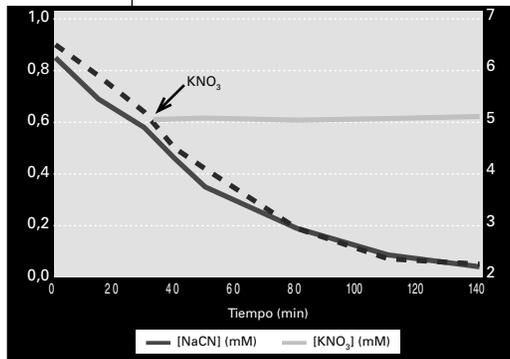
Efecto del NaCN y la azida en la actividad nitrato reductasa de *P. pseudoalcaligenes*



La actividad se midió según se describe en *Materiales y Métodos*, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de ambos inhibidores.

GRÁFICO 55

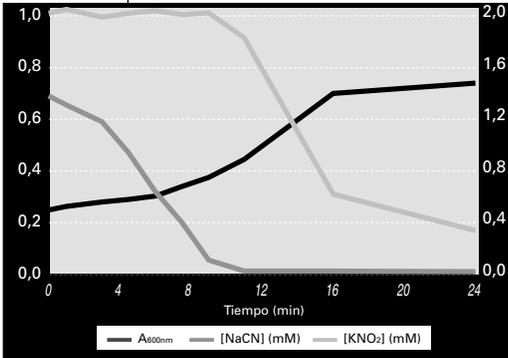
Efecto del nitrato en el consumo de cianuro



Células precultivadas con cianuro fueron recogidas en la fase exponencial de crecimiento, resuspendiéndose en medio mínimo M9 (pH 9,5) a una $A_{600nm} = 0,6$, y con 1 mM de NaCN como fuente de nitrógeno. A los 40 min de iniciar el experimento, el cultivo se dividió en dos, uno al que se añadió KNO_3 hasta 2 mM (línea continua), y a otro nada (línea discontinua).

GRÁFICO 56

Utilización de cianuro por *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en presencia de nitrito



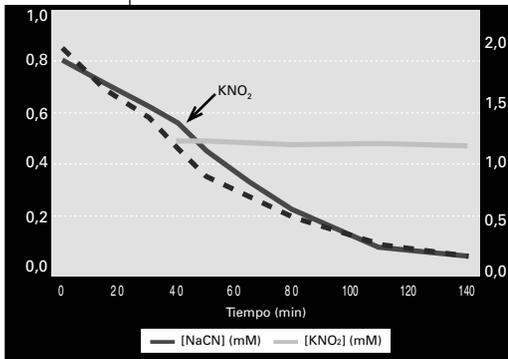
A un cultivo o precultivo en medio mínimo con NH_4Cl 2 mM como fuente de nitrógeno, se adicionó $NaCN$ y KNO_2 , ambos compuestos a una concentración de hasta 2 mM.

Si bien elevadas concentraciones de nitrito pueden provocar efectos perjudiciales en muchos microorganismos, a pequeñas concentraciones este compuesto resulta una fuente de nitrógeno para muchas bacterias. En presencia de nitrito, *P. pseudoalcaligenes* utilizó preferentemente el cianuro, mientras que el nitrito no se consumió hasta que el cianuro fue consumido completamente.

(Gráfico 56). Como se puede observar en el Gráfico 57, la adición de nitrito no alteró la cinética de degradación de cianuro.

GRÁFICO 57

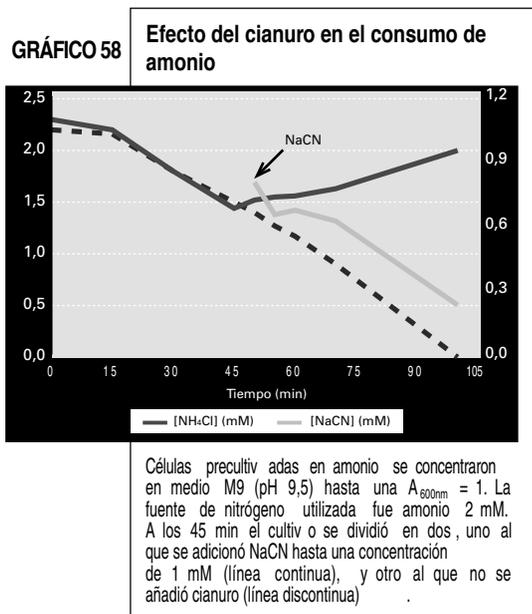
Efecto del nitrito en el consumo de cianuro



Células precultivadas con cianuro fueron recogidas en la fase exponencial de crecimiento, resuspendiéndose en medio mínimo M9 (pH 9,5) a una $A_{600nm} = 0,6$, y con $NaCN$ 1 mM como fuente de nitrógeno. A los 40 min de iniciar el experimento, el cultivo se dividió en dos, uno al que se añadió KNO_2 hasta una concentración de 2 mM (línea continua) y a otro nada (línea discontinua).

Efecto del cianuro en la asimilación de amonio, nitrato y nitrito

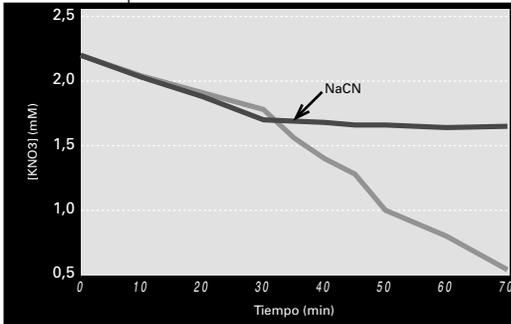
Con el fin de estudiar de forma más completa la interacción entre el metabolismo del cianuro y otras fuentes inorgánicas de nitrógeno, se llevaron a cabo experimentos encaminados a conocer el efecto del cianuro sobre la asimilación de amonio, nitrato y nitrito. Para ello se utilizaron suspensiones celulares concentradas ($A_{600nm} = 1$) preparadas en medio mínimo con amonio o nitrato, ambos a una concentración 2 mM. Cuando las células se encontraban consumiendo la correspondiente fuente de nitrógeno, se adicionó hasta 1 mM de NaCN. Como se puede observar en los Gráficos 58 y 59, el cianuro inhibió completa e inmediatamente tanto el consumo de amonio como el de nitrato. Después de más de 30 min a una concentración aproximadamente constante, el cianuro comenzó a ser asimilado en los medios con amonio, a la vez que se produjo un ligero incremento en la concentración de amonio en el medio (Gráfico 58).



Efecto de algunos aminoácidos en el consumo de cianuro

Además de las fuentes de nitrógeno inorgánicas anteriores, también se estudió el efecto de algunos aminoácidos en la asimilación de cianuro. A células precultivadas durante 24 h en medio mínimo con amonio 2 mM, se les añadió NaCN hasta una concentración de 2 mM y diferentes aminoácidos a una concentración hasta 5 mM, determinándose la concentración de

GRÁFICO 59 Efecto del cianuro en el consumo de nitrato de *P. pseudoalcaligenes*



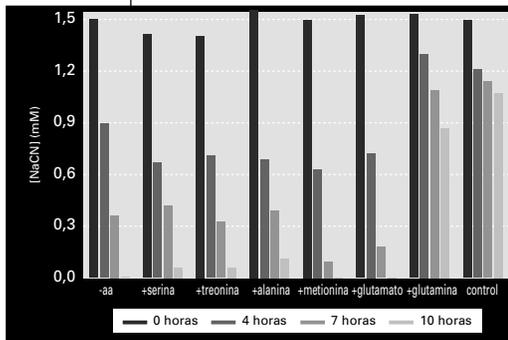
Células precultivadas en nitrato se concentraron en medio M9 (pH 9,5) hasta una $A_{600nm} = 1$. La fuente de nitrógeno utilizada fue nitrato 2 mM. A los 45 min el cultivo se dividió en dos, uno al que se adicionó hasta 1 mM de NaCN (línea oscura), y otro al que no se añadió cianuro (línea clara).

cianuro a los tiempos establecidos. Como se observa en la Gráfico 60, de todos los aminoácidos utilizados sólo la glutamina inhibió el consumo de cianuro.

En presencia de glutamina, la desaparición de cianuro fue prácticamente similar a la acontecida en un medio control sin inocular, presentando ambos una concentración de cianuro de

0,8 mM después de 24 h. El resto de aminoácidos no ejerció ningún efecto sobre la degradación de cianuro.

GRÁFICO 60 Efecto de diferentes aminoácidos en el consumo de cianuro



La cepa CECT5344 se cultivó previamente en medio mínimo M9 (pH 9,5) con amonio 2 mM como fuente de nitrógeno. Tras consumir todo el amonio (24h), se añadió a los distintos cultivos NaCN hasta una concentración de 2 mM y diferentes aminoácidos a una concentración de hasta 5 mM.

Degradación de cianuro en medio rico

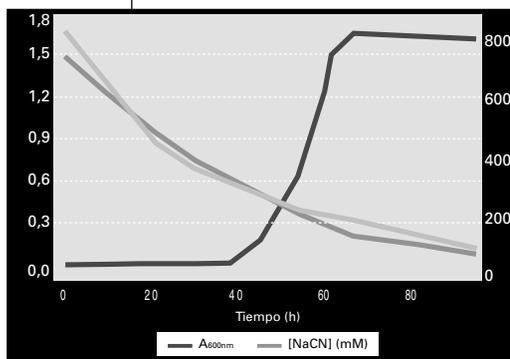
Al igual que en medio mínimo, la degradación de cianuro también se estudió en medio rico LB en condiciones alcalinas.

La estirpe CECT5344 no degradó el cianuro en medio LB (pH 9,5), ya que la cinética de desaparición de cianuro fue prácticamente igual en el cultivo inoculado que en el medio sin inocular (Gráfico 61). En ambos casos la concentración de cianuro en el medio a las

94 h de iniciar el experimento fue de 100 μM . Si bien la concentración de cianuro añadida fue de 2 mM, la concentración de cianuro libre detectada a tiempo cero fue sólo de 700 μM , lo que indica que la mayor parte del cianuro reaccionó con compuestos presentes en el medio.

GRÁFICO 61

Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en medio rico a pH 9,5 en presencia de NaCN



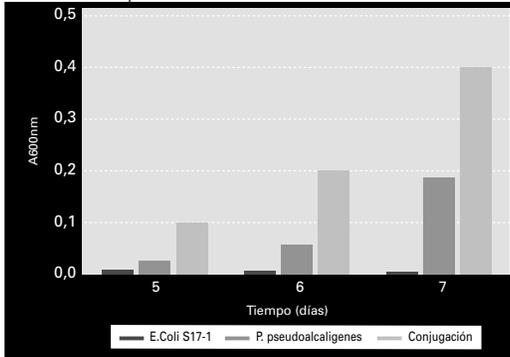
La cepa CECT5344 se cultivó en medio rico LB a pH 9,5 en presencia de NaCN 2 mM (línea media). Como control se utilizó un medio sin inocular (línea clara) en el cual se determinó la concentración de cianuro de forma paralela al cultivo o inoculado.

Obtención de un mutante hiperresistente a cianuro

A fin de obtener un mutante hiperresistente a cianuro se llevó a cabo una mutagénesis al azar mediante inserción del transposón Tn5 presente en el plásmido pSUP2021 (Simon *et al.*, 1983), tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. El proceso de selección se llevó a cabo en medio mínimo (pH 9,5) con dos concentraciones elevadas de NaCN como única fuente de nitrógeno. Las concentraciones de cianuro empleadas fueron 10 mM, una concentración tóxica pero tolerada por la estirpe silvestre, y 100 mM, una concentración que la estirpe silvestre es incapaz de tolerar. En estos medios se lavaron las células procedentes de los filtros de conjugación, tanto la mezcla de la estirpe CECT5344 de *P. pseudoalcaligenes* y la estirpe donadora S17-1 (pSUP2021), como cada una de las estirpes por separado. Estos dos últimos cultivos sirvieron como control. A los 7 días de inocular los cultivos no se detectaron células viables de la estirpe silvestre en presencia de 100 mM, mientras que el cultivo inoculado con la mezcla de

GRÁFICO 62

Crecimientos de los cultivos inoculados con la estirpe silvestre y la mezcla de conjugación con NaCN 10 mM



Después de la conjugación, los filtros se lavaron en medio M9 (pH 9,5) sin carbono ni nitrógeno. Seguidamente, tanto los controles (estirpe receptora y donadora por separado) como la mezcla de conjugación se inocularon en medio mínimo M9 (pH 9,5) con NaCN 10 mM como única fuente de nitrógeno.

conjugación mantuvo constante su turbidez inicial y la viabilidad celular. El seguimiento del crecimiento celular con NaCN 10 mM reveló que el cultivo con la mezcla creció de forma más rápida que la estirpe silvestre, alcanzando una absorbancia máxima de 0,4 y 0,198, respectivamente (Gráfico 62). Como era de esperar, *E. coli* no creció en estas condiciones.

Durante el crecimiento de la mezcla de conjugación y de la

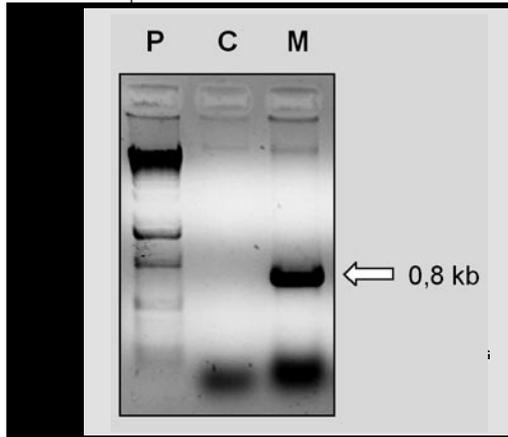
estirpe silvestre con NaCN 10 mM se tomaron varias muestras, las cuales se cultivaron en placas con medio LB y kanamicina. Para confirmar la existencia de transconjugantes por inserción del Tn5 se tomaron varias colonias aisladas, realizándose sobre ellas una PCR con los oligonucleótidos Km-A y Km-B, diseñados a partir del casete de resistencia a kanamicina del Tn5. En uno de los clones obtenidos a partir del cultivo con la mezcla de conjugación se amplificó una banda de aprox. 0,8 kb, indicativa de la presencia del Tn5 (Gráfico 63). Por el contrario, en los clones aislados del cultivo control con la estirpe silvestre no se amplificó ninguna banda. También se amplificó una banda del mismo tamaño cuando, utilizando los mismos oligonucleótidos, se realizó una PCR sobre una alícuota del cultivo que contenía la mezcla de conjugación con una concentración de NaCN 100 mM.

Una vez verificada la presencia de transconjugantes que contenían el transposón Tn5, se seleccionaron al azar varios de estos clones positivos, inoculándolos por separado en medio mínimo M9 (pH 9,5) con NaCN 10 mM como única fuente de nitrógeno. Dos de estos clones (estirpes RC5 y RC6) mostraron un fenotipo idéntico al observado en la selección. A partir de este momento se trabajó sólo con la estirpe RC5. En el Gráfico 64 se muestra el consumo de cianuro por la cepa silvestre y el mutante RC5 en medios con NaCN 5 mM. Como demuestra su prolongada fase

de latencia (7 h), esta concentración de cianuro resultó ligeramente tóxica para la estirpe silvestre. En cambio, el mutante RC5 degradó el cianuro rápidamente, sin apenas mostrar fase de latencia.

GRÁFICO 63

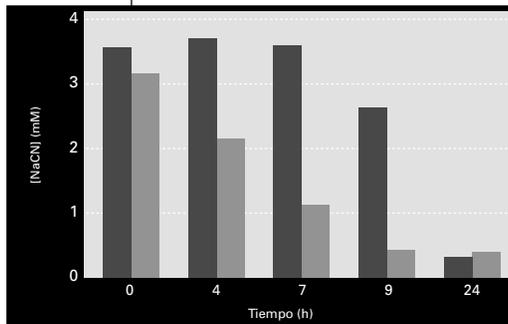
Comprobación por PCR de la presencia del transposón Tn5 en los transconjugantes cultivados en medios con NaCN



P, marcadores de peso molecular ; C, control con únicamente *P. pseudoalcaligenes* ; M, mezcla de conjugación.

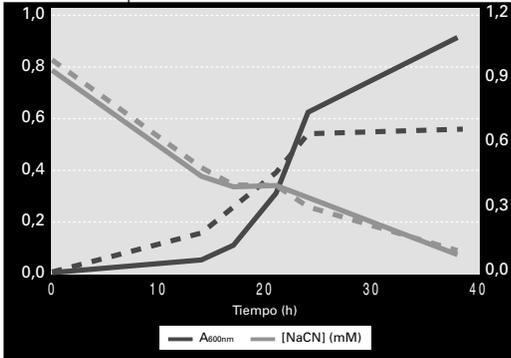
GRÁFICO 64

Consumos de cianuro por el mutante RC5 y la cepa silvestre a elevadas concentraciones de cianuro



Las estirpes silvestre (oscuro) y mutante RC5 (claro) se cultivaron con amonio 2 mM como única fuente de nitrógeno. A las 24 h se adicionó a ambos cultivos NaCN hasta una concentración de 5 mM, determinándose a partir de este momento la concentración de cianuro a los tiempos indicados.

GRÁFICO 65 Crecimientos del mutante RC5 y la cepa silvestre en medio rico LB con cianuro

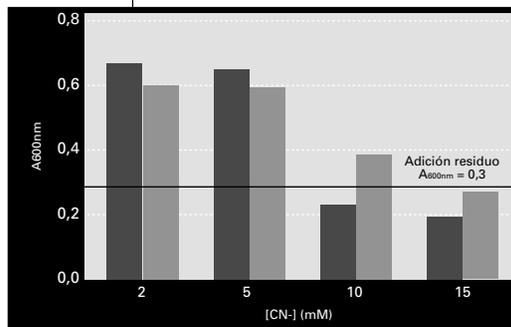


Las estirpes silvestre (líneas continuas) y mutante RC5 (líneas discontinuas) se cultivaron en medio rico LB (pH 9,5) con NaCN 2 mM. La determinación del crecimiento y la concentración de cianuro se llevó a cabo a los tiempos indicados.

Igual que ocurrió con la estirpe silvestre, el mutante RC5 fue incapaz de degradar cianuro en medio LB. En estas condiciones, la fase de latencia experimentada por el mutante fue menor que la de la estirpe silvestre (Gráfico 65). Por el contrario, en medio LB sin cianuro la duración de la fase de latencia de la estirpe silvestre fue menor que la del mutante RC5 (resultados no mostrados). Curiosamente, en este experimento la fase de latencia de la estirpe silvestre fue menor que la presentada en el Gráfico 61, un hecho debido probablemente a la mayor velocidad de desaparición de cianuro ocurrida en este último experimento.

También se estudió la resistencia del mutante RC5 al residuo cianurado de la joyería, comparado con la estirpe silvestre. Para ello, el mutante se cultivó en medio mínimo (pH 9,5) con distintas concentraciones de cianuro del residuo como única fuente de nitrógeno. En el Gráfico 66 se representa el crecimiento de las estirpes silvestre y mutante a las 12 h después de añadir residuo a cultivos crecidos a cultivos crecidos

GRÁFICO 66 Efecto de diferentes concentraciones de cianuro del residuo en el crecimiento de la estirpe silvestre y el mutante RC5



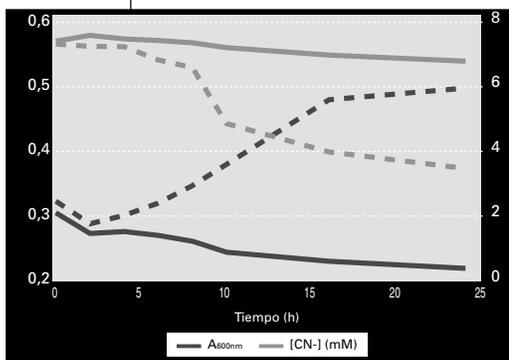
En la figura se representa el crecimiento de la estirpe silvestre (oscuro) y del mutante RC5 (claro) a las 12 h después de añadir diferentes volúmenes de residuo a suspensiones celulares previamente cultivadas en medio mínimo (pH 9,5) con amonio 2 mM como fuente de nitrógeno. Justo antes de adicionar el residuo, todos los cultivos tenían una A_{600nm} de 0,34 (línea negra).

previamente con amonio 2 mM. A bajas concentraciones de residuo (2 y 5 mM de cianuro libre), ambas estirpes experimentaron un crecimiento similar; si bien la absorbancia a 600nm del cultivo mutante fue ligeramente inferior a la del cultivo silvestre. Concentraciones de cianuro superiores (10 y 15 mM), afectaron negativamente a las dos estirpes, aunque en mayor medida a la cepa parental. Por ejemplo, la concentración de cianuro libre que provocó una significativa disminución de la turbidez en la estirpe silvestre fue 10 mM, mientras que en el caso del mutante RC5 fue 15 mM.

En el Gráfico 67 se representa en detalle el crecimiento y el consumo de cianuro de las estirpes silvestre y mutante en medio mínimo (pH 9,5) con 10 mM de cianuro (residuo). La adición del residuo hasta una concentración de cianuro libre de 10 mM a ambos cultivos provocó una brusca disminución en la absorbancia a 600nm.

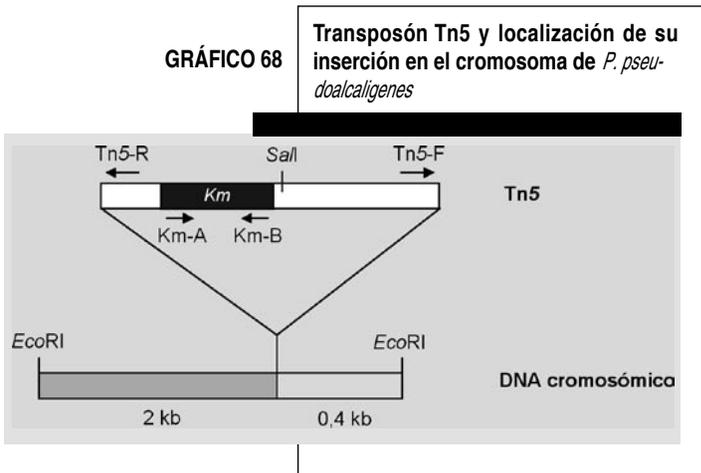
Tras experimentar una fase de latencia de aproximadamente 4 h, el mutante comenzó a crecer de forma exponencial hasta alcanzar la fase estacionaria a una A_{600nm} de 0,5. Por el contrario, la absorbancia del cultivo silvestre continuó disminuyendo a lo largo del experimento. Respecto al consumo de cianuro, como era de esperar, éste fue nulo en el cultivo silvestre. En el caso del mutante, y coincidiendo con la fase exponencial de crecimiento, se produjo una clara disminución de la concentración de cianuro en el medio. Durante la fase estacionaria se observó, igual que en el cultivo de la estirpe silvestre, una ligera disminución de cianuro, probablemente debida a la volatilización de HCN.

GRÁFICO 67 Efecto de altas concentraciones del residuo (cianuro libre 10 mM) en la estirpe silvestre y el mutante RC5



Tras precultivar ambas estirpes en medio mínimo con amonio 2 mM durante 24 h, se adicionó a los cultivos el volumen de residuo necesario para alcanzar una concentración de cianuro libre de 10 mM. Las líneas oscuras representan el crecimiento y las claras la concentración de cianuro. Por otra parte, las líneas continuas corresponden a la cepa silvestre mientras que las discontinuas corresponden al mutante.

Para determinar el sitio de inserción del Tn5 en el mutante RC5 se procedió a clonar las regiones flanqueantes al transposón aprovechando la existencia de un único sitio *Sall* en el centro de dicho transposón y la ausencia de un sitio *EcoRI* en el mismo (Gráfico 68). En primer lugar, el DNA total de la estirpe mutante se digirió con *EcoRI* y *Sall*, ligándose en el plásmido pUC18 los fragmentos obtenidos. La detección de los insertos que contenían uno de los extremos del transposón y su correspondiente región flanqueante se llevó a cabo por PCR, utilizando para ello combinaciones de los oligonucleótidos correspondientes a cada uno de los extremos del transposón (Tn5-R ó Tn5-F) con los oligonucleótidos directo (F) y reverso (R) del sitio de clonación múltiple del plásmido pUC18. Con la pareja Tn5-R/F se obtuvo un fragmento de 2 kb, mientras que con los oligonucleótidos Tn5-F/R se obtuvieron varios fragmentos, entre los cuales se seleccionó el de mayor tamaño (0,4 kb). Ambos fragmentos se clonaron en el vector pGEM-T, obteniéndose los plásmidos pAT1 y pAT2, que contienen los insertos de 0,4 y 2 kb, respectivamente.



El único fragmento secuenciado, el de menor tamaño (0,4 Kb) (Gráfico 69), presentó una identidad del 86% con la secuencia de DNA de *P. fluorescens* PfO-1 correspondiente a un gen (PA4350) que codifica una proteína conservada de función desconocida y que posee un dominio acil-CoA-N-aciltransferasa. Curiosamente, en *P. fluorescens*, en la misma cadena y en la misma orientación, se encuentra junto al gen PA4350 un gen que codifica una probable aciltransferasa que participa en el metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos. En *P. putida* y *P. syringae* la organización génica del gen homólogo a PA4350 es la misma.

GRÁFICO 69

Secuencia de la región de DNA, y traducción de la misma, del mutante RC5 donde se insertó el transposón Tn5



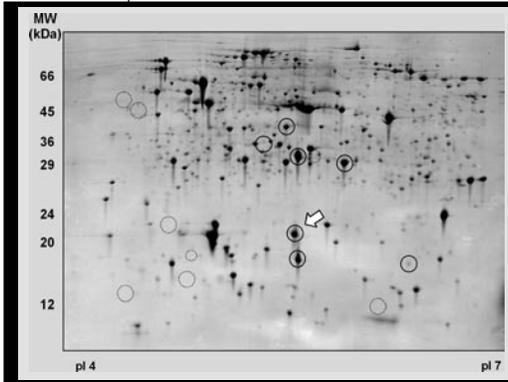
La principal diferencia existente entre el cianuro comercial y el residuo es que este último contiene una gran cantidad de complejos cianuro-metálicos. El hecho de que las diferencias entre las estirpes silvestre y mutante RC5 fuesen más evidentes, cuando se utilizó como fuente de nitrógeno el cianuro del residuo de la joyería, sugiere que el gen afectado en el mutante RC5 podría estar involucrado en el metabolismo de sideróforos.

Aproximación proteómica al estudio del metabolismo del cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

La Proteómica puede definirse como el estudio de proteínas a gran escala. Si bien ya en 1970 algunos autores comenzaron este tipo de estudios mediante la utilización de geles bidimensionales de proteínas, la reproducibilidad alcanzada en la electroforesis bidimensional (2-DE), la aplicación de la espectrometría de masas al análisis de proteínas y la secuenciación de algunos genomas en los últimos años han hecho resurgir esta tecnología. Actualmente la proteómica engloba multitud de técnicas dirigidas a la identificación de proteínas, al estudio de modificaciones post-traduccionales, a la determinación de funciones enzimáticas, a la interacción proteína-proteína, etc (Pandey y Mann, 2000). La electroforesis bidimensional constituye actualmente una herramienta muy potente para el análisis de mezclas complejas de proteínas. En esta técnica, las proteínas son separadas con muy alta resolución en función de su punto isoelectrónico (isoelectroenfoque, IEF) y de su masa molecular. En cuanto a la identificación de proteínas, la generación de huellas peptídicas (PMF) mediante espectrometría de masas es hoy día la herramienta analítica más ampliamente utilizada (Gygi y Aebersold, 2000).

GRÁFICO 70

Electroforesis bidimensional de la fracción soluble de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 cultivada con el residuo de la joyería como única fuente de nitrógeno



Los círculos continuos indican las proteínas inducidas por el residuo, mientras que las proteínas inhibidas por éste se muestran con círculos punteados. La flecha indica la proteína CNO, inducida tanto por el residuo como por NaCN.

Con el fin de aislar e identificar proteínas relacionadas con el metabolismo del cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, se sometieron a electroforesis bidimensional extractos acelulares obtenidos de células cultivadas en presencia o ausencia de cianuro, incluido el residuo de la joyería. Hasta el momento no existe ninguna referencia bibliográfica sobre el estudio del metabolismo del cianuro a través de una aproximación

metodológica de este tipo. En nuestro caso, los primeros experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de la profesora Anke Becker (Bielefeld, Alemania), donde se utilizaron tiras de IEF de 24 cm. Se realizaron geles 2D con la fracción soluble (proteínas citoplásmicas y periplásmicas) de células cultivadas en medio mínimo con amonio, NaCN o residuo de la joyería como únicas fuentes de nitrógeno, y también en medio rico (LB) con y sin cianuro, aunque en este trabajo sólo se muestra el perfil de expresión proteica en la fracción soluble de *P. pseudoalcaligenes* cultivada con el residuo cianurado (Gráfico 70). En este gel, al igual que en el de amonio, se obtuvieron por término medio alrededor de 1000 manchas. En cambio, los geles obtenidos con los extractos de células cultivadas con NaCN presentaron un escaso número de manchas, por lo que los estudios comparativos se realizaron fundamentalmente entre los geles de amonio y del residuo.

Nota: Todos los geles 2D presentados en este trabajo se realizaron por triplicado, exponiéndose de todos ellos el gel más representativo.

Comparado con células de amonio, el residuo produjo la inducción de 7 proteínas, mientras que la expresión de otras 8 fue reprimida. De todas las proteínas inducidas por el residuo, tan sólo la proteína CNO fue también inequívocamente inducida por NaCN, tanto en medio mínimo

como en medio rico (resultados no mostrados). Esta proteína presentó una masa molecular de 22.000 Da y un pI de 5,4. Su PMF presentó una gran similitud con la proteína fosforibosilglicinamida formiltransferasa de la bacteria *Caulobacter crescentus* (n° de acceso en la base de datos NCBI: gi |16125946. MW = 20.387 Da; pI = 5,23; 193 aminoácidos). El número de péptidos generados por MALDI-TOF y ligados a la proteína de *C. crescentus* fue 4, lo que supuso el 30% de su secuencia (Gráfico 71).

GRÁFICO 71

Secuencia de aminoácidos de la fosforibosilglicinamida formiltransferasa de *Caulobacter crescentus*

```

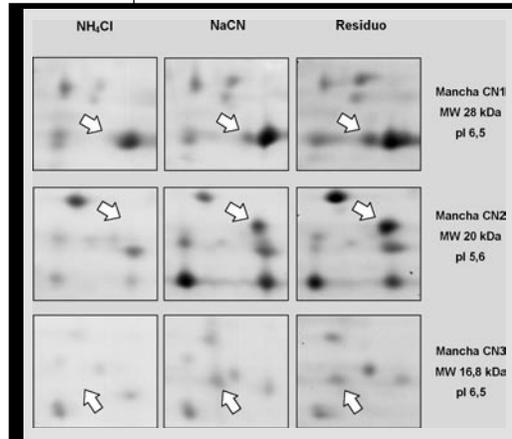
1  MTQPTKVAVL ISGRGSNMEA LVRAAQAPGC PFETALVLAN KPDAKGLEIA AAGVEALCV
61  DQKPFKGDRE AYERAIDAL RARGIEVIAL AGYMRILTPF LVDWEGRML NIHPSLLPAY
121 PGLDTHARAI AAGELEAGCT VHLVTAGVDE GPILGQARVP ILPGDDEPAL AARVLEQEHK
181 LYADTLATFC RGL
    
```

En negra se indican las regiones de identidad con los fragmentos peptídicos de la proteína de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 generados por MALDI-TOF MS.

Posteriormente, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba se obtuvieron geles bidimensionales utilizando tiras de 11 cm. Los extractos acelulares procedían de células precultivadas en amonio 2 mM a las que a las 24 h se les añadió NH_4Cl , NaCN o residuo, recogién-dose cuando éstas se encontraban consumi-endo activamente la correspondiente

GRÁFICO 72

Proteínas de la fracción soluble de *P. pseudoalcaligenes* inducidas tanto por NaCN como por el residuo de la joyería



Las flechas indican las proteínas inducidas tanto por NaCN como por el residuo, indicándose a la derecha su masa molecular y su punto isoelectrico.

fuerza de nitrógeno. Inicialmente, durante el proceso de solubilización las muestras se trataron con el reductor tributilfosfina (TBP), obteniéndose

aproximadamente 500 manchas por gel. En el Gráfico 72 se muestran en detalle algunas zonas de los geles obtenidos, y donde se presentan algunas proteínas inducidas tanto por NaCN como por el residuo.

La proteína CNI fue identificada positivamente y de forma inequívoca sometiendo su PMF obtenido mediante MALDI-TOF MS a una búsqueda en el programa Mascot. Con una alta significación, la mayor similitud del PMF de CNI se obtuvo con la generada a partir de la subunidad C de la alquil hidroperóxido reductasa de *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (nº acceso NCBI: gi |15595337. MW = 20529 Da; pI = 5,89; 187 aminoácidos). Los péptidos de la proteína CNI ligados con la proteína de la base de datos fueron 8, constituyendo el 47% de la secuencia teórica (Gráfico 73).

GRÁFICO 73

Secuencia de aminoácidos de la subunidad C de la alquil hidroperóxido reductasa de *P. aeruginosa* PA01

```
1 MSLINTQVQP FKVNAFHNGK FIEVTEESLK GKWSVLIFMP AAFTFNCPT EDAANNYGE
61 FQKAGAEVII VTTDTHFSHK VWHETSPAVG KAQFPLIGDP THQLTNAFGV HIPEEGLALR
121 GTFVINPEGV IKTVEIHSNE IARDVGETVR KLKAAQYTA AHPGEVCPAKW KEGEKTLAPS
181 LDLVGKI
```

En negra se indican las regiones de identidad con los fragmentos peptídicos de la proteína de *P. pseudoalcaligenes* generados por MALDI-TOF MS.

El PMF de la proteína CN2 presentó una gran similitud con la proteína de unión a DNA tipo ferritina de *Pseudomonas fluorescens* PfO-I (nº acceso NCBI: gi|23058503. MW = 17,609 Da; pI = 4,94; 156 aminoácidos). Los péptidos ligados fueron 4, y cubrieron el 41% de la secuencia teórica (Gráfico 74).

GRÁFICO 74

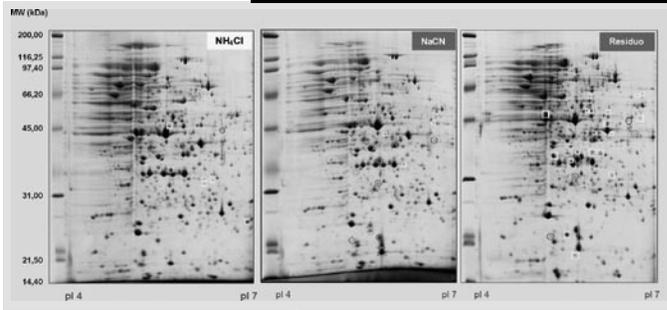
Secuencia de aminoácidos de la ferritina de unión a DNA de *Pseudomonas fluorescens* PfO-1

```
1 MAIDIGISEE DRKSIVEGLS RLLSDTYVLY LKTHNFHWV TGMFRTLHL MFEQYNELA
61 LAVDSIAERI RALGFPAPGA YATYARLSSI KEEEGVPSAE DMKQLVEGQ EAVTRTARGI
121 FPLLDKVSDE PTADLLTQRH QVHEKTAWML RALLEA
```

En negra se indican las regiones de identidad con los fragmentos peptídicos de la proteína de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 generados por MALDI-TOF MS.

GRÁFICO 76

Geles 2D de fracciones solubles de *P. pseudoalcaligenes* cultivada con amonio, NaCN o residuo de la joyería como únicas fuentes de nitrógeno

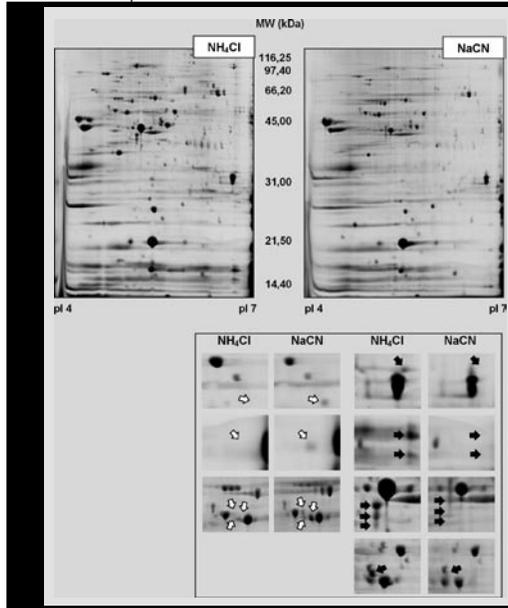


Las muestras se trataron con DTT 50 mM. Sim -
biología: proteínas sobreexpuestas con respecto
a amonio (triángulos naranjas); proteínas sobre-
expuestas con respecto a NaCN y el residuo
(triángulos rosas); proteínas inducidas sólo por
NaCN o por el residuo, o proteínas presentes
sólo en el amonio (cuadrados amarillos); proteínas
inducidas por ambas fuentes de nitrógeno (circu-
los rojos), proteínas presentes en amonio y NaCN
(círculos verdes); proteínas presentes en amonio
y el residuo (círculos azules).

También se sometieron a electroforesis bidimensional las fracciones de membrana de células cultivadas con amonio o NaCN como únicas fuentes de nitrógeno. Los geles obtenidos con estas fracciones presentaron alrededor de 350 manchas. Igual que en las fracciones solubles, las fracciones de membrana de células crecidas con amonio o NaCN también presentaron diferencias en cuanto a su perfil de expresión proteica, observándose tanto proteínas inducidas como reprimidas por NaCN (Gráfico 77). El tóxico originó la inducción de 5 proteínas, mientras que reprimió la expresión de 9.

GRÁFICO 77

Perfil de expresión proteica de la fracción de membrana de *P. pseudoalcaligenes* cultivada con amonio o NaCN como únicas fuentes de nitrógeno

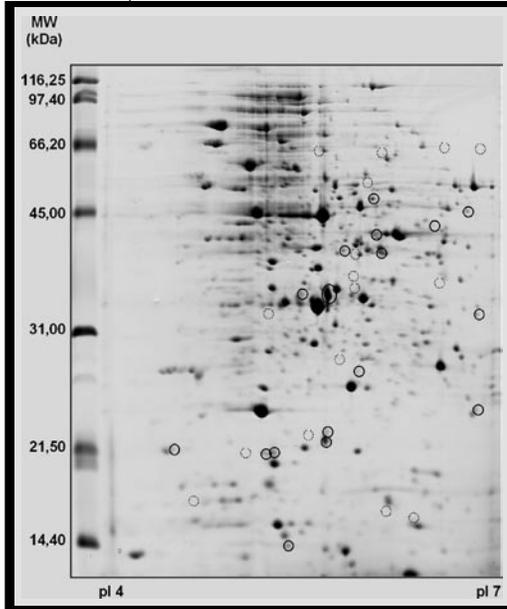


En la parte superior se presentan los geles 2D de la fracción de membrana de la estirpe CECT5344 cultivada en ambas condiciones. En la parte inferior se muestran en detalle las zonas donde se inducen (flechas blancas) o reprimen (flechas negras) algunas proteínas.

Como se comentó anteriormente, la estirpe CECT5344 fue incapaz de degradar cianuro en medio rico, por lo que en estas condiciones cabría esperar la ausencia de enzimas relacionadas con la ruta de degradación y la inducción de proteínas involucradas en la resistencia y la producción de sideróforos. A fin de identificar este tipo de proteínas, tanto la fracción soluble como la de membrana de células cultivadas en medio rico, en presencia y ausencia de NaCN, fueron sometidas a electroforesis bidimensional. El análisis cualitativo de los geles obtenidos con las fracciones solubles, los cuales presentaron alrededor de 740 manchas por gel, reveló la existencia de aproximadamente 17 proteínas inducidas por NaCN. También se observaron 16 proteínas reprimidas por este mismo compuesto (Gráfico 78).

GRÁFICO 78

Diferencias en el perfil de expresión proteica de la fracción soluble de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 cultivada en medio rico en presencia y ausencia de NaCN



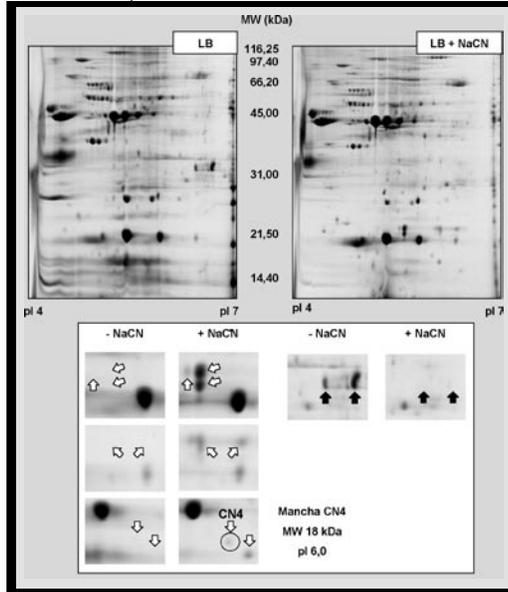
Electroforesis bidimensional de la fracción soluble de *P. pseudoalcaligenes* cultivada en medio rico LB en presencia de NaCN 1 mM. Con círculos se indican las proteínas inducidas (continuos) o reprimidas (punteados) por NaCN.

El Gráfico 79 muestra los geles 2-DE de la fracción de membrana de células cultivadas en medio rico en presencia y ausencia de NaCN. El número promedio de manchas por gel fue aproximadamente 300, mientras que el análisis cualitativo reveló la presencia de 7 proteínas inducidas por NaCN y sólo 2 proteínas reprimidas por dicho compuesto.

De entre todas las manchas de la fracción de membrana inducidas por NaCN, tan sólo se identificó con una alta significación la proteína CN4 (Gráfico 79; círculo).

GRÁFICO 79

Diferencias en el perfil de expresión proteica de la fracción de membrana de *P. pseudoalcaligenes* cultivada en medio rico en presencia y ausencia de NaCN



(arriba) 2-DE de la fracción de membrana de *P. pseudoalcaligenes* cultivada en medio rico LB en presencia de NaCN 1 mM. (abajo) Comparación en detalle de las proteínas inhibidas (flechas negras) o inducidas (flechas blancas) por NaCN.

La búsqueda con Mascot dio la mayor similitud del PMF de M1 con la generada a partir de una proteína de choque térmico de *Pseudomonas alcaligenes* (n° acceso NCBI: gi|12965134. MW = 18,090 Da; pI = 5,75; 160 aminoácidos). Los 10 péptidos de la proteína M1 ligados a la proteína de choque térmico cubrieron el 66% de la secuencia total de esta última (Gráfico 80).

GRÁFICO 80

Secuencia de aminoácidos de la posible proteína de choque térmico de *P. alcaligenes*

```

1  MNLAEIFRRI LMSNVLSLAP LFRQSVGFDR FNDLFESALR SNDAGSSYPP INVEKHGEDH
61  YRIVVAAAGF EEDDLELQVE RDVLTVVGNK RDRSAENISY LHQGIQRAF KLSFRLADHI
121 EVKGANLVNG LLHVELERIV PEEAKTKRIP IGSQRPALEN
    
```

En negra se indican las regiones de identidad con los fragmentos peptídicos de la proteína de *P. pseudoalcaligenes* generados por MALDI-TOF MS.

El perfil de hidrofobicidad de la proteína de *P. alcaligenes* puso de manifiesto la presencia de varias regiones hidrofóbicas, sin embargo según el programa TMHMM (v. 2.0) esta proteína carece de dominios transmembrana (resultados no mostrados).

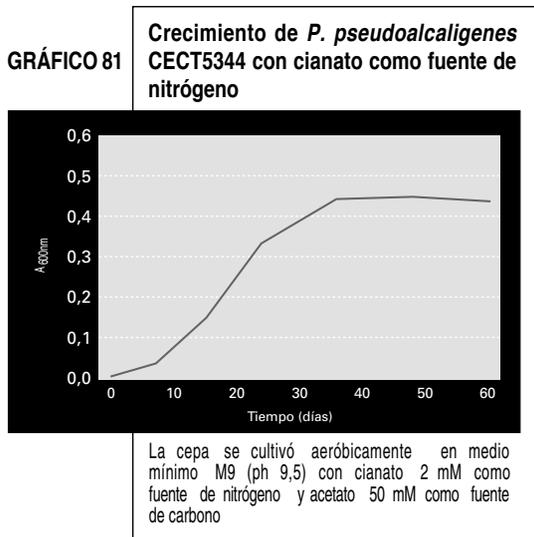
III.3 Metabolismo del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* cect5344I

Utilización de cianato como fuente de nitrógeno por *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

Como se ha referido en la *Introducción*, el cianuro es una fuente muy importante de cianato, por lo que es frecuente encontrar, tanto de forma natural como artificial, mezclas de ambos compuestos. Otro aspecto por el cual el cianuro y el cianato están estrechamente relacionados es que este último se ha descrito como un posible intermediario en la ruta de degradación del cianuro (Knowles y Dorr, 1989). De hecho, como se comentó en el capítulo anterior, el cianuro induce una actividad cianasa en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. En consecuencia, se consideró de gran interés estudiar el metabolismo del cianato en esta bacteria.

Crecimiento de la estirpe CECT5344 con cianato como única fuente de nitrógeno

Tras inocular la bacteria en medio mínimo M9 (pH 9,5) con acetato y cianato como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, se determinó espectrofotométricamente la densidad celular del cultivo a lo largo del tiempo. Los resultados representados en el Gráfico 81 muestran el crecimiento de la estirpe CECT5344, la cual



presentó una curva típica de crecimiento bacteriano con una fase de latencia (fase lag) de 8 h, y una fase exponencial de crecimiento con un tiempo de duplicación de 7,5 h.

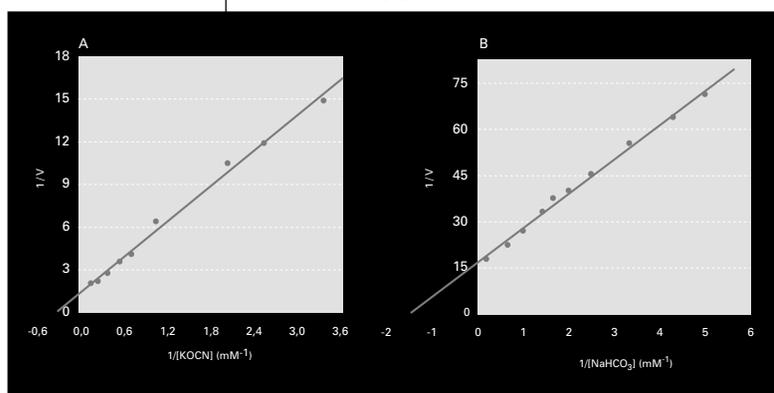
Actividad cianasa en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

En algunas bacterias, entre las que se encuentran *E. coli* y *Pseudomonas* sp., se ha descrito que la utilización de cianato como fuente de nitrógeno está determinada por la presencia de una enzima, denominada cianasa, capaz de transformar este compuesto en amonio (Chapatwala et al., 1998; Kunz y Nagappan, 1989; Anderson, 1980). Extractos acelulares de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 obtenidos a partir de células cultivadas con cianato como única fuente de nitrógeno presentaron una actividad cianasa de $562 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína en la fase exponencial de crecimiento. Por el contrario, en células cultivadas con amonio o nitrato y recogidas en fase exponencial no se pudo detectar la actividad.

La actividad cianasa se caracterizó determinándose la K_M , el pH y temperatura óptimos, y el efecto de algunos posibles inhibidores. Los ensayos se realizaron según se describe en *Materiales y Métodos*. Los efectos de la concentración de cianato y bicarbonato, sustratos de la enzima, se representan en el Gráfico 82, obteniéndose una K_M aparente para ambos de 2,4 mM y 0,67 mM, respectivamente.

GRÁFICO 82

Representación de Lineweaver-Burk para el cianato (A) y el bicarbonato (B)

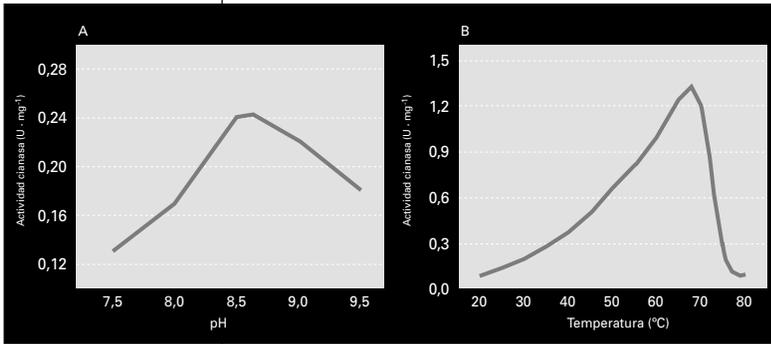


Los coeficientes de regresión lineal de las rectas para el cianato y el bicarbonato fueron 0,9931 y 0,9942, respectivamente.

El efecto del pH sobre la actividad se llevó a cabo utilizando en el ensayo una mezcla de tampones formada por MES (pKa 6,1), BIS-TRIS PROPANO (pKa₁ 6,8 y pKa₂ 9) y CAPS (pKa 10,4), todos ellos a una concentración 50 mM. Los resultados obtenidos se muestran en el Gráfico 83. Respecto a la influencia de la temperatura sobre la actividad cianasa, se estudió tanto su temperatura óptima de actividad como su termoestabilidad. La temperatura a la cual la enzima presentó una actividad máxima estuvo comprendida entre 65 y 70 °C, observándose actividad incluso a 75 °C (Gráfico 83).

GRÁFICO 83

Efectos del pH (A) y la temperatura (B) en la actividad cianasa de *P. pseudoalcaligenes*

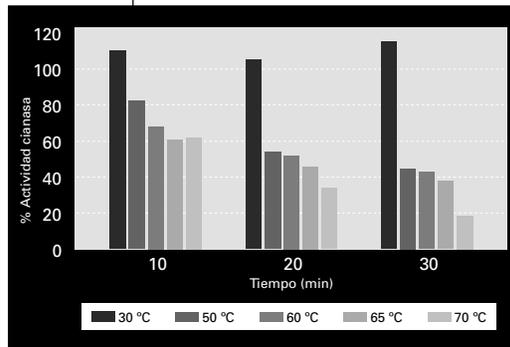


La actividad cianasa se ensayó a distintos pH (A) o a diferentes temperaturas (B)

Su estabilidad frente a la temperatura se determinó ensayando la actividad en condiciones óptimas (pH 8,5 y 65 °C). Los extractos acelulares se incubaron previamente durante 10, 20 y 30 min a temperaturas comprendidas entre 30 y 70 °C. Después de someter el extracto a 65 y 70 °C durante 30 min, la enzima conservó respectivamente hasta un 40 y un 20% de su actividad inicial (Gráfico 84).

GRÁFICO 84

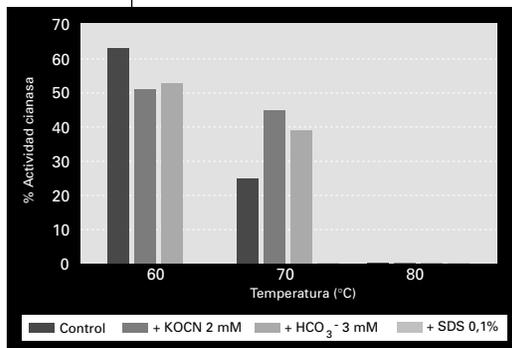
Termoestabilidad de la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344



Los diferentes valores se encuentran referidos a la actividad determinada en un extracto que se mantenía a 4 °C y que fue de 500 mU · mg⁻¹. Esta actividad se consideró en 100%

GRÁFICO 85

Efectos de sus sustratos y del SDS en la termoestabilidad de la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344



El extracto se incubó a 60, 70 y 80 °C durante 20 min., en ausencia (control) o presencia de cianato, bicarbonato o SDS. El 100% de la actividad corresponde a la determinada en un extracto que se mantuvo a 4°C y que fue 500 mU ·mg⁻¹.

La estabilidad de algunas enzimas se favorece por la presencia de sus sustratos o de algunos detergentes. En el caso de la cianasa de *P. pseudoalcaligenes*, la presencia de sus sustratos no aumentó su estabilidad a 60 °C. Sin embargo, la incubación de la enzima en presencia de cianato 2 mM a 70 °C aumentó su estabilidad casi un 100% respecto al control sin cianato

(Gráfico 85). A esta temperatura, el bicarbonato también aumentó la estabilidad de la enzima, aunque en menor medida. El detergente SDS inhibió completamente la actividad a cualquier temperatura (Gráfico 85).

CUADRO 14

Efectos de diferentes inhibidores en la actividad cianasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

Inhibidor*	% Actividad cianasa
Control	100
Amonio	99
Cianuro	100
Urea	100
Nitrato	78
Nitrito	99
EDTA	100
DTE	98
Ferricianuro	100
Tiocianato	95
p-hidroximercuribenzoato	31
Azida	32

*Los inhibidores se añadieron al ensayo a una concentración 10 mM.
Fuente: Elaboración propia.

Como posibles inhibidores de la actividad cianasa se utilizaron algunos metabolitos relacionados, como amonio, cianuro, urea, nitrato, nitrito y tiocianato, además de algunos quelantes, inhibidores y protectores de grupos funcionales (EDTA, DTE, ferricianuro, *p*-hidroximercuribenzoato y azida), todos añadidos al ensayo a una concentración 10 mM (Cuadro 14). Únicamente el *p*-hidroximercuribenzoato y la azida inhibieron la actividad de forma significativa (57%), y en menor medida, el nitrato (en negrita).

Regulación de la asimilación de cianato

Inducción de la actividad cianasa

Con objeto de establecer las condiciones que inducen la actividad cianasa de la estirpe CECT5344, ésta se ensayó en extractos acelulares obtenidos a partir de células cultivadas en medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno y recogidas en fase exponencial. También se estudió la presencia de esta actividad en medio rico (LB), así como su inducción por azida, un inductor de la cianasa en *E. coli* y *Flavobacterium* sp. (Guilloton y Karst, 1987). Las condiciones de hambre de nitrógeno (-N) se obtuvieron cultivando las células con amonio 2 mM como única fuente de nitrógeno y recogiendo a las 24 horas, momento en el cual no quedaba nitrógeno alguno en el medio. Como se puede apreciar en el Cuadro 15, no se

CUADRO 15

Inducción de la actividad cianasa en distintas condiciones

Compuesto	Actividad cianasa (mU·mg ⁻¹)
Cianato	562
Amonio	0
Amonio + azida	0
Nitrato	0
NaCN	960
[Cu(CN) ₄] ²⁻	10.000
Urea	1.813
L-arginina	0
Ornitina	0
- N	41
LB	0
LB + NaCN	0

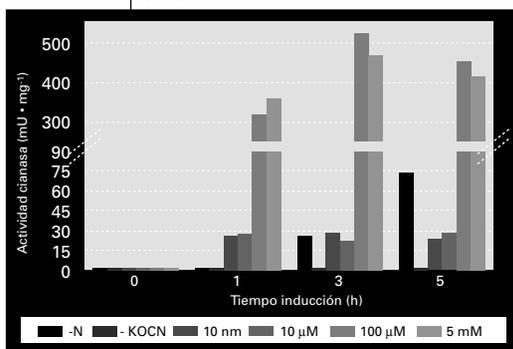
Fuente: Elaboración propia.

detectó actividad cianasa en células cultivadas con amonio, nitrato, arginina y ornitina como fuentes de nitrógeno, ni tampoco en células cultivadas en medio rico (LB). La azida, utilizada a una concentración que no afectó al crecimiento de la bacteria (1 mM), tampoco indujo la actividad cianasa. Por el contrario, fueron inductores de la cianasa en la estirpe CECT5344, además del cianato, la urea, el cianuro y el complejo cianuro-cobre. Las células crecidas en presencia de este último son las que presentaron mayor actividad, si bien es de destacar que tanto el cianuro como la urea también fueron mejores inductores que el sustrato natural de la enzima.

En medio rico LB con cianuro no se observó inducción de la actividad. Si bien en condiciones de limitación de nitrógeno también se detectó cianasa, su actividad fue mucho menor que en el resto de casos en los que se indujo.

GRÁFICO 86

Inducción de la actividad cianasa por pequeñas concentraciones de cianato

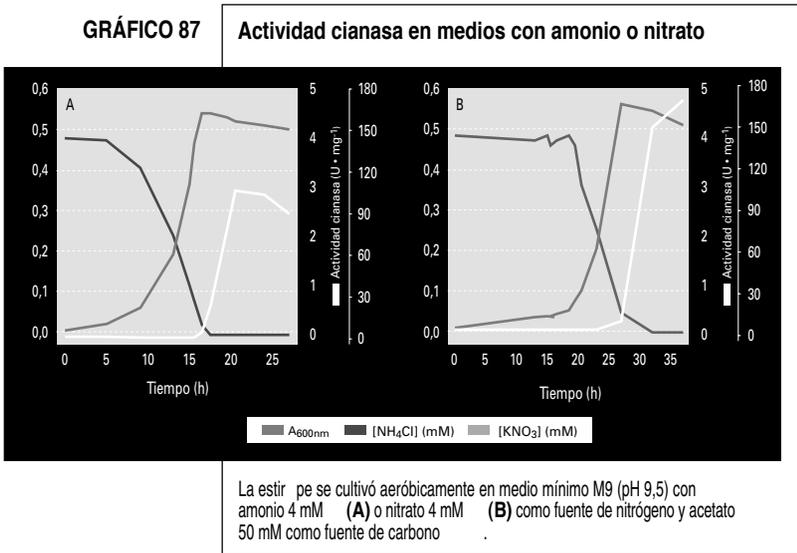


La actividad cianasa se determinó en extractos acelulares de células cultivadas con diferentes concentraciones de cianato, así como en ausencia de nitrógeno y en ausencia de cianato.

Con el fin de conocer la mínima concentración de cianato capaz de inducir esta actividad, se utilizaron células previamente cultivadas en nitrato, ya que esta fuente de nitrógeno no induce la cianasa pero tampoco es un represor. Las células precultivadas con nitrato fueron recogidas en fase exponencial y se resuspendieron en

medio fresco a una A_{600nm} de 0,35, añadiéndose a todos los cultivos nitrato 5 mM junto con diferentes concentraciones de cianato. A partir de este momento las células se recogieron a distintos tiempos, determinándose la actividad cianasa en los extractos acelulares. Como controles se utilizaron dos cultivos, uno carente de cualquier fuente de nitrógeno y otro con nitrato en ausencia de cianato. Como se observa en el Gráfico 86, la actividad cianasa no se indujo con nitrato como única fuente de nitrógeno, pero se indujo hasta un nivel basal en condiciones de hambre de nitrógeno (aprox. 30 mU · mg⁻¹). Por el contrario, la actividad se indujo significativamente por concentraciones de cianato superiores a 10 μM, alcanzándose la máxima actividad a las 3 h de añadir cianato (aprox. 500 mU · mg⁻¹).

La determinación de la actividad cianasa a lo largo del crecimiento de la cepa CECT5344 con amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno, reveló la existencia de una alta actividad durante la fase estacionaria de crecimiento (Gráfico 87). Es de resaltar que la actividad comenzó a detectarse en el momento en el que la fuente de nitrógeno desapareció por completo del medio. En ambos cultivos la actividad máxima fue similar; 110 mU·mg⁻¹ en células cultivadas con amonio y 160 mU·mg⁻¹ en el caso del nitrato. Curiosamente, estos valores fueron mayores que los descritos anteriormente en ausencia de nitrógeno (Cuadro 15 y Gráfico 86), aunque el perfil de actividad mostrado en el Gráfico 87 sugiere que esto probablemente fue debido a que las células se recogieron en distintos tiempos.



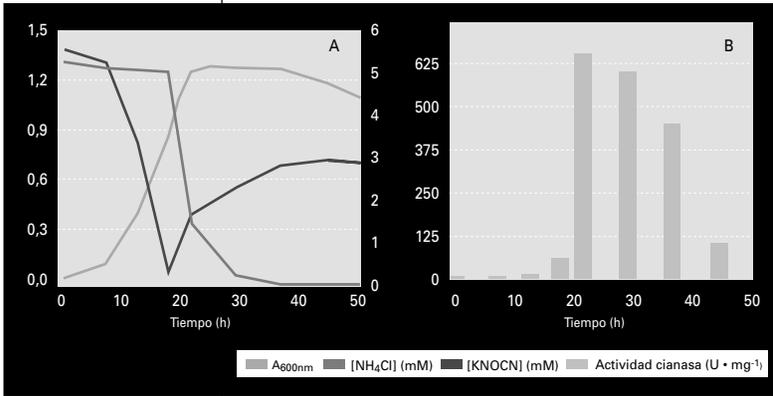
Efecto de otras fuentes de nitrógeno en la asimilación de cianato

Para evaluar el efecto que otras fuentes de nitrógeno ejercían sobre el metabolismo del cianato, *P. pseudoalcaligenes* se cultivó en medio mínimo M9 con cianato junto con amonio o nitrato como fuentes adicionales de nitrógeno. En el Gráfico 88 se observa cómo en medios con amonio y cianato, la bacteria utilizó preferentemente el amonio. Durante el consumo de amonio no se detectó consumo de cianato ni actividad cianasa, pero cuando desapareció todo el amonio comenzó de forma simultánea el consumo de cianato y la inducción de la cianasa, que alcanzó un valor máximo de 650 mU·mg⁻¹ al final de la fase exponencial de crecimiento.

Durante la fase estacionaria de crecimiento se acumuló amonio en el medio de cultivo, probablemente procedente de la degradación del cianato remanente.

GRÁFICO 88

Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con cianato y amonio como fuentes de nitrógeno



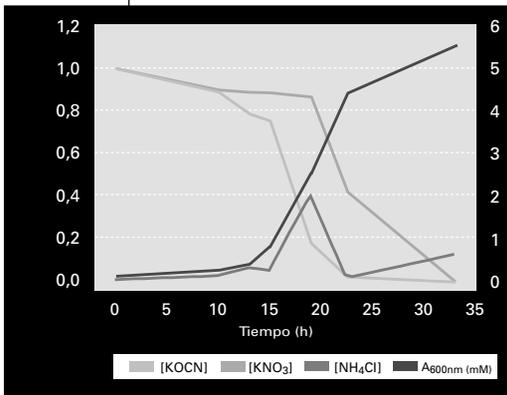
La bacteria se cultivó en medio mínimo M9 con cianato y amonio, ambos compuestos a concentraciones 5 mM. En A se representa el crecimiento y las concentraciones de amonio y cianato. En B, la actividad cianasa.

Respecto a la preferencia entre el cianato y el nitrato, cuando ambos compuestos están presentes simultáneamente, la bacteria consumió en

primer lugar el cianato y posteriormente el nitrato (Gráfico 89). Al igual que en el caso anterior, y coincidiendo con el consumo de cianato, se observó una aparición de amonio en el medio, si bien en este caso fue transitoria.

GRÁFICO 89

Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* con cianato y nitrato como fuentes de nitrógeno



La bacteria se cultivó en medio mínimo M9 (pH 9,5) con nitrato y cianato, ambos a una concentración 5 mM. Como fuente de carbono se utilizó acetato 50 mM.

En medios con cianato y nitrato como fuentes de nitrógeno, *P. pseudoalcaligenes* asimiló preferente-

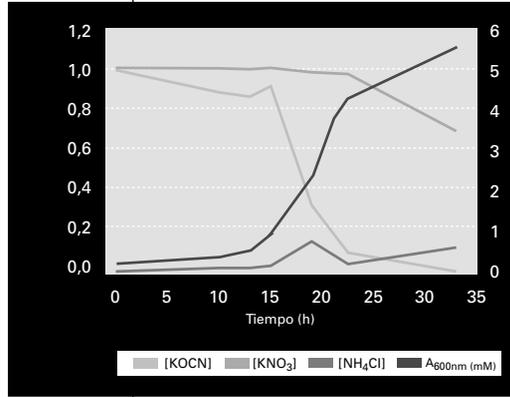
mente el cianato, consumiendo posteriormente el nitrito (Gráfico 90). Igual que en los medios con nitrato y cianato, la fase de latencia con nitrito y cianato fue de aproximadamente 12 horas y la A_{600} máxima 1,1.

Se realizaron otra serie de experimentos encaminados a estudiar la interacción entre el metabolismo del cianato y del amonio, y que consistieron en la

adición de uno u otro compuesto a cultivos que se encontraban consumiendo una de estas fuentes de nitrógeno. En el Gráfico 91 se puede apreciar cómo el cianato ni inhibió ni potenció la asimilación de amonio, mientras que el amonio

GRÁFICO 90

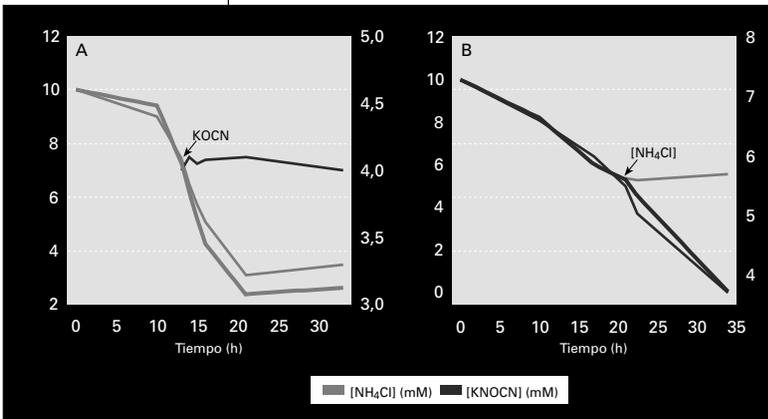
Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con cianato y nitrito



La bacteria se inoculó en medio M9 (pH 9,5) con cianato y nitrito como fuentes de nitrógeno. Como fuente de carbono se adicionó acetato hasta una concentración de 50 mM.

GRÁFICO 91

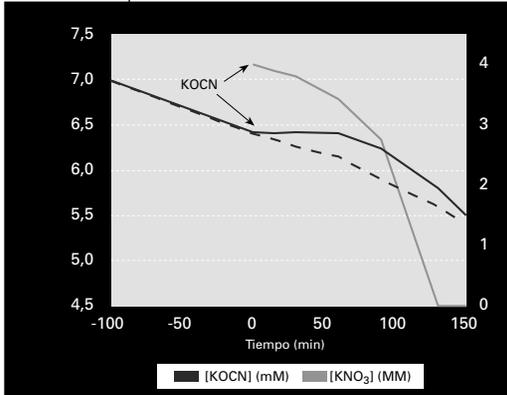
Interacción entre el metabolismo del cianato y del amonio



Células precultivadas con NH₄Cl ó KOCN 5 mM se recogieron en fase exponencial, transfiriéndose a medios que contenían, respectivamente, (A) NH₄Cl ó (B) KOCN (10 mM). La A_{600nm} inicial se ajustó a 1,2. Cuando los cultivos se encontraban consumiendo la fuente de nitrógeno añadida, se adicionó cianato (A) ó amonio (B), ambos a una concentración 5 mM. Como control se utilizaron cultivos a los que no se les añadió ninguna fuente de nitrógeno adicional.

GRÁFICO 92

Efecto del cianato en la asimilación de nitrato



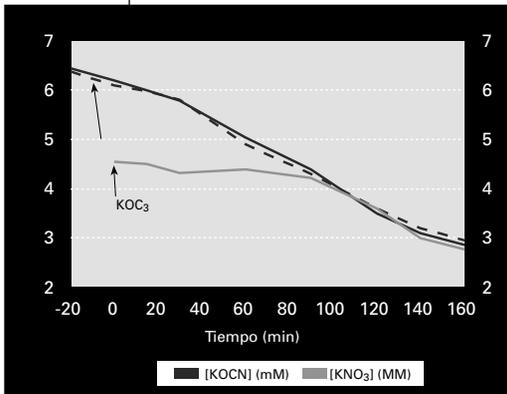
Células cultivadas previamente con KNO₃ 5 mM se recogieron en fase exponencial y se transfirieron a medios que contenían KNO₃ 10 mM, ajustándose la A_{600 nm} del cultivo a 1,2. Este se repartió en dos matraces; a uno se le añadió KOCN 5 mM (línea continua), mientras que el otro cultivo actuó como control sin adicionar cianato (línea discontinua). El tiempo cero representa el momento de adición de cianato, también señalado por una flecha.

tampoco alteró la asimilación de cianato, lo que parece indicar que el efecto del amonio en el metabolismo del cianato se ejerce a nivel de expresión génica.

La asimilación de nitrato fue otro de los procesos en los que se estudió el efecto del cianato. La adición de cianato inhibió transitoriamente la asimilación de nitrato durante 60 min, mientras que el cianato comenzó a desaparecer inmediatamente tras su adición (Gráfico 92). Sin embargo, sólo se observó un consumo significativo de cianato después de una hora tras su adición. La adición de nitrato a un cultivo que se encontraba activamente consumiendo cianato no ejerció ningún efecto sobre dicho proceso (Gráfico 93). En cuanto al nitrato, éste no comenzó a ser consumido hasta después de transcurridos 90 min desde la adición, momento en el cual la concentración de cianato era aproximadamente 4 mM.

GRÁFICO 93

Efecto del nitrato en la degradación de cianato



Células cultivadas previamente con KOCN 5 mM se recogieron en fase exponencial y se transfirieron a medios con KOCN 10 mM, ajustándose la A_{600 nm} del cultivo a 1,2. Este se repartió en dos matraces, uno que sirvió como control (línea discontinua) y otro al que se le añadió KNO₃ 5 mM cuando se encontraba consumiendo cianato (línea continua). El tiempo 0 representa el momento de adición de nitrato.

Purificación parcial de la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

Con objeto de obtener una preparación enriquecida en la enzima cianasa para su posterior utilización en el desarrollo de un biosensor de cianato, que se describirá más adelante, se realizó un procedimiento de purificación sencillo basado tan sólo en un tratamiento térmico y una cromatografía de intercambio iónico. Los pasos llevados a cabo durante esta purificación se resumen en el Cuadro 16.

CUADRO 16

Purificación parcial de la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

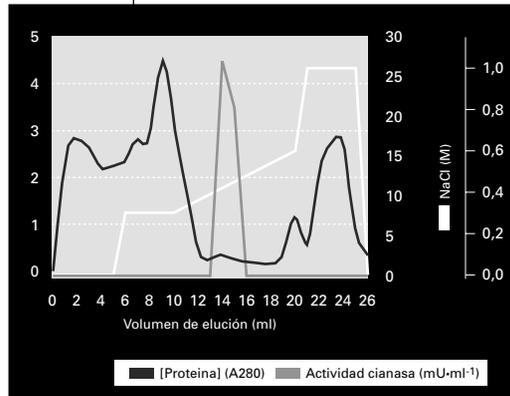
Paso de purificación	Actividad total (mU)	Proteína total (mg)	Actividad específica (mU·mg ⁻¹)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Extracto crudo	100	16	6,25	1	100
Tratamiento térmico (70 °C)	60	4,8	12,5	2	60
Intercambio iónico	43	0,4	107,5	17,2	43

Fuente: Elaboración propia.

Debido a la estabilidad de esta enzima a elevadas temperaturas, se usó el tratamiento térmico a 70 °C como paso de purificación. En este primer paso se obtuvo un factor de purificación de 2. Seguidamente se realizó una cromatografía de intercambio iónico (Gráfico 94), con la que se consiguió un factor de purificación de 17,2. El proceso total de purificación tuvo un factor de purificación de 17,2 y un rendimiento del 43%.

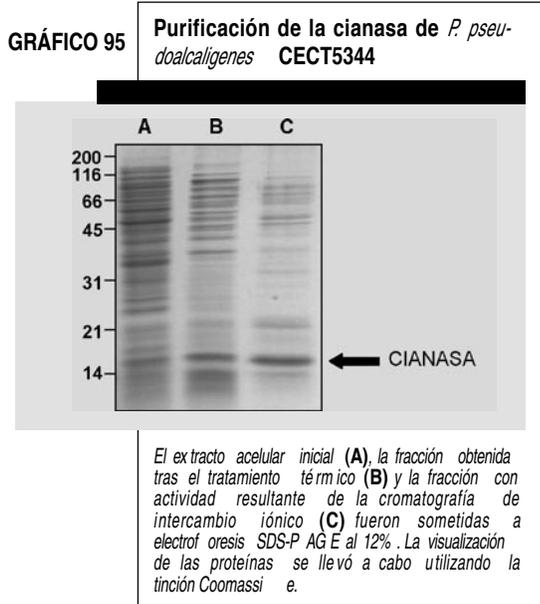
GRÁFICO 94

Cromatografía de intercambio iónico en Mono Q



La preparación procedente del tratamiento térmico se aplicó a una columna Mono Q HR 5/5. La cromatografía se desarrolló a un flujo de 1 ml·min⁻¹ y se recogieron fracciones de 1 ml en las que se determinó la actividad cianasa y la concentración de proteína. El lavado de las proteínas retenidas en la columna se llevó a cabo con NaCl a las concentraciones indicadas en la figura.

Para comprobar el grado de purificación, el extracto obtenido se sometió a una electroforesis SDS-PAGE (Gráfico 95). En el gel resultante se puede observar la existencia de una banda mayoritaria con una masa molecular de aproximadamente 16 kDa, la cual correspondería a la proteína CynS.



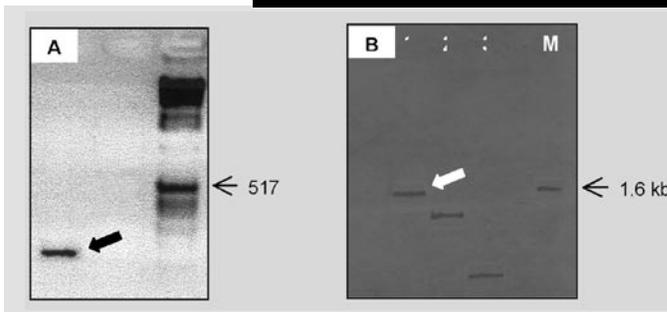
Clonación y secuenciación del gen que codifica la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Purificación de la cianasa a partir de su expresión heteróloga en *E. coli*

Con el objetivo de aislar e identificar mediante PCR el gen que codifica la cianasa de la estirpe CECT5344, se diseñaron oligonucleótidos degenerados a partir de la secuencia consenso obtenida del alineamiento de las proteínas CynS de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. La utilización de estos cebadores, denominados cyn1 y cyn2, y cuya secuencia se presenta en el Cuadro 9 de *Materiales y Métodos*, dio lugar a la amplificación de un fragmento de DNA de aproximadamente 100 pb (Gráfico 96A), que coincidió con el tamaño esperado. Este fragmento se marcó con digoxigenina, según se describe en *Materiales y Métodos*, y se utilizó como sonda en una hibridación con el DNA total de la estirpe CECT5344 digerido con diferentes enzimas de restricción. El resultado de la hibridación, mostrado en el Gráfico 96B, reveló la presencia de varios fragmentos de entre 1 y 2 kb, los cuales se

ligaron en el plásmido pBluescriptII K-S. Después de transformar la estirpe DH5 α de *E. coli* con las distintas ligaciones y transferir las colonias a placas de LB, se llevó a cabo una hibridación en colonia utilizando como sonda el fragmento obtenido por PCR. Finalmente se seleccionó un clon que portaba un inserto *Sall* de 1.550 pb (pMHI).

GRÁFICO 96

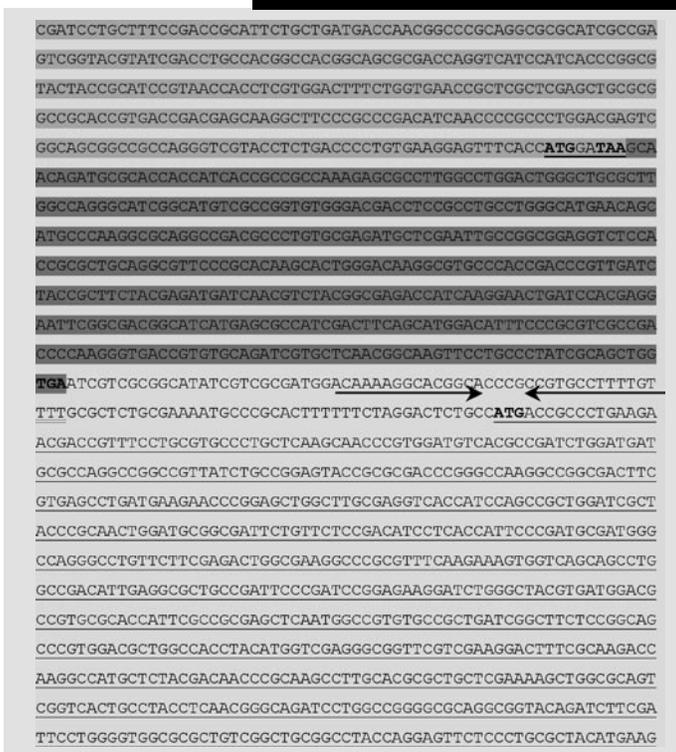
Amplificación por PCR y detección de un fragmento de DNA de la cepa CECT5344 conteniendo el gen *cynS*



La flecha negra indica el fragmento de 100 pb amplificado por PCR (A) y en blanco el fragmento *Sall* de 1,55 kb detectado por hibridación (B). Las calles 1, 2 y 3 corresponden a la digestión con *Sall*, *Pst* y *Sall/EcoRI*, respectivamente. M, marcador de masa molecular X (Roche).

La secuenciación y análisis del fragmento seleccionado reveló la existencia de tres *orfs* (marcos de lectura abierta) diferentes (Gráfico 97). Uno de estos *orfs*, situado en la zona central de la secuencia, codifica un péptido de 146 aminoácidos con una masa molecular estimada de 15.834 Da. Debido a que la identidad más alta mostrada por este péptido con otras secuencias del banco de datos correspondió a CynS de *Burkholderia fungorum*, al péptido deducido de este *orf* se le denominó CynS. Los otros dos *orfs*, que se encontraban incompletos, se localizaron a ambos lados del *orf2*, y los péptidos codificados mostraron una identidad del 42% y del 91% con un transportador de bicarbonato de *Nostoc* sp. y con la proteína HemE de *P. aeruginosa*, respectivamente. La región intergénica existente entre dos de los *orfs* identificados presentó una secuencia palindrómica que podría formar un tallo de 14 nucleótidos y un bucle de 4 nucleótidos. Además, también se identificó una cola poli-T característica de las señales de parada de la transcripción en procariontes. El análisis de la secuencia mediante el programa STEMLOOP, del paquete informático GCG, reveló que la horquilla formada posee una energía muy elevada.

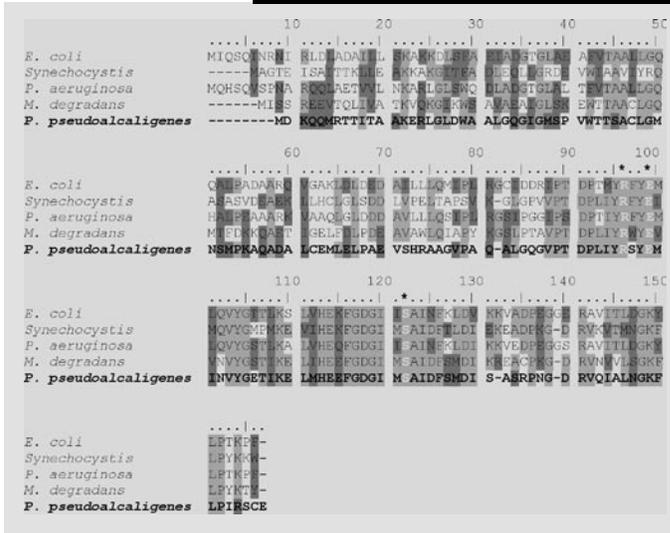
GRÁFICO 97 Secuencia del fragmento Sall de 1,55 kb



En gris claro se destaca la secuencia que muestra a homología con un transportador de bicarbonato (*cynB*), mientras que en gris oscuro se resaltan las secuencias correspondientes a los genes *cynS* y *hemE*, respectivamente. Los codones de iniciación y terminación se muestran en negro. Con dos flechas se marca una secuencia palindrómica que podría formar un bucle de terminación de la transcripción, y subrayado doble una cola poli-T. La secuencia solapante entre los genes *cynB* y *cynS* se muestra enmarcada.

El Gráfico 98 muestra el alineamiento múltiple de la proteína CynS de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con las proteínas de *E. coli*, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *P. aeruginosa* y *Microbulbifer degradans*. Como se puede observar, todas las cianobacterias presentan una gran similitud, especialmente entre los residuos aminoacídicos 90 y 130. Dentro de esta zona se conservan en todos los casos tres residuos aminoacídicos (arginina-96, glutamato-99 y serina-122), los cuales se ha descrito que forman parte del centro activo de la enzima (Walsh et al., 2000).

GRÁFICO 98 Alineamiento múltiple de CynS de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 con otras proteínas CynS

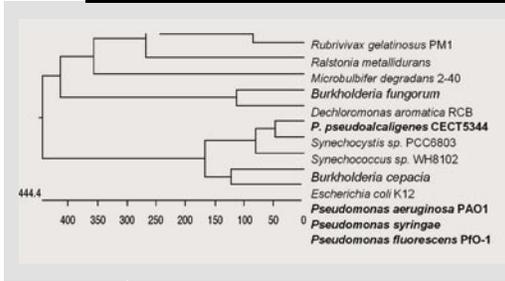


El alineamiento se realizó utilizando el método de Clustal del programa de alineamiento múltiple de secuencias BioEdit (ver sección Materias y Métodos). Los aminoácidos idénticos se señalan en claro, mientras que los cambios conservativos se indican en oscuro. En negrita se resalta la secuencia del gen *cynS* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. En blanco y con asterisco se destacan los aminoácidos que se han descrito formar parte del centro activo de la enzima.

Se construyó un árbol filogenético de las distintas proteínas CynS, el cual diferenció claramente estas proteínas en dos grupos bien definidos (Gráfico 99). Esta organización indica que la proteína CynS de la estirpe CECT5344 está más relacionada con la cianasa de cianobacterias y estirpes de la subdivisión beta que con las del resto de miembros de su género, perteneciente a las Gammaproteobacterias.

GRÁFICO 99

Distancias filogénicas entre varias proteínas CynS de bacterias



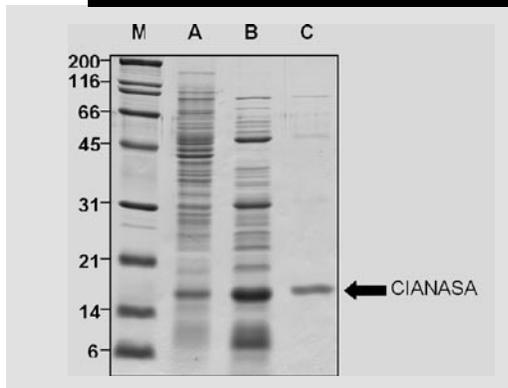
El cladograma se construyó tras una comparación múltiple de secuencias aminoacídicas utilizando el método Jotun Hein del programa Lasergene (DNAST AR). En negra se marcan las CynS de varias Pseudomonas, incluyendo la correspondiente a *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

La cianasa de *P. pseudoalcaligenes* se purificó hasta homogeneidad a partir del clon de *E. coli* que contenía el inserto *Sall* de 1.550 pb en el plásmido pMH1. Para ello se partió de un extracto acelular obtenido a partir de células cultivadas en medio rico LB, condiciones bajo las cuales no se expresó la cianasa endógena de *E. coli*.

En primer lugar el extracto fue sometido a tratamiento térmico (70 °C) durante 30 min. La fracción resultante se sometió a fraccionamiento con sulfato amónico, obteniéndose finalmente una única banda de aprox. 16 kDa correspondiente a la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Gráfico 100).

GRÁFICO 100

Comprobación de la pureza de la cianasa recombinante de la estirpe CECT5344



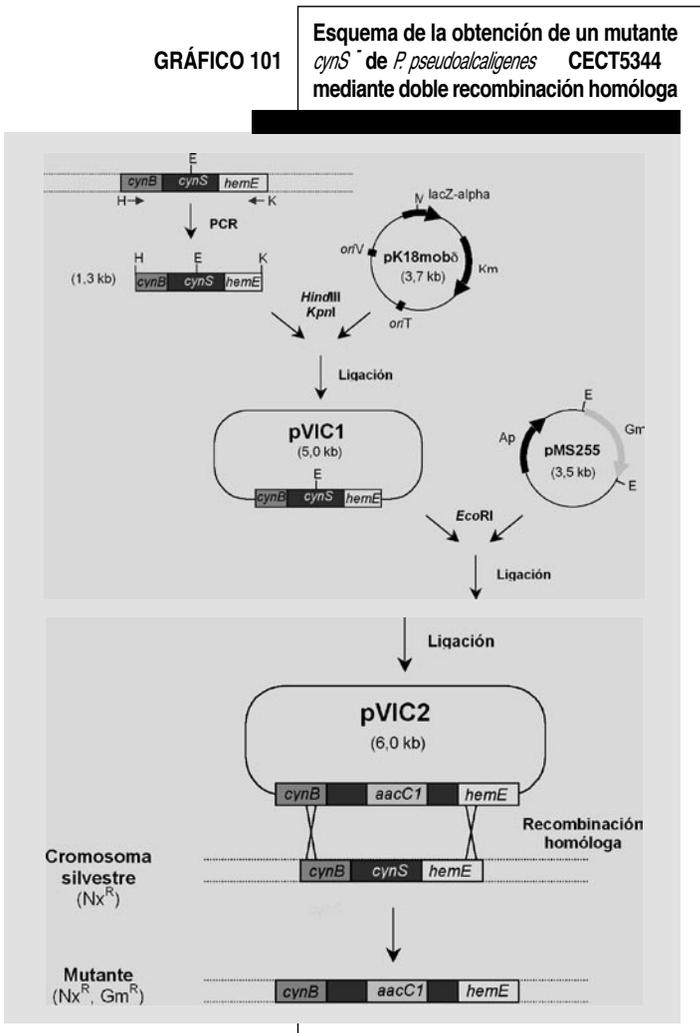
El extracto acelular inicial (A) y las fracciones obtenidas tras el tratamiento térmico (B) y la precipitación con sulfato amónico (C) fueron sometidas a electroforesis SDS-PAGE al 12%. La visualización de las proteínas se llevó a cabo utilizando la tinción Coomassie. M, marcadores de masa molecular.

Obtención de un mutante de *P. pseudoalcaligenes* incapaz de utilizar cianato como fuente de nitrógeno

Una vez clonado el gen que codifica la cianasa de *P. pseudoalcaligenes*, para confirmar su función se procedió a la construcción de un mutante dirigido en dicho gen, tal y como se detalla en *Materiales y Métodos*. El mutante se construyó por reemplazamiento génico de la copia silvestre por un alelo mutante que contenía la inserción de un casete de resistencia a gentamicina (*aacC1*) en una posición central del gen de la cianasa. El plásmido suicida (pVIC2) contenía, además del gen de la cianasa interrumpido por el

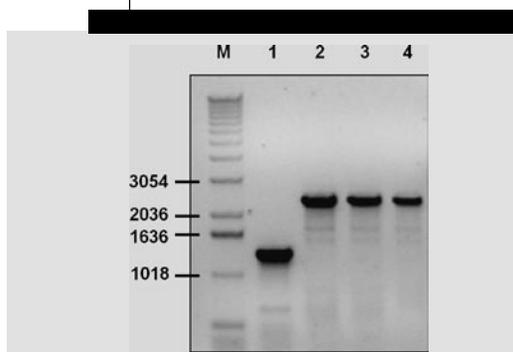
GRÁFICO 101

Esquema de la obtención de un mutante *cynS*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 mediante doble recombinación homóloga



casete *accCI*, secuencias flanqueantes de DNA cromosómico de la estirpe CECT5344 con una extensión suficiente como para que los eventos de doble recombinación homóloga pudiesen ocurrir con una frecuencia razonable. En el Gráfico 101 se esquematiza la construcción del plásmido pVIC2, que contiene la inserción del casete *accCI* en el sitio *EcoRI* del gen *cynS* y que dio lugar a la inactivación de dicho gen. Este plásmido fue transferido por conjugación biparental desde *E. coli* S17-1 a *P. pseudoalcaligenes* tal y como se describe en *Materiales y Métodos*.

GRÁFICO 102 Comprobación del mutante *cynS*⁻ mediante PCR



Sobre el DNA total de la cepa parental y de 3 clones positivos se realizó una amplificación por PCR utilizando los cebadores *cyn3* y *cyn4*. La calle 1 representa el fragmento amplificado en la cepa silvestre, mientras que las 2, 3 y 4 representan los fragmentos amplificados en 3 clones mutantes. La calle M corresponde al marcador de peso molecular X (Roche).

La selección de los transconjugantes se llevó a cabo en réplicas conteniendo medio LB con ácido nalidíxico y gentamicina y, LB con ácido nalidíxico y kanamicina. Finalmente se seleccionaron aquellos clones que presentaron sensibilidad a kanamicina y resistencia a gentamicina, por ser candidatos a haber sufrido una doble recombinación y presentar, por lo tanto, reemplazo

alélico. Entre los clones así aislados se eligió uno al azar que se denominó *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 *cynS*⁻. La confirmación del reemplazamiento alélico se realizó a través de una amplificación por PCR sobre el DNA cromosómico de la cepa parental y del mutante *cynS*⁻, utilizando los cebadores *cyn3* y *cyn4* (Cuadro 9 de *Materiales y Métodos*). El aumento de tamaño del fragmento amplificado en el mutante, que coincidió con el tamaño del casete de resistencia a gentamicina, verificó la autenticidad de dicho mutante (Gráfico 102).

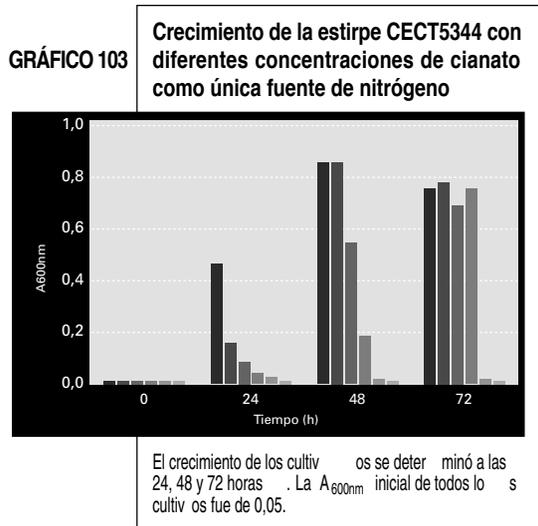
El mutante *cynS*⁻ de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 fue incapaz de crecer con cianato como única fuente de nitrógeno.

Tolerancia a cianato

El cianato resulta tóxico para muchas estirpes bacterianas a elevadas concentraciones, y se ha propuesto que el papel de la cianasa podría ser el de proteger contra dicho efecto. Para evaluar la toxicidad del cianato en la estirpe CECT5344, ésta se cultivó en medio mínimo con concentraciones crecientes de dicho compuesto como única fuente de nitrógeno, determinándose el crecimiento bacteriano a las 0, 24, 48 y 72 h. Como se observa en el Gráfico 103, *P. pseudoalcaligenes* toleró e incluso utilizó concentraciones de cianato de hasta 100 mM. Concentraciones superiores (500 mM) impidieron el crecimiento de la bacteria. La fase de latencia aumentó de forma paralela a la concentración de cianato, desde 12 h (5 mM) hasta 24 h (100 mM), alcanzándose en todos los casos el mismo crecimiento celular ($A_{600nm} = 0,8$).

El disponer de un mutante en el gen que codifica la cianasa permitió escrutar el papel de dicha proteína en el mecanismo de resistencia a cianato. Debido a la incapacidad del mutante *cynS*⁻ de utilizar cianato como

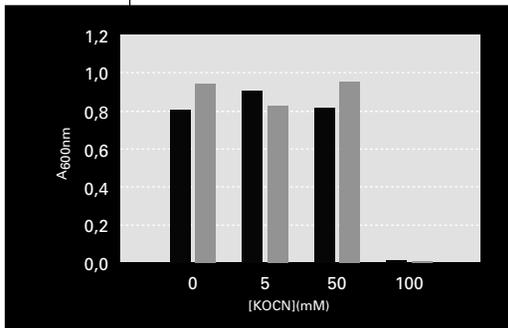
fuente de nitrógeno, la determinación de la toxicidad de este compuesto sobre dicho mutante requería la presencia de una fuente de nitrógeno adicional. Se descartó la utilización de amonio por el efecto represor que esta fuente de nitrógeno ejerce sobre la expresión de genes relacionados con la asimilación de otras fuentes de nitrógeno. Por el contrario, el nitrato no ejerce efecto represor sobre la asimilación de cianato en esta bacteria (resultado mostrado posteriormente). Por lo tanto, el papel de la cianasa en el mecanismo de resistencia se llevó a cabo comparando el crecimiento de la estirpe silvestre y del mutante *cynS*⁻ en medios de cultivo con nitrato 10 mM como fuente alternativa de nitrógeno, y con concentraciones crecientes de cianato. Como se puede observar en el Gráfico 104, concentraciones de hasta 50 mM de cianato no afectaron



al crecimiento máximo del mutante ni de la cepa silvestre, que fue el mismo en los dos casos. A diferencia de cuando el cianato se encontraba como única fuente de nitrógeno (Gráfico 103), en presencia de nitrato, concentraciones iguales o superiores a 100 mM de cianato inhibieron completamente el crecimiento de las dos estirpes.

GRÁFICO 104

Tolerancia a cianato de la cepa silvestre y el mutante *cynS*⁻

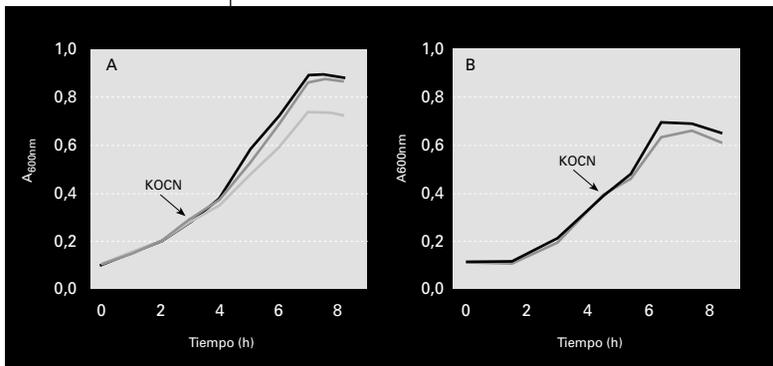


La cepa silvestre (color oscuro) y el mutante *cynS*⁻ (color claro) se cultivaron en medio mínimo (pH 9,5) con KNO₃ 10 mM y acetato 50 mM como fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente, añadiéndose además diferentes concentraciones de cianato. El crecimiento de los cultivos se detuvo a las 48 horas. La A_{600nm} inicial de todos los cultivos fue de 0,05.

Los siguientes experimentos estuvieron encaminados a estudiar, tanto en la estirpe silvestre como en el mutante *cynS*⁻, el efecto inmediato que ejerce la adición de cianato sobre el crecimiento bacteriano. Para ello, células cultivadas en medio mínimo con amonio 10 mM como única fuente de nitrógeno fueron recogidas en la fase exponencial de cre-

GRÁFICO 105

Efecto del cianato en el crecimiento de las estirpes silvestre (A) y mutante *cynS*⁻ (B)



La línea negra representa el crecimiento de un cultivo control al que no se le añadió cianato, mientras que las líneas grises más oscuras y las claras representan la adición de cianato hasta una concentración de 5 mM ó 2 mM, respectivamente. La flecha negra indica el momento de adición del cianato.

cimiento y lavadas en tampón M9 (pH 9,5). Posteriormente las células se resuspendieron en medio fresco M9 con amonio 5 mM a una A_{600nm} de 0,1 y se añadió un pulso de cianato 2 ó 5 mM cuando los cultivos alcanzaron una A_{600nm} de 0,35-0,4. En el Gráfico 105 se observa como la adición de hasta 5 mM de cianato no afectó al crecimiento de ninguna de las dos estirpes.

III.4 Aplicaciones biotecnológicas del metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

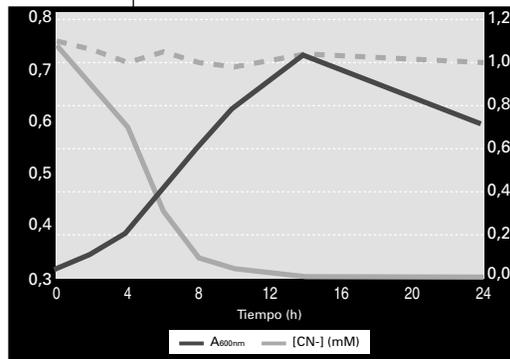
Biodegradación de un residuo cianurado procedente de la industria joyera

Como se expuso en la *Introducción* de este trabajo, la industria joyera utiliza cianuro en varios procesos y genera un residuo tóxico con una concentración muy elevada de cianuro. La presencia de numerosos metales pesados hace que, además de en forma libre, este compuesto se encuentre formando parte de complejos cianuro-metálicos muy recalcitrantes. Para evitar la formación de ácido cianhídrico volátil, este residuo se conserva a un pH alcalino superior a 13. Según la legislación vigente en nuestro país este tipo de residuos son considerados peligrosos, por lo que su liberación al medioambiente debe estar precedida de un proceso de destoxificación.

Aunque actualmente existen diferentes tratamientos físico-químicos de eliminación de cianuro, la descontaminación biológica de residuos cianurados podría constituir una atractiva alternativa a los métodos tradicionales. Por lo tanto, en este apartado se evaluó la capacidad de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 de utilizar el residuo como fuente de

GRÁFICO 106

Utilización del cianuro presente en el residuo por la estirpe CECT5344

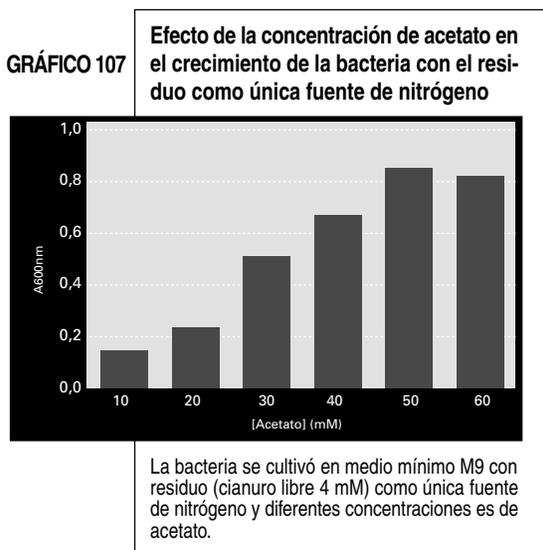


La cepa se cultivó en medio mínimo M9 con amonio 2 mM como fuente de nitrógeno y acetato 50 mM. A las 24h se añadió al medio residuo de la joyería a una concentración de cianuro libre de hasta 1 mM. La línea discontinua representa la concentración de cianuro libre en un experimento control sin inocular.

nitrógeno con vistas a una posible aplicación biotecnológica.

La estirpe bacteriana CECT5344 aislada en este trabajo creció utilizando el cianuro que contiene el residuo de la joyería, convenientemente diluido y a pH alcalino (pH 9,5), como única fuente de nitrógeno (Gráfico 106). La fuente de carbono utilizada fue acetato.

Como se describió en el capítulo 1, la utilización de un inóculo pequeño en la degradación del residuo ocasionó una pérdida de HCN de hasta el 50% del cianuro inicial (Gráfico 19). Sin embargo, el residuo añadido a células cultivadas previamente en amonio 2 mM (pH 9,5) fue rápidamente consumido, evitando cualquier pérdida de cianuro por volatilización. En estas condiciones la bacteria presentó una fase de latencia algo mayor de 3 h, momento a partir del cual aumentó la velocidad de crecimiento y el consumo de cianuro. Mientras que en este cultivo el cianuro desapareció completamente en 9 h, en un experimento control sin inocular la concentración inicial de cianuro libre se mantuvo constante durante 18 h.

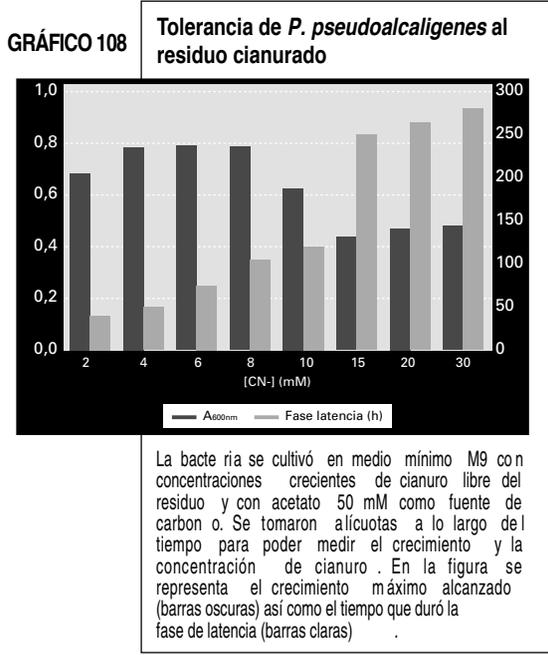


Puesto que la concentración de cianuro libre es conocida, pero no siempre la concentración de cianuro unido a metales, se diseñó el siguiente experimento para determinar la concentración mínima de fuente de carbono necesaria para la completa biodegradación de una cantidad fija de cianuro libre del residuo (4 mM). Se eligió esta concentración porque fue la

concentración de amonio a partir de la cual no se observó aumento del crecimiento con 50 mM de acetato como fuente de carbono (Gráfico 26). Como se observa en el Gráfico 107, el crecimiento máximo alcanzado por la bacteria fue mayor a medida que aumentaba la concentración de acetato, saturándose a una concentración de 50 mM. Esta misma concentración

de acetato fue la mínima a la cual la bacteria consumió completamente todo el cianuro libre.

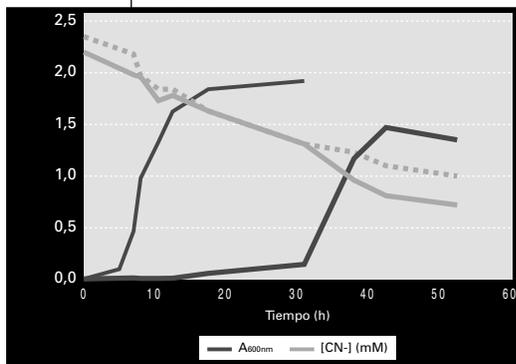
Para diseñar un proceso biotecnológico de biodegradación resulta de gran interés conocer el rango de tolerancia del microorganismo. En este sentido, y con el fin de conocer la resistencia de la estirpe CECT5344 al residuo cianurado, la bacteria se cultivó en medio mínimo con cantidades crecientes de éste como única fuente de nitrógeno, manteniendo fija la concentración de la fuente de carbono (acetato 50 mM) (Gráfico 108).



La bacteria toleró hasta 30 mM de cianuro procedente del residuo, si bien a esta concentración, la fase de latencia, que en general aumentó con la concentración de cianuro, fue de 250 h. Al igual que se demostró en el apartado anterior, la relación C/N a la que se obtuvo mayor crecimiento fue 50/4. Concentraciones de cianuro superiores a 8 mM afectaron negativamente al crecimiento. La resistencia de la estirpe CECT5344 al residuo también se estudió en medio rico. La bacteria se inoculó en medio LB en presencia o ausencia del residuo cianurado, utilizando una concentración de cianuro libre de 4 mM (Gráfico 109). Para evitar la pérdida de cianuro en forma de HCN el pH del medio se ajustó a pH 9,5.

GRÁFICO 109

Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* en medio rico en ausencia y presencia del residuo



La cepa se cultivó en medio rico (LB) en presencia (líneas gruesas) o ausencia (líneas finas) del residuo (cianuro libre 4 mM). Como control de la evaporación se utilizó un medio sin inocular (línea discontinua).

En medio LB, la fase de latencia en presencia del residuo se incrementó considerablemente respecto al cultivo control, aumentando de 7 a 30 h. Aparte de esto, la curva de crecimiento fue similar en ambos casos, si bien el crecimiento máximo en presencia de cianuro fue ligeramente inferior (aproximadamente 2/3 del alcanzado en el cultivo control). Al igual que se observó con NaCN, en estas condiciones la bacteria fue incapaz de asimilar el cianuro libre del residuo.

Biodegradación de cianuro en un biorreactor

Con el objetivo de desarrollar a escala industrial un proceso de biorremediación del residuo de la joyería, se llevaron a cabo experimentos de biodegradación de cianuro con *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en un biorreactor operando tanto de forma discontinua como continua.

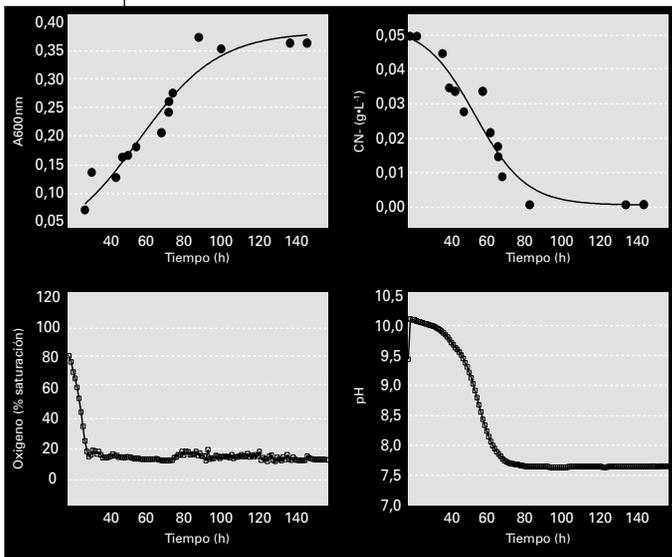
Operación en cultivo discontinuo

Previamente a la degradación de cianuro en modo continuo, se realizaron experimentos trabajando de forma discontinua. Fundamentalmente se estudió la degradación de cianuro a pH alcalino, con y sin control de pH, y los rendimientos celulares obtenidos en el biorreactor. Considerando que la utilización de un pH alcalino es un requisito para llevar a cabo

de forma eficiente la descontaminación biológica de cianuro, se estudió la degradación de este compuesto por la estirpe CECT5344 en medio mínimo a un pH inicial de 10, pero sin control posterior del pH. En estas condiciones cabe esperar una acidificación del medio debido a su carbonatación por el CO_2 procedente del aire, que es equivalente a la adición de ácido carbónico. Por lo tanto, para minimizar la entrada de aire y evitar de este modo la pérdida de cianuro por arrastre del mismo en forma de HCN, es importante indicar que la concentración de oxígeno a partir de las 40 h se fijó en un 10% de su porcentaje de saturación. En estas condiciones el microorganismo creció rápidamente provocando una eliminación de cianuro, que fue paralela al crecimiento (Gráfico 110). De forma simultánea al consumo de cianuro y al crecimiento de la bacteria, se produjo una disminución del pH, estabilizándose finalmente en un valor de 7,6.

GRÁFICO 110

Degradación de cianuro por *P. pseudoalcaligenes* en un biorreactor



La bacteria se cultivó previamente en medio mínimo M9 con amoníaco 2 mM como fuente de nitrógeno. Pasadas 24 horas, se añadió NaCN 2 mM, midiéndose a partir de este momento el crecimiento, la concentración de cianuro, la saturación de oxígeno y el pH del medio.

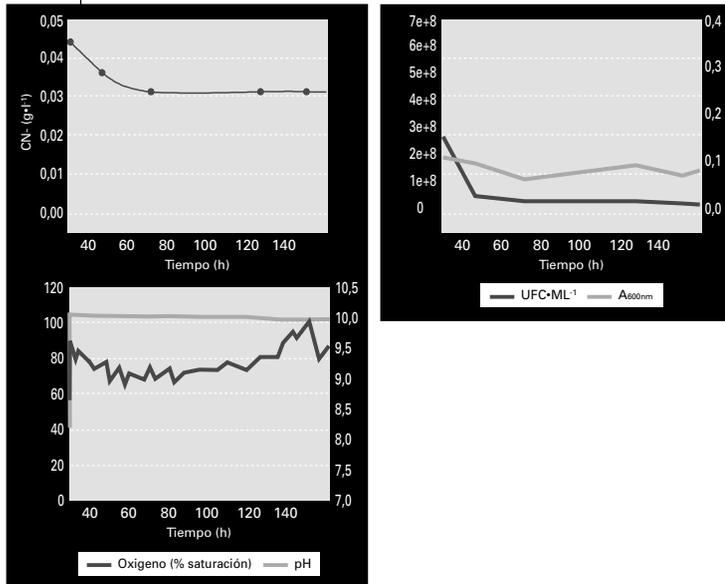
Para evitar la disminución del pH durante el consumo de cianuro y el consiguiente riesgo de formación de HCN, se llevó a cabo un experimento en condiciones alcalinas (pH 10) manteniendo el pH de forma automática.

Como se puede observar en el Gráfico 111, a diferencia de los experimentos realizados sin control de pH, la eliminación de cianuro tan sólo fue del 30% aproximadamente. En estas condiciones el crecimiento fue muy escaso, igual que el consumo de oxígeno, lo que parece apuntar que el cianuro desapareció de forma abiótica.

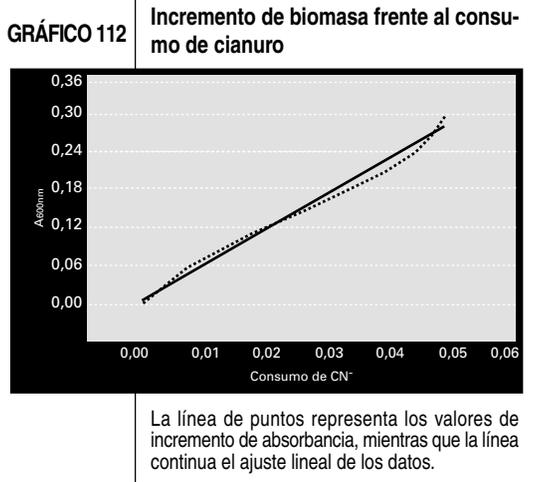
La estimación de los parámetros cinéticos y de rendimiento, en el caso en el que se consigue eliminar por completo el cianuro del medio, se realizó mediante el ajuste de los datos experimentales a una ecuación sigmoideal. Al comparar el incremento de biomasa frente al consumo de sustrato, se puede determinar el rendimiento para el sistema (Y_{XS}). En el Gráfico 112, donde se representa el aumento de absorbancia frente al consumo de cianuro, se observa que la relación es constante a lo largo de todo el experimento, lo que permite realizar un ajuste lineal. De la pendiente de dicho ajuste se obtiene un valor para $Y_{XS} = 5,6$ U absorbancia / g CN⁻.

GRÁFICO 111

Degradación de cianuro a pH por *P. pseudoalcaligenes* en un bio-reactor



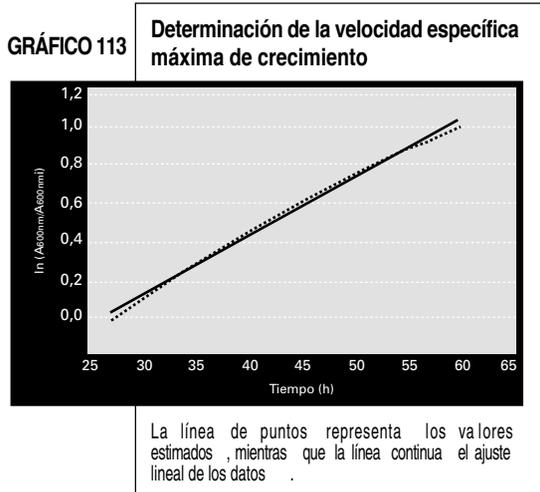
La bacteria se cultivó previamente en medio mínimo M9 con amonio 2 mM como fuente de nitrógeno. Pasadas 24 horas, se añadió hasta 2 mM de NaCN, monitorizándose a partir de este momento la concentración de cianuro, el crecimiento y la saturación de oxígeno. El pH del medio se mantuvo en un valor de 10 de forma automatizada.



Por otro lado, suponiendo una cinética de primer orden para la fase exponencial de crecimiento ($r_x = \mu \cdot X$), y teniendo en cuenta que hasta las sesenta horas aproximadamente no existen limitaciones al crecimiento de la población, salvo la propia concentración de microorganismos viables, se puede considerar que $\mu \approx \mu_{\text{máx}}$, siendo $\mu_{\text{máx}}$ la velocidad específica máxima de crecimiento de la población. De esta forma, una vez integrado el balance de células viables, despreciando la muerte celular, se obtiene:

$$\ln \left(\frac{X}{X_i} \right) = \mu_{\text{máx}} \cdot t$$

El Gráfico 113 presenta los datos del Gráfico 110 utilizando la ecuación anterior. La regresión lineal de los datos suministra, a través del valor de la pendiente, la estimación de la velocidad específica máxima de crecimiento. Empleando la absorbancia, el valor obtenido fue de $0,03 \text{ h}^{-1}$, mientras

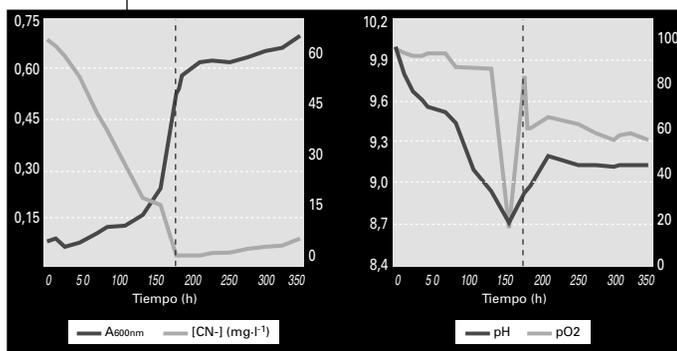


que cuando se utilizaron las unidades formadoras de colonias o el peso seco para medir la biomasa los valores fueron similares, 0,034 y 0,04 h⁻¹ respectivamente (no mostrado). El tiempo de duplicación del cultivo en estas condiciones fue de unas 23 h.

Operación en cultivo continuo

Tras los experimentos en cultivo discontinuo con cianuro sódico, se llevó a cabo un ensayo de biodegradación del residuo en el biorreactor operando de forma continua en condiciones alcalinas (pH inicial de 10) y sin control posterior del pH. En primer lugar el biorreactor funcionó de forma discontinua hasta que la bacteria consumió todo el cianuro libre. A partir de este momento se comenzó a suministrar de forma continua medio mínimo con acetato y residuo (80 mg·l⁻¹ de cianuro libre). Como se puede observar en el Gráfico 114, *P. pseudoalcaligenes* experimentó una fase de latencia de aprox. 100 h, tiempo durante el cual desapareció prácticamente la mitad del cianuro y disminuyó el pH hasta 8,8. De forma paralela al crecimiento se produjo una disminución drástica de O₂ en el medio, señal de una elevada actividad metabólica. Durante las 175 h que se mantuvo el fermentador operando de forma continua, el crecimiento aumentó ligeramente (0,1 unidades de A_{600nm}), la pO₂ disminuyó de forma suave y la concentración de cianuro libre en el efluente fue prácticamente cero. Tan sólo en las últimas 60 h la concentración aumentó hasta 5 mg·l⁻¹. Curiosamente, el pH del medio se mantuvo constantemente en un valor de 9,1, el pH óptimo de crecimiento de la estirpe CECT5344.

GRÁFICO 114 Biodegradación del residuo en un biorreactor operando de forma continua



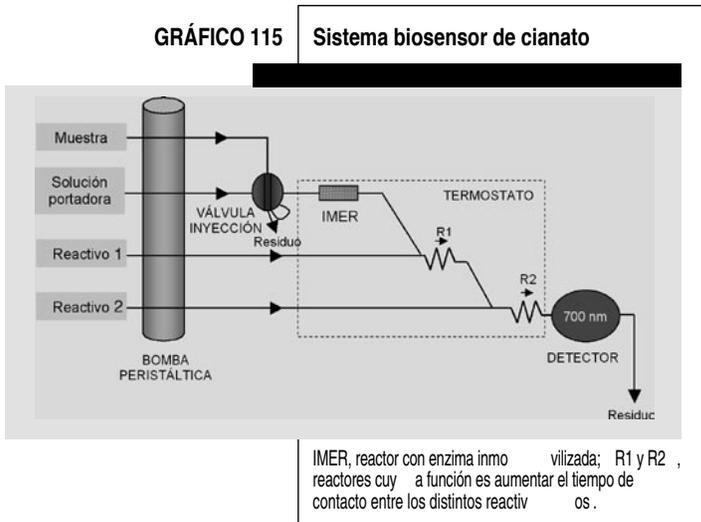
P. pseudoalcaligenes se inoculó en 3,5 l de medio mínimo, conteniendo acetato 50 mM y residuo (80 mg·l⁻¹ de cianuro libre) como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. El biorreactor operó de forma discontinua durante 175 h (línea discontinua), momento a partir del cual pasó a operar de forma continua (flujo: 1,6 ml·min⁻¹). En este momento la saturación de O₂ se aumentó hasta el 80%.

Construcción de un biosensor de cianato

En este apartado se recoge el desarrollo de un biosensor de cianato basado en un sistema de inyección de flujo (FI) acoplado a un reactor enzimático que contiene la cianasa inmovilizada de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

Descripción del dispositivo

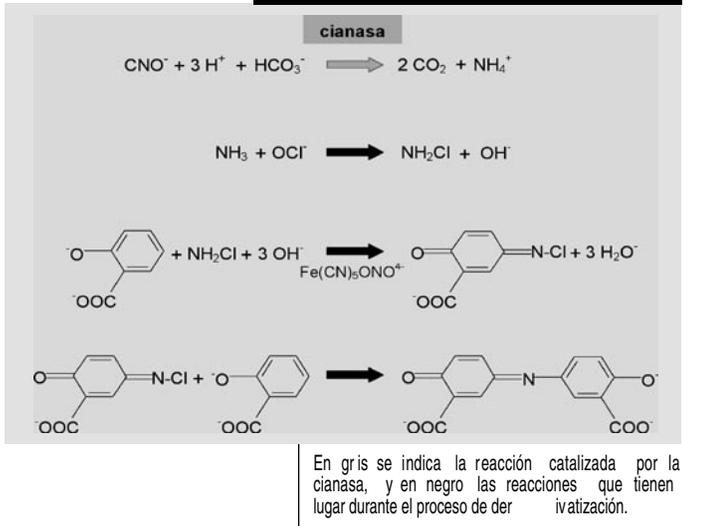
El dispositivo empleado (Gráfico 115) consiste en una bomba peristáltica y un sistema de tubos a través de los cuales son impulsadas varias soluciones (muestra, solución portadora, reactivo 1 y reactivo 2). Una válvula de inyección permite el paso de la muestra, contenida en un bucle, a través del reactor con la enzima inmovilizada (IMER). En presencia de la cianasa, la muestra con cianato junto con el bicarbonato suministrado por la solución portadora generan amonio, el cual es detectado posteriormente mediante una reacción de derivatización basada en un método modificado



de Berthelot. Esta reacción, que tiene lugar al confluir el amonio con los reactivos 1 y 2 en sus respectivos reactores (R1 y R2), produce 2,2-dicarboxiquinonacloramina, compuesto que absorbe a 700 nm (Gordon *et al.*, 1978; Berthelot, 1859). Las reacciones químicas implicadas en el sistema biosensor se representan en el Gráfico 116.

GRÁFICO 116

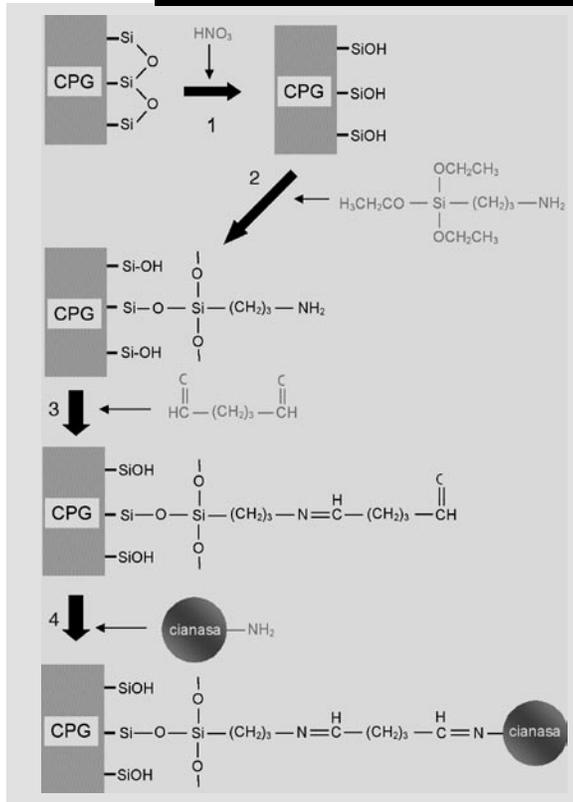
Reacciones (bio)químicas implicadas en el biosensor

*Inmovilización de la cianasa*

Con el objetivo de utilizar la enzima cianasa en la construcción del biosensor, ésta se purificó parcialmente a partir de *P. pseudoalcaligenes* según se ha descrito en el *Capítulo III*. Tras esta purificación se obtuvieron dos fracciones con distinto grado de pureza, una primera que sólo había sido sometida a tratamiento térmico, y una segunda que además fue sometida a cromatografía de intercambio iónico. Ambas preparaciones enzimáticas fueron utilizadas para inmovilizar la cianasa de forma covalente en vidrio de poro controlado, proceso que no inhibió la actividad de la enzima (Gráfico 117).

GRÁFICO 117

Procedimiento de inmovilización covalente de la cianasa en vidrio de poro controlado.

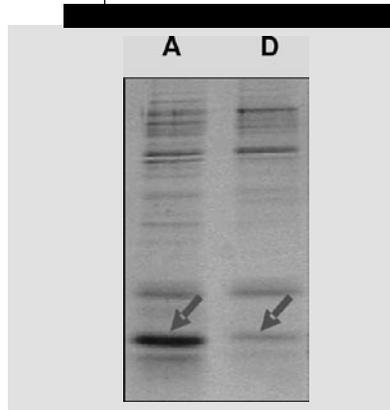


Los diferentes pasos de inmovilización se detallan en el apartado de *Materiales y Métodos*.

La eficiencia del proceso de inmovilización, determinada según la actividad enzimática presente en la fracción que contenía la cianasa antes y después de la inmovilización, fue del 95%. Tras someter a electroforesis SDS-PAGE las fracciones enzimáticas utilizadas antes y después de la inmovilización, se observó que la banda correspondiente a la cianasa prácticamente desapareció después del proceso de inmovilización, lo que confirmó el valor obtenido anteriormente (Gráfico 118).

GRÁFICO 118

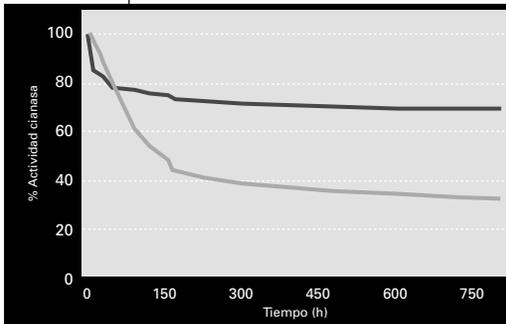
Visualización del proceso de inmovilización de la cianasa



La fracción enriquecida con la cianasa, antes (A) y después (D) de la inmovilización, fue sometida a electroforesis SDS-PA GE. En cada calle se cargaron 13 mg de proteína. Las flechas indican la banda correspondiente a la cianasa.

GRÁFICO 119

Estabilidad de la cianasa inmovilizada durante la utilización del biosensor



Se construyeron dos IMER, uno con enzima parcialmente purificada mediante dos pasos de purificación (oscura) y otro con extracto hervido (clara). Ambos IMER se utilizaron esporádicamente durante 800 h para la determinación por triplicado de un patrón de cianato 0,5 mM. Entre cada medida los IMER se conservaron a 4 °C.

Una característica muy importante que deben cumplir las enzimas inmovilizadas destinadas a su utilización en biosensores es poseer una elevada estabilidad a lo largo del tiempo. Para estudiar la estabilidad de la cianasa inmovilizada se construyeron 2 IMER (con extractos que contenían la cianasa con dos grados diferentes de purificación) y se ensayaron varias veces a lo largo de 800 h. En

el Gráfico 119 se puede observar como el IMER que contenía la cianasa más purificada experimentó inicialmente una brusca pérdida de actividad, estabilizándose a partir de las 300 h con una actividad en torno al 40% de la

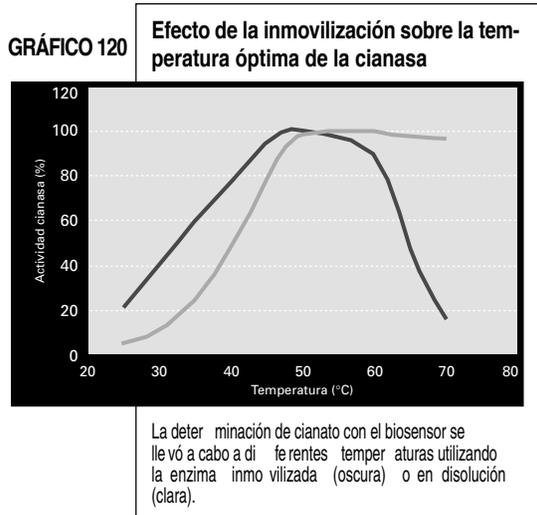
actividad inicial. Este proceso parece indicar que el proceso de inactivación es inespecífico, y que la presencia de otras proteínas protege a la cianasa. En el caso del IMER que contenía el extracto sólo tratado térmicamente la disminución inicial de actividad fue del 25%, manteniéndose estable a partir de las 150 h. La actividad específica del primer IMER fue de 107,5 $U \cdot g^{-1}$, mientras que la del segundo fue 12,5 $U \cdot g^{-1}$.

Con objeto de estudiar el efecto de la inmovilización sobre la temperatura óptima de la cianasa se llevó a cabo la determinación de cianato con el biosensor a diferentes temperaturas, utilizando la enzima inmovilizada en un IMER o en disolución, en este último caso la enzima se añadió a la solución portadora.

En ambos casos la actividad enzimática aumentó desde los 25 hasta los 50 °C, temperatura a la cual la actividad fue máxima (Gráfico 120). Sin embargo, el intervalo de temperatura en el que la enzima presentó su máxima actividad fue mayor cuando se utilizó la enzima en disolución (de 50 a 70 °C). Con la enzima inmovilizada, dicho intervalo sólo estuvo comprendido entre 45 y 57 °C. A los 70 °C, la actividad relativa de la enzima inmovilizada fue del 18%, mientras que la de la enzima en disolución fue del 97%.

Optimización de variables

Las variables que afectaban al sistema se optimizaron mediante un análisis univariante, en el cual primero se analizaron las condiciones óptimas de la reacción de derivatización y posteriormente con el IMER incluido en el sistema. El Cuadro 17 presenta todas las variables que potencialmente pueden influir en el método, agrupadas en físicas, químicas e hidrodinámicas, incluyendo los intervalos estudiados y el valor óptimo de cada variable.



CUADRO 17		Optimización de las variables experimentales		
Tipo	Variable	Intervalo estudiado	Valor óptimo	
Física	Temperatura (°C)	25-80	50	
Hidrodinámicas	Flujo (ml·min ⁻¹)	0.3-1.6	0.5	
	Volumen muestra (μl)	100-500	200	
	Longitud reactor 1 (cm)	50-500	100	
	Longitud reactor 2 (cm)	50-500	250	
Químicas	Tampón			
	NaH ₂ PO ₄ (mmol·l ⁻¹)	10-200	50	
	Na ₂ HCO ₃ (mmol·l ⁻¹)	1-40	3	
	pH	7-9	8	
	Reactivo 1			
	Salicilato sódico (mmol·l ⁻¹)	1-50	5	
	Nitroprusiato sódico (mmol·l ⁻¹)	1-25	5	
	Reactivo 2			
	Hipoclorito sódico (mmol·l ⁻¹)	1-50	25	
	Hidróxido sódico (mmol·l ⁻¹)	-	200	

Fuente: Elaboración propia.

Características del método

Las características del método (Cuadro 18) se determinaron usando IMERs con los dos estados de purificación de la cianasa, y utilizando los valores óptimos de las variables estudiadas previamente. Para ello se realizaron dos rectas de calibrado con patrones de cianato de diferente concentración, los cuales fueron inyectados en el sistema por triplicado. Como se puede observar, el método mostró diferentes rangos lineales en función del extracto utilizado; la sensibilidad, expresada como la pendiente de la recta de calibrado, aumentó un 100% cuando se utilizó la cianasa más pura (1,54 l·μmol⁻¹·cm⁻¹ frente a 0,64 l·μmol⁻¹·cm⁻¹).

La precisión del método, definida tanto por la reproducibilidad como por la repetitividad del sistema, se determinó con un IMER que contenía la cianasa más pura y con dos concentraciones diferentes de cianato (12,33 y 308,25 μmol·l⁻¹). Los resultados obtenidos mediante el análisis de la varianza (ANOVA) (Cuadro 19), muestran que, para ambas concentraciones de cianato, los valores *p* del test *F* fueron mayores de 0,05, lo que indica que no se observó ninguna diferencia significativa entre ninguna pareja de medias (nivel de confianza 95%).

CUADRO 18 Características del método

Características	Cianasa ¹	Cianasa ²
Ecuación ^a	$Y=6,71(\pm 4,8)+0,64(\pm 0,02)X$	$Y=7,52(\pm 2,9)+1,54(\pm 0,02)X$
$R^2(n=7)$	0,9979	0,9992
Rango lineal ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	1,23-616,5	1,073-308,25
Límite detección ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,750	0,519
Límite cuantificación ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	2,15	1,73
Covarianza	119,04	61,78
$_x/y$	4,86	3,51

1. Cianasa purificada en un solo paso.
 2. Cianasa purificada en dos pasos.
 - a. Y representa la absorbancia y X la concentración de cianato.
 - b. Calculado como 3σ la desviación de la señal del blanco.
 - c. Calculado como 10σ la desviación de la señal del blanco.
- Fuente: Elaboración propia.

CUADRO 19 Resultados del análisis de la varianza

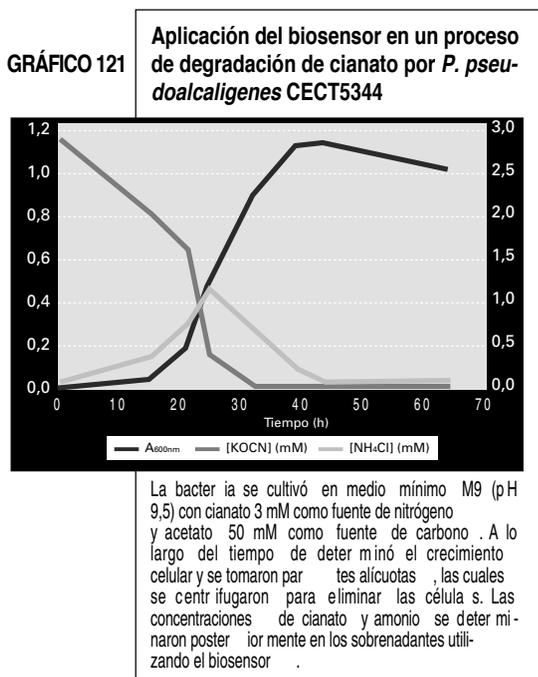
Nivel	Fuente	Suma de cuadrados	Df	Media de Cuadrados	F-Ratio	Valor P
Bajo	Entre grupos	15,2638	6	2,54396	0,76	0,6040
	Dentro de grupos	93,1785	28	3,3278		
	Total (correlación)	108,442	34			
Alto	Entre grupos	118,415	6	19,7358	2,11	0,0948
	Dentro de grupos	196,133	21	9,33965		
	Total (correlación)	314,548	27			

Fuente: Elaboración propia.

Entre las posibles sustancias que podrían interferir en este método destacan el cianuro, el amonio y algunos metales pesados, compuestos todos ellos presentes muy frecuentemente en las muestras que contienen cianato. La resistencia de la enzima a amonio y cianuro (*Capítulo III, apartado 1.2.*), junto con su especificidad hacia el cianato, posibilitaron una total insensibilidad del sistema a estos compuestos. A pesar de la no inhibición del amonio sobre la actividad cianasa, este compuesto podría hacer sobreestimar la concentración real de cianato. En este sentido, la presencia de un cortocircuito que evitase el paso de la muestra por el IMER evitaría este problema. Por último, la frecuencia de muestreo bajo condiciones óptimas fue de 15 muestras $\cdot\text{h}^{-1}$.

Aplicación del biosensor

Para comprobar la efectividad del método, éste se aplicó a la medida de cianato en un proceso de biorremediación con *P. pseudoalcaligenes* (Gráfico 121). La bacteria se cultivó en medio mínimo M9 (pH 9,5) con cianato 3 mM y acetato 50 mM como fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente, determinándose la concentración de cianato y amonio mediante el sistema biosensor desarrollado. La aplicabilidad analítica del método también fue validada por estudios de recuperación, en los que se determinó la concentración de cianato en muestras obtenidas del experimento anterior tras la adición a éstas de 2 concentraciones conocidas de cianato (12,3 y 246,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Cuadro 20). Los valores obtenidos oscilaron entre el 85,9 y el 97,4%.



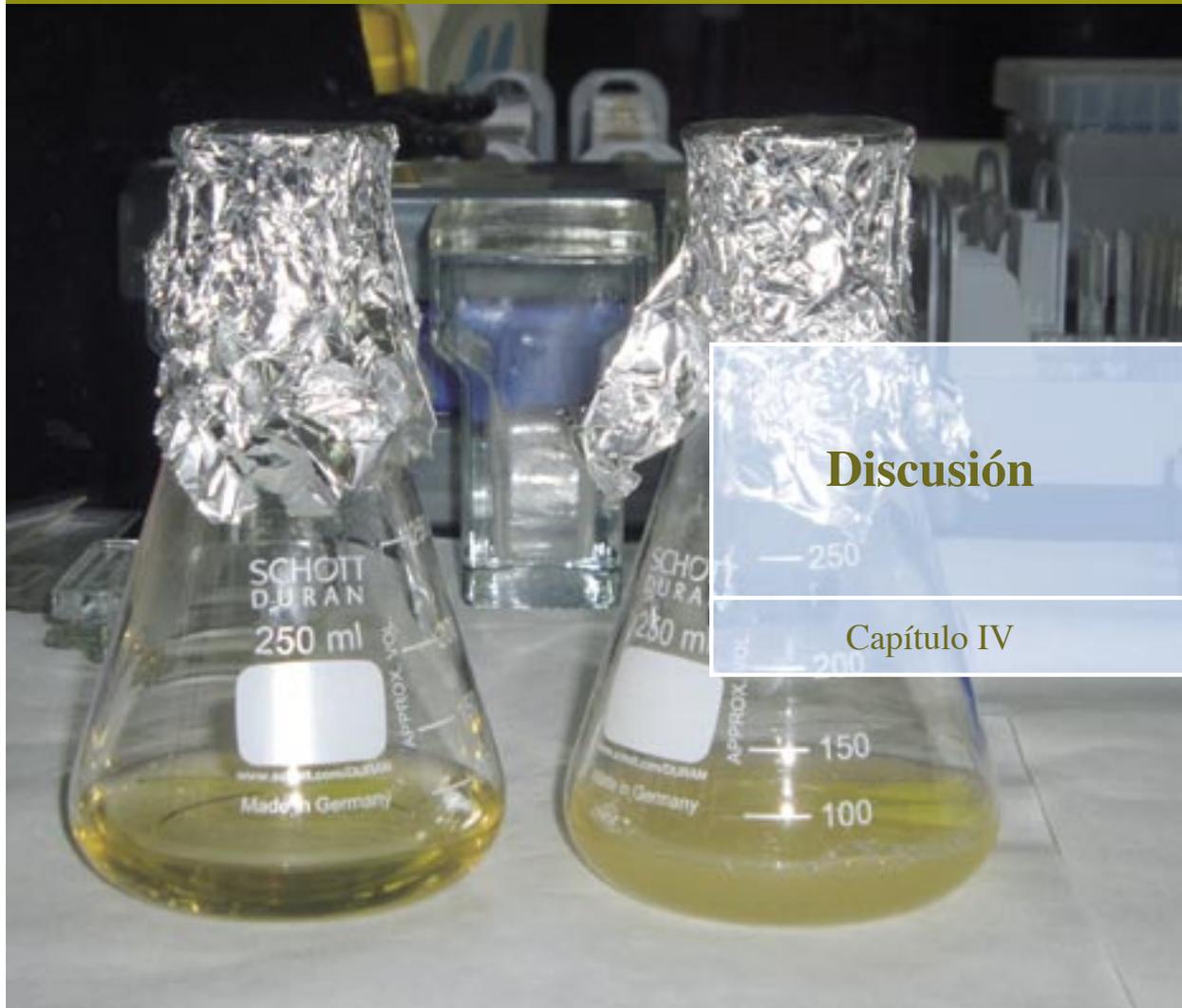
CUADRO 20 Aplicación del método

Muestra	Tiempo (h)	Factor de dilución	[CNO ⁻] ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) ^a	[CNO ⁻] encontrada ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) ^a	Recuperación (%) ^b	
					Adición 1	Adición 2
1	24,5	250	0,307	123,3	97,4	95,3
2	32,0	125	0,038	308,3	85,9	93,5

a. Concentración de cianato de acuerdo con la figura 4.7.

b. Las adiciones 1 y 2 representan 12,3 y 246,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, respectivamente.

Fuente: Elaboración propia.



Discusión

Capítulo IV

IV. DISCUSIÓN

El cianuro es una molécula conocida principalmente por su toxicidad, una característica que ha sido aprovechada por algunos organismos, fundamentalmente las plantas, para utilizar este compuesto como arma defensiva frente a posibles agresores. No obstante, este tóxico posee una gran importancia para la vida, tanto por su posible implicación en el origen prebiótico de las bases nitrogenadas como por su utilización como sustrato nitrogenado por un gran número de microorganismos. El cianuro también es un compuesto de una gran relevancia social, ya que su uso en multitud de procesos industriales lo han convertido en un compuesto crucial en la sociedad moderna. Sin embargo, su frecuente utilización genera en ocasiones graves problemas de contaminación. Una de las actividades industriales generadora de residuos contaminados con cianuro es la joyería. A pesar de que existen varios tratamientos físico-químicos de eliminación de cianuro, ninguno de ellos está exento de graves inconvenientes. Aprovechando la capacidad de asimilación de cianuro de algunos microorganismos, la biodegradación de cianuro podría suponer una atractiva alternativa a los métodos tradicionales.

Este trabajo comenzó con el aislamiento y caracterización de una bacteria capaz de degradar cianuro en condiciones alcalinas, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. A continuación se estudiaron varios aspectos del proceso, como la resistencia a cianuro, el sistema de adquisición de metales necesario en presencia de dicho compuesto y la ruta por la que esta estirpe degrada cianuro. Todos estos estudios están encaminados a la aplicación de *P. pseudoalcaligenes* en la descontaminación de residuos industriales cianurados, entre los que se encuentran los procedentes de la industria joyera de Córdoba. Como primer paso se han realizado pruebas muy prometedoras en colaboración con el Dr. Isidoro García, del Departamento de Ingeniería Química de la UCO, que muestran como a escala de laboratorio se puede conseguir la completa eliminación del cianuro libre presente en el residuo de la joyería. Además, las enzimas implicadas en los diferentes procesos podrían constituir la parte biológica en la construcción de biosensores, y como ejemplo se ha diseñado un biosensor de cianato basado en la cianasa de la bacteria, bajo la supervisión de la Dra. Luque de Castro, del Departamento de Química Analítica de la UCO.

IV.1 Aislamiento de una cepa bacteriana capaz de degradar cianuro en condiciones alcalinas

A pesar de su toxicidad, el cianuro es un compuesto natural ampliamente utilizado como fuente de nitrógeno por numerosos microorganismos (Ebbs, 2004; Dubey y Holmes, 1995; Raibuck 1992; Knowles, 1976). Probablemente, el origen prebiótico de esta molécula ha permitido su coexistencia con los seres vivos desde el origen de la vida, posibilitando así el desarrollo de mecanismos de resistencia y rutas asimiladoras en multitud de organismos. La capacidad de degradación de cianuro que presentan muchos hongos y bacterias se ha estudiado ampliamente, con el objetivo de su aplicación en procesos de biorremediación. Sin embargo, la mayoría de los trabajos realizados sobre degradación biológica de cianuro se han llevado a cabo a pH neutro y utilizando glucosa como fuente de carbono, condiciones que limitan o pueden sobrevalorar el rendimiento del proceso. Como se adelantó en la *Introducción* de este trabajo, la proporción HCN/CN^- depende fundamentalmente del pH. El elevado pK_a del cianuro (9,2), junto con su bajo punto de ebullición, implica que a pH neutro o ácido este compuesto se volatiliza en forma de ácido cianhídrico (HCN), proceso altamente peligroso que provoca contaminación atmosférica y que compite con la biodegradación. En cuanto a la utilización de glucosa, según la reacción de Killiani todo azúcar reductor puede producir amonio en presencia de cianuro. Por lo tanto, en presencia de glucosa la degradación de cianuro es un proceso químico independiente de la presencia del organismo en estudio. En resumen, desde el punto de vista químico la eliminación biológica de cianuro requiere unas condiciones alcalinas y una fuente de carbono incapaz de reaccionar químicamente con el cianuro. Por este motivo se exigió, como requisito previo, el aislamiento de una bacteria alcalófila capaz de degradar cianuro con una fuente de carbono adicional diferente de la glucosa. Mediante un medio con NaCN y acetato a pH 9,5, y utilizando como inóculo lodos recogidos de la margen izquierda del río Guadalquivir tras su paso por Córdoba, se ha aislado una bacteria capaz de degradar cianuro. Esta bacteria se ha identificado como *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, y la estirpe se ha depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número 5344. *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria alcalófila (Gráfico 16), capaz de tolerar un pH extremadamente alcalino (hasta 11,5). Probablemente como un mecanismo de tolerancia a pH desfavorables, esta bacteria es capaz de modificar el pH del medio aproximándolo a su pH óptimo de crecimiento (Gráfico 17). Mientras que el pH óptimo de crecimiento de las bacterias puede variar entre valores ácidos y básicos, el pH intracelular debe permanecer próximo a la neutralidad para evitar la desnaturalización

de las macromoléculas celulares que son muy sensibles a valores de pH extremos (Madigan et al., 2004). En varias estirpes alcalófilas del género *Bacillus* se ha descrito que su pH intracelular es aproximadamente 8 (Horikoshi, 1999). Si bien existen técnicas específicas de determinación del pH intracelular, este valor puede ser estimado a partir del pH óptimo de las enzimas intracelulares (Horikoshi, 1999). En este sentido, el pH óptimo de varias enzimas de *P. pseudoalcaligenes* (cianasa 8,5; serina deshidratasa 8,5; nitrilasa 9) parece indicar que el pH intracelular de esta bacteria podría encontrarse próximo a 8,5.

P. pseudoalcaligenes utiliza cianuro como única fuente de nitrógeno, pero no como única fuente de carbono. Este hecho, recogido extensamente en la bibliografía (Adjei y Ohta, 1999; Harris y Knowles, 1983), puede ser debido a que el número de oxidación del C y del N en la molécula de cianuro es C(+II) y N(-III), el equivalente al CO y al NH₃, respectivamente. Desde este punto de vista el cianuro puede ser una buena fuente de nitrógeno, pero una pobre fuente de carbono para un organismo aeróbico heterótrofo. De hecho, tan sólo se ha descrito la utilización de cianuro como fuente de carbono y nitrógeno en condiciones anaeróbicas por bacterias fijadoras de nitrógeno y metanotrofas. Así, la nitrogenasa utiliza el cianuro como un aceptor de electrones alternativo al N₂, produciendo amonio y metano (Liu et al., 1997; Li et al., 1982). Otro factor que puede impedir la utilización de este compuesto como fuente de carbono es la relación carbono/nitrógeno (C/N) de la molécula de cianuro, que es 1, mientras que en la mayoría de los microorganismos la razón C/N de los compuestos intracelulares es 10. En este caso la cantidad de cianuro necesaria para tener una concentración de carbono que permitiese el crecimiento sería tan elevada que resultaría tóxica.

La observación al microscopio electrónico de células cultivadas con NaCN reveló la existencia de unos cuerpos electrodensos con la apariencia típica de gránulos de reserva del tipo de los poli-β-hidroxialcanoatos (Gráfico 15). Por el contrario, dichos acúmulos no se observaron en células cultivadas en amonio o en el residuo de la joyería, éste último con un gran número de complejos cianurados y no limitante en nitrógeno. Puesto que la acumulación de este tipo de material en las células se produce en respuesta a una limitación de nitrógeno u otro nutriente esencial (Reddy et al., 2003), los resultados anteriores parecen indicar que la elevada toxicidad del cianuro emula condiciones de hambre de nitrógeno y, por tanto, produce la acumulación de poli-β-hidroxialcanoatos. Sin embargo, no se puede descartar que la señal reguladora del proceso sea la carencia de otro metabolito esencial, como el hierro. La naturaleza química de

estos polímeros se desconoce, pero en cualquier caso, la síntesis de un compuesto de alto valor añadido en la industria durante la descontaminación de un tóxico supone un atractivo proceso biotecnológico.

IV.2 Metabolismo del cianuro en *P.pseudoalcaligenes* CECT5344

Degradación de cianuro libre y complejos cianuro-metálicos, producción de sideróforos y resistencia a cianuro

En este apartado se describe un proceso de degradación biológica de cianuro mediante *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (bajo Patente Nacional, P200100989), en el que por primera vez se tienen en cuenta dos factores críticos, el pH y la fuente de carbono. La estirpe CECT5344 es capaz de degradar NaCN a pH alcalino (pH 9,5) y con acetato como fuente de carbono, condiciones en las que la pérdida abiótica de cianuro por volatilización o por reacción con otros compuestos del medio es nula (Gráfico 18) (Luque et al, 2004). Entre todos los organismos cianotróficos descritos hasta el momento tan sólo el hongo *Fusarium solani* y la bacteria *Burkholderia cepacia* C3 fueron capaces de degradar cianuro en condiciones alcalinas (Adjei y Ohta, 1999; Dumestre et al., 1997). Sin embargo, en el caso de *B. cepacia*, ésta requiere la presencia de glucosa como fuente de carbono, un azúcar reductor susceptible de producir amonio en presencia de cianuro en condiciones alcalinas (reacción de Killiani, Andrade et al., 1995; Militzer 1949). De hecho, la ausencia de un control no inoculado con glucosa y cianuro en el trabajo donde se describe la degradación de cianuro por esta bacteria sugiere que gran parte del proceso se debe a un fenómeno abiótico (Adjei y Ohta, 1999 y 2000).

En condiciones alcalinas la disolución del CO₂ atmosférico y la consiguiente formación de bicarbonato se encuentran favorecidas, lo que ocasiona una acidificación del medio. A ello hay que restar la alcalinización provocada por la propia evaporación del ácido cianhídrico como consecuencia de la pérdida de un protón por cada molécula de HCN evaporada, aunque en conjunto se produce una acidificación. En los experimentos llevados a cabo con un pequeño inóculo la pérdida de HCN debida a la disminución del pH del medio se ve favorecida por la excesiva fase de latencia (Gráfico 19). Sin embargo, la utilización de cultivos con una biomasa inicial considerable y capaces de degradar el cianuro rápidamente evita el problema de la volatilización de HCN (Gráfico 18).

Además de cianuro libre, *P. pseudoalcaligenes* es capaz de utilizar como fuente de nitrógeno el cianuro presente en algunos complejos cianuro-metálicos, como los formados por el hierro y el cobre (Luque *et al.* 2004). De los Cuadros 28 y 29 se deduce que el complejo $K_2Cu(CN)_4$ es una mejor fuente de nitrógeno que el ferro- y el ferricianuro, aunque ambos son sustratos más pobres que el amonio o el cianuro libre. Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta la estabilidad relativa de los complejos cianurados, ya que el complejo formado por el hierro es mucho más estable que el formado por el cobre. La estabilidad de estos complejos depende del pH, siendo en general más estables a pH alcalino. Curiosamente, la estirpe CECT5344 degrada más rápidamente el ferricianuro a pH 9,5 que a pH 7, al contrario de lo que ocurre con *Fusarium solani*, capaz de usar el ferrocianuro a pH 5 pero no a pH 7 (Barclay *et al.*, 1998). Probablemente el pH óptimo de degradación de los complejos cianuro-metálicos es una situación de compromiso entre la estabilidad del complejo y el pH óptimo de crecimiento de la bacteria. La aparición de hidróxido férrico en cultivos que contienen residuo, así como el mayor crecimiento alcanzado por la bacteria con esta fuente de nitrógeno que con cantidades equivalentes de amonio o NaCN (Cuadro 27), demostraron que *P. pseudoalcaligenes* también es capaz de degradar los complejos presentes en el residuo, principalmente los formados por el hierro.

Uno de los complejos utilizados por *P. pseudoalcaligenes*, el ferrocianuro férrico (Azul de Prusia), es uno de los compuestos más estables y recalcitrantes que se conocen ($K_d=10^{-52}$ M), no existiendo hasta la fecha referencias sobre su biodegradación. La capacidad de la estirpe CECT5344 de utilizar este complejo como única fuente de nitrógeno e hierro (Cuadro 31) únicamente puede ser debida a la producción de sideróforos, compuestos de pequeña masa molecular (<1000 Da) que poseen una gran afinidad por el Fe^{2+} ($K_{af} > 10^{30} M^{-1}$) y otros metales (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003; Andrews *et al.*, 2003; Neilands, 1995; Visca *et al.*, 1992; Neilands, 1981). Los sideróforos, que constituyen un mecanismo de adquisición de hierro altamente eficiente, son sintetizados y liberados al medio únicamente en condiciones limitantes de hierro. Por lo tanto, estos compuestos también deben ser los responsables del suministro de hierro durante el crecimiento de la bacteria en medios alcalinos con elevadas concentraciones de cianuro libre (Cuadro 23) o con bipyridilo y ferrocianuro (Cuadro 30), condiciones todas ellas de limitación de hierro debido a la elevada afinidad del cianuro por metales, a la naturaleza quelante del bipyridilo y a la formación de hidróxidos insolubles de hierro a pH alcalino. A pesar de los numerosos trabajos acerca de la degradación biológica de cianuro, nunca se ha tenido en cuenta

este importante requerimiento, la producción de sideróforos. Mediante el empleo de un medio específico utilizado para detectar sideróforos (CAS), se confirmó que la estirpe CECT5344 produce este tipo de quelantes biológicos (Gráfico 31). La producción de estos compuestos es un hecho muy frecuente entre miembros del género *Pseudomonas*, donde se ha llegado incluso a utilizar su diversidad como una herramienta de identificación (Bultreys et al., 2003; Meyer et al., 2002; Bultreys et al., 2001; Meyer 2000).

La pioverdina y la pioquelina son los dos sideróforos más frecuentes entre las *Pseudomonas*, aunque también se han descrito otros (pseudomonina, quinolobactina, corrugativa, nocardamina y ácido piridina-2,6-ditiocarboxílico) (Cornelis y Matthijs, 2002). En cuanto a la naturaleza química del sideróforo/s producido por *P. pseudoalcaligenes*, inicialmente se planteó la posibilidad de que los α -cetoácidos producidos en respuesta a cianuro (Gráfico 42) actuaran, al igual que se ha descrito en algunas bacterias, como sideróforos (Reissbrodt et al., 1997; Drechsel et al., 1993). Sin embargo, la ausencia de α -cetoácidos en medios sin cianuro y con biperidilo elimina esta posibilidad. Por otro lado, el carácter no fluorescente de la estirpe CECT5344 también desecha la posibilidad de que esta bacteria produzca pioverdina, sideróforo responsable de la fluorescencia de las *Pseudomonas* fluorescentes. Sin embargo, la inducción de la proteína CN0 por NaCN y el residuo de la joyería (Gráfico 70), condiciones ambas de limitación de hierro, sugiere que *P. pseudoalcaligenes* produce un sideróforo estrechamente relacionado con la pioverdina. Esta proteína, identificada como fosforibosilglicinamida formiltransferasa (GART; EC 2.1.2.2), es una enzima involucrada en la síntesis *de novo* de purinas; sin embargo, McMorran et al. (2001) describieron que este tipo de enzimas poseen una gran identidad con la proteína PvdF de *P. aeruginosa* PAO1, que participa en la síntesis de la pioverdina. Concretamente, esta enzima cataliza la formilación de N⁵-hidroxiornitina para dar N⁵-formil-N⁵-hidroxiornitina, un aminoácido presente en la cadena peptídica de la pioverdina. El hecho de que estas dos enzimas posean una actividad catalítica similar, así como el perfil de inducción de la proteína CN0, sugiere que dicha proteína podría participar en la síntesis de un sideróforo peptídico no fluorescente similar a la pioverdina. Este podría ser el caso de la dihidropioverdina, un sideróforo producido por algunas estirpes no fluorescentes de *P. syringae* que difiere de la pioverdina únicamente en el estado de saturación de dos átomos de carbono presentes en el cromóforo (Bultreys et al., 2001). Otros sideróforos distintos a la pioverdina, como la ornibactina y la exoquelina MS, también contienen el derivado aminoácido N⁵-formil-N⁵-hidroxiornitina, por lo que su síntesis también requiere la participación de

una formiltransferasa (Bultreys *et al.*, 2001). La relación de esta proteína con la bioquímica de compuestos monocarbonados también podría sugerir su participación en la ruta de asimilación de cianuro. Sin embargo, su presencia en células cultivadas en medio LB+NaCN, condiciones donde no se produce degradación de cianuro, apoya la hipótesis de que la proteína CN0 participa en la síntesis de sideróforos, ya que la presencia de cianuro siempre implica una limitación de hierro.

FiuA es uno de los 8 receptores de ferrisideróforos presente en la membrana de *P. aeruginosa* y se caracteriza por su especificidad por ferrisideróforos de fuentes heterólogas, concretamente por la ferrioxamina B (Vasil y Ochsner, 1999). En *P. pseudoalcaligenes* la identificación de un gen homólogo a *fiuA* sugiere que, además de sintetizar su/s propio/s sideróforo/s, también posee la capacidad de utilizar sideróforos sintetizados por otros microorganismos.

La toxicidad del cianuro se debe principalmente a la inhibición de metaloproteínas esenciales para diferentes procesos biológicos. Sin embargo, el estudio de un mutante hiperresistente a cianuro obtenido por mutagénesis al azar con el transposón Tn5 parece indicar que la escasez de hierro provocada por elevadas concentraciones de cianuro también podría contribuir de manera indirecta a la toxicidad del cianuro. Estudios preliminares sugieren que este mutante, denominado RC5, libera una mayor cantidad de sideróforos que la estirpe silvestre (resultados no mostrados), mientras que el análisis de la secuencia del DNA adyacente a la inserción del Tn5 mostró que el gen afectado codifica una proteína que contiene un dominio aciltransferasa. El análisis del genoma de *P. aeruginosa*, *P. putida* y *P. syringae* reveló que este gen se encuentra formando parte de una unidad transcripcional junto con otro gen que también codifica una aciltransferasa, por lo que se podría tratar de una enzima heterodimérica que participa en la transferencia de grupos acilo. De forma hipotética se puede sugerir que la síntesis de sideróforos en *P. pseudoalcaligenes* podría compartir con otra ruta biosintética un intermediario común, el cual dependiendo de su estado acilado se dirigiría hacia una u otra ruta. En este sentido, la inactivación de la aciltransferasa provocaría que la forma no acilada se dirigiera de forma mayoritaria hacia la síntesis de sideróforos.

Si bien son necesarios más experimentos para asegurar la función de la enzima afectada en el mutante RC5, el hecho de que éste produzca más sideróforos y de que su resistencia sea más pronunciada con el residuo (Gráfico 67), donde hay un gran número de complejos cianuro-metálicos, sugiere que a elevadas concentraciones de cianuro la escasez de hierro forma parte de los efectos tóxicos del cianuro.

Como se comentó anteriormente, las metaloproteínas son las principales dianas del cianuro en la célula. Además de su importancia cuantitativa, este tipo de proteínas participan en diversos procesos biológicos de gran importancia (fotosíntesis, respiración, etc), lo que argumenta el carácter extremadamente tóxico del cianuro. *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria resistente a cianuro, capaz de tolerar concentraciones muy elevadas (hasta 20 mM de cianuro sódico) (Gráfico 23). Salvo algunas excepciones, este es uno de los mayores niveles de tolerancia a cianuro descritos hasta el momento. Con respecto a la toxicidad de los complejos cianuro-metálicos, al igual que en otros casos, éstos resultan menos tóxicos que el cianuro libre (Gráficos 28 y 29), un hecho motivado por la estabilidad de este tipo de compuestos (Quan *et al.*, 2004; Silva-Avalos *et al.*, 1990). La elevada resistencia a cianuro en condiciones aeróbicas, así como la insensibilidad a azida, un inhibidor de la citocromo *c* oxidasa incapaz de inhibir las oxidasas alternativas hasta ahora descritas, sugieren la presencia de una oxidasa insensible a cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. De hecho, trabajos previos realizados en la Universidad de Extremadura, que participa en el Proyecto de Investigación Coordinado en el que se encuadra la presente Tesis Doctoral, han demostrado la presencia de los genes *cioAB* en *P. pseudoalcaligenes*. Dichos genes, que codifican una oxidasa insensible a cianuro, son homólogos a los descritos en *P. aeruginosa* y *E. coli*, y su mutación provoca un fenotipo de sensibilidad al cianuro (R. Blasco, comunicación personal).

La degradación de cianuro constituye también una forma de detoxificar y conferir resistencia a este compuesto (Knowles, 1976). En *P. pseudoalcaligenes*, la liberación al medio de 2-oxoglutarato inducida por cianuro podría constituir, además de la principal ruta asimiladora de cianuro en esta bacteria, un elemento de resistencia. Este mecanismo consiste en la detoxificación del cianuro mediante la formación de un compuesto no tóxico, la cianhidrina del 2-oxoglutarato. Un mecanismo similar ha sido propuesto en *P. fluorescens* NCIMB 11764, aunque en este caso la resistencia debida a este tipo de compuestos fue algo casual, como indica la ausencia de inducción por cianuro (Kunz *et al.*, 1998).

Además de la toxicidad inherente a la molécula de cianuro, en eucariotas este compuesto provoca la inducción de estrés oxidativo, lo que se convierte en un problema añadido. En este trabajo se muestra como en *P. pseudoalcaligenes*, el cianuro induce la expresión de dos enzimas involucradas en la protección frente a estrés oxidativo (Gráfico 72), tratándose de la primera vez que en bacterias se relaciona el cianuro con este fenómeno. La inducción de estas dos proteínas, una alquil

hidroperóxido reductasa y una proteína de unión a DNA tipo ferritina, cuyas funciones son la degradación de H_2O_2 y peróxidos orgánicos y la protección del DNA frente a especies reactivas de oxígeno (ERO) (Zhao et al., 2002; Vattanaviboon et al., 2002; Dowds, 1994), respectivamente, sugiere que en presencia de cianuro se produce un aumento intracelular de ERO. En condiciones normales, el metabolismo aeróbico genera de forma accidental ERO, principalmente H_2O_2 y O_2^- . En 1999, Messner e Imlay demostraron que en *E. coli* estas especies tóxicas son producidas como consecuencia de la autooxidación de deshidrogenasas respiratorias, como es el caso del complejo II (succinato deshidrogenasa), por lo que el aumento de ERO en la estirpe CECT5344 podría ser debido al retroceso del flujo electrónico hacia el complejo II ocasionado por el efecto inhibitor del cianuro sobre el complejo IV de la cadena de transporte electrónico. La inducción de la alquil hidroperóxido reductasa, una enzima ampliamente distribuida entre bacterias y que no posee metales en su centro activo (Vattanaviboon et al., 2003; Mongkolsuk y Helmann, 2002; Seaver y Imlay, 2001), también podría ser debida a una posible inhibición por cianuro de la metaloenzima catalasa, principal responsable de la resistencia a H_2O_2 y cuya inhibición por cianuro se ha descrito en algunos organismos (Kanthasamy et al., 1997). De esta forma, la alquil hidroperóxido reductasa constituiría un sistema alternativo de destoxificación de H_2O_2 resistente a cianuro.

El estrés oxidativo ocasionado por el cianuro en *P. pseudoalcaligenes* también podría ser el responsable de la inducción en medio rico de la proteína de choque térmico CN4 (Gráfico 79). Este tipo de proteínas, que actúan como chaperonas moleculares, parecen formar parte de una adaptación celular general a estrés, ya que son inducidas no sólo por elevadas temperaturas, sino también por diferentes tipos de estrés (Laksanalamai y Robb, 2004). Por ejemplo, se ha descrito que condiciones de estrés oxidativo inducen o activan algunas proteínas de choque térmico (Hsp33), las cuales actúan sobre las proteínas dañadas por las ERO (Ruddock y Klappa, 1999; Dukan y Nystrom, 1998). En *P. pseudoalcaligenes*, la proteína CN4 que se encuentra asociada a la membrana plasmática, lugar donde se generan ERO, podría desempeñar una función similar, aunque no se descarta su participación en el plegamiento de otro tipo de proteínas.

Ruta de degradación de cianuro y control de su metabolismo en *P. pseudoalcaligenes*

La degradación de cianuro puede tener un carácter tanto asimilador como destoxificador, aunque en algunos casos la ausencia de una ruta degradativa completa impide la utilización de este compuesto como fuente de nitrógeno. Este es el caso de algunos hongos fitopatógenos

que destoxifican el cianuro hidratándolo hasta formamida, que es menos tóxica que el cianuro, pero son incapaces de utilizar cianuro como fuente de nitrógeno porque carecen de una formamidasa capaz de metabolizar este compuesto hasta amonio (Cluness *et al.*, 1993; Fry y Munch, 1975; Fry y Millar, 1972). En *P. pseudoalcaligenes*, la degradación de cianuro tiene un carácter asimilador, ya que el crecimiento es proporcional a la concentración de cianuro (Gráfico 26). El carácter asimilador de la ruta se corroboró mediante la utilización de MSX, en presencia del cual las células producen amonio estequiométricamente a partir de cianuro (Gráfico 21). Un hecho significativo es que la mayor parte de la degradación de cianuro en esta bacteria tiene lugar al inicio de la fase exponencial, lo que sugiere la participación de un intermediario en el proceso de asimilación (Gráficos 18, 19 y 110).

La ausencia de nitrogenasa en la estirpe CECT5344, enzima capaz de utilizar cianuro como sustrato para producir amonio y metano, desecha totalmente la posibilidad de la existencia de una ruta reductiva, mientras que la imposibilidad de detectar ácido fórmico, formamida y las enzimas responsables de la síntesis de estos compuestos a partir de cianuro, sugieren que el cianuro no es asimilado a través de una ruta hidrolítica. *P. pseudoalcaligenes* es incapaz de utilizar formamida como fuente de nitrógeno, y además, sus extractos acelulares no presentan ninguna actividad enzimática capaz de producir amonio a partir de este compuesto, lo que confirma la inexistencia de una ruta hidrolítica. Células cultivadas en cianuro tampoco presentaron una actividad rodanasa capaz de producir tiocianato, compuesto que además no fue utilizado como fuente de nitrógeno por esta bacteria.

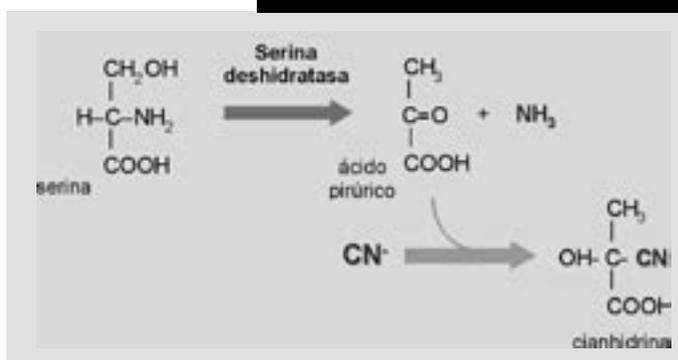
La acción de una monooxigenasa sobre el cianuro podría producir teóricamente cianato, un sustrato de la cianasa, por lo que este compuesto se ha presentado en muchas ocasiones como un posible intermediario de la degradación del cianuro. Sin embargo, hasta el momento no se ha podido demostrar esta posible relación entre el cianuro y el cianato.

En *P. fluorescens* NCIMB 11764, Dorr y Knowles (1989) propusieron la existencia de una ruta de degradación de cianuro a través de cianato, aunque la ausencia de actividad cianasa en células cultivadas con cianuro desecha esta posibilidad. *P. pseudoalcaligenes* es la primera bacteria cianotrófica en la que se describe la inducción de la cianasa por cianuro (Cuadro 15). Al igual que la cianuro oxigenasa de *P. fluorescens* NCIMB 11764, cuya actividad fue mayor con $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ que con cianuro libre, la cianasa de la estirpe CECT5344 presenta su máxima actividad en presencia del complejo $\text{Cu}(\text{CN})_4^{2-}$ (Dorr y Knowles, 1989). En ambos casos, la

menor toxicidad de los complejos podría ser la responsable de su máximo efecto inductor. A pesar de estos resultados, resultaron fallidos todos los intentos encaminados a detectar la enzima responsable de la oxidación del cianuro a cianato, la cianuro monooxigenasa. Además, un mutante deficiente en el gen *cynS* que codifica la cianasa, y por lo tanto incapaz de utilizar cianato como fuente de nitrógeno, mantiene intacta la capacidad de degradar cianuro (Gráfico 35). Estos resultados sugieren que, de existir una ruta de este tipo, ésta no sería el principal mecanismo asimilador en *P. pseudoalcaligenes*. Sin embargo, el hecho de que la inducción completa de la cianasa de la estirpe CECT5344 requiera cianato (Cuadro 15), sugiere que durante la degradación de cianuro se debe producir cianato.

La β -cianoalanina es un derivado aminoacídico que actúa como intermediario durante la asimilación de cianuro en bacterias como *E. coli*, *Chromobacterium violaceum*, *Bacillus megaterium* y *Enterobacter* sp. 10-1, constituyendo también la principal ruta de degradación de cianuro en plantas (Sakai *et al.*, 1981; Castric y Strobel, 1969; Brysk *et al.*, 1969; Blumenthal *et al.*, 1968; Dunnill y Fowden, 1965). La desaparición de cianuro y la producción de amonio observada con extractos acelulares de *P. pseudoalcaligenes* incubados en presencia de cianuro y serina u O-acetil-serina, los dos aminoácidos utilizados por las bacterias que degradan cianuro a través de β -cianoalanina, indican la posible existencia de una actividad β -cianoalanina sintasa (β -CAS) en la estirpe CECT5344. Sin embargo, la producción de una mayor cantidad de amonio en un control sin cianuro y la estequiometría de la reacción (Gráfico 36) sugieren que la actividad medida podría corresponder a la serina deshidratasa, enzima que produce amonio y ácido pirúvico a partir de serina. La formación de ácido pirúvico explicaría la desaparición de cianuro observada en los ensayos, ya que este α -cetoácido reacciona químicamente con el cianuro formando una cianhidrina (Gráfico 122). Se ha descrito que la L-cisteína es un inhibidor de la serina deshidratasa, un hecho observado también en esta bacteria. La inhibición de esta enzima, y la consiguiente ausencia de piruvato, justifica la inhibición de la desaparición de cianuro en presencia de L-cisteína. La L-homoserina también inhibe parcialmente la desaparición de cianuro en los ensayos, probablemente debido a la inhibición de la serina deshidratasa por competición con su sustrato, la serina. Todos estos datos sugieren que hay que poner especial atención en la determinación de la actividad β -CAS, ya que la ausencia de controles podría confundir esta enzima con la serina deshidratasa. Por otro lado, la elevada afinidad del piruvato por el cianuro, la resistencia y presencia de una actividad serina deshidratasa en células cultivadas con cianuro y la utilización como fuente de nitrógeno de la cianhidrina del piruvato sugieren que este sistema podría formar parte de la ruta de asimilación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes*.

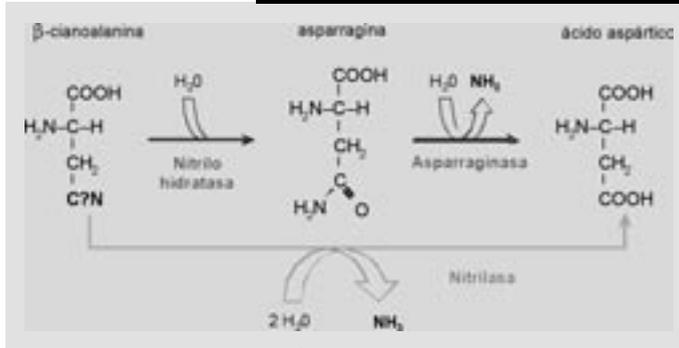
GRÁFICO 122 Desaparición de cianuro y aparición de amonio por acción de la serina deshidratasa



En oscuro se representa la reacción catalizada por la serina deshidratasa, y en claro la reacción química entre el cianuro y el ácido pirúvico.

A pesar de carecer de una actividad β -CAS, *P. pseudoalcaligenes* presenta una actividad enzimática capaz de producir amonio a partir de β -cianoalanina, lo que posibilita la utilización de este compuesto como fuente de nitrógeno (Gráfico 20). La β -cianoalanina es un compuesto producido por un gran número de bacterias marinas en medios sin cianuro, lo que indica que el metabolismo de este compuesto no siempre está relacionado con la degradación de cianuro (Yoshikawa *et al.*, 2000). En *P. pseudoalcaligenes*, los resultados indican que esta enzima se expresa constitutivamente, aunque tanto su sustrato como compuestos cianurados inducen una actividad mayor (Gráfico 37). Esto sugiere que, si bien la β -cianoalanina no parece ser un intermediario de la degradación de cianuro, esta actividad podría actuar sobre otros nitrilos producidos a partir de cianuro. La β -cianoalanina, como cualquier otro nitrilo, puede ser degradada hasta amonio mediante la incorporación, de forma simultánea o secuencial, de dos moléculas de H_2O (Gráfico 123). En la estirpe CECT5344, los resultados apuntan a que este compuesto es degradado mediante la acción consecutiva de una nitrilo hidratasa y una asparraginasa, ya que se pudo separar la actividad asparraginasa de la degradadora de β -CNA, pero los intentos por separar la actividad degradadora de β -CNA de la actividad asparraginasa fueron nulos.

GRÁFICO 123

Posibles mecanismos de degradación de la β -cianoalanina

En oscuro se representa la posible ruta presente en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

Tras sugerir la participación de un posible sideróforo en la degradación de cianuro, Kunz y colaboradores propusieron que la acumulación de α -cetoácidos y la formación de cianhidras eran componentes esenciales en la asimilación de cianuro en *P. fluorescens* NCIMB 11764 (Kunz *et al.*, 1998; Chen y Kunz, 1997). Esta ruta se describió como un mecanismo accidental de asimilación de cianuro, ya que la producción de α -cetoácidos (principalmente piruvato, aunque también 2-oxoglutarato) fue únicamente atribuida a la limitación de nitrógeno. Igual que esta bacteria, *P. pseudoalcaligenes* también libera al medio α -cetoácidos (2-oxoglutarato) en ausencia de una fuente de nitrógeno asimilable. Ello se debe probablemente al desbalance C/N originado en estas condiciones, pero sin embargo, la producción de estos compuestos también es inducida por cianuro (Gráficos 42, 45 y 47). La inducción de la proteína CN3, identificada como un miembro de la superfamilia de proteínas PII, en células cultivadas con cianuro indica que en estas condiciones la producción de α -cetoácidos es debida a una limitación de nitrógeno. La proteína PII es un elemento central en la transducción de la señal de nitrógeno en bacterias, desempeñando un importante papel en la coordinación de la asimilación de nitrógeno y el metabolismo del carbono (Arcondéguy *et al.*, 2001). La proteína a través de la cual se identificó CN3, NrgB, perteneciente a la familia de proteínas PII, es inducida en condiciones de escasez de nitrógeno y actúa sobre algunos genes del metabolismo del nitrógeno en bacterias Gram positivas. La proteína NrgB de *Clostridium acetobutylicum* presentó homología con la proteína PII-2 o GlnK de *P. aeruginosa*, un regulador exclusivo de bacterias Gram negativas que participa también en el control del metabolismo

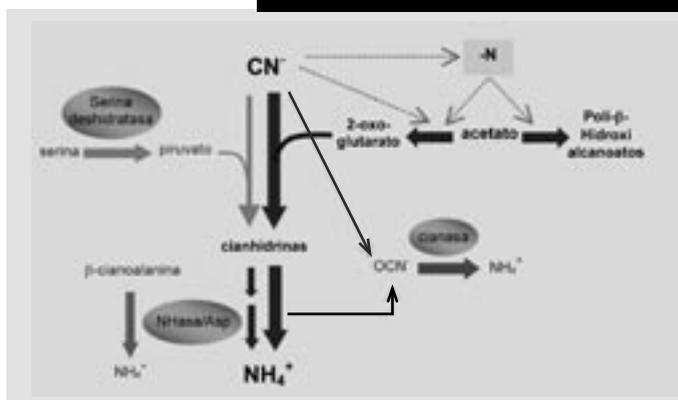
del nitrógeno. Esta proteína actúa de forma similar a PII, aunque en un segundo nivel de regulación (Ninfa y Atkinson, 2000). A diferencia de PII, que es constitutiva y regulada post-traduccionalmente, PII-2 es inducida en condiciones limitantes de nitrógeno, al igual que NrgB, lo que explicaría su identificación en células cultivadas con cianuro o el residuo, y no en medios con amonio (Gráfico 72). En definitiva, la presencia de la proteína PII-2 en células cultivadas con cianuro indica que en estas condiciones *P. pseudoalcaligenes* se encuentra en un estado metabólico de escasez de nitrógeno, lo que explica la liberación de 2-oxoglutarato al medio. Sin embargo, la producción de α -cetoácidos es más rápida en presencia de cianuro que en ausencia de nitrógeno (Gráfico 43), lo que sugiere que el cianuro también puede ser una señal que actúa directamente sobre la proteína PII-2.

La formación de cianhidrinas es un proceso no enzimático que tiene lugar como consecuencia de la reacción del cianuro con el grupo carbonilo de aldehídos o cetonas. Uno de los factores que influyen sobre la síntesis de estos α -hidroxinitrilos es el pH. En este sentido, y a diferencia del piruvato, la formación de la cianhidrina del 2-oxoglutarato se muestra favorecida a pH alcalino (Gráfico 48), condiciones en las que la estirpe CECT5344 muestra su crecimiento óptimo. En cuanto a la degradación de estos compuestos, *P. pseudoalcaligenes* es capaz de utilizar las cianhidrinas del piruvato y del 2-oxoglutarato como fuentes de nitrógeno (Cuadro 13). Además, suspensiones celulares concentradas produjeron, pero sólo en presencia de MSX, amonio a partir de estas dos cianhidrinas (Gráfico 34), lo que prueba que su degradación es un proceso enzimático que conduce a la formación de amonio. Su estabilidad a pH alcalino, al menos en el caso de la cianhidrina del 2-oxoglutarato (Gráfico 48), y la no detección de 2-oxoglutarato durante la conversión de la cianhidrina a amonio, desechó la posibilidad de que el amonio producido proviniese del cianuro originado de una posible reversión de la cianhidrina a cianuro y 2-oxoglutarato. Otro hecho que apoyó la asimilación enzimática de la cianhidrina fue la presencia de una actividad enzimática, independiente de NADH y pterina, capaz de producir amonio a partir de la cianhidrina del 2-oxoglutarato (Gráfico 41). Aunque los estudios realizados sobre esta actividad enzimática son aún preliminares, la ausencia de dicha actividad en extractos dializados indica que ésta requiere algún cofactor. Estos resultados descartan que la degradación enzimática de las cianhidrinas tenga lugar únicamente a través de una nitrilasa o un sistema nitrilo hidratasa/amidasa, enzimas que no requieren cofactores. No obstante, este tipo de enzimas podría actuar sobre algún otro nitrilo producido a partir de las cianhidrinas por una enzima que si requeriría cofactores. En

P. fluorescens, inicialmente se propuso la degradación de las cianhidrinas por una cianuro oxigenasa dependiente de NADH, sin embargo, estudios posteriores revelaron que el único sustrato de esta enzima es el cianuro libre (Kunz *et al.*, 2001). Recientemente se ha descrito que la asimilación de cianuro en *P. fluorescens* NCIMB 11764 tiene lugar mediante un mecanismo oxigenolítico dependiente de pterina, generando como productos amonio y ácido fórmico (Fernández *et al.*, 2004).

En resumen, la liberación de 2-oxoglutarato inducida por cianuro, la utilización de cianhidrinas como fuente de nitrógeno y su conversión estequiométrica a amonio en presencia de MSX indican que, la ruta principal de degradación de cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 transcurre a través de la formación no enzimática de cianhidrinas y su posterior metabolización hasta amonio (Gráfico 124). Tras excluir la posible implicación de α -cetoácidos durante la asimilación de cianuro en *P. fluorescens*, *P. pseudoalcaligenes* sería la primera bacteria donde tiene lugar un mecanismo asimilador de este tipo. Curiosamente, en condiciones de hambre de nitrógeno las células consumieron cianuro rápidamente (Gráfico 18), mientras que suspensiones celulares concentradas precultivadas con cianuro y preparadas en medio fresco experimentaron una pequeña fase de latencia antes de comenzar a degradar el cianuro (Gráfico 49), lo que sugiere que la asimilación de este compuesto requiere la liberación al medio de un metabolito, que podría ser el 2-oxoglutarato. La liberación al medio de 2-oxoglutarato, inducida directa o indirectamente por el cianuro, provocaría la formación extracelular de la correspondiente cianhidrina. Además, la formación de ácido pirúvico mediada por la serina deshidratasa podría constituir una fuente intracelular de cianhidrina. Posteriormente, las cianhidrinas formadas por uno u otro mecanismo serían degradadas por un sistema enzimático aún por elucidar, aunque la sobreinducción de una actividad degradadora de β -cianoalanina en respuesta a compuestos cianurados y el incremento de dicha actividad durante el consumo de cianuro (Gráficos 37 y 38), sugiere que en esta ruta podría participar un sistema nitrilo hidratasa/amidasa. La presencia de la proteína PII-2 en células cultivadas con cianuro indica que las enzimas responsables de la asimilación de las cianhidrinas formadas durante la degradación de cianuro podrían encontrarse bajo control de esta proteína, al igual que ocurre con otras enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno. Finalmente, la formación de cianato, que podría tener lugar directamente a partir de cianuro por la acción de una monooxigenasa o bien a partir de algún intermediario de la ruta principal de degradación de cianuro, y su posterior conversión a amonio catalizada por la cianasa podría constituir una ruta oxidativa minoritaria.

GRÁFICO 124 Ruta metabólica propuesta para la degradación de cianuro por *P. pseudoalcaligenes* CECT5344



Las flechas discontinuas indican un efecto positivo o negativo.
NHasa/Asp: Nitrilo hidratasa/Asparaginasa.

La mayoría de las enzimas expuestas anteriormente forman parte de rutas de degradación inducibles por cianuro. A pesar de esto, en algunas ocasiones la degradación de cianuro posee un carácter constitutivo, lo que podría estar justificado como un mecanismo de resistencia inmediato ante la presencia de cianuro. En *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, la degradación de cianuro es inducible por su sustrato. No obstante, y a diferencia de otros microorganismos cianotróficos, las células procedentes de amonio también degradan cianuro, aunque tras una fase de latencia mayor que la experimentada por células precultivadas en cianuro (Gráfico 49) (Kao et al., 2003; Harris y Knowles, 1983b). Estudios proteómicos llevados a cabo en este trabajo han revelado que en medio mínimo el cianuro promueve la inducción de al menos 13 proteínas en *P. pseudoalcaligenes* (Gráficos 76 y 77), y un número mayor en medio rico (Gráficos 78 y 79). Estas proteínas pueden estar relacionadas con diferentes procesos biológicos relacionados con el metabolismo del cianuro, como la producción y liberación de 2-oxoglutarato, la síntesis de la oxidasa alternativa y la producción de sideróforos.

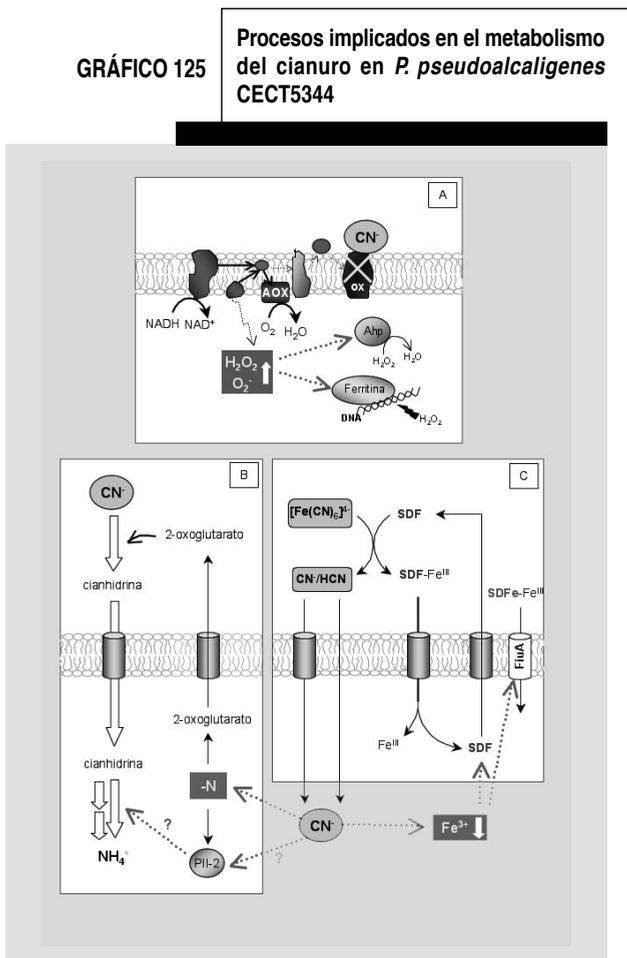
La interacción entre el metabolismo del cianuro y otras fuentes de nitrógeno apenas ha sido estudiada hasta la fecha, a pesar de la importancia que este aspecto supone desde el punto de vista tanto de la regulación como de la aplicación del proceso. El amonio es la fuente de

nitrógeno preferente en bacterias. Esto es debido tanto a su inmediata incorporación en aminoácidos a través de la glutamina sintetasa, como al efecto inhibitor que este compuesto ejerce sobre la asimilación de otras fuentes de nitrógeno. Este último efecto es ocasionado como consecuencia de que el amonio constituye el punto de convergencia de las diferentes rutas de asimilación de nitrógeno (Magasanik, 1996; Merrick y Edwards, 1995). En este sentido, la inhibición de la asimilación de cianuro por amonio se ha descrito ampliamente en la literatura (Silva-Avalos *et al.*, 1990; Harris y Knowles, 1983a y b). Por el contrario, en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 el amonio no inhibe la asimilación de cianuro (Gráfico 52), aunque, al igual que en *Klebsiella oxytoca* y *Alcaligenes xylosoxidans*, concentraciones elevadas (10 mM) reprimen ligeramente dicho proceso (Gráfico 50) (Kao *et al.*, 2003; Ingvorsen *et al.*, 1991). En bacterias se ha descrito que el efecto inhibitor del amonio sobre otras rutas de asimilación de compuestos nitrogenados se ejerce a través de la glutamina. En *P. pseudoalcaligenes*, a pesar de que la glutamina reprimió la asimilación de cianuro (Gráfico 60), concentraciones de amonio inferiores a 10 mM no afectaron al consumo de cianuro (Gráfico 50). Este efecto contradictorio puede deberse a que las células utilizadas para estudiar la influencia del amonio sobre la degradación de cianuro se encontraban en hambre de nitrógeno, condiciones en las que el amonio sólo tiene un efecto regulador a elevadas concentraciones.

Igual que el amonio, el nitrato y el nitrito son fuentes de nitrógeno inorgánicas frecuentemente utilizadas por bacterias. La no inhibición de la degradación de cianuro por nitrato (Gráfico 55), junto con la represión e inhibición de la asimilación de nitrato por cianuro (Gráficos 53 y 59), son fenómenos no descritos hasta la fecha. Por el contrario, la inhibición por cianuro de la nitrato reductasa asimiladora es un hecho bien conocido (Moreno-Vivián *et al.*, 1999; Garrett y Nason, 1969; Paneque y Losada, 1966). El amonio generado durante la degradación de cianuro podría ser en última instancia el responsable de la represión de la asimilación de nitrato, aunque la afirmación de esta hipótesis requeriría un estudio más detallado. En cuanto al efecto inhibitor, éste puede ser ejercido a diferentes niveles, aunque en este trabajo se demuestra que al menos uno de ellos es la enzima nitrato reductasa (Gráfico 54). Según se deduce de la inhibición de la asimilación de nitrito por cianuro, la nitrito reductasa, una enzima que participa tanto en la asimilación de nitrito como de nitrato, también podría ser otro punto sobre el que actuase este tóxico. El carácter metaloproteico de estas dos enzimas es probablemente el responsable de su sensibilidad a cianuro. La interacción entre el metabolismo del cianuro y del nitrito en *P. pseudoalcaligenes* es similar a la ocurrida con

el nitrato, ya que en esta bacteria el cianuro reprime la asimilación de nitrito, probablemente debido al amonio generado durante la degradación de cianuro, mientras que el nitrito no inhibe la degradación de cianuro (Gráficos 56 y 57). En cuanto al efecto de diferentes aminoácidos sobre la asimilación de cianuro, salvo la glutamina, ninguno de los otros compuestos utilizados inhibe el proceso de degradación (Gráfico 60).

GRÁFICO 125 Procesos implicados en el metabolismo del cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344



Resistencia a cianuro (A), ruta de degradación (B) y producción de sideróforos (C). Las flechas discontinuas indican un efecto positivo. En gris se encuadran las respuestas inducidas por el cianuro. AOX: oxidasa alternativa; ox: citocromo oxidasa; Ahp: alquil hidropéroxido reductasa; SDF: sideróforo; SDF-Fe^{III}: sideróforo quelado.

Una vez más, y desde el punto de vista de su aplicación, *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 parece aventajar a las estirpes cianotróficas descritas hasta el momento, ya que ésta puede asimilar cianuro en presencia de pequeñas concentraciones de amonio, así como de nitrato, nitrito o diferentes aminoácidos.

Como resumen de este capítulo, en el Gráfico 125 se esquematizan los distintos procesos implicados en el metabolismo del cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344: un mecanismo de resistencia a cianuro basado en una oxidasa alternativa insensible a cianuro y en sistemas de protección frente a especies reactivas de oxígeno, una ruta principal de degradación de cianuro a través de cianhidrinas y un sistema de adquisición de hierro mediante sideróforos.

V.3 | **Metabolismo del cianato en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344**

Cianasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344

Como se comentó anteriormente, la inducción de la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* por cianuro indica que, en esta bacteria, el metabolismo del cianato y del cianuro están relacionados. Además, el cianato es un compuesto tóxico generado tanto de forma natural como artificial a partir del cianuro. Por lo tanto, el estudio del metabolismo del cianato en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se consideró de gran importancia para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Igual que otros microorganismos, la capacidad de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 de utilizar cianato como fuente de nitrógeno (Gráfico 81) se debe a la inducción de una actividad enzimática denominada cianasa, que cataliza la bicarbonatolisis del cianato para producir amonio. Esta enzima, localizada igual que en *E. coli* en el citoplasma (Kozliak et al., 1994), presenta en células cultivadas en cianato una actividad específica de 562 $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$, un valor relativamente superior al descrito para *P. fluorescens*, 168 $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$, y similar al de *E. coli*, 250-500 $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ (Kunz y Nagappan, 1989; Guilloton y Karst, 1987A). La caracterización bioquímica de la cianasa de la estirpe CECT5344 revela que esta enzima difiere considerablemente del resto de cianasas descritas. Por ejemplo, la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* es insensible a altas concentraciones de tiocianato, un compuesto que ejerce inhibición competitiva sobre la cianasa de *M. thiocyanatum* (Wood

et al., 1998). La temperatura y pH óptimos de la actividad son 65 °C y 8,5, respectivamente, valores muy alejados de los descritos hasta el momento, mientras que su marcada termoestabilidad es una propiedad exclusiva de la cianasa esta bacteria. La inmovilización de la cianasa, que se llevó a cabo para su uso en un biosensor, disminuyó la temperatura óptima de actividad (Gráfico 120), aunque el extenso intervalo de temperatura sobre el que la enzima mostró una temperatura óptima (45-57 °C), hace suponer que en estas condiciones el tiempo de contacto entre la enzima y su sustrato es un factor limitante. La actividad exhibida por la enzima a distintas temperaturas, tanto *in vitro* como con la enzima inmovilizada en el biosensor, es el resultado no sólo del efecto de la temperatura sobre la actividad, sino también del efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima. En este sentido, la determinación de la actividad enzimática en el biosensor y con la enzima en disolución, la cual sólo va a estar sometida a las distintas temperaturas un corto espacio de tiempo, refleja más fielmente el efecto de la temperatura sobre la actividad. De hecho, a diferencia de la enzima en disolución, la enzima inmovilizada disminuyó bruscamente su actividad a elevadas temperaturas debido a la desnaturalización, un efecto ya observado en el Gráfico 84.

De todas las cianasas descritas, hasta la fecha tan sólo se había purificado hasta homogeneidad la de *E. coli* (Sung et al., 1987; Anderson, 1980). La cianasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se ha purificado mediante un procedimiento relativamente simple que aprovecha el carácter termoestable de la enzima (Cuadro 16). Este método es una buena fuente de cianasa para su empleo en el biosensor de cianato, como se describirá posteriormente, sobre todo si tenemos en cuenta que la enzima no está disponible comercialmente. La cianasa de la estirpe CECT5344 presenta una masa molecular de aproximadamente 16 kDa (Gráfico 95), un tamaño similar al descrito para el monómero de esta enzima en otras bacterias (*E. coli*, 16,35 kDa; *Synechococcus* sp. PCC 7942 16,362 kDa; *M. thiocyanatum* 17,9 kDa). Si bien no se ha determinado la masa molecular de esta enzima en condiciones nativas, la identidad de su secuencia aminoacídica con la de *E. coli* y su inhibición por SDS (Gráfico 85), sugiere que su estructura puede ser similar a la descrita por Walsh et al., (2000), es decir, un homodécadmero de 170 kDa.

Mediante la utilización de oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de otras cianasas ya descritas se aisló un fragmento de DNA que permitió aislar, clonar y secuenciar el gen *cynS* que codifica la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. La identidad de este gen ha sido confirmada por la comparación de su secuencia con las bases de datos, por la obtención de un mutante en dicho gen incapaz de utilizar cianato

como fuente de nitrógeno y por la expresión heteróloga del mismo en *E. coli*. La cianasa de *P. pseudoalcaligenes* purificada hasta homogeneidad a partir de *E. coli* conserva su carácter termoestable, por lo que uno de los pasos de purificación consistió en un tratamiento térmico a 70 °C, en este caso durante 30 min. Si bien no se ha estudiado la termoestabilidad de otras proteínas de *P. pseudoalcaligenes*, sin duda el tratamiento térmico en el marco proteínico de *E. coli* ofrece un mejor rendimiento que el mismo tratamiento en el contexto proteínico de la estirpe CECT5344.

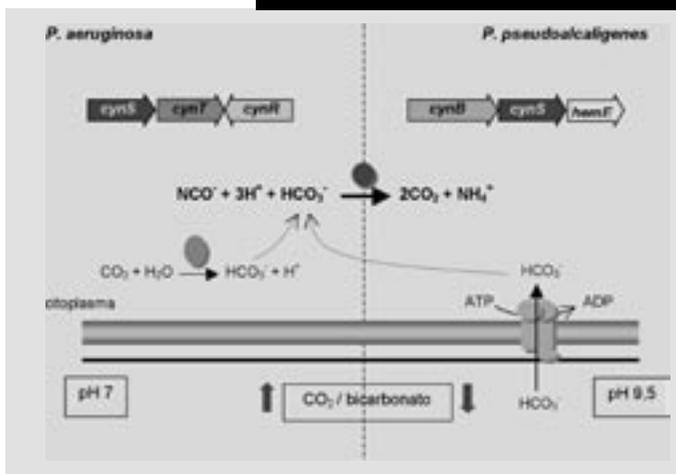
El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* con otras proteínas CynS (Gráfico 98), revela que, en todos los casos, el extremo N-terminal de esta enzima está menos conservado que la región C-terminal, una observación ya realizada por Walsh *et al.* en el año 2000. La proteína CynS de la estirpe CECT5344 presenta en su secuencia tres regiones altamente conservadas en todas las cianasas, y por lo tanto con una potencial relevancia funcional, correspondientes en la secuencia de *E. coli* a los residuos 92-99 (PxxYRxxE), 114-124 (ExFGDGlXSAI) y 145-151 (TxxGKxL) (Walsh *et al.*, 2000). Se ha descrito que algunos residuos aminoacídicos presentes en estas regiones (Arg96, Glu99, Asp118 y Arg/Lys81) probablemente ayudan a la estabilidad de la estructura cuaternaria de la proteína mediante la formación de puentes salinos (Walsh *et al.*, 2000). Los residuos Arg96, Glu99 y Ser122, propuestos por Walsh *et al.* como los residuos catalíticos de la enzima, también se encuentran conservados en la secuencia de la estirpe CECT5344. De estos tres residuos, la Ser122 es importante en la unión del sustrato. El análisis filogénico de las diferentes proteínas CynS revela que la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* se encuentra más relacionada con la cianasa de cianobacterias y *Dechloromonas aromática* que con la de *E. coli*, *Pseudomonas*, y otras γ -proteobacterias (Gráfico 99).

En *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, el gen *cynS* que codifica la cianasa se encuentra flanqueado por el gen *hemE* y otro al que hemos denominado *cynB* (Gráfico 126). El primero codifica una proteína involucrada en la síntesis del grupo sirohemo, mientras que *cynB* presenta una gran identidad con un gen que codifica un sistema transportador, de tipo ABC, para nitrato, sulfato o bicarbonato. Sin embargo, la identificación definitiva de este gen requiere su completa secuenciación y caracterización, trabajo que se está llevando a cabo actualmente. El gen *hemE* se encuentra relativamente alejado de *cynS*, y en la región intergénica existe una región palindrómica que podría formar un bucle de señalización de terminación de la transcripción. Estos hechos, junto con la aparente falta de relación fisiológica entre la asimilación de cianato y la síntesis de sirohemo parecen

indicar que el gen *hemE* no se encuentra en la misma unidad transcripcional que el gen de la cianasa en *P. pseudoalcaligenes*. En el fragmento analizado hasta la fecha destaca también la ausencia del gen *cynT*, que codifica una anhidrasa carbónica presente tanto en *E. coli* como en un miembro de su mismo género, *P. aeruginosa*. El análisis de un mutante de *E. coli* en el gen *cynT*, revela que la función fisiológica de la anhidrasa carbónica es producir una cantidad suficiente de bicarbonato, que es sustrato junto con el cianato de la reacción catalizada por la cianasa (Guilloton *et al.*, 1993 y 1992). De esta forma se impide que durante la degradación de cianato se produzca una escasez de bicarbonato, lo que ocasionaría la paralización de la reacción catalizada por la cianasa y la inhibición del crecimiento. El bicarbonato es un compuesto requerido en diversas reacciones metabólicas, aunque la inhibición del crecimiento provocada por su escasez es debida a la competición entre el cianato y el bicarbonato/ CO_2 en un sitio desconocido pero de gran importancia para el crecimiento, lo que justifica que bajas concentraciones de bicarbonato/ CO_2 incrementen este efecto inhibitorio (Kozliak *et al.*, 1995). Por otra parte, ya que el cianato es un anión a pH neutro/básico, para su asimilación cabe esperar la participación de un transportador. En este sentido, en *E. coli*, se ha descrito en el operón *cyn* la presencia de un gen (*cynX*) que codifica una proteína transportadora de cianato que pertenece a la familia MFS (Pao *et al.*, 1998). Un gen análogo

GRÁFICO 126

Operón *cyn* de *P. aeruginosa* y *P. pseudoalcaligenes* CECT5344



Diferencias entre ambas especies en la producción del bicarbonato necesario para la degradación de cianato.

a *cynX* se ha encontrado también en el genoma de *P. aeruginosa*, si bien se localiza en una región génica diferente (<http://www.pseudomonas.com>). Por el contrario, en *Synechococcus* sp. PCC 7942 el gen de la cianasa se encuentra agrupado en un operón con genes transportadores de la familia ABC, a los que todavía no se les ha asignado una función concreta (Harano *et al.*, 1997). Sin embargo, los autores postulan que podría tratarse de un transportador de cianato o de bicarbonato.

En *P. pseudoalcaligenes*, la ausencia de anhidrasa carbónica podría estar justificada por la presencia en el operón *cyn* de un transportador de bicarbonato, como podría ser el caso del gen *cynB* descrito anteriormente. El carácter alcalófilo de esta bacteria le permite crecer en medios con un pH elevado, condiciones en las que la proporción bicarbonato/CO₂ es mayor que en medios neutros o ácidos. En estas condiciones la bacteria no necesitaría la anhidrasa carbónica para producir bicarbonato, sino un transportador para tomar el bicarbonato del medio. Curiosamente las cianobacterias generalmente viven en ambientes alcalinos (Fogg, 1956), lo que podría sugerir un mecanismo similar al propuesto en *P. pseudoalcaligenes*. A pesar de su homología con un transportador de bicarbonato, no se descarta que el producto codificado por el gen *cynB* de *P. pseudoalcaligenes* sea un transportador de cianato, por lo que actualmente se están estudiando ambas posibilidades. Finalmente, es de destacar que tanto la agrupación génica como la secuencia de la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* es más parecida a la de cianobacterias que a la de enterobacterias o a la de otras especies de *Pseudomonas*.

Regulación del metabolismo del cianato y función de la cianasa

Todas las cianasas descritas hasta la fecha catalizan la misma reacción. Sin embargo, igual que ocurre con las nitrato reductasas, a la enzima se le han asignado al menos tres funciones. La primera y más evidente es la asimilación de nitrógeno, al catalizar la formación de amonio a partir de cianato. La segunda es de resistencia al anión, que es tóxico y puede provenir del medio o ser producido endógenamente de una forma más o menos gratuita. Por último, a la cianasa se le ha atribuido el papel de regular la concentración intracelular de cianato, que podría ser una molécula señalizadora del balance C/N.

A pesar de la toxicidad del cianato, muchos microorganismos son capaces de tolerar elevadas concentraciones de este compuesto. *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 tolera, e incluso utiliza para el crecimiento, con concentraciones de cianato de hasta 100 mM (Gráfico 103). Hasta la fecha no se ha descrito

ningún otro microorganismo capaz de tolerar una concentración tan elevada de cianato. En el caso de *P. fluorescens* NCIB 11764, Kunz y Nagappan (1989) observaron ausencia de crecimiento en medio mínimo con cianato 20 mM, mientras que con 10 mM la velocidad de crecimiento se vio muy afectada con respecto a células cultivadas con amonio. De igual forma, para *E. coli* son tóxicas las concentraciones de cianato superiores a 10 mM (Guillotón y Karst, 1987a). Tan sólo *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov. es capaz de tolerar una concentración algo mayor, 50 mM, aunque la fase lag en estas condiciones fue de 90 h (Wood *et al.*, 1998). La fase lag que experimentó la estirpe CECT5344 en estas mismas condiciones es de 24 h. El hecho de que no se inhiba el crecimiento tras la adición de 2 y 5 mM de cianato (Gráfico 105) sugiere que la resistencia a cianato en esta bacteria es un mecanismo constitutivo. Por el contrario, en *E. coli* la resistencia parece residir en un mecanismo inducible por cianato, ya que una concentración 2 mM de cianato inhibió fuertemente el crecimiento bacteriano (Guillotón y Karst, 1987a y 1987b).

Se ha propuesto que, en algunas bacterias, la degradación de cianato, mediada por la cianasa, es un mecanismo destoxicador que podría conferir resistencia al cianato generado de forma endógena. La presencia de esta actividad, en *P. fluorescens*, en medios con cianato y exceso de amonio, así como la mayor sensibilidad a cianato de mutantes de *E. coli* deficientes en el gen *cynS* apoyan esta hipótesis (Kunz y Nagappan, 1989; Guillotón y Karst, 1987a). Este no parece ser el caso de la estirpe CECT5344, en la que en medios con cianato y amonio la cianasa sólo se induce tras el consumo de amonio (Gráfico 88), y en la que el mutante *cynS* presenta la misma sensibilidad a cianato que la estirpe silvestre (Gráficos 104 y 105). En las cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Synechococcus* sp. PCC 7942, la escasa actividad cianasa en medios con amonio, condiciones en las que se acumula el cianato como consecuencia de la descomposición espontánea del carbamoilfosfato, descarta la implicación de esta enzima en la destoxicación del cianato endógeno (Harano *et al.*, 1997).

En *P. putida* KT2440 se ha descrito recientemente la presencia de una bomba de exclusión de cianato, similar a la inducida por algunos microorganismos frente a metales pesados, la cual podría conferir resistencia a este compuesto (Martins do Santos *et al.*, 2004). Salvo la existencia de un mecanismo similar, el responsable de la marcada resistencia a cianato en *P. pseudoalcaligenes* podría ser su carácter alcalófilo. En un mutante *cynS* de *E. coli*, se ha demostrado que la inhibición del crecimiento en presencia de cianato es potenciada a mayor concentración de protones, lo que sugiere que dicha inhibición podría ser mediada por el ácido isociánico

(HOCN) (pK_a 3,7) (Guilloton y Karst, 1987a). En el caso de la estirpe CECT5344, la alcalinidad del medio de cultivo, y probablemente la del interior celular, favorecen la presencia de la forma no reactiva, el cianato. El carácter constitutivo de la resistencia a cianato en esta bacteria apoya esta hipótesis.

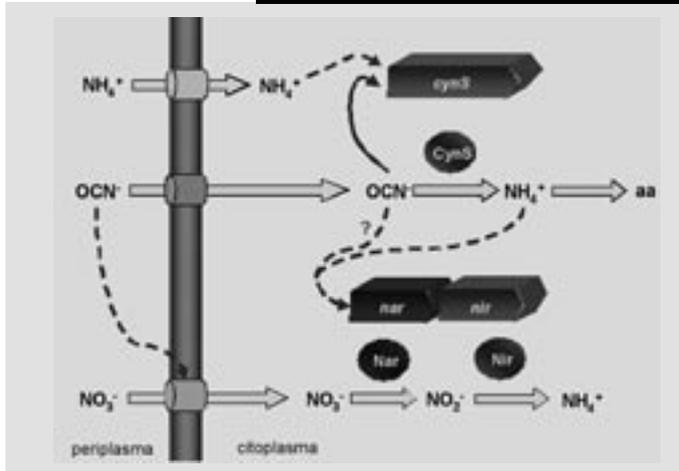
En la mayoría de los casos descritos hasta ahora la cianasa es una enzima inducible por su sustrato, el cianato. En *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, esta actividad se induce por cianuro, por el complejo cianuro-cobre y por urea, además de por cianato (Cuadro 15). La presencia de actividad cianasa en células cultivadas con cianuro sugiere la participación del cianato en la degradación de cianuro, cuestión que se discutirá más adelante. En el caso de la urea, este compuesto se descompone espontáneamente en cianato y amonio, por lo que la inducción de la enzima en estas condiciones está plenamente justificada (Marier y Rose, 1964). El carácter isostérico e isoelectrónico de la azida ($N=N=N$)⁻ respecto al cianato ($N=C=O$)⁻ ocasiona, en *E. coli*, tanto la activación de la transcripción como la inhibición competitiva de la actividad cianasa (Guilloton y Karst, 1987, Anderson y Little, 1986; Wagner, 1965). Curiosamente, en la estirpe CECT5344 la azida inhibe la actividad pero no induce la expresión del gen *cynS*. La ausencia de actividad en células cultivadas con amonio, nitrato o los aminoácidos arginina y ornitina, junto con la existencia de una actividad basal en condiciones de hambre de nitrógeno (Cuadro 15), sugieren que la cianasa, además de inducirse por cianato, se reprime en condiciones de exceso de nitrógeno. La inducción de la actividad tras el consumo de amonio o nitrato también apoyan este tipo de regulación (Gráfico 87). En *P. fluorescens* NCIB 11764 tampoco se detecta actividad cianasa en células cultivadas con amonio, aunque no se ha descrito una inducción posterior una vez consumida la fuente de nitrógeno (Kunz y Nagappan, 1989). Por el contrario, en cianobacterias, esta actividad está presente tanto en amonio como en nitrato, aunque en mayor medida en nitrato (Harano *et al.*, 1997).

En bacterias, el amonio es una fuente de nitrógeno preferente, lo que conlleva a que este compuesto afecte de forma negativa la inducción de sistemas de asimilación de fuentes de nitrógeno alternativas. Siguiendo este modelo, en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 la asimilación de cianato es un proceso reprimido, aunque no inhibido, por amonio (Gráficos 88 y 91). Además, el cianato no inhibe la asimilación de amonio (Gráfico 91). El análisis mediante hibridación *northern* del RNA total de *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Synechocystis* sp. PCC 6803, ha revelado la ausencia de transcrito del operón *cyn* en células cultivadas con amonio y cianato

(Harano *et al.*, 1997). En *P. fluorescens* NCBI 11764, la regulación difiere de la descrita en los dos casos anteriores, ya que el amonio no reprime la expresión de la cianasa (Kunz y Nagappan, 1989). Otras dos fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables por la mayoría de microorganismos son el nitrato y el nitrito. En *P. pseudoalcaligenes* el cianato reprime la asimilación de ambos compuestos (Gráficos 89 y 90). Un efecto similar se ha descrito en cianobacterias, donde Suzuki *et al.* (1996) demostraron que el cianato reprime la transcripción del gen *nirA* que codifica la nitrito reductasa. Estos autores sugieren que el cianato endógeno procedente de la descomposición espontánea del carbamoilfosfato, cuyo nivel intracelular aumenta cuando la disponibilidad de amonio es alta (Lawrie, 1979), podría actuar como la señal metabólica promovida por el amonio para regular los genes que participan en la asimilación de nitrógeno y carbono. Debido a que la nitrito reductasa es una enzima común a la asimilación de nitrito y nitrato, el gen que codifica esta enzima suele formar parte del operón responsable de la asimilación de nitrato, lo que explicaría el efecto represor del cianato en ambos procesos asimiladores observado en la estirpe CECT5344. En este trabajo, por primera vez se presentan indicios sobre la posible participación del cianato en la regulación de genes involucrados en la asimilación de nitrógeno en una bacteria no perteneciente al grupo de las cianobacterias. Sin embargo, no se puede descartar que dicho efecto lo ejerza el amonio producido a partir del cianato. En *P. pseudoalcaligenes*, además de poseer un efecto represor, el cianato también inhibe de forma reversible el consumo de nitrato (Gráfico 92). El efecto inmediato ocasionado por el cianato, el escaso tiempo de inhibición (aprox. 50 min), y el hecho de que la inhibición desaparezca aún manteniéndose elevadas concentraciones de cianato en el medio, sugiere que el cianato inhibe la asimilación de nitrato a nivel de transportador. Además, como indica el inmediato consumo de cianato tras su adición, este transportador podría actuar, aunque de forma poco eficiente, sobre el cianato. Aproximadamente a los 50 min de la adición de cianato, probablemente el tiempo necesario para inducir el operón *cyn* y un transportador específico, este compuesto comenzó a transportarse de forma eficiente, reanudándose de forma paralela el consumo de nitrato. Al contrario de lo ocurrido en el caso anterior, el transporte de cianato no parece ser inhibido por nitrato (Gráfico 93). Todos los datos anteriormente descritos y discutidos, esquematizados en el Gráfico 127, apuntan a que el metabolismo del cianato en esta bacteria es de tipo asimilador, al estar regulado negativamente por amonio y positivamente por su sustrato.

GRÁFICO 127

Interacción entre el metabolismo del cianato, del amonio y del nitrato en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344



Líneas discontinuas: efecto negativo; línea continua: efecto positivo o. aa: aminoácidos.

IV.4 Aplicaciones biotecnológicas

Un hecho muy frecuente es el fracaso de la aplicación de los microorganismos estudiados en el laboratorio a la descontaminación de muestras reales, debido a la presencia de otros contaminantes que inhiben el proceso de degradación u ocasionan la muerte de la bacteria. Esto justifica que haya numerosos trabajos donde se describen microorganismos capaces de degradar cianuro pero pocos que describan procesos de descontaminación biológica de efluentes cianurados. *P. pseudoalcaligenes* es capaz de degradar tanto cianuro como el residuo de la industria joyera en medio mínimo (Gráfico 106), pero no en medio rico (Gráfico 109). Es importante resaltar que el residuo tiene un mayor efecto inductor que el NaCN sobre el proteoma de la estirpe CECT5344 (Gráfico 76), probablemente debido a la necesidad de mecanismos de resistencia a metales, que son muy abundantes en este residuo. De hecho, *P. pseudoalcaligenes* crece en presencia de grandes volúmenes de residuo (Gráfico 108), por lo que posee un alto grado de resistencia tanto a cianuro como a metales. Este hecho supone una ventaja respecto a la bacteria alcalófila y cianotrófica

Burkholderia cepacia, la cual es extremadamente sensible a la presencia de hierro y cobre (Adjei y Ohta, 2000). La marcada resistencia del mutante RC5 al residuo (Gráficos 64 y 65), mayor que la experimentada por la estirpe silvestre, demuestra la idoneidad de este mutante para su aplicación en procesos de biorremediación.

Algunos experimentos llevados a cabo en un biorreactor han revelado que *P. pseudoalcaligenes* es capaz de degradar cianuro en condiciones alcalinas (pH 10) sólo en ausencia de un control de pH (Gráfico 110). Cuando el pH se mantiene de forma constante en un valor de 10, la estirpe CECT5344 se mantiene viable en estado de latencia durante al menos 7 días (Gráfico 111), lo que demuestra su elevado grado de resistencia a ambientes desfavorables. Además también pone de manifiesto la importancia de la disminución del pH ocasionada por la bacteria cuando ésta se encuentra en ambientes extremadamente alcalinos. El rendimiento del sistema (Y_{XS}) en ausencia de control de pH es de 5,6 U de absorbancia·g⁻¹ de CN⁻, mientras que la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) es 0,035 h⁻¹, un valor inferior al obtenido con NaCN cuando la bacteria se cultivó en matraces tipo erlenmeyer (0,067 h⁻¹). Como se demuestra en el Gráfico 114, la utilización de *P. pseudoalcaligenes* en la descontaminación del residuo de la joyería en un biorreactor operando de forma continua es un hecho factible. Sin embargo, la detección en el efluente de trazas de cianuro al final del experimento hace necesario un estudio más detallado del proceso.

La toxicidad del cianato y su frecuente presencia en la naturaleza hacen necesario el desarrollo de sistemas de detección que indiquen la presencia de este contaminante en todo tipo de muestras. A pesar de la existencia de varios métodos de determinación de cianato en la actualidad, todos ellos presentan serias limitaciones. Dos métodos ópticos, uno fotométrico y otro fluorimétrico, ambos basados en una reacción similar de derivatización mediante la utilización del ácido 2-aminobenzoico, fueron desarrollados por Guilloton y Karst (1985) y Lundquist *et al.* (1993), respectivamente. El primer método no es aplicable a muestras alcalinas, mientras que el segundo requiere una laboriosa preparación de la muestra. Otros métodos, que utilizan cromatografía líquida con detección fotométrica, fluorimétrica o potenciométrica, sólo aplicables a muestras simples, ya que muestras complejas y con alta concentración de sales ocasionan un rápido deterioro de las columnas cromatográficas (Isildak y Asan, 1999; Fagan *et al.*, 1997; Lundquist *et al.*, 1993). Además, hasta hoy día no se ha propuesto ningún método que permita determinar cianato de forma automatizada, una tecnología hacia la que se tiende actualmente en todo tipo de dispositivos analíticos. Por todo ello, y aprovechando algunas de las características más peculiares de la cianasa de *P. pseudoalcaligenes*

CECT5344, se propuso desarrollar un sistema biosensor de cianato, fácilmente automatizable, basado en un sistema de inyección de flujo y acoplado a un reactor enzimático conteniendo la enzima cianasa inmovilizada. Este trabajo ha sido publicado en la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Luque et al., 2003).

La cianasa de la estirpe CECT5344, sólo enriquecida por tratamiento térmico o parcialmente purificada mediante tratamiento térmico y cromatografía de intercambio iónico, es inmovilizada de forma covalente en vidrio de poro controlado (Gráfico 117). La inmovilización covalente es uno de los métodos que más establemente une las enzimas, pero, sin embargo, la participación de algún residuo aminoacídico del centro activo en la unión al soporte puede ocasionar la inactivación de la enzima. La cianasa de *P.pseudoalcaligenes* se inmoviliza de forma eficiente y conservando su actividad (Gráfico 118). Uno de los factores más importantes a tener en cuenta en el desarrollo de un biosensor es la estabilidad a lo largo del tiempo del componente biológico, en nuestro caso la cianasa. A diferencia del reactor con la cianasa enriquecida por tratamiento térmico, el reactor preparado con la enzima parcialmente purificada experimenta una gran disminución inicial de su actividad, aunque su elevada actividad específica también hace posible su utilización en análisis rutinarios (Gráfico 119). La diferencia de estabilidad entre ambas preparaciones parece ser debida a factores inespecíficos, ya que la inactivación de la cianasa es mayor cuanto más pura se encontraba la preparación.

La optimización del método se ha llevado a cabo analizando todas las variables que potencialmente pueden influir en el proceso, agrupadas en variables físicas, químicas e hidrodinámicas. La temperatura afecta tanto a la reacción de derivatización como a la reacción enzimática, permitiendo el carácter termoestable de la cianasa mantener el sistema a la temperatura óptima de la reacción de derivatización (50 °C), temperatura a la cual la enzima inmovilizada también trabaja de forma óptima. En cuanto a las variables dinámicas se observa que, mientras que un flujo alto en el sistema disminuye drásticamente la señal, flujos pequeños proporcionan buenas respuestas como consecuencia de un mayor tiempo de contacto existente tanto en el IMER como en la reacción de derivatización. Sin embargo en estas condiciones la frecuencia de muestreo disminuye, por lo que finalmente se ha elegido un flujo intermedio (0,5 ml·min⁻¹) como compromiso entre ambas variables. El biosensor desarrollado en este trabajo, con un límite de detección de 0,519 μmol·l, presenta una sensibilidad superior a la mayoría de métodos descritos hasta el momento. Además, también se demuestra la precisión del dispositivo. La insensibilidad de la enzima a compuestos potencialmente inhibidores,

junto con la posibilidad de establecer un cortocircuito que evite el paso de la muestra por el IMER, hacen de éste un método potencialmente aplicable a cualquier tipo de muestra, incluidas las que contienen amonio. Además de su utilización en un proceso de biorremediación (Gráfico 121), su aplicabilidad analítica ha sido validada por estudios de recuperación en los que se obtienen recuperaciones del 85,9 y 97,4%, lo que revela la ausencia de efectos de la matriz empleada (Cuadro 20).

Las características del sistema biosensor propuesto hacen de éste una potente herramienta para la determinación de cianato, y, por lo tanto, una atractiva alternativa al resto de métodos convencionales. La combinación de un sistema de inyección en flujo con una enzima inmovilizada aumenta la sensibilidad y selectividad de este método con respecto a los métodos ya existentes. Un importante aspecto a remarcar es que el uso de la cianasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha permitido trabajar a temperaturas y pHs normalmente adversos al resto de enzimas. Este sistema biosensor ofrece también otras importantes ventajas: alta sensibilidad, simplicidad del proceso, escasas interferencias y elevada capacidad de automatización para desarrollar un rápido análisis de un gran número de muestras.



Conclusiones

Capítulo V

V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. En la degradación de cianuro llevada a cabo por la cepa alcalófila *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 están implicados una ruta principal de degradación a través de cianhidrinas y un sistema de adquisición de hierro basado en la producción de sideróforos.
2. El metabolismo del cianuro, del cianato y de otros compuestos nitrogenados están relacionados en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. En esta bacteria, la cianasa posee una función asimiladora, proceso que es reprimido por amonio y puede estar en competencia con el nitrato, de forma que el orden de preferencia de estas fuentes de nitrógeno es $\text{NH}_4^+ > \text{OCN}^- > \text{NO}_3^-$.
3. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria idónea para su aplicación en la biorremediación de residuos cianurados, principalmente los procedentes de la industria joyera. Además, las características del biosensor desarrollado con la cianasa de la estirpe CECT5344 hacen de aquel una poderosa herramienta para la determinación de cianato en comparación con los métodos convencionales.



Bibliografía

Bibliografía

- Adjei MD, Ohta Y (2000) Factors affecting the biodegradation of cyanide by *Burkholderia cepacia* strain C-3. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89:274-277.
- Adjei MD, Ohta Y (1999) Isolation and characterization of a cyanide-utilizing *Burkholderia cepacia* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:699-704.
- Akcil A (2003) Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotech Adv* 21:501-511.
- Alexander M (1999) Biodegradation and bioremediation. Academic Press.
- Alexander M (1965) Biodegradation: Problems of molecular recalcitrance and microbial fallibility. *Advances in Applied Microbiology* 7:35-80.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Anderson PM, Little RM (1986) Kinetic properties of cyanase. *Biochemistry* 25:1621-1626.
- Anderson PM (1980) Purification and properties of the inducible enzyme cyanase. *Biochemistry* 19:2882-2888.
- Andrade MC, Figueira MM, Linardi VR (1995) Utilization of ammonia, generated from abiotic cyanide degradation, by *Rhodotorula rubra*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:343-344.
- Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* 27:215-237.
- 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.

- Arcondéguy T, Jack R, Merrick M (2001) PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65:80-105.
- Arp DJ, Zumft WG (1983) L-methionine-SR-sulfoximine as a probe for the role of glutamine synthetase in nitrogenase switch-off by ammonia and glutamine in *Rhodospseudomonas palustris*. *Arch Microbiol* 134:17-22.
- Ashcroft JR, Haddock BA (1975) Synthesis of alternative membrane-bound redox carriers during aerobic growth of *Escherichia coli* in the presence of potassium cyanide. *Biochem J* 148:349-352.
- Askeland RA, Morrison SM (1983) Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 45:1802-1807.
- Asmus E, Garschagen H (1953) The use of barbituric acid for the photometric determination of cyanide and thiocyanate. *Z Anal Chem* 138:414-422.
- Atlas RM, Bartha R (2002) Ecología microbiana y Microbiología ambiental. PEARSON EDUCACIÓN, S.A., Madrid.
- Atlas RM, Pramer D (1990) Focus on bioremediation. *ASM News* 56:7.
- ATSDR (1993) Agency for toxic substances and disease registry. Toxicological profile for cyanide. U.S. Dept. of health and human services, Public health service. TP-92-09.
- Baeumner AJ (2003) Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. *Anal Bioanal Chem* 377:434-445.
- Banerjee A, Sharma R, Banerjee UC (2002) The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:33-44.
- Barclay M, Hart A, Knowles CJ, Meeussen JCL, Tett VA (1998) Biodegradation of metal cyanide by mixed and pure cultures of fungi. *Enz Microb Techn* 22:223-231.
- Barclay M, Tett VA, Knowles CJ (1998) Metabolism and enzymology of cyanide/metallo cyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions. *Enz Microb Techn* 23:321-330.

- 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.
- Belkin S (2003) Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Current Opinion in Microbiology* 6:206-212.
- Bergmeyer HU, Beutler H-O (1985) *Methods of enzymatic analysis*, Vol. VIII, 3^a edición.
- Berthelot M (1859) Répertoire Chimie Pure Appliquée, p. 284.
- Berthold DA, Andersson ME, Nordlund P (2000) New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1460:241-254. Review.
- Blasco R, Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Castillo F (2003) Nuevo procedimiento para la degradación bacteriana de cianuro y/o sus complejos metálicos, nueva cepa bacteriana empleada en dicho procedimiento y aplicaciones del mismo. Patente Nacional n° P200100989.
- Blasco R, Martínez-Luque M, Madrid MP, Castillo F, Moreno-Vivián C (2001) *Rhodococcus* sp. RBI grows in the presence of high nitrate and nitrite concentrations and assimilates nitrate in moderately saline environments. *Arch Microbiol* 175:435-440.
- Blasco R, Castillo F, Martínez-Luque M (1997) The assimilatory nitrate reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* EIF1 is a flavoprotein. *FEBS Lett* 414:45-49.
- Blumenthal SG, Hendrickson HR, Abrol YP, Conn EE (1968) Cyanide metabolism in higher plants. III, The biosynthesis of β -cyanoalanine. *J Biol Chem* 243:5302-5307.
- Borchers R (1977) Allantoin determination. *Anal Biochem* 79:612-613.
- Bordo D, Bork P (2002) The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. *EMBO reports* 3:741-746.
- 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.

- Brenner V, Arensdorf JJ, Foght DD (1994) Genetic construction of PCB degraders. *Biodegradation* 5:359-377.
- Brysk MM, Ressler C (1970) γ -cyano- α -L-aminobutyric acid. A new product of cyanide fixation in *Chromobacterium violaceum*. *J Biol Chem* 245:1156-1160.
- Brysk MM, Corpe WA, Hanks LV (1969) β -cyanoalanine formation by *Chromobacterium violaceum*. *J Bacteriol* 97:322-327.
- Bultreys A, Gheysen I, Wathélet B, Maraite H, de Hoffman E (2003) High-performance liquid chromatography analyses of pyoverdinin siderophores differentiate among phytopathogenic fluorescent *Pseudomonas* species. *Appl Environ Microbiol* 69:1143-1153.
- Bultreys A, Gheysen I, Maraite H, de Hoffmann E (2001) Characterization of fluorescent and nonfluorescent peptide siderophores produced by *Pseudomonas syringae* strains and their potential use in strain identification. *Appl Environ Microbiol* 67:1718-1727.
- Burlina A (1985) *Methods of enzymatic analysis*, Vol. VII, 3^a edición.
- Caruso SC (1975) The chemistry of cyanide compounds and their behavior in the aquatic environment. Carnegie Mellon Institute of Research.
- Castric PA, Strobel GA (1969) Cyanide metabolism by *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* 244:4089-4094.
- Cawse PA (1967) The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst* 92:311-315.
- Chapatwala KD, Babu GRV, Vijaya OK, Kumar KP, Wolfram JH (1998) Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20:28-33.
- Chen W, Bruhlmann F, Richnis RD, Mulchandani A (1999) Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 10:137-141.
- Chena S-C, Liu JK (1999) The respiratory responses to cyanide of a cyanide-resistant *Klebsiella oxytoca* bacterial strain. *FEMS Microbiol Lett* 175:37-43.

- Cluness MJ, Turner PD, Clements E, Brown DT, O'Reilly C (1993) Purification and properties of cyanide hydratase from *Fusarium lateritium* and analysis of the corresponding *chl* gene. *J Gen Microbiol* 139:1807-1815.
- Comolli JC, Donohue TJ (2002) *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. *Mol Microbiol* 45:755-768.
- Connell DW, Hawker DW, Warne MStJ, Vowles PP (1997) Basic concepts of environmental chemistry. Lewis Publishers, Boca Raton, New York.
- Cooper M, Tavankar GR, Williams HD (2003) Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 149:1275-1284.
- Cornelis P, Matthijs S (2002) Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environmental Microbiology* 4:787-798.
- Cunningham L, Pitt M, Williams HD (1997) The *cioAB* genes from *Pseudomonas aeruginosa* code for a novel cyanide-insensitive terminal oxidase related to the cytochrome *bd* quinol oxidases. *Mol Microbiol* 24:579-591.
- Cunningham L, Williams HD (1995) Isolation and characterization of mutants defective in the cyanide-insensitive respiratory pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 177:432-438.
- D'Souza SF (2001) Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* 16:337-353. Review.
- De Lorenzo V (1994) Designing microbial systems for gene expression in the field. *TIBTECH* 12:365-371.
- Devereux J, Haerberli P, Smithies O (1984) A comprehensive set of sequence analysis program for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12:387-395.
- Díaz E, Munthali M, de Lorenzo V, Timmis KN (1994) Universal barrier to lateral spread of specific genes among microorganisms. *Mol Microbiol* 13:855-861.
- Dictor MC, Battaglia-Brunet F, Morin D, Bories A, Clarens M (1997) Biological treatment of gold ore cyanidation wastewater in fixed bed reactors. *Env Pollut* 97:287-294.

- Dorr PK, Knowles CJ (1989) Cyanide oxygenase and cyanase activities of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *FEMS Microbiol Lett* 60:289-294.
- Dowds BC (1994) The oxidative stress response in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 124:255-263.
- Drechsel H, Thieken A, Reissbrodt R, Jung G, Winkelmann G (1993) α -keto acids are novel siderophores in the genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* and are produced by amino acid deaminases. *J Bacteriol* 175:2727-2733.
- Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK (2002) Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:143-152. Review.
- Dubey SK, Holmes DS (1995) Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World J Microbiol Biotech* 11:257-265.
- Dukan S, Nystrom T (1998) Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Genes Dev* 12:3431-3441.
- Dumestre A, Chone T, Portal J-M, Gerard M, Berthelin J (1997) Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soils. *Appl Environ Microbiol* 63:2729-2734.
- Dunnill PM, Fowden L (1965) Enzymatic formation of β -cyanoalanine from cyanide by *Escherichia coli* extracts. *Nature* 208:1206-1207.
- Dursun AY, Alik A, Aksu Z (1999) Degradation of ferrous(II) cyanide complex ions by *Pseudomonas fluorescens*. *Proc Biochem* 34:901-908.
- Ebbs S (2004) Biological degradation of cyanide compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 15:231-236.
- Eisler R (1991) Cyanide hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service, Biological Reports v. 85 (1.23).
- Endo T, Watanabe I. (1989) Nitrile hydratase of *Rhodococcus* sp. N-774. *FEBS LETTERS* 243:61-64.

- Fagan P, Paull B, Haddad PR, Dunne R, Kamar H (1997). Ion chromatographic analysis of cyanate in gold processing samples containing large concentrations of copper(I) and other metallo-cyanide complexes. *J Chromatogr A* 770:175-183.
- Faraldo-Gómez JD, Sansom MSP (2003). Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nature Reviews* 4:105-116.
- Faust RA (1994). Toxicity summary for cyanide. Oak ridge reservation environmental restoration program. Oak Ridge National Laboratory, Tennessee.
- Fernandez RF, Dolgih E, Kunz DA (2004). Enzymatic assimilation of cyanide via pterin-dependent oxygenolytic cleavage to ammonia and formate in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Appl Environ Microbiol* 70:121-128.
- Figueira MM, Ciminelli VST, de Andrade MC, Linardi VR (1996). Cyanide degradation by an *Escherichia coli* strain. *Can J Microbiol* 42:519-523.
- Finnegan I, Toerien S, Abbot L, Smit F, Raubenheimer HG (1991). Identification and characterization of an *Acinetobacter* sp. capable of assimilation of a range of cyano-metal complexes, free cyanide ions and simple organic nitriles. *Appl Microbiol Biotechnol* 36:142-144.
- Fogg GE (1956). The comparative physiology and biochemistry of the blue-green algae. *Bacteriol Rev* 20:148-165.
- Fry WE, Munch DC (1975). Hydrogen cyanide detoxification by *Gloeocercospora sorghi*. *Physiol Plant Pathol* 7:23-33.
- Fry WE, Millar RL (1972). Cyanide degradation by an enzyme from *Stemphylium loti*. *Arch Biochem Biophys* 151:468-474.
- Garrett RH, Nason A (1969). Further purification and properties of *Neurospora* nitrate reductase. *J Biol Chem* 244:2870-2882.
- Genevois ML (1929). Sur la fermentation et sur la respiration chez les végétaux chlorophylliens. *Revue Génétique Botanique* 41:252-271.
- Gordon SA, Fleck A, Bell J (1978). Optimal conditions for the estimation of ammonium by the Berthelot reaction. *Ann Clin Biochem* 15:270-275.

- Guerrero MG, Vega JM, Losada M (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann Rev Plant Physiol* 32:169-204.
- Guerrero MG, Vega JM, Leadbetter E, Losada M (1973) Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from *Azotobacter chroococcum*. *Arch Mikrobiol* 91:287-304.
- Guilloton M, Lamblin AF, Kozliak EI, Gerami-Nejad M, Tu C, Silverman D, Anderson PM, Fuchs JA (1993) A physiological role for cyanate-induced carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175:1443-1451.
- Guilloton M, Karst F (1987) Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants lacking inducible cyanase. *J Gen Microbiol* 133:645-653 (A).
- Guilloton M, Karst F (1987) Cyanate specifically inhibits arginine biosynthesis in *Escherichia coli* K12: a case of by-product inhibition? *J Gen Microbiol* 133:655-665 (B).
- Guilloton M, Karst F (1985) A spectrophotometric determination of cyanate using reaction with 2-aminobenzoic acid. *Anal Biochem* 149:291-295.
- Guilloton M, Hargreaves AB (1972) Cyanate hydrolysis by a flavobacterium species. *C R Acad Sci* 275:1827-1830.
- Gygi SP, Aebersold R (2000) Mass spectrometry and proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 4:489-494. Review.
- Harano Y, Suzuki I, Maeda S-I, Kaneko T, Tabata S, Omata T (1997) Identification and nitrogen regulation of the cyanase gene from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 179:5744-5750.
- Harris R, Knowles CJ (1983a) The conversion of cyanide to ammonia by extracts of a strain of *Pseudomonas fluorescens* that utilizes cyanide as source of nitrogen for growth. *FEMS Microbiol Lett* 20:337-341.
- Harris R, Knowles CJ (1983b) Isolation and growth of a *Pseudomonas* species that utilizes cyanide as a source of nitrogen. *J Gen Microbiol* 129:1005-1011.

- 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 gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172:6557-6567.
- Higashibata A, Fujiwara T, Fukumori Y (1998) Studies on the respiratory system in alkaliphilic *Bacillus*; a proposed new respiratory mechanism. *Extremophiles* 2:83-92.
- Horikoshi K (1999) Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:735-750.
- Imlay JA (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* 57:395-418.
- Ingvorsen K, Hojer-Pedersen B, Godtfredsen SE (1991) Novel cyanide-hydrolysing enzyme from *Alcaligenes xylooxidans* subsp. *denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* 57:1783-1789.
- Isildak I, Asan A (1999) Simultaneous detection of monovalent anions and cations using all solid-state contact PVC membrane anion and cation-selective electrodes as detectors in single column ion chromatography. *Talanta* 48:967-978.
- Jandhyala D, Berman M, Meyers PR, Sewell BT, Willson RC, Benedik MJ (2003) CynD, the cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus*: gene cloning and structural studies. *Appl Environ Microbiol* 69:4794-4805.
- Kaneko T, Tanaka A, Sato S, Kotani H, Sazuka T, Miyajima N, Sugiura M, Tabata S (1995) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. I. Sequence features in the 1 Mb region from map positions 64% to 92% of the genome. *DNA Res.* 2:153-166.
- Kang MH, Park JM (1997) Sequential degradation of phenol and cyanide by a commensal interaction between two microorganisms. *J Chem Tech Biotechnol* 69:226-230.
- Kanhasamy AG, Ardelt B, Malave A, Mills EM, Powley TL, Borowitz JL, Isom GE (1997) Reactive oxygen species generated by cyanide mediate toxicity in rat pheochromocytoma cells. *Toxicology Letters* 93:47-54.

- Kao CM, Liu JK, Lou HR, Lin CS, Chen SC (2003) Biotransformation of cyanide to methane and ammonia by *Klebsiella oxytoca*. *Chemosphere* 50:1055-1061.
- Kelly M, Postgate JR, Richards RL (1967) Reduction of cyanide and isocyanide by nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. *Biochem J* 102:1-3.
- Kim S-H, Oriol P (2000) Cloning and expression of the nitrile hydratase and amidase genes from *Bacillus* sp. BR449 into *Escherichia coli*. *Enz Microb Technol* 27:492-501.
- Knowles CJ, Dorr PK (1989) Cyanide oxygenase and cyanase activities of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *FEMS Microbiology Letters* 60:289-294.
- Knowles CJ (1988) Cyanide utilization and degradation by microorganisms. Ciba Foundation Symposium 140: Cyanide compounds in biology.
- Knowles CJ (1976) Microorganisms and cyanide. *Bacteriological Reviews* 40:652-680.
- Kobayashi M, Shimizu S (2000) Nitrile hydrolases. *Current Opinion in Chemical Biology* 4:95-102.
- Koshiishi I, Mamura Y, Imanari T (1997) Cyanate causes depletion of ascorbate in organisms. *Biochim Biophys Acta* 3:566-574.
- Kowalska M, Bodzek M, Bohdziewicz J (1998) Biodegradation of phenols and cyanides using membranes with immobilized microorganisms. *Proc Biochem* 33:189-197.
- Kozliak EI, Guilloton MB, Gerami-Nejad M, Fuchs JA, Anderson PM (1994) Expression of proteins encoded by the *Escherichia coli* *cyn* operon: carbon dioxide-enhanced degradation of carbonic anhydrase. *J Bacteriol* 176:5711-5717.
- Kraus LM, Gaber L, Handorf CR, Marti H-P, Kraus AP (2001) Carbamoylation of glomerular and tubular proteins in patients with kidney failure: a potential mechanism of ongoing renal damage. *Swiss Med Wkly* 131:139-145.
- Kraus LM, Kraus AP (1998) The search for the uremic toxin: the case for carbamoylation of amino acids and proteins. *Wien Klin Wochenschr* 110:521-530.

- Kunz DA, Fernandez RF, Parab P (2001) Evidence that bacterial cyanide oxygenase is a pterin-dependent hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 287:514-518.
- Kunz DA, Chen J-L, Pan G (1998) Accumulation of α -keto acids as essential components in cyanide assimilation by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Appl Environ Microbiol* 64:4452-4459.
- Kunz DA, Wang C-S, Chen J-L (1994) Alternative routes of enzymatic cyanide metabolism in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Microbiology* 140:1705-1712.
- Kunz DA, Nagappan O, Silva-Avalos J, DeLong GT (1992) Utilization of cyanide as a nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764: evidence for multiple pathways of metabolic conversion. *Appl Environ Microbiol* 58:2022-2029.
- Kunz DA, Nagappan O (1989) Cyanase-mediated utilization of cyanate in *Pseudomonas fluorescens* NCIB 11764. *Appl Environ Microbiol* 55:256-258.
- Kwon HK, Woo SH, Park JM (2002) Degradation of tetracyanonickelate (II) by *Cryptococcus humicolus* MCN2. *FEMS Microbiol Lett* 214:211-216.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227:680-685.
- LaGrega MD, Buckingham PL, Evans JC (1996) Gestión de residuos tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. McGRAW-HILL.
- Laksanalamai P, Robb FT (2004) Small heat shock proteins from extremophiles: a review. *Extremophiles* 8:1-11.
- Lamblin A-FJ, Fuchs JA (1994) Functional analysis of the *Escherichia coli* K-12 *cyn* operon transcriptional regulation. *J Bacteriol* 176:6613-6622.
- Laville J, Blumer C, Schroetter CV, Gaia V, Défago 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.
- Lawrie AC (1979) Effect of carbamoyl phosphate on nitrogenase in *Anabaena cylindrica* Lemm. *J Bacteriol* 139:115-119.

- Layh N, Hirrlinger B, Stolz A, Knackmuss HJ (1997) Enrichment strategies for nitrile-hydrolysing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:668-674
- Levy M, Miller SL, Brinton K, Bada JL (2000) Prebiotic synthesis of adenine and amino acids under Europa-like conditions. *Icarus* 145:609-613.
- Li J-G, Burgess BK, Corbin JL (1982) Nitrogenase reactivity: cyanide as substrate and inhibitor. *Biochemistry* 21:4393-4402.
- Liu J-K, Liu C-H, Lin C-S (1997) The role of nitrogenase in a cyanide-degrading *Klebsiella oxytoca* strain. *Proc Nat Sci Coun*, part B 21:37-42.
- Lowe DJ, Fisher K, Thorneley RNF, Vaughn SA, Burgess BK (1989) Kinetics and mechanism of the reaction of cyanide with molybdenum nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry* 28:8460-8466.
- Lundquist P, Backmangullers B, Kagedal B, Nilsson L, Rosling H (1993) Fluorometric determination of cyanate in plasma by conversion to 2,4(1H,3H)-quinazolinedione and separation by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 211:23-27.
- Luque-Almagro VM, Blasco R, Fernández-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.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2004) Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Edición, Pearson Education, S.A., Madrid.
- Magasanik B (1996) Regulation of nitrogen utilization. En: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology (Neidhardt, FC et al. eds), pp. 1344-1356. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- Mandel M, Higa A (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53:154-162.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Marck C (1988) 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res* 16:1829-1836.

- Marier JR, Rose D (1964) Determination of cyanate, and a study of its accumulation in aqueous solutions of urea. *Anal Biochem* 7:304-314.
- Martin S, Harding JJ (1989) Site of carbamoylation of bovine gamma-II-cristallin by potassium [¹⁴C]cyanate. *Biochem J* 262:909-915.
- Martins dos Santos VAP, Timmis KN, Tümmler B, Weinel C (2004) Genomic features of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Pseudomonas, Volume 1*, edited by Juan-Luis Ramos. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Maruyama A, Ishizawa K, Takagi T (2000) Purification and characterization of β -cyanoalanine synthase and cysteine synthases from potato tubers: are β -cyanoalanine synthase and mitochondrial cysteine synthase same enzyme?. *Plant cell physiol* 41:200-208.
- Massom M, Townshend A (1986) Cyclic regeneration of nicotinamide adenine dinucleotide with immobilized enzymes. *Anal Chim Acta* 185:49-55.
- Mathangi DC, Namasivayam A (2004) Calcium ions: its role in cyanide neurotoxicity. *Food Chem Toxicol* 42:359-361.
- McAfee BJ, Taylor A (1999) A review of the volatile metabolites of fungi found on wood substrates. *Natural toxins* 7:283-303.
- McMorran BJ, Shantha Kumara HMC, Sullivan K, Lamont IL (2001) Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147:1517-1524.
- Merrick MJ, Edwards RA (1995) Nitrogen control in bacteria. *Microbiol Rev* 59:604-622.
- Messner KR, Imlay JA (1999) The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 274:10119-10128.
- Meyer T, Burow M, Bauer M, Papenbrock J (2003) *Arabidopsis* sulfurtransferases: investigation of their function during senescence and in cyanide detoxification. *Planta* 217:1-10.

- Meyer J-M, Geoffroy VA, Baida N, Gardan L, Izard D, Lemanceau P, Achouak W, Palleroni NJ (2002) Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol* 68:2745-2753.
- Meyer J-M (2000) Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol* 174:135-142.
- Meyers PR, Rawlings DE, Woods DR, Lindsey GG (1993) Isolation and characterization of a cyanide dihydratase from *Bacillus pumilus* C1. *J Bacteriol* 175:6105-6112.
- Militzer W (1949) The addition of cyanide to sugars. *Arch Biochem Biophys* 143:143-148.
- Mills EM, Gunasekar PG, Pavlakovic G, Isom GE (1996) Cyanide-induced apoptosis and oxidative stress in differentiated PC12 cells. *J Neurochem* 67:1039-1046.
- Miyakawa S, Cleaves HJ, Miller SL (2002) The cold origin of life: A. Implications based on the hydrolytic stabilities of hydrogen cyanide and formamide. *Orig Life Evol Biosph* 32:195-208.
- Moller BL, Seigler DS (1999) Biosynthesis of cyanogenic glycosides, cyanolipids, and related compounds. *Plant amino acids: Biochemistry and biotechnology*. Ed. B. K. Singh, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 563-609.
- Mongkolsuk S, Helmann JD (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. *Molecular Microbiology* 45:9-15.
- Moreno-Vivián C, Cabello P, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F (1999) Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J Bacteriol* 181:6573-6584.
- Moreno-Vivián C, Cejudo FJ, Cárdenas J, Castillo F (1983) Ammonia assimilation pathways in *Rhodopseudomonas capsulata* EIF1. *Arch Microbiol* 136:147-151.
- Morikawa H, Erkin ÖC (2003) Basic processes in phytoremediation and some applications to air pollution control. *Chemosphere* 52:1553-1558.
- Morrison GR (1971) Microchemical determination of organic nitrogen with Nessler reagent. *Anal Biochem* 43:527-532.
- Mudder TI, Botz MM, Smith A (2001) Chemistry and treatment of cyanidation wastes. Mining Journal Books Ltd. London.

- Munthali MT, Timmis KN, Restricting the dispersal of recombinant DNA: design of a contained biological catalyst. *Biotechnology* 14:189-191.
- Nahrstedt A (1988) Cyanogenesis and the role of cyanogenic compounds in insects. Ciba Foundation Symposium 140: Cyanide compounds in biology.
- Nakamura H, Karube I (2003) Current research activity in biosensors. *Anal Bioanal Chem* 377:446-468.
- Nazifi S, Aminlari M, Alaibakhsh MA (2003) Distribution of rhodanese in tissues of goat (*Capra hircus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 134:515-518.
- Neilands JB (1995) Siderophores : structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry* 270:26723-26726.
- Neilands JB (1981) Microbial iron compounds. *Ann Rev Biochem* 50:715-731.
- Ninfa AJ, Atkinson MR (2000) PII signal transduction proteins. *Trends in Microbiology* 8:172-179.
- O'Reilly C, Turner PD (2003) The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes –a comparative study. *J Appl Microbiol* 95:1161-1174.
- Oka T, Arima K (1965) Cyanide resistance in *Achromobacter* II. Mechanism of cyanide resistance. *J Bacteriol* 90:744-747.
- Oliveira MA, Reis EM, Nozaki J (2001) Biological treatment of wastewater from the cassava meal industry. *Environ Res Sec. A* 85:177-183.
- Orgel LE (2004) Prebiotic adenine revisited: eutectics and photochemistry. *Orig Life Evol Biosph* 34:361-369.
- Oró J (1977) Química prebiológica y origen de la vida. Una visión personal. *Avances de la Bioquímica, Salvat Ed.* 515-541.
- Pace HC, Brenner C (2001) The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biology* 2:1-9. Review.

- Paitan Y, Biran D, Biran I, Shechter N, Babai R, Rishpon J, Ron EZ (2003) On-line and in situ biosensors for monitoring environmental pollution. *Biotechnology Advances* 22:27-33.
- Pandey A, Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837-846. Review.
- Paneque A, Losada M (1966) Comparative reduction of nitrate by spinach nitrate reductase with NADH_2 and NADPH_2 . *Biochim Biophys Acta* 128:202-204.
- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH (1998) Major Facilitator Superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:1-34.
- Pearson WR, Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:2444-2448.
- Pieniazek A, Gwozdziński K (2003) Carbamylation of proteins leads to alterations in the membrane structure of erythrocytes. *Cell Mol Biol Lett* 8:127-131.
- Pistorius EK, Jetschmann K, Voss H, Vennesland B (1979) The dark respiration of *Anacystis nidulans*. Production of HCN from histidine and oxidation of basic amino acids. *Biochim Biophys Acta* 585:630-642.
- Poulton JE (1988) Cyanide utilization and degradation by microorganisms. Ciba Foundation Symposium 140: Cyanide compounds in biology.
- Powell KA, Beardsmore AJ, Naylor TW, Corcoran EG (1983) The microbial treatment of cyanide waste. *J Chem E Symposium Series* 77:307-313.
- Precigou S, Goulas P, Duran R (2001) Rapid and specific identification of nitrile hydratase (NHase)-encoding genes in soil samples by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Letters* 204:155-161.
- Qian M, Eaton JW, Wolff SP (1997) Cyanate-mediated inhibition of neutrophil myeloperoxidase activity. *Biochem J* 326:159-166.
- Quan Z-X, Bae J-W, Rhee S-K, Cho Y-G, Lee S-T (2004) Toxicity and degradation of metal-complexed cyanide by a bacterial consortium under sulfate-reducing conditions. *Biotechnology Letters* 26:1007-1011.

- Ray WK, Zeng G, Potters MB, Mansuri AM, Larson TJ (2000) Characterization of a 12-Kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol* 182:2277-2284.
- Raybuck SA (1992) Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. *Biodegradation* 3:3-18.
- Reddy CS, Ghai R, Rashmi, Kalia VC (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Technol* 87:137-146.
- Reissbrodt R, Kingsley R, Rabsch W, Beer W, Roberts M, Williams PH (1997) Iron-regulated excretion of α -keto acids by *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 179:4538-4544.
- Rhoads DM, Umbach AL, Sweet CR, Lennon AM, Rauch GS, Siedow JN (1998) Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *J Biol Chem* 273:30750-30756.
- Rivera-Ortiz JM, Burris RH (1975) Interactions among substrates and inhibitors of nitrogenase. *J Bacteriol* 123:537-545.
- Rollinson G, Jones R, Meadows MP, Harris RE, Knowles CJ (1987) The growth of a cyanide-utilising strain of *Pseudomonas fluorescens* in liquid culture on nickel cyanide as a source of nitrogen. *FEMS Microbiol Lett* 40:199-205.
- Ruddock LW, Klappa P (1999) Oxidative stress: protein folding with a novel redox switch. *Current Biology* 9:400-402.
- Sakai T, Yanase H, Sawada M, Tonomura K (1981) Formation of β -cyanoalanine by cyanide-resistant strain *Enterobacter* sp. 10-1. *J Biol Chem* 45:2053-2062.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sayler GS, Ripp S (2000) Field application of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Curr Opin Biotechnol* 11:286-289.
- Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium*. *Gene* 145:69-73.

- Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47-56.
- Schygulla-Banek K (1993) Verwertung von cyanid und eisencyanokomplexen durch ein neuartiges bakterium. Ph Thesis University of Stuttgart.
- Seaver LC, Imlay JA (2001) Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:7173-7181.
- 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.
- Shapiro R (1995) The prebiotic role of adenine: a critical analysis. *Orig Life Evol Biosph* 25:83-98.
- Shou Y, Li N, Li L, Borowitz JL, Isom GE (2002) NF- κ B-mediated up-regulation of Bcl-X_s and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis. *J Neurochem* 81:842-852.
- Silva-Avalos J, Richmond MG, Nagappan O, Kunz DA (1990). Degradation of the metal cyano-complex of tetracyano-nickelate(II) by cyanide-utilizing bacterial isolates. *Appl Environ Microbiol* 56:3664-3670.
- Simon R., Priefer U., Pühler A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1:784-791.
- Smith A, Mudder T (1996) Tratamiento de residuos de cianuración. Mining Journal Books Ltd.
- Snell FD, Snell CT (1949) Colorimetric methods of analysis. 3^a ed., vol. 2, pp. 804-805. D van Nostrand Reinhold, Nueva York.
- Solomonson LP, Spehar AM (1979) Stimulation of cyanide formation by ADP and its possible role in the regulation of nitrate reductase. *J Biol Chem* 254:2176-2179.
- Suh Y-J, Park JM, Yang J-W (1994) Biodegradation of cyanide compounds by *Pseudomonas fluorescens* immobilized on zeolite. *Enz Microb Technol* 16:529-533.
- Sung Y-C, Fuchs JA (1988) Characterization of the *cyn* operon in *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* 263:14769-14775.

- Sung Y-C, Parsell D, Anderson PM, Fuchs JA (1987) Identification, mapping, and cloning of the gene encoding cyanase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 169:2639-2642 (A).
- Sung Y-C, Anderson PM, Fuchs JA (1987) Characterization of high-level expression and sequencing of the *Escherichia coli* K-12 *cynS* gene encoding cyanase. *J Bacteriol* 169:5224-5230 (B).
- Suzuki I, Sugiyama T, Omata T (1996) Regulation by cyanate of the genes involved in carbon and nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 178:2688-2694.
- Tavankar GR, Mossialos D, Williams HD (2003) Mutation or overexpression of a terminal oxidase leads to a cell division defect and multiple sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 278:4524-4530.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-80.
- Timmis KN, Piper DH (1999) Bacteria designed for bioremediation. *Trends Biotechnol* 17:201-204.
- Torres B, Jaenecke S, Timmis KN, García JL, Díaz E (2000) A gene containment strategy based on a restriction-modification system. *Environ Microbiol* 2:555-563.
- Tsuchiya Y, Sumi K (1977) Thermal decomposition products of polyacrylonitrile. *J Appl Polym Sci* 21:975-980.
- Vallejo-Pecharrómán B, Luque de Castro MD (2002) Determination of cyanide by a pervaporation-UV-photodissociation potentiometric detection approach. *The Analyst* 127:267-271.
- Vanlerberghe GC, McIntosh L (1997) Alternative oxidase: from gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:703-734.
- Vasil ML, Ochsner UA (1999) The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Molecular Microbiology* 34:399-413.

- Vattanaviboon P, Panmanee W, Mongkolsuk S (2003) Induction of peroxide and superoxide protective enzymes and physiological cross-protection against peroxide killing by a superoxide generator in *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiology* 221:89-95.
- Vattanaviboon P, Whangsuk W, Panmanee W, Klomsiri C, Dharmsthiti S, Mongkolsuk S (2002) Evaluation of the roles that alkyl hydroperoxide reductase and Ohr play in organic peroxide-induced gene expression and protection against organic peroxides in *Xanthomonas campestris*. *Biochem Biophys Res Commun* 299:177-182.
- Veiga A, Arrabaça JD, Loureiro-Dias MC (2003) Cyanide-resistant respiration, a very frequent metabolic pathway in yeasts. *FEMS Yeast Re* 3:239-245.
- Vetter J (2000) Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* 38:11-36.
- Visca P, Colotti G, Serino L, Verzili D, Orsi N, Chiancone E (1992) Metal regulation of siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and functional effects of siderophore-metal complexes. *Appl Environ Microbiol* 58:2886-2893.
- Wackett LP, Hershberger CD (2001) Biocatalysis and biodegradation: microbial transformation of organic compounds. *ASM Press*. Washington, D.C.
- Wagner EL (1965) Calculated binding in the pseudohalide anions and their hydracids. *Journal of Chemical Physics* 43:2728-2735.
- Walsh MA, Otwinowski Z, Perrakis A, Anderson PM, Joachimiak A (2000) Structure of cyanase reveals that a novel dimeric and decameric arrangement of subunits is required for formation of the enzyme active site. *Structure* 8:505-514.
- Watanabe A, Yano K, Ikebukuro K, Karube I (1998) Cloning and expression of a gene encoding cyanidase from *Pseudomonas stutzeri* AK61. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:93-97.
- Watanabe A, Yano K, Ikebukuro K, Karube I (1998) Investigation of the potential active site of a cyanide-dihydratase using site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* 1382:1-4.
- Whitlock J, Mudder T (1998) The cyanide monograph. Primera edición, *Mining Journal Books*, London, England, United Kingdom.

- Witthohn K, Naumann CM (1984) Qualitative and quantitative studies on the compounds of the larval defensive secretion of *Zygaena trifolii* (Esper, 1783) (Insecta, Lepidoptera, Zygaenidae). *Comp Biochem Physiol C* 79:103-106.
- Wood AP, Kelly DP, McDonald IR, Jordan SL, Morgan TD, Khan S, Murrell JC, Borodina E (1998) A novel pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources. *Arch Microbiol* 169:148-158.
- Yamaguchi Y, Nakamura T, Kusano T, Sano H (2000) Three *Arabidopsis* genes encoding proteins with differential activities for cysteine synthase and β -cyanoalanine synthase. *Plant Cell Physiol* 41:465-476.
- Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ. (2000) A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21:3666-3672.
- Yanase H, Sakamoto A, Okamoto K, Kita K, Sato Y (2000) Degradation of the metal-cyano complex tetracyanonickelate (II) by *Fusarium oxysporum* N-10. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:328-334.
- Yoshikawa K., Adachi K., Nishijima M., Takadera T., Tamaki S., Harada K-I., Mochida K., Sano H. (2000) β -Cyanoalanine production by marine bacteria on cyanide-free médium and its specific inhibitory activity toward cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66:718-722.
- Zagrobelyny M, Bak S, Rasmussen AV, Jorgensen B, Naumann CM, Moller BL (2004) Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. *Phytochemistry* 65:293-306. Review.
- Zhao G, Ceci P, Ilari A, Giangiacomo L, Laue TM, Chiancone E, Chasteen ND (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 277:27689-27696.