



TESIS DOCTORAL

**Catabolismo de furfurales y compuestos
aromáticos en *Pseudomonas pseudoalcaligenes*
CECT 5344. Aislamiento de nuevas cepas
asimiladoras de cianuro y sus complejos
metálicos.**

Daniel Macías Granados

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética

Conformidad de los Directores:

Fdo: Rafael Blasco Plá

Fdo: M^a Isabel Igeño González

2014

*A mis padres, a mis herman@s y
a mi recién llegada sobrina Claudia...
Y como no... a mi súper-abuela!*

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, Dr. Rafael Blasco Plá y Dra. M^a Isabel Igeño González, por acompañarme durante estos cuatro años en el largo mundo de la investigación, y haber hecho posible este trabajo. Os agradezco los conocimientos que, gracias a vosotros, he conseguido adquirir durante esta larga estancia. A Rafa le agradezco los buenos momentos pasados en su despacho divagando sobre futuros experimentos, y su perseverancia cuando los resultados no marchaban. A Maribel agradecerle su ayuda durante estos largos y tediosos meses de escritura, además de su insistencia con las técnicas de biología molecular, y quitarme el miedo escénico que tenía en mutagénesis dirigida, que me privaba de “disfrutarla”.

A todas las personas que componen el grupo BioMic, que me acogieron desde el primer momento como uno más. Hablo de Maribel², Tino y Alberto. También agradecer a Ricardo, Juan Carlos, Julia, Marisa, Chus,... el buen trato que me han dado durante estos cuatro años.

A mis compañeros de trabajo, que sin duda, sin ellos no hubiera sido todo esto posible:

En primer lugar agradecer a Gloria todo lo que me ha ensañado desde el primer día que pisé el laboratorio. Lo bien que se ha portado conmigo dentro y fuera de estas cuatro paredes, siempre estando dispuesta a ofrecer su ayuda para todo, sencillamente GRACIAS!

A Sol Invictus (Alejandroff), por esos grandes momentos cafeteros en los que la imaginación se iba a otra parte; Tailandia, La India,... y como no, a los buenos ratejos que hemos podido compartir tomando algunas cervezas de más, aunque, en ocasiones lo recuerde vagamente...

A Tere por ser como una hermanita aquí en Cáceres, siempre dispuesta a escucharme y a aconsejarme. De las mejores personas que he podido conocer en Cáceres durante estos cuatro años.

A Marisa y Gra, por ser esas compañeras Zipi Zape que siempre están juntas, y con las que me encanta discutir, reñir,... pero siempre en modo sarcástico, salvo alguna que otra vez que me sacaban de mis casillas!

A Montaña, Marta, Caro,... por esos buenos momentos que hemos pasado en los pasillos y fuera del departamento.

A la Tuna de Magisterio de Cáceres, por los grandes momentos que me han hecho disfrutar, y la gran cantidad de ciudades que he podido visitar. Pero sobre todo a las grandes personas que he tenido la oportunidad de conocer... Siempre que pueda me escaparé de allá de donde esté para disfrutar de un Certamen, una buena comida navideña o cualquier otro evento.

A la gran cantidad de amigos que han hecho que mi estancia en Cáceres, durante estos cuatro años, haya sido realmente buena. Jamás pensé que me iba a ir tan bien!! Gran suerte que he tenido de conoceros; Emi (Nano), Maby, Trini, Patri, Juanma, José, Greg (El Puto Guiri), Isma,... Gracias a todos!!

A mis amigos de "TOA LA VÍA", que aunque no tenga la oportunidad de veros a menudo, sé que están ahí para cualquier cosa que necesite. MOMO, PLIMO, KISKA, CORDÓN, LITOS, GORDA, RAFA... grandes ratos que hemos disfrutado juntos. Aunque el trabajo y la distancia sólo nos dejen vernos de cuando en cuando, espero que los viajes en Semana Santa se mantengan por algunos años... Sois la leche!!

A mi Familia (mis Padres, mis Herman@s, mi Super-Abuela, mis ti@s, mis prim@s...), por ser la base de todo lo que soy, la educación y los valores que me han inculcado a los largos de todos estos años. Gracias a mi hermano José por animarme a recorrer este largo camino, cuando no lo veía del todo claro... aunque en ocasiones dijera, "¿¿para qué le habré hecho caso??", y a mi hermanita por sus visitas productivas allá donde me iba a estudiar! Os aprecio y os quiero mucho!!

A Ali, una de las mejores personas que he conocido... Gracias a esa casualidad, en un bar de Bilbao, tuve la oportunidad de verte por primera vez. A partir de ahí, qué más puedo decir... ¡eres un encanto! Me has ayudado mucho en mis "bajones", que aunque tenga pocos, también los tengo. Gracias por todos tus apoyos morales desde la distancia, y a las desconexiones "weekend". Y ahora...

FINANCIACIÓN:

Ministerio de Ciencia e Innovación

- BIO2011-30026-C02-01



Gobierno de Extremadura

- PRI07A097

- Ayuda a Grupos-BioMic GR10165-CCV019

GOBIERNO DE EXTREMADURA
Consejería de Empleo, Empresa e Innovación



UNIÓN EUROPEA
Fondo Social Europeo
"Una manera de hacer Europa"

Universidad de Extremadura



- Beca de Investigación para licenciados dentro del programa de Captación y Formación de Recursos Humanos de Excelencia en Investigación, Desarrollo e Innovación.

Fondo Europeo de Desarrollo Regional

- FEDER 2007-2013



Unión Europea
Fondo Europeo
de Desarrollo Regional

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral se ha realizado en el Grupo de Biotecnología de Microorganismos (BIOMIC) del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

Parte de los resultados de este trabajo se han presentado en los siguientes congresos y reuniones:

- XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Madrid. 3-6 de Septiembre de 2013.
- 6th International Meeting on Biotechnology. Bilbao. 19-21 de Septiembre de 2012.
- XI Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Cáceres. 12-14 de Junio de 2012.
- XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Barcelona. 5-8 de Septiembre de 2011.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han incluido en las siguientes publicaciones científicas:

- **Luque-Almagro V.M., Acera F., Igeño M.I., Wibberg D., Roldán M.D., Sáez L.P., Hennig M., Quesada A., Huertas M.J., Blom J., Merchán F., Escibano M.P., Jaenicke S., Estepa J., Guijo M.I., Martínez-Luque M., Macías D., Szczepanowski R., Becerra G., Ramirez S., Carmona M.I., Gutiérrez O., Manso I., Pühler A., Castillo F., Moreno-Vivián C., Schlüter A. y Blasco R. (2013)** Draft whole genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Environmental Microbiology* **15**: 253-270.
- **Wibberg D., Luque-Almagro V.M., Igeño M.I., Bremges A., Roldán M.D., Merchán F., Sáez L.P., Guijo M.I., Manso M.I., Macías D., Cabello P., Becerra G., Ibáñez M.I., Carmona M.I., Escibano M.M.P., Castillo F., Sczyrba A., Moreno-Vivián C., Blasco R., Pühler A. y Schlüter A. (2014)** Complete genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Journal of Biotechnology* **175**: 67-68.

ÍNDICE

1. Índice de Tablas.....	9
2. Índice de Figuras	11

ABREVIATURAS.....	17
--------------------------	-----------

I. INTRODUCCIÓN

1. La contaminación y el medio ambiente.....	23
2. Proceso de elaboración de bioetanol.....	26
3. Furaldehídos y sus derivados.....	28
3.1 Química de los furfurales.....	28
3.2 Producción de furfurales.....	30
3.3 Tratamientos para la eliminación de furfurales en hidrolizados lignocelulósicos	32
3.3.1 Métodos físicos.....	32
3.3.2 Métodos químicos.....	32
3.4 Biodegradación de furfurales	33
3.5 Genética de las rutas de degradación de compuestos furánicos.....	36
3.6 Efectos biológicos de los furfurales.....	38
3.7 Los furfurales como materias primas.....	39
4. Catabolismo de carbohidratos por <i>Pseudomonas</i>	40
5. Metabolismo de compuestos aromáticos.....	40
5.1 Rutas de degradación de compuestos aromáticos.....	41
5.1.1 Ruta del β -cetoadipato	44
5.1.2 Rutas de escisión <i>meta</i>	44
6. El cianuro	45
6.1 Química del cianuro y sus derivados.....	45
6.2 Fuentes de cianuro.....	47
6.3 Eliminación de cianuro	49
7. El género <i>Pseudomonas</i>	52
7.1 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	53
7.1.1 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	54

II. OBJETIVOS	59
----------------------------	----

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico.....	63
1.1 Aislamiento por enriquecimiento selectivo de cepas degradadoras de complejos ciano-metálicos	64
1.2 Análisis de la secuencia del gen rRNA 16S de las cepas degradadoras de compuestos metálicos cianurados.....	64
2. Medios y condiciones de cultivo.....	64
2.1 Medios de cultivo.....	64
2.1.1 Medios líquidos	64
2.1.1.1 Cultivos mixtos.....	66
2.1.2 Medios sólidos.....	67
2.1.2.1 Medios sólidos en gradiente de concentración de sustrato.....	67
2.1.2.2 Medio CAS.....	68
2.1.2.3 Unidades formadoras de colonias (CFU).....	69
2.2 Condiciones de cultivo.....	69
2.3 Pureza y conservación de los cultivos	70
3. Determinaciones analíticas.....	70
3.1 Determinación de la concentración de amonio	70
3.2 Determinación de la concentración de cianuro.....	71
3.3 Determinación de la concentración de glucosa.....	71
3.4 Determinación de la concentración de proteínas.....	72
3.4.1 Método de Bradford.....	72
3.4.2 Método de Lowry	72
3.5 Determinación de actividades enzimáticas	73
3.5.1 Actividad alcohol furfurílico deshidrogenasa	73
3.5.2 Actividad furfural deshidrogenasa.....	73
3.5.3 Actividad furoil-CoA sintetasa.....	73
3.5.4 Actividad furoil-CoA deshidrogenasa.....	74
4. Obtención de extractos acelulares	74
4.1 Recolección de células.....	74
4.2 Preparación de extractos acelulares.....	74

5. Caracterización de las enzimas.....	75
5.1 Temperatura óptima de las enzimas.....	75
5.2 pH óptimo de las enzimas.....	75
6. Cromatografía de intercambio iónico.....	75
6.1 Separación de las enzimas furfural alcohol deshidrogenasa y furfural deshidrogenasa.....	75
6.2 Determinación de metabolitos.....	76
7. Técnicas de biología molecular	76
7.1 Plásmidos	76
7.2 Extracción de DNA	77
7.2.1 Extracción y purificación de DNA genómico.....	77
7.2.2 Extracción y purificación de DNA plasmídico	78
7.3 Digestión del DNA con enzimas de restricción.....	78
7.4 Ligación del DNA	78
7.5 Electroforesis de DNA en gel de agarosa.....	79
7.6 Cuantificación del DNA.....	79
7.7 Recuperación de fragmentos de DNA de los geles de agarosa.....	80
7.8 Transformación de las bacterias por electroporación.....	80
7.8.1 Preparación de células electrocompetentes con sacarosa.....	80
7.8.2 Transformaciones de células electrocompetentes.....	80
7.8.3 Selección de colonias recombinantes.....	81
7.9 Reacción de amplificación en cadena de fragmentos de DNA con DNA polimerasa termorresistente (PCR).....	81
7.9.1 Amplificación de fragmentos del gen <i>benE1</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	83
7.9.2 Amplificación de fragmentos del gen <i>edd</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	83
7.9.3 Amplificación de fragmentos del gen <i>liuA</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	83
7.9.4 Diseño de la técnica de PCR para amplificar el gen <i>aacC1</i>	84
7.10 Disrupción insercional de genes de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D.....	84
7.11 PCR de colonias.....	85
7.12 Secuenciación y anotación del genoma de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344	85

7.13 Análisis transcriptómico	85
7.13.1 Extracción y purificación del RNA.....	86
7.13.2 Cuantificación del RNA.....	86
7.13.3 Sustracción del RNA ribosómico (rRNA)	86
7.13.4 Electroforesis de mRNA en gel de agarosa-formaldehído.....	86
7.13.5 Tratamiento del mRNA y análisis bioinformático de los datos.....	87
7.13.5.1 Preparación de las muestras	87
7.13.5.1.1 Control de calidad	87
7.13.5.1.2 Construcción de librerías	87
7.13.5.1.3 Obtención de microesferas para secuenciación.....	87
7.13.5.1.4 Secuenciación.....	87
7.13.5.2 Análisis de datos.....	87
7.13.5.2.1 Análisis primario. Control de calidad del dato bruto.....	88
7.13.5.2.2 Análisis secundario. Mapa y cuantificación de transcritos.....	88
7.13.5.2.3 Análisis terciario. Comparación de muestras	88
7.13.5.2.4 Análisis terciario. Anotación de los genes diferencialmente expresados.....	89
7.13.5.2.5 Análisis terciario. Estudio de enriquecimiento funcional.....	89
8. Análisis bioinformático	89
9. Equipos.....	90
10. Reactivos	91

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1. <u>Aislamiento, identificación y caracterización de cepas bacterianas capaces de degradar complejos cianuro-metálicos</u>	95
1.1 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas capaces de utilizar complejos cianuro-metálicos como fuente de nitrógeno.....	97
1.2 pH óptimo de crecimiento de las cepas bacterianas.....	98
1.3 Asimilación de compuestos cianurados.....	100
1.4 Asimilación de residuos cianurados procedentes de la industria joyera	104
1.5 Biodegradación de residuos cianurados procedentes de la industria joyera mediante cultivos mixtos bacterianos.....	106

1.5.1 Cultivos mixtos de <i>Achromobacter sp.</i> y <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	107
1.5.2 Cultivos mixtos de <i>M. kitamiense</i> y <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 R1.....	109
1.5.3 Cultivos mixtos de <i>M. kitamiense</i> y <i>Achromobacter sp.</i>	111
1.6 Producción de sideróforos.....	113
Capítulo 2. <u>Catabolismo de compuestos carbonados en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1</u>	115
2.1 Asimilación de hidratos de carbono por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	118
2.2 Asimilación de compuestos intermediarios del ciclo de Krebs y metabolitos centrales por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1.....	120
2.3 Utilización de ácidos grasos saturados como fuente de carbono por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	123
2.4 Asimilación de compuestos aromáticos por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	125
2.4.1 Identificación de genes implicados en la asimilación de compuestos aromáticos por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	125
2.4.2 Asimilación de compuestos aromáticos por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	130
Capítulo 3. <u>Catabolismo de compuestos furánicos en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344</u>	133
3.1 Identificación de los genes <i>hmfA</i> , <i>hmfB</i> , <i>hmfC</i> , <i>hmfD</i> y <i>hmfE</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	135
3.2 Identificación de la secuencia del gen <i>psfD</i> de <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	151
3.3 Degradación de compuestos furánicos por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	156
3.3.1 Asimilación de furfural por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	157
3.3.2 Asimilación de alcohol furfúrico por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	160
3.3.3 Asimilación de ácido furoico por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	163
3.3.4 Biodegradación de HMF por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	165
3.3.5 Utilización simultánea de furfurales y cianuro por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	168
3.4 Obtención del mutante R1D de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	168
3.5 Degradación de compuestos furánicos por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D.....	172
3.5.1 Asimilación de furfural por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D.....	172

3.5.2 Asimilación de alcohol furfurílico por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	175
3.5.3 Asimilación de ácido furoico por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	178
3.6 Actividad furfural alcohol deshidrogenasa y la furfural deshidrogenasa	180
3.6.1 Caracterización de las actividades furfural alcohol deshidrogenasa y furfural deshidrogenasa	182
3.6.1.1 Efecto de la temperatura	182
3.6.1.2 Efecto del pH	183
3.7 Asimilación de glucosa y furfural por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	184
3.7.1 Construcción de una cepa mutante en el gen <i>edd</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	186
3.7.2 Caracterización fenotípica del mutante en el gen <i>edd</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	188
Capítulo 4. Perfil transcripcional global de la asimilación de alcohol furfurílico en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1D	191
4.1 Sobreexpresión génica en respuesta a alcohol furfurílico en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	198
4.2 Represión génica en respuesta a alcohol furfurílico en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	202
4.3 Construcción de una cepa mutante en el gen <i>benE1</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	203
4.3.1 Caracterización fenotípica del mutante en el gen <i>benE1</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	206
4.4 Papel del operón <i>liuABCDE</i> en el metabolismo de compuestos furánicos en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	210
4.4.1 Identificación del operón <i>liuABCDE</i> en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344	210
4.4.2 Construcción de una cepa mutante en el gen <i>liuA</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	211
4.4.3 Caracterización fenotípica del mutante en el gen <i>liuA</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	213
V. DISCUSIÓN GENERAL	219
CONCLUSIONES	227

BIBLIOGRAFÍA.....	231
--------------------------	------------

1. Índice de Tablas

Tabla 1. Propiedades y características de algunos compuestos furánicos.....	29
Tabla 2. Composición química de algunos hidrolizados lignocelulósicos.....	31
Tabla 3. Características de algunos complejos ciano-metálicos	46
Tabla 4. Reacciones de biodegradación de ácido cianhídrico y compuestos cianurados	50
Tabla 5. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.....	63
Tabla 6. Antibióticos empleados en este trabajo.....	66
Tabla 7. Plásmidos empleados en este trabajo.....	76
Tabla 8. Oligonucleótidos para PCR empleados en este trabajo	82
Tabla 9. Utilización de diferentes carbohidratos como fuentes de carbono por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1	118
Tabla 10. Velocidad específica de crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1.....	123
Tabla 11. Comparación de las secuencias BN5_03560-65 y BN5_03554 de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1 con los genes implicados en la degradación de compuestos aromáticos de otros organismos	125
Tabla 12. Características del crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1 respecto a <i>C. basilensis</i> HMF 14 en medios con furfural	160
Tabla 13. Características del crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1 respecto a <i>C. basilensis</i> HMF 14 en medios con alcohol furfurílico.....	162
Tabla 14. Características del crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1 respecto a <i>C. basilensis</i> HMF 14 en medios con ácido furoico	164
Tabla 15. Características del crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1 con derivados furánicos.....	165
Tabla 16. Características del crecimiento de las cepas R1 y R1D de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344, <i>C. basilensis</i> HMF14 y <i>P. putida</i> S12_fur en medios de cultivo con furfural.....	175
Tabla 17. Características del crecimiento de las cepas R1 y R1D de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344, y <i>C. basilensis</i> HMF 14 en medios de cultivo con alcohol furfurílico	178
Tabla 18. Características del crecimiento de las cepas R1 y R1D de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344, y <i>C. basilensis</i> HMF 14 en medios de cultivo con ácido furoico.....	180
Tabla 19. Genes con expresión diferencial en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D cultivadas en alcohol furfurílico vs acetato potásico	194

2. Índice de Figuras

Figura 1. Esquema representativo de la producción de bioetanol a partir de bagazo de caña de azúcar (SCB).....	27
Figura 2. Reacciones secundarias producidas durante la hidrólisis de compuestos lignocelulósicos	28
Figura 3. Estructura química del furano	29
Figura 4. Esquema de la formación de furfural e HMF a partir de xilosa y glucosa.....	30
Figura 5. Ruta catabólica de HMF (A) y furfural (B) en <i>C. basilensis</i> HMF14	35
Figura 6. Vías catabólicas de algunos compuestos aromáticos en diferentes géneros de <i>Pseudomonas</i>	42
Figura 7. Ejemplos de reacciones catalizadas por dioxigenasas.....	43
Figura 8. pH óptimo de crecimiento de <i>M. testaceum</i> (A), <i>Achromobacter sp</i> (B) y <i>A. piechaudii</i> (C)	99
Figura 9. pH óptimo de crecimiento de <i>M. kitamiense</i> (A) y <i>A. xylosoxidans</i> (B)	100
Figura 10. Crecimiento de algunos aislados bacterianos con cianuro potásico como única fuente de nitrógeno	101
Figura 11. Crecimiento de algunos aislados bacterianos en medios con ferrocianuro potásico como única fuente de nitrógeno.....	102
Figura 12. Crecimiento de algunos aislados bacterianos en medios con ferricianuro potásico como única fuente de nitrógeno.....	103
Figura 13. Crecimiento de algunos aislados bacterianos en medios con residuo cianurado como única fuente de nitrógeno.....	105
Figura 14. Crecimiento de <i>Achromobacter sp</i> y <i>M. kitamiense</i> con diferentes concentraciones de residuo cianurado	106
Figura 15. Crecimiento de <i>Achromobacter sp.</i> y <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1 con residuo como única fuente de nitrógeno.....	108
Figura 16. Determinación de las unidades formadoras de colonias de <i>Achromobacter sp.</i> y <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1 cultivadas en medios con residuo cianurado como fuente de nitrógeno.....	109
Figura 17. Crecimiento de <i>M. kitamiense</i> y <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1 con residuo como única fuente de nitrógeno.....	110

Figura 18. Determinación de las unidades formadoras de colonias de <i>M. kitamiense</i> y <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1 cultivadas en medios con residuo cianurado como fuente de nitrógeno.....	111
Figura 19. Crecimiento de <i>Achromobacter sp.</i> y <i>M. kitamiense</i> con residuo como única fuente de nitrógeno	112
Figura 20. Determinación de las unidades formadoras de colonias de <i>Achromobacter sp.</i> y <i>M. kitamiense</i> cultivadas en medios con residuo cianurado como fuente de nitrógeno.....	113
Figura 21. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1 con glucosa como fuente de carbono y cianuro como fuente de nitrógeno.....	119
Figura 22. Cromatogramas de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1 obtenidos por HPLC de los sobrenadantes de cultivos con glucosa.....	120
Figura 23. Efecto de la fuente de carbono sobre la asimilación de cianuro de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1	122
Figura 24. Efecto del octanoato sobre la asimilación del cianuro por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1.....	124
Figura 25. Catabolismo de catecol en <i>P. putida</i>	127
Figura 26. Genes implicados en el catabolismo de 2,3-dihidroxibenzoato y 2,3-dihidroxi-p-cumato en <i>P. reinekei</i> MT1.....	128
Figura 27. Genes implicados en el catabolismo de 2-aminofenol en <i>B. xenovorans</i> LB400.....	128
Figura 28. Sintenia de los genes de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1 en comparación con otras bacterias.....	129
Figura 29. Utilización de 2-aminofenol como fuente de carbono por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1.....	131
Figura 30. Ruta catabólica de HMF (A) y furfural (B) en <i>C. basilensis</i> HMF14.....	135
Figura 31. Esquema de una región de 16 Kb del cromosoma de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1 en la que se encuentra el operón <i>hmfABCDE</i>	137
Figura 32. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de HmfA.....	140
Figura 33. Análisis filogenético de HmfA de diferentes microorganismos.....	141
Figura 34. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de HmfB.....	142
Figura 35. Análisis filogenético de HmfB de diferentes microorganismos.....	143

Figura 36. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de HmfC.....	143
Figura 37. Análisis filogenético de HmfC de diferentes microorganismos.....	144
Figura 38. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de HmfD.....	145
Figura 39. Análisis filogenético HmfD de diferentes microorganismos.....	146
Figura 40. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de HmfE.....	140
Figura 41. Análisis filogenético de HmfE de diferentes microorganismos.....	141
Figura 42. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de BenE1.....	149
Figura 43. Análisis filogenético de BenE1 de diferentes microorganismos.....	150
Figura 44. Esquema de la región de 7,2 Kb del cromosoma de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 en la que se encuentra el gen <i>psfD</i>	151
Figura 45. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de PsfD.....	153
Figura 46. Análisis filogenético de PsfD de diferentes microorganismos.....	154
Figura 47. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de BN5_02200.....	155
Figura 48. Análisis filogenético de BN5_02200 de diferentes microorganismos.....	156
Figura 49. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1 con furfural como única fuente de carbono.....	158
Figura 50. Efecto de la concentración de furfural sobre el crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1.....	159
Figura 51. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1 en medios con alcohol furfurílico como única fuente de carbono.....	161
Figura 52. Efecto de la concentración de alcohol furfurílico sobre el crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1.....	162
Figura 53. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1 en medios con ácido furoico como única fuente de carbono.....	163
Figura 54. Efecto de la concentración de ácido furoico sobre el crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1.....	164
Figura 55. Biodegradación de HMF por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1.....	166

Figura 56. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1 con furfural y con HMF.....	167
Figura 57. Proceso de adaptación de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 a la utilización de furfural como única fuente de carbono.....	169
Figura 58. Evolución de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1 en la utilización de furfural como única fuente de carbono.....	170
Figura 59. Identificación de la mutación sufrida por <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D.....	171
Figura 60. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D con furfural como única fuente de carbono.....	173
Figura 61. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1 (A) y R1D (B) con furfural como única fuente de carbono.....	174
Figura 62. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D con alcohol furfurílico como única fuente de carbono.....	176
Figura 63. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1 (A) y R1D (B) con alcohol furfurílico como única fuente de carbono.....	177
Figura 64. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1 (A) y R1D (B) en medios con ácido furoico como única fuente de carbono.....	179
Figura 65. (A) Actividad furfuril alcohol deshidrogenasa (FADH) y (B) furfural deshidrogenasa (FDH) de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D.....	181
Figura 66. Separación de las enzimas FADH y FDH de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D mediante cromatografía de intercambio aniónico.....	182
Figura 67. Efecto de la temperatura sobre la actividad furfuril alcohol deshidrogenasa (A) y furfural deshidrogenasa (B) de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D.....	183
Figura 68. Efecto del pH sobre la actividad furfuril alcohol deshidrogenasa (A) y furfural deshidrogenasa (B) de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D.....	184
Figura 69. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D en medios con glucosa y furfural como fuentes de carbono.....	185
Figura 70. Esquema de la construcción del plásmido PGEM-TE <i>edd aacC1</i>	187
Figura 71. Comprobación de la inserción génica en el mutante EDD1 de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D mediante PCR.....	188
Figura 72. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D y el mutante EDD1 con glucosa como fuente de carbono.....	189

Figura 73. Crecimiento del mutante EDD1 de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D en medios con glucosa y furfural como fuentes de carbono.....	190
Figura 74. Representación esquemática de las categorías funcionales de los genes regulados en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344R1D en respuesta a alcohol furfurílico	203
Figura 75. Representación esquemática de la construcción del plásmido PGEM-TE <i>benE1 aacC1</i>	205
Figura 76. Comprobación de la inserción génica en el mutante BENE1.1 de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D mediante PCR.....	206
Figura 77. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D y BENE1.1 en medios con alcohol furfurílico (A), furfural (B) o ácido furoico (C) 10 mM como fuente de carbono	207
Figura 78. Crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D y BENE1.1 en medios con alcohol furfurílico (A), furfural (B) y ácido furoico (C) 2 mM como fuente de carbono	209
Figura 79. Esquema de una región de 13,5 kb del cromosoma de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 conteniendo el operón <i>liuABCDER</i>	210
Figura 80. Representación esquemática de la construcción del plásmido PGEM-TE <i>liuA aacC1</i>	212
Figura 81. Comprobación de la inserción génica en el mutante LIUA1 de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D mediante PCR	213
Figura 82. Efecto de la mutación del gen <i>liuA</i> sobre el crecimiento de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D con alcohol furfurílico (A), furfural (B) o ácido furoico (C) 2 mM como fuente de carbono.....	214

- A** Adenina
- ACC** Aceptor-receptor de electrones en forma oxidada (**ACC_{ox}**) o en forma reducida (**ACC_{red}**)
- ADP** Adenosín difosfato
- ALE** *Adaptative Laboratory Evolution*
- Ap^r** Resistencia a ampicilina
- AP** Azul de Prusia
- ATP** Adenosín trifosfato
- BLAST** *Basic Local Alignment Search Tool*
- BSA** Seroalbúmina bovina
- BPB** Azul de Bromofenol (3',3'',5',5''-tetrabromofenolsulfotaleína)
- C** Citosina
- CAS** Cromo azurol S
- CFU** Unidades Formadoras de Colonias
- CoA** Coenzima A
- Da** Dalton
- DCPIP** 2,6-diclorofenolindofenol
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- DNA** Ácido desoxirribonucleico
- DNAsa** Desoxirribonucleasa
- dNTP** Desoxirribonucleótido trifosfato
- D.O._{600 nm}** Densidad óptica ($\lambda = 600 \text{ nm}$)
- DTNB** Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
- DTT** 1,4-ditio-D-treitol
- ϵ** Coeficiente de extinción molar
- EDTA** Ácido etilendiaminotetracético
- EMBL-EBI** *European Bioinformatics Institute database*
- FAD** Dinucleótido de flavina y adenina oxidado
- FDCA** Ácido 2,5-furanodicarboxílico
- FPLC** Cromatografía líquida rápida de proteínas
- g** Unidades de fuerza G
- G** Guanina
- Gm^r** Resistencia a gentamicina

Abreviaturas

HMF 5-hidroximetil furfural

HPLC Cromatografía líquida de alta resolución

IPTG Isopropil-1-tio- β -galactopiranosido

Kb Kilobase

KDa Kilodalton

KEGG *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

Km^r Resistencia a kanamicina

LB Medio de cultivo Luria-Bertani

M9 Medio mínimo M9

Mb Megabases

MCL Cadena media

MOPS Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico

NAD⁺ Dinucleótido de nicotinamina adenina oxidado

NADH Dinucleótido de nicotinamina adenina reducido

NBT *Nitro Blue Tetrazolium*

ORF Marco abierto de lectura

PIPES Ácido 1,4-piperazina-dietanosulfónico

pb Pares de bases

p/v Relación peso/volumen

PCR Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente

PHB Polihidroxibutirato

PMS Metosulfato de fenazina

rcf Fuerza centrífuga relativa

RDP *Ribosomal Database Project II*

Rf^r Resistencia a rifampicina

RNA Ácido ribonucleico

RNA^r RNA ribosómico

RNA^{sa} Ribonucleasa

mRNA RNA mensajero

ROS Especies reactivas de oxígeno

rpm Revoluciones por minuto

RT Reacción de retrotranscripción

SAD Disociables en ácido fuerte

- SCB** Bagazo de caña de azúcar
- SOC** Medio de cultivo SOC
- SSCF** Sacarificación simultánea y co-fermentación
- SSF** Sacarificación y fermentación simultáneas
- T** Timina
- TBE** Tampón borato-EDTA
- TCA** Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos
- TE** Tampón Tris-EDTA
- Tet^r** Resistencia a tetraciclina
- T_R** Tiempo de retención
- Tris** Tri-hidroximetil-aminometano
- U** Unidad de actividad enzimática
- WAD** Complejos metálicos de cianuro disociables por ácido débil
- X-gal** 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

I. INTRODUCCIÓN

1. La contaminación y el medio ambiente.

La contaminación se define como un desequilibrio entre la entrada (producción) y salida (descomposición) de sustancias de los ecosistemas como consecuencia de una perturbación en el transporte horizontal de una materia que no ha sido asimilada por la evolución (Castillo *et al.*, 2005). La contaminación medioambiental está causada tanto por compuestos orgánicos como por compuestos inorgánicos y es un efecto colateral del crecimiento de la población humana y del desarrollo tecnológico. Los seres humanos han explotado, modificado y contaminado los ecosistemas desde muy antiguo, pero desde la Revolución Industrial esta perturbación ha alcanzado la categoría de impacto ambiental (Castillo *et al.*, 2005). Durante el último siglo la industria química de síntesis orgánica ha experimentado un notable desarrollo, lo que ha ocasionado la liberación al medio ambiente de una enorme variedad de compuestos orgánicos. Algunos de ellos poseen una estructura química que difiere considerablemente de los compuestos orgánicos naturales, por lo que se denominan compuestos xenobióticos, y pueden ocasionar graves problemas de contaminación. Entre éstos se encuentran compuestos con diferentes aplicaciones, como algunos halogenados (propelentes, disolventes, refrigerantes e insecticidas), los nitroaromáticos (explosivos, disolventes, plaguicidas), los bifenilos policlorados (plastificantes, aislantes-refrigerantes, etc.), las dioxinas, los sulfonatos alquilbencílicos (detergentes) y los polímeros sintéticos (envoltorios y materiales de empaquetado). Algunos de estos compuestos xenobióticos son resistentes (recalcitrantes) a la biodegradación. Otros se degradan muy lentamente, de modo co-metabólico sólo en presencia de un segundo sustrato, que es empleado como fuente primaria de energía, o dan lugar a residuos, a veces poliméricos, peligrosos para el medio ambiente (Atlas y Bartha, 2002). En otras ocasiones el problema de la contaminación ambiental por compuestos orgánicos no es debido a su naturaleza xenobiótica, sino a la cantidad 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, aunque la mayoría de éstos entran dentro de los ciclos biogeoquímicos de una forma natural, los problemas de contaminación aparecen cuando la actividad de la sociedad industrializada aumenta la cantidad de material inorgánico, superando la capacidad de la microflora autóctona para reciclarlo. Los problemas de contaminación ocasionados por metales pesados, nitrato, nitrito, cianuro, cianato, etc., se suelen originar bien como consecuencia de las actividades mineras (drenaje

Introducción

ácido provocado por la oxidación microbiana del hierro y del azufre), de actividades agrícolas (uso excesivo de abonos nitrogenados) o de las actividades industriales (producción de residuos o vertidos). Además de estos factores, la toxicidad del compuesto también determina el grado de contaminación ocasionado (Castillo *et al.*, 2005).

Según el principio de infalibilidad microbiana todo compuesto químico puede ser degradado si se dan las condiciones ambientales adecuadas (Alexander, 1965). La certeza de esta afirmación parece probada, dado que, a excepción de algunos hidrocarburos como el petróleo, no existen acumulaciones a gran escala de sustancias orgánicas naturales. Si algún compuesto orgánico producido en la ecosfera fuera inherentemente resistente a su descomposición y reciclado, se habrían acumulado grandes depósitos de este material a lo largo de los tiempos geológicos, y claramente no ha sido así (Atlas y Bartha, 2002). La explicación de la 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 rutas metabólicas capaces de utilizarlos. Además, su elevada capacidad reproductora les posibilita evolucionar de una forma más rápida que a los organismos macroscópicos. 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 co-metabolismo o de utilización como co-sustratos (Dua *et al.*, 2002; Wackett, 1997; Wackett y Hershberger, 2001). 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 bioacumularse 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.

La eliminación de los contaminantes ambientales mediante procedimientos físico-químicos es, por norma general, un proceso ambiental y energéticamente ineficiente. Por ello, hace tiempo que se ha incorporado una nueva estrategia para luchar contra la contaminación de forma más eficiente y que consiste en aprovechar las capacidades degradadoras de los microorganismos, que, con su enorme capacidad de adaptación, habilitan distintas rutas metabólicas que les permiten degradar distintos contaminantes (Harayama *et al.*, 1992; Smith, 1990; van der Meer *et al.*, 1992). La abundancia de microorganismos, su capacidad para transferir genes horizontalmente y su alta velocidad de crecimiento, les permiten evolucionar rápidamente y adaptarse a los cambios en el ambiente, incluso en condiciones extremas que no permitirían la proliferación de otros seres vivos (Dua *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2001; Timmis y Pieper, 1999).

El término biodegradación se utiliza con frecuencia para describir transformaciones de todo tipo, incluyendo tanto las que producen compuestos similares a los de partida como las de oxidación completa de compuestos orgánicos a sus componentes inorgánicos (mineralización). La biorremediación es una tecnología que hace uso de la potente capacidad biodegradadora de los microorganismos para solucionar los problemas de contaminación ambiental (Atlas y Pramer, 1990).

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. 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 residuos a través del biorreactor.

No obstante, en ocasiones la biodegradación de contaminantes está limitada a pesar de que la ingeniería genética está posibilitando la obtención de microorganismos modificados genéticamente que poseen un mayor potencial biodegradador (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), o bacterias con múltiples rutas de degradación que posibiliten la eliminación de compuestos recalcitrantes (Brenner *et al.*, 1994). Aunque estos microorganismos recombinantes ofrecen importantes beneficios en aplicaciones medioambientales, la posibilidad de predecir su comportamiento en la naturaleza, junto con la ausencia de una legislación reguladora provoca 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) (Munthal *et al.*, 1996; Torres *et al.*, 2000).

2. Proceso de elaboración de bioetanol.

Uno de los mayores retos a los que se enfrenta la sociedad en el siglo XXI es el de satisfacer la creciente demanda de energía para el transporte, la calefacción y los procesos industriales y, a la vez, proporcionar materia prima para la industria de una forma sostenible. El futuro suministro energético debe de estar acompañado de una importante reducción de los gases con efecto invernadero. La Comisión Europea tiene previsto sustituir progresivamente el 20% de los combustibles fósiles convencionales por combustibles alternativos en el sector del transporte para el año 2020 (Gray *et al.*, 2006).

La creciente preocupación por la seguridad en el abastecimiento de petróleo y el impacto negativo sobre el medio ambiente de los combustibles fósiles, en particular las emisiones de gases de efecto invernadero, está presionando a la sociedad para encontrar combustibles renovables como alternativa al petróleo. Actualmente el combustible renovable más común es el bioetanol, producido a partir de azúcares procedentes de diferentes cultivos, como la caña de azúcar (fundamentalmente en Brasil) o el maíz (sobre todo en EE.UU). El problema del uso de estos azúcares como materia prima para la elaboración de biocombustibles es que, además de competir con la alimentación animal y

las necesidades humanas, ésta materia prima no será suficiente para satisfacer la demanda mundial de etanol como combustible (Gray *et al.*, 2006). En consecuencia, el futuro uso a gran escala de bioetanol tendrá que basarse, con toda seguridad, en su producción a partir de materiales lignocelulósicos. A estos biocombustibles líquidos obtenidos a partir de otros recursos renovables, en particular de materiales lignocelulósicos, se les denomina biocombustibles de segunda generación. Éstos cumplen con los objetivos fijados por la Unión Europea, disminuyendo la emisión de gases con efecto invernadero, además de minimizar el conflicto ético del uso del suelo para la producción de materia prima energética (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006).

Actualmente, la producción de bioetanol a partir de materia lignocelulósica (polímero formado por tres carbohidratos; hemicelulosa, celulosa y lignina) es demasiado escasa, a pesar de ser una materia prima abundante y de bajo coste (Cardona y Sánchez, 2007; Cheng *et al.*, 2008). Uno de los principales materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol es el bagazo de caña de azúcar (SCB), debido principalmente a que se produce en grandes cantidades (Martín *et al.*, 2007) y a que tiene un alto contenido en hemicelulosa (30-35 %) y celulosa (40-55 %) (Peng *et al.*, 2009). En general, la producción de bioetanol a partir de SCB incluye cuatro pasos principales; pretratamiento de la biomasa, hidrólisis de la celulosa, fermentación de las hexosas, separación y tratamiento de efluentes (Figura 1).

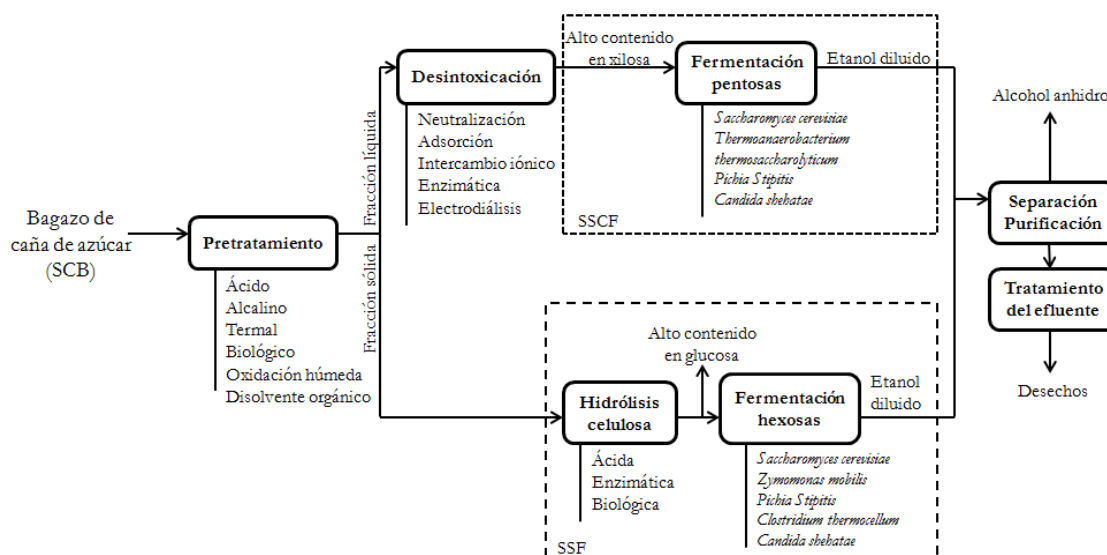


Figura 1. Esquema representativo de la producción de bioetanol a partir de bagazo de caña de azúcar (SCB). SSF: sacarificación y fermentación simultáneas, SSCF: sacarificación simultánea y co-fermentación. Esquema adaptado (Cardona *et al.*, 2010).

Los materiales lignocelulósicos no contienen monosacáridos fácilmente disponibles para la bioconversión, en su lugar contienen polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) que previamente tienen que ser hidrolizados en azúcares fermentables (glucosa, manosa, galactosa, etc.). Para ello, se realiza un pretratamiento donde se generan, además de los monosacáridos simples correspondientes, numerosos subproductos derivados, entre los que se encuentran derivados furánicos, ácidos débiles y compuestos fenólicos (Figura 2) (Gámez *et al.*, 2006). Muchos de estos compuestos inhiben el crecimiento y la fermentación de las levaduras obstaculizando la producción de bioetanol, y afectando a la economía del proceso (Endo *et al.*, 2008).

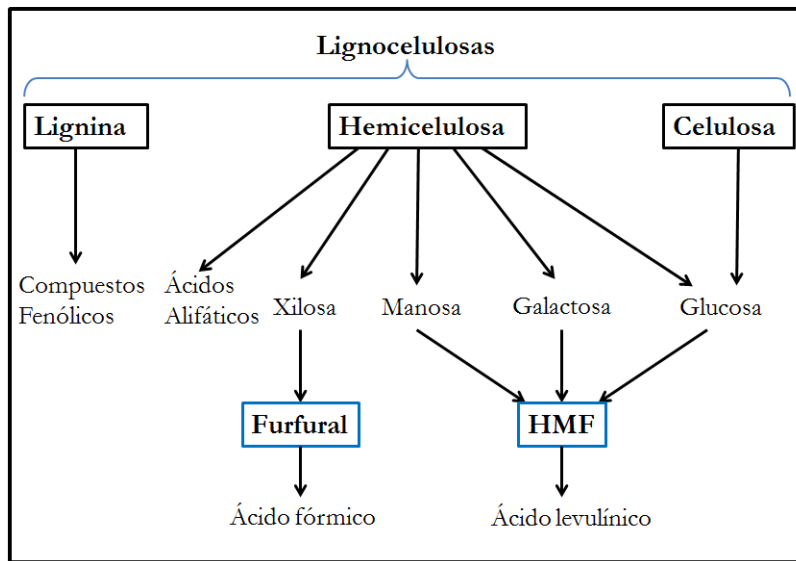


Figura 2. Reacciones secundarias producidas durante la hidrólisis de compuestos lignocelulósicos. Esquema adaptado (Purwadi y Taherzadeh, 2008).

3. Furaldehídos y sus derivados.

3.1 Química de los furfurales.

Los furfurales constituyen un grupo de compuestos químicos con el denominador común de poseer un anillo de furano, lo que les confiere una gran estabilidad. El anillo furánico está formado por cuatro átomos de carbono con hibridación sp^2 y un único átomo de oxígeno con hibridación sp^2 . Esto hace que el anillo presente seis electrones en la nube electrónica π , dos pares de electrones en los orbitales no enlazantes p_z de los átomos de carbono y un par de electrones del orbital no enlazante p_z del átomo de oxígeno (Figura 3). En su conjunto el anillo presenta cinco enlaces σ y dos enlaces π .

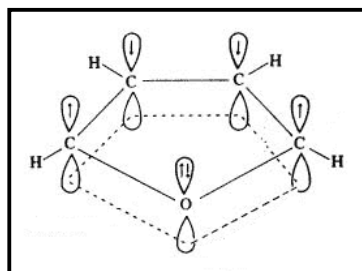


Figura 3. Estructura química del furano.

Entre los furfurales más comunes se encuentran los que aparecen en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades y características de algunos compuestos furánicos. Adaptado (Town, 2004).

Nombre del compuesto	Propiedades físicas	Fórmula empírica	Estructura
Furfural	Líquido a T ^a ambiente Punto de fusión -36,5 °C Punto de ebullición 161,7 °C	C ₅ H ₄ O ₂	
5-hidroximetil furfural (HMF)	Sólido a T ^a ambiente. Punto de fusión 30-34 °C Punto de ebullición 114-116 °C	C ₆ H ₆ O ₃	
Alcohol furfurílico	Líquido a T ^a ambiente Punto de fusión -29 °C Punto de ebullición 170 °C	C ₅ H ₆ O ₂	
Ácido furoico	Sólido a T ^a ambiente Punto de fusión 133 °C Punto de ebullición 230 °C	C ₅ H ₄ O ₃	
Ácido 2,5-furanodicarboxílico (FDCA)	Sólido a T ^a ambiente Punto de fusión 342 °C Punto de ebullición 420 °C	C ₆ H ₄ O ₅	

3.2 Producción de furfurales.

El furfural o furfuraldehído y el 5-hidroximetilfurfural o HMF son dos de los compuestos furánicos más abundantes originados en los procesos industriales (Wierckx *et al.*, 2010). El furfural se produce a partir de hemicelulosa, que se encuentra en productos vegetales ricos en xilosa, como por ejemplo, la cáscara de arroz (Sangarunlert *et al.*, 2007) o mazorcas de maíz (Mains y Laforge, 1924), por hidrólisis ácida seguida de una deshidratación catalítica ácida a elevadas temperaturas (Figura 4). De hecho, el nombre furfural proviene de la palabra latina *furfur*, que significa salvado. Un derivado del furfural, el furfuril mercaptano, es el responsable del aroma del café tostado. El HMF se produce por deshidratación catalítica ácida a partir de hexosas, principalmente fructosa y glucosa (Figura 4). Sin embargo, mientras se originan varios cientos de miles de toneladas de furfural al año, el HMF no es todavía un producto químico importante a escala industrial (Kuster, 1990).

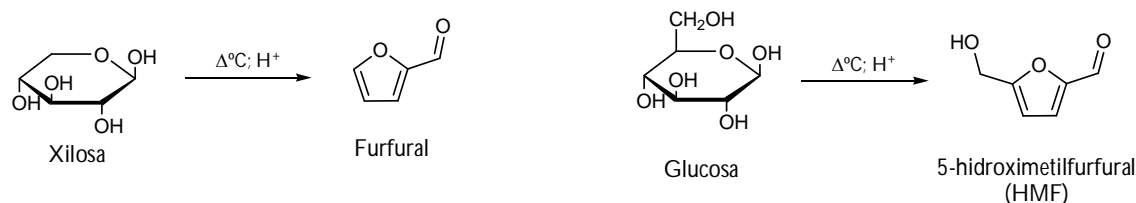


Figura 4. Esquema de la formación de furfural e HMF a partir de xilosa y glucosa.

Como alternativa a su síntesis a partir de hexosas, el HMF también puede ser producido por hidroximetilación del furfural (Lecomte *et al.*, 1999), o bien, por reducción del FDCA (Moreau *et al.*, 2004). El reciente interés industrial del furfural y del HMF se debe a su presencia en los hidrolizados lignocelulósicos, que contienen una concentración de furfural variable dependiendo del tipo del residuo lignocelulósico del que se trate y del tratamiento previo al que se someta (Almeida *et al.*, 2009). En la tabla 2, se reflejan las concentraciones de furfurales y de diferentes azúcares en función del tipo de hidrolizado y del tratamiento al que haya sido sometido.

Tabla 2. Composición química de algunos hidrolizados lignocelulósicos

Materia prima	Tratamiento	Concentración (g/l)							Referencia
		Glucosa	Manosa	Galactosa	Xilosa	Arabinosa	HMF	Furfural	
Pretratamiento de la lignocelulosa									
Paja de cebada	210 °C, 15 min	4,6	-	1,3	17,4	1,9	0,2	0,7	(García-Aparicio <i>et al.</i> , 2006)
Rastrojo de maíz	3 % SO ₂ , 200 °C, 5 min	8,3	-	4,0	35,8	6,3	0,06	1,1	(Öhgren <i>et al.</i> , 2006)
Picea	3 % SO ₂ , 215 °C, 5 min	23,4	19,4	4,0	8,9	-	3,0	1,7	(Rudolf <i>et al.</i> , 2005)
Bagazo de caña de azúcar	2 % SO ₂ , 190 °C, 5 min	3,5		0	32,8	2,7	0	0,9	(Rudolf <i>et al.</i> , 2008)
Paja de trigo	- % H ₂ SO ₄ , 210 °C, 2,5 min	10,9	-	-	51,2	-	0,6	1,7	(Olofsson <i>et al.</i> , 2008)
Hidrólisis ácida de lignocelulosa									
Paja de arroz	1,6 % H ₂ SO ₄ , 121 °C, 30 min	21	-	-	6	.	0,18	0,13	(Roberto <i>et al.</i> , 2003)
Picea	2,4 % H ₂ SO ₄ , 180 °C, 10 min	21,7	12,7	-	5,0	-	4	1	(Larsson <i>et al.</i> , 1999)
Picea	5 g/L H ₂ SO ₄ , 215 °C, 7 min	30,4	19,8	-	4,7	-	5,9	1,3	(Taherzadeh <i>et al.</i> , 1997)
Bagazo de caña de azúcar	0,34 % H ₂ SO ₄ , 160 °C, 15 min	3,4	0,6	1,4	31,8	1,9	0,18	2,22	(Neureiter <i>et al.</i> , 2002)

3.3 Tratamientos para la eliminación de furfurales en hidrolizados lignocelulósicos.

La fermentación de los hidrolizados lignocelulósicos en los que no se han eliminado los elementos contaminantes se caracteriza por una cinética lenta, con un rendimiento y una productividad limitada debido a la presencia de una amplia variedad de compuestos que actúan como potentes inhibidores del metabolismo microbiano (Mussatto y Roberto, 2004). Por lo tanto, estos hidrolizados deben de ser previamente detoxificados para alcanzar rendimientos más elevados (Canilha *et al.*, 2012; Mussatto y Roberto, 2004; Soni y Kango, 2013). El coste general de la producción de bioetanol se ve considerablemente elevado debido a la gran cantidad de productos químicos que es necesario emplear para eliminar dichos inhibidores (von Sivers *et al.*, 1994). La eficacia de un determinado método de detoxificación dependerá del tipo de hidrolizado, ya que cada hidrolizado tiene un tipo de toxicidad diferente, que variará en función de la materia prima y de las condiciones de hidrólisis empleadas (Guo *et al.*, 2013).

3.3.1 Métodos físicos.

Uno de los métodos empleados para reducir el contenido de compuestos inhibidores (ácido acético, furfural y vainillina) es la evaporación al vacío del hidrolizado. Sin embargo, este método aumenta moderadamente la concentración de compuestos tóxicos no volátiles, y por lo tanto el grado de inhibición de la fermentación (Converti *et al.*, 2000; Parajó *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2001).

3.3.2 Métodos químicos.

Los métodos químicos incluyen, entre otros, la precipitación de los compuestos tóxicos mediante modificaciones en los valores de pH, utilizando NaOH y Ca(OH)₂, lo que produce una reducción de un 20 % en la concentración de furfural y HMF, obteniéndose buenos resultados a un bajo coste (Martinez *et al.*, 2001; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000; Roberto *et al.*, 1991). Otro método destacable por su bajo coste y su alta efectividad es el uso de carbón activo que presenta gran capacidad para adsorber inhibidores lignocelulósicos (Dominguez *et al.*, 1996; Gong *et al.*, 1993; Mussatto y Roberto, 2001). Aparte del carbón activo, también existen otros compuestos capaces de adsorber dichos inhibidores, como la tierra de diatomeas (Ribeiro *et al.*, 2001) y las resinas de intercambio

iónico, estas últimas presentan buena productividad y resultados eficaces, pero tienen un coste elevado en comparación con otros tratamientos (Chandel *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 1999).

3.4 Biodegradación de furfurales.

En la actualidad, el interés de la comunidad científica por el metabolismo microbiano de compuestos furánicos, especialmente furfural y HMF, está experimentando un gran crecimiento, posiblemente debido a la presencia de aldehídos furánicos tóxicos en los hidrolizados lignocelulósicos. Sin embargo, estos compuestos también están muy extendidos en la naturaleza y en alimentos procesados (Wierckx *et al.*, 2011).

La capacidad de ciertos microorganismos de metabolizar el furfural y sus derivados puede ser aprovechada para su eliminación de los hidrolizados lignocelulósicos. Aunque se han descrito algunos microorganismos capaces de degradar compuestos furánicos, los más caracterizados hasta el momento son bacterias Gram-negativas aerobias, pertenecientes a un número relativamente pequeño de géneros. Esto sugiere que el catabolismo de furanos sólo puede encontrarse entre microorganismos especializados. Entre los microorganismos capaces de metabolizar el furfural y el HMF se encuentran *Ralstonia eutropha* (Yu y Stahl, 2008), *Coniochaeta ligniaria* NRRL30616 (Nichols *et al.*, 2005), *Pseudomonas putida* Fu1 (Koenig y Andreesen, 1989), *Cupriavidus basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a), *Methylobacterium extorquens*, *Pseudomonas sp.*, *Flavobacterium indologenes*, *Acinetobacter sp.* y *Arthrobacter aureescens* (Lopez *et al.*, 2004). En *P. putida* Fu1 (Koenig y Andreesen, 1990) y *Cupriavidus basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a), basándose en las actividades enzimáticas analizadas en medios con furfural, se ha propuesto una ruta metabólica implicada en la degradación de este compuesto. Además, se han aislado mutantes de *P. putida* Fu1 incapaces de crecer en ácido furoico (Nichols y Mertens, 2008). También se ha descrito una cepa de *C. ligniaria* NRRL30616 capaz de metabolizar compuestos furánicos, compuestos aromáticos y compuestos orgánicos presentes en hidrolizados lignocelulósicos (Nichols *et al.*, 2005). Algunos microorganismos no pueden crecer con compuestos furánicos, sin embargo son capaces de transformarlos, probablemente para detoxificarlos (Gutierrez *et al.*, 2006; Petersson *et al.*, 2006; Trudgill, 1969).

En 1964, Kakinuma y Yamatodani ((Kakinuma y Yamatodani, 1964)) fueron los primeros en describir el aislamiento de microorganismos capaces de degradar compuestos furánicos. Estos autores aislaron numerosos microorganismos capaces de utilizar estos

Introducción

compuestos como fuente de carbono, alguno de éstos producía glutamato a partir de ácido furoico. Desde entonces sólo se han identificado unas pocas decenas de microorganismos degradadores de furanos, y la mayoría de ellos muy recientemente.

La primera ruta metabólica aeróbica descrita para la biodegradación de furfurales fue propuesta por PW Trudgill (1969) en *P. putida* F2. Esta ruta fue posteriormente modificada y verificada por Koenig y Andreesen en 1990 (Koenig y Andreesen, 1990) y Koopman en 2010 (Koopman *et al.*, 2010a). En la ruta propuesta por Trudgill (Figura 5), el furfural se oxida primero a ácido furoico por medio de una aldehído deshidrogenasa que, posteriormente, se activa con coenzima A en una reacción catalizada por la furoil CoA sintetasa. El producto resultante se hidroxila en la posición C₅ por una furoil CoA deshidrogenasa dando lugar al enol correspondiente que tautomeriza a su forma ceto, originando una lactona. En *P. putida* F1 se ha demostrado que la furoil CoA deshidrogenasa es dependiente de molibdeno (Koenig y Andreesen, 1989). El anillo de la lactona se abre de forma espontánea o catalítica originando 2-oxoglutaroil CoA en su forma tautomérica cetoenólica. Mediante una reacción de hidrólisis se libera 2-oxoglutarato que se metaboliza a través del Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos (TCA). La formación de 2-oxoglutarato como producto final de esta vía fue confirmada por la adición de arsenito, que inhibe específicamente la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Koenig y Andreesen, 1990; Koopman *et al.*, 2010a).

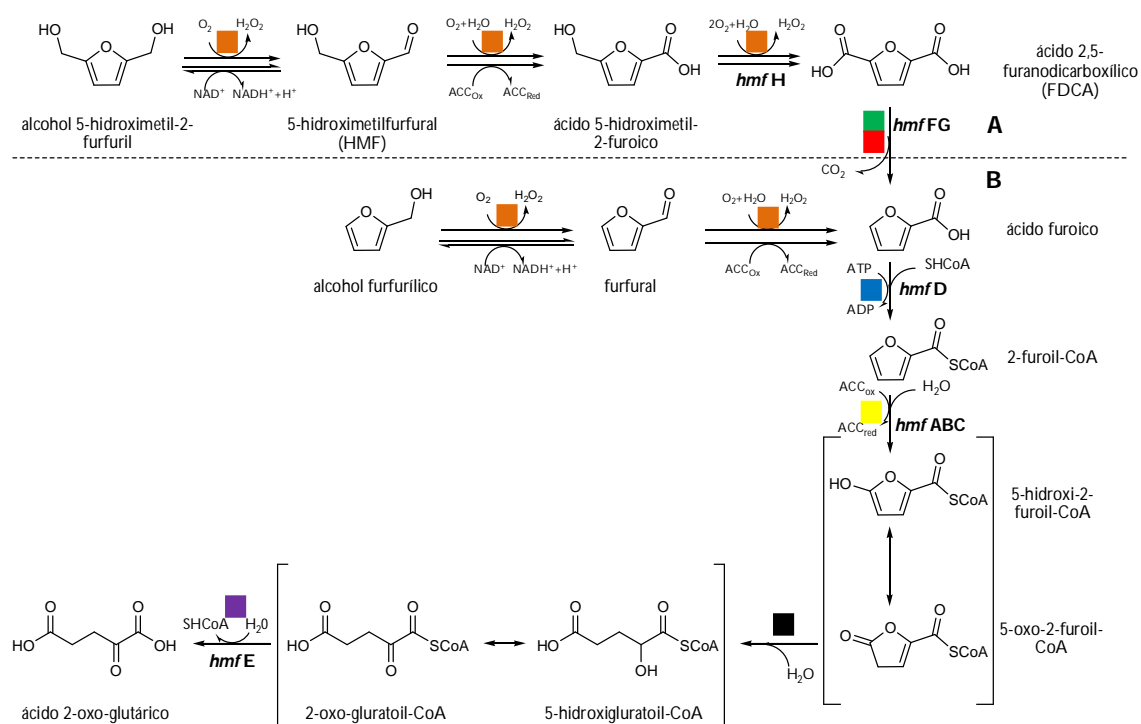


Figura 5. Ruta catabólica de HMF (A) y furfural (B) en *C. basilensis* HMF14. Los símbolos de colores indican las actividades de las siguientes enzimas: ■ oxidorreductasa furfural/HMF; ■ y ■ descarboxilasa del ácido 2,5-furanodicarboxílico; ■ 2-furoil CoA sintetasa; ■ furoil CoA deshidrogenasa; ■ 2-oxoglutaroil CoA hidrolasa. ■ Hidrólisis de una lactona. Las reacciones entre paréntesis indican tautomerizaciones cetoenólicas. ACC: aceptor-receptor de electrones en forma oxidada (ox) o en forma reducida (red). Esquema adaptado (Koopman *et al.*, 2010a; Trudgill, 1969).

Recientemente, se ha demostrado que *C. basilensis* HMF14 utiliza la vía inicialmente propuesta por Trudgill para metabolizar el ácido 2-furoico, ruta que ha sido completamente caracterizada a nivel génico (Figura 5) (Koopman *et al.*, 2010a). Además de las enzimas caracterizadas por Koenig y Andreesen (1990) y Trudgill (1969), se ha identificado una nueva enzima, una CoA tioesterasa, esencial para la degradación del ácido 2-furoico (Koopman *et al.*, 2010a).

De manera análoga a lo que ocurre con el furfural, el HMF se oxida primero al ácido monocarboxílico correspondiente, que posteriormente, en una reacción catalizada por una oxidorreductasa específica, se oxida dando lugar al FDCA. Posteriormente el FDCA se descarboxila originando ácido furoico y convergiendo en la ruta descrita por Trudgill. No se han descrito deshidrogenasas específicas para el catabolismo de aldehídos furánicos, por lo que hasta el momento la oxidorreductasa implicada en la ruta metabólica del HMF también podría ser la encargada de catalizar la oxidación de furfural (Koopman *et*

al., 2010a). Sin embargo, alcohol furfurílico deshidrogenasa y furfural deshidrogenasa parecen ser dos enzimas diferentes en *P. putida* F1 (Koenig y Andreesen, 1990), si bien, hasta el momento, no se han identificado los genes codificantes en ninguna bacteria.

3.5 Genética de las rutas de degradación de compuestos furánicos.

Aunque la vía de degradación de furfural fue parcialmente caracterizada a nivel enzimático a finales de 1980, las bases genéticas se han dilucidado recientemente. Mediante la generación en *P. putida* Fu1 de mutantes incapaces de crecer en ácido furoico, Nichols y Mertens proporcionaron algunas ideas preliminares acerca de la genética del proceso. Esta bacteria metaboliza furfural mediante una ruta que implica su conversión en 2-oxoglutarato y en la que el ácido furoico (FA) y el coenzima A intervienen como intermediarios. Se obtuvieron dos tipos de mutantes, uno en *psfB* y otro en el gen *psfF* (Nichols y Mertens, 2008). El gen *psfF* codifica un regulador transcripcional de la familia GcvR y en su entorno se encuentra el grupo de genes *psf9*, cuya secuencias deducidas de aminoácidos indican que podrían estar relacionados con la tolerancia al estrés oxidativo (Nichols y Mertens 2008). Por otra parte, el gen *psfB* codifica un regulador transcripcional de tipo LysR y está flanqueado por el grupo de genes *psf2*. Dentro de este grupo de genes cabe destacar *psfA* que codifica una aldehído deshidrogenasa, y *psfD* codificante de un factor accesorio similar al necesario para la maduración de la xantina deshidrogenasa. Contiguo a *psfD* se encuentra un gen perteneciente a la familia de reguladores AraC. Tanto *psfA* como *psfD* son esenciales para el metabolismo del furfural en *P. putida* Fu1. Como respuesta a FA, el gen de la familia LysR parece actuar positivamente y el de la familia GcvR negativamente sobre la regulación de la expresión de los genes vecinos (Nichols y Mertens, 2008).

Posteriormente en *C. basilensis* HMF14 se han identificado dos agrupamientos génicos, uno responsable de la conversión de HMF a ácido furoico, y el otro de la degradación de éste hasta 2-oxoglutarato (Koopman *et al.*, 2010a). El operón responsable de la degradación de ácido furoico contiene los genes *hmfABCDE*, que codifica las enzimas necesarias propuestas por Trudgill (Figura 5) (Trudgill, 1969) y por Koenig y Andeesen (Koenig y Andreesen, 1990). El otro operón contiene los genes *hmfFGH* implicados en la conversión de HMF a ácido furoico, a través del intermediario FDCA. Cuando estas dos agrupaciones génicas se transfieren a *P. putida* S12, una bacteria incapaz de metabolizar furfurales, le confieren la capacidad de asimilar furfural y HMF, lo que confirma la

funcionalidad de estos genes y demuestra que están implicados en la degradación de compuestos furánicos (Koopman *et al.*, 2010a).

En las bacterias capaces de catabolizar furfural, tanto las secuencias como el orden en que se organizan los genes *hmfABCDE* están muy conservados. De hecho, los menores valores de semejanza de HmfA, la subunidad grande de la hipotética furoil-CoA deshidrogenasa, son los de la proteína de *Dinoroseobacter shibae* DFL12 (54% identidad) (Wierckx *et al.*, 2011). El operón *hmfFGH* está menos conservado, tanto en su organización espacial como en la secuencia de aminoácidos que codifica (Koopman *et al.*, 2010a). Algunas cepas de *Burkholderia* y *Methylobacterium* tienen todos los genes *hmf* organizados en un único operón. Sin embargo, en la mayoría de las bacterias hipotéticamente capaces de degradar HMF, los genes *hmfFG* y *hmfH* se organizan de manera muy variada (Wierckx *et al.*, 2011). Los genes *hmfABCDE* están implicados en la ruta central de asimilación del ácido furoico, ruta que también es necesaria para la degradación de HMF. Por lo tanto cabe esperar un alto nivel de conservación para estos genes, mientras que los genes para la degradación de HMF pueden haber sido reclutados más tarde, y posiblemente proceder de orígenes diversos (Koopman *et al.*, 2010a).

Aunque la vía metabólica de HMF únicamente está compuesta por dos actividades específicas, la enzima HmfH parece ser el factor determinante para la degradación de HMF. Las cepas incapaces de degradar HMF pueden poseer genes homólogos de *hmfFG*, pero nunca poseen un homólogo funcional a *hmfH*. Por lo tanto, la presencia de un homólogo *hmfH* parece ser representativa de la capacidad para degradar HMF, aunque *Burkholderia xenovorans* LB400 podría ser una excepción ya que, a pesar de que es incapaz de degradar HMF, contiene homólogos de *hmfH* y *hmfFG* (Wierckx *et al.*, 2011).

En las proximidades de los genes *hmf* de *C. basilensis* HMF14, se han identificado varios genes adicionales que pueden estar relacionados con la degradación o tolerancia a furaldehídos. Estos genes, identificados como *mfs*, *hmfR*, *adh* y *hyd*, no son esenciales para la degradación de HMF o furfural, pero pueden jugar un papel importante en el transporte o en la regulación de la ruta (Koopman *et al.*, 2010a). Las posibles aldehído deshidrogenasas codificadas por éstos presentan un 59-69 % de identidad con la aldehído deshidrogenasa PsfA de *P. putida* Fu1 (Wierckx *et al.*, 2011). Estos genes también pueden contribuir a la oxidación de furfural y/o de HMF. Además, en *S. cerevisiae* y *Escherichia coli* se han identificado varios genes responsables de la reducción de aldehídos furánicos (Gutierrez *et al.*, 2006; Petersson *et al.*, 2006).

3.6 Efectos biológicos de los furfurales.

Los efectos nocivos del furfural y del HMF son bien conocidos desde la década de los 70. En 1978 se demostró por primera vez que el furfural inducía mutaciones en el DNA de *Salmonella typhimurium* (Zdzienicka *et al.*, 1978), aunque más tarde se describió también en otros organismos como *E. coli* (Hadi *et al.*, 1989; Khan y Hadi, 1993), el fago *lambda* (Hadi *et al.*, 1989) y *Drosophila melanogaster* (Rodríguez-Arnaiz *et al.*, 1992). Además, parece existir una estrecha relación entre la exposición a furfural y la formación de tumores hepáticos en ratones (Reynolds *et al.*, 1987), así como daño en el tejido pulmonar (Gupta *et al.*, 1991).

Los grupos aldehído en general provocan la aparición de ROS que causan daño oxidativo a las células y contribuyen a los efectos letales de muchas enfermedades, como por ejemplo la enfermedad del Alzheimer (Ohta y Ohsawa, 2006). Además, los aldehídos se encuentran implicados en la generación de mutaciones en el DNA, así como en el mal plegamiento de las proteínas y en la producción de daños en las membranas celulares, causando finalmente la apoptosis en muchos casos (Perrone *et al.*, 2008; Sigler *et al.*, 1999).

Existen varios mecanismos por los que las células pueden eliminar los efectos nocivos de los aldehídos. Entre éstos cabe destacar, además de su reducción, la oxidación de los aldehídos mediante la reacción catalizada por una aldehído deshidrogenasa (ALDH₂), protegiendo así a las células frente al estrés oxidativo (Ohta *et al.*, 2004). El vínculo existente entre aldehídos y enfermedades ha llevado a la búsqueda de fármacos que actúen como secuestradores de aldehídos químicos, tales como la hidralazina (Burcham *et al.*, 2002).

El furfural induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células, pudiendo causar daño celular irreversible. Además del daño celular producido por las ROS, los aldehídos furánicos ejercen varios efectos específicos tales como la inhibición de algunas enzimas (Modig *et al.*, 2002). Normalmente esto conduce en gran medida al aumento del tiempo de la fase de latencia (Mills *et al.*, 2009), que sólo puede ser superado por un incremento considerable en la densidad de inóculo.

Las levaduras no presentan crecimiento en presencia de furfural hasta que éste es convertido o transformado a derivados de menor toxicidad, como el alcohol furfurílico. La reducción del furfural es un mecanismo de defensa para evitar consecuencias deletéreas. La transformación de furfural en su derivado alcohólico va acompañada de una disminución de ROS y del comienzo del crecimiento celular (Almeida *et al.*, 2009). Algunos organismos han sido capaces de desarrollar mecanismos de defensa frente a los efectos nocivos de los

furfurales aldehídicos. Bajo condiciones anaeróbicas, como las del metabolismo fermentativo, *S. cerevisiae* transforma el furfural y el HMF en sus derivados alcohólicos, menos reactivos que los compuestos de partida, utilizando para ello NADPH como reductor (Almeida *et al.*, 2009). En condiciones aeróbicas, *S. cerevisiae* convierte el furfural en ácido furoico (Sarvari Horvath *et al.*, 2003).

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que el HMF puede tener propiedades terapéuticas contra algunos tipos de cáncer (Michail *et al.*, 2007), y que derivados de éste podrían ejercer efectos positivos sobre la anemia falciforme (Abdulmalik *et al.*, 2005).

3.7 Los furfurales como materias primas.

El hecho de que los furfurales sean químicamente muy reactivos y de que puedan producirse a partir de fuentes renovables, convierte a estos compuestos en materias primas muy interesantes, pudiendo ser alternativas a los derivados petroquímicos en la producción de plásticos y otros productos químicos (Koopman *et al.*, 2010b). El furfural es un disolvente selectivo utilizado principalmente en el procesamiento de aceite de petróleo. También se ha utilizado como ingrediente para dar sabor en la industria alimentaria. Su derivado reducido, el alcohol furfurílico, se utiliza a escala industrial para la producción de resina de furano (Koopman *et al.*, 2010b).

A partir del HMF se pueden sintetizar otros productos de alto valor industrial como, por ejemplo, el FDCA, un compuesto de partida interesante para la producción de poliésteres y poliamidas, con potencial para sustituir en parte al ácido tereftálico. Al tratarse de un compuesto químico bastante versátil, el FDCA posee un amplio potencial siendo catalogado como uno de los productos químicos "top-12" obtenidos a partir de biomasa. Aunque el FDCA puede ser sintetizado químicamente a partir de HMF, para ello son necesarias presiones elevadas, altas temperaturas y la presencia de sales de metales y solventes orgánicos, lo que hace que el proceso sea bastante costoso y, además contaminante. Sin embargo, el FDCA puede ser sintetizado por algunos microorganismos como *C. basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010b).

4. Catabolismo de carbohidratos por *Pseudomonas*.

Desde hace varias décadas, basándose fundamentalmente en el comportamiento de mutantes deficientes en enzimas de la ruta, se han estudiado las diferentes vías de utilización de carbohidratos en el género *Pseudomonas*. En general, las bacterias del género *Pseudomonas* utilizan como fuente de carbono pocos carbohidratos, entre los que se encuentran: glucosa, gluconato, 2-cetogluconato, fructosa, sorbitol y manitol. Este espectro es un muy reducido cuando se compara con otras especies, como *E. coli* que utiliza glucosa, gluconato, fructosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, arabinosa, trehalosa, sorbitol, manitol, etc. Además, en el caso de *P. aeruginosa*, el catabolismo de carbohidratos se reduce únicamente al de la glucosa (Lessie y Phibbs, 1984).

El catabolismo de carbohidratos en *Pseudomonas* se caracteriza por no utilizar la ruta de Embden-Meyerhof debido a la falta del gen que codifica la 6-fosfofructoquinasa (Raps y Demoss, 1962; Schleissner *et al.*, 1997; Tiwari y Campbell, 1969; Wood y Schwerdt, 1954). En su lugar, utiliza la ruta de Entner-Doudoroff, que fue descubierta en *Pseudomonas saccharophila* (De Ley, 1960; Entner y Doudoroff, 1952), en la que se obtiene gliceraldehído-3-fosfato y piruvato a partir de 6-fosfogluconato, que es el intermediario clave (Blevins *et al.*, 1975; Doudoroff *et al.*, 1974). Posteriormente, experimentos de respirometría mostraron que esta ruta es la que existe en la mayoría de las *Pseudomonas* (Palumbo y Witter, 1969; Spangler y Gilmour, 1966).

En la ruta de Entner-Doudoroff la glucosa se oxida a 6-fosfogluconato, que se convierte en 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato (KDGP) por acción de la 6-fosfogluconato deshidratasa (Edd), que por la acción de la 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolasa (Eda) da lugar a piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (Lessie y Phibbs, 1984), que se transforma finalmente en intermediarios del ciclo de Krebs. En *P. aeruginosa* y *P. putida*, mutantes deficientes en la 6-fosfogluconato deshidratasa (Edd) son incapaces de asimilar glucosa, gluconato, 2-cetogluconato o manitol, pero crecen de manera similar que la cepa silvestre con citrato, succinato o acetato (Blevins *et al.*, 1975; Vicente y Canovas, 1973b).

5. Metabolismo de compuestos aromáticos.

Los compuestos aromáticos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza siendo su origen eminentemente natural. Se forman en una gran variedad de

procesos bioquímicos y es posible encontrarlos como moléculas de bajo peso molecular, como el benceno, o como componentes de biopolímeros tales como la lignina, el polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Gibson y Harwood, 2002). Un gran número de los compuestos aromáticos de origen xenobiótico son particularmente tóxicos y difíciles de degradar, por lo que persisten durante más tiempo en el medio ambiente debido a que su eliminación es más lenta (Reineke y Knackmuss, 1988).

5.1 Rutas de degradación de compuestos aromáticos.

La aromaticidad es una propiedad química que confiere a los compuestos que la poseen una especial estabilidad. El catabolismo de los diferentes compuestos aromáticos tiene lugar a través de rutas periféricas que convergen en otras centrales. En las primeras se produce la conversión de los distintos compuestos en unos pocos intermediarios centrales, y las segundas incluyen la ruptura del anillo aromático y conducen sus productos al metabolismo central de la célula (Díaz, 2004; Heider y Fuchs, 1997). Existe una gran diversidad de rutas periféricas, casi tantas como compuestos aromáticos existentes, formadas por enzimas muy específicas e inducidas por los compuestos aromáticos a degradar (Harwood *et al.*, 1998; Heider *et al.*, 1998). Las rutas centrales son mucho más reducidas, en número y diversidad. Muchas rutas periféricas convergen en un menor número de rutas centrales, lo que recibe el nombre de "embudo catabólico" (Harayama y Reikik, 1989).

Las rutas catabólicas aeróbicas de compuestos aromáticos se encuentran entre las mejores estudiadas a nivel molecular, especialmente las descritas en especies del género *Pseudomonas* (Jiménez *et al.*, 2002; van der Meer *et al.*, 1992; Wackett, 2003). Los compuestos aromáticos se catabolizan a través de una serie de rutas periféricas que implican la adición de uno o dos grupos hidroxilo sobre el anillo aromático, catalizada por monooxigenasas y/o dioxigenasas. Este hecho provoca el aumento de la densidad electrónica del anillo y le dota de mayor susceptibilidad a la oxidación.

Para organismos del género *Pseudomonas* se han descrito, al menos, 11 vías centrales distintas, donde convergen diferentes rutas periféricas (Figura 6, adaptada de (Jiménez *et al.*, 2010)).

Introducción

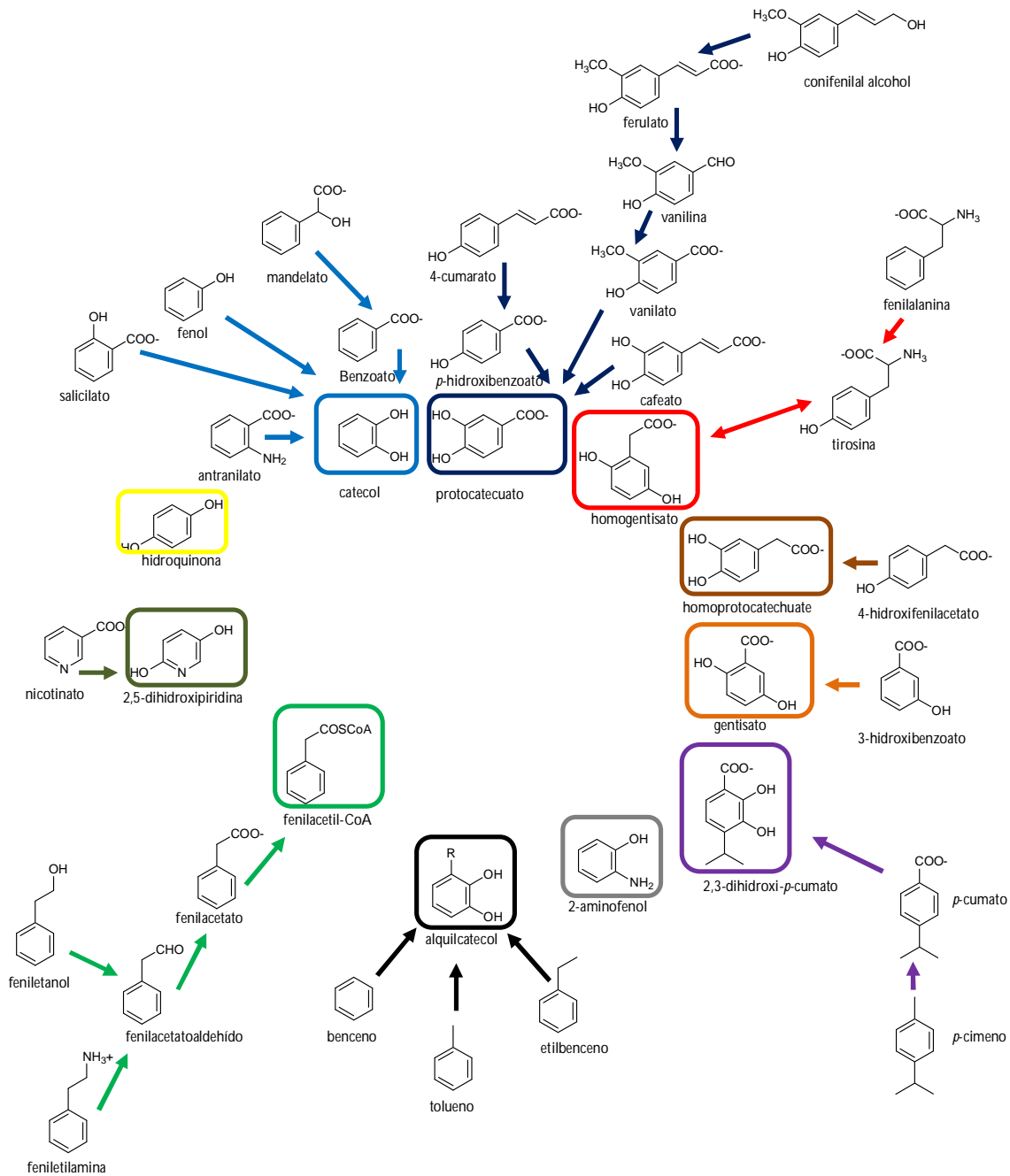


Figura 6. Vías catabólicas de algunos compuestos aromáticos en diferentes géneros de *Pseudomonas*. Las diferentes vías periféricas que convergen en unos pocos intermediarios centrales tales como catecol (azul), protocatecuato (azul oscuro), homogentisato (rojo), homoprotocatecuato (marrón), gentisato (naranja), 2,3-dihidroxi-*p*-cumato (púrpura), 2-aminofenol (gris), alquilocatecol (negro), fenilacetil-CoA (verde oscuro), 2,5-dihidroxipiridina (verde claro) e hidroquinona (amarillo). Esquema adaptado (Jiménez *et al.*, 2010).

Una vez activado el anillo aromático, la siguiente etapa en las rutas de degradación aeróbica de compuestos aromáticos consiste en la ruptura del anillo y su conversión en un compuesto intermedio no aromático. Este tipo de reacciones está catalizado por

dioxigenasas, que son metaloenzimas que rompen un enlace C-C mediante la adición de los dos átomos del oxígeno molecular a los intermediarios hidroxilados centrales. Estas enzimas se clasifican en intradiol y extradiol dioxigenasas en función de la posición que ocupe el enlace de ruptura con respecto a los grupos hidroxilo. Las intradiol dioxigenasas requieren de la presencia de Fe (III) no hemínico, y catalizan la ruptura del núcleo aromático en posición *orto*- respecto a los grupos hidroxilo, mientras que las extradiol dioxigenasas requieren de Fe (II), o en algunos casos de Mg (II) o Mn (II), que tampoco se encuentra unido a un grupo hemo, y catalizan la ruptura en posición *meta*-, en un enlace adyacente a uno de los grupos hidroxilo (Figura 7) (Vaillancourt *et al.*, 2004).

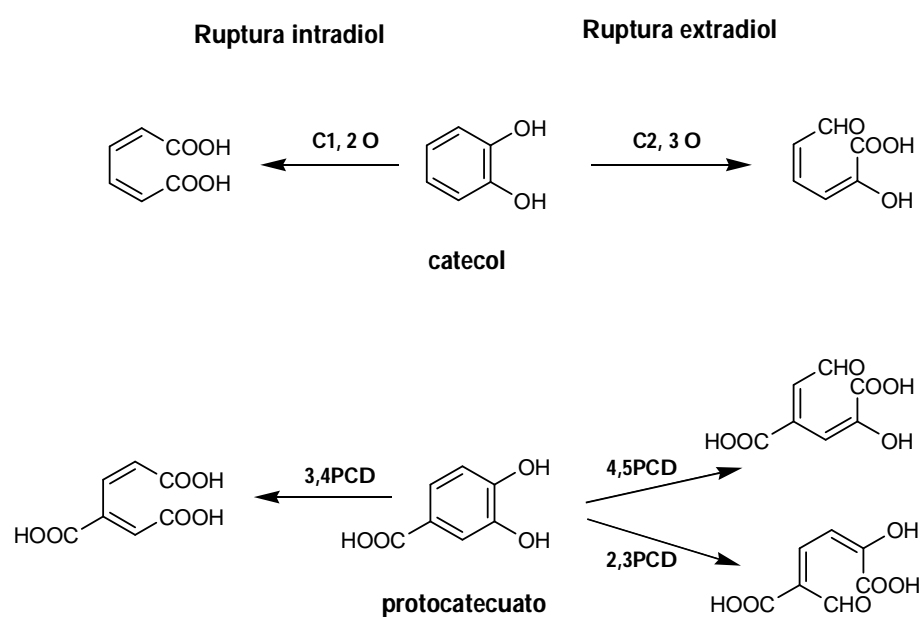


Figura 7. Ejemplos de reacciones catalizadas por dioxigenasas. Se muestran los productos de la ruptura de intradiol o extradiol para los mismos sustratos. Las dioxigenasas que catalizan la ruptura son; C1,2 O catecol-1,2-dioxigenasa; C2,3 O catecol-2,3-dioxigenasa; 3,4PCD, protocatecuato-3,4-dioxigenasa; 4,5PCD, protocatecuato-4,5-dioxigenasa; 2,3PCD, protocatecuato-2,3-dioxigenasa.

Aunque al analizar las reacciones que catalizan las diferencias entre las intradiol y extradiol dioxigenasas puedan parecer pequeñas, estas enzimas no comparten similitud en su secuencia ni en su estructura, lo que indica que pertenecen a familias de proteínas con un origen evolutivo diferente. Además, sus mecanismos de reacción son distintos. Los sustratos descritos para las intradiol dioxigenasas son el catecol y el protocatecuato, ambos con grupos hidroxilos contiguos (Figura 7). Por el contrario, las extradiol dioxigenasas catalizan la ruptura tanto de compuestos aromáticos catecólicos (catecol, protocatecuato,

homoprotocatecuato), como de otros que presentan dos hidroxilos no contiguos como el gentisato, el homogentisato y la hidroquinona (Vaillancourt *et al.*, 2004). También existen extradiol dioxigenasas que rompen compuestos monohidroxilados, como el 2-aminofenol (Takenaka *et al.*, 1997), el salicilato (Hintner *et al.*, 2001) y el 1-hidroxi-2-naftoato, implicados en el metabolismo del fenantreno (Iwabuchi y Harayama, 1998).

5.1.1 Ruta del β -cetoadipato.

La ruta del β -cetoadipato es considerada una de las rutas más ampliamente utilizadas en la degradación de compuestos aromáticos por microorganismos. Esta vía central es una ruta *orto*- y se compone de dos ramas, una para la degradación de protocatecuato (genes *pca*) y otra para la degradación de catecol (genes *cat*). Estas dos ramas convergen en un intermediario común, el β -cetoadipato, que da nombre a la ruta, y que finalmente se degrada a intermediarios del Ciclo de Krebs (Harwood y Parales, 1996; Jiménez *et al.*, 2004). Esta vía está presente en prácticamente todas las *Pseudomonas* estudiadas, con algunas excepciones como *Pseudomonas mendocina* (Harwood y Parales, 1996).

Muchos compuestos aromáticos abundantes como el quinato, *p*-hidroxibenzoato de metilo y fenilpropanoides (*p*-cumarato, ferulato, etc.), se degradan a través del protocatecuato como intermediario central por la vía *orto*- (protocatecuato 3,4-dioxigenasas) (Harwood y Parales, 1996; Jiménez *et al.*, 2004). Otros como el benzoato, triptófano, anilina, salicilato, antranilato, naftaleno, fenol, benceno, tolueno, 4-nitrotolueno, nitrobenzeno, etc., se degradan a través del catecol como intermediario a través de la vía *orto*- (catecol 1,2-dioxigenasas) (Harayama *et al.*, 1992; Jiménez *et al.*, 2004; Wackett, 2003; Williams y Sayers, 1994).

5.1.2 Rutas de escisión *meta*.

Como se ha indicado anteriormente, el benzoato y el catecol se degradan normalmente por la vía del β -cetoadipato, aunque en algunas *Pseudomonas* también pueden hacerlo por la ruta de escisión *meta*-. Algunos compuestos alquilcatecoles también utilizan esta vía metabólica, como por ejemplo, el 2,3-dihidroxi-*p*-cumarato, derivados del 3-metil y 3-etil-catecol y protocatecuato, que se forman durante la degradación aeróbica de hidrocarburos aromáticos tales como xilenos, toluenos, etilbenceno y *p*-cimeno (Williams y Sayers, 1994). *P. putida* mt-2 contiene una ruta catabólica codificada en el plásmido TOL

(pWW0) para la oxidación de la cadena lateral del alquilo de tolueno, *m*-xileno y *p*-xileno (genes *xyI*), hasta (metil)catecoles y su posterior rotura en *meta*- y transformación en intermediarios del ciclo de Krebs (Harayama *et al.*, 1992). Por el contrario, *P. putida* F1 contiene una ruta catabólica cromosómicamente codificada (genes *tod*) para la dioxigenación directa de benceno, tolueno y etilbenceno, hasta catecol, 3-metilcatecol y 3-etilcatecol, respectivamente (Choi *et al.*, 2003), que posteriormente son degradados a través de una ruta *meta*-. Ambas vías metabólicas, conducen a un intermediario común, el 2-hidroxipentanodieno que es transformado en piruvato y acetil-CoA (Choi *et al.*, 2003).

Aunque el catabolismo del protocatecuato a través de la ruta del β -cetoacido está bastante extendido, también puede ser degradado a través de una ruta *meta*-, catalizado por una protocatecuato 4,5-dioxigenasa de dos componentes (*ligAB*). Esta ruta parece ser la forma más común de la degradación de protocatecuato en *Sphingomonas* y *Comamonas*, aunque también se extiende a algunas especies del género *Pseudomonas*, como por ejemplo, *Pseudomonas straminea* NGJ1 (Maruyama *et al.*, 2004).

6. El cianuro.

6.1 Química del cianuro y sus derivados.

El cianuro es un anión monovalente consistente en un átomo de carbono unido a un átomo de nitrógeno mediante un triple enlace. El cianuro se encuentra en la naturaleza tanto en forma simple (HCN o CN⁻) como en forma de sal (las más comunes, de sodio y potasio). El cianhídrico es un ácido débil con un pKa de 9,22 a 25 °C, soluble en agua y en etanol. La forma protonada es volátil, y por tanto a pH ácido pasa a la fase gaseosa, pudiendo ser transportado a largas distancias desde la fuente de emisión (Smith y Martel, 1976).

La inestabilidad del triple enlace convierte al cianuro en una molécula altamente reactiva, de ahí su amplio uso en la industria química. El anión cianuro 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 (Tabla 3).

Tabla 3. Características de algunos complejos ciano-metálicos. Adaptado (Cartmell y Fowles, 1979).

Clasificación	Fórmula empírica	Constante de disociación (K_d)
Disociables por ácido fuerte (SAD)		
Azul de Prusia	$(Fe_4[Fe(CN)_6]_3)$	10^{-52}
Hexacianoferrato (III) (ferricianuro)	$[Fe(CN)_6]^{-3}$	10^{-44}
Tetracianomercurato (II)	$[Hg(CN)_4]^{-2}$	10^{-42}
Hexacianoferrato (II) (ferrocianuro)	$[Fe(CN)_6]^{-4}$	10^{-37}
Tricianocuprato (I)	$[Cu(CN)_3]^{-2}$	10^{-28}
Dicianoargentato (I)	$[Ag(CN)_2]^{-}$	10^{-21}
Disociables por ácido débil (WAD)		
Tetracianocadmiato (II)	$[Cd(CN)_4]^{-2}$	10^{-17}
Tetracianozincato (II)	$[Zn(CN)_4]^{-2}$	10^{-17}
Tetracianoniquelato (II)	$[Ni(CN)_4]^{-2}$	10^{-22}

Se definen dos categorías de complejos metálicos dependiendo de su estabilidad: complejos débiles, disociables por ácidos débiles, y complejos fuertes, sólo disociables por la acción de ácidos fuertes (Tabla 3). Los complejos débiles se suelen denominar por sus siglas en inglés “WAD” (*Weak-Acid Dissociable*) y se forman con metales tales como cadmio, cobre, níquel, plata o zinc. A pesar de que el tiocianato (SCN^-) es también un complejo débil, suele considerarse en otra categoría por ser el azufre un no metal. Los complejos de cianuro con oro, cobalto o hierro solo son disociables por la acción de ácidos fuertes o SAD (*Strong-Acid Dissociable*) en soluciones acuosas. Los complejos débiles pueden disociarse con cierta facilidad, por lo que la concentración de HCN en sus disoluciones es relativamente alta y son más tóxicos que los SAD (Mudder *et al.*, 2001). La liberación de cianuro del complejo se ve afectada principalmente por el pH, por la concentración del complejo y por la temperatura. Los complejos fuertes son muy estables, con constantes de

disociación de hasta 10^{-52} (Tabla 3), por lo que, sin tener en cuenta la toxicidad del metal pesado, son considerados menos tóxicos que los complejos débiles, que a su vez son menos peligrosos que los cianuros libres CN^-/HCN . 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, con la consiguiente liberación al medio de cianuro (Mudder *et al.*, 2001; Smith y Mudder, 1996; Wang y Forssberg, 1990).

El cianuro inhibe el crecimiento celular por, al menos, tres mecanismos principales: (a) quelación fuerte de metales di o trivalentes de las metaloenzimas como la citocromo *c* oxidasa; (b) reacción con el grupo ceto de diferentes compuestos originando derivados de cianhidrinas; y (c) reacción con las bases de Schiff intermediarias en las reacciones enzimáticas dando lugar a la formación de derivados nitrilos estables (Solomonson, 1981).

Se postula que el cianuro ha jugado un papel esencial en la síntesis de las primeras moléculas orgánicas. En 1961, Oro describió la síntesis de los aminoácidos glicina y alanina y, fundamentalmente, de la base púrica adenina a partir de ácido cianhídrico (HCN) gaseoso introducido en una solución básica de hidróxido amónico 3N, mantenida a 70°C durante 25 días (Oro, 1961; Oro y Kimball, 1961; Oro y Kamat, 1961; Oro y Kimball, 1962).

6.2 Fuentes de cianuro.

El cianuro se encuentra de forma generalizada en la naturaleza; no sólo se detecta en el aire en zonas urbanas e industriales, sino que además es liberado por la biomasa en descomposición. También está presente en las emisiones volcánicas y lo producen los organismos cianogénicos, que lo generan como subproducto de otras reacciones o como metabolito primario. La cianogénesis, descubierta en 1983, es la capacidad de producir cianuro, o derivados de éste, que poseen ciertos organismos entre los que se incluyen plantas superiores, artrópodos, hongos, algas y bacterias (Conn, 1979; Dubey y Holmes, 1995). Las plantas constituyen una fuente significativa de compuestos cianurados y los utilizan para defenderse frente a herbívoros y patógenos, tanto por su toxicidad como por su sabor amargo (Jones, 1998). En las plantas el cianuro se origina durante la producción de al menos dos hormonas: en una de las variadas vías de producción de ácido indolacético

Introducción

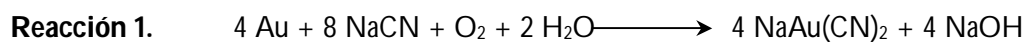
(Barceló *et al.*, 2001) y en el último paso de la síntesis de etileno (Peiser *et al.*, 1984; Pirrung *et al.*, 1993). También se ha descrito la producción de compuestos cianurados con funciones defensivas en distintos artrópodos, en los que además actúan como feromonas implicadas en el control del apareamiento (Seidelmann *et al.*, 2003). En algunas algas cianogénicas (*Anacystis nidulans* y *Chlorella vulgaris*) se ha especulado sobre el posible papel regulador del cianuro en el metabolismo del nitrógeno (Pistorius *et al.*, 1979); mientras que en bacterias la biosíntesis de cianuro podría estar orientada hacia el metabolismo secundario, puesto que se produce durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria (Askeland y Morrison, 1983).

El cianuro tiene también un origen antropogénico, ya que se utiliza para la síntesis industrial de numerosos compuestos químicos orgánicos como pinturas, adhesivos y nylon (Gallagher y Manoil, 2001). Al año se producen 2-3 megatoneladas de compuestos cianurados (Raybuck, 1992), que en parte van a parar tanto a suelos como a ambientes acuáticos o son liberados en forma de emisiones gaseosas. La generación principal de residuos procede de las actividades mineras (extracción de oro y plata) y metalúrgicas, así como de los procesos de galvanoplastia y electropulido en la industria de la joyería (Akcil, 2003; Akcil y Mudder, 2003; Baxter y Cummings, 2006). En este sector el cianuro es utilizado durante el abrillantamiento y/o recubrimiento por determinados metales (plata, oro, cromo, rodio, etc.) de piezas metálicas. 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.

Debido a su elevada toxicidad, los residuos de joyería están considerados por la normativa europea como residuos peligrosos (Decisión 2001/118/CE). En la legislación española, según la orden MAM 304/2002 de 8 de febrero (publicada en el BOE del 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 LER 060311.

Por sus características químicas el cianuro es capaz, en condiciones ligeramente oxidantes, de disolver el oro contenido en el mineral. El proceso de disolución de metales se denomina lixiviación, mientras que la disolución de oro por cianuro se denomina

específicamente cianuración. Este proceso se describe mediante la ecuación de Elsner (Mudder *et al.*, 2001) (**Reacción 1**):



Una vez disuelto, el oro es recuperado de la disolución por precipitación con zinc o por adsorción en carbón activo granular (Mudder *et al.*, 2001). Debido a su disponibilidad y la solubilidad de sus complejos metálicos, el cianuro es prácticamente el único agente lixivante 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. Desde el año 1975 hasta el 2000 han acontecido en el mundo más de 30 accidentes de gran envergadura causados por la liberación de cianuro al medio ambiente (Mudder *et al.*, 2001).

Aunque la minería es uno de los sectores que genera más residuos cianurados, ya que utiliza aproximadamente el 20 % de la producción mundial de cianuro, también se producen considerables cantidades de residuos cianurados durante la producción de alimentos. Así, por ejemplo, en el proceso de extracción de almidón de la yuca o mandioca, alimento básico para un gran número de personas en áreas tropicales de África, Sudamérica y el Pacífico, se liberan glucósidos cianogénicos que son hidrolizados por las propias enzimas de la planta. De ese modo se pueden generar residuos con concentraciones de hasta 200 mg/l de cianuro libre (Siller y Winter, 1998).

6.3 Eliminación de cianuro.

Debido a las enormes cantidades de cianuro producidas por la industria se han desarrollado diferentes métodos físico-químicos para degradar este compuesto tóxico (Mudder *et al.*, 2001). No obstante, la mayoría de estos métodos son relativamente caros, utilizan reactivos potencialmente peligrosos y a la vez pueden producir compuestos incluso más tóxicos. Por este motivo se están desarrollando métodos biológicos basados en la versatilidad metabólica de bacterias y hongos que permitan eliminar el cianuro, sobre todo en condiciones extremas de cultivo como, por ejemplo, medios alcalinos que eviten la volatilización a HCN que se produce a pH ácido y neutro (Huertas *et al.*, 2006).

A pesar de su toxicidad, existe un amplio número de microorganismos que producen, degradan o utilizan cianuro. Se han descrito varias rutas bioquímicas para la biodegradación de cianuro (Tabla 4) que se pueden agrupar en tres tipos: vía reductiva, vía

oxidativa y vía de sustitución/adición, en la que se incluye la ruta hidrolítica. La vía reductiva se deriva de la reacción que lleva a cabo la nitrogenasa, siendo los productos finales de la reacción metano y amonio. En las reacciones de oxidación, el cianuro puede ser convertido en cianato mediante una reacción catalizada por una cianuro monooxigenasa, o directamente en CO₂ y amonio mediante la acción de una dioxigenasa. En la ruta hidrolítica se pueden distinguir dos ramas. Por una parte, la cianuro hidratasa cataliza la formación de formamida por la adición de una molécula de agua, mientras que la cianidasa produce ácido fórmico y amonio por la adición de dos moléculas de agua en una sola reacción (Ebbs, 2004). Por último, en las rutas de sustitución/transferencia cabe destacar la formación de 3-cianoalanina a partir de cianuro y O-acetilserina (OAS), o cisteína.

Tabla 4. Reacciones de biodegradación de ácido cianhídrico y compuestos cianurados. Adaptado de (Ebbs, 2004).

Reacciones hidrolíticas	
<u>Cianuro hidratasa</u> HCN + H ₂ O → HCONH ₂	<u>Cianidasa</u> HCN + 2 H ₂ O → HCOOH + NH ₃
<u>Nitrilo hidratasa</u> R-CN + H ₂ O → R-CONH ₂	<u>Nitrilasa</u> R-CN + 2 H ₂ O → R-COOH + NH ₃
Reacciones oxidativas	
<u>Cianuro monooxigenasa</u> HCN + O ₂ + H ⁺ + NAD(P)H → HOCN + NAD(P) ⁺ + H ₂ O	
<u>Cianuro dioxigenasa</u> HCN + O ₂ + 2 H ⁺ + NAD(P)H → CO ₂ + NH ₃ + NAD(P) ⁺	
Reacciones reductivas	
<u>Nitrogenasa</u> HCN + 2 H ⁺ + 2 e ⁻ → CH ₂ NH; CH ₂ NH + H ₂ O → CH ₂ O + NH ₃ CH ₂ NH + 4 H ⁺ + 4 e ⁻ → CH ₄ + NH ₃	

En general, la capacidad de asimilar cianuro requiere, además, de una ruta metabólica para transformar este compuesto tóxico en otro fácilmente asimilable como el amonio, la presencia de enzimas que no se inhiban por cianuro, entre las que destaca una respiración insensible al mismo y probablemente la capacidad de sintetizar sideróforos para la entrada de hierro, ya que la altísima afinidad del cianuro por el hierro limita su biodisponibilidad (Baxter y Cummings, 2006).

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 cianurados. Debido al uso prolongado de cianuro en la minería de los metales preciosos desde finales del siglo XIX, la eliminación de estos complejos ha sido extensamente tratada en la literatura científica. La gran estabilidad química que poseen limita en muchos casos la efectividad de los tratamientos de eliminación, en los que también se ha de tener en cuenta la propia toxicidad de los metales con los que se compleja.

Todos los datos provenientes de estudios con seres vivos han sido tratados siempre con mucha precaución, ya que los complejos metálicos del cianuro pueden descomponerse a causa de la luz solar (fotodisociación) o por disociación físico-química debida a las características del medio de cultivo. El estudio de la biodegradación de los complejos cianurados es paralelo al estudio de la estabilidad o de la capacidad de disociación de los mismos en distintas condiciones ambientales (Barclay *et al.*, 1998b; Raef *et al.*, 1977).

Los complejos de cadmio, cobre, níquel, plata y zinc se disocian con mayor facilidad que los más estables de hierro y oro. Estos últimos, tipo SAD, han mostrado ser más resistentes a la degradación microbiana (Dzombak *et al.*, 2006). Se han descrito varias especies del género *Pseudomonas* y *Klebsiella*, aisladas mediante técnicas de enriquecimiento a partir de suelos no contaminados de cianuro, capaces de degradar complejos metálicos cianurados (Silva-Avalos *et al.*, 1990). Bacterias como *P. putida* BCN3, *Klebsiella sp.* y *P. fluorescens* NCIMB 11764 son capaces de utilizar $K_2Ni(CN)_4$ como fuente de nitrógeno (Rollinson *et al.*, 1987; Silva-Avalos *et al.*, 1990). De igual forma se ha demostrado que las cepas 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; Finnegan *et al.*, 1991; Rollinson *et al.*, 1987). Se ha descrito una bacteria, *Acinetobacter sp.*, capaz de degradar un gran número de complejos cianuro-metálicos (de Au, Ag, Cd, Zn, Cu, Zn, Cu, Fe y Co) mediante un complejo lipoenzimático extracelular. A pesar de que los complejos cianurados de hierro son muy estables, se han descrito cultivos mixtos capaces de eliminar distintas formas químicas de éstos, en total ausencia de luz. Un cultivo mixto, proveniente de suelos contaminados de una antigua planta manufacturadora de gas, fue capaz de degradar hasta un 60 % de ferrocianuro potásico a pH de 7,2 (Raybuck, 1992).

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 metálicos $K_2Ni(CN)_4$ y $K_4Fe(CN)_6$ como fuentes de nitrógeno (Barclay *et al.*, 1998a; Barclay *et al.*, 1998b; Yanase *et al.*, 2000). *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, así como en su posible disociación en cianuro libre dentro y fuera de las células, su transporte y su probable actuación como sustratos. Tan sólo se sabe que tanto el cianuro libre como sus formas metálicas son metabolizados por los mismos sistemas enzimáticos.

7. El género *Pseudomonas*.

El género *Pseudomonas* fue descrito por el profesor Migula (Karlsruhe Institute, Alemania) (Migula, 1894; Migula, 1900) como "Células con estructuras polares móviles. Algunas especies forman esporas, aunque en general se trata de un evento raro (por ejemplo en *Pseudomonas violacea*)". Actualmente no se conoce ninguna especie de *Pseudomonas* que produzca esporas, y probablemente las observadas por Migula fueran gránulos refráctiles de material de reserva (Palleroni, 2010). Migula propuso, con gran acierto, como especie tipo a *Pseudomonas pyocyanea*, que más tarde fue renombrada como *P. aeruginosa*. Aunque en ninguno de sus escritos aclaró la etimología de la palabra *Pseudomonas*, posteriormente otros taxónomos sugirieron una derivación directa del griego (*monas* o unidad). Así, en la 7ª edición del Manual Bergey de Bacteriología Determinativa de 1957, la definición formal es "Gr. *pseudes* falso; Gr. *monas* una unidad, mónada; *Pseudomonas* falsa mónada o unidad" (Palleroni, 2010).

Basándose en estudios nutricionales o de hibridación RNAr/DNA (Palleroni *et al.*, 1973), las especies de *Pseudomonas* se dividieron en cinco grupos taxonómicos (RNA-I-V) cuya diversidad se demostró más tarde mediante la secuenciación de RNAr 16 S. El trabajo de Jean-Marie Meyer y sus colaboradores en la Universidad de Estrasburgo (Meyer *et al.*, 2002) ha añadido una nueva y muy interesante estrategia para la identificación de especies, basada en la determinación del tipo de sideróforos, fluorescentes o no fluorescentes, producidos por las bacterias.

Las bacterias del género *Pseudomonas* (grupo RNA-I dentro de la subclase γ -proteobacterias), son microorganismos ubicuos, saprofitos, bacilos rectos o ligeramente curvados, no helicoidales, con flagelos polares, Gram negativos, oxidasa positivos, y aeróbicos estrictos, aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones (Krieg y Garrity, 2001). El catabolismo de los glúcidos se realiza por la ruta de

Entner-Doudoroff y el ciclo de Krebs. Algunos sintetizan sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso con gran valor taxonómico, siendo común la presencia de plásmidos (Anzai *et al.*, 2000). La mayoría de las especies se cultivan a un pH neutro, a temperaturas de la zona mesófila y no requieren factores de crecimiento, aunque algunos miembros del género son psicrófilos. En general no acumulan gránulos de poli- β -hidroxibutirato en condiciones óptimas de crecimiento, excepto cuando se cultivan con gluconatos o alcanos (Haywood *et al.*, 1990), y cuando el medio de cultivo está desbalanceado (Prieto *et al.*, 2007). Son capaces de degradar y mineralizar compuestos muy diferentes como hidratos de carbono, ácidos alifáticos, aminas, amidas, aminoácidos y alcoholes, así como gran variedad de compuestos aromáticos, tanto de origen natural como xenobióticos, que convergen en rutas centrales como la del catecol, protocatecuato, homogentisato, gentisato, hidroxiquinol, hidroquinona, homoprotocatecuato y fenilacetil-CoA (Jiménez *et al.*, 2004). Muchas *Pseudomonas* pueden utilizar más de 100 fuentes de carbono y energía diferentes. Ello les permite colonizar diversos ambientes naturales (suelos, aguas dulces y marinas), y pueden ser saprofitas, patógenos o actuar en simbiosis con plantas y animales. Esta versatilidad metabólica, fisiológica y genética hace posible que colonicen con éxito una gran variedad de nichos, cumpliendo una función significativa en procesos tan importantes como el reciclaje de elementos, degradación y reciclaje de compuestos xenobióticos o la protección de plantas frente a patógenos (Timmis, 2002).

El número de especies asignadas al denominado grupo *sensu stricto* de *Pseudomonas* ha crecido considerablemente y sigue creciendo, como consecuencia de la notable adaptabilidad de la familia *Pseudomonadaceae* a las condiciones de los distintos entornos. Entre estas condiciones variables, se encuentran principalmente la composición química de los compuestos para satisfacer las necesidades de carbono y nitrógeno. Sin embargo, las bacterias pertenecientes a esta familia son menos tolerantes a variaciones de pH y de temperatura, lo que explicaría la ausencia de cepas realmente acidófilas o termófilas (Palleroni, 2010). El género *Pseudomonas* incluye cepas patógenas oportunistas de animales (*P. aeruginosa*), patógenos de plantas (*Pseudomonas syringae*) y cepas que estimulan el crecimiento de plantas actuando como fungicidas, como *P. fluorescens* (Lugtenberg y Dekkers, 1999). En los últimos años se ha secuenciado el genoma de 27 cepas de *Pseudomonas* y muchas otras se encuentran en proceso de secuenciación (<http://www.pseudomonas.com/viewAllGenomes.do>) (Winsor *et al.*, 2009).

7.1 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*.

Pseudomonas pseudoalcaligenes es una bacteria del suelo, aislada por primera vez a partir del agua de una piscina (Monias, 1928). Basándose en el análisis del rRNA 16S se ha clasificado en el mismo grupo que *P. aeruginosa*, *P. mendocina* y *Pseudomonas stutzeri*, y pertenece al subgrupo de *P. aeruginosa* de Palleroni (Anzai *et al.*, 2000). Etimológicamente *pseudoalcaligenes* significa falso productor de álcalis ((pseu. do.al.ca.li'ge.nes Gr. adj *pseudés*, falso; N.L. n. *alcali* (al artículo árabe, la; *qaliy* n. árabe, sosa), alcalinos; N.L. suff. *-genes* (de Gr. v. *gennaô*, producir), produciendo; N.L. adj. *alcaligenes*, producción de álcali (<http://www.bacterio.cict.fr/p/pseudomonas.html>; (Krieg y Garrity, 2001)). La colección examinada por Stanier incluía al menos dos grupos (Stanier *et al.*, 1966); las cepas pertenecientes al primero de los grupos eran capaces de almacenar PHB (polihidroxibutirato) y eran arginina dihidrolasa positivas; en tanto que las pertenecientes al segundo grupo no poseían estas propiedades y mostraban características nutricionales diferentes (Doudoroff *et al.*, 1974). La especie está constituida por tres subespecies: *P. pseudoalcaligenes* subsp. *pseudoalcaligenes* (la original descrita por Stanier *et al.*, 1966), *P. pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*, patógena de plantas (Schaad *et al.*, 1978) y *P. pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* (agente causal de la enfermedad bacteriana del tubérculo japonés *Amorphophalus konjaci*) (Goto, 1983). Algunas cepas de *P. pseudoalcaligenes*, aisladas de suelos y aguas subterráneas contaminadas con nitrobenceno, son capaces de utilizar el nitrobenceno como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Nishino y Spain, 1993), de co-metabolizar bifenilos policlorados (Taira *et al.*, 1992), de crecer en presencia de telurio (Di Tomaso *et al.*, 2002) y algunas además presentan tolerancia a metales y metaloides tóxicos (Tremaroli *et al.*, 2010).

7.1.1 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344.

La bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344 fue aislada, por su capacidad de crecer en medio mínimo con cianuro como única fuente de nitrógeno, por enriquecimiento selectivo de lodos recogidos en la margen izquierda del río Guadalquivir tras su paso por la ciudad de Córdoba, donde la industria joyera posee gran importancia (Luque-Almagro *et al.*, 2005). Esta bacteria resulta idónea para aplicaciones biotecnológicas en el tratamiento de residuos industriales cianurados, ya que tolera una elevada concentración de cianuro libre (hasta 30 mM) y un pH muy alcalino (hasta pH 12), lo que

evita que el cianuro se volatilice como HCN. Hasta ese momento no existían precedentes en la bibliografía sobre biodegradación bacteriana de cianuro a pH alcalino (Luque-Almagro *et al.*, 2005), aunque se habían analizado aspectos del metabolismo del cianuro y el cianato en especies no alcalófilas de *Pseudomonas* (Chapatwala *et al.*, 1998; Dhillon y Shivaraman, 1999); y descrito hongos fitopatógenos que degradaban cianuro (Dumestre *et al.*, 1997). *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 no sólo asimila cianuro libre, también asimila complejos cianometálicos, cianato, nitrilos y otros derivados naturales o artificiales (Luque-Almagro *et al.*, 2005).

El potencial biotecnológico de esta bacteria ha quedado demostrado mediante la desintoxicación de cianuro en un reactor discontinuo (Huertas *et al.*, 2010), y también mediante el uso de la enzima cianasa, que es inducida por cianuro, en la construcción de un biosensor para detectar cianato (Luque-Almagro *et al.*, 2003). Mediante electroforesis bidimensional se identificaron en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 algunas proteínas inducidas por cianuro, encontrándose que este compuesto tóxico producía una respuesta que incluía defensa frente a estrés oxidativo, hambre de nitrógeno, y producción de sideróforos (Huertas *et al.*, 2006; Luque-Almagro *et al.*, 2007). Otras proteínas que también se inducían por cianuro fueron: una proteína de función desconocida, codificada por el gen *hyp1*, que pertenece a la misma agrupación génica (*nit1C*) que el gen *nit* que codifica una nitrilasa, dos proteínas relacionadas con la respiración insensible a cianuro u oxidasa alternativa (Cio), la cianasa (CynS) que cataliza la conversión de cianato en amonio, y CynA el componente periplásmico de un transportador de cianato, aunque más tarde se comprobó que las rutas de asimilación de cianato y cianuro son diferentes en esta bacteria (Luque-Almagro *et al.*, 2008). Por lo tanto, frente a la presencia de cianuro, la bacteria desarrolla una compleja respuesta que implica la inducción de las enzimas de las rutas degradativas del cianuro y cianato, como la nitrilasa y la cianasa, la síntesis de sideróforos para la captación de hierro, ya que CN^- y Fe^{2+} forman complejos muy estables que limitan la disponibilidad de este elemento (Andrews *et al.*, 2003; Braun y Killmann, 1999; Chen y Kunz, 1997; Faraldo-Gomez y Sansom, 2003; Huertas *et al.*, 2006), la inducción de una oxidasa terminal insensible a cianuro, y de mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo y de control del balance C/N intracelular en respuesta a la limitación de nitrógeno (Huertas *et al.*, 2006; Luque-Almagro *et al.*, 2007; Luque-Almagro *et al.*, 2005; Quesada *et al.*, 2007b).

P. pseudoalcaligenes CECT 5344 posee un genoma de 4,69 Mb (Wibberg *et al.*, 2014), consta de un único cromosoma circular, comparte el 75 % de sus genes (3.384) con

Introducción

P. mendocina ymp y no contiene plásmidos accesorios. El cromosoma circular *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 contiene 1.103 genes exclusivos respecto a *P. mendocina* ymp, mientras que en el cromosoma circular de *P. mendocina* ymp se encuentran 1.373 genes únicos. La secuenciación del genoma ha permitido identificar la presencia de genes implicados en procesos con gran potencial biotecnológico como la producción de bioplásticos, la degradación de furfurales y otros contaminantes, o la resistencia a metales pesados (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Un hecho que podría estar relacionado con las condiciones ambientales en las que esta cepa bacteriana se ha desarrollado, es que en ésta se han identificado tres operones *cio* (*cio1*, *cio2* y *cio3*) mientras que en otras *Pseudomonas*, como en *P. aeruginosa*, *P. putida* o *P. mendocina*, sólo existe un operón *cio* por genoma, o dos, como en *P. stutzeri*, *P. fluorescens* o *P. syringae* (Luque-Almagro *et al.*, 2013). La mutagénesis dirigida del gen *cioA*, localizado en el agrupamiento génico *cio1*, abolió totalmente el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 en presencia de cianuro así como la expresión de la respiración resistente a cianuro (Quesada *et al.*, 2007b). Sin embargo, aún no se conoce la función de los productos génicos de los otros dos operones *cio*: *cio2* y *cio3* (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Aunque sin duda, el principal mecanismo de adaptación que presentan las bacterias resistentes al cianuro es la inducción de una oxidasa terminal insensible a éste (Quesada *et al.*, 2007b), además, deben tenerse en cuenta otros mecanismos de resistencia debido a que el cianuro puede unirse a los cofactores metálicos de ciertas proteínas, inhibiendo con ello su actividad catalítica. En este contexto, además del ya mencionado de la limitación de hierro y producción de sideróforos, el metabolismo del cianuro se relaciona claramente con el del hierro. De hecho, varios trabajos recientes relacionan ambos procesos en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Becerra *et al.*, 2014; Becerra *et al.*, 2011; Igeño *et al.*, 2011).

II. OBJETIVOS

La mayoría de residuos tóxicos generados por las industrias son difíciles y costosos de tratar, por eso para su eliminación se contempla la posibilidad de usar microorganismos capaces de utilizarlos para su crecimiento (asimilarlos), tanto como fuente de carbono como de nitrógeno. *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es una bacteria cianotrófica capaz de metabolizar el cianuro en su forma libre, pero que resulta poco eficiente degradando los complejos metálicos cianurados. Puesto que la relación C/N en la molécula de cianuro es muy baja, es necesario añadir una fuente de carbono adicional al medio de cultivo para que la bacteria pueda asimilar el cianuro. Uno de los objetivos de esta Tesis ha sido encontrar la fuente de carbono óptima para la asimilación de cianuro. Para ello sería ideal utilizar fuentes de carbono que a su vez constituyan un problema de contaminación ambiental. La secuenciación y anotación del genoma de la bacteria (el primero de una bacteria asimiladora de cianuro) abre la posibilidad de profundizar en el potencial biodegradador de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 mediante la identificación de nuevas rutas catabólicas de compuestos que supongan un problema de contaminación ambiental. Además, como la bacteria está limitada en la asimilación de complejos cianurados, ha sido otro objetivo el aislamiento de nuevas cepas bacterianas que complementen las capacidades degradadoras de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 mediante el uso de cultivos mixtos.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas que utilicen complejos cianurados, fundamentalmente de hierro, como única fuente de nitrógeno para su crecimiento.
2. Estudio de las fuentes de carbono óptimas para la asimilación de cianuro por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.
3. Identificación de regiones génicas posiblemente implicadas en las rutas de degradación de compuestos aromáticos.
 - a. Análisis, mediante ensayos de crecimiento en placas en gradiente de concentración, de los compuestos aromáticos asimilables por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.
4. Estudiar la asimilación de compuestos furánicos por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.
 - a. Determinar la funcionalidad de las vías implicadas en la asimilación de furfural y sus derivados en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 mediante ensayos

Objetivos

fisiológicos de crecimiento y degradación, además de la determinación de algunas actividades enzimáticas.

- b. Generación de una cepa mutante de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 incapaz de utilizar glucosa.
- c. Identificación de los cambios en la expresión génica inducidos por alcohol furfurílico en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Análisis funcional de algunos genes posiblemente implicados en la asimilación de furfurales (*benE* y *liuA*).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico.

Las cepas de bacterias utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo/ Fenotipo Relevante	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
XL1 <i>blue</i> MRF ^r	Δ (mcra)183, Δ (mcrcb-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac [F ^r proAB lacI ^q Z Δ M15 tn10 (Tet ^r)].	(Sambrook <i>et al.</i> , 1982)
<i>Microbacterium testaceum</i>	Asimilación de cianuro unido a metales	Este trabajo
<i>Achromobacter sp.</i>	Asimilación de cianuro unido a metales	Este trabajo
<i>Achromobacter piechaudii</i>	Asimilación de cianuro unido a metales	Este trabajo
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	Asimilación de cianuro unido a metales	Este trabajo
<i>Microbacterium kitamiense</i>	Asimilación de cianuro unido a metales	Este trabajo
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>		
CECT 5344 R1 (R1)	Mutante espontáneo de CECT 5344 resistente a rifampicina. Rf ^r .	(Luque-Almagro <i>et al.</i> , 2005; Quesada <i>et al.</i> , 2007a)
CECT 5344 R1D (R1D)	Mutante espontáneo de la cepa CECT 5344 R1 más eficiente en la asimilación de furfural. Rf ^r .	Este trabajo
CECT 5344 EDD (EDD1)	Mutante de la cepa 5344 R1D obtenido por inserción cromosómica del gen <i>aacC1</i> en <i>edd</i> . Rf ^r , Gm ^r .	Este trabajo
CECT 5344 BENE1 (BENE1.1)	Mutante de la cepa 5344 R1D obtenido por inserción cromosómica del gen <i>aacC1</i> en <i>benE1</i> . Rf ^r , Gm ^r .	Este trabajo
CECT 5344 LIUA (LIUA1)	Mutante de la cepa 5344 R1D obtenido por inserción cromosómica del gen <i>aacC1</i> en <i>liuA</i> . Rf ^r , Gm ^r .	Este trabajo

1.1 Aislamiento por enriquecimiento selectivo de cepas degradadoras de complejos ciano-metálicos.

Como medio selectivo para el aislamiento se empleó medio mínimo M9 (Sambrook *et al.*, 1982) a pH 9,5 con acetato 50 mM como fuente de carbono, y azul de Prusia(10mM), ferrocianuro potásico (10mM), ferricianuro potásico (10mM) o cianuro potásico (2 mM) como única fuente de nitrógeno. Los medios se inocularon con lodos recogidos de diferentes zonas de Río Tinto (Huelva) y se incubaron en un Erlenmeyer a 30 °C y 200 rpm en un agitador orbital durante una semana. El proceso se repitió 4 veces reinoculando en medio fresco con 1% (v/v) del cultivo previamente crecido. Para la obtención de colonias aisladas se hicieron diluciones del último cultivo y se esparcieron sobre 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 asimilar el cianuro y los complejos metálicos cianurados en cultivos axénicos. Para cada fuente de nitrógeno se obtuvo un único cultivo puro.

1.2 Análisis de la secuencia del gen rRNA 16S de las cepas degradadoras de compuestos metálicos cianurados.

El gen que codifica la subunidad ribosómica 16S (rRNA 16S) de las diferentes cepas fue secuenciado en la Empresa Sistemas Genómicos S.L. (Valencia, España). Las secuencias obtenidas se compararon a las secuencias genómicas disponibles en la base de datos *GenBank* y *RDP (Ribosomal Database Project II)*. La identificación de las cepas se efectuó mediante un análisis de similitud entre las secuencias de las muestras problema y las secuencias presentes en las bases de datos mencionadas.

2. Medios y condiciones de cultivo.

2.1 Medios de cultivo.

2.1.1 Medios líquidos.

Como medio rico para el crecimiento de las diferentes cepas de *E. coli*, *P. putida* y *P. pseudoalcaligenes* se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1982) a pH 7,5 (*E. coli* y *P. putida*), pH 8,0 (*Achromobacter sp* y *A. xylosoxidans*), pH 8,5 (*P. pseudoalcaligenes*, *A.*

piechaudii), y pH 9,0 (*M. testaceum* y *M. kitamiense*). La composición del medio LB se detalla a continuación:

Bactotriptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
NaCl.....	10 g
H ₂ O.....	hasta 1 l

Como medio mínimo definido para el crecimiento de las diferentes cepas, se utilizó el medio M9 (Sambrook *et al.*, 1982) a un pH entre 7,5 y 9,5, que contenía por litro:

Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl.....	0,5 g
Solución trazas	2 ml

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. El medio M9 se suplementó con cloruro amónico (2,0 ó 5,0 mM), cianuro potásico (2 mM), ferrocianuro potásico (10 mM), ferricianuro potásico (10 mM) o residuo cianurado (2 mM de cianuro libre) como fuente de nitrógeno. Como fuentes de carbono y energía se utilizaron, según los casos, alguno de los siguientes compuestos: acetato potásico (4 g/l), DL-malato sódico (4 g/l), citrato sódico (4g/l), succinato sódico (4 g/l), piruvato sódico (4g/l), fumarato sódico (4 g/l), octanoato sódico (4 g/l), glucosa (4 g/l), glicerol (4 g/l), furfural (10 mM), alcohol furfúrico (10 mM) o ácido furoico (10 mM).

Con el objetivo de determinar el pH óptimo de crecimiento de algunas cepas bacterianas, se preparó una mezcla de tampones en el intervalo de pH a estudiar (6,0-10,0). Como tampones se utilizaron fosfato (HPO₄²⁻/H₂PO₄⁻), borato (BO₄³⁻/HBO₄²⁻) y bicarbonato (H₂CO₃/HCO₃⁻), cada uno de ellos a una concentración final de 25 mM.

Los medios se esterilizaron por calentamiento a 121 °C en autoclave durante 20 min. 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

Materiales y Métodos

por filtración (filtros con poros de 0,22 μm de diámetro suministrados por Millipore), y se añadieron al resto de la solución de trazas.

Como medios de conservación y cultivo para las células competentes se utilizaron, el medio LB, mencionado anteriormente, y el medio SOC (Sambrook *et al.*, 1982), cuya composición es la siguiente:

SOC:

Bactriptona.....	2 % (p/v)
Extracto de levadura	0,5 % (p/v)
NaCl.....	0,6 g
KCl.....	0,19 g
MgCl ₂	0,95 g
MgSO ₄	1,2 g
Glucosa	3,6 g
H ₂ O.....	hasta 1 l

Cuando al medio de cultivo se añadió algún antibiótico, éste se esterilizó por filtración y se añadió a los medios de cultivo una vez enfriados éstos hasta 55°C. Las concentraciones de antibióticos utilizadas y los disolventes empleados se especifican en la Tabla 6.

Tabla 6. Antibióticos empleados en este trabajo.

Antibiótico	Solución madre (mg/ml)	Concentración final ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Disolvente
Ampicilina (Ap)	100	100	H ₂ O
Gentamicina (Gm)	10	10	H ₂ O
Rifampicina (Rf)	40	40	DMSO
Tetraciclina (Tet)	12	12	H ₂ O

2.1.1.1 Cultivos mixtos.

Para los cultivos mixtos, se inocularon simultáneamente volúmenes iguales (normalmente en una relación 1:1000 inóculo: medio de cultivo) de dos cepas previamente crecidas en medio líquido hasta la fase estacionaria de crecimiento. El crecimiento del

cultivo mixto se siguió espectrofotométricamente como si se tratara de un cultivo normal, pero para distinguir la evolución de cada cepa, se realizaron diluciones seriadas que se extendieron en placas de Petri y se determinaron las unidades formadoras de colonias (CFU), como se indica más adelante. *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se distinguió del resto de cepas por su resistencia a rifampicina, *M. kitamiense* por el color naranja de sus colonias, y el resto por diferencia.

2.1.2 Medios sólidos.

Los cultivos en medio sólido se realizaron con el medio de crecimiento correspondiente suplementado con Bacto Agar al 1,5 % (p/v). Los antibióticos se añadieron después de su esterilización y antes de que el medio se solidificara. Cuando fue necesario, se añadieron los reactivos 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) a una concentración de 0,2 mM e isopropil-1-tio- β -galactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0,5 mM.

2.1.2.1 Medios sólidos en gradiente de concentración de sustrato.

Para estudiar la capacidad de *P. pseudoalcaligenes* de utilizar algunos compuestos como fuentes de carbono o de nitrógeno, se realizaron ensayos en placas en gradiente de concentración. Las placas con medio M9 se prepararon con un 7 % (p/v) de agar, consiguiendo así un punto de fusión entre los 35 y los 40 °C que permite asegurar la viabilidad del inóculo al añadirlo (por lo general, una dilución 1:1000 de un cultivo en fase estacionaria). Los medios contenían, además de las trazas y resto de componentes del medio mínimo, 4 g/l de DL-malato o 5 mM de cloruro amónico para estudiar nuevas fuentes de nitrógeno o de carbono, respectivamente. Una vez inoculadas las placas y solidificado el medio, se añadieron pequeños cristales (compuesto sólido) o un pequeño volumen (10 μ l compuesto líquido) del compuesto a estudiar en un extremo de la placa. De esta forma se genera un gradiente de concentración a partir del punto donde se añade el compuesto. Como la placa se encuentra homogéneamente inoculada con la bacteria, en los casos de crecimiento positivo es posible observar un halo de crecimiento a partir de una determinada distancia del punto de aplicación de la muestra tras varios días de incubación a 30 °C. La distancia e intensidad del halo dependerán de la solubilidad del compuesto en el medio y de su toxicidad. Como controles positivos de fuentes de carbono y de nitrógeno utilizables por la bacteria se utilizaron acetato sódico y cloruro amónico, respectivamente.

2.1.2.2 Medio CAS.

Como medio para la detección de sideróforos se utilizó el medio CAS (Alexander y Zuberer, 1991). Éste contenía, por litro, 4 soluciones que se prepararon y esterilizaron por separado. El material de vidrio utilizado para el almacenaje de las soluciones se lavó con HCl 3 M para eliminar las posibles interferencias de Fe (III). El medio se preparó adicionando cada una de las soluciones en el orden en que se muestra, con agitación constante y en condiciones de esterilidad. La composición de cada una de ellas se detalla a continuación:

(1) Solución tampón.

KH ₂ PO ₄	0,3 g
NaCl.....	0,5 g
NH ₄ Cl.....	1 g
PIPES.....	30,24 g
KOH.....	12 g
Ágar	15 g
H ₂ O.....	hasta 0,8 l

(2) Solución de oligoelementos. Esta solución está constituida por 7 ml de la solución D y 63 ml de la solución E.

Solución D:

MnSO ₄ · H ₂ O.....	11,7 mg
H ₃ BO ₃	14 mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O.....	0,4 mg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O.....	12 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O.....	10 mg
H ₂ O.....	hasta 0,07 l

Solución E:

Glucosa	2 g
Manitol	2 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,49 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	14,57 mg
H ₂ O.....	hasta 0,063 l

(3) Solución de casamino ácidos.

Casamino ácidos.....	3 g
H ₂ O.....	hasta 0,03 l

(4) Solución indicadora de Fe-CAS. Esta solución contiene tres soluciones que se adicionaron en el orden en que se muestra:

Solución A:

FeCl ₃ · 6 H ₂ O	2,79 mg
HCl (37 %).....	8,3 µl
H ₂ O.....	hasta 0,01 l

Solución B:

Cromo azurol S (CAS)	60,5 mg
H ₂ O.....	hasta 0,05 l

Solución C:

HDTMA	72,8 mg
H ₂ O.....	hasta 0,04 l

2.1.2.3 Unidades formadoras de colonias (CFU).

Para determinar las unidades formadoras de colonias de un cultivo se realizaron diluciones seriadas de éste y se inoculó 0,1 ml de cada una en medio sólido LB, con o sin antibiótico de selección.

Las unidades formadoras de colonias por ml se determinaron a partir de la siguiente ecuación.

$$CFU/ml = \frac{n^{\circ} \text{ de colonias por placa} \cdot \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen (ml) de la muestra sembrada}}$$

2.2 Condiciones de cultivo.

Las células de *P. pseudoalcaligenes* y *M. testaceum* se incubaron a 30 °C, las de *Acromobacter sp*, *A. piechaudii*, *M. kitamiense*, *A. xylosoxidans* se incubaron a 35 °C y las células de *E. coli* se incubaron a 37°C en un agitador orbital (Infors) a 200 rpm. El crecimiento de las bacterias en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm (D.O. _{600 nm})

empleando un espectrofotómetro Helyos β (Termo Spectronics). La velocidad específica de crecimiento (μ , expresado en h^{-1}) durante la fase exponencial de crecimiento se calculó linearizando la fórmula $X=X_0e^{\mu t}$, siendo X la densidad óptica y considerando por tanto que en estas condiciones el número de células es proporcional a la densidad óptica. En todos los casos se obtuvieron correlaciones mayores a 0,95.

2.3 Pureza y conservación de los cultivos.

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

Durante periodos inferiores a un mes las cepas se conservaron a 4 °C en placas de LB suplementadas con el antibiótico de selección. Para la conservación a largo plazo, las bacterias se congelaron en el medio de cultivo correspondiente con glicerol al 20 % (v/v) y se mantuvieron a -80 °C.

3. Determinaciones analíticas.

Los datos derivados de estos métodos fueron obtenidos interpolando los valores experimentales con rectas de calibrado, previamente realizadas, con patrones de concentración conocida.

3.1 Determinación de la concentración de amonio.

La concentración de amonio se determinó espectrofotométricamente mediante el método de Nessler (Morrison, 1971). En esta reacción el amonio reacciona con el ioduro de mercurio y el ioduro potásico del reactivo A de Nessler, en el ambiente básico proporcionado por hidróxido sódico del reactivo B. El color resultante puede variar entre el amarillo, característico de bajas concentraciones de nitrógeno amoniacal (0,4 a 5 mg/l), y el pardo rojizo que indica niveles cercanos a los 500 mg/l.

El protocolo consistió en la adición de 0,020 ml de mezcla a partes iguales de reactivo de Nessler A y B (Panreac) a 0,980 ml de la muestra problema. La absorbancia a 420 nm se interpoló en una recta patrón obtenida con NH_4Cl .

Esta determinación fue utilizada fundamentalmente para monitorizar el consumo de amonio en los cultivos.

3.2 Determinación de la concentración de cianuro.

La concentración de cianuro se determinó colorimétricamente adaptando el método descrito por Luque *et al.* (Luque-Almagro *et al.*, 2005). El cianuro libre reacciona con Cloramina-T a pH 8,0 originando cloruro de cianógeno, el cual al reaccionar con piridina se transforma en ácido glutacónico. Este último a su vez, en presencia de ácido barbitúrico genera un compuesto coloreado susceptible de determinación colorimétrica a 578 nm.

En el protocolo utilizado, a 1 ml de muestra convenientemente diluida (para una concentración inicial de 2 mM es necesario diluir unas 250 veces), se le añadió 0,040 ml de cloramina T al 1 % (p/v) y después de agitar la mezcla se incubó durante 1 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadieron 0,120 ml de reactivo B, compuesto por 3 g de ácido barbitúrico, 15 ml de piridina, 3 ml de HCl y agua hasta 50 ml. Transcurridos 10 min se midió la absorbancia a 578 nm, interpolando el valor obtenido en una recta patrón realizada con KCN.

Esta determinación se utilizó para seguir el consumo de cianuro en los cultivos.

3.3 Determinación de la concentración de glucosa.

La concentración de glucosa se determinó colorimétricamente mediante un sistema comercial enzimático con glucosa oxidasa/peroxidasa (BioSystems, Reagents & Instruments). La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa presente en la muestra para dar ácido glucónico y H₂O₂. El H₂O₂ generado reacciona con la aminoantipirina y el fenol, en una reacción catalizada por la peroxidasa, para dar quinonaimina y H₂O. La quinonaimina es un compuesto coloreado susceptible de determinación colorimétrica a 500 nm.

En el protocolo seguido, a 10 µl de muestra se añadió 1 ml de reactivo y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia a 500 nm interpolando el valor obtenido en una recta patrón realizada con glucosa.

3.4 Determinación de la concentración de proteínas.

Para medir la concentración de proteínas totales se utilizaron los siguientes métodos, dependiendo de la muestra.

3.4.1 Método de Bradford.

La concentración de proteínas en extractos acelulares se determinó mediante el método de Bradford, basado en la reacción de las mismas con el azul Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford, 1976). Este colorante se une a las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas cambiando su máximo de absorción desde 465 nm hasta 595 nm. No es adecuado usar este método para la determinación de proteínas de membrana ni en presencia de detergentes, puesto que se producen grandes interferencias.

Para la determinación de la concentración de proteínas mediante este método, a 1 ml del colorante comercial (Bio-Rad) diluido 5 veces con agua se añadieron 0,020 ml de muestra convenientemente diluida. Transcurridos 5 min a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia de la muestra a 595 nm. El valor obtenido se interpoló en una recta obtenida utilizando como patrón una solución de seroalbúmina bovina (BSA, Bio-Rad).

3.4.2 Método de Lowry.

Este método se empleó para determinar la concentración de proteínas en células enteras procedentes directamente de los cultivos. Los iones cobre (añadidos como tartato) en medios alcalinos forman complejos con las proteínas favoreciendo su desnaturalización. Esto expone los residuos de tirosina cuyos grupos fenólicos reducen, en una reacción catalizada por el propio cobre a pH básico, el reactivo de Folin que se añade posteriormente. El proceso de reducción del Folin hace que su principal componente, el ácido fosfomolibdotúngstico, vire de un color amarillo a un azul intenso (Lowry *et al.*, 1951).

A 200 ml de muestra diluida se añadió 1 ml de solución de trabajo. La solución de trabajo se compone de 10 ml de agua destilada, 10 ml de una disolución de Na_2CO_3 (carbonato sódico) al 5% (p/v) e NaOH (hidróxido sódico) al 0,8% (p/v), 100 μl de una disolución de tartrato de sodio potasio al 4% y 100 μl de una disolución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 2% (p/v). La mezcla se agitó y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras los que se añadieron 100 μl de reactivo de Folin diluido al 50% con agua destilada. Tras agitar vigorosamente se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se midió la

absorbancia a 750 nm. Los datos obtenidos se interpolaron en una recta patrón construida con seroalbúmina bovina (BSA, Bio-Rad).

3.5 Determinación de actividades enzimáticas.

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1 μmol de sustrato, o la aparición de 1 μmol de producto, por minuto. Las actividades enzimáticas de la ruta de degradación de furfurales se ensayaron de acuerdo con protocolos previamente descritos (Koopman *et al.*, 2010a), optimizados en cuanto a temperatura y pH para las actividades enzimáticas de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

3.5.1 Actividad alcohol furfurílico deshidrogenasa.

La determinación de la actividad alcohol furfurílico deshidrogenasa (EC 1.1.1.--) se llevó a cabo espectrofotométricamente, a 65 °C, midiendo el incremento de absorbancia a 340 nm debido a la producción de NADH ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 50 μmoles de tampón fosfato/carbonato/Tris pH 9,5; 1,5 μmoles de NAD^+ y la cantidad adecuada de extracto acelular. La reacción se inició por la adición de 5 μmoles de alcohol furfurílico.

3.5.2 Actividad furfural deshidrogenasa.

La actividad furfural deshidrogenasa (aldehído oxidasa EC 1.2.3.1) se determinó espectrofotométricamente a 65 °C por el aumento de la absorbancia a 522 nm debido a la reducción del DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol), un aceptor artificial de electrones, por parte del furfural.

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 50 μmoles de tampón fosfato/carbonato/Tris pH 6,5; 0,33 μmoles de PMS (metosulfato de fenacina), 0,1 μmoles de DCPIP y la cantidad adecuada de extracto acelular. La reacción se inició por la adición de 5 μmoles de furfural.

3.5.3 Actividad furoil-CoA sintetasa.

La actividad furoil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.31) se cuantificó determinando la disminución de la absorbancia a 340 nm mediante un ensayo acoplado con la piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 100 μmoles de tampón glicilglicina pH 7,8; 2 μmoles de CoA, 2 μmoles de ATP, 1

μ moles de fosfoenolpiruvato, 0,3 μ moles de NADH, 0,003 μ moles de $MgCl_2$, 10 U de piruvato quinasa, 10 U de lactato deshidrogenasa y la cantidad adecuada de extracto acelular. La reacción se inició por la adición de 5 μ moles de ácido furoico.

3.5.4 Actividad furoil-CoA deshidrogenasa.

La actividad furoil-CoA deshidrogenasa (EC 1.3.99.8) se determinó espectrofotométricamente, mediante un ensayo acoplado, por el aumento de la absorbancia a 535 nm debido a la reducción de NBT (Nitro Blue Tetrazolium), un aceptor artificial de electrones. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml; 100 μ moles de tampón glicilglicina pH 7,8, 2 μ moles de CoA, 2 μ moles de ATP, 0,003 μ moles de $MgCl_2$, 1 % de Tritón X-100, 0,15 % NBT y la cantidad adecuada de extracto. La reacción se inició por la adición de 5 μ moles de ácido furoico.

4. Obtención de extractos acelulares.

4.1 Recolección de células.

Las células de *P. pseudoalcaligenes* (500 ml de cultivo) se recogieron por centrifugación durante 15 min a 10.000 rpm (9.632 rcf) en una centrifuga Avanti J-25 (Rotor J-A-14) a 4 °C y se homogeneizaron en tampón Tris/HCl 50 mM pH 8,0. Este proceso se repitió en varias ocasiones para eliminar los restos de medio de cultivo. Finalmente, las células se disgregaron en 3,5 ml de tampón Tris/HCl 50 mM pH 8,0, 2 mM de DTT, inhibidor de proteasas (Roche) y 10 % de glicerol. En algunos casos las células se conservaron a -20 °C hasta su uso.

4.2 Preparación de extractos acelulares.

Las células de *P. pseudoalcaligenes* se rompieron por diferencia de presión mediante la prensa de French a una presión aproximada de 68 atm (mini-cell de Thermo Sprectronis). Los extractos se centrifugaron durante 15 min a 10.000 rpm (12.857 rcf) en una centrifuga Eppendorf 5810 (Rotor F-34-6-38) a 4 °C para eliminar los restos celulares y las células enteras. El sobrenadante resultante se ultracentrifugó a 41.000 rpm (70.131 rcf) en una ultracentrifuga Beckman Coulter (Rotor TLA-110) durante 1 hora a 4 °C. El sobrenadante

de este último paso constituyó el extracto libre de células utilizado en los ensayos enzimáticos.

5. Caracterización de las enzimas.

5.1 Temperatura óptima de las enzimas.

La temperatura óptima de cada enzima se determinó realizando el ensayo en un espectrofotómetro termostático a diferentes temperaturas (30 °C - 70 °C). Para ello, previamente, la temperatura de todos los reactivos se equilibró a la temperatura de ensayo.

5.2 pH óptimo de las enzimas.

El pH óptimo se determinó realizando el ensayo de la actividad enzimática a distintos pHs [6, 10] empleando para ello diferentes tampones: fosfato sódico (pH [6, 7]), Tris-HCl (pH [7, 9]) y carbonato sódico (pH [9, 10]). En todos los casos el tampón se empleó a una concentración de 50 mM.

6. Técnicas cromatográficas.

6.1 Separación de las enzimas furfural alcohol deshidrogenasa y furfural deshidrogenasa.

La cromatografía de intercambio iónico se empleó para intentar separar las enzimas implicadas en la ruta de asimilación de furfurales en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, y más concretamente la furfural alcohol deshidrogenasa y la furfural deshidrogenasa. Para ello se utilizó una columna de intercambio aniónico (Mono Q 5/50 GL de GE Healthcare) instalada en un sistema de cromatografía líquida rápida para proteínas (Äkta purifier, GE Healthcare). El flujo utilizado fue de 1 ml/min recogiendo fracciones de 0,5 ml.

La columna se equilibró con tampón A (Tris/HCl 50 mM pH 8,0, 2 mM de DTT y 2 % de glicerol). Una vez cargada la muestra (2 ml), la columna se lavó con el mismo tampón (12,5 ml) para eliminar las proteínas no unidas. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con un gradiente de NaCl en tampón A, mediante el siguiente programa: se aplicó un gradiente de 0 a 0,1 M de NaCl en 1 min, se mantuvo a 0,1 M

durante 5 min, se aplicó un gradiente de 0,1 a 0,5 M de NaCl durante 20 min, y se aumentó después la concentración de NaCl de 0,5 a 1M durante 10 min. Finalmente la columna se lavó con 5 ml tampón conteniendo NaCl 2 M y se re-equilibró con 10 ml del tampón de partida, quedando preparada para una nueva cromatografía.

En todas las fracciones se determinaron las actividades enzimáticas y la concentración de proteínas (absorbancia a 280 nm). Se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford sólo en aquellas fracciones que presentaron actividad enzimática.

6.2 Determinación de metabolitos.

Los intermediarios metabólicos presentes en los sobrenadantes de los cultivos bacterianos se determinaron mediante un equipo de cromatografía líquida rápida de alta resolución (HPLC) System Gold (Beckman). Como fase móvil se empleó H₂SO₄ 5 mN a un caudal constante de 0,6 ml·min⁻¹, equipado con una columna ION-300 (ICE-99-9850) de 300 x 7,8 mm (Transgenomic) a 65° C. La detección se realizó a λ=210 nm (determinación de citrato, succinato, piruvato, fumarato, malato y octanoato), a λ=278 nm (determinación de furfural, ácido furoico, HMF y FDCA) y a λ=217 nm (alcohol furfurílico).

7. Técnicas de biología molecular.

7.1 Plásmidos.

Los plásmidos empleados en este trabajo y sus características más relevantes se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pGEM-T Easy	Vector de clonación de productos de PCR, Apr, oriColE1, lacZ α . Vector de clonación suicida en <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.	Promega
pGEM-TE <i>benE</i> _{173/528}	Vector pGEM-T Easy que contiene un fragmento interno del gen <i>benE</i> . Apr	Este trabajo

Tabla 7. (Continuación)

pGEM-TE <i>benE1</i> _{770/1139}	Vector pGEM-T Easy que contiene un fragmento interno del gen <i>benE1</i> . Ap ^r	Este trabajo
pGEM-TE <i>benE1</i> _{73/528-770/1139}	Vector pGEM-T Easy que contiene dos fragmentos internos del gen <i>benE1</i> . Ap ^r	Este trabajo
pGEM-TE <i>benE1 aacC1</i>	Vector pGEM-T Easy que contiene un fragmento interno del gen <i>benE1</i> interrumpido por el gen <i>aacC1</i> . Ap ^r Gm ^r	Este trabajo
pGEM-TE <i>edd</i> _{9/730}	Vector pGEM-T Easy que contiene un fragmento interno del gen <i>edd</i> . Ap ^r	Este trabajo
pGEM-TE <i>edd</i> _{1140/1737}	Vector pGEM-T Easy que contiene un fragmento interno del gen <i>edd</i> . Ap ^r	Este trabajo
pGEM-TE <i>edd</i> _{9/730-1140/1737}	Vector pGEM-T Easy que contiene dos fragmentos internos del gen <i>edd</i> . Ap ^r	Este trabajo
pGEM-TE <i>edd aacC1</i>	Vector pGEM-T Easy que contiene un fragmento interno del gen <i>edd</i> interrumpido por el gen <i>aacC1</i> . Ap ^r Gm ^r	Este trabajo
pGEM-TE <i>liuA</i> _{43/464}	Vector pGEM-T Easy que contiene un fragmento interno del gen <i>liuA</i> . Ap ^r	Este trabajo
pGEM-TE <i>liuA</i> _{514/1040}	Vector pGEM-T Easy que contiene un fragmento interno del gen <i>liuA</i> . Ap ^r	Este trabajo
pGEM-TE <i>liuA</i> _{43/464-514/1040}	Vector pGEM-T Easy que contiene dos fragmentos internos del gen <i>liuA</i> . Ap ^r	Este trabajo
pGEM-TE <i>liuA aacC1</i>	Vector pGEM-T Easy que contiene un fragmento interno del gen <i>liuA</i> interrumpido por el gen <i>aacC1</i> . Ap ^r Gm ^r	Este trabajo
pMS255	Vector pMS255 que contiene el gen <i>aacC1</i> . Ap ^r Gm ^r	(Becker <i>et al.</i> , 1995)

7.2 Extracción de DNA.

7.2.1 Extracción y purificación de DNA genómico.

Para purificar el DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* se utilizó el sistema comercial de extracción de DNA genómico *GNOME* (QBIOgene[®]). Siguiendo el

protocolo suministrado por el fabricante se obtuvo de una forma rápida y muy eficiente un DNA de calidad y en cantidad suficiente para trabajos posteriores (10 µg/ml de cultivo (D.O. $_{600\text{ nm}} \approx 0,7$)). Por último, el DNA se separó tras precipitación etanólica mediante centrifugación al formar un ovillo.

7.2.2 Extracción y purificación de DNA plasmídico.

La extracción de DNA plasmídico se llevó a cabo empleando el sistema *Plasmid DNA Purification Kit* (Intron Biotechnology), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

7.3 Digestión del DNA con enzimas de restricción.

Las reacciones de digestión del DNA con las endonucleasas de restricción contenían hasta 1,0 µg de DNA, 2 µl de tampón de restricción (10x) y la cantidad de enzima de restricción (FastDigest) correspondiente según el fabricante, en un volumen final de 20 µl completados con H₂O miliQ estéril. Las condiciones utilizadas fueron las recomendadas por la casa comercial (Fermentas) para cada una de las diferentes enzimas. Al final del proceso las enzimas se inactivaron calentando la muestra a 80 °C durante 5 minutos.

7.4 Ligación del DNA.

Para la ligación de moléculas de DNA en plásmidos, 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 1 U de DNA-ligasa del fago T4 (Promega), el tampón de ligación suministrado por la casa comercial y las concentraciones adecuadas de DNA en un volumen final de 10 µl completado con H₂O miliQ estéril. Las ligaciones con los fragmentos cohesivos se realizaron a 14 °C durante 16-24 horas. La relación molar inserto/plásmido se varió según el tamaño de éstos, considerando que las condiciones ideales son 50 ng de vector y una relación molar de inserto/vector de entre 1-3 veces para las ligaciones con extremos cohesivos (Sambrook *et al.*, 1982).

Para calcular las concentraciones de vector e inserto en la mezcla de ligación se utilizó la siguiente fórmula:

$$ng\ inserto = \frac{ng\ vector \cdot tamaño\ inserto\ (kb)}{tamaño\ vector\ (kb)} \cdot relación\ molar\ inserto/vector$$

7.5 Electroforesis de DNA en gel de agarosa.

La electroforesis de DNA se llevó a cabo utilizando geles de agarosa (0,8 % p/v) preparados en tampón TBE (Tris base 20 mM, ácido bórico 5 mM y EDTA 0,5 mM, pH 7,8) (Sambrook *et al.*, 1982). Por cada 100 ml de gel se añadieron 10 µl de solución gel RED (Biotium) para visualizar el DNA por fluorescencia al iluminarlo con luz UV.

A cada 5 µl de muestra de DNA se añadió 1 µl de tampón de carga compuesto por 2 colorantes [azul de bromofenol al 0,25 % (p/v) y Xilen- cianol 0,25 % (p/v)] y glicerol al 50 % (v/v). La mezcla se depositó en un pocillo del gel, sumergido en una cubeta con tampón TBE. La electroforesis se llevó a cabo en las cubetas horizontales *Sub-Cell GT MINI* y *Sub-Cell GT WIDE MINI* (BioRad), con un voltaje constante entre 50 y 70 V durante el tiempo necesario para separar suficientemente los fragmentos de DNA de interés. Como marcadores de tamaño de los fragmentos se utilizaron, según los casos:

- DNA del bacteriófago λ digerido con HindIII (Roche) (fragmentos de 23.139, 9.416, 6.557, 23.22, 2.027, 564 y 125 pb).
- 1kb DNA Ladder (Invitrogen) (fragmentos desde 12 kb hasta 2 kb y después de 1600, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200 y 100 pb).
- 100bp DNA Ladder (Invitrogen) (un primer fragmento de 2.072 pb seguido por otro de 1.500, a partir de donde disminuía 100 pb).

7.6 Cuantificación del DNA.

De manera rutinaria, la concentración de DNA se estimó visualmente en geles de agarosa teñidos con gel RED (Biotium) mediante análisis comparativo con una muestra patrón de concentración conocida.

En caso de disponer de preparaciones de DNA de elevada pureza, su concentración se cuantificó midiendo la absorbancia de las muestras diluidas en H₂O miliQ estéril a 260 y 280 nm. La pureza del DNA se estimó por la relación entre la absorbancia a esas dos longitudes de onda, considerando que relaciones A_{260}/A_{280} menores a 1,5 indican una elevada cantidad de proteínas; entre 1,5 y 1,8 el DNA es de buena calidad; y mayores a 1,8 son indicativas de contaminación por RNA. Para valorar la concentración de DNA de

doble cadena se consideró un coeficiente de extinción a 260 nm de 0,02 ml/(μ g.cm) (Cárdenas y Pineda, 1988).

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

Para la recuperación de fragmentos de DNA de geles de agarosa se utilizó el sistema comercial de *Speedtools PCR Clean Up Kit* (Biotools), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.8. Transformación de las bacterias por electroporación.

7.8.1 Preparación de células electrocompetentes con sacarosa.

Se inocularon 500 ml de medio LB con un preinóculo de *E. coli* (XL1 blue MRF) o *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D ($A_{600\text{ nm}}$ de partida = 0,1) y se incubaron a 37 °C ó 30 °C, respectivamente, en incubador orbital con fuerte agitación (aprox. 200 rpm). Cuando las células alcanzaron una $A_{600\text{ nm}}$ próxima a 0,4, se centrifugaron a 10000 rpm (9.632 rcf) (centrifuga Avanti J-25, rotor JA-14) durante 5 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y el sedimento de células se homogenizó en 500 ml de sacarosa 0,3 M, enfriada previamente en hielo; posteriormente las células se centrifugaron durante 5 minutos en las mismas condiciones y este paso se repitió una segunda vez para eliminar los restos de medio de cultivo. Se volvió a lavar el sedimento celular con 50 ml de sacarosa 0,3 M, fría (4 °C). Tras una nueva centrifugación, la masa de células resultante se disgregó en 2,5 ml de sacarosa 0,3 M, manteniendo las células y los reactivos en hielo. La suspensión resultante se dividió en cantidades alícuotas de 50 μ l que se conservaron a -80 °C.

7.8.2 Transformaciones de células electrocompetentes.

Las células electrocompetentes de *E. coli* (XL1 blue MRF) y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D obtenidas como se indica en el apartado anterior, fueron descongeladas en hielo y modificadas genéticamente por transformación mediante electroporación en cubetas de electroporación de 0,2 cm (BioRad) frías empleando un equipo Micropulser (Bio-Rad). El programa utilizado (EC2) aplica un voltaje de 2,5 kV. La constante temporal tras el pulso ha de registrarse entre 4 y 5 ms con una intensidad de campo eléctrico de 12,5 kV/cm. A 50 μ l de suspensión de células electrocompetentes se añadieron entre 10 pg y 5 ng del DNA a introducir en la bacteria. Tras el pulso eléctrico se añadieron 950 μ l de medio LB a temperatura ambiente, las células se transfirieron a un tubo y se incubaron en

agitación a 37 °C durante 1 h para el caso de las células de *E. coli* y a 30 °C de 2 a 3 h para las células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D. Finalmente, en función de la eficiencia, volúmenes variables del cultivo se repartieron homogéneamente en la superficie de placas de Petri con LB-agar y el antibiótico de selección correspondiente.

7.8.3 Selección de las colonias recombinantes.

En algunos casos para diferenciar las colonias de *E. coli* transformantes que han incorporado el plásmido recombinante de aquellas que han incorporado el plásmido sin inserto, se usó el método de la complementación del fragmento *a* de la β -galactosidasa. Este método requiere que el vector usado contenga el sitio de clonación dentro de la región codificante del fragmento *a* (pGem-T Easy) y que la bacteria huésped exprese el otro fragmento de la β -galactosidasa necesario para la complementación (lacZDM15; presente normalmente en el profago f80 o en F'). En los plásmidos recombinantes, la incorporación del inserto inactiva el fragmento *a* de forma que las bacterias que contienen estos plásmidos carecen de actividad β -galactosidasa, originando colonias blancas en un medio de cultivo que contiene el sustrato incoloro X-gal. Las colonias recombinantes se seleccionaron mediante su crecimiento en placas con medio LBA (LB + antibiótico), IPTG y X-Gal con las concentraciones expuestas anteriormente. Las placas se incubaron a 37 °C el tiempo necesario hasta la aparición de colonias recombinantes (color blanco).

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

Las secuencias de los distintos oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de PCR se diseñaron con la ayuda del programa OLIGO6 y su síntesis fue encargada a una casa comercial (Integrated DNA Technologies, IDT). En la Tabla 8, se muestran las secuencias de los cebadores empleados en la amplificación de cada uno los fragmentos empleados en este trabajo.

Tabla 8. Oligonucleótidos para PCR empleados en este trabajo.

Nombre	Secuencia 5´-3´	Descripción
benE ₁₇₃ U	GCAATCAACCTCAAGTCGGTC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>benE1</i> .
benE ₁₅₂₈ L	CGCAGGATCCGGAAGTAGGT	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>benE1</i> . BamHI.
benE ₁₇₇₀ U	CTACAAGGATCCGGTCAATGC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>benE1</i> . BamHI.
benE ₁₁₃₉ L	TACCGAACAGGCTGAACTTGC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>benE1</i> .
edd ₉ U	CCGCGTTGTTGAAGTGACCGA	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>edd</i> .
edd ₇₃₀ L	GCCCGGATCCATGAAGGAAGC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>edd</i> para su mutagénesis. BamHI.
edd ₁₁₄₀ U	CTACACCCGGGATCCCTTCCT	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>edd</i> . BamHI.
edd ₁₇₃₇ L	CGCATGAAGGCGAACAACCTCG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>edd</i> .
liuA ₄₃ U	GACATGCTGGCGGACTCGGTC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>liuA</i> .
liuA ₄₆₄ L	TCCGGATCCGTGGCCGTTGA	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>liuA</i> . BamHI.
liuA ₅₁₄ U	GGGATCCACGCCAAGACCGAC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>liuA</i> . BamHI.
liuA ₁₀₄₀ L	CCGGGTATTCATTGGTGTAGC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>liuA</i> .
aacC1U	ATGTTGTGTGGAATTGTGAGC GGATAAC	Amplificación del gen <i>aacC1</i> para la generación de los mutantes EDD1, BENE1.1 y LIUA1.
aacC1L	GTGCTGCAAGGCGATTAAGTT GGGTAAC	Amplificación del gen <i>aacC1</i> para la generación de los mutantes EDD1, BENE1.1 y LIUA1.

Aparece subrayada la secuencia diana de las distintas enzimas de restricción

Como molde se utilizó DNA genómico y para minimizar la introducción de posibles mutaciones se usó el kit comercial *KOD Hot Start Master Mix DNA Polymerase* (Novagen). Para ello, en cada reacción de PCR se incluyó el DNA a amplificar (5 ng de DNA genómico/plasmídico), los cebadores correspondientes (0,3 μ M) y el tampón, los desoxinucleótidos y la DNA-polimerasa proporcionados en el kit (10 μ l, 0,4 U de KOD Polimerasa), en un volumen final de 20 μ l.

Los productos amplificados se purificaron con el sistema *Speedtools PCR Clean Up Kit* (Biotools).

7.9.1 Amplificación de fragmentos del gen *benE1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

Se utilizaron las parejas de oligonucleótidos benE1₇₃U/benE1₅₂₈L y benE1₇₇₀U/benE1₁₁₃₉L como cebadores en las reacciones de PCR, en las que se usó como molde la cantidad óptima de DNA genómico (100 ng). Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron: 2 min a 96 °C, seguidos de 30 ciclos de 30 s a 94° C, 10 s a 63,4 °C y 10 s a 70 °C.

Los tamaños esperados de las amplificaciones con los oligonucleótidos benE1₇₃U/benE1₅₂₈L y benE1₇₇₀U/benE1₁₁₃₉L fueron de 476 pb y 390 pb, respectivamente.

7.9.2 Amplificación de fragmentos del gen *edd* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

Se utilizaron las parejas de oligonucleótidos edd₉U/edd₇₃₀L y edd₁₁₄₀U/edd₁₇₃₇L como cebadores en las reacciones de PCR, en las que se usó como molde la cantidad óptima de DNA genómico (100 ng). Las condiciones empleadas en la reacción de amplificación fueron: 2 min a 96 °C, seguidos de 30 ciclos de 20 s a 94° C, 10 s a 65,6 °C y 15 s a 70 °C.

Los tamaños esperados de las amplificaciones con los oligonucleótidos edd₉U/edd₇₃₀L y edd₁₁₄₀U/edd₁₇₃₇L fueron de 742 pb y 618 pb, respectivamente.

7.9.3 Amplificación de fragmentos del gen *liuA* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

Se utilizaron las parejas de oligonucleótidos liuA₄₃U/liuA₄₆₄L y liuA₅₁₄U/liuA₁₀₄₀L como cebadores en las reacciones de PCR, en las que se usó como molde la cantidad

óptima de DNA genómico (100 ng). Las condiciones empleadas fueron: 2 min a 96 °C, seguidos de 30 ciclos de 20 s a 94° C, 10 s a 65,6 °C y 15 s a 70 °C.

Los tamaños esperados de las amplificaciones con los oligonucleótidos *liuA*₄₃U/*liuA*₄₆₄L y *liuA*₅₁₄U/*liuA*₁₀₄₀L fueron de 442 pb y 547 pb, respectivamente.

7.9.4 Diseño de la técnica de PCR para amplificar el gen *aacC1*.

Para amplificar el gen *aacC1* que confiere resistencia a gentamicina se usaron los oligonucleótidos *aacC1*U y *aacC1*L con las siguientes condiciones de PCR: 3 min a 94 °C, seguidos por 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 2 min a 68 °C; y una extensión final de 10 min a 68 °C. Como DNA molde se utilizó el plásmido PMS255 (10 ng) que contiene el gen *aacC1*. El tamaño de este fragmento fue de 939 pb.

7.10 Disrupción insercional de genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

Para la construcción de las cepas mutantes BENE1.1, EDD1 y LIUA1 (Tabla 5), se procedió a la disrupción insercional, por doble recombinación homóloga, de los genes *benE1*, *edd* y *liuA* respectivamente. Para ello, se amplificaron fragmentos internos de cada uno de los genes citados, y se clonaron en el lugar de clonación múltiple de pGEM-T Easy, un plásmido que se replica en *E. coli* XL1 *blue* MRF⁺ pero no en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D. Posteriormente, se amplificó y aisló el gen que confiere resistencia a gentamicina (*aacC1*) a partir del vector pMS255. El gen *aacC1* se insertó entre los fragmentos génicos de *benE1*, *edd* y *liuA* resultando los plásmidos pGEM-TE *benE1 aacC1*, pGEM-TE *edd aacC1* y pGEM-TE *liuA aacC1* (Tabla 7). Las construcciones resultantes se transfirieron a *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D mediante electroporación. Las bacterias transformantes se seleccionaron en medio LB suplementado con gentamicina (10 µg/ml). Los transformantes obtenidos por este método podrían ser una mezcla de recombinación homóloga doble o simple entre el gen nativo y el clonado en el vector suicida. Varias colonias escogidas al azar se crecieron en medio líquido, sin presión selectiva de antibiótico. Una cantidad alícuota de este cultivo se sembró en placa por el método de agotamiento, con el fin de obtener colonias aisladas que se cultivaron en placas con gentamicina como marcador seleccionable y en placas con ampicilina (antibiótico de contraselección). La correcta sustitución de los genes descritos y la ausencia del vector (doble recombinación) se comprobaron mediante amplificación por PCR usando dos oligonucleótidos internos del

fragmento génico correspondiente (benE₁₇₃U/benE₁₁₃₉L, edd₉U/edd₁₇₃₇L y liuA₄₃U/liuA₁₀₄₀L; Tabla 8).

7.11 PCR de colonias.

El análisis rutinario de las colonias transformantes se realizó mediante PCR de colonias. Con el asa de platino se seleccionó una cantidad suficiente de cultivo bacteriano, de colonias escogidas al azar, y se disgregaron en 100 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 8,0), que se incubó a 96 °C durante 5 min en un termo-bloque. Posteriormente, para separar el DNA de los demás fragmentos celulares, se centrifugó a 10000 rpm (10.397 rcf) (Centrífuga Eppendorf 5804 Rotor F-34-6-38) durante 10 min a 4 °C. Por último, el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo para su análisis mediante PCR.

7.12 Secuenciación y anotación del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

El genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se secuenció según lo descrito por Luque *et al.* (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Inicialmente se realizó la predicción de genes y anotación automática del borrador del genoma mediante el sistema de anotación GenDB 2.0 (Meyer *et al.*, 2003) y su enlace con la base de datos KEGG. Posteriormente se llevó a cabo una anotación manual de las secuencias, que permitió una identificación de genes más precisa. Recientemente se ha finalizado el proyecto de secuenciación del genoma mediante la tecnología PacBio (Pacific Biosciences) (Wibberg *et al.*, 2014).

7.13 Análisis transcriptómico.

El transcriptoma es el grupo completo de genes expresados bajo condiciones particulares. Se define como el grupo de moléculas de RNA que están presentes y pueden referirse a un tipo celular único, como es este caso, o a cualquier organización compleja de células, hasta constituir un organismo. Debido a que algunos genes generan múltiples mRNA, es probable que el transcriptoma sea más grande que el número de genes definidos directamente en el genoma, sobre todo en eucariotas. El transcriptoma no incluye sólo el mRNA, sino también los RNA no codificantes (como tRNA, rRNA y microRNA o miRNA).

7.13.1 Extracción y purificación de RNA.

Para purificar el RNA total de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (R1D) se utilizó el sistema comercial de extracción *Aurum Total RNA Mini Kit* (Bio-Rad). Siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante se obtuvo RNA de calidad y en cantidad suficiente para trabajos posteriores (0,3-0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Pureza $\geq 1,7$). Como paso adicional de purificación, el RNA se trató con DNasa proporcionada en el *Kit DNase free (DNase Treatment and Removal de Ambion)*. Por último, se analizó la integridad del RNA por electroforesis en gel de agarosa.

7.13.2 Cuantificación del RNA.

La pureza del RNA se determinó midiendo la relación $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ y su concentración a partir de la absorbancia obtenida a 260 nm. Además se analizó por electroforesis en gel de agarosa para determinar su integridad.

7.13.3 Sustracción del RNA ribosómico (rRNA).

La sustracción del RNA ribosómico de las muestras se realizó con el sistema comercial *MICROB Express Kit* (Ambion). En los casos en que la cantidad de RNA de partida fue inferior a 5 μg , el RNA total se precipitó previamente según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

7.13.4 Electroforesis de mRNA en gel de agarosa-formaldehído.

La electroforesis de mRNA se llevó a cabo en geles de agarosa (1,2 % p/v) preparados en tampón MOPS pH 7,0 a los que se añadió formaldehído a una concentración de 2,5 M.

A cada 5 μl de muestra de mRNA se añadieron 5 μl de tampón de carga compuesto por formamida desionizada al 38 % (v/v), formaldehído a una concentración de 1,4 % (v/v), tampón MOPS pH 7 0,38 mM y solución teñidora al 10 % [BPB al 0,25 % (p/v), EDTA 1 mM y glicerol al 50 % (v/v)]. La mezcla se depositó en un pocillo del gel, sumergido en una cubeta con tampón MOPS pH 7,0. La electroforesis se llevó a cabo en las cubetas horizontales *Sub-Cell GT MINI* y *Sub-Cell GT WIDE MINI* (BioRad), con un voltaje constante de 40 V durante el tiempo necesario para visualizar correctamente todas las bandas. Como marcador de tamaño de los fragmentos de RNA se usó 0,5-10 kb RNA Ladder (Invitrogen).

7.13.5 Tratamiento del mRNA y análisis bioinformático de los datos.

El tratamiento del mRNA y el análisis bioinformático de los datos se llevó a cabo por la empresa Sistemas Genómicos, S. L. (Valencia, España). El protocolo utilizado para analizar las diferencias de expresión de los mRNA presentes en el transcriptoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D se detalla a continuación.

7.13.5.1 Preparación de las muestras.

7.13.5.1.1 Control de calidad.

Se valoró la calidad y cantidad del RNA de tres formas: mediante medida de absorbancia a 260 nm con un NanoDrop 1000, cuantificación por fluorescencia con Qubit, y electroforesis en Agilent 2100 Bioanalyzer.

7.13.5.1.2 Construcción de librerías.

Se obtuvieron librerías de fragmentos compatibles con la plataforma SOLiD a partir del mRNA. Para la obtención de las librerías se aplicaron los protocolos y recomendaciones proporcionados por Life Technologies para la secuenciación en SOLiD v4. La calidad y cantidad de las librerías se valoró mediante su análisis con Qubit y Agilent 2100 Bioanalyzer.

7.13.5.1.3 Obtención de microesferas para secuenciación.

La mezcla equimolar de las librerías se sometió a un proceso de PCR en emulsión para la amplificación clonal de los fragmentos, seguido de un proceso de enriquecimiento y modificación química para permitir la carga en la cámara de reacción. Para la realización de este proceso se siguieron los protocolos y recomendaciones proporcionados por Life Technologies para la secuenciación en SOLiD v4.

7.13.5.1.4 Secuenciación.

La calidad y cantidad de las microesferas obtenidas a partir del pool de las librerías se estimó teniendo en cuenta los parámetros obtenidos del WFA (*workflow analysis*). Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones para la obtención de secuencias de 50 nt + 35 nt (*Paired-End*) en SOLiD v4. La calidad de los datos obtenidos se estimó mediante los parámetros proporcionados por el software SETS (*SOLiD Experimental Tracking System*).

7.13.5.2 Análisis de los datos

Los datos se analizaron a distintos niveles:

- Primario: Control de calidad de las secuencias generadas.
- Secundario: Mapeo de las lecturas, cuantificación e identificación de transcritos.

- Terciario: Comparación entre muestras. Estudios funcionales.

7.13.5.2.1 *Análisis primario. Control de calidad del dato bruto.*

El análisis primario se llevó a cabo utilizando scripts “in house” escritos en Perl, bash y R.

7.13.5.2.2 *Análisis secundario. Mapeo y cuantificación de transcritos.*

Las lecturas generadas se mapearon frente a la última versión del genoma de *P. Pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 presente en la base de datos NCBI [<http://0-www.ncbi.nlm.nih.gov.ilsprod.lib.neu.edu/nuccore/CAIG00000000.1>] (“*National Center of Biotechnology Information*”) utilizando el software Bioscope1.3 [<http://solidsoftwaretools.com>]. Posteriormente se eliminaron las lecturas de una baja calidad en el mapeo mediante Picard Tools [<http://picard.sourceforge.net>]. Una vez seleccionado las lecturas con un valor de calidad elevado se llevó a cabo el ensamblaje, identificación y cuantificación de los transcritos mediante inferencia bayesiana utilizando cufflinks v2.02 (Trapnell *et al.*, 2010).

7.13.5.2.3 *Análisis terciario. Comparación de muestras.*

En el presente experimento no se utilizaron réplicas biológicas, por lo tanto, todos los procedimientos estadísticos en el apartado terciario se adaptaron a dicha circunstancia. Para llevar a cabo el estudio de expresión diferencial entre grupos de muestras se utilizaron diferentes paquetes estadísticos diseñados en Python y R. Se utilizó el paquete HTSeq [<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq>] para obtener el número de lecturas presentes por transcrito (cuantificación asociada directamente con la expresión del transcrito).

Posteriormente, se aplicaron diferentes algoritmos de normalización EDASeq [<http://www.bioconductor.org/packages/2.11/bioc/html/EDASeq.html>] y de expresión diferencial mediante la premisa de una distribución binomial negativa mediante DESeq (Anders y Huber, 2010). Estos términos son los más aceptados actualmente por la comunidad científica para estudios de expresión diferencial mediante RNA-SEQ.

Se consideró transcrito diferencialmente expresado aquel que presenta un valor de FolChange inferior a -2 o superior a 2 y con un valor de pValue menor de de 0,1. Sin embargo, para el caso de genes dentro de un operón, estos márgenes se ampliaron cuando el resto de genes del operón cumplen con la norma general.

7.13.5.2.4 *Análisis terciario. Anotación de los genes diferencialmente expresados.*

Los transcritos identificados fueron anotados mediante diferentes bases de datos. En un primer paso se obtuvo la descripción del transcrito asociado a la base de datos NCBI. En un segundo paso se seleccionaron las “*keywords*” asociadas a cada transcrito presente en la base de datos de proteínas Uniprot [<http://www.uniprot.org/>] para *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Finalmente, los transcritos desconocidos fueron anotados mediante homología de secuencias frente a la base de datos Uniprot y frente a la base de datos Rfam [<http://rfam.sanger.ac.uk/>] para la identificación de posibles “non coding RNAs”.

7.13.5.2.5 *Análisis terciario. Estudio de enriquecimiento funcional.*

Debido a la escasa anotación funcional de los transcritos presentes en el organismo *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, se utilizaron técnicas de Text-mining en texto libre [<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/digest/index.php>] utilizando las descripciones presentes en los transcritos cuyo pValue fueron inferiores a 0,1.

Con esta técnica se pretende dar una orientación general de que funciones se están alterando diferencialmente en las comparaciones.

8. Análisis bioinformático.

Para la identificación de sitios de restricción se empleó el servidor <http://www.restrictionmapper.org/>. La edición de las secuencias en formato PEARSON/FASTA se realizó en el servidor <http://www.bioinformatics.org/sms2/>. Los análisis de secuencias de nucleótidos se realizaron en el servidor <http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast/>. Las búsquedas de similitudes de secuencia de nucleótidos y de aminoácidos se realizaron utilizando el programa BLAST en el servidor del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los entornos génicos de las proteínas ortólogas a las proteínas estudiadas se identificaron en los servidores <http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/CMrHomePage.cgi> y <http://www.pseudomonas.com> (Winsor *et al.*, 2009). Los alineamientos de secuencias de nucleótidos y los alineamientos múltiples de proteínas se realizaron con el programa CLUSTALW (Larkin *et al.*, 2007), en el servidor <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>. La secuencia de nucleótidos del cromosoma circular de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 está disponible en el EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute database*) en el servidor [89](http://0-</p>
</div>
<div data-bbox=)

www.ncbi.nlm.nih.gov/ilsprod.lib.neu.edu/Traces/wgs/?val=caig# (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Los árboles filogenéticos se realizaron con el método *Phylogeny.fr* (Dereeper *et al.*, 2008) en el servidor <http://www.phylogeny.fr/>. El punto isoeléctrico y el tamaño de las proteínas estudiadas se identificaron mediante el sistema de anotación GenDB 2.0 (Meyer *et al.*, 2003).

9. Equipos.

- Balanza analítica marca Cobos.
- Balanza marca Cobos.
- Baño termostatzado marca Selecta.
- Campana de flujo laminar Telstar MH-100 provista de luz ultravioleta.
- Centrífuga de sobremesa minispin plus marca Eppendorf.
- Centrífuga Eppendorf 5810R utilizada con los rotores basculante A-4-62 y de ángulo fijo F34-6-38.
- Centrífuga Eppendorf 5804R que soporta los rotores de ángulo fijo F34-6-38 y F45-30-11.
- Digitalizador de imágenes visible-UV Bio-Rad Chemi Doc provisto del software Quantity One 4.3.1.
- Electroporador Micropulser marca Bio-Rad.
- Equipo de cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC) marca GE Healthcare.
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) marca Beckman.
- Espectrofotómetro Helyos B marca Termo Spectronics.
- Estufas de incubación Selecta Incudigit (empleada a 30°C) y Raypa incuterm (a 37°C).
- Incubadores orbitales Infors Multitron y Multitron II.
- Kit de electroforesis de Mini-PROTEAN 3 Cell marca Bio-Rad.
- pHmetro GLP21 marca Crison.
- Prensa de French SLM-Amino.
- Termobloques Tembloc marca Selecta y Digital Heatblock marca VWR.

- Termociclador Eppendorf Mastercicle.
- Termociclador S1000 Thermal Cyclers marca Bio-Rad.
- Ultracentrifuga Beckman Coulter.
- Vórtex marca Fisher Scientific.

10. Reactivos.

Los reactivos utilizados fueron de la mayor pureza comercialmente disponible en las casas comerciales Bio-Rad, Conda, Fluka, Merk, Panreac, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich, VWR-ProLabo.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 1.

Aislamiento, identificación y caracterización de cepas bacterianas capaces de degradar complejos cianuro-metálicos.

El cianuro y sus derivados están entre los compuestos tóxicos más potentes producidos por la industria en todo el mundo. Se utiliza en la síntesis de muchos compuestos orgánicos, si bien las actividades mineras y la manufactura de metales preciosos, incluyendo la extracción de oro y plata y los procesos de galvanoplastia y electropulido en la industria de la joyería, constituyen la principal fuente de residuos con cianuros y complejos cianometálicos (Akcil y Mudder, 2003; Raybuck, 1992). En estos residuos una proporción muy importante del cianuro total se encuentra formando parte de complejos metálicos, tanto débiles como fuertes. *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es una bacteria cianotrófica capaz de metabolizar el cianuro en su forma libre (Luque-Almagro *et al.*, 2005), pero resulta poco eficiente degradando los complejos metálicos cianurados (Luque-Almagro *et al.*, 2005). Por consiguiente, para la optimización del proceso de biodegradación del cianuro es fundamental encontrar y caracterizar nuevas cepas bacterianas, capaces de asimilar complejos metálicos del cianuro, que complementen las capacidades de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

1.1 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas capaces de utilizar complejos cianuro-metálicos como fuente de nitrógeno.

Utilizando como inóculo lodos recogidos en el entorno de Río Tinto (Huelva), se aislaron, mediante la técnica de enriquecimiento selectivo, bacterias capaces de degradar complejos cianuro-metálicos a pH alcalino en condiciones aeróbicas. Para su aislamiento se empleó medio mínimo M9 (pH 9,5) con acetato como fuente de carbono y ferrocianuro, ferricianuro, residuos cianurados procedente de la industria joyera o cianuro potásico como única fuente de nitrógeno. La identificación de las cepas bacterianas aisladas se llevó a cabo mediante la amplificación del DNA que codifica el RNA ribosómico 16S. Este DNA se secuenció, y posteriormente las secuencias obtenidas se compararon con otras existentes en las bases de datos *GenBank* y *RDP (Ribosomal Database Project II)*. La identificación de las cepas se efectuó mediante un análisis de similitud entre las secuencias de las muestras problema y las secuencias presentes en las bases de datos mencionadas. Las secuencias RNA 16S de las cepas bacterianas analizadas permitieron identificarlas como: *Microbacterium testaceum*, *Achromobacter piechaudii*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Microbacterium kitamiense* y *Achromobacter sp.*

1.2 pH óptimo de crecimiento de las cepas bacterianas.

De las cinco cepas bacterianas aisladas, únicamente *M. testaceum*, *Achromobacter sp.* y *A. piechaudii* fueron capaces de crecer a pH 9,5 con acetato como fuente de carbono y cloruro amónico como fuente de nitrógeno (resultados no mostrados). Por lo tanto, con estas cepas, y tras comprobar que las pérdidas de amonio no eran significativas en medios sin inocular, se utilizó medio M9 con cloruro amónico como fuente de nitrógeno para determinar el pH óptimo (Figura 8). Para la determinación del pH óptimo de *A. xylooxidans* y *M. kitamiense* se utilizó medio rico LB (Figura 9).

Las bacterias se inocularon en medios ajustados a diferentes pHs, y se calcularon las velocidades específicas de crecimiento (μ) para cada pH a partir de las respectivas curvas de crecimiento, tal y como se especifica en la sección 2.2 de Materiales y Métodos.

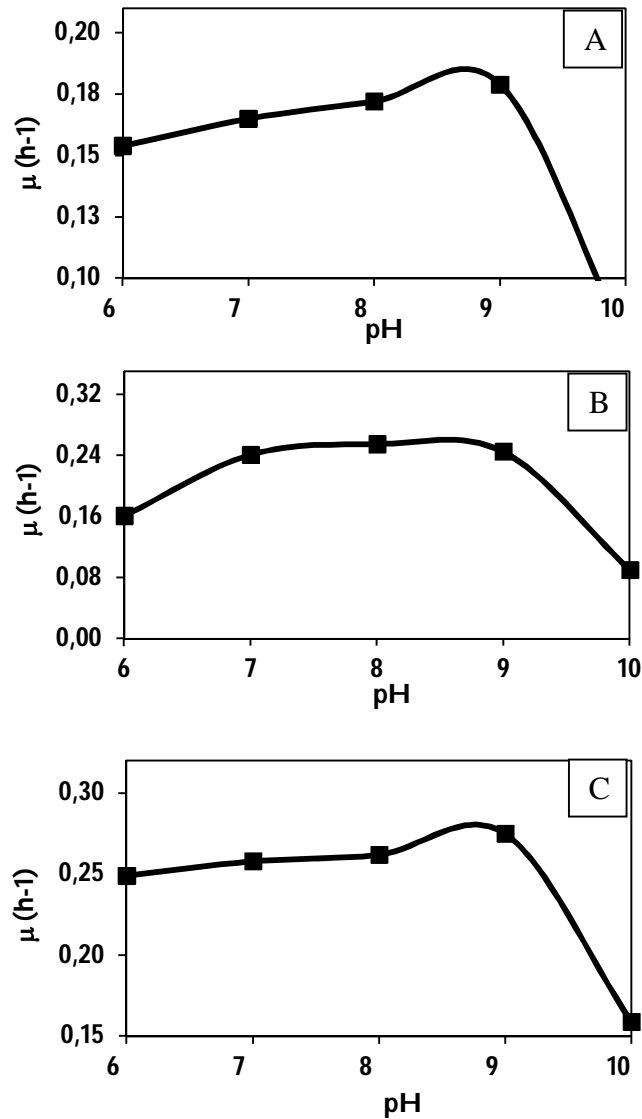


Figura 8. pH óptimo de crecimiento de *M. testaceum* (A), *Achromobacter sp* (B) y *A. piechaudii* (C). Las cepas bacterianas se cultivaron en medio mínimo M9 tamponado a distintos pHs (Materiales y Métodos 2.1.1) con DL-malato (4 g/l) como única fuente de carbono y NH₄Cl (5mM) como única fuente de nitrógeno. Para cada pH se determinó la velocidad específica de crecimiento (Materiales y Métodos 2.2) que se representa como μ .

Para el caso de *M. kitamiense* y *A. xylosoxidans* se utilizó medio rico LB para la determinación del pH óptimo de crecimiento (Figura 9).

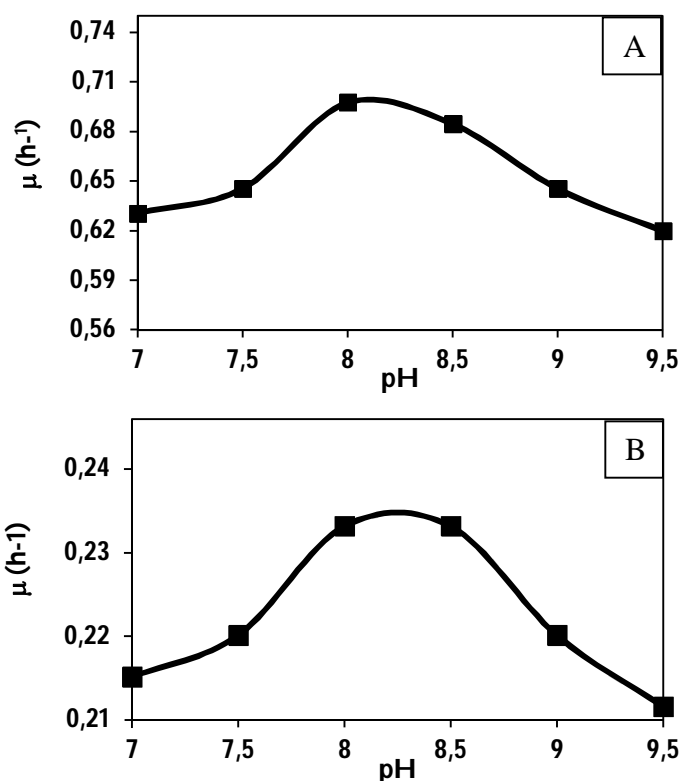


Figura 9. pH óptimo de crecimiento de *M. kitamiense* (A) y *A. xylosoxidans* (B). Las cepas bacterianas se cultivaron en medios ricos LB tamponados a distintos pHs. Se determinó la velocidad específica de crecimiento (Materiales y Métodos 2.2) que se representa como μ .

Los resultados mostrados en las figuras 8 y 9 indicaron que el pH óptimo para el crecimiento de *M. testaceum* fue 9,0, el de *Achromobacter sp.* fue 8,5, el de *A. piechaudii* fue 9,0, el de *A. xylosoxidans* fue 8,0 y el de *M. kitamiense* de aproximadamente 8,5. Es decir, todas las bacterias aisladas tienen un pH óptimo de crecimiento ligeramente alcalino, por lo que se trata de bacterias alcalófilas, al igual ocurre que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, cuyo pH óptimo de crecimiento es 9,0 (Luque-Almagro *et al.*, 2005). En todos los experimentos realizados con estas cepas bacterianas se utilizaron medios de cultivo a pH 9,5, puesto que cuando se utilizan fuentes de nitrógeno cianuradas es aconsejable trabajar a un pH superior a 9,2 para evitar la volatilización del cianuro (pK_a del cianuro = 9,2).

1.3 Asimilación de compuestos cianurados.

Con el objetivo de conocer qué tipo de sustratos pueden metabolizar las cepas bacterianas aisladas, éstas se cultivaron aeróbicamente en medio mínimo M9 (pH 9,5), con DL-malato como fuente de carbono. Además, como fuentes de nitrógeno se utilizaron diferentes compuestos cianurados: cianuro potásico (KCN), ferrocianuro potásico ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$), ferricianuro potásico ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) y ferrocianuro férrico (Azul de Prusia)

($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$). Debido al equilibrio existente entre el ión cianuro y el gas cianhídrico, el pH del medio es un factor a tener en cuenta en los tratamientos biológicos de degradación de cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2005). Por este motivo, e independientemente del pH óptimo de cada bacteria, el pH de los medios de cultivo bacterianos fue alcalino (pH 9,5).

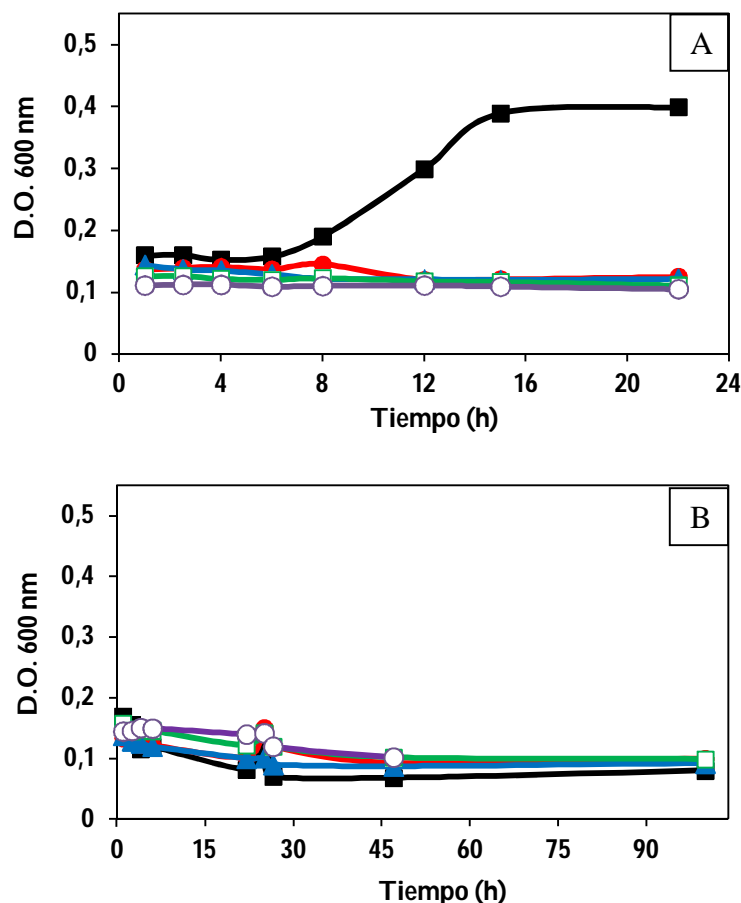


Figura 10. Crecimiento de algunos aislados bacterianos con cianuro potásico como única fuente de nitrógeno. Las células de *M. testaceum* (■), *Achromobacter sp.* (●), *A. piechaudii* (▲), *M. kitamiense* (□) y *A. xylooxidans* (○) se cultivaron en medio mínimo M9 con DL-malato (4 g/l) como fuente de carbono y KCN 2 mM (A) o 4 mM (B) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600nm a los tiempos indicados. En la gráfica se representan los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control se utilizó un medio sin inocular donde se determinó la concentración de cianuro (resultados no mostrados).

Las células de *A. piechaudii*, *A. xylooxidans*, *M. kitamiense* y *Achromobacter sp.* fueron incapaces de crecer en medios con cianuro potásico 2 o 4 mM (Figura 10). Sólo *M. testaceum* fue capaz de utilizar el cianuro potásico 2mM como única fuente de nitrógeno para su crecimiento (Figura 10A). Sin embargo, cuando se incrementó la concentración de cianuro

Resultados y Discusión

potásico en el medio de cultivo (4 mM) (Figura 10B), las células de *M. testaceum* no experimentaron crecimiento. *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es capaz de crecer en medios con una concentración inicial de cianuro libre de hasta 30 mM, a pH alcalinos utilizando acetato como única fuente de carbono (Luque-Almagro *et al.*, 2005).

El cianuro es un compuesto que puede encontrarse en la naturaleza de diversos modos, ya sea en forma libre o formando complejos cianurados con metales pesados. La toxicidad de estos complejos depende de su biodisponibilidad y de su constante de disociación. El ferrocianuro, ferricianuro y Azul de Prusia, son complejos cianurados de hierro especialmente estables y poco tóxicos comparados con las formas libres del cianuro (Castillo *et al.*, 2005).

Para dilucidar qué complejos metálicos pueden usar las cepas bacterianas aisladas, éstas se inocularon en medios con ferrocianuro potásico ($K_4Fe(CN)_6$), ferricianuro potásico $K_3[Fe(CN)_6]$ ó Azul de Prusia ($Fe_4[Fe(CN)_6]_3$) como única fuente de nitrógeno y DL-malato como fuente de carbono. Ninguna de las bacterias aisladas creció en medios con Azul de Prusia como única fuente de nitrógeno (resultados no mostrados).

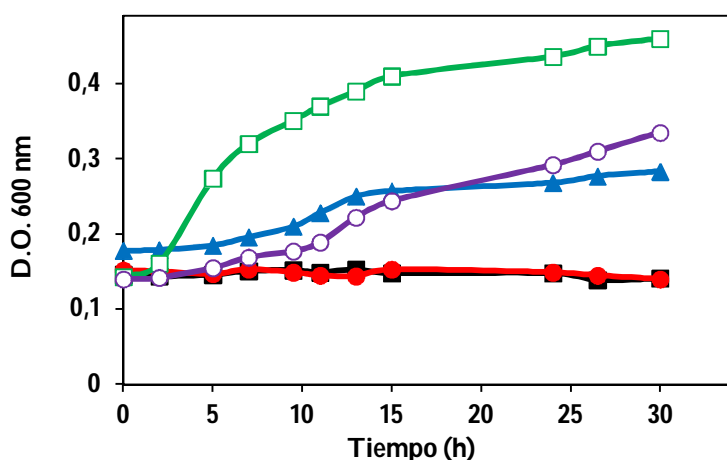


Figura 11. Crecimiento de algunos aislados bacterianos en medios con ferrocianuro potásico como única fuente de nitrógeno. Las células de *M. testaceum* (■), *Achromobacter sp.* (●), *A. piechaudii* (▲), *M. kitamiense* (□) y *A. xylosoxidans* (○) se cultivaron en medio mínimo M9 con DL-malato (4 g/l) y ferrocianuro ($K_4Fe(CN)_6$) 10 mM como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600nm a los tiempos indicados. En la gráfica se representan los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares.

A. piechaudii, *A. xylosoxidans* y *M. kitamiense* fueron capaces de utilizar el ferrocianuro potásico como única fuente de nitrógeno para su crecimiento (Figura 11). En la gráfica se observa que *M. kitamiense* utilizó mucho más eficientemente este complejo metálico

alcanzando una densidad óptica máxima de 0,45 (D. O. $_{600\text{ nm}}$) tras 30 horas de incubación. Por el contrario, *A. piechaudii* y *A. xylosoxidans* alcanzaron una densidad óptica de 0,32 y 0,27, respectivamente, en el mismo periodo de tiempo.

El hierro puede encontrarse formando complejos cianurados con diferentes estados de oxidación, y por consiguiente con diferentes constantes de disociación. El hexacianoferrato (II)(ferrocianuro) ($K_d = 10^{-37}$ M) presenta una constante de disociación mayor que el hexacianoferrato (III) (ferricianuro) ($K_d = 10^{-44}$ M), y éste mayor que el Azul de Prusia ($K_d = 10^{-52}$ M) (Cartmell y Fowles, 1979). Estos datos indican que, en principio, es más fácil extraer cianuro del complejo formado en el ferrocianuro que en el del ferricianuro, puesto que su constante de disociación es mayor.

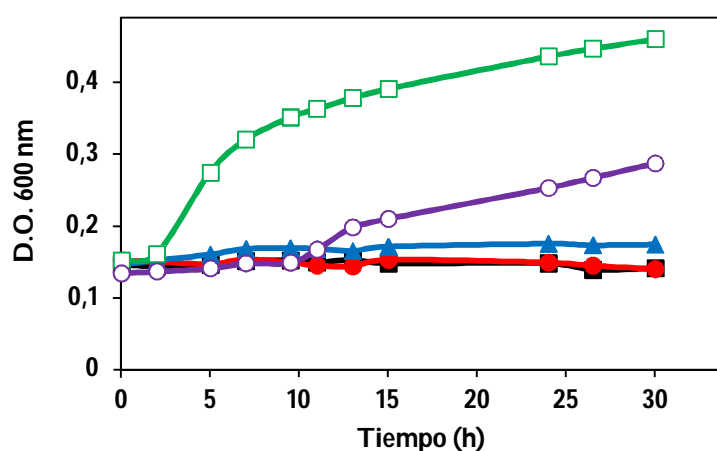


Figura 12. Crecimiento de algunos aislados bacterianos en medios con ferricianuro potásico como única fuente de nitrógeno. Las células de *M. testaceum* (■), *Achromobacter sp.* (●), *A. piechaudii* (▲), *M. kitamiense* (□) y *A. xylosoxidans* (○) se cultivaron en medio mínimo M9 con DL-malato (4 g/l) y ferricianuro ($K_3[Fe(CN)_6]$) 10 mM como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600nm a los tiempos indicados. En la gráfica se representan los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares.

Si tenemos en cuenta los valores de las constantes de disociación de los complejos cianuro-metálicos (Tabla 3, Introducción 6.1), no es de extrañar que, debido a su mayor estabilidad, el hexacianoferrato (III), sea peor fuente de nitrógeno para los microorganismos. Como se muestra en la figura 12, sólo *M. kitamiense* y *A. xylosoxidans* presentaron crecimiento celular en medios con ferricianuro potásico, mientras que *A. piechaudii* fue incapaz de utilizar este complejo como fuente de nitrógeno, aunque sí lo hizo en el caso del ferrocianuro. Con ferricianuro *A. xylosoxidans* experimentó un crecimiento más lento y menos eficiente que con ferrocianuro. De todas las cepas, *M. kitamiense* fue la

que asimiló más eficientemente el cianuro de ambos complejos metálicos, alcanzando D. O. _{600nm} máximas de 0,45, y presentando 2 horas de fase de latencia. (Figuras 11 y 12).

La estabilidad de los complejos aumenta con la basicidad del pH del medio. Sorprendentemente *M. kitamiense* y *A. xylooxidans* fueron capaces de degradar complejos metálicos fuertes, como el ferrocianuro y el ferricianuro, a pH alcalinos, a diferencia de lo que ocurre con *F. solani* (Barclay *et al.*, 1998a) y *P. fluorescens* (Dursun *et al.*, 1999) que únicamente utilizan ferrocianuro a pH ácidos. *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, además de utilizar cianuro libre como fuente de nitrógeno para su crecimiento también es capaz de crecer en medios con ferrocianuro, ferricianuro y Azul de Prusia en medios alcalinos, siendo éste último, uno de los compuestos más estables y recalcitrantes que se conocen (Luque-Almagro *et al.*, 2005). Sin embargo, el crecimiento máximo alcanzado por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 con 1 mM de ferrocianuro como fuente de nitrógeno fue inferior a 0.15 unidades de absorbancia a 600 nm (Luque-Almagro *et al.*, 2005), que es menor que el observado para alguno de los aislados en este trabajo (Figura 11),

1.4 Asimilación de residuos cianurados procedentes de la industria joyera.

La industria joyera produce grandes cantidades de residuos cianurados que son generados en los baños electrolíticos durante los procesos de galvanoplastia y electropulido. Estos residuos contienen elevadas concentraciones de cianuro, bien en forma libre o bien formando complejos, tanto débiles como fuertes, con metales pesados (Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, etc.). *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es una bacteria cianotrófica capaz de utilizar los residuos cianurados como fuente de nitrógeno para su crecimiento (Luque-Almagro *et al.*, 2005).

M. testaceum, *Achromobacter* sp, *A. piechaudii*, *M. kitamiense*, y *A. xylooxidans* se cultivaron en medios con residuo cianurado (2mM cianuro libre como concentración final) procedente de industria joyera. Se observó que todas las cepas bacterianas fueron capaces de utilizar los residuos cianurados como fuentes de nitrógeno para su crecimiento (Figura 13).

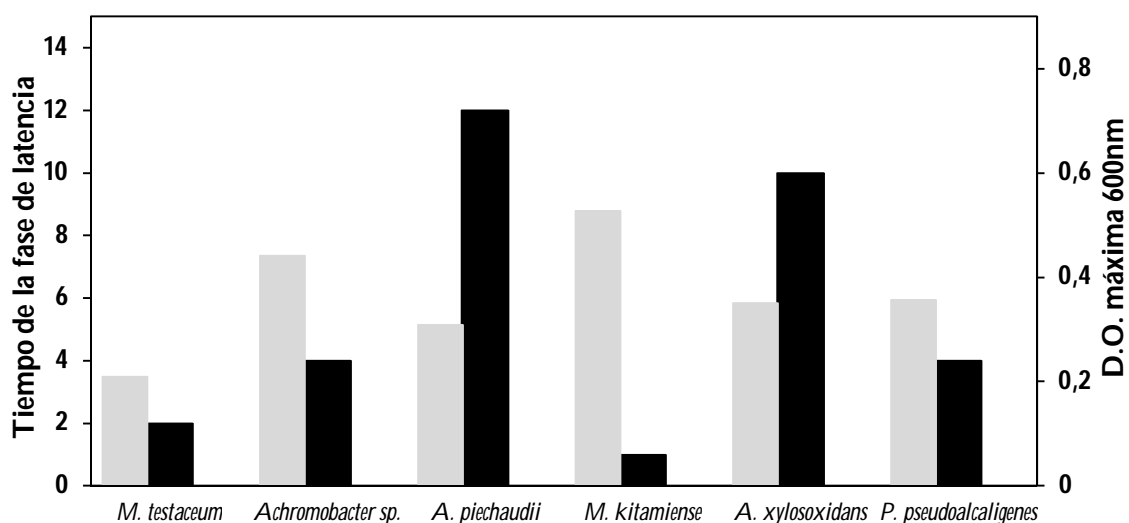


Figura 13. Crecimiento de algunos aislados bacterianos en medios con residuo cianurado como única fuente de nitrógeno. Las células de *M. testaceum*, *Achromobacter sp.*, *A. piechaudii*, *M. kitamiense*, *A. xylosoxidans* y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se cultivaron en medio mínimo M9 con DL-malato (4 g/l) y residuo cianurado procedente de la industria joyera (cianuro libre 2 mM) como fuente de carbono y de nitrógeno respectivamente. En cada caso, se determinó el tiempo de la fase de latencia (negro) y el crecimiento máximo alcanzado midiendo la absorbancia a 600nm (gris). En la gráfica se representan los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares.

Estos resultados no son insólitos para *M. testaceum* que fue capaz de utilizar cianuro potásico para su crecimiento (Figura 10A), o para *A. piechaudii*, *M. kitamiense*, y *A. xylosoxidans* que fueron capaces de asimilar complejos cianurado-metálicos, como ferricianuro o ferrocianuro, como fuentes de nitrógeno (Figuras 11 y 12). Sorprendentemente, y al contrario de lo que ocurrió en los casos del cianuro potásico (Figura 10), el ferrocianuro potásico (Figura 11) y el ferricianuro potásico (Figura 12), *Achromobacter sp.* presentó crecimiento celular en medios con residuo cianurado como única fuente de nitrógeno, lo que indica que esta bacteria podría utilizar los complejos cianuro-metálicos menos estables (con constantes de disociación más elevadas) presentes en el residuo. Es de destacar que *Achromobacter sp.* y *M. kitamiense* fueron capaces de utilizar más eficientemente que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 los residuos cianurados del medio de cultivo (Figura 13).

Se analizó el comportamiento de *Achromobacter sp.* y de *M. kitamiense* frente a diferentes concentraciones de residuos cianurados procedentes de la industria joyera (Figura 14). Para ello, a los medios de cultivo se le añadieron diferentes volúmenes del residuo que contenía una concentración de cianuro libre inicial de 0,77 M.

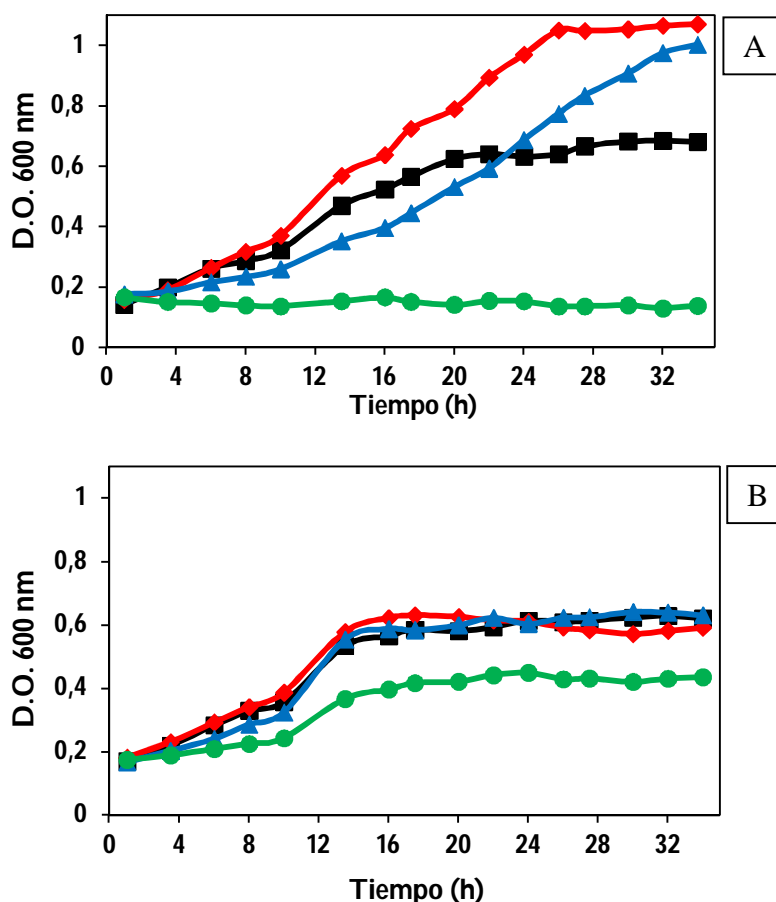


Figura 14. Crecimiento de *Achromobacter sp* y *M. kitamiense* con diferentes concentraciones de residuo cianurado. Las células de *Achromobacter sp* (A) y *M. kitamiense* (B) se cultivaron en medios M9 con DL-malato (4 g/l) como fuente de carbono y volúmenes crecientes del residuo de joyería como fuente de nitrógeno (0,77 mM de cianuro libre), dando lugar a concentraciones finales de cianuro libre en el medio de 2 (■), 5 (◆), 10 (▲) y 20 (●) mM. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. En la gráfica se representan los resultados de un experimento típico.

Aunque ambas cepas utilizaron el residuo cianurado como fuente de nitrógeno, *Achromobacter sp.* lo hizo más eficientemente (Figura 14). Concentraciones de residuo cianurado equivalentes a 10 mM de cianuro libre resultaron tóxicas para el crecimiento de ambas bacterias, siendo especialmente tóxico para *Achromobacter sp.* una concentración de cianuro siempre determinado como libre, superior (20 mM) (Figura 14A).

1.5 Biodegradación de residuos cianurados procedentes de la industria joyera mediante cultivos mixtos bacterianos.

Tanto *Achromobacter sp.* como *M. kitamiense* crecieron bastante eficientemente en medios con residuos cianurados procedentes de la industria joyera (Figura 14), aunque en el

caso de *Achromobacter sp.* este proceso fue mucho más ventajoso. En cambio, *M. kitamiense* asimiló mucho más eficientemente tanto el ferrocianuro como el ferricianuro (Figuras 11 y 12). También *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es capaz de utilizar complejos cianuro-metálicos como fuentes de nitrógeno aunque de forma muy limitada (Luque-Almagro *et al.*, 2005). Es decir, estas tres cepas bacterianas presentan diferentes competencias asimiladoras, y por tanto la suma de las capacidades degradativas de las tres cepas bacterianas abre la posibilidad de la utilización de cultivos mixtos, en lugar de cepas puras, como una buena alternativa para una eliminación más efectiva del cianuro, tanto libre como acomplejado, presente en los residuos cianurados.

Por este motivo, se estudió la degradación del cianuro presente en los residuos cianurados por cultivos mixtos constituidos por diferentes mezclas, de dos de estas tres cepas bacterianas; *Achromobacter sp.* y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, *M. kitamiense* y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, así como *Achromobacter sp.* y *M. kitamiense*.

1.5.1 Cultivos mixtos de *Achromobacter sp.* y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

El cultivo mixto formado por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y *Achromobacter sp.* no fue más eficiente el de las cepas puras. En primer lugar porque el crecimiento bacteriano máximo alcanzado en medios con residuo cianurado no fue mayor que el que tenía lugar en el caso de *P. pseudoalcaligenes* 5344 R1 individualmente (Figura 15A) y fue bastante menor que cuando se cultivó *Achromobacter sp.* de forma aislada (Figura 15B). En segundo lugar, la desaparición de cianuro libre del medio también ocurrió más lentamente en el cultivo mixto (Figura 15C) que en el de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. *Achromobacter sp.* fue capaz de crecer con residuo cianurado como única fuente de nitrógeno, pero no de eliminar el cianuro del medio (Figura 15B). Por tanto, el crecimiento de esta bacteria debe ocurrir obligatoriamente a costa de otras fuentes de nitrógeno presentes en el residuo cianurado, como podrían ser los complejos cianurados débiles.

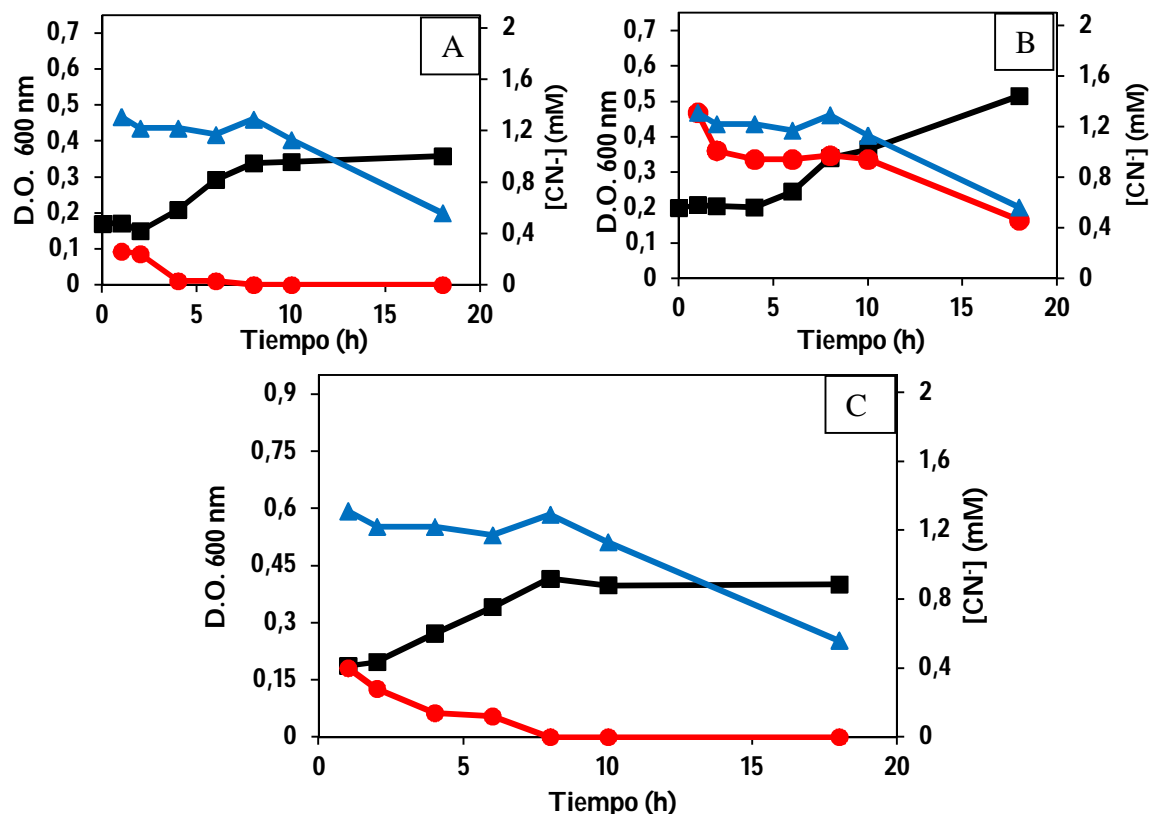


Figura 15. Crecimiento de *Achromobacter sp.* y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con residuo como única fuente de nitrógeno. La figura A muestra el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. La figura B muestra el crecimiento de *Achromobacter sp.* La figura C muestra el crecimiento conjunto de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 y *Achromobacter sp.* en cultivos mixtos. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con DL-malato (4 g/l) como fuente de carbono y residuo cianurado (2 mM CN libre) como fuente de nitrógeno, hasta la fase estacionaria de crecimiento. La determinación del crecimiento y de la concentración de cianuro se llevó a cabo a los tiempos indicados. Como control se utilizó un medio sin inocular en el que se determinó la concentración de cianuro de forma paralela al cultivo inoculado. En la gráfica se representan los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Crecimiento celular (■), concentración de cianuro libre en medio inoculado (●), concentración de cianuro libre en medio sin inocular (▲).

El hecho de que en el cultivo mixto experimente un crecimiento inferior que el cultivo de *Achromobacter sp.*, podría ser debido a la competencia de las dos cepas por un mismo sustrato, o a la producción de algún compuesto tóxico por alguna de las bacterias. Se estimó, mediante el recuento en placa de unidades formadoras de colonias (CFU) la cepa bacteriana que contribuía mayoritariamente al incremento de la densidad óptica observada en el cultivo. Para ello se utilizaron dos tipos de medios, por una parte un medio selectivo (LBR) con un antibiótico de selección (rifampicina), en el sólo puede crecer *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 que es resistente a este antibiótico; y por otra, un medio no

selectivo (LB) en el que crecerán las dos cepas bacterianas (Figura 16). El número de CFU en medio selectivo (LBR), y por tanto correspondiente a *P. Pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, fue de $3 \cdot 10^7$, aproximadamente 20 veces menor que en medios no selectivos (LB) que fue de $7,6 \cdot 10^8$, es decir, *Achromobacter sp.* era la cepa bacteriana preponderante en el cultivo mixto. Estos datos sugieren que las dos especies bacterianas podrían competir por los nutrientes presentes en los residuos cianurados, como podrían ser los complejos cianuro-metálicos débiles, y que en esta competición *Achromobacter sp.* es la especie dominante en esas condiciones.

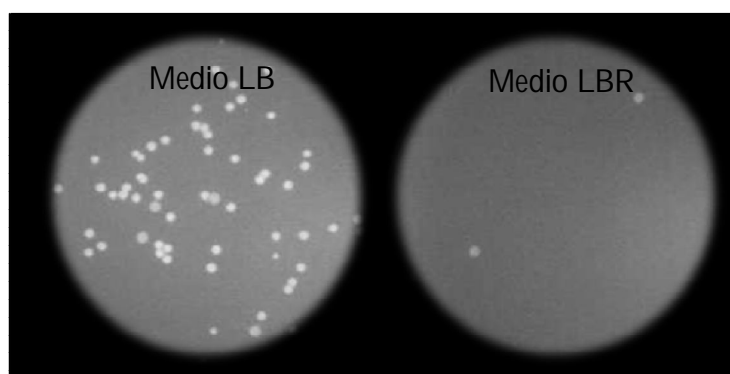


Figura 16. Determinación de las unidades formadoras de colonias de *Achromobacter sp.* y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 cultivadas en medios con residuo cianurado como fuente de nitrógeno. A partir de un cultivo mixto se determinaron las unidades formadoras de colonias de cada cepa bacteriana en medios selectivos (LBR) y medios no selectivos (LB). Las células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 y *Achromobacter sp.* se cultivaron conjuntamente en medio mínimo M9 con DL-malato (4 g/l) como fuente de carbono y residuo cianurado (2 mM cianuro libre) como fuente de nitrógeno, hasta la fase exponencial de crecimiento ($D.O_{600nm}=0,23$). Se inoculó 0,1 ml de diluciones seriadas del cultivo bacteriano en placas de Petri LB y LBR. En medio LBR se produjo el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, mientras que en medio LB crecieron ambas cepas bacterianas.

1.5.2 Cultivos mixtos de *M. kitamiense* y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

Cuando *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y *M. kitamiense* se inocularon en medios con residuos cianurados como única fuente de nitrógeno, el cultivo mixto alcanzó un crecimiento celular máximo de 0,75 (D. O. 600 nm) (Figura 17C), muy superior al crecimiento que mostró *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 (D. O. 600 nm 0,35) (Figura 17A) y levemente superior al de *M. kitamiense* (D. O. 600 nm 0,60) (Figura 17B) en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos pueden ser el reflejo de que ambas especies utilicen sustratos cianurados diferentes y presentes en el residuo procedente de la industria joyera. Sin embargo, en el cultivo mixto la eliminación o desaparición del cianuro libre transcurrió más lentamente que cuando se cultivó individualmente *P. pseudoalcaligenes* CECT

Resultados y Discusión

5344 R1 (Figura 17A). Puesto que *M. kitamiense* era incapaz de utilizar como fuente de nitrógeno el cianuro libre presente en el residuo (Figura 17B), la eliminación de éste del medio en el cultivo mixto se deberá exclusivamente a la actividad de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Por consiguiente, *M. kitamiense* necesariamente ha de asimilar otras fuentes de nitrógeno existentes en el residuo cianurado, como por ejemplo, complejos cianurados fuertes como ferrocianuro y ferricianuro potásico.

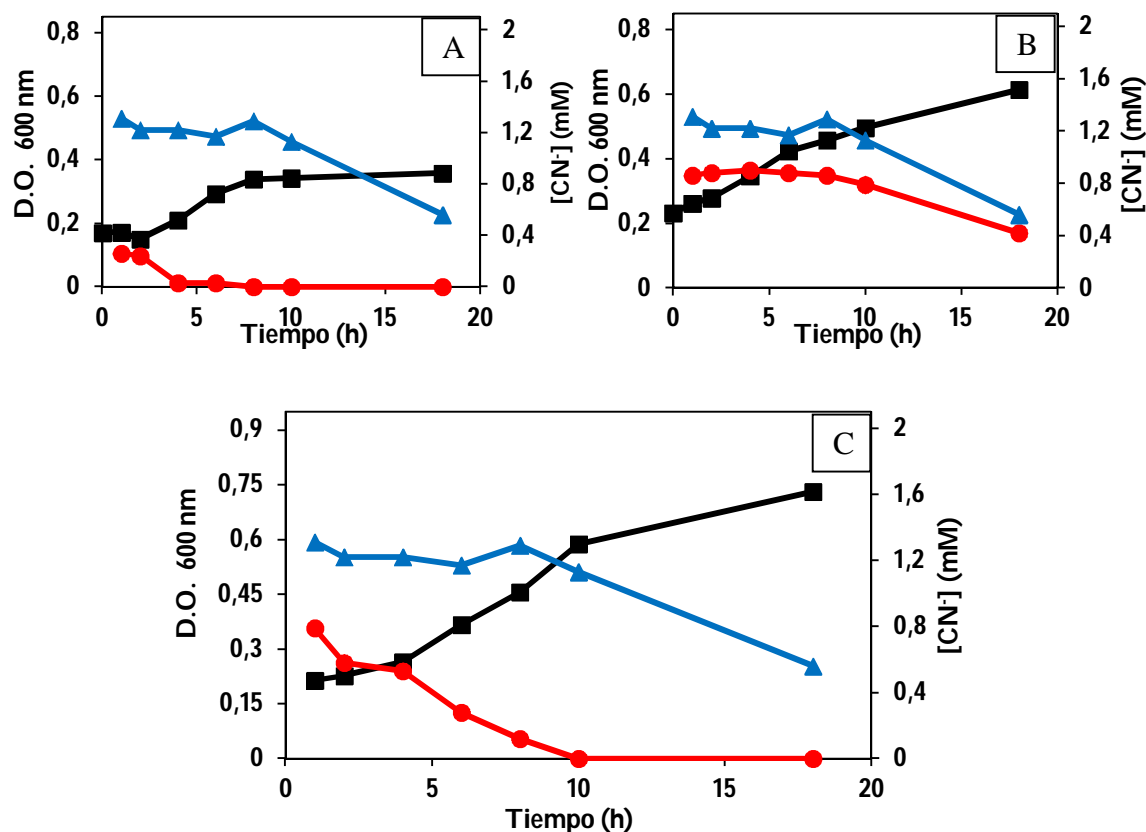


Figura 17. Crecimiento de *M. kitamiense* y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con residuo como única fuente de nitrógeno. La figura A muestra el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. La figura B muestra el crecimiento de *M. kitamiense*. La figura C muestra el crecimiento conjunto de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 y *M. kitamiense* en cultivos mixtos. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con DL-malato (4 g/l) como fuente de carbono y residuo cianurado (2mM cianuro libre) como fuente de nitrógeno, hasta la fase estacionaria de crecimiento. La determinación del crecimiento y de la concentración de cianuro se llevó a cabo a los tiempos indicados. Como control se utilizó un medio sin inocular en el que se determinó la concentración de cianuro libre de forma paralela al cultivo inoculado. En la gráfica se representan los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Crecimiento celular (■), concentración de cianuro libre en medio inoculado (●), concentración de cianuro libre en medio sin inocular (▲).

Lo mismo que en el caso anterior, en la fase exponencial del cultivo mixto, *P. pseudoalcaligenes* fue la cepa minoritaria, puesto que el valor de CFU en medios selectivos

(LBR) fue $4 \cdot 10^7$, aproximadamente 30 veces menor que en medios no selectivos (LB) que fue de $9,4 \cdot 10^8$, siendo por tanto *M. kitamiense* la cepa bacteriana más abundante en el cultivo mixto (Figura 18). Además, en el cultivo mixto ambas cepas utilizaron fuentes de nitrógeno complementarias, por una parte *P. pseudoalcaligenes* metabolizó preferentemente el cianuro libre y *M. kitamiense* asimilaría ferro y ferricianuro potásico existentes en el residuo, o bien otros compuestos nitrogenados también presentes. Aunque se ha descrito que *P. pseudoalcaligenes* también es capaz de utilizar como fuente de nitrógeno complejos cianuro-metálicos fuertes, lo hace muy poco eficientemente (Luque-Almagro *et al.*, 2005). Sin embargo, teniendo en cuenta que las capacidades degradativas del cultivo mixto fueron inferiores a la suma de las presentadas por los cultivos puros, la mezcla de *M. kitamiense* y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 no resulta aconsejable en la degradación del cianuro presente en los residuos cianurados.

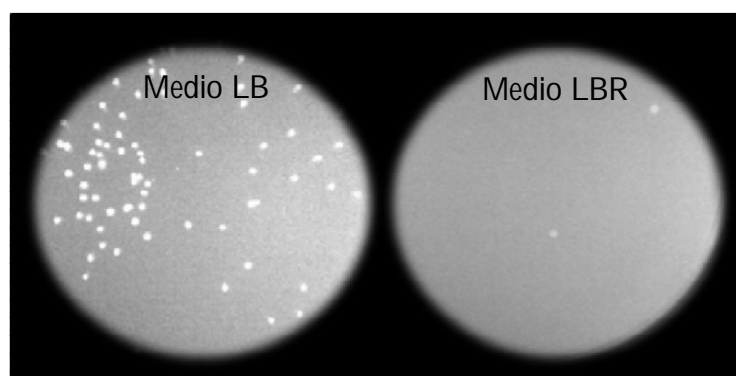


Figura 18. Determinación de las unidades formadoras de colonias de *M. kitamiense* y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 cultivadas en medios con residuo cianurado como fuente de nitrógeno. A partir de un cultivo mixto se determinaron las unidades formadoras de colonias de cada cepa bacteriana en medios selectivos (LBR) y medios no selectivos (LB). Las células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 y *M. kitamiense* se cultivaron conjuntamente en medio mínimo M9 con DL-malato (4 g/l) como fuente de carbono y residuo cianurado (2 mM cianuro libre) como fuente de nitrógeno, hasta la fase exponencial de crecimiento ($D_{600nm}=0,36$). Se inocularon 0,1 ml de diluciones seriadas del cultivo bacteriano, en placas de Petri LB y LBR. En medio LBR se produjo el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, mientras que en medio LB crecieron ambas cepas bacterianas.

1.5.3 Cultivos mixtos de *M. kitamiense* y *Achromobacter sp.*

En cultivos mixtos de *Achromobacter sp.* y *M. kitamiense* en medios con residuo cianurado como única fuente de nitrógeno, no se produjo la eliminación de cianuro libre (Figura 19C), algo que no resulta sorprendente ya que ninguna de las especies bacterianas fue capaz de metabolizar individualmente el cianuro libre presente en el residuo (Figuras

Resultados y Discusión

19A y 19B). No obstante, la proliferación bacteriana ($D.O_{600nm}$) en dicho cultivo experimentó un considerable incremento con respecto a las cepas cultivadas de forma independiente (Figura 19), lo que implica que ambas cepas bacterianas utilizan como fuente de nitrógeno complejos cianuro-metálicos diferentes.

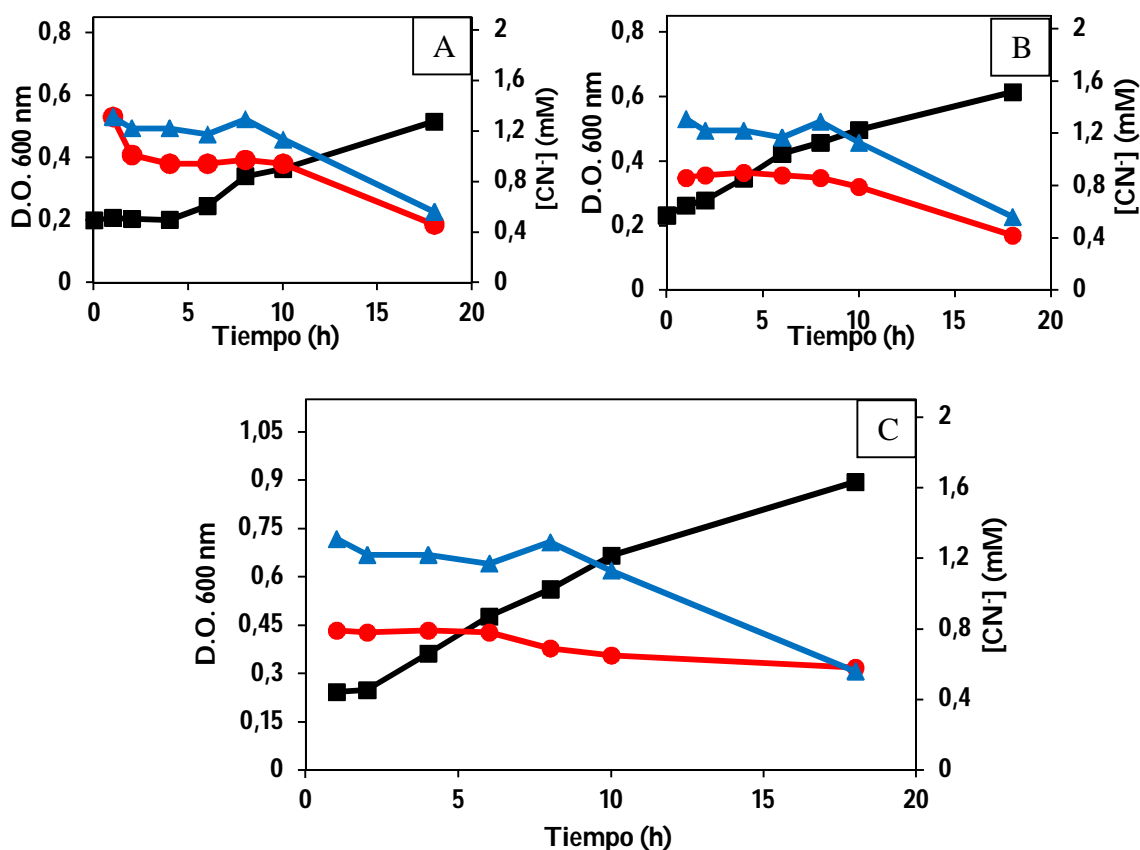


Figura 19. Crecimiento de *Achromobacter sp.* y *M. kitamiense* con residuo como única fuente de nitrógeno. La figura A muestra el crecimiento de *Achromobacter sp.* La figura B muestra el crecimiento de *M. kitamiense*. La figura C muestra el crecimiento conjunto de *Achromobacter sp.* y *M. kitamiense* en cultivos mixtos. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con DL-malato (4 g/l) como fuente de carbono y residuo cianurado (2mM cianuro libre de 2 mM) como fuente de nitrógeno, hasta la fase estacionaria de crecimiento. La determinación del crecimiento y de la concentración de cianuro se llevó a cabo a los tiempos indicados. Como control se utilizó un medio sin inocular en el que se determinó la concentración de cianuro de forma paralela al cultivo inoculado. En la gráfica se representan los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Crecimiento celular (■), concentración de cianuro en medio inoculado (●), concentración de cianuro en medio sin inocular (▲).

Lógicamente el recuento de CFU para *M. kitamiense* y *Achromobacter sp.* fue similar ($8,4 \cdot 10^8$), puesto que sí *M. kitamiense* y *Achromobacter sp.*, usasen diferentes complejos metálicos cianurados como fuente de nitrógeno para su crecimiento, ninguna de las dos

debe prevalecer sobre la otra (Figura 20). Como ninguna de las especies es resistente a antibióticos de selección, la discriminación entre ambas se realizó basándose en el color, ya que las colonias de *M. kitamiense* son de un color anaranjado característico.

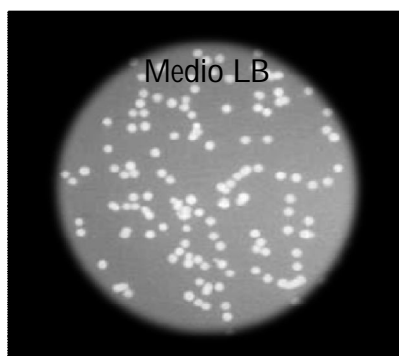


Figura 20. Determinación de las unidades formadoras de colonias de *Achromobacter* sp. y *M. kitamiense* cultivadas en medios con residuo cianurado como fuente de nitrógeno. A partir de un cultivo mixto se determinaron las unidades formadoras de colonias de cada cepa bacteriana en medios no selectivos (LB). Las células de *M. kitamiense* y *Achromobacter* sp. se cultivaron conjuntamente en medio mínimo M9 con DL-malato (4 g/l) como fuente de carbono y residuo cianurado (2 mM cianuro libre) como fuente de nitrógeno, hasta la fase exponencial de crecimiento ($D.O_{600nm}=0,42$). Se inocularon 0,1 ml de diluciones seriadas del cultivo bacteriano, en placas de Petri LB. En medio LB se produjo el crecimiento de ambas cepas bacterianas.

Desde un punto de vista biotecnológico, el tratamiento de residuos cianurados, procedentes de la industria joyera mediante el uso de microorganismos, puede ser tratado de un modo más eficiente con co-cultivos de cepas bacterianas. De las cepas bacterianas estudiadas en este trabajo, en este sentido la inoculación conjunta de *M. kitamiense* y *Achromobacter* sp. fue la más prometedora ya que se produjo una mayor degradación de cianuro en sus diferentes formas, exceptuando el cianuro en forma libre.

1.6 Producción de sideróforos.

Como se ha comentado anteriormente, *M. kitamiense* creció con complejos cianurados fuertes como el ferrocianuro y el ferricianuro, como única fuente de nitrógeno. El crecimiento en presencia de estos complejos especialmente estables, requiere la síntesis y excreción por parte de microorganismos de compuestos quelantes con una afinidad elevada por el hierro. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular y elevada afinidad por el hierro producidas y excretadas por algunos microorganismos en condiciones limitantes de hierro (Andrews *et al.*, 2003; Faraldo-Gomez y Sansom, 2003).

Resultados y Discusión

Para investigar la capacidad de *M. kitamiense* de sintetizar sideróforos se utilizó el medio CAS, un método universal para la detección de estos compuestos (Alexander y Zuberer, 1991). El ensayo se basa en una competición por el hierro entre el sideróforo producido por el microorganismo y el complejo férrico de un colorante indicador (CAS). Si el hierro es arrancado por el sideróforo, el indicador cambia de color, normalmente de azul a naranja.

El crecimiento de *M. kitamiense* en medio M9-CAS no produjo un halo de decoloración en la zona próxima a las colonias. Lo mismo ocurrió en el caso de *Achromobacter sp* (resultados no mostrados). Estos resultados evidencian que ni *Achromobacter sp* ni *M. kitamiense* producen sideróforos, al menos detectables por el método CAS, a pesar de que *M. kitamiense* es capaz de competir con el hierro para utilizar el cianuro del complejo. Podría ocurrir que *M. kitamiense* tuviera un sistema de transporte específico tanto para el ferricianuro como para el ferrocianuro, y por tanto que la degradación de los complejos ocurriera en el interior de la célula.

Capítulo 2.

Catabolismo de compuestos carbonados en

P. pseudoalcaligenes CECT 5344.

Resultados y Discusión

P. pseudoalcaligenes CECT 5344 es una bacteria que puede asimilar cianuro como única fuente de nitrógeno para su crecimiento, sin embargo, y como ocurre de forma generalizada en todos los microorganismos asimiladores de cianuro, no es capaz de utilizarlo como fuente de carbono (Luque-Almagro *et al.*, 2005). Este hecho puede ser debido a que los números de oxidación del C y del N en la molécula de cianuro son C (+II) y N (-III), es decir los equivalentes 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; de modo que para suministrar el carbono suficiente para el crecimiento bacteriano sería necesaria una concentración de cianuro tan elevada que resultaría tóxica. Otro factor que puede impedir la utilización del cianuro como fuente de carbono es la baja relación de carbono/nitrógeno (C/N) en la molécula de cianuro, que es 1, mientras que en la mayoría de los microorganismos la razón C/N de los compuestos intracelulares es del orden de 10. En cualquier caso, el hecho experimental es que para que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 asimile cianuro es imprescindible añadir una fuente de carbono adicional al medio de cultivo. Esta bacteria es capaz de utilizar el acetato como fuente de carbono para su crecimiento en medios con cianuro como fuente de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2005), y recientemente se ha demostrado que existen otras fuentes de carbono mucho más eficientes que el acetato para la asimilación de cianuro, como por ejemplo, el DL-malato (Igeño *et al.*, 2011).

Gracias al Consorcio entre el grupo Metabolismo del Nitrógeno en Bacterias Fotosintéticas de la Universidad de Córdoba, el servicio de Genómica del Centro de Biotecnología (CeBiTec) de la Universidad de Bielefeld y el grupo de Biotecnología de Microorganismos (BioMic) de la Universidad de Extremadura se ha secuenciado el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, obteniéndose así el primer borrador del genoma de una bacteria que asimila cianuro en condiciones alcalinas (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Recientemente se ha finalizado el proyecto de secuenciación del genoma mediante la tecnología PacBio (Pacific Biosciences), que ha permitido la secuenciación de varias regiones de DNA repetitivo imposibles de resolver mediante otras técnicas de secuenciación (Wibberg *et al.*, 2014).

Inicialmente se realizó la predicción de genes y anotación automática del borrador del genoma mediante el sistema de anotación GenDB 2.0 (Meyer *et al.*, 2003) y su enlace con la base de datos KEGG. Posteriormente, se llevó a cabo una anotación manual de las secuencias, lo que permitió una identificación de genes más precisa. La secuencia genómica

de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 (contingencias CAIG01000001-CAIG01000024) se encuentra depositada en la base de datos EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute database*).

La secuenciación del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 ha permitido identificar genes relacionados tanto con el metabolismo del cianuro como con otros procesos de interés biotecnológico (Luque-Almagro *et al.*, 2013) y ha puesto de manifiesto la presencia de agrupaciones génicas relacionadas con la asimilación diferentes compuestos carbonados, algunos de ellos aromáticos (Luque-Almagro *et al.*, 2013). El objetivo fundamental de este capítulo fue encontrar nuevas fuentes de carbono para el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

2.1 Asimilación de hidratos de carbono por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

Se ha descrito que, en general, las bacterias del género *Pseudomonas* utilizan como fuentes de carbono pocos tipos de carbohidratos, en comparación con otras especies que, como por ejemplo *E. coli*, son capaces de metabolizar glucosa, gluconato, fructosa, maltosa, galactosa, sacarosa, lactosa, arabinosa, etc. (Lessie y Phibbs, 1984). Con el objeto de conocer que carbohidratos era capaz de utilizar *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, ésta se cultivó en medio M9 con cloruro amónico como fuente de nitrógeno, al que se añadieron diferentes carbohidratos en estado sólido (medios sólidos en gradiente de concentración de sustrato; Materiales y Métodos 2.1.2.1). De los carbohidratos probados, *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 sólo fue capaz de utilizar glucosa como única fuente de carbono y energía (Tabla 9).

Tabla 9. Utilización de diferentes carbohidratos como fuentes de carbono por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Los experimentos se realizaron en placas de Petri en gradiente de concentración depositando una pequeña cantidad de cada compuesto en un extremo de la placa (Materiales y Métodos 2.1.2.1). Los signos + y – indican crecimiento o ausencia de éste en comparación con un control positivo (acetato) y negativo (sin adición).

Compuesto	Crecimiento
Glucosa	+
Xilosa	-
Sacarosa	-
Arabinosa	-
Manosa	-
Galactosa	-
Fructosa	-

Resultados y Discusión

A continuación se estudió la eficiencia en la utilización de cianuro con glucosa como fuente de carbono. Como referencia se utilizó cloruro amónico (2 mM), observándose que la bacteria no era capaz de asimilar cianuro cuando se empleaba glucosa como fuente de carbono (Figura 21).

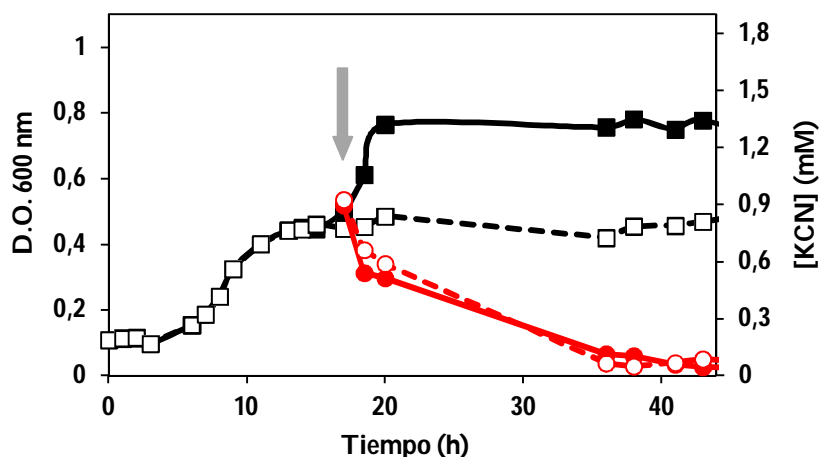


Figura 21. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con glucosa como fuente de carbono y cianuro como fuente de nitrógeno. Las células se cultivaron en medio mínimo (M9) con glucosa (4 g/l) como fuente de carbono y con amonio limitante (NH₄Cl 2,0 mM) como fuente de nitrógeno, hasta la fase estacionaria (D.O. _{600nm} ≈ 0,4). En este punto (flecha gris) el cultivo se dividió en dos y se añadió KCN 2,0 mM o NH₄Cl 2,0 mM. El crecimiento bacteriano y la concentración de cianuro se determinaron a los tiempos indicados. (■) Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con glucosa + NH₄Cl. (□) Crecimiento con glucosa + KCN. Como control se utilizó el mismo medio sin inocular en el que se determinó la concentración de cianuro (○) de forma paralela a la del cultivo inoculado (●). En la figura se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares.

Es importante destacar que, aunque no se produjo proliferación bacteriana, el cianuro libre desaparecía a lo largo del experimento (Figura 21), tanto en el medio inoculado como en el sin inocular. Por este motivo se analizaron, mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos), los sobrenadantes de los cultivos celulares, antes y después de añadir cianuro al cultivo. En el sobrenadante del medio sin cianuro se advirtió la existencia de un compuesto (C₁) con un tiempo de retención (T_R) de 9,25 minutos (Figura 22), descartándose que éste sea glucosa puesto que era indetectable mediante esta técnica. La adición de cianuro al medio originó la aparición de un nuevo compuesto (C₂, T_R=6,50 minutos) a expensas de C₁. (Figura 22). Podría ocurrir que C₂ fuese una cianhidrina derivada de una reacción química entre la glucosa y el cianuro, en la que el nucleófilo CN⁻ ataca al carbono electrófilo del carbonilo de la glucosa. De hecho, la disminución de la concentración de cianuro libre en medios sin inocular puede deberse a esta reacción. Se ha

descrito que en la levadura *Rhodotorula rubra* el cianuro reacciona con azúcares reductores en condiciones alcalinas, liberando amonio que es utilizado posteriormente por la levadura como fuente de nitrógeno (Andrade *et al.*, 1995). Sin embargo, esto no es exactamente lo que ocurre en nuestro caso puesto que el compuesto C_1 no es glucosa sino, posiblemente, un derivado de la glucosa (cuya naturaleza no ha podido ser dilucidada) producido y excretado por la bacteria en condiciones limitantes de nitrógeno. C_1 podría ser un compuesto carbonílico que reaccione químicamente con el cianuro, y por tanto haga desaparecer el cianuro libre del medio. Como resultado se originaría una cianhidrina que probablemente la bacteria no sea capaz de asimilar. No obstante no se puede descartar que el cianuro inhiba algunas de las enzimas necesarias para catabolizar la glucosa.

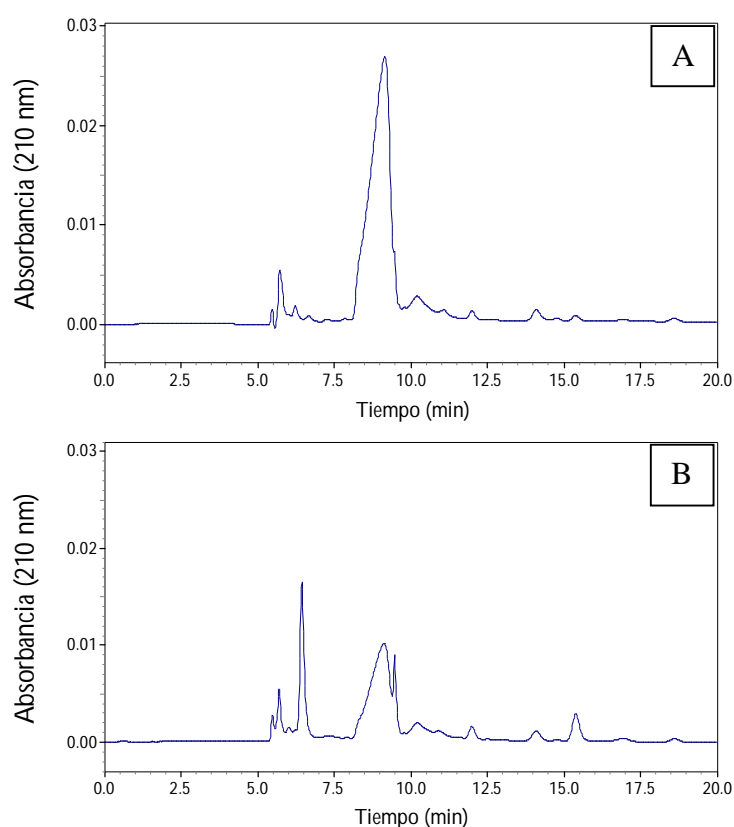


Figura 22. Cromatogramas de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 obtenidos por HPLC de los sobrenadantes de cultivos con glucosa. Las células se cultivaron en medio mínimo (M9) con glucosa (4 g/l) y 2,0 mM de NH_4Cl hasta la fase estacionaria ($\text{D.O.}_{600\text{nm}} \approx 0,4$), punto en el que se añadió KCN 2,0 mM. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación inmediatamente antes (A) y justamente después de añadir KCN (B). Ninguno de los compuestos ha podido ser identificado. En la figura se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.2 Asimilación de compuestos intermediarios del ciclo de Krebs y metabolitos centrales por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

Resultados y Discusión

Con el objetivo general de encontrar fuentes de carbono óptimas para el crecimiento y para la asimilación de cianuro por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, también se probaron algunos metabolitos como piruvato, citrato, succinato y fumarato (Figura 23), fuentes de carbono que pueden ser asimiladas por todas las especies del género *Pseudomonas* (Anderson y Wood, 1969; Blevins *et al.*, 1975; McFadden y Ramanandarao, 1964; Tiwari y Campbell, 1969). Los ensayos se normalizaron utilizando siempre 4 g/l de la fuente de carbono y una cantidad limitante de cloruro amónico (2 mM), lo que permitió obtener un preinóculo similar en todos los casos. Cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria se añadió cianuro (KCN 2 mM) y se siguió el crecimiento bacteriano. Para cada fuente de carbono se calcularon las velocidades específicas de crecimiento durante la fase exponencial (Tabla 10). Además, en todos los casos se analizó la acumulación de metabolitos en el sobrenadante del cultivo, antes y después de añadir cianuro; no observándose diferencias en ambos cromatogramas (resultados no mostrados).

P. pseudoalcaligenes CECT 5344 R1 fue capaz de utilizar todas las fuentes de carbono ensayadas (Figura 23), tanto con amonio como con cianuro (fuentes de nitrógeno). Considerando como objetivo final la biodegradación de cianuro, se conseguirá una eficiencia mayor en ésta al eliminar la misma cantidad de cianuro en el menor tiempo posible. No obstante para una aplicación biotecnológica habría que tener también en cuenta el precio de las fuentes de carbono, los rendimientos en biomasa, la posible valorización de subproductos como los bioplásticos, etc. De los resultados mostrados en la figura 23 resulta evidente que se consigue eliminar completamente el cianuro libre en todos los cultivos inoculados con *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, por otra parte en los controles sin inocular la cantidad de cianuro, al final de cada experimento, dependió de la fuente de carbono empleada. En esta serie de experimentos las fuentes de carbono más eficientes fueron citrato y succinato (Figura 23 B y D), ya que con ellas el cianuro libre desapareció del sobrenadante en menos de 4 horas, alcanzando los cultivos finalmente una densidad óptica prácticamente idéntica con cianuro y con amonio (Figura 23). Asimismo cuando se usaron fumarato o piruvato, como fuentes de carbono, fue necesario que transcurrieran 8 hora para que el cianuro fuera consumido completamente (Figura 23 A y C). Estos tiempos, relativamente prolongados, permiten la evaporación de parte del cianuro y probablemente sean la razón de que el rendimiento celular (medido como densidad óptica final) sea menor en cultivos con cianuro que cuando se empleó amonio (Figura 23 A y C).

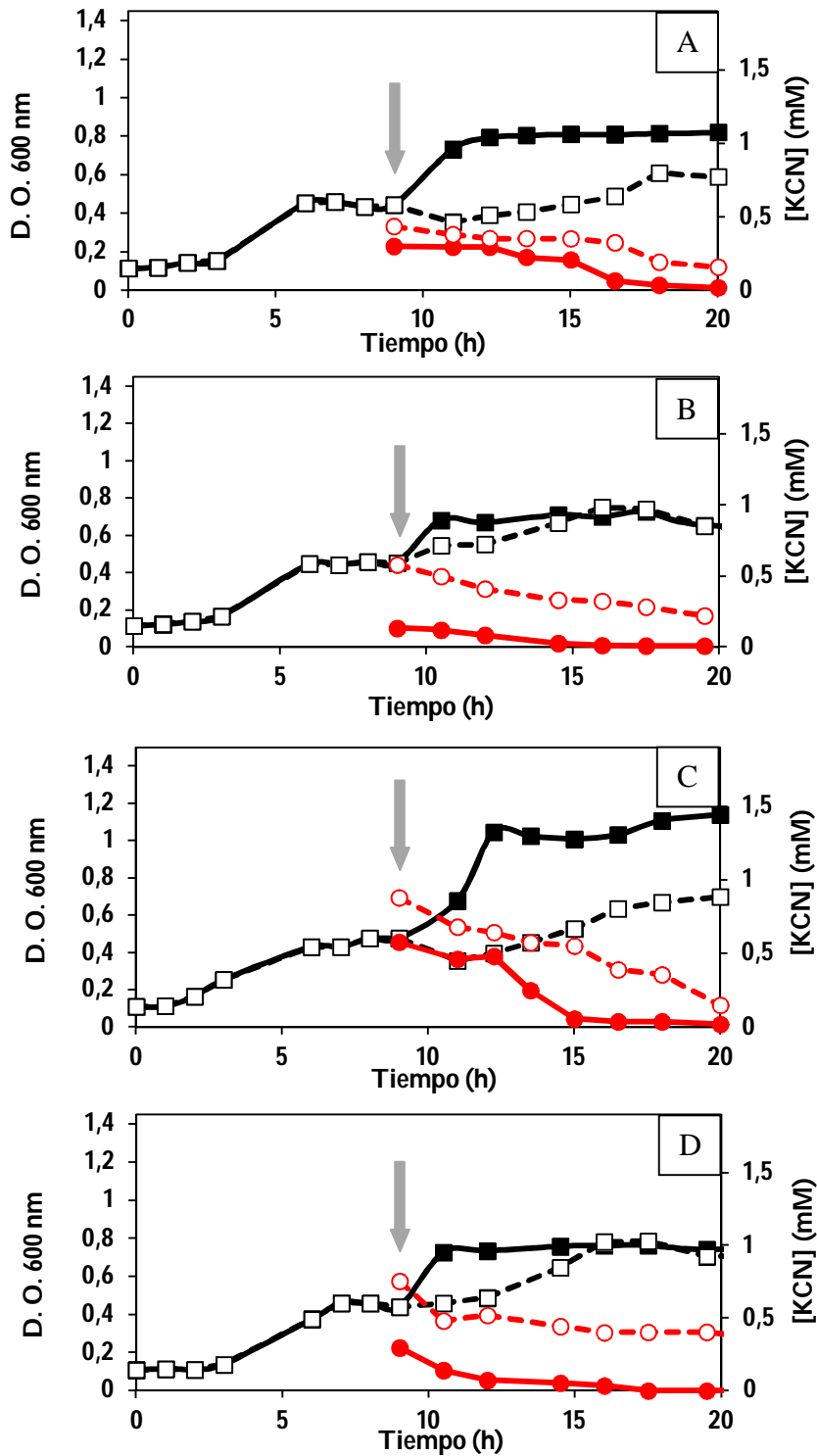


Figura 23. Efecto de la fuente de carbono sobre la asimilación de cianuro de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Las células se cultivaron en medio mínimo (M9) con 4 g/l de piruvato (A), succinato (B), fumarato (C) o citrato (D) como fuente de carbono y 2,0 mM de NH_4Cl como fuente de nitrógeno hasta la fase estacionaria ($\text{D.O.}_{600\text{nm}} \approx 0,4$). En este punto (flecha gris) cada cultivo se dividió en dos y se añadió KCN 2,0 mM o NH_4Cl 2,0 mM. El crecimiento bacteriano y la concentración de cianuro se determinaron a los tiempos indicados. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con cloruro amónico (■) y con KCN (□). Como control se utilizó el mismo medio sin inocular en el que se determinó la concentración de cianuro libre (○) de forma paralela a la del cultivo inoculado (●). En la figura se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares.

Los datos de la Figura 23 han sido utilizados para calcular las velocidades específicas de crecimiento, observando que para todas las fuentes de carbono estudiadas, éstas son mayores con cloruro amónico que con cianuro potásico, probablemente debido a la toxicidad del cianuro (Tabla 10). De los datos de la tabla 10 se puede concluir que, aunque *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 es capaz de utilizar succinato, piruvato, fumarato o citrato como fuentes de carbono para asimilar cianuro, éstas son sin duda menos provechosas que el DL-malato, hasta hora el compuesto más eficiente.

Tabla 10. Velocidad específica de crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Las células se cultivaron en medio mínimo (M9) con piruvato, succinato, fumarato, citrato, acetato o malato (4 g/l) como fuente de carbono y 2,0 mM de NH₄Cl como fuente de nitrógeno, hasta la fase estacionaria (D.O.₆₀₀ ≈ 0,4). Seguidamente cada cultivo se dividió en dos y se añadió KCN 2,0 mM o NH₄Cl 2 mM. La velocidad específica de crecimiento se determinó como la pendiente del ajuste lineal del tramo exponencial de la curva de crecimiento, y se representa como μ .

Compuesto	Velocidad específica de crecimiento (μ) con NH ₄ Cl	Velocidad específica de crecimiento (μ) con KCN
Piruvato	0,36	0,15
Succinato	0,33	0,12
Fumarato	0,44	0,12
Citrato	0,33	0,13
Acetato	0,34	0,11
DL-Malato	0,37	0,17

2.3 Utilización de ácidos grasos saturados como fuente de carbono por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

La formación de bioplásticos por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 podría ser un valor añadido a la degradación de cianuro. El octanoato sódico es un precursor para la síntesis de polihidroxicanoatos (PHAs) de cadena media (MCL) en *Pseudomonas oleovorans* (Ho *et al.*, 2007) y *P. putida* KT2440 (Le Meur *et al.*, 2012). La mayoría de las especies del género *Pseudomonas* pueden formar PHAs cuando se cultivan en medios que contienen alcanos o gluconato como fuente de carbono (Haywood *et al.*, 1990).

P. pseudoalcaligenes CECT 5344 R1 demostró ser capaz de utilizar el octanoato sódico como única fuente de carbono para su crecimiento si se cultiva con cloruro amónico como fuente de nitrógeno (Figura 24), sin embargo, no ocurrió lo mismo en el caso del decanoato sódico (resultados no mostrados). Además, como se aprecia en la figura 24, *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 mantuvo su capacidad de asimilar cianuro cuando la fuente

de carbono era el octanoato sódico ($\mu = 0,17 \text{ h}^{-1}$). Es importante destacar que el cianuro libre desapareció a lo largo del experimento (Figura 24), tanto en el medio inoculado como en el control sin inocular.

Las velocidades específicas de crecimiento máximas de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, en medios con cianuro como fuente de nitrógeno, fueron las alcanzadas cuando la fuente de carbono era octanoato sódico o DL-malato. Es decir, en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, tanto el DL-malato como el octanoato sódico constituyen las fuentes de carbono óptimas para la biodegradación de cianuro. No obstante, tal y como se ha indicado anteriormente, a la hora de optimizar el proceso hay que tener en cuenta factores como la velocidad de consumo de cianuro, el coste de las fuentes de carbono, el comportamiento de la bacteria en cultivos continuos, el efecto del pH, etc. Finalmente será un compromiso entre todas estas variables lo que indique cual es la fuente de carbono óptima en el proceso de biodegradación de cianuro.

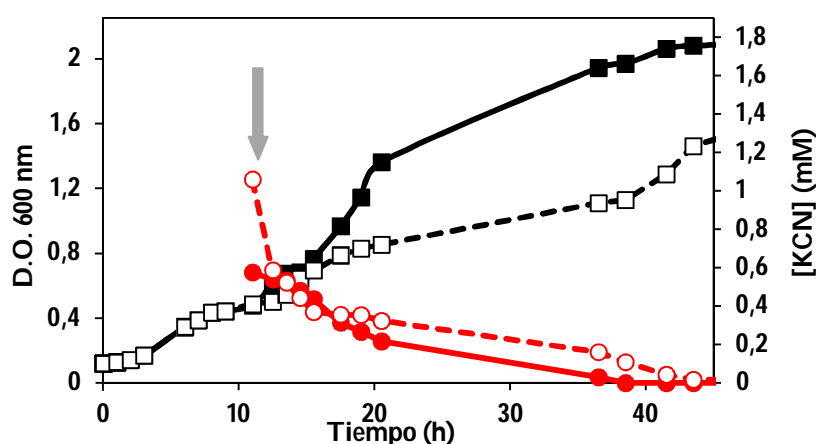


Figura 24. Efecto del octanoato sobre la asimilación del cianuro por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Las células se cultivaron en medio mínimo (M9) con octanoato sódico (4 g/l) como fuente de carbono y 2,0 mM de NH_4Cl como fuente de nitrógeno hasta la fase estacionaria de crecimiento ($\text{D.O.}_{600\text{nm}} \approx 0,4$). En este punto (flecha gris) cada cultivo se dividió en dos y se añadió KCN 2,0 mM o NH_4Cl 2,0 mM. El crecimiento bacteriano y la concentración de cianuro se determinaron a los tiempos indicados. (■) Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con octanoato + NH_4Cl . (□) Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con octanoato + KCN. Como control se utilizó un medio sin inocular en el que se determinó la concentración de cianuro libre (○) de forma paralela a la del cultivo inoculado (●). En la figura se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares.

Es importante destacar que el cianuro libre desaparecía a lo largo del experimento (Figura 24), tanto en el medio inoculado como en el control sin inocular.

2.4 Asimilación de compuestos aromáticos por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

2.4.1 Identificación de genes implicados en la asimilación de compuestos aromáticos por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

La secuenciación del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y su posterior anotación manual utilizando el programa *GenDB* (Meyer *et al.*, 2003) permitió la identificación de una agrupación génica homóloga a la relacionada con el metabolismo de compuestos aromáticos en otros organismos (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014).

La región, de unas 23 kb y 24 genes (*BN5_03547-BN5_03568*), está flanqueada por secuencias de inserción (ISSod6 transposasas, IS1301; ISRM3), lo que sugiere que ésta forma parte de un operón con un origen evolutivo común similar a operones implicados en el catabolismo presentes en algunos plásmidos transferibles. Un análisis detallado de las secuencias localizadas en dicha región indica que algunos de estos genes presentan un alto grado de identidad con otros previamente descritos y caracterizados por su implicación en la biodegradación de 2,3-dihidroxibenzoato en *P. reinekei* MT1 (*dhbA*, *dhbC*, *dhbD*, *dhbE*, *dhbG* y *dhbH*) (Marin *et al.*, 2012), 2-aminofenol en *B. xenovorans* LB 400 (*amnC*, *amnE*, *amnF*, *amnG* y *amnH*) (Chirino *et al.*, 2013) y tolueno en *P. putida* (*xylE*, *xylG*, *xylI*, *xylJ*, *xylK* y *xylQ*) (Tabla 11).

Tabla 11. Comparación de las secuencias BN5_03560-65 y BN5_03554 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con los genes implicados en la degradación de compuestos aromáticos de otros organismos. Se indican las homologías obtenidas mediante BLAST con los genes *xylEIJQ* del plásmido TOL pWWO de *P. putida*, los genes *dhbACDEG* de *P. reinekei* MT1, y los genes *amnCFHGE* de *B. xenovorans* LB400.

<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344		Productos génicos relacionados			
Gen	Tamaño del producto génico (aa)	Función probable	Organismo/ nombre del gen	% identidad aa	Nº acceso GenBank
<i>Ppsal_1072</i> (BN5_03565)	486	2-hidroximuconico semialdehído deshidrogenasa	<i>B. xenovorans</i> LB400 (<i>amnC</i>)	57	YP_559853.1
			<i>P. putida</i> (<i>xylG</i>)	70	NP_542865.1
			<i>P. reinekei</i> MT1 (<i>dhbC</i>)	69	AFN52423.1

Tabla 11. (Continuación)

<i>Ppsal_1071</i> (BN5_03564)	261	2-oxipenta-4-enoato hidratasa	<i>B. xenovorans</i> LB400 (<i>amnF</i>)	47	YP_559851.1
			<i>P. putida</i> (<i>xylJ</i>)	84	NP_542863.1
			<i>P. reinekei</i> MT1 (<i>dhbD</i>)	63	AFN52424.1
<i>Ppsal_1071</i> (BN5_03563)	312	Acetaldehído deshidrogenasa	<i>B. xenovorans</i> LB400 (<i>amnH</i>)	76	YP_559849.1
			<i>P. putida</i> (<i>xylQ</i>)	90	NP_542862.1
			<i>P. reinekei</i> MT1 (<i>dhbG</i>)	79	AFN52427.1
<i>Ppsal_1070</i> (BN5_03562)	342	4-hidroxi-2-cetovalerato aldolasa	<i>B. xenovorans</i> LB400 (<i>amnG</i>)	84	YP_559848.1
			<i>P. putida</i> (<i>xylK</i>)	87	NP_542861.1
			<i>P. reinekei</i> MT1 (<i>dhbH</i>)	89	AFN52428.1
<i>Ppsal_1069</i> (BN5_03561)	264	4-oxalocrotonato descarboxilasa	<i>B. xenovorans</i> LB400 (<i>amnE</i>)	38	YP_559850.1
			<i>P. putida</i> (<i>xylI</i>)	90	NP_542860.1
			<i>P. reinekei</i> MT1 (<i>dhbE</i>)	64	AFN52425.1
<i>Ppsal_1062</i> BN5_03554	285	catecol 2,3-dioxigenasa 2,3-dihidroxi- <i>p</i> -cumato-3,4-dioxigenasa	<i>P. putida</i> (<i>xylE</i>)	21	NP_542866.1
			<i>P. reinekei</i> MT1 (<i>dhbA</i>)	55	AFN52421.1

La comparación de las secuencias deducidas de aminoácidos de BN5_03560-65 y BN5_03554 con las de los ortólogos de otros microorganismos (Tabla 11) indicó que los valores de identidad más altos fueron los correspondientes a las secuencias deducidas de aminoácidos de los genes *xylE*, *xylI*, *xylJ*, *xylK* y *xylQ*, implicados en el metabolismo de catecoles a través la ruta *meta* y localizados en el plásmido TOL (*pWVO*) de *P. putida* (Burlage *et al.*, 1989; Greated *et al.*, 2002) (Figura 25). Además se ha identificado un gen (*BN5_03560*) contiguo *BN5_03561* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, que comparte un 60% de identidad con *XylF* de *P. putida*.

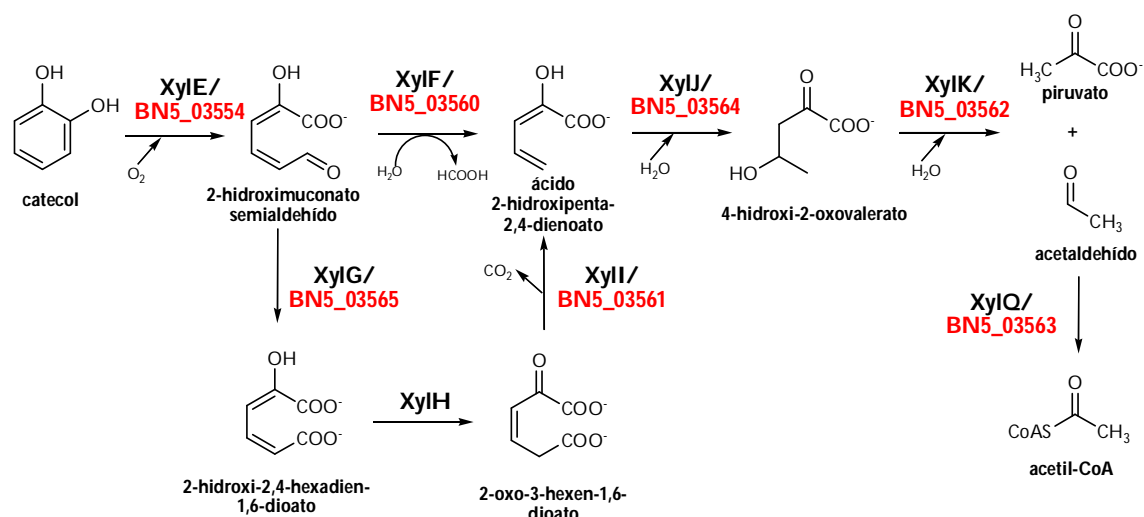


Figura 25. Catabolismo de catecol en *P. putida*. Los genes implicados en la degradación de catecol en *P. putida* codifican las siguientes enzimas: XylE, catecol 2,3-dioxigenasa; XylF, 2-hidroxi-2,4-hexadien-1,6-dioato hidrolasa; XylG, 2-hidroxi-2,4-hexadien-1,6-dioato deshidrogenasa; XylH, 4-oxocrotonato isomerasa; XylI, 4-oxocrotonato descarboxilasa; XylJ, 2-oxopent-4-enoato hidratasa; XylK, 2-oxohidroxipent-4-enoato aldolasa; XylQ, acetaldehído deshidrogenasa. Se muestran en rojo los ortólogos de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Esquema adaptado (Burlage *et al.*, 1989; Greated *et al.*, 2002).

A excepción de *xylH*, en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se han identificado homólogos de todos los genes implicados en el catabolismo de catecol en *P. putida* (Figura24).

Por otra parte, *P. reinekei* MT1 es capaz de degradar 2,3-dihidroxibenzoato y 2,3-dihidroxi-*p*-cumato mediante una vía de escisión en *meta*, en la que están implicados los productos del operón *dhbABCDEFGH* (Marin *et al.*, 2012). Este operón codifica las enzimas necesarias para la degradación de catecol o catecoles sustituidos con grupos alquilo (Harayama *et al.*, 1987). Se da la circunstancia de que los genes *BN5_03560-65* y *BN5_03554* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, homólogos a los genes *xyl* de *P. putida*, también comparten un alto grado de identidad con los genes *dhbA*, *dhbC*, *dhbD*, *dhbE*, *dhbG* y *dhbH* de *P. reinekei* MT1.

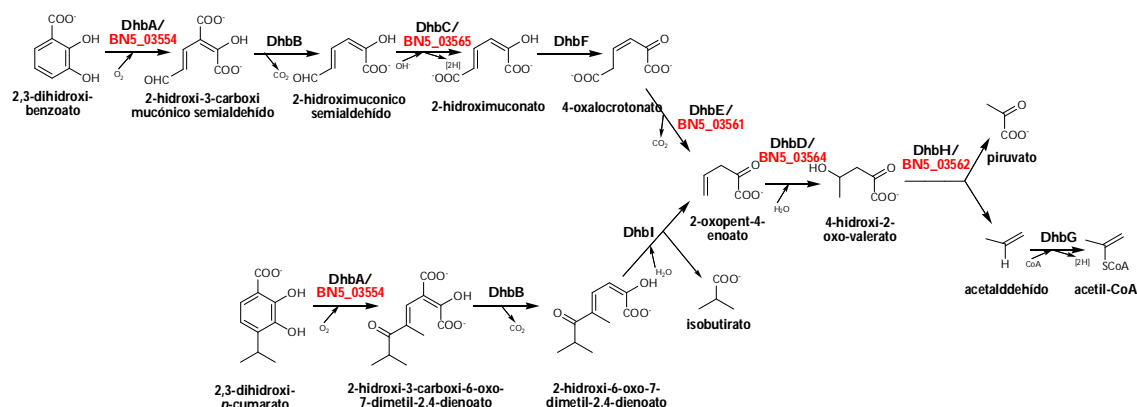


Figura 26. Genes implicados en el catabolismo de 2,3-dihidroxibenzoato y 2,3-dihidroxi-p-cumato en *P. reinekei* MT1. Los genes implicados en la degradación de 2,3-dihidroxibenzoato y 2,3-dihidroxi-p-cumato en *P. reinekei* MT1 codifican las siguientes enzimas: DhbA, 2,3-dihidroxibenzoato-3,4-dioxigenasa; DhbB, 2-hidroxi-3-carboximucónico semialdehído descarboxilasa; DhbC, 2-hidroxi-3-carboximucónico semialdehído deshidrogenasa; DhbD, 2-oxopenta-4-enoato hidratasa; DhbE, 2-oxocrotonato descarboxilasa; DhbF, 4-oxocrotonato isomerasa; DhbG, acetilaldehído deshidrogenasa; DhbH, 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa; DhbI, 2-hidroxi-3-carboximucónico semialdehído hidrolasa. Se muestran en rojo los ortólogos de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Esquema adaptado (Marin *et al.*, 2012).

En *B. xenovorans* LB 400 el operón *amn* (*amnRJBACDFEHG*) codifica las proteínas necesarias para catabolizar el 2-aminofenol (Chirino *et al.*, 2013). Los genes *BN5_03560-65* y *BN5_03554* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 también comparten homología con *amnC*, *amnE*, *amnF*, *amnG* y *amnH* de *B. xenovorans* LB 400, además de con genes *xyl* de *P. putida* y *dhb* de *P. reinekei* MT1, como se ha comentado anteriormente.

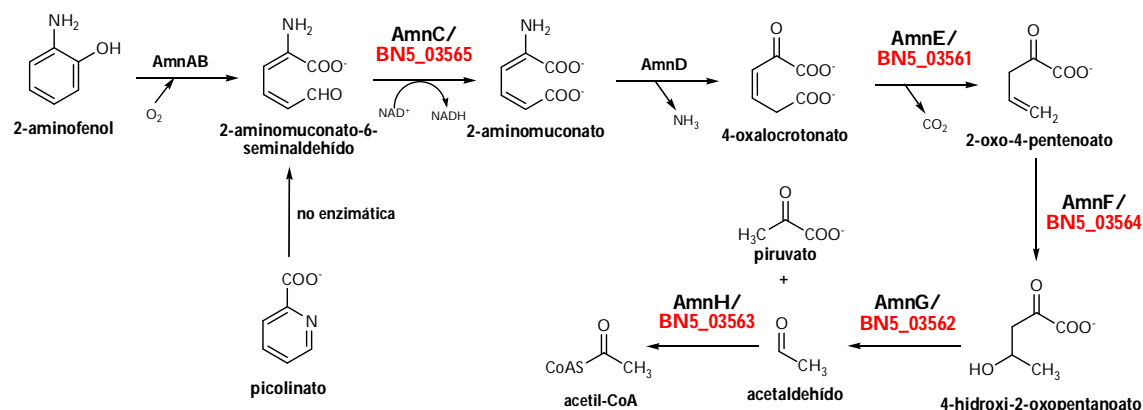


Figura 27. Genes implicados en el catabolismo de 2-aminofenol en *B. xenovorans* LB400. Los genes implicados en la degradación de 2-aminofenol en *B. xenovorans* LB400 codifican las siguientes enzimas: AmnAB, 2-aminofenol-1,6-dioxigenasa; AmnC, 2-aminomuconato-6-semialdehído deshidrogenasa; AmnD, 2-aminomuconato desaminasa; AmnE, 4-oxocrotonato descarboxilasa; AmnF, 2-oxo-4-enoato hidratasa; AmnG, 4-hidroxi-2-oxopentanoato piruvato liasa. AmnH, acetilaldehído deshidrogenasa. Se muestran en rojo los ortólogos de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. Esquema adaptado (Chirino *et al.*, 2013).

Aparte de la homología, el estudio de la sintenia génica puede resultar muy útil para inferir relaciones funcionales entre genes y el origen de un gen o grupo de genes. El término sintenia (del griego “sobre el mismo hilo”) apareció hace cuatro décadas para definir *loci* situados en el mismo cromosoma, estén o no genéticamente ligados. Desde entonces el uso del término ha evolucionado y se ha distanciado notablemente de la definición original. Por lo general, se refiere a *loci* genéticos de diferentes organismos situados en una región cromosómica de ascendencia evolutiva común. En un contexto genómico el término regiones sinténicas se refiere a que la secuencia y el orden de los genes se conserva entre dos especies estrechamente relacionadas.

En la figura 28 se representa la organización de los genes implicados (regiones sinténicas) en la degradación de compuestos aromáticos en *B. xenovorans* LB 400, *M. reinekei* MT1 y *P. putida* y sus ortólogos en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

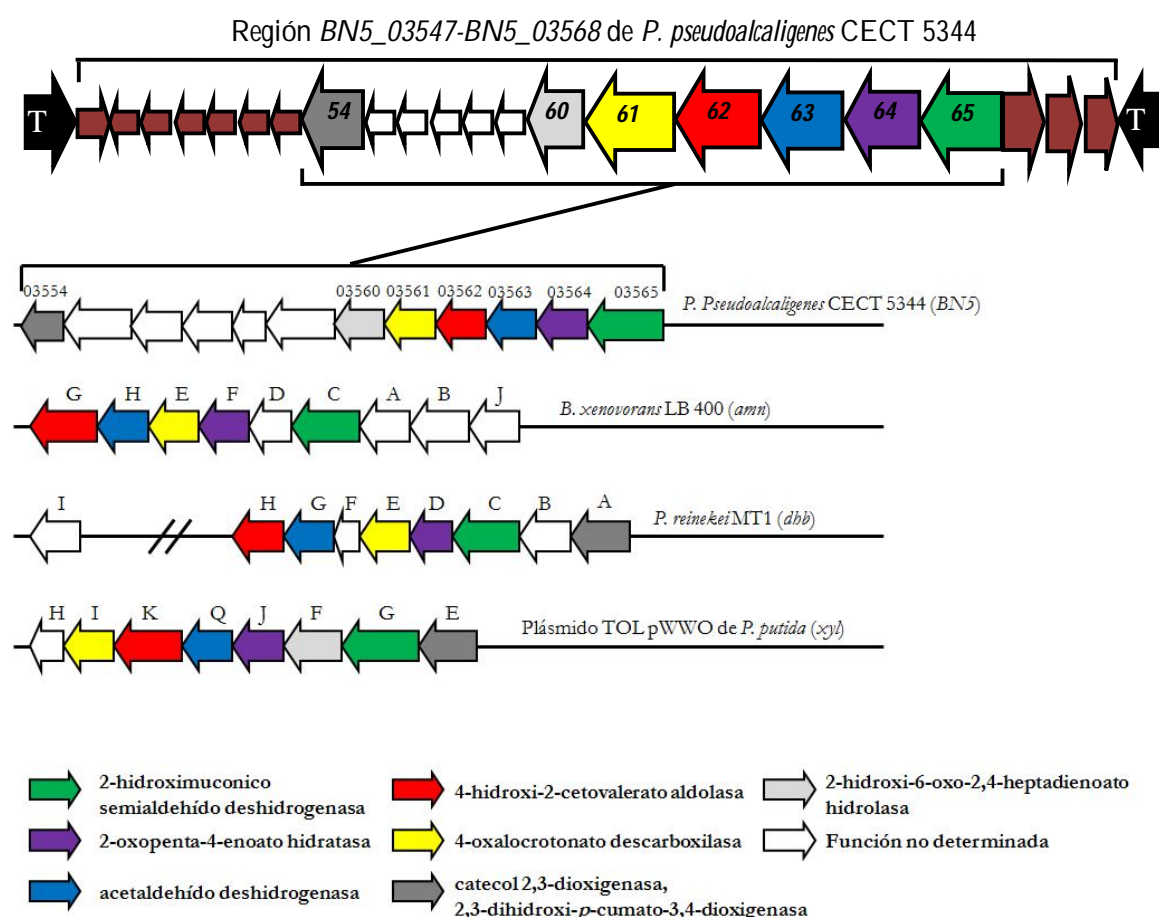


Figura 28. Sintenia de los genes de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 en comparación con otras bacterias. Comparación de la organización de los genes BN5_03560-65 y BN5_03554 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con los genes *dhb* de *P. reinekei* MT1, los genes *amn* de *B. xenovorans* LB 400 y los genes *xyl* de *P. putida*. Los colores de los diferentes genes hacen referencia a su función.

2.4.2 Asimilación de compuestos aromáticos por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

La semejanza, tanto en la organización estructural (Figura 28) como en la identidad de aminoácidos deducidos (Tabla 11), del gen *BN5_03554* y la región génica *BN5_03560-65* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 con los genes implicados en la degradación de 2-aminofenol en *B. xenovorans* LB400, catecol en *P. putida* y 2,3-dihidroxibenzoato *P. reinekei* MT1, nos hizo pensar que esta bacteria podría degradar compuestos aromáticos. Debido a que existe una gran cantidad de compuestos aromáticos cuyo metabolismo converge en las rutas más arriba descritas, y que además éstos pueden resultar tóxicos a concentraciones no muy elevadas, los ensayos de degradación *in vivo* con *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se realizaron en medios sólidos en gradiente de concentración de sustrato (Materiales y Métodos 2.1.2.1). De esta forma, se analizó, de un modo rápido y sencillo, la capacidad de esta bacteria para degradar una gran variedad de compuestos aromáticos. Los diferentes compuestos se depositaron en un extremo de la placa de Petri inoculada con la bacteria en un medio de cultivo sin fuente de carbono, permitiendo su difusión desde ese punto. En los casos en que la bacteria pudo utilizar estos compuestos, se observó un halo de crecimiento a partir de una determinada distancia, específica para cada compuesto. En estas condiciones se comprobó que la bacteria fue capaz de utilizar como fuentes de carbono; ácido benzoico, ácido vanílico, ácido cumárico, ácido quínico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido picolínico, ácido protocatecuico, catecol, , ácido 3-hidroxibenzoico, 2-aminofenol, ácido 2-aminobenzoico, furfural, alcohol furfúrico y ácido furoico. Además de como fuente de carbono, también pudo utilizar 2-aminofenol y ácido 2-aminobenzoico como únicas fuentes de nitrógeno para su crecimiento. Otros compuestos aromáticos tales como el ácido ferúlico, naftaleno, pireno, benceno, tolueno y nitrobenceno no permitieron el crecimiento de la bacteria. En la figura 29, se muestra el halo de crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 cuando se utilizó 2-aminofenol como única fuente de carbono.

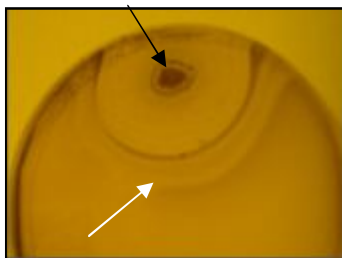


Figura 29. Utilización de 2-aminofenol como fuente de carbono por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. En el punto de la placa indicado con una flecha negra se añadieron unos cristales de 2-aminofenol. La placa, inoculada con la bacteria en un medio sin fuente de carbono, se incubó durante tres días, transcurridos los cuales se captó la imagen. La flecha blanca indica el halo de crecimiento bacteriano. En la zona entre las dos flechas no se observa crecimiento porque probablemente la concentración de 2-aminofenol sea tan elevada que no permita el crecimiento.

Capítulo 3.

Catabolismo de compuestos furánicos por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

3.1 Identificación de los genes *hmfA*, *hmfB*, *hmfC*, *hmfD* y *hmfE* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

En *C. basilensis* HMF14 se han identificado dos agrupamientos génicos implicados en el catabolismo de compuestos furánicos (Figura 30). Un operón contiene los genes *hmfABCDE*, que codifican la mayoría de las enzimas responsables de la degradación de ácido furoico hasta 2-oxoglutarato. El segundo operón contiene los genes *hmfFGH* implicados en la conversión de HMF a ácido furoico, a través del intermediario FDCA (Koopman *et al.*, 2010a).

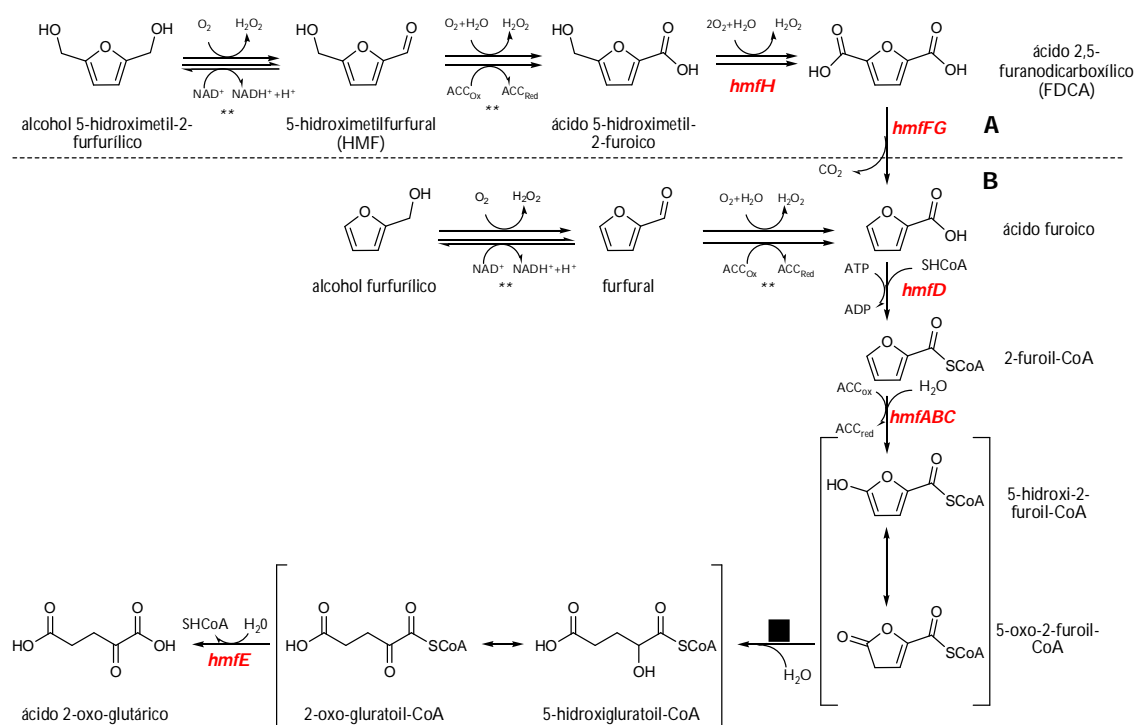


Figura 30. Ruta catabólica de HMF (A) y furfural (B) en *C. basilensis* HMF14. Los genes implicados en la degradación de furfural e HMF codifican las siguientes enzimas: HmfFG, descarboxilasa del ácido 2,5-furanodicarboxílico; HmfD, 2-furoil CoA sintetasa; HmfABC, furoil CoA deshidrogenasa; HmfE, 2-oxoglutaroil CoA hidrolasa. Las reacciones marcadas con ** pueden ser catalizadas por HmfH o por deshidrogenasas inespecíficas. ■ Indica una hidrólisis de lactona que puede ocurrir espontáneamente, o puede ser catalizada por una lactona hidrolasa específica. Las reacciones entre paréntesis indican tautomerizaciones cetoenólicas. ACC, aceptor-donador de electrones en forma oxidada (ox) o en forma reducida (red). Esquema adaptado (Koopman *et al.*, 2010a; Trudgill, 1969).

En *C. basilensis* HMF14, HmfD codifica una furoil-CoA sintetasa que cataliza la activación, dependiente de ATP, de ácido furoico a 2-furoil-CoA. HmfABC es una heterotrímero con actividad deshidrogenasa dependiente de molibdeno que cataliza la oxidación del 2-furoil-CoA a 5-hidroxi-2-furoil-CoA, siendo HmfA la subunidad grande,

HmfB la subunidad mediana y HmfC la subunidad pequeña (2Fe-2S). La proteína HmfE fue anotada como perteneciente a la familia de enzimas enoil-CoA hidrolasas/isomerasas (Hawes *et al.*, 1996; Holden *et al.*, 2000). Sin embargo, en *C. basilensis* HMF14, HmfE parece funcionar como 2-oxoglutaril-CoA hidrolasa, catalizando la hidrólisis del 2-oxoglutaril-CoA a ácido 2-oxo-glutárico (Koopman *et al.*, 2010a).

Durante el proceso de anotación manual del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se identificó una agrupación génica homóloga a la compuesta por los genes *hmfA*, *hmfB*, *hmfC*, *hmfD* y *hmfE*, involucrada en la degradación de furfural en *C. basilensis* HMF14, y cuyos productos génicos catalizan en este microorganismo la mayoría de las reacciones de la ruta de conversión de ácido furoico hasta 2-oxoglutarato (Koopman *et al.*, 2010a). Sin embargo, no se detectaron genes homólogos a los genes *hmfF*, *hmfG* y *hmfH* responsables de la degradación de HMF hasta ácido furoico (intermediario metabólico en la degradación de furfural) en *C. basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a). Genes ortólogos a éstos se han encontrado en un número relativamente limitado de bacterias Gram-negativas pertenecientes a los géneros *Cupriavidus*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Acidiphilium*, *Dinoroseobacter*, y *Methylobacterium* (Green y Bousfield, 1983; Pohlmann *et al.*, 2006).

El entorno génico de estos genes en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se muestra en la figura 31.

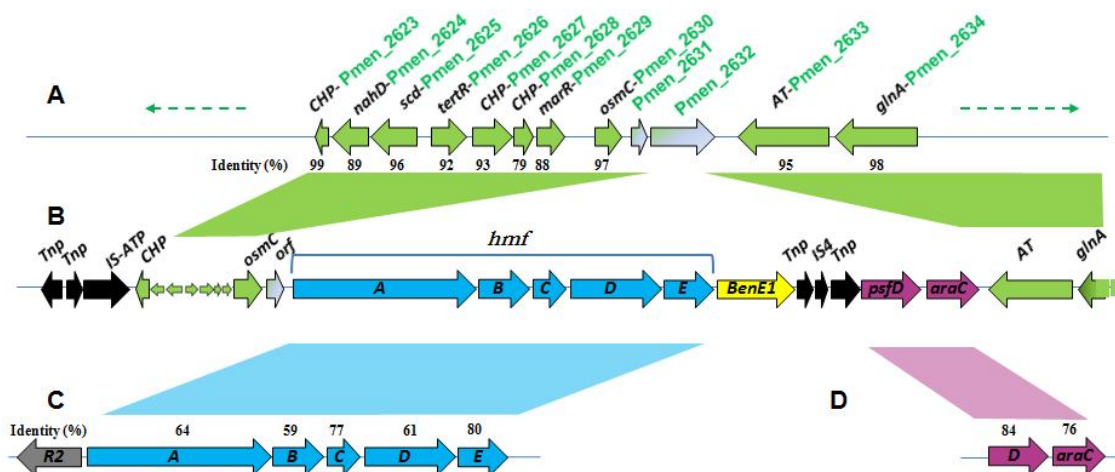


Figura 31. Esquema de una región de 16 kb del cromosoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 en la que se encuentra el operón *hmfABCDE*. Los genes representados en el centro del esquema (B) corresponden a la región génica entre las posiciones 2327934 y 2344010 del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Los genes que flanquean las secuencias codificantes de las proteínas HmfA, HmfB, HmfC, HmfD y HmfE (en azul) codifican las siguientes proteínas; Ohr, proteína de resistencia a hidroperóxidos orgánicos, BenE1, posible transportador de benzoato, Tnp e IS4, posibles transposasas y genes implicados en movilidad genética. Los genes en verde son homólogos a los genes de *Pseudomonas mendocina* ymp localizados en la región Pmen_2623 a Pmen_2634 (A). El porcentaje de identidad de estos genes homólogos se indica debajo de cada uno. Los genes en azul (C) son homólogos al operón *hmfABCDE* implicado en la asimilación de furfural en *C. basiliensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a), mientras que los genes violeta (D) son homólogos a los involucrados en la asimilación de furfural en *P. putida* Fu1 (Nichols y Mertens, 2008). El gen *benE1*, que no se encuentra presente en los genomas de *C. basiliensis* HMF14 y *P. putida* Fu1, tiene una identidad del 82 % con el gen codificante de un posible transportador de benzoato en *Alcanivorax dieselolei* B5 (YP_006821461.1). Esquema adaptado (Luque-Almagro *et al.*, 2013).

En la vecindad de los genes *hmf* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, se encuentran secuencias relacionadas con la movilidad genética (Figura 31), lo que sugiere que el operón se ha insertado mediante transferencia horizontal. Además, todos los genes presentes en la región entre BN5_02211 (*orf*) y BN5_02200 (*araC*), con la excepción de *psfD* y *benE1* (Figura 31), son únicos (*singletons*) con respecto a los genomas de la mayoría de las *Pseudomonas*. En el caso de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, agrupado con los genes *hmf* se ha identificado el gen *benE1* (BN5_02205), que no ha sido descrito en otras cepas bacterianas degradadoras de furfural. Homólogos a *benE1* se han identificado en bacterias como *Alcanivorax dieselolei* B5 (YP_006821461.1) y *Arhodomonas aquaeolei* (WP_018719425.1) entre otras (Figura 43). Aunque se desconoce su función, BenE1 muestra los dominios característicos de la familia de transportadores de benzoato. Estos datos han motivado el interés por el estudio de la función de este gen y abre la posibilidad de que ésta pueda estar relacionada con el proceso de asimilación de furfurales. La hipótesis de partida es que la

proteína funcione como un transportador de ácido furoico, puesto que, además de ser moléculas con tamaños similares, ambos son aniones monovalentes aromáticos. La arquitectura de este locus, junto con la presencia de elementos genéticos móviles, sugiere fuertemente que este grupo de genes relacionados con la asimilación de compuestos furánicos ha sido horizontalmente transferido a *P. Pseudomonas* CECT 5344.

Hay que destacar que en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se ha identificado otro gen (BN5_02086), anotado como *benE2*, con ortólogos en la mayoría de las especies de *Pseudomonas* y perteneciente también a la familia de transportadores de benzoato. En *P. putida* KT2440 los genes *benF*, *benK*, *benE2* y *benE1* codifican proteínas pertenecientes a la superfamilia de transportadores de benzoato; BenK, BenE2 y BenE1 funcionan como transportadores para introducir el benzoato al interior, mientras que BenK lo hace como una bomba de eflujo de benzoato. El 31% de los aminoácidos de BenE1 y Ben E2 son idénticos (Nishikawa *et al.*, 2008), algo que ocurre también con los productos génicos de *benE1* y *benE2* en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. En *P. putida* KT2440, *benE2* forma parte de un operón implicado en la degradación de benzoato a catecol, mientras que *benE1* se localiza en otra región de cromosoma bacteriano (Cowles *et al.*, 2000). Sin embargo, en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 tanto *benE1* como *benE2* se localizan en entornos génicos diferentes a los encontrados para estos genes en *P. putida* KT2440 y otras *Pseudomonas*.

En las bacterias capaces de catabolizar furfural, tanto las secuencias como el orden en que se organizan los genes *hmfABCDE* están muy conservados (Wierckx *et al.*, 2011). El alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes *hmfA*, *hmfB*, *hmfC*, *hmfD* y *hmfE* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con las secuencias presentes en las bases de datos, indica que éstas exhiben una elevada semejanza con las de los genes homólogos de *C. basilensis* HMF14 y varias especies de *Burkholderia*, *Ralstonia* y *Pseudomonas*, (Figuras 32, 34, 36, 38 y 40), lo que sugiere que estas proteínas podrían tener una función similar a la descrita en *C. basilensis* HMF14.

```

1      10      20      30      40      50      60
Reut.  ..MKRFDAGETTGTVQETQET...RQAPHVGRMARVEDAAAILTCGRYADDLGVKPGTLHAALIRSPHA
Rpic.  ..MKRFDAGETTGTGAQETQQT...TGOPYVGRMORVEDAAAILTCGRYADDIGVKPGTLHAALIRSPHA
Cbas.  MSDKRSLPAAAAAIIHLESAAAGAASRQHVGRSERLEDAAILTCGRYADDLGVKPGTLHAALIRSPHA
Bxen.  .....MORLEDAAILTCGRYADDIGVKPGTLHAALIRSPHA
Ppsal. ....MNLVQDPVPTQHSG.....HIGARQTRVEDAALLRGLGCYADDAATPGTLHAALIRSPHE
PUW4.  ..MTSFQPLATESQTG.....HIGARQTRVEDAALLRGLGCYADDAATPGTLHAALIRSPHA

70     80     90     100    110    120    130
Reut.  HAELG AIDFAAALKVEGVRAVLTAAADLPAWSRPEVVGKAPMEOWALAMDVRVRYGEPVAVVVAESRALTA
Rpic.  HAELGLIDFAAALKAPGVRAVLTGADLPAWSRPEVVGKAPMEOWALAMDVRVRYGEPVAVVVAESRALTA
Cbas.  HAELGTIDATAAALAAPGVHAVLTGADLPAWSRPEVVAKSPMEOWALAMDVRVRYGEPVAVVVAESRALTA
Bxen.  HAELVTSIDTDAAKLFGVRAITLTRDDLRAWSRPEVVGKSPMEOWALAMDVRVRYGEPVAVVVAESRALTA
Ppsal. HARITAVDFSKALLMRGVHGVLTIGEDKRWALPEVVGVRQPMERWCIAVDRVRYGEPVAVVVAESRYLTA
PUW4.  HARITAVDFSKALLMRGVHGVLTIGEDVYRWRALPEVVGVRQPMERWCIAVDRVRYGEPVAVVVAESRYLTA

140    150    160    170    180    190    200
Reut.  EDALDLVRRVYRALSPEVVSIEAAVAGDAPVLHSGLGSNVASDRHFRYGDPEAAFAAAPHRVTLTAHYPRN
Rpic.  EDALDLVRRVYRVLPEVVSIEAAIADAPQLHSGLGSNVASDRHFRYGDPEAAFAAAPHRVTLTAHYPRN
Cbas.  EDALDLVRRVYRVLPEVVSIEAALADAPILHFGVGANVSDRHFERYGEPAAFAAAPHRVTLTAHYPRN
Bxen.  EDALDLKVEYATLPEVVSIEQAASDQSPVLHEKVGSNVSDRHFERYGEPAAFAAAPHRVTLTAHYPRN
Ppsal. EDALEGVRVYEPLEPIIDPEAATTEQAPVLHCAVGSNVVNERHFERYGEPAAFAAAPHRVTLKVSFPRS
PUW4.  EDALEGVRVYEPLEPIIDPELATAEQAPEILHCAVGSNVVNERHFERYGEPAAFAAAPHRVTLKVSFPRS

210    220    230    240    250    260    270
Reut.  TCTPTECGVVIAEHLPGDEGVVTSNFMGPFSLHAYMAMALQVPANRLRHVAPRDSGGSFQKQAVFPYV
Rpic.  TCTPTECGVVIAEHLPGNEGVVTSNFMGPFSLHAYMAMALQVPANRLRHVAPRDSGGSFQKQAVFPYV
Cbas.  TCTPTECGVVIAEHLPGDEGVVTSNFMGPFSLHAYMAMALQVPANRLRHKAPRDSGGSFQKQAVFPYA
Bxen.  SCAPTECGVVIAEYLAGDEGVVTSNFMGPFSLHAYMAMALNVPANRLRHKAPRDSGGSFQKQAVFPYV
Ppsal. SCTPTECGVVIQAQYERATGIVVLANPQGPYALHTVMARALNVGNRLRLRTPKDSGGSFQKQAVFPYV
PUW4.  SCTPTECVVVIQAQYERATGIVVLANPQGPYALHTVMARALNVGNRLRLRTPKDSGGSFQKQAVFPYV

280    290    300    310    320    330    340
Reut.  VLMGLASRRKAGAPVKWVEDRLEHLSAATSATARLSTLEAAVEADGRIVALSYDQLEDCGGYLRAPEPATF
Rpic.  VLMGLASRRKAGAPVKWVEDRLEHLSAATSATARLSTLEAAVEADGRIVALSYDQLEDCGGYLRAPEPATF
Cbas.  VLMGLASRRKAGAPVKWVEDRLEHLSAATSATARLSTLEAAVESDGRIKALSYDQLEDCGGYLRAPEPATF
Bxen.  VLMGLASRRKAGAPVKWVEDRLEHLSAATSATARVSTLEAAVESDGRITALEYDQLEDCGGYLRAPEPATF
Ppsal. VMMGLAARRVAGAPVKWVEDRLEHLQGAASSATNRVTEIEAAVQADGRITALEYDQIDDCGAYLRAPEPATF
PUW4.  VMMGLASRRVAGAPVKWVEDRLEHLQGAASSATNRVTEIEAAVEADGRITALEYDQIDDCGAYLRAPEPATF

350    360    370    380    390    400    410
Reut.  YRMHGLTGAYAIPLNLLVRNRVLLTNKTFPTGLVRGFGGPOVYFALERLVRITAVELNLDPLDVIYRRNFVE
Rpic.  YRMHGLTGAYAIPLNLLVRNRVLLTNKTFPTGLVRGFGGPOVYFALERLVRITAVELNLDPLDVIYRRNFVE
Cbas.  YRMHGLTGAYAIPLNLLVRNRVLLTNKTFPTGLVRGFGGPOVYFALERLVRITAVELNLDPLDVIYRRNFVA
Bxen.  YRMHGLTGAYAIPLNLLVRNRVLLTNKTFPTGLVRGFGGPOVYFALERLVRITAVELNLDPLDVIYRRNFVA
Ppsal. YRMHGNLTGAYAIRNLLVRNRVLLTNKTFPTGLVRGFGGPOVYFALERLLQITAVQLNLDPLDVIYRRNFVE
PUW4.  YRMHGNLTGAYAIRNLLVRNRVLLTNKTFPSGLNVRGFGGPOVYFALERLLQITAVQLNLDPLDVIYRRNFVE

420    430    440    450    460    470    480
Reut.  ADAFYRAAAGALLDSGNYQALAMSRALAEACAYDELKRRRDAARAEGRLYGIGFAAIVEPSVSNMGYITTA
Rpic.  TNAFFYRAAAGALLDSGNYQALAMSRALAEACAYDELKRRRDAARAEGRLYGIGFAAIVEPSVSNMGYITTA
Cbas.  ADAFYRAAAGALLDSGNYQALALARALEEGGYELKRRRDAARAEGRLYGIGFAAIVEPSVSNMGYITTA
Bxen.  ADAFYRAAAGALLDSGNYQALARRALDEGGYELLRRAARAEGRLYGIGFAAIVEPSVSNMGYITTV
Ppsal. ADAFYRAAAGALLDSGNYQAGITDLAVKDGGLDELLRRRDAARAEGRLYGIGYAAVIEPSISNMGYITTA
PUW4.  ADAFYQAAAGALLDSGNYQAGITLALATDGGLEDLKRDRDQARAEGRLYGIGYAAVIEPSISNMGYITTA

490    500    510    520    530    540    550
Reut.  TPAEARRKAGPKNGAIASATVSDLLGCVVVTIASTPAGQGHMTVCQAQVADVVLGIDPADVAVNVEFDTH
Rpic.  TPAEARRKAGPKNGAIASATVSDLLGCVVVTIASTPAGQGHMTVCQAQVADVVLGIDPADVAVNVEFDTH
Cbas.  MPAEARRKAGPKNGAIASATVSDLLGCVVVTIASTPAGQGHMTVCQAQVADVVLGVPADVAVNVEFDTH
Bxen.  MPAEARRKAGPKNGAIASATVSDLLGCVVVTIASTPAGQGHMTVCQAQVADVVLGVPADVAVNVEFDTH
Ppsal. MMPEARRKAGPKNGAVSTATINVGPLGDSVSVHVSSTPQGGHMTAVQAQVADVVLGVALESIVNVELDTQ
PUW4.  MTSEARRKAGPKNGAVATATINVGPLGDSVSVHVSSTPQGGHMTAVQAQVADVVLGVALESIVNVELDTQ

560    570    580    590    600    610    620
Reut.  KDAWSVAAGNYSRRFAGAVACTVHLAATRVRRDKLARIIVASHLRCDPAELVFTNGCTARKSASPD TALPFA
Rpic.  KDAWSVAAGNYSRRFAGAVACTVHLAATRVRRDKLARIIVASQLDCDPAELVFAEGRIARRDAPETAVVFA
Cbas.  KDAWSVAAGNYSRRFAGAVACTVHLAARVRRDKLARIIVAFQFGCTPAEVVFDGRIARRGAPESGLPET
Bxen.  KDAWSVAAGNYSRRFAGAVACTVHLAARVRRDKLARIIVSKQLGCAFEDVCPAEGRIYAKGABDRQAPFG
Ppsal. KDAWSIASGNYSRRFAGAVACTVYQAALKVRDRDLAATAAAQLQARBEDIRGGGRIFVANGGSA...AFH
PUW4.  KDAWSIASGNYSRRFAGAVACTVYKAALKIRDRDLAKTAAEQQAQSEDIRRAGGRIFVANGGVA...PEH

```

(Continuación Figura 32)

Resultados y Discusión

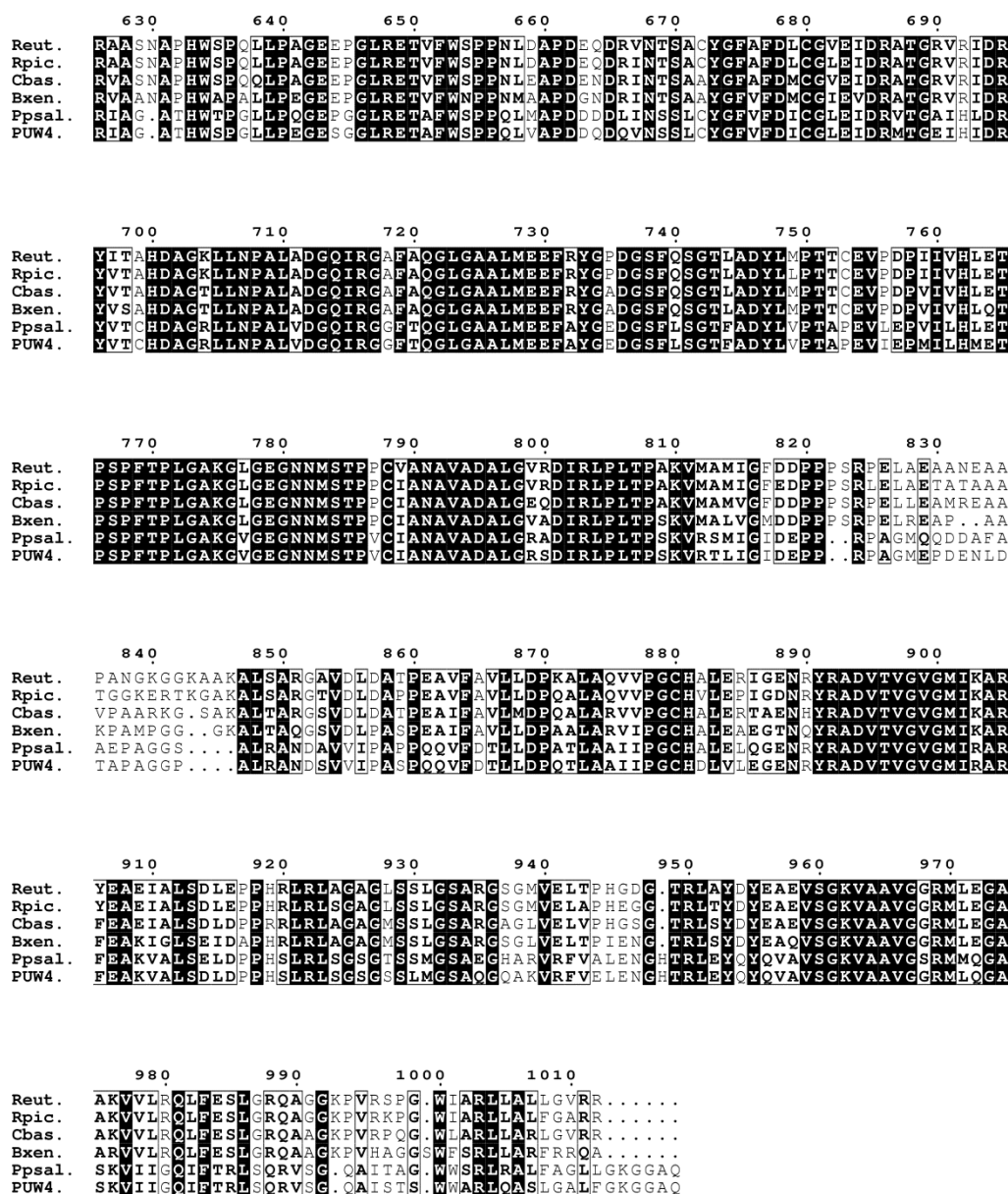


Figura 32. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de HmfA. La búsqueda de homología entre las diferentes secuencias se realizó con el programa BLAST. El alineamiento múltiple se construyó utilizando el método NJ (“Neighbor–Joining”) (Larkin *et al.*, 2007). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al GenBank de cada una de ellas: REUT para (YP_293090.1) *R. eutropha* JMP134, RPIC para (YP_002981699.1) *Ralstonia pickettii* 12D, CBAS para (ADE20399.1) *C. basilensis* HMF14, BXEN para (YP_558947.1) *B. xenovorans* LB400, PPSAL para (WP_003461290.1) *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y PUW4 para (YP_007029625.1) *Pseudomonas* sp. UW4.

El análisis filogenético de HmfA reveló un claro agrupamiento de varias especies de *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Burkholderia* (Figura 33), siendo la más cercana a *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 la proteína de *Pseudomonas* sp. UW4.

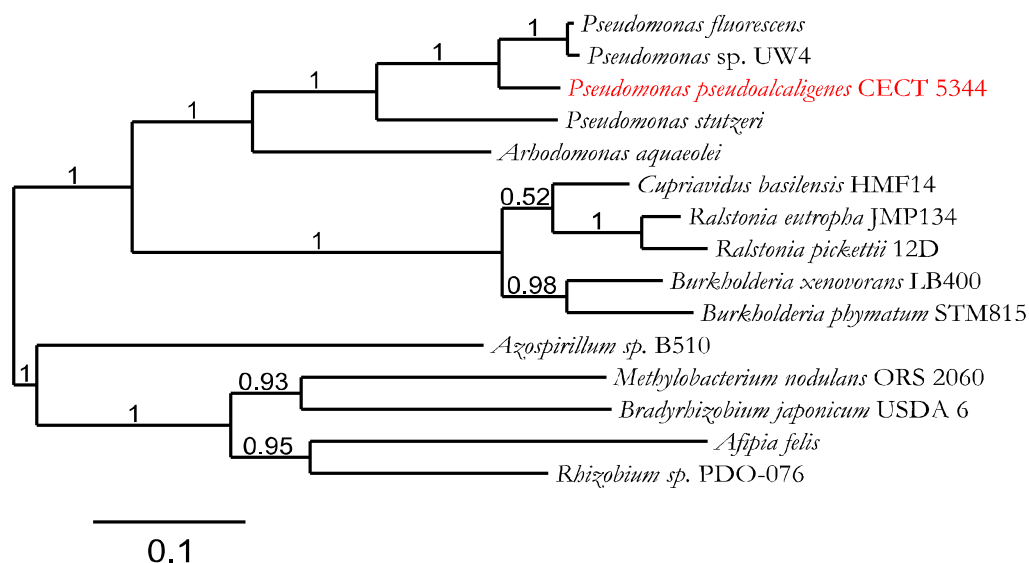


Figura 33. Análisis filogenético de HmfA de diferentes microorganismos. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de HmfA y el árbol filogenético se realizó usando el servidor Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al *GenBank* de cada una de las proteínas de los diferentes microorganismos: *P. fluorescens* (WP_017338507.1), *Pseudomonas sp.* UW4 (YP_007029625.1), *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (WP_003461290.1), *P. stutzeri* (WP_003295915.1), *A. aquaeolei* (WP_018719430.1), *C. basilensis* HMF14 (ADE20399.1), *R. eutropha* JMP134 (YP_293090.1), *R. pickettii* 12D (YP_002981699.1), *B. xenovorans* LB400 (YP_558947.1), *B. phymatum* STM815 (YP_001862744.1), *Azospirillum sp.* B510 (YP_003451177.1), *M. nodulans* ORS 2060 (YP_002498522.1), *B. japonicum* USDA 6 (YP_005611034.1), *A. felis* (WP_002717735.1) y *Rhizobium sp.* PDO-076 (WP_007596264.1). Los valores de la escala representan el grado de diferencia entre las secuencias (0,1 muestra una diferencia del 10% entre dos secuencias).

La secuencia de aminoácidos deducida del gen *hmfA* *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 indicó que se trata de una proteína de 1.000 aminoácidos, con un punto isoeléctrico teórico de 6,225 y una masa molecular de 106,8 kDa.

Resultados y Discusión

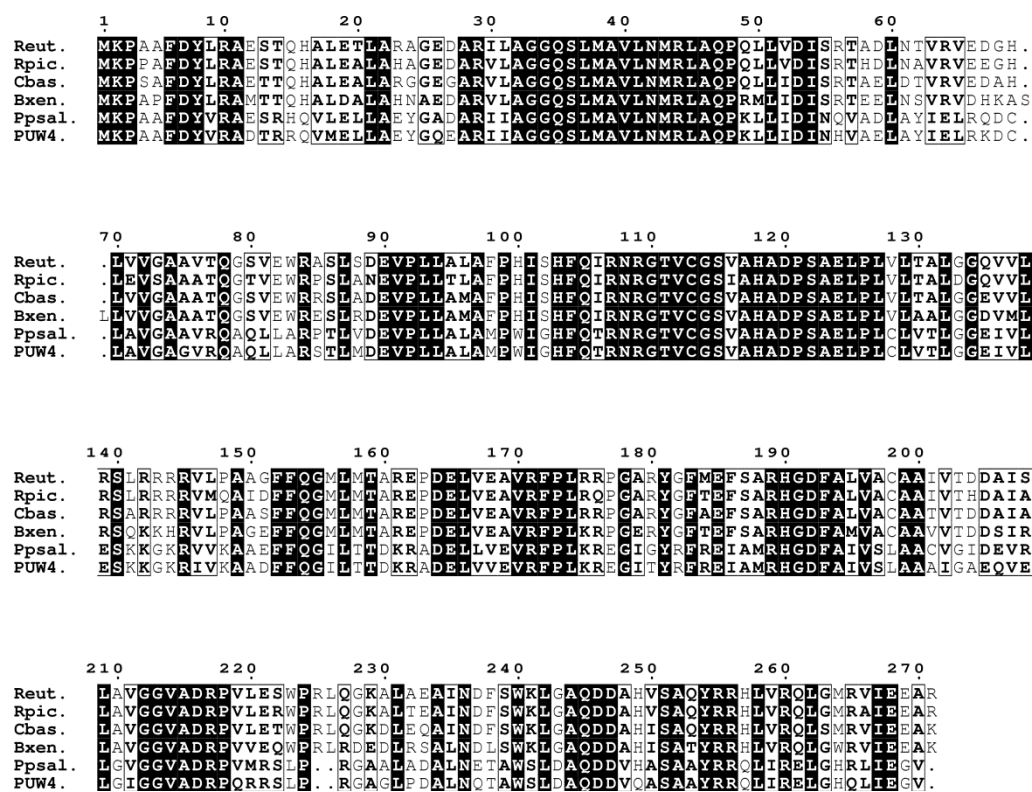


Figura 34. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de HmfB. La búsqueda de homología entre las diferentes secuencias se realizó con el programa BLAST. El alineamiento múltiple se construyó utilizando el método NJ ("Neighbor-Joining") (Larkin *et al.*, 2007). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al GenBank de cada una de ellas: REUT para (YP_293089.1) *R. eutropha* JMP134, RPIC para (YP_002981700.1) *R. pickettii* 12D, CBAS para (ADE20400.1) *C. basilensis* HMF14, BXEN para (YP_558946.1) *B. xenovorans* LB400, PPSAL para (WP_003461288.1) *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y PUW4 para (YP_007029624.1) *Pseudomonas sp.* UW4.

El árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento múltiple (CLUSTALW) de las secuencias de aminoácidos de HmfB de diversos organismos y varias especies de *Pseudomonas*, incluida *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 (Figura 35), siendo también en este caso la más la proteína de *Pseudomonas sp.* UW4 la más cercana.

La secuencia de aminoácidos deducida del gen *hmfB* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 indicó que se trata de una proteína de 268 aminoácidos, con un punto isoeléctrico teórico de 6,725 y una masa molecular de 29,2 kDa.

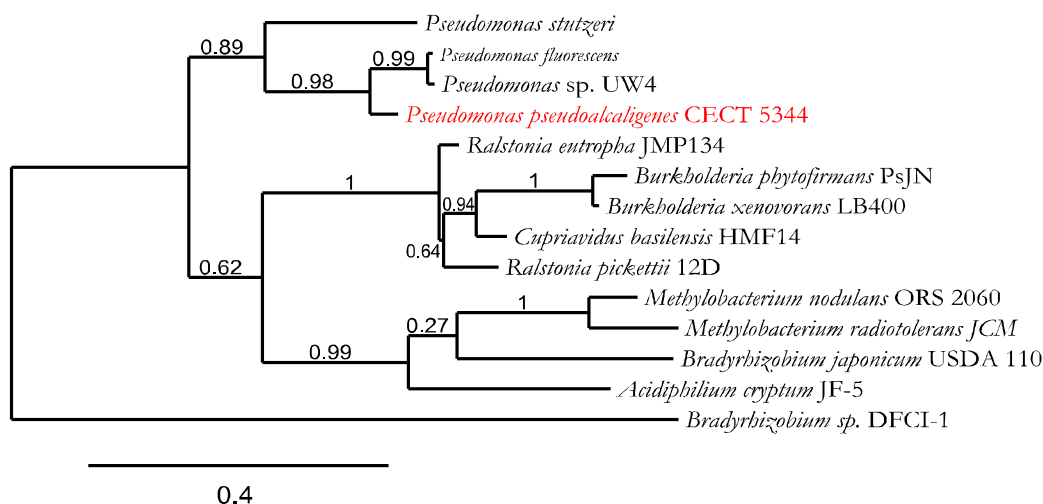


Figura 35. Análisis filogenético de HmfB de diferentes microorganismos. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de HmfB y el árbol filogenético se realizó usando el servidor Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al *GenBank* de cada una de las proteínas de los diferentes microorganismos: *P. stutzeri* (WP_003295917.1), *P. fluorescens* (WP_017338508.1), *Pseudomonas sp.* UW4 (YP_007029624.1), *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (WP_003461288.1), *R. entropba* JMP134 (YP_293089.1), *B. phytofirmans* PsJN (YP_001895808.1), *B. xenovorans* LB400 (YP_558946.1), *C. basilensis* HMF14 (ADE20400.1), *R. pickettii* 12D (YP_002981700.1), *M. nodulans* ORS 2060 (YP_002498523.1), *M. radiotolerans* JCM 2831(YP_001757368.1), *B. japonicum* USDA 110 (NP_770174.1), *A. cryptum* JF-5 (YP_001233809.1) y *Bradyrhizobium sp.* DFCI-1 (WP_021080417.1). Los valores de la escala representan el grado de diferencia entre las secuencias (0,4 muestra una diferencia del 40% entre dos secuencias).

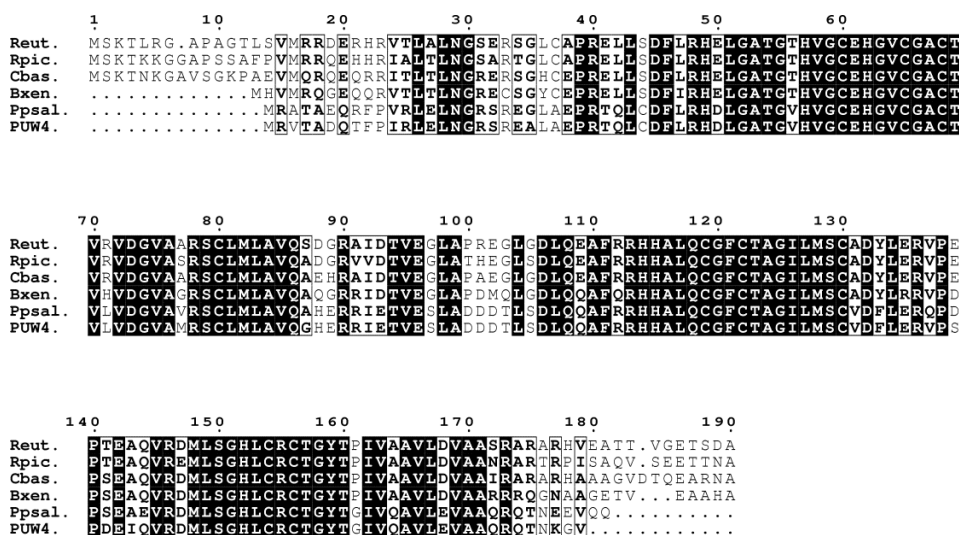


Figura 36. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de HmfC. La búsqueda de homología entre las diferentes secuencias se realizó con el programa BLAST. El alineamiento múltiple se construyó utilizando el método NJ (“Neighbor-Joining”) (Larkin *et al.*, 2007). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al *GenBank* de cada una de ellas: REUT para (YP_293088.1) *R. entropba* JMP134, RPIC para (YP_002981701.1) *R. pickettii* 12D, CBAS para (ADE20401.1) *C. basilensis* HMF14, BXEN para (YP_558945.1) *B. xenovorans* LB400, PPSAL para (WP_003461286.1) *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y PUW4 para (YP_007029623.1) *Pseudomonas sp.* UW4.

El análisis filogenético de HmfC reveló un claro agrupamiento con varias especies de *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Burkholderia* (Figura 37), siendo la más cercana a *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 la proteína de *Pseudomonas* sp. UW4.

La secuencia de aminoácidos deducida del gen *hmfC* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 indicó que se trata de una proteína de 168 aminoácidos, con un punto isoeléctrico teórico de 5,154 y una masa molecular de 18,5 kDa.

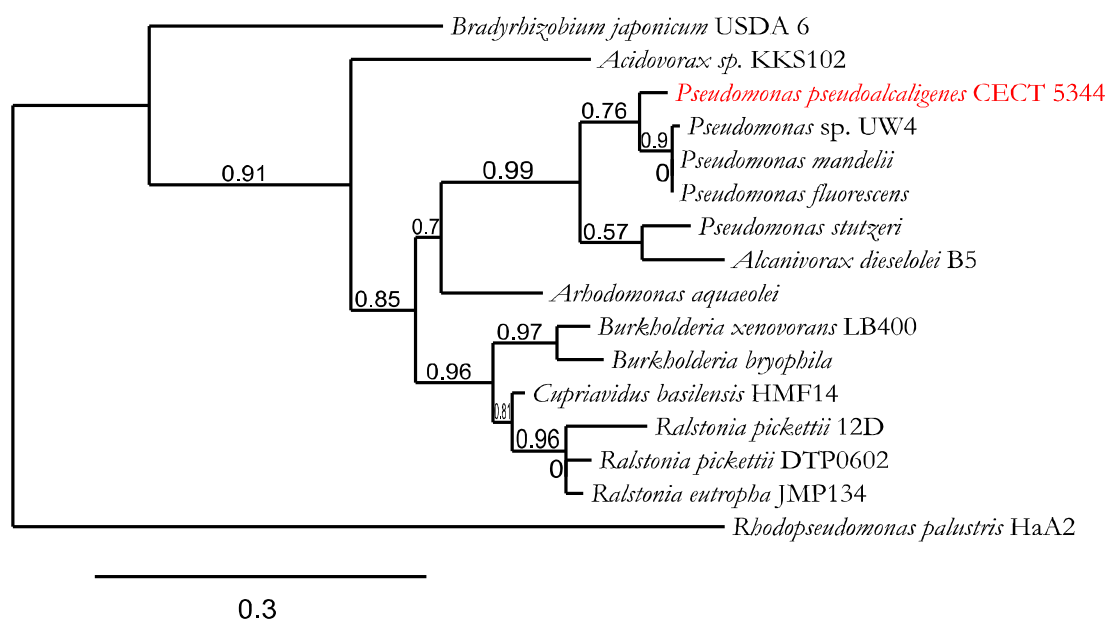


Figura 37. Análisis filogenético de HmfC de diferentes microorganismos. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de HmfC y el árbol filogenético se realizó usando el servidor Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al *GenBank* de cada una de las proteínas de los diferentes microorganismos: *B. japonicum* USDA 6 (YP_005611032.1), *Acidovorax* sp. KKS102 (YP_006855582.1), *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (WP_003461286.1), *Pseudomonas* sp. UW4 (YP_007029623.1), *P. mandelii* (WP_010459409.1), *P. fluorescens* (WP_017338509.1), *P. stutzeri* (WP_003295918.1), *A. dieselolei* B5 (YP_006821458.1), *A. aquaeolei* (WP_018719428.1), *B. xenovorans* LB400 (YP_558945.1), *B. bryophila* (WP_020066159.1), *C. basilensis* HMF14 (ADE20401.1), *R. pickettii* 12D (YP_002981701.1), *R. pickettii* DTP0602 (YP_008601112.1), *R. eutropha* JMP134 (YP_293088.1) y *R. palustris* HaA2 (YP_486721.1). Los valores de la escala representan el grado de diferencia entre las secuencias (0,3 muestra una diferencia del 30% entre dos secuencias).

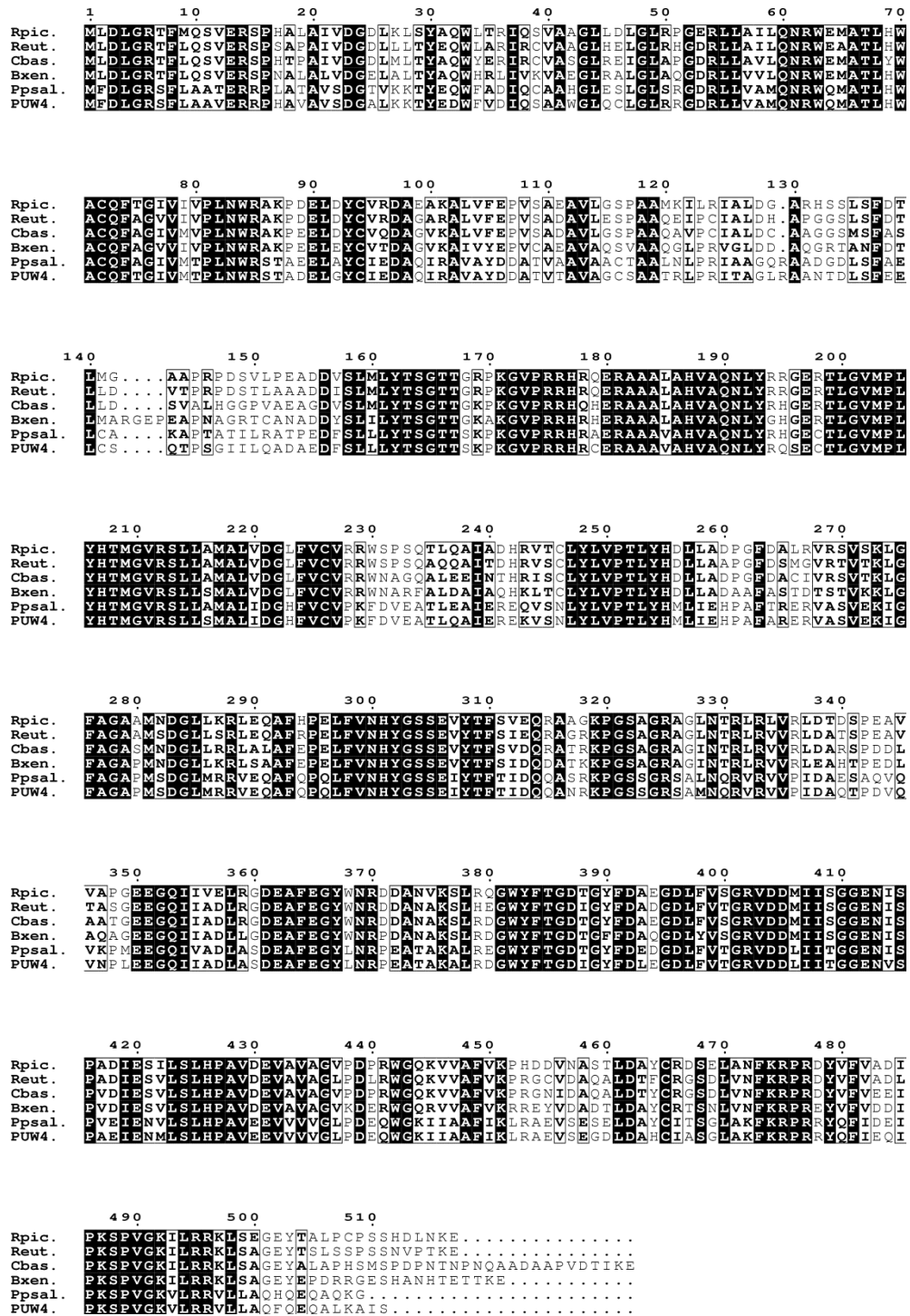


Figura 38. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de HmfD. La búsqueda de homología entre las diferentes secuencias se realizó con el programa BLAST. El alineamiento múltiple se construyó utilizando el método NJ (“Neighbor-Joining”) (Larkin *et al.*, 2007). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al GenBank de cada una de ellas: REUT para (YP_293087.1) *R. eutropha* JMP134, RPIC para (YP_002981702.1) *R. pickettii* 12D, CBAS para (ADE20402.1) *C. basiliensis* HMF14, BXEN para (YP_558944.1) *B. xenovorans* LB400, PPSAL para (WP_003461283.1) *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y PUW4 para (YP_007029622.1) *Pseudomonas sp.* UW4.

Resultados y Discusión

El árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento múltiple (CLUSTALW) de las secuencias de aminoácidos de HmfD de diversos organismos y varias especies de *Pseudomonas*, incluida *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se muestra en la figura 39.

La secuencia de aminoácidos deducida del gen *hmfD* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 indicó que se trata de una proteína de 510 aminoácidos, con un punto isoelectrónico teórico de 5,455 y una masa molecular de 56,2 kDa.

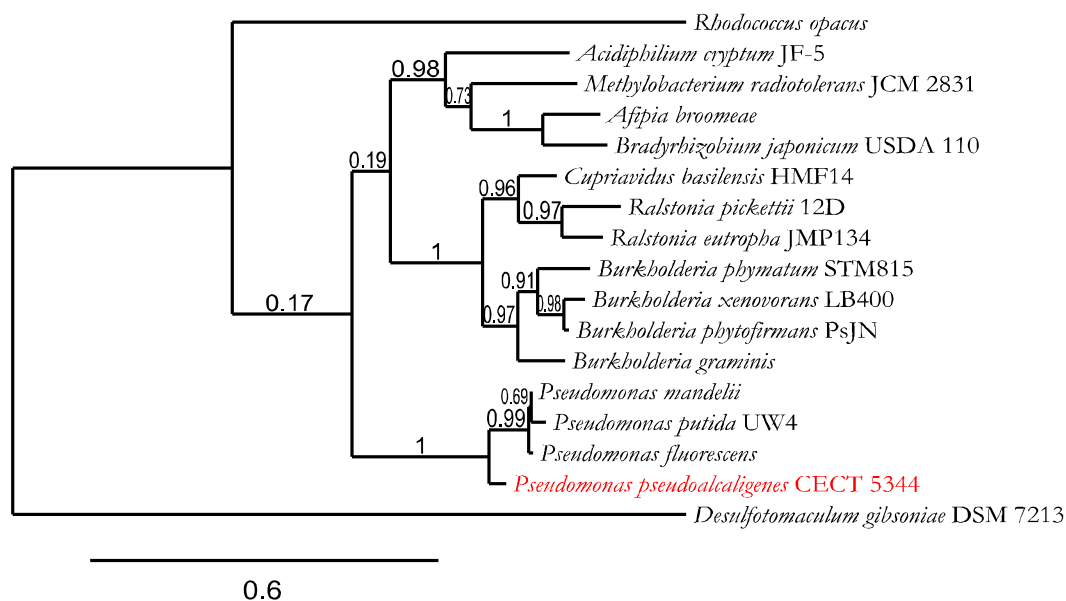


Figura 39. Análisis filogenético HmfD de diferentes microorganismos. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de HmfD y el árbol filogenético se realizó usando el servidor Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al *GenBank* de cada una de las proteínas de los diferentes microorganismos: *R. opacus* (WP_005259143.1), *A. cryptum* JF-5 (YP_001233811.1), *M. radiotolerans* JCM 2831 (YP_001757370.1), *A. broomeae* (WP_006018925.1), *B. japonicum* USDA 110 (NP_770176.1), *C. basilensis* HMF14 (ADE20402.1), *R. pickettii* 12D (YP_002981702.1), *R. eutropha* JMP134 (YP_293087.1), *B. phymatum* STM815 (YP_001862741.1), *B. xenovorans* LB400 (YP_558944.1), *B. phytofirmans* PsJN (YP_001895806.1), *B. graminis* (WP_006046925.1), *P. mandelii* (WP_010459411.1), *Pseudomonas sp.* UW4 (YP_007029622.1), *P. fluorescens* (WP_017338510.1), *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (WP_003461283.1) y *D. gibsoniae* DSM 7213 (YP_007943739.1). Los valores de la escala representan el grado de diferencia entre las secuencias (0,6 muestra una diferencia del 60% entre dos secuencias).

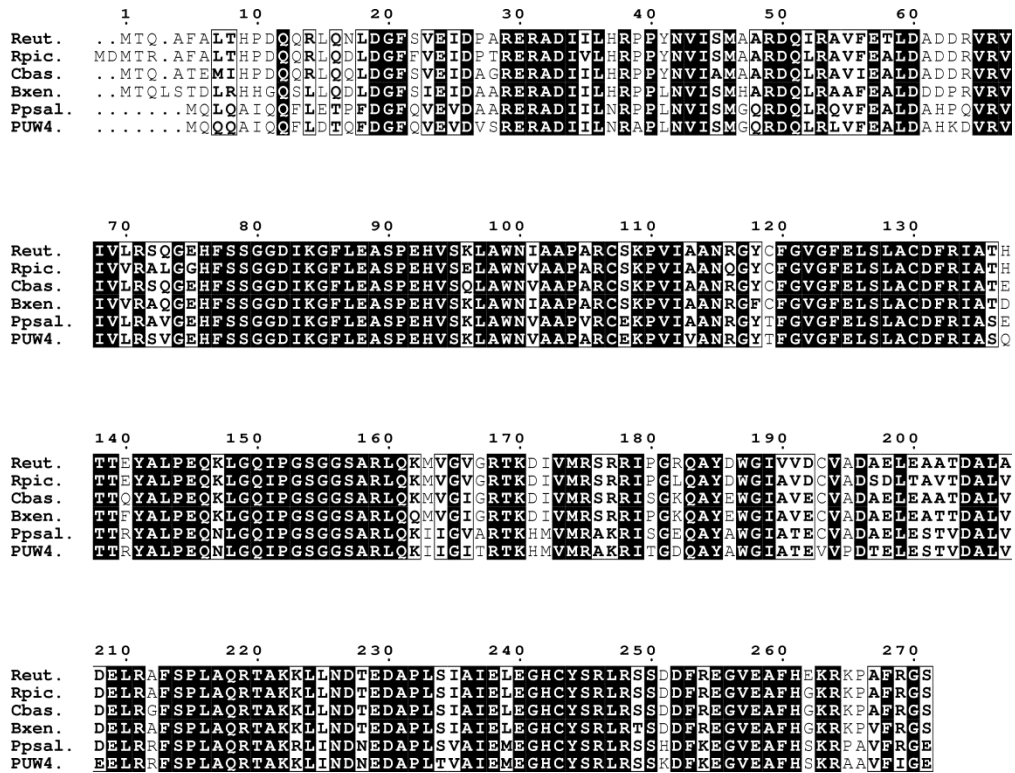


Figura 40. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de HmfE. La búsqueda de homología entre las diferentes secuencias se realizó con el programa BLAST. El alineamiento múltiple se construyó utilizando el método NJ (“Neighbor-Joining”) (Larkin *et al.*, 2007). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al GenBank de cada una de ellas: REUT para (YP_293086.1) *R. eutropha* JMP134, RPIC para (YP_002981703.1) *R. pickettii* 12D, CBAS para (ADE20403.1) *C. basiliensis* HMF14, BXEN para (YP_558943.1) *B. xenovorans* LB400, PPSAL para (WP_003461281.1) *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y PUW4 para (YP_007029621.1) *Pseudomonas* sp. UW4.

El análisis filogenético de HmfE reveló un claro agrupamiento de varias especies de *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Burkholderia* (Figura 41), siendo la más cercana a *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 la proteína de *Pseudomonas* sp. UW4.

La secuencia de aminoácidos deducida del gen *hmfE* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 indicó que se trata de una proteína de 267 aminoácidos, con un punto isoeléctrico teórico de 6,197 y una masa molecular de 29,6 kDa.

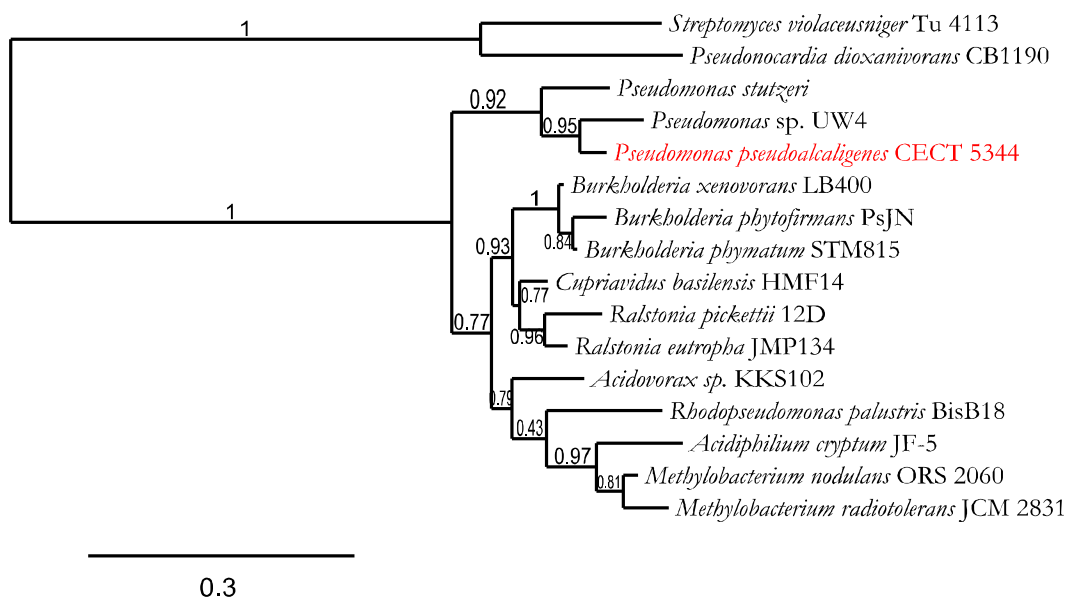


Figura 41. Análisis filogenético de HmfE de diferentes microorganismos. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de HmfE y el árbol filogenético se realizó usando el servidor Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al *GenBank* de cada una de las proteínas de los diferentes microorganismos: *S. violaceusniger* Tu 4113 (YP_004814278.1), *P. dioxanivorans* CB1190 (YP_004335907.1), *P. stutzeri* (WP_003295922.1), *Pseudomonas* sp. UW4 (YP_007029621.1), *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (WP_003461281.1), *B. xenovorans* LB400 (YP_558943.1), *B. phytofirmans* PsJN (YP_001895805.1), *B. phymatum* STM815 (YP_001862740.1), *C. basilensis* HMF14 (ADE20403.1), *R. pickettii* 12D (YP_002981703.1), *R. eutropha* JMP134 (YP_293086.1), *Acidovorax* sp. KKS102 (YP_006856578.1), *R. palustris* BisB18 (YP_530741.1), *A. cryptum* JF-5 (YP_001233812.1), *M. nodulans* ORS 2060 (YP_002498526.1) y *M. radiotolerans* JCM 2831 (YP_001757371.1). Los valores de la escala representan el grado de diferencia entre las secuencias (0,3 muestra una diferencia del 30% entre dos secuencias).

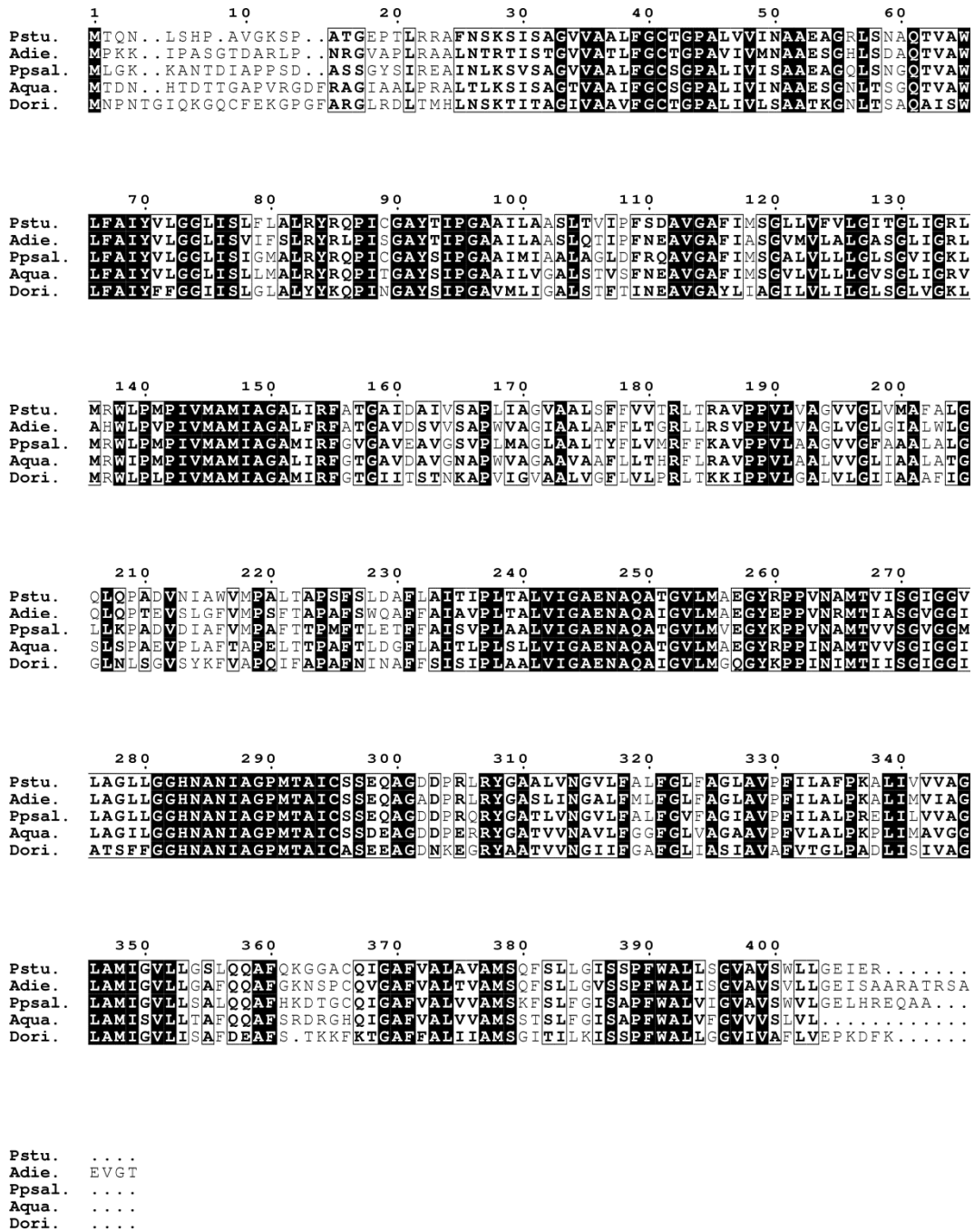


Figura 42. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de BenE1. La búsqueda de homología entre las diferentes secuencias se realizó con el programa BLAST. El alineamiento múltiple se construyó utilizando el método NJ (“Neighbor–Joining”) (Larkin *et al.*, 2007). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al GenBank de cada una de ellas: PSTU para (WP_003295923.1) *P. stutzeri*, ADIE para (YP_006821461.1) *A. dieselolei* B5, PPSAL para (WP_003461279.1) *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, AQUA para (WP_018719425.1) y *A. aquaeolei*, DORI para (YP_004968829.1) *Desulfosporosinus orientis* DSM 765.

Resultados y Discusión

El árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento múltiple (CLUSTALW) de las secuencias de aminoácidos de BenE1 de diversos organismos, incluida *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 (Figura 43), reveló que el origen de este gen es diferente al de los genes *hmfABCDE*. El gen *benE1* (BN5_02205) se localizó aguas abajo del gen *hmfE*, y curiosamente no se ha identificado en otras cepas capaces de degradar furfural, como *C. basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a) y *P. putida* Fu1 (Nichols y Mertens, 2008).

La secuencia de aminoácidos deducida del gen *benE1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 indicó que se trata de una proteína de membrana de 413 aminoácidos, con un punto isoeléctrico teórico de 9,09 y una masa molecular de 42,2 kDa.

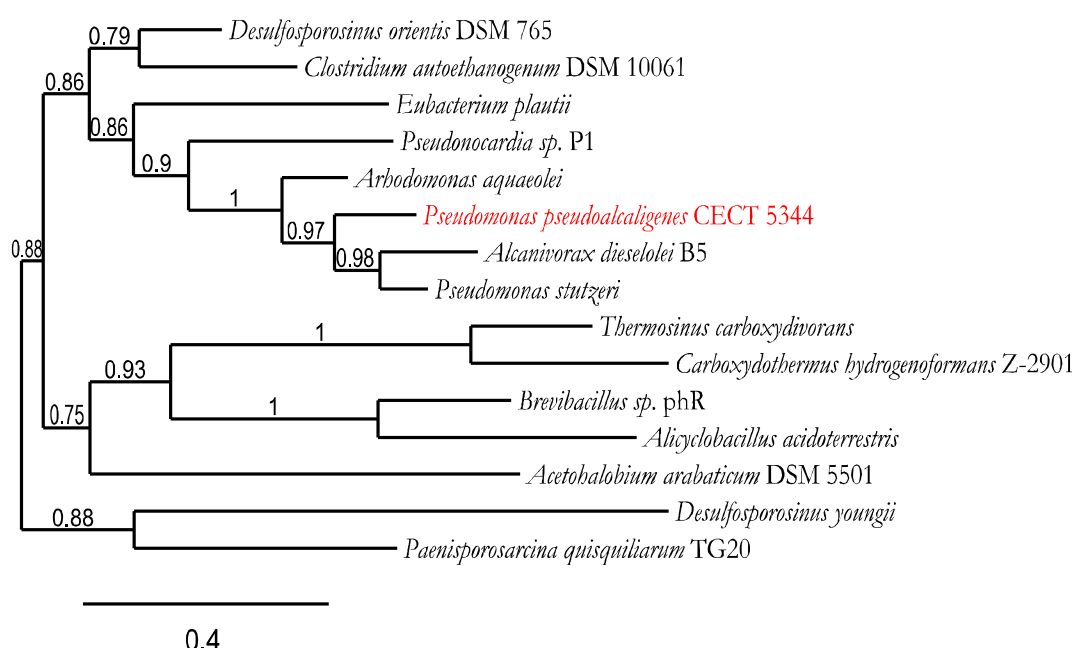


Figura 43. Análisis filogenético de BenE1 de diferentes microorganismos. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de BenE1 y el árbol filogenético se realizó usando el servidor Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al *GenBank* de cada una de las proteínas de los diferentes microorganismos: *D. orientis* DMS765 (YP_004968829.1), *C. autoethanogenum* DMS 10061 (YP_008699855.1), *E. plautii* (WP_007487838.1), *Pseudonocardia* sp. P1 (WP_010228570.1), *A. aquaeolei* (WP_018719425.1), *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (WP_003461279.1), *A. dieselolei* B5 (YP_006821461.1), *P. stutzeri* (WP_003295923.1), *T. carboxydivorans* (WP_007288715.1), *C. hydrogenoformans* Z-2901 (YP_360105.1), *Brevibacillus* sp. pHr (WP_019121867.1), *A. acidoterrestis* (WP_021295969.1), *A. arabaticum* DMS 5501 (YP_003827075.1), *D. youngii* (WP_007785484.1) y *P. quisquiliarum* TG20 (WP_019413304.1). Los valores de la escala representan el grado de diferencia entre las secuencias (0,4 muestra una diferencia del 40% entre dos secuencias).

3.2 Identificación de la secuencia del gen *psfD* de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344.

P. putida Fu1 es una bacteria capaz de utilizar furfurales como fuente de carbono y energía para el crecimiento. En un esfuerzo por entender la genética del proceso, se aislaron mutantes (por transposones) incapaces de utilizar furfurales. El estudio de los genes donde se insertó el transposón, así como de los genes colindantes, permitió la identificación de los genes *psfA*, *psfB*, *psfC*, *psfD*, *psfE*, *psfF* y *psfG*, que podrían estar implicados con la degradación de ácido furoico (Nichols y Mertens, 2008). El gen *psfD* codifica un posible factor accesorio similar al requerido por la xantina deshidrogenasa, que se expresa mucho más cuando la bacteria utiliza derivados furoicos como fuente de carbono, sobre todo ácido furoico. Sin embargo, la mutación en el gen *psfD*, aunque provoca un crecimiento mucho más lento en ácido furoico que el de la cepa silvestre, no lo detiene completamente, lo que sugiere que este gen no es esencial, o bien la posible existencia de un gen parálogo que lo sustituya. La degradación de ácido furoico en *P. putida* Fu1 implica una 2-furoil coenzima A deshidrogenasa, una molibdoenzima similar a la xantina deshidrogenasa que podría ser el sustrato de PsfD (Koenig y Andreesen, 1989).

En el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 no se han hallado secuencias de DNA con similitudes significativas a los genes *psfA*, *psfB*, *psfC*, *psfE*, *psfF* y *psfG*. Sin embargo, se ha identificado un gen homólogo a *psfD* de *P. putida* Fu1, al que se le ha denominado *psfD* y cuyo entorno génico se muestra en la figura 44. Es de destacar que aguas abajo de *psfD* se encuentra un gen (*BN5_02200*) cuyo hipotético producto es un regulador transcripcional de la familia AraC. Dicho gen también se localiza en *P. putida* Fu1 (*B3FNL5_PSEPU*) junto a *psfD* (Nichols y Mertens, 2008).



Figura 44. Esquema de la región de 7,2 kb del cromosoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en la que se encuentra el gen *psfD*. En la figura se muestra la representación esquemática de la región genética existente entre las posiciones 2325534 y 2332755 del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Los genes que flanquean a *psfD* codifican las siguientes proteínas; BN5_02199, aminotransferasa; BN5_02200, regulador transcripcional de la familia AraC; T, posibles transposasas o genes relacionados con la movilidad de elementos génicos (BN5_02202, BN5_02203 y BN5_02204); BenE1, proteína de membrana transportadora de benzoato; HmfE, posible 2-oxoglutaroil CoA hidrolasa; HmfD, furoil CoA sintetasa. En verde se indican los genes que han sido descritos en *P. putida* Fu1 (Nichols y Mertens, 2008).

Es interesante destacar, que en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 el gen *psfD* se localiza en zonas muy próximas a las secuencias homólogas a *hmfABCDE*, algo que no sucede en otras *Pseudomonas*, puesto que ninguna de ellas presenta el operón *hmfABCDE*.

El alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de las proteínas PsfD de *P. putida* Fu1 y de varias especies de *Pseudomonas*, incluida la de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 (Figura 45) mostró que entre todas las secuencias existe un elevado nivel de identidad. Este hecho podría indicar que en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 la función de esta enzima podría ser muy similar a la descrita en *P. putida* Fu1.

También es de destacar el hecho de que los genes de las posibles transposasas y elementos de movilidad que separan el operón *hmfABCDE* del gen *psfD* (Figura 44) delimitan dos regiones génicas con orígenes probablemente diferentes, ya que los genes aguas abajo de las transposasas son homólogos a los descritos en *P. putida* Fu1 con una identidad media del 80%, mientras que los genes que se encuentran aguas arriba son homólogos a los genes *hmf* de *C. basilensis* HMF14 con una identidad entre un 60 y un 80 %. Los genes *hmf* no han sido descritos en otras *Pseudomonas* hasta ahora.

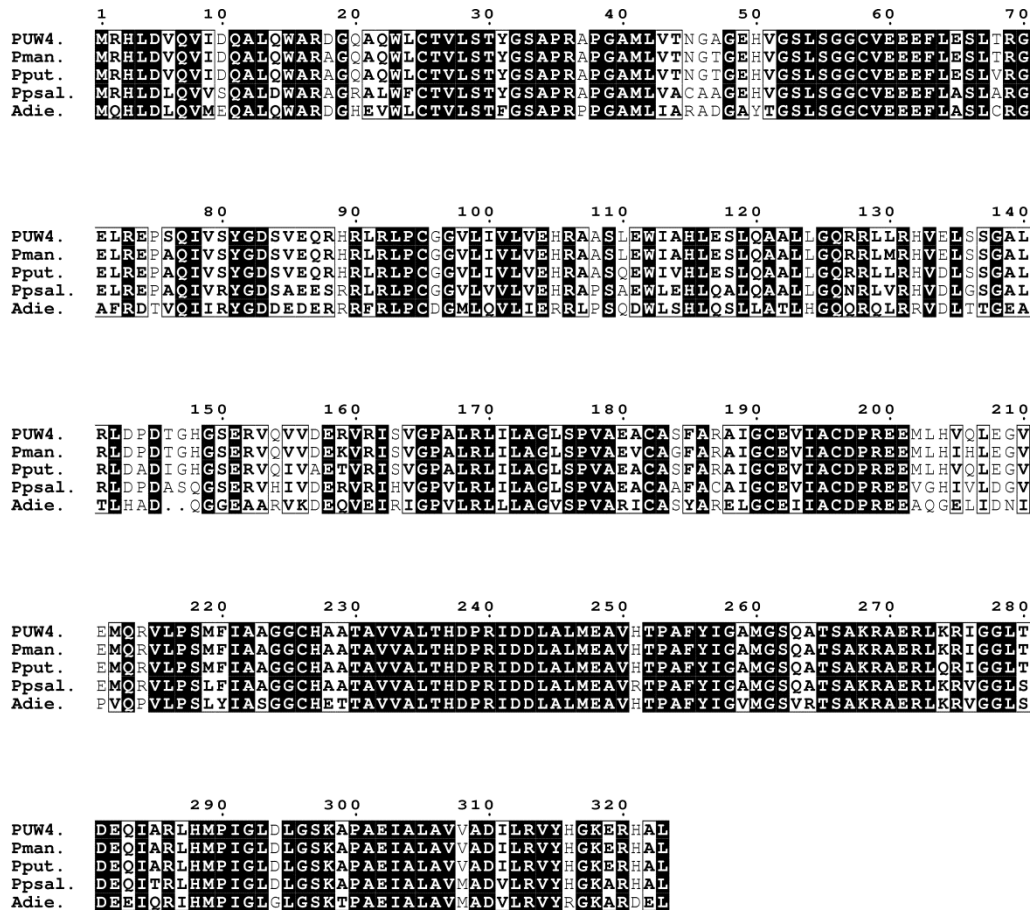


Figura 45. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de PsfD. La búsqueda de homología entre las diferentes secuencias se realizó con el programa BLAST. El alineamiento múltiple se construyó utilizando el método NJ (“Neighbor-Joining”) (Larkin *et al.*, 2007). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al GenBank de cada una de ellas: PUW4 para (YP_007029618.1) *Pseudomonas sp.* UW4, PMAN para (WP_010459417.1) *P. mandelii*, PPUT para (ACA09741.1) *P. putida* Fu1, PPSAL para (WP_003461270.1) *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 y ADIE para (YP_006821479.1), *A. dieselolei* B5.

El árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento múltiple (CLUSTALW) de las secuencias de aminoácidos de PsfD de diversos organismos y varias especies de *Pseudomonas*, incluida *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 (Figura 46), reveló que entre todas las especies de *Pseudomonas* existe un elevado nivel de identidad.

La secuencia de aminoácidos deducida del gen *psfD* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 indicó que se trata de una proteína de 323 aminoácidos, con un punto isoelectrico teórico de 6,24 y una masa molecular de 34,4 kDa.

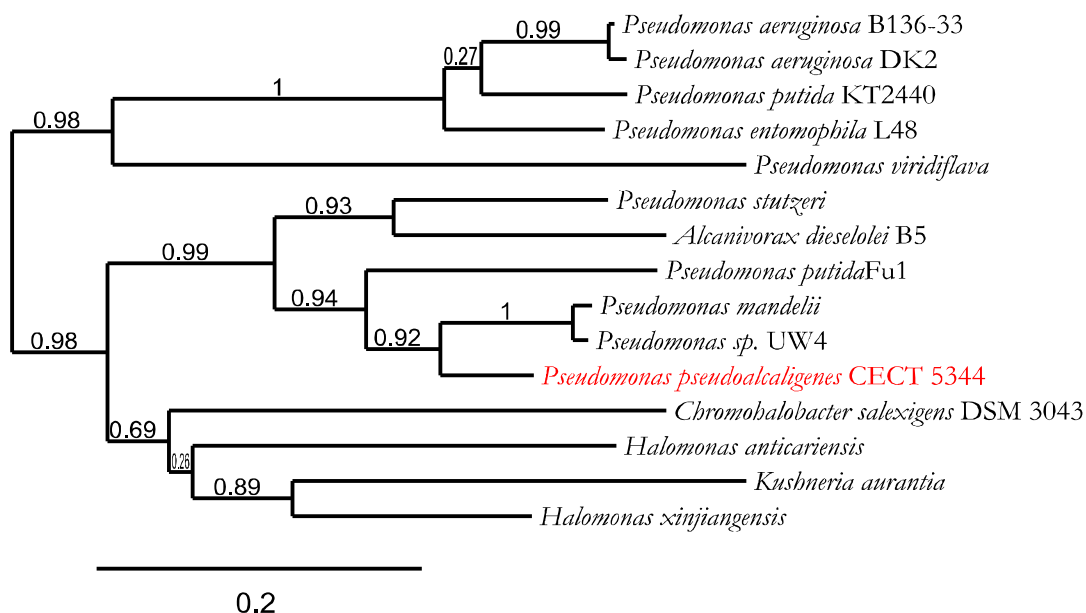


Figura 46. Análisis filogenético de PsfD de diferentes microorganismos. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de PsfD y el árbol filogenético se realizó usando el servidor Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al *GenBank* de cada una de las proteínas de los diferentes microorganismos: *P. aeruginosa* B136-33 (YP_007711702.1), *P. aeruginosa* DK2 (YP_006484872.1), *P. putida* KT2440 (NP_746348.1), *P. entomophila* L48 (YP_608442.1), *P. viridiflava* (WP_004886406.1), *P. stutzeri* (WP_019339161.1), *A. dieselolei* B5 (YP_006821479.1), *P. putida* Fu1 (ACA09741.1), *P. mandelii* (WP_010459417.1), *Pseudomonas sp.* UW4 (YP_007029618.1), *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (WP_003461270.1), *C. salexigens* DMS 3043 (YP_572592.1), *H. anticariensis* (WP_016418894.1), *K. aurantia* (WP_016418894.1) y *H. xinjiangensis* (WP_019019699.1). Los valores de la escala representan el grado de diferencia entre las secuencias (0,2 muestra una diferencia del 20% entre dos secuencias).

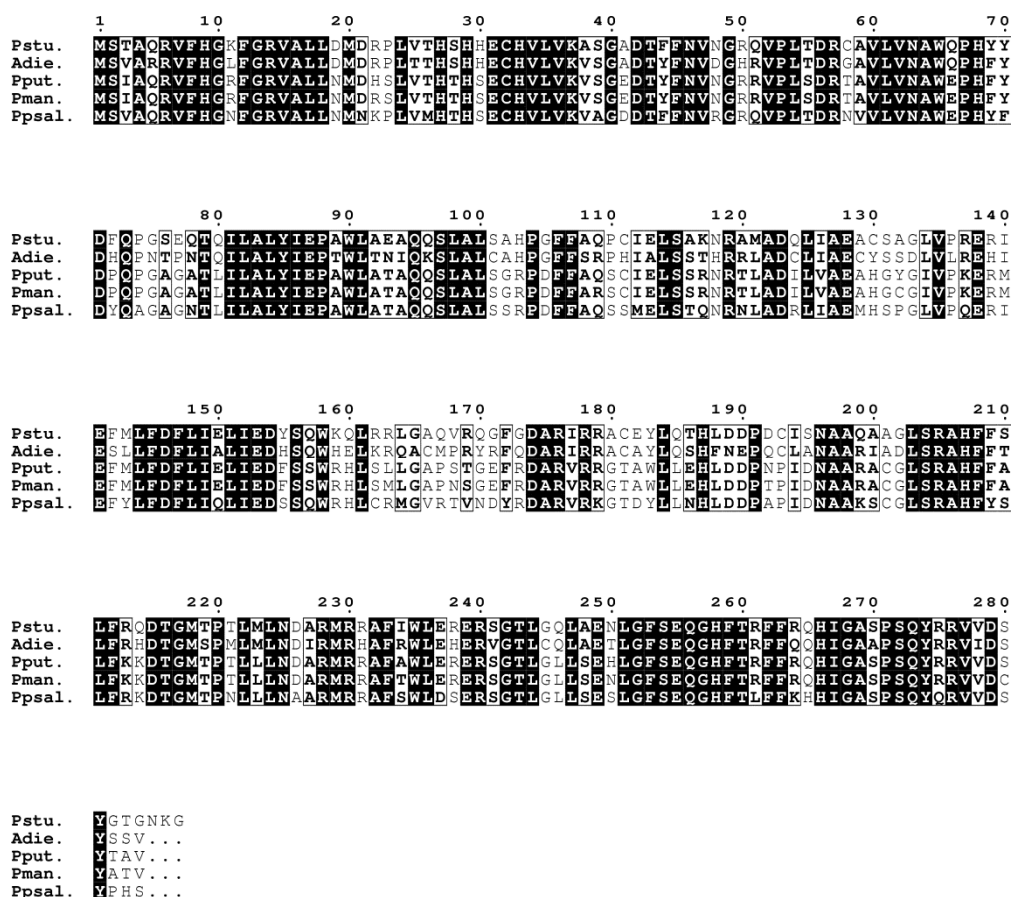


Figura 47. Alineamiento múltiple de las secuencias deducidas de aminoácidos de BN5_02200. La búsqueda de homología entre las diferentes secuencias se realizó con el programa BLAST. El alineamiento múltiple se construyó utilizando el método NJ (“Neighbor-Joining”) (Larkin *et al.*, 2007). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al *GenBank* de cada una de ellas: PSTU para (WP_003295937.1), *P. stutzeri*, ADIE para (YP_006821480.1) *A. dieselolei* B5, PPUT para (ACA09742.1) *P. putida* Fu1, PMAN para (WP_010459419.1) *P. mandelii* y PPSAL para (WP_003461267.1) *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

El análisis filogenético de BN5_02200 reveló un claro agrupamiento con varias especies de *Pseudomonas*, (Figura 48), siendo la más cercana a *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 la proteína de *P. putida* Fu1.

La secuencia de aminoácidos deducida del gen BN5_02200 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 indicó que se trata de una proteína de 284 aminoácidos, con un punto isoelectrónico teórico de 7,79 y una masa molecular de 32,3 kDa.

Como ya se ha comentado anteriormente, la proteína codificada por *BN5_02200* presenta homología con miembros de la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS formada por un grupo de factores de transcripción que incluye más de 100 miembros diferentes, ampliamente distribuidos y descritos en γ proteobacterias, en

bacterias Gram-positivas y en cianobacterias. Estos factores de transcripción, de ~ 300 aminoácidos, pertenecen la superfamilia de proteínas de unión a DNA *Helix-Turn-Helix* (HTH; hélice-giro-hélice), y tienen tres funciones reguladoras fundamentales: metabolismo del carbono, respuesta al estrés y patogénesis (Gallegos *et al.*, 1997).

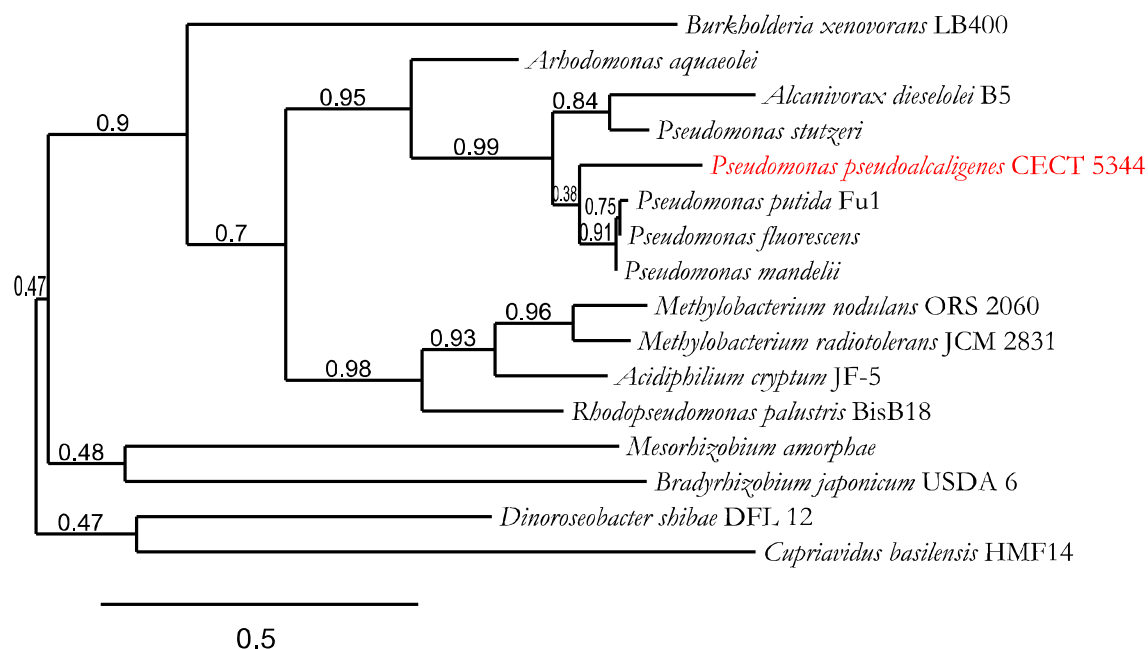


Figura 48. Análisis filogenético de BN5_02200 de diferentes microorganismos. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de BN5_02200 y el árbol filogenético se realizó usando el servidor Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008). Entre paréntesis se proporcionan los números de acceso correspondientes al *GenBank* de cada una de las proteínas de los diferentes microorganismos: *B. xenovorans* LB400 (YP_555126.1), *A. aquaeolei* (WP_018719424.1), *A. dieselolei* B5 (YP_006821480.1), *P. stutzeri* (WP_003295937.1), *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (WP_003461267.1), *P. putida* Fu1 (ACA09742.1), *P. fluorescens* (WP_017338515.1), *P. mandelii* (WP_010459419.1), *M. nodulans* ORS 2060 (YP_002498521.1), *M. radiotolerans* JCM 2831 (YP_001757366.1), *A. cryptum* JF-5 (YP_001233807.1), *R. palustris* BisB18 (YP_530736.1), *M. amorphae* (WP_006202795.1), *B. japonicum* USDA 6 (YP_005611197.1), *D. shibae* DFL 12 (YP_001541920.1) y *C. basilensis* HMF14 (WP_006156524.1). Los valores de la escala representan el grado de diferencia entre las secuencias (0,5 muestra una diferencia del 50% entre dos secuencias).

3.3 Degradación de compuestos furánicos por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

Se han descrito varios microorganismos capaces de metabolizar furfural, como *R. eutropha* (Yu y Stahl, 2008), *C. ligniaria* NRRL30616 (Nichols *et al.*, 2005), *P. putida* Fu1 (Koenig y Andreesen, 1989), *M. extorquens*, *F. indologenes*, *Acinetobacter* sp, *A. aurescens* (Lopez *et al.*, 2004) o *C. basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a). La expresión de los genes *hmfABCDE* de *C. basilensis* HMF14 en *P. putida* S12, una bacteria incapaz de degradar furfural, permite a la nueva cepa *P. putida* S12 *pJT' hmfABCDE* la utilización de furfural,

alcohol furfurílico y ácido furoico como fuentes de carbono para su crecimiento (Koopman *et al.*, 2010a). Por otra parte, *P. putida* Fu1 metaboliza furfural mediante una ruta que implica su conversión en 2-oxoglutarato, y en la que el ácido furoico (FA) y el coenzima A intervienen como intermediarios. Como se acaba de indicar, en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se han hallado tanto genes homólogos (*hmfA,B,D,D,E*) a los de *C. basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a), como a los de *P. putida* Fu1 (*psfD*) (Nichols y Mertens, 2008), por lo que el siguiente paso fue estudiar *in vivo* el fenotipo de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 en relación con su capacidad de asimilar compuestos furánicos como fuentes de carbono.

3.3.1 Asimilación de furfural por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

El furfural, uno de los componentes principales de los hidrolizados lignocelulósicos, se utilizó única fuente de carbono y energía para el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Cuando se utilizan fuentes de carbono que no son tóxicas para la bacteria éstas se suelen adicionar a una concentración final de 4 g/l. En el caso del furfural esto supondría una concentración inicial de 42 mM. Sin embargo, como el furfural podía resultar tóxico, inicialmente se optó por utilizar una concentración 10 mM de furfural. En estas condiciones, *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 fue capaz de crecer, presentando un crecimiento máximo de 0,9 (D. O. _{600 nm}) tras 160 horas de incubación, con una larga fase de latencia (~120 horas, Figura 49). Además del crecimiento, se monitorizó la evolución del cultivo midiendo la concentración de furfural a lo largo del tiempo, encontrándose que el furfural fue convertido estequiométricamente en ácido furoico en un periodo de menos de 40 horas (Figura 49). La conversión de furfural a su forma alcohol y/o ácido es un mecanismo común en la detoxificación de furfural en muchas bacterias (Boopathy *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2004; Okuda *et al.*, 2008) y también el primer paso de su asimilación en otras (Koopman *et al.*, 2010a). La concentración de ácido furoico en el sobrenadante del cultivo permaneció constante durante 60 horas, tiempo en el que el cultivo bacteriano no experimentó crecimiento. Transcurrido este tiempo, comenzó a disminuir la concentración de ácido y, paralelamente, comenzó la fase exponencial de crecimiento (Figura 49). En *C. basilensis* HMF14, durante la fase de latencia, el furfural se convierte rápidamente en alcohol furfurílico y se acumula sólo una pequeña cantidad de ácido furoico (Wierckx *et al.*, 2010). Al comienzo de la fase exponencial de crecimiento, la

producción de alcohol furfurílico disminuye en beneficio de la formación de biomasa, lo que probablemente ocurre a través de furoico (Koenig y Andreesen, 1990; Trudgill, 1969).

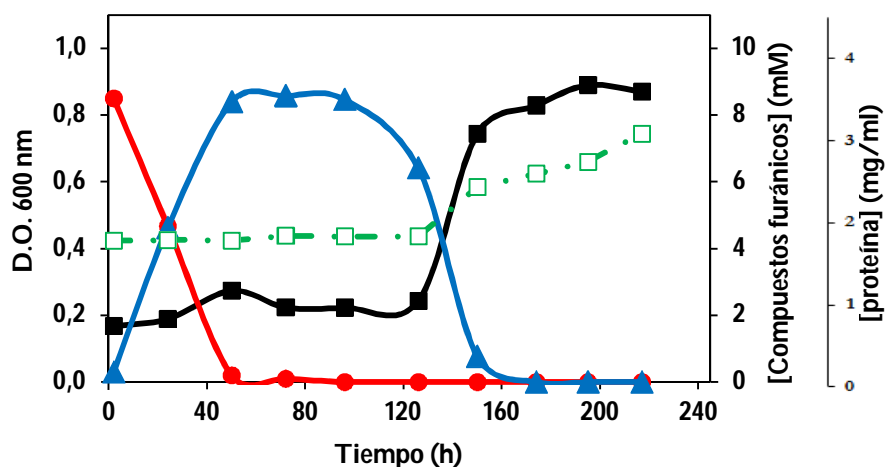


Figura 49. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con furfural como única fuente de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con furfural (10 mM) como única fuente de carbono y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (3.4.2. de Materiales y Métodos). Las concentraciones de furfural y de ácido furoico se determinaron mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos). Se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados). Crecimiento (■), concentración furfural (●), concentración de ácido furoico (▲) y concentración de proteína (□).

Estos resultados fueron muy diferentes a los descritos en *C. basilensis* HMF14 (Wierckx *et al.*, 2010), ya que mientras que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 tardó unas 50 horas en consumir el furfural, *C. basilensis* HMF14 lo hizo en 9 horas. Además, en este último caso, la fase de latencia fue mucho más breve, alcanzándose un crecimiento celular máximo en 15 horas. En cambio, *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 presentó una fase de latencia muy prolongada alcanzando su máximo de crecimiento a las 170 horas (Figura 49).

Una vez demostrado que la bacteria puede, aunque muy lentamente, asimilar furfural, el siguiente paso fue utilizar cultivos con concentraciones crecientes de furfural, con el objetivo de optimizar el proceso, a la vez que determinar a partir de que concentración el furfural es tóxico para la bacteria.

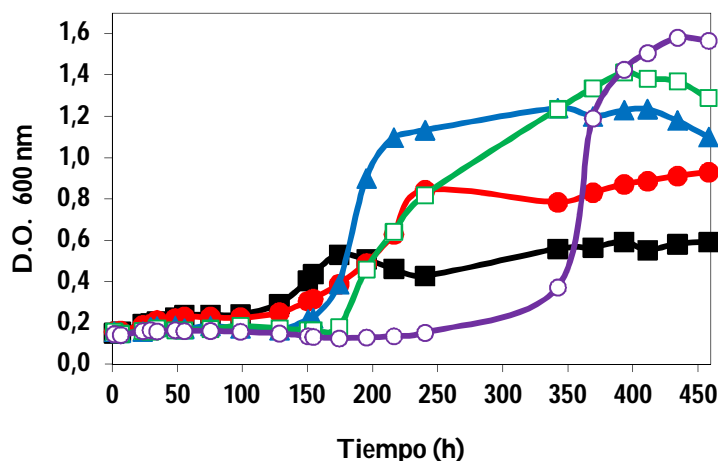


Figura 50. Efecto de la concentración de furfural sobre el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con furfural 5 (■), 10 (●), 20 (▲), 30 (□) ó 40 (○) mM como única fuente de carbono, y NH₄Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. Se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados).

En *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, concentraciones de furfural superiores a 5 mM producían un incremento en la fase de latencia de los cultivos, probablemente debido a la toxicidad del sustrato (Figura 50). Algo parecido ocurre en *C. basilensis* HMF14, aunque en un intervalo de concentraciones diferente (3-12 mM) (Wierckx *et al.*, 2010). *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 fue capaz de asimilar concentraciones de hasta 40 mM de furfural (Figura 50), mientras que *C. basilensis* HMF14 no presenta crecimiento celular por encima de 12 mM de furfural (Wierckx *et al.*, 2010). Las velocidades específicas de crecimiento (μ) de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, fueron notablemente inferiores a las de *C. basilensis* HMF14 (Tabla 12) (Wierckx *et al.*, 2010). Los datos de la tabla 12 indican que, existe una relación casi lineal entre el crecimiento máximo y la concentración de sustrato, para concentraciones bajas de furfural, pero que el crecimiento se satura a partir de 30-40 mM. Esta observación es lógica si consideramos que llegará un momento en que sean otros nutrientes, diferentes a la fuente de carbono, los que sean limitantes en el medio de cultivo.

Tabla 12. Características del crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 respecto a *C. basilensis* HMF14 en medios con furfural.

Organismo	[Furfural] (mM)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Tiempo de latencia (T _L)	Max. D. O. 600 nm
<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1	5	0,019	100	0,59
	10	0,017	125	0,93
	20	0,044	144	1,24
	30	0,043	175	1,41
	40	0,040	312	1,58
<i>C. basilensis</i> HMF14*	3,5*	0,22*	--	1,09*

*(Wierckx *et al.*, 2010)

C. basilensis HMF14 parece asimilar el furfural más eficientemente que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 debido a que alcanza un crecimiento máximo notablemente mayor con concentraciones similares de éste (Tabla 12). Sin embargo, se comparan datos obtenidos con diferentes espectrofotómetros que tendrían que ser comprobados con el mismo instrumento y, en cualquier caso, deben ser analizados otros parámetros como rendimientos referidos a peso seco o a proteína total, para poder llegar a una conclusión más certera.

3.3.2 Asimilación de alcohol furfurílico por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

La ruta descrita para la degradación de alcohol furfurílico en *C. basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a) requiere los mismos genes que para la asimilación de furfural (Figura 30), ya que la oxidación de alcohol a aldehído (furfural), y éste a ácido furoico, parece estar catalizada por deshidrogenasas inespecíficas. Dicho de otra manera, en el operón *hmf* no se localizan genes para la oxidación de alcohol hasta ácido furoico. Al igual que *C. basilensis* HMF14, *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 también utilizó el alcohol furfurílico como única fuente de carbono y energía (Figura 51).

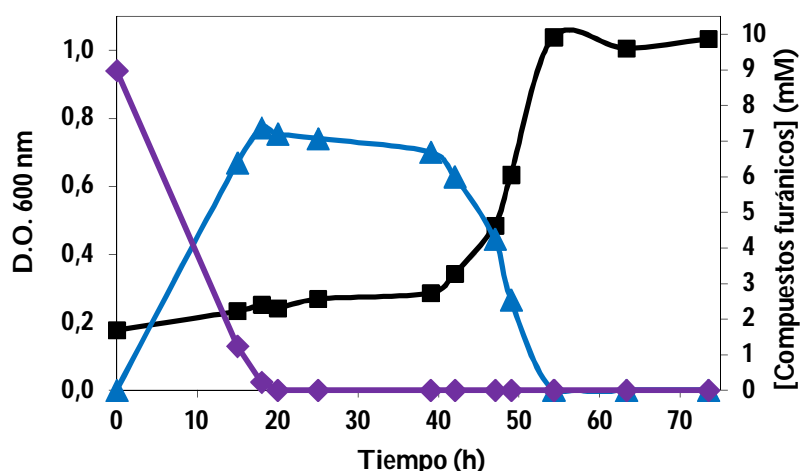


Figura 51. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 en medios con alcohol furfurílico como única fuente de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con alcohol furfurílico (10 mM) como única fuente de carbono, y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. Las concentraciones de alcohol furfurílico y de ácido furoico se determinaron mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos). Se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados). Crecimiento celular (■), concentración de ácido furoico (▲), concentración de alcohol furfurílico (◆).

Cuando como única fuente de carbono se utilizó alcohol furfurílico (10 mM) *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 alcanzó un crecimiento máximo de 1,05 (D. O. $_{600\text{nm}}$), tras 55 horas de incubación, con una fase de latencia de aproximadamente 40 horas. Si comparamos estos resultados (Figura 51) con los obtenidos con furfural (Figura 49), resulta evidente que, si bien los crecimientos máximos fueron parecidos, con alcohol furfurílico el tiempo de latencia se redujo bastante. Además, la acumulación de ácido furoico en el sobrenadante no ocurrió de forma estequiométrica a la desaparición de alcohol furfurílico. Transcurridas una 40 h desde la inoculación, se produjo una disminución paulatina de la concentración de ácido furoico que coincidió con la fase exponencial de crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 (Figura 51).

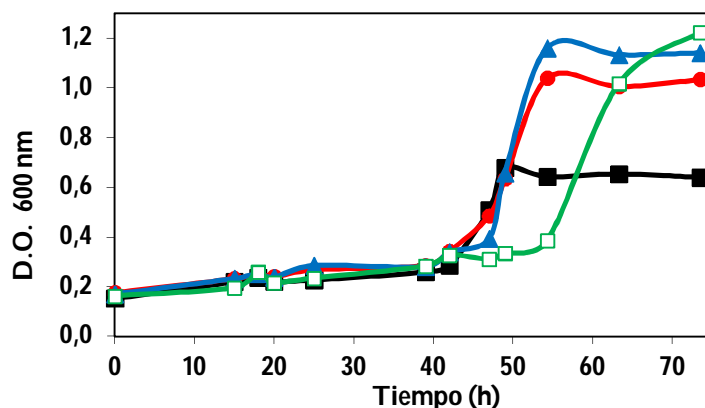


Figura 52. Efecto de la concentración de alcohol furfurílico sobre el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con 5 (■), 10 (●), 15 (▲) o 20 (□) mM de alcohol furfurílico como única fuente de carbono, y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. Se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados).

Cuando se utilizaron concentraciones crecientes de alcohol furfurílico para el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, sólo se produjo un aumento de la fase de latencia con concentraciones superiores a 15 mM (Figura 52). Estos resultados, junto con los de la figura 50, sugieren que, como ya ha sido descrito para otras bacterias (Zheng *et al.*, 2013), el alcohol resulta menos tóxico que el aldehído para *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Las velocidades específicas de crecimiento (μ) de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 fueron ligeramente inferiores a las descritas para *C. basilensis* HMF14 (Tabla 13) (Wierckx *et al.*, 2010), aunque muy superiores a las encontradas para la misma bacteria con furfural (Tabla 12).

Tabla 13. Características del crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 respecto a *C. basilensis* HMF14 en medios con alcohol furfurílico.

Organismo	[A. Furfurílico] (mM)	μ_{max} (h^{-1})	Tiempo de latencia (T_L)	Max. D. O. _{600 nm}
<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1	5	0,14	40	0,68
	10	0,14	40	1,04
	15	0,15	40	1,15
	20	0,11	55	1,22
<i>C. basilensis</i> HMF14*	3,5*	0,22*	--	1,08*

*(Wierckx *et al.*, 2010)

3.3.3 Asimilación de ácido furoico por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

El ácido furoico es un intermediario clave en de la ruta de degradación de compuestos furánicos descrita en *C. basiliensis* HMF14, ya que en él convergen alcohol furfurílico y furfural, por una parte, y HMF por otra (Koopman *et al.*, 2010a). Por lo tanto, y una vez demostrado que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 es capaz de utilizar furfural y alcohol furfurílico como fuentes de carbono y energía, el siguiente paso fue comprobar si esta bacteria también podía utilizar el ácido furoico.

P. pseudoalcaligenes CECT 5344 R1 creció en medios con ácido furoico (10 mM), como única fuente de carbono y energía, transcurridas 48 horas (fase de latencia), después de las que tuvo lugar un rápido crecimiento que coincidió con el consumo del ácido furoico, sin que se detectase por HPLC la acumulación de ningún otro metabolito (Figura 53).

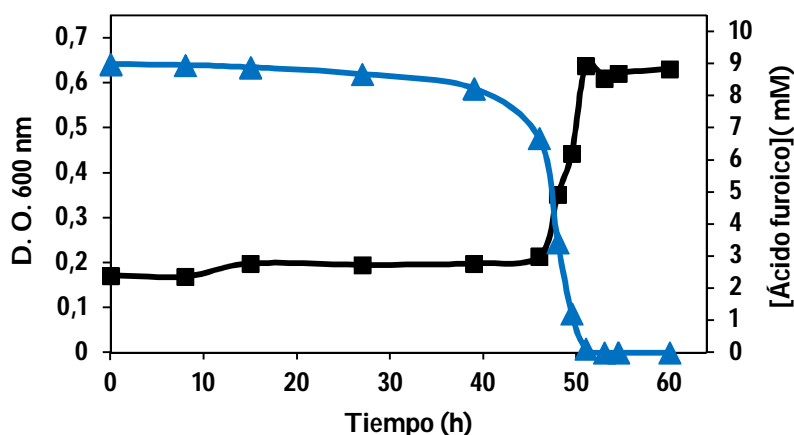


Figura 53. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 en medios con ácido furoico como única fuente de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con ácido furoico (10 mM) como única fuente de carbono, y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. La concentración de ácido furoico se determinó mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos). Se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados). Crecimiento (■), concentración de ácido furoico (▲).

El incremento de la concentración de ácido furoico en el cultivo, desde 5 hasta 20 mM, no influyó en la duración de la fase de latencia (Figura 54), lo que indica que, a diferencia de lo mostrado más arriba para furfural y alcohol furfurílico, el ácido furoico no parece ser tóxico para *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Por otra parte, el tiempo de latencia en medios con ácido furoico es similar al mostrado por la bacteria en medios con alcohol furfurílico (Tabla 14).

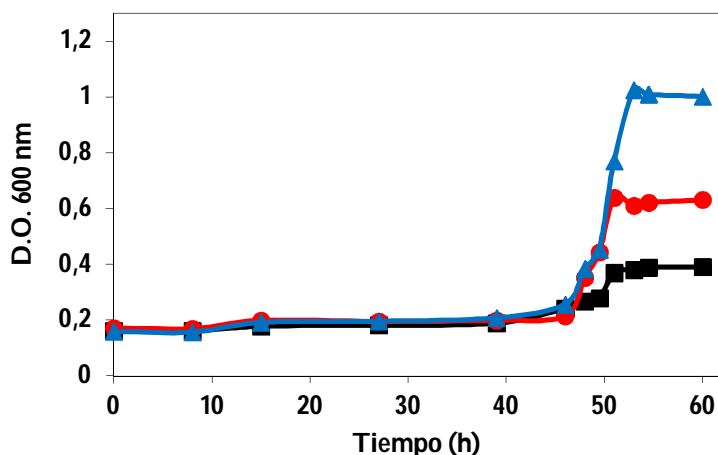


Figura 54. Efecto de la concentración de ácido furoico sobre el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con 5 (■), 10 (●) y 20 (▲) mM de ácido furoico como única fuente de carbono y cloruro amónico 5 mM como única fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. Se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados).

Las velocidades específicas de crecimiento (μ) de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 en medios con ácido furoico, aumentaron a medida que lo hacía la concentración de éste (Tabla 14). En este caso, los resultados obtenidos para *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 son similares a los descritos para *C. basilensis* HM14 (Wierckx *et al.*, 2010).

Tabla 14. Características del crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 respecto a *C. basilensis* HMF14 en medios con ácido furoico.

Organismo	[A. Furoico] (mM)	μ_{\max} (h^{-1})	Tiempo de latencia (T_L)	Max. D. O. 600 nm
<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1	5	0,19	48	0,39
	10	0,24	48	0,64
	20	0,35	48	1,02
<i>C. basilensis</i> HMF14*	3,5*	0,29*	--	0,99*

*(Wierckx *et al.*, 2010)

Las velocidades específicas de crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 fueron máximas en medios con ácido furoico. Sin embargo, el rendimiento celular, determinado como la absorbancia final de cultivo, fue mayor con alcohol furfurílico que con el ácido, ocupando el furfural una posición intermedia (Tabla 15). Estos resultados en

relación a los rendimientos, pueden explicarse desde una perspectiva bioenergética, ya que en un metabolismo respiratorio, cuanto más oxidada se encuentre la fuente de carbono (ácido > aldehído > alcohol) menos energía se puede extraer de ella.

Tabla 15. Características del crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con derivados furánicos.

Compuesto	Concentración (mM)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Tiempo de latencia (T _L)	Max. D. O. 600 nm
Furfural	10	0,017	125	0,93
Alcohol furfurílico	10	0,14	40	1,04
Ácido furoico	10	0,24	48	0,64

3.3.4 Biodegradación de HMF por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

En *C. basilensis* HMF14 los genes *hmfFG* y *hmfH* codifican las proteínas necesarias para la degradación de HMF a ácido furoico (Koopman *et al.*, 2010a; Wierckx *et al.*, 2011). En el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 no se han encontrado secuencias homólogas a estos genes, lo que en principio sugirió que este compuesto no podría ser utilizado por la bacteria como fuente de energía, al menos a través de esta ruta metabólica. Cuando *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se inoculó en medios con HMF como única fuente de carbono no se observó crecimiento bacteriano después de más de 200 horas (Figura 55).

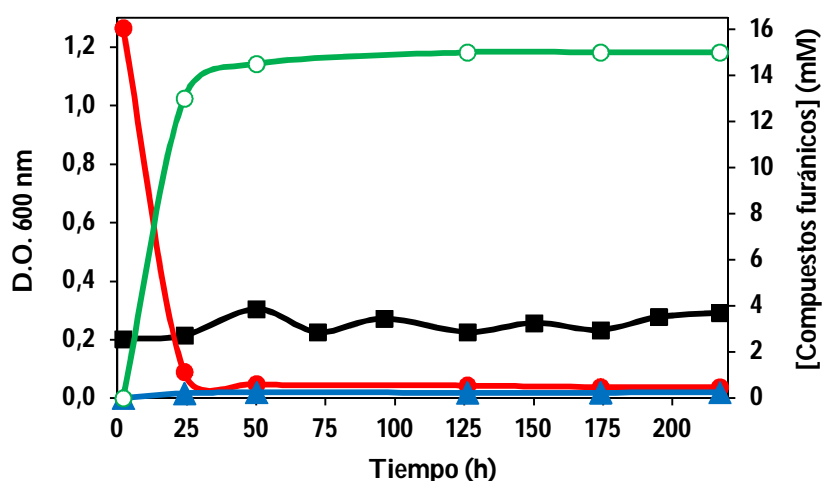


Figura 55. Biodegradación de HMF por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con HMF 16 mM como única fuente de carbono y cloruro amónico 5 mM como única fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. Las concentraciones de HMF y de FDCA se determinaron mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos). Se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados). Crecimiento celular (■), concentración HMF (●), concentración FDCA (▲) y concentración relativa de un compuesto desconocido (○).

El HMF desapareció del sobrenadante del cultivo transcurridas 25 horas, lo que indica que, a pesar de que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 no puede usar HMF como fuente de carbono, si tiene la capacidad de metabolizarlo (Figura 55). El consumo de HMF en el cultivo iba acompañado de la aparición de dos nuevos productos (cromatogramas no mostrados), uno identificado como FDCA, y un segundo compuesto que podría ser ácido 5-hidroximetil 2-furoico, propuesto como intermediario en *C. basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010b), aunque no existe evidencia experimental ya que, al no estar disponible comercialmente, no ha podido ser usado como patrón. El rendimiento de la biotransformación de HMF a FDCA por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 es del orden del 5 % (Figura 55), por lo que, de ser correcta esta hipótesis, el 95% restante sería ácido 5-hidroximetil 2-furoico. En *C. basilensis* HMF14 la oxidación del ácido 5-hidroximetil 2-furoico a FDCA está catalizada únicamente por HmfH (Koopman *et al.*, 2010a). Por lo tanto, el hecho de que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 no contenga genes homólogos a *hmfH* está en concordancia con los resultados mostrados en la figura 55.

Por último, y para descartar cualquier problema de inducibilidad de la ruta de degradación por HMF en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, ésta se inoculó en medios que contenían simultáneamente furfural e HMF como fuentes de carbono.

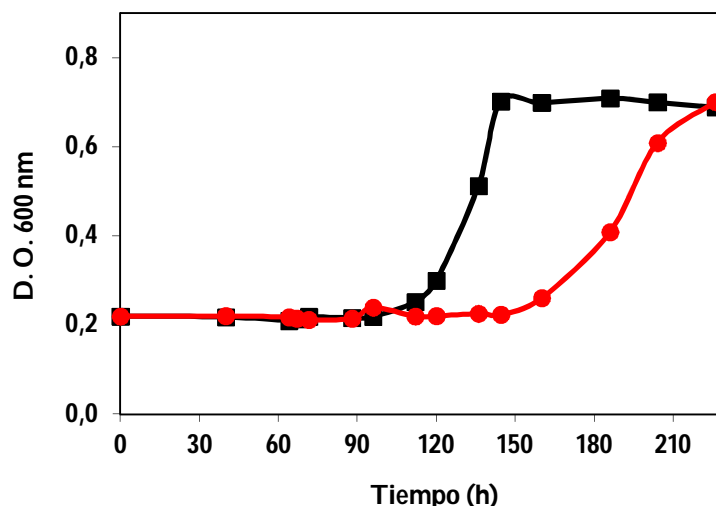


Figura 56. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 con furfural y con HMF. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con furfural 10 mM (■) o con furfural 10 mM + HMF 5 mM (●). En todos los casos se empleó NH_4Cl (5 mM) como fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. Se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados).

P. pseudoalcaligenes CECT 5344 R1 creció más lentamente en medios con furfural y HMF, que en aquellos en los que se utilizó solamente furfural (Figura 56). Puesto que el crecimiento celular máximo alcanzado (D. O. 600nm) en ambos medios fue el mismo, se puede concluir que el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se produce exclusivamente a costa del carbono suministrado por el furfural. El retraso del crecimiento causado por el HMF puede ser debido a la toxicidad de éste específicamente sobre el metabolismo del furfural o a un efecto inespecífico. Puesto que el HMF también causó retraso en el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 en medios con acetato sódico (resultados no mostrados), se puede concluir que el efecto tóxico observado en la figura 56 es inespecífico e independiente de furfural. Algo similar se ha descrito en *S. cerevisiae*, que es capaz de metabolizar furfural y HMF en cultivos independientes, pero incapaz cuando en los medios de cultivo hay mezcla de ambos (Lopez *et al.*, 2004).

3.3.5 Utilización simultánea de furfurales y cianuro por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1.

Como se ha mostrado anteriormente, cuando la fuente de nitrógeno es el amonio, *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 utiliza alcohol furfurílico, furfural y ácido furoico como fuentes de carbono para su crecimiento. Para conocer si la bacteria mantiene la capacidad de metabolizar compuestos furánicos a la vez que asimila cianuro, o viceversa, *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se cultivó con alcohol furfurílico, furfural o ácido furoico como únicas fuentes de carbono y cloruro amónico limitante (2mM) como fuente de nitrógeno. Una vez consumido el amonio se adicionó cianuro potásico (2,0 mM) a los cultivos y, en estas condiciones, no se produjo proliferación bacteriana en ninguno de los casos (resultados no mostrados). Es decir, *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 en presencia de cianuro pierde su competencia para asimilar compuestos furánicos. Aunque explicar este fenotipo es bastante difícil, éste podría estar relacionado con la respiración, ya que en los experimentos de transcriptómica (Capítulo 4) se observó que el alcohol furfurílico inducía la sobreexpresión de los genes *cox* (citocromo oxidasa). Una relación reguladora entre respiración y fuentes de carbono ha sido descrita en otras especies de *Pseudomonas* (Dinamarca *et al.*, 2002). También puede ocurrir que sean los compuestos furánicos los que influyan negativamente sobre el metabolismo del cianuro en esta bacteria.

3.4 Obtención del mutante R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

La inoculación sucesiva de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 en medios con furfural como única fuente de carbono (cuatro veces consecutivas, aproximadamente 30 generaciones), permitió la selección de una nueva cepa capaz de utilizar el furfural mucho más eficientemente que la cepa original (Figura 57), a la que se denominó *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

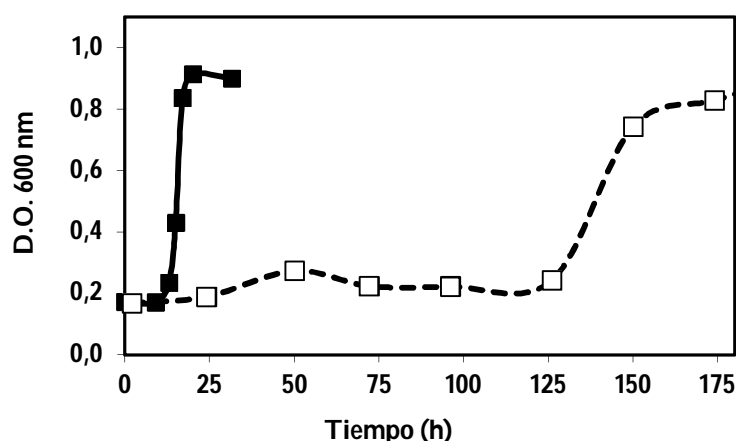


Figura 57. Proceso de adaptación de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 a la utilización de furfural como única fuente de carbono. Las células se cultivaron, mediante reinoculaciones sucesivas, en medio mínimo M9 con furfural (10 mM) como única fuente de carbono y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados). (■) Crecimiento de la cepa R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344. (□) Crecimiento de la cepa R1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

Este fenotipo fue claramente observable en medios sólidos con furfural como única fuente de carbono, ya que el rápido crecimiento de R1D se tradujo en la formación de colonias de mayor tamaño que las de la cepa R1, considerando el mismo tiempo de incubación. Esta característica permitió monitorizar la evolución entre un tipo celular y otro. Así, cuando *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se inoculó en placas con furfural como única fuente de carbono, después de una sola pasada en medio líquido con furfural, se observaron dos tipos de colonias: grandes y pequeñas (Figura 58). Las colonias grandes, de crecimiento rápido (alrededor del 1 % del total) mantuvieron su morfología después de varias inoculaciones en medio rico LB, al igual que ocurrió con las colonias pequeñas. Además, ambas colonias fueron resistentes a rifampicina y capaces de utilizar cianuro como única fuente de nitrógeno. Por esta razón, y debido a la frecuencia relativamente alta con la que se obtuvo el nuevo fenotipo, la hipótesis de partida fue que R1D era un mutante puntual de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1. De hecho, algo similar se ha descrito en *P. putida* S12, la cual, tras expresar los genes *hmfABCDE* de *C. basilensis* HMF14 sólo fue capaz de asimilar eficientemente furfural y sus derivados cuando se inoculó repetidamente en medios con furfural como única fuente de carbono (Koopman *et al.*, 2010a).

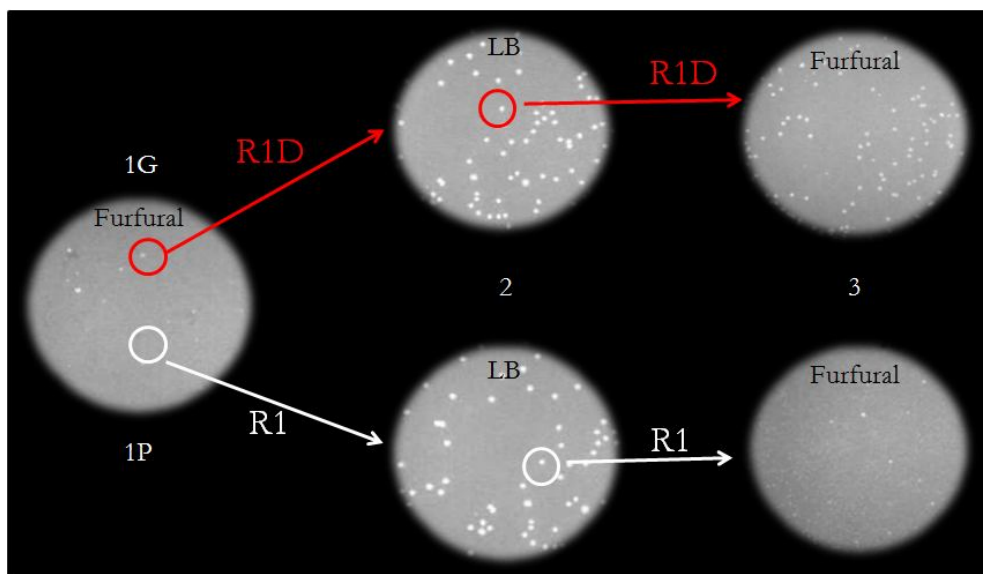


Figura 58. Evolución de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 en la utilización de furfural como única fuente de carbono. Las células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 se cultivaron en medio mínimo M9 con furfural (10 mM) como fuente de carbono hasta la fase estacionaria de crecimiento, se realizaron diluciones seriadas y se inocularon 100 μ l en medios sólidos M9 con furfural (10 mM) como única fuente de carbono y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. Tras un periodo de incubación de 24 horas a 30 $^{\circ}\text{C}$, en las placas se obtuvieron colonias con dos morfologías, una mayoritaria pequeña y otra grande (1). Tanto las colonias individuales grandes (1G, rojo-arriba), como las pequeñas (1P, blanco-abajo), se cultivaron en 5 ml de medio líquido LB y, una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento, se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas con medio LB (2). Las colonias individuales de estos cultivos se inocularon por separado en 5 ml de medio líquido M9 con furfural como fuente de carbono y, una vez en fase estacionaria, se volvieron a realizar diluciones seriadas antes de inocular 100 μ l de las mismas en placas M9 con furfural como única fuente de carbono (3).

La selección de mutantes con nuevas habilidades o mejor adaptados mediante presión selectiva ha sido ampliamente descrita en la bibliografía, incluida la selección de mutantes capaces de asimilar furfurales (Abdulrashid y Clark, 1987). Sin embargo, hasta la generalización del uso de las técnicas de secuenciación masiva no ha sido posible plantearse el análisis de los cambios genotípicos y fenotípicos que dichas adaptaciones suponen. En los últimos años se está prestando gran atención al proceso de adaptación evolutiva en el laboratorio (ALE, de *Adaptative Laboratory Evolution*) ya que, además del interés que el problema tiene desde el punto de vista de la ciencia básica, sus resultados pueden tener una enorme aplicación en la manipulación genética de microorganismos, y de seres vivos en general (Conrad *et al.*, 2011; Winkler *et al.*, 2013).

Para tratar de identificar la mutación sufrida por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D se aprovecharon los datos de secuenciación masiva disponibles. Por una parte se disponía de la secuencia del genoma de la cepa original (*P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1), y por

otra de los datos de transcriptómica del mutante (*P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D) en medios con alcohol furfurílico (Capítulo 4). El análisis de la secuencia de los genes cuya expresión varía en medios con alcohol furfurílico como fuente de carbono en la cepa mutante (R1D) respecto a la cepa silvestre en medios con acetato mostró un posible cambio en la posición 782 del gen *BN5_02200* (782T>G). Este posible cambio fue confirmado mediante secuenciación del DNA del mutante y de la cepa silvestre (Figura 59). La mutación puntual provoca el cambio nada conservativo del triplete CTT (Leu) en la cepa silvestre por CGT (Arg) en el mutante (*p.L261R*). El alineamiento mediante CLUSTALW de las secuencias de aminoácidos deducidas de genes ortólogos de otras *Pseudomonas* muestra que ésta arginina se encuentra conservada en todos, excepto en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1, lo que abunda en la importancia de este residuo en la función de la proteína (resultados no mostrados).

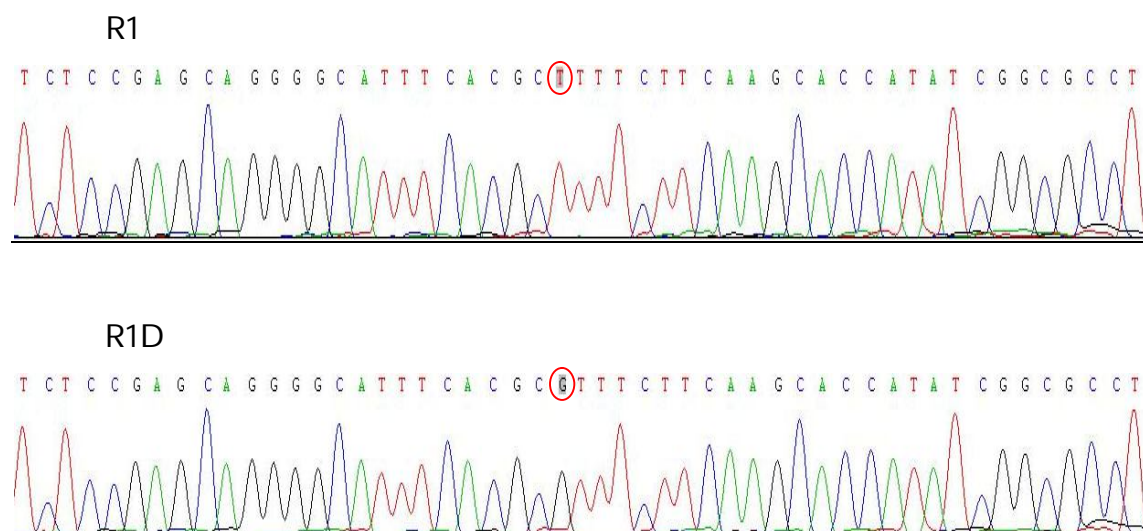


Figura 59. Identificación de la mutación sufrida por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D. Cromatogramas que muestran la zona secuenciada del gen *BN5_02200* de la cepa R1 y R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 donde se ha producido el cambio de nucleótidos. Nótese el cambio de C por G (782T>G), lo que se traduce en un cambio del aminoácido leucina (CTT) por arginina (CGT) (*p.L261R*).

La proteína codificada por *BN5_0220* presenta homología con miembros de la familia AraC/XylS de reguladores transcripcionales caracterizados por poseer un dominio de unión al DNA muy conservado, de aproximadamente 100 aminoácidos, en su extremo carboxilo terminal. La mayoría de los genes codificantes de este tipo de reguladores se encuentran aguas arriba del operón al que regulan, al contrario de lo que ocurre con los de la familia LysR, que se transcriben en la misma dirección que los genes diana.

Generalmente actúan como activadores de la transcripción en presencia de un efector químico. Estos factores de transcripción, de ~ 300 aminoácidos, pertenecen la superfamilia de proteínas unión a DNA *Helix-Turn-Helix* (HTH; hélice-giro-hélice), y tienen tres funciones reguladoras fundamentales: metabolismo del carbono, respuesta al estrés y patogénesis (Gallegos *et al.*, 1997). En lo que al metabolismo de carbono se refiere, los miembros de la familia AraC controlan la degradación de azúcares tales como arabinosa (AraC), celobiosa (CelD), melibiosa (MelR y MSMR), rafinosa (RAFR y MSMR), ramnosa (Rhar y RhaS) y xilosa (XylR); de ciertos aminoácidos tales como valina (MMSR), arginina (Adiy), y ornitina (Orur); alcoholes tales como 1,2-propanodiol (PocR); alquillbenzoatos (XylS), ácido *p*-hidroxifenilacético (HPAA), y herbicidas tales como dipropiltiocarbamato de S-etilo (TCHR) (Gallegos *et al.*, 1997).

3.5 Degradación de compuestos furánicos por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

3.5.1 Asimilación de furfural por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

La nueva cepa de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (R1D), obtenida mediante reinoculaciones sucesivas de la cepa silvestre (R1) en medios con furfural, degradó 10 mM de furfural mucho más rápidamente que R1 y en un tiempo similar al descrito para *C. basilensis* HMF14 (Figura 60), que lo hace en aproximadamente 9 horas y prácticamente sin fase de latencia (Wierckx *et al.*, 2010). La cepa R1D alcanzó la fase estacionaria a las 20 h, con un crecimiento celular máximo de 0,9 (D. O._{600nm}), y con un tiempo de latencia de unas 13 horas (Figura 60). Además el furfural se transformó rápidamente en ácido furoico, que permaneció transitoriamente en el medio de cultivo antes de ser completamente asimilado (Figura 60).

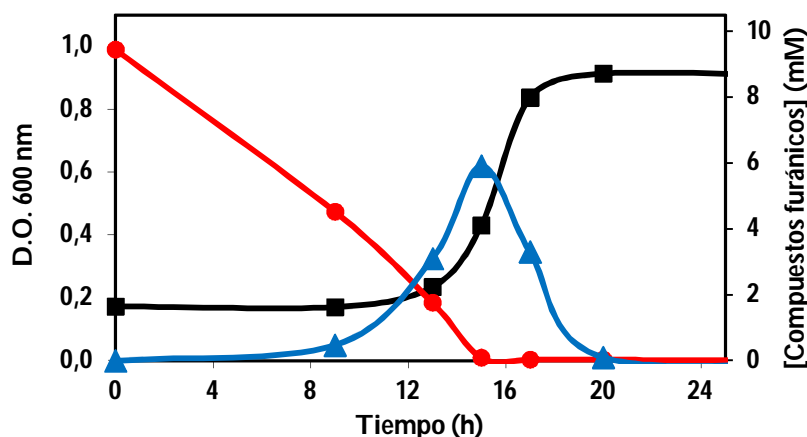


Figura 60. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D con furfural como única fuente de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con furfural (10 mM) como única fuente de carbono y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento (■) de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. Las concentraciones de furfural (●) y ácido furoico (▲) se determinaron mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos). En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados).

A diferencia de la cepa R1D, la cepa silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (R1) no alcanzó la fase estacionaria de crecimiento hasta las 160 horas, unas 140 horas después que el mutante. En la figura 61 se representan con la misma escala de tiempo las curvas de crecimiento de las dos cepas cultivadas con furfural como fuente de carbono. En lo que respecta a los metabolitos detectados en los sobrenadantes de los medios de cultivo, cabe destacar que la cepa silvestre transformó estequiométricamente todo el furfural en ácido furoico, mientras que en el mutante este compuesto se acumuló transitoriamente (Figura 61).

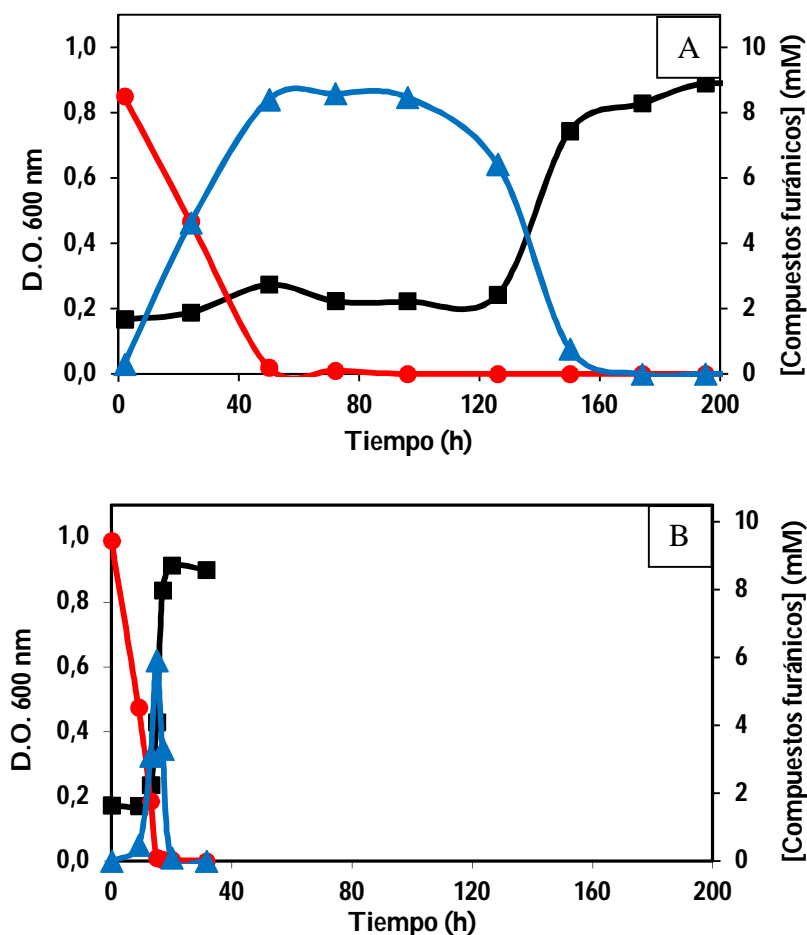


Figura 61. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 (A) y R1D (B) con furfural como única fuente de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con furfural (10 mM) como única fuente de carbono y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento (■) de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. Las concentraciones de furfural (●) y ácido furoico (▲) se determinaron mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos). En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados).

Las velocidades específicas de crecimiento (μ) de la cepa R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 fueron considerablemente mayores que las que presentó la cepa silvestre (Tabla 16). De hecho, la velocidad de crecimiento de R1D con furfural fue superior a la descrita para *C. basilensis* HMF14, y prácticamente igual a la de *P. putida* S12_fur, una cepa manipulada genéticamente y posteriormente optimizada por reinoculación sucesiva en medios con furfural (Tabla 16) (Koopman *et al.*, 2010a). Aunque *C. basilensis* HMF14 tiene una velocidad de crecimiento ligeramente inferior a la de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, alcanza densidades ópticas de casi el doble con una concentración menor de furfural (Tabla 16). Estos datos no deben ser interpretados como una indicación de que *C. basilensis*

HMF14 asimila el furfural más eficientemente que la cepa R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, ya que las densidades ópticas no pueden ser consideradas equivalentes a biomasa, sobre todo tratándose de bacterias diferentes y medidas analíticas tomadas con diferentes instrumentos. Sería necesario disponer de otros parámetros, como peso seco o proteína total, para poder comparar estas dos bacterias.

Tabla 16. Características del crecimiento de las cepas R1 y R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, *C. basilensis* HMF14 y *P. putida* S12_fur en medios de cultivo con furfural.

Organismo	[Furfural] (mM)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Tiempo de latencia (T _L)	Max. D. O. _{600 nm}
<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	5	0,29	13	0,55
<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1	5	0,019	125	0,59
<i>C. basilensis</i> HMF14*	3,5*	0,22*	--	1,09*
<i>P. putida</i> S12_fur**	3,5**	0,30**	--	--

* (Wierckx *et al.*, 2010)

** (Koopman *et al.*, 2010a)

3.5.2 Asimilación de alcohol furfurílico por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

Análogamente a lo que ocurrió con furfural, la cepa R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 también creció muy rápidamente utilizando alcohol furfurílico como fuente de carbono (Figura 62). Comparando furfural con alcohol furfurílico, y partiendo de la misma concentración (10 mM), la cepa R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 alcanzó un crecimiento celular máximo ligeramente superior con el alcohol que con furfural (D. O. _{600nm} = 1,05 vs 0,9). Además, la fase de latencia fue mucho más corta con alcohol furfurílico (4 horas, Figura 62) que con furfural (10 horas, Figura 60). Por último, la acumulación de ácido furoico fue prácticamente inexistente en los sobrenadantes de cultivos con alcohol furfurílico como fuente de carbono (Figura 62).

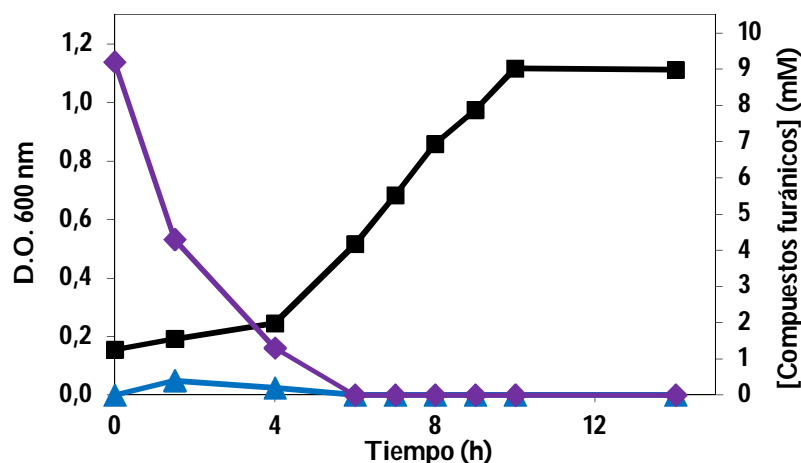


Figura 62. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D con alcohol furfurílico como única fuente de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con 10 mM de alcohol furfurílico como única fuente de carbono y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento (■) de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. Las concentraciones de alcohol furfurílico (◆) y ácido furoico (▲) se determinaron mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos). En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados).

Si comparamos el crecimiento de ambas cepas en una misma gráfica y con la misma escala de tiempo, resulta evidente que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D (Figura 63B) asimiló más eficientemente el alcohol furfurílico la cepa silvestre R1 en las mismas condiciones (Figura 63A). Mientras que la cepa R1D consumió completamente el alcohol furfurílico a las 6 horas, la cepa R1 lo hizo en 19 horas. Además, en tanto en el sobrenadante del cultivo de la cepa R1D no se detectó prácticamente ácido furoico (Figura 63B), la cepa R1 acumuló cantidades casi estequiométricas del ácido antes de asimilarlo (Figura 63A). En ambos casos, la completa degradación de ácido furoico va acompañada del crecimiento celular de la bacteria.

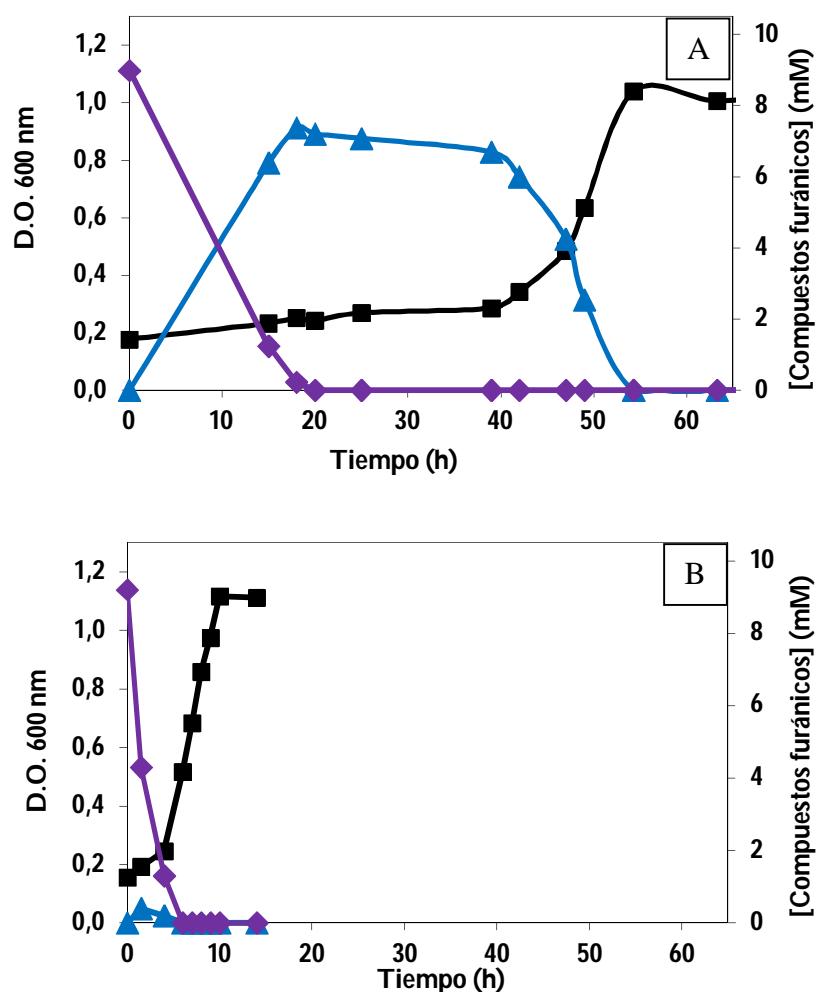


Figura 63. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 (A) y R1D (B) con alcohol furfurílico como única fuente de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con alcohol furfurílico (10 mM) como única fuente de carbono y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento (■) de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600_{nm} a los tiempos indicados. Las concentraciones de alcohol furfurílico (◆) y ácido furoico (▲) se determinaron mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos). En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados).

La velocidad específica de crecimiento (μ) de R1D con alcohol furfurílico fue considerablemente mayor que la de la cepa R1 (Tabla 17). Además, ésta fue también mayor que la descrita en la bibliografía para *C. basilensis* HMF14. Nuevamente, el hecho de que en *C. basilensis* HMF14 la densidad óptica máxima alcanzada con alcohol furfurílico sea mayor que la obtenida en este trabajo con *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D no quiere decir que una bacteria sea más eficiente que otra utilizando la fuente de carbono.

Tabla 17. Características del crecimiento de las cepas R1 y R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, y *C. basilensis* HMF14 en medios de cultivo con alcohol furfurílico.

Organismo	[A. furfurílico] (mM)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Tiempo de latencia (T _L)	Max. D. O. 600 nm
<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	5	0,34	2	0,72
<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1	5	0,14	40	0,68
<i>C. basilensis</i> HMF14*	3,5*	0,22*	--	1,09*

*(Wierckx *et al.*, 2010)

3.5.3 Asimilación de ácido furoico por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

La cepa R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 fue mucho más eficiente asimilando ácido furoico que la cepa R1, alcanzando la fase estacionaria en unas 10 horas, mientras que la cepa silvestre no lo hizo hasta transcurridas 50 horas (Figura 64A). De hecho, en este medio de cultivo la cepa R1D no presentó prácticamente fase de latencia, asimilando completamente el ácido furoico en unas 9 horas, a diferencia de lo observado para R1, que no lo degradó hasta las 50 horas (Figura 64).

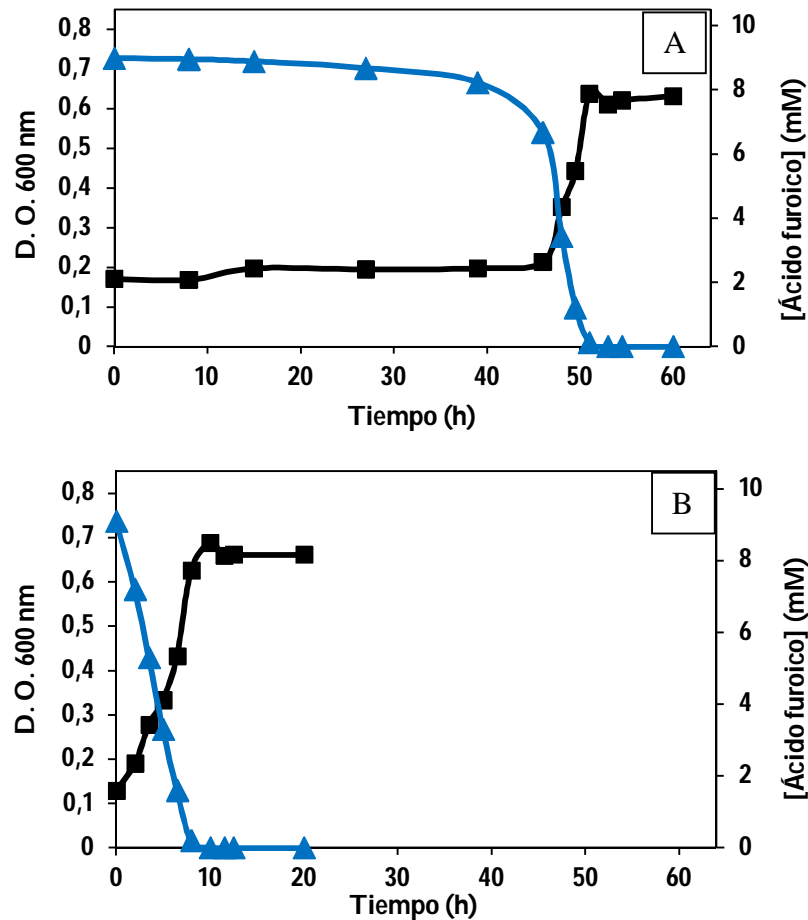


Figura 64. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 (A) y R1D (B) en medios con ácido furoico como única fuente de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con ácido furoico 10 mM como única fuente de carbono y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento (■) de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600_{nm} a los tiempos indicados. Las concentraciones de ácido furoico (▲) se determinaron mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos). En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. Como control positivo se utilizó un medio con acetato (4 g/l) como fuente de carbono, y como control negativo se utilizó un medio sin inocular (resultados no mostrados).

La velocidad específica de crecimiento (μ) de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D con ácido furoico fue mayor que la de la cepa R1 y *C. basilensis* HMF14 (Tabla 18).

Tabla 18. Características del crecimiento de las cepas R1 y R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, y *C. basilensis* HMF14 en medios de cultivo con ácido furoico.

Organismo	[A. Furoico] (mM)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Tiempo de latencia (T _L)	Max. D. O. 600 nm
<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1D	5	0,34	--	0,41
<i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1	5	0,19	48	0,39
<i>C. basilensis</i> HMF14*	3,5*	0,29*	--	0,99*

*(Wierckx *et al.*, 2010)

En lo referente a la asimilación de furfural y alcohol furfurílico, una diferencia notable entre la cepa silvestre (R1) y el mutante R1D fue que, durante el crecimiento, la segunda prácticamente no acumuló ácido furoico (Figuras 61 y 63). Además, en R1D cultivada con ácido furoico la fase de latencia fue prácticamente inexistente, en tanto que en R1 la fase de latencia es muy prolongada (Figura 64). Estos datos claramente indican que la diferencia entre R1 y R1D radica en el proceso de asimilación de ácido furoico, no en la oxidación del alcohol y del aldehído hasta ácido furoico. Por lo tanto parece que la ruta se puede dividir en dos tramos, uno conducente a la oxidación del grupo alcohol (-CH₂OH) y aldehído (-CHO) hasta ácido (-COOH), y otro consistente en la mineralización de ácido furoico. Vista así, la ruta de degradación de furfurales presenta ciertas similitudes con la asimilación de tolueno y xilenos en *P. putida* mt-2, una de las primeras rutas de degradación de compuestos aromáticos descritas en bacterias (Worsey y Williams, 1975), y por lo tanto, en el metabolismo de furfurales podríamos hablar de una ruta superior (hasta ácido furoico) y de una ruta inferior (desde ácido furoico hacia abajo).

El siguiente paso en el proceso de caracterización de la ruta de asimilación de furfurales en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D fue la determinación y caracterización de las actividades enzimáticas pronosticadas en función de los genes detectados en la anotación del genoma de la bacteria.

3.6 Actividad furfuril alcohol deshidrogenasa y la furfural deshidrogenasa.

La ruta para la asimilación de furfural descrita en *C. basilensis* HMF14 comienza con la reacción catalizada por la furfuril alcohol deshidrogenasa (FADH), seguida de la furfural deshidrogenasa (FDH) cuyo producto es el ácido furoico. Éste es sustrato de la furoil-CoA sintetasa (FCoAS), cuyo producto es a su vez sustrato de la furoil-CoA deshidrogenasa

(FCoADH) (Koopman *et al.*, 2010a). La presencia del operón *hmfABCDE* en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 sugería que la ruta metabólica podría ser muy parecida a la descrita para *C. basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a). De todas las actividades enzimáticas descritas en *C. basilensis* HMF14, en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 únicamente se pudieron determinar claramente las actividades FADH y FDH (Figura 65), que catalizan la oxidaciones de alcohol furfurílico a furfural, y de éste a ácido furoico, respectivamente. Estas dos enzimas constituirían, por analogía con la ruta de degradación de xilenos en *P. putida* mt-2, la ruta superior de degradación de furfurales, pero no está claro cuáles son los genes codificantes.

En esta ruta metabólica, la actividad furfural deshidrogenasa sería necesaria tanto para asimilar alcohol furfurílico como para metabolizar furfural. Los resultados mostrados en la figura 65B, indican que la enzima furfural deshidrogenasa se indujo en medios con furfural y alcohol furfurílico y, en menor medida, con ácido furoico. Por tanto, estos resultados sugieren que la actividad furfural deshidrogenasa es inducible por sustrato. En cambio, la actividad furfuril alcohol deshidrogenasa no es una enzima necesaria cuando las células se cultivan con furfural. De hecho, el furfural parece reprimir la expresión de esta actividad, siendo constitutiva en el resto de las condiciones de de cultivo (Figura 65A).

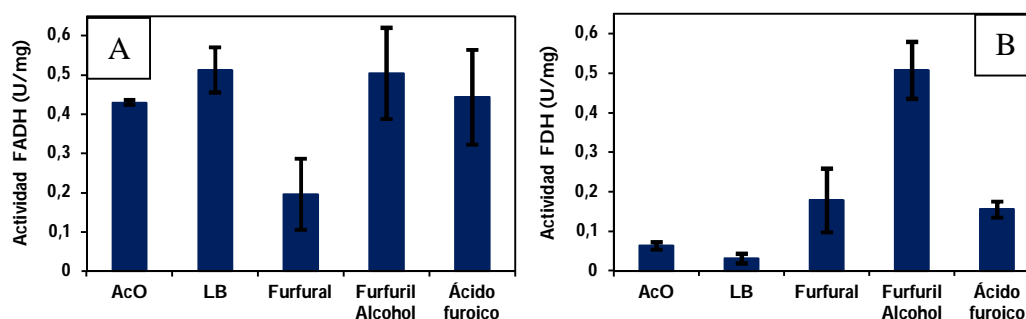


Figura 65. (A) Actividad furfuril alcohol deshidrogenasa (FADH) y (B) furfural deshidrogenasa (FDH) de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D. Las células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D se cultivaron tanto en medio rico (LB), como en medio mínimo M9 con NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno y 4 g/l de las siguientes fuentes de carbono: acetato sódico (AcO), furfural, alcohol furfurílico, o ácido furoico. Una vez en la fase exponencial de crecimiento ($\text{D.O.}_{600\text{ nm}} \approx 0,7$), las células se recogieron por centrifugación, se rompieron por diferencia de presión (prensa de French), y las actividades se determinaron como se indica en el apartado 3.5 de Materiales y Métodos. Las barras de error representan la desviación estándar de los valores de las actividades enzimáticas obtenidas en tres experimentos independientes.

En *C. basilensis* HMF14 no hay asignados genes concretos que codifiquen las enzimas furfuril alcohol deshidrogenasa y furfural deshidrogenasa (Koopman *et al.*, 2010a).

Cabe incluso la posibilidad de que ambas reacciones estén catalizadas por una única enzima. Con el objeto de intentar dirimir esta hipótesis, se intentó separar cromatográficamente ambas enzimas. En el cromatograma se puede observar que, utilizando este gradiente, la actividad furfural alcohol deshidrogenasa (FADH) y furfural deshidrogenasa (FDH) co-eluyen en la misma fracción (Figura 66). Por lo tanto, podría tratarse de una misma enzima, aunque no se puede descartar lo contrario.

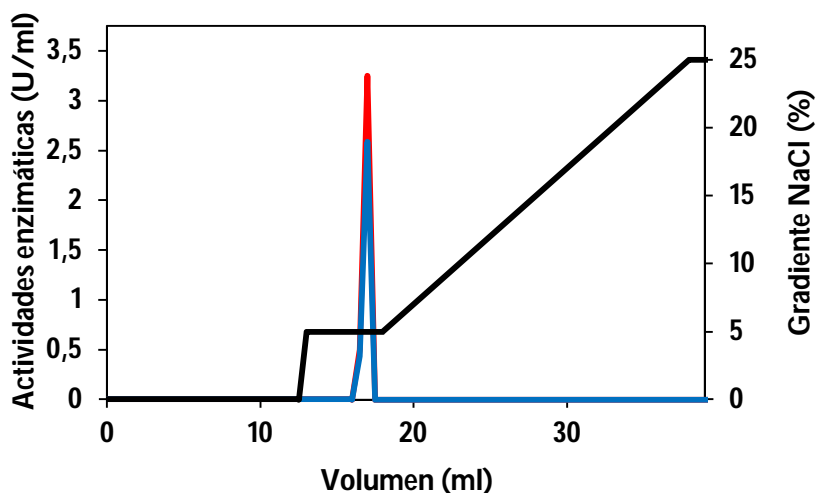


Figura 66. Separación de las enzimas FADH y FDH de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D mediante cromatografía de intercambio aniónico. Los extractos acelulares (2,0 ml) procedentes de un cultivo de 250 ml de células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D creciendo exponencialmente en medio mínimo M9, con alcohol furfúrico como única fuente de carbono, se aplicaron a una columna de intercambio aniónico Mono Q 5/50 GL a un flujo de 2,0 ml/min en tampón Tris/HCl 50 mM pH 8. La elución de las proteínas retenidas en la columna se llevó a cabo con un gradiente de NaCl (—) a las concentraciones indicadas, siendo el 100% 2,0 M de NaCl en el mismo tampón de elución. Se tomaron fracciones de 0,5 ml en las que se determinaron las actividades FADH (—), y FDH (—).

3.6.1 Caracterización de las actividades furfural alcohol deshidrogenasa y furfural deshidrogenasa.

En un paso previo a su intento de purificación y caracterización, se optimizaron dos parámetros enzimáticos; pH y temperatura óptima.

3.6.1.1 Efecto de la temperatura

En la figura 67 se muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad furfural alcohol deshidrogenasa (A) y furfural deshidrogenasa (B) en extractos acelulares de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

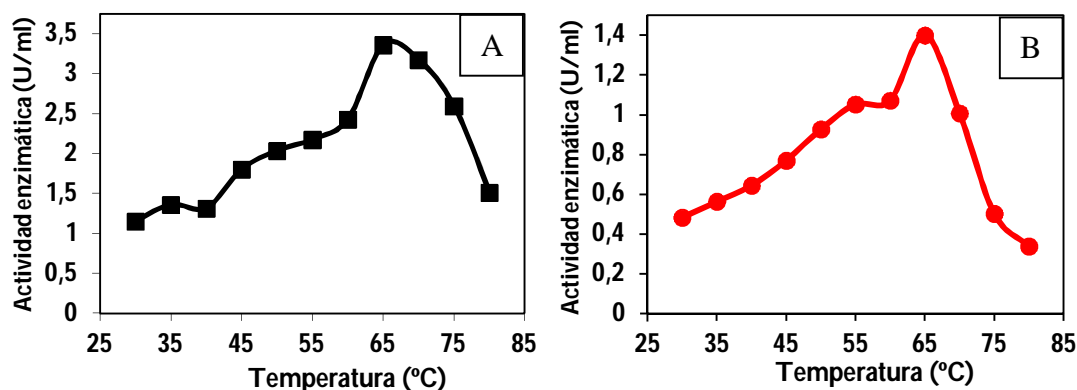


Figura 67. Efecto de la temperatura sobre la actividad furfuril alcohol deshidrogenasa (A) y furfural deshidrogenasa (B) de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D. Las células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D se cultivaron en medio mínimo M9 con NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno y con alcohol furfurílico (10 mM) como única fuente de carbono hasta la fase exponencial de crecimiento ($\text{D.O.}_{600\text{ nm}} \approx 0,7$). Posteriormente, las células se rompieron por diferencia de presión (prensa de French). Las actividades se determinaron como se indica en el apartado 5.1 de Materiales y Métodos, a partir de los extractos ultracentrifugados de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D. En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico.

La temperatura óptima para las dos enzimas fue de 65 °C. Se trata de una temperatura óptima muy elevada para una bacteria mesófila, pero curiosamente ocurre lo mismo para muchas otras enzimas de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D, como son la cianasa (Luque-Almagro *et al.*, 2008), la 3-cianoalanina nitrilasa (Acera *et al.*, 2009), la fumarasa y la aconitasa (Igeño *et al.*, 2011).

Que las dos enzimas tengan la misma temperatura óptima abunda en la hipótesis de que se trate de una única proteína, pero por otra parte la asimetría de las figuras y la meseta a unos 55 °C en las dos figuras sugieren la presencia de dos actividades diferentes.

3.6.1.2 Efecto del pH.

Del mismo modo, también se determinó el pH óptimo para las dos actividades enzimáticas. El pH óptimo para la actividad furfuril alcohol deshidrogenasa fue de 9,5 (Figura 68A), mientras que para la actividad furfural deshidrogenasa fue 6,5 (Figura 68B). El pH óptimo es parámetro una característico de cada enzima, pero de estos resultados no se puede concluir que se trate de dos enzimas diferentes, sino que puede ser una proteína con dos actividades enzimáticas.

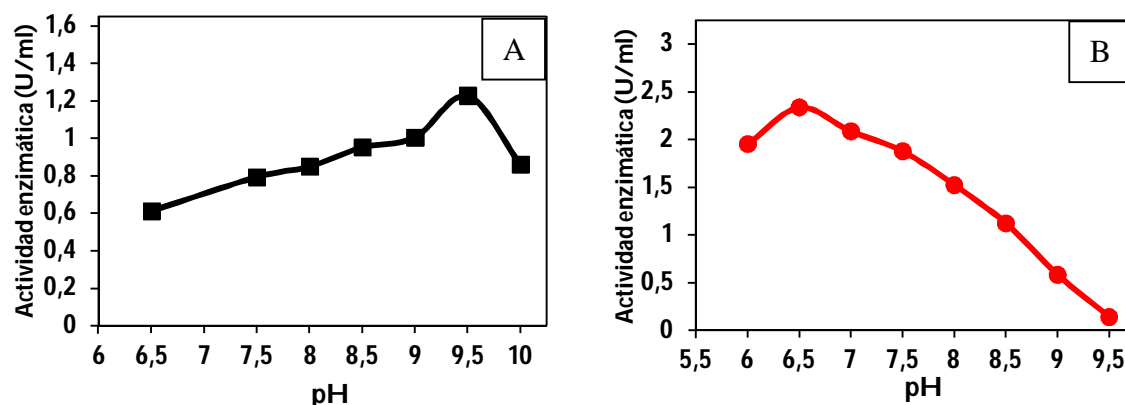


Figura 68. Efecto del pH sobre la actividad furfural alcohol deshidrogenasa (A) y furfural deshidrogenasa (B) de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D. Las células de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D se cultivaron en medio mínimo M9 con NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno y con alcohol furfúrico (10 mM) como única fuente de carbono hasta la fase exponencial de crecimiento ($\text{D.O.}_{600 \text{ nm}} \approx 0,7$). Posteriormente, las células se rompieron por diferencia de presión (prensa de French). Las actividades FADH y FDH se determinaron a diferentes pHs como se indica en el apartado 5.2 de Materiales y Métodos, a partir de los extractos ultracentrifugados de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D. En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico.

3.7 Asimilación de glucosa y furfural por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

En el proceso de elaboración de bioetanol a partir de compuestos lignocelulósicos, éstos se hidrolizan en un pretratamiento ácido donde, además de azúcares (xilosa, manosa, galactosa y glucosa), se generan diferentes tipos de compuestos entre los que se encuentran compuestos fenólicos, ácidos alifáticos y furfurales (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006; Purwadi y Taherzadeh, 2008). Como se ha descrito en el capítulo 2 de esta Tesis, *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es capaz de utilizar tanto glucosa como furfural como fuentes de carbono para su crecimiento. Sin embargo, no existen datos acerca del crecimiento de esta bacteria en medios que contengan simultáneamente glucosa y furfural, qué es lo que realmente contienen, en diferentes proporciones, los hidrolizados lignocelulósicos. Para realizar estos experimentos se mantuvo constante la concentración de glucosa (5 mM) y se suplementaron los medios de cultivo con dos concentraciones de furfural, 2,5 y 5 mM. De los experimentos mostrados en la figura 69 se puede concluir que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D puede utilizar simultáneamente glucosa y furfural como fuentes de carbono para su crecimiento.

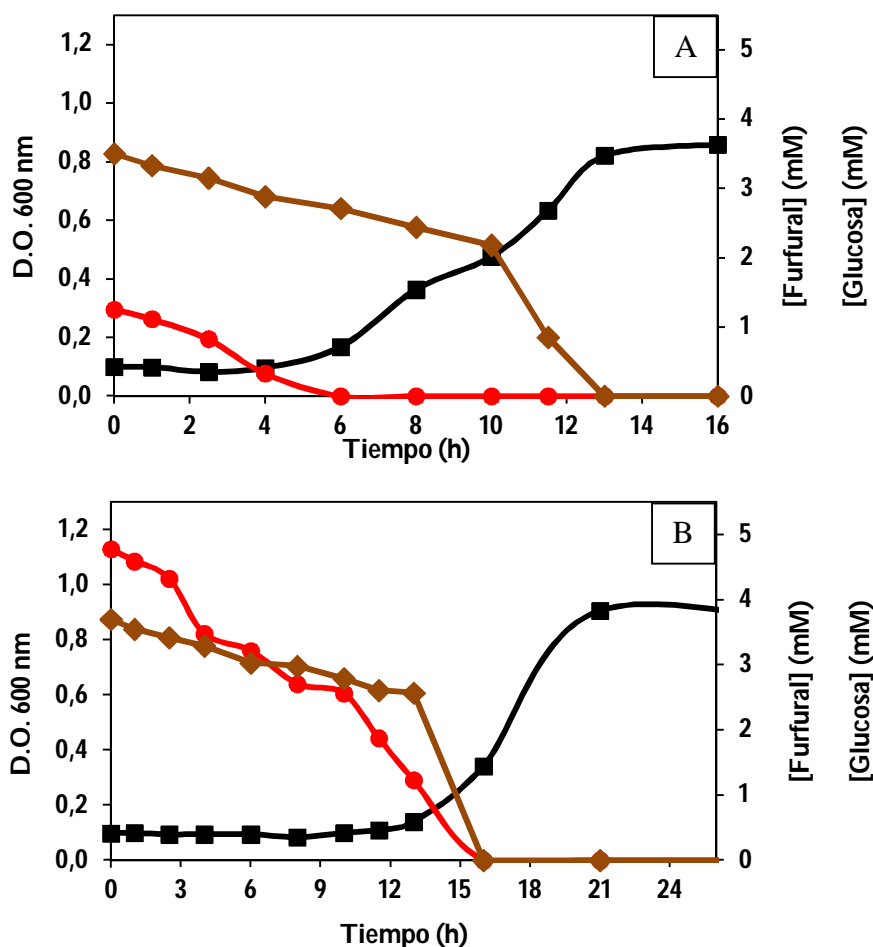


Figura 69. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D en medios con glucosa y furfural como fuentes de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con NH_4Cl (5mM) y glucosa 5 mM suplementado con furfural 2,5 mM (A) o 5 mM (B) como fuentes de carbono. El crecimiento (■) de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. La concentración de furfural (●) se determinó mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos) y la concentración de glucosa (◆) se determinó por colorimetría (3.3 de Materiales y Métodos). En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares.

El que la fase de latencia sea prolongada en los cultivos con 5mM de furfural (Figura 69B), puede ser debido a los efectos tóxicos del furfural a estas concentraciones.

En cualquier caso, independientemente de la relación en la concentración furfural/glucosa en el medio de cultivo, el hecho es que la cepa R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 degrada simultáneamente glucosa y furfural. Ello hace inviable el uso biotecnológico de esta cepa ya que eliminaría, además del tóxico (furfural), el sustrato fermentable por las levaduras para producir etanol (glucosa) a partir de hidrolizados lignocelulósicos. Por ello, se decidió construir un mutante que fuera incapaz de asimilar glucosa, pero que mantuviera inalterada su capacidad para degradar compuestos furánicos.

3.7.1 Construcción de una cepa mutante en el gen *edd* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

Como se ha indicado en la introducción, en *Pseudomonas* la ruta predominante para la asimilación de glucosa es la de Entner-Doudoroff. Se ha descrito que mutantes en la 6-fosfogluconato deshidratasa (*Edd*) de *P. aeruginosa* y *P. putida*, son incapaces de crecer en glucosa (Blevins *et al.*, 1975; Vicente y Canovas, 1973b). Con estos antecedentes, se planteó como objetivo generar un mutante en el gen *edd* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D en un esfuerzo por encontrar una cepa que asimile eficientemente los furfurales sin consumir la glucosa.

Para la generación del mutante se construyó el plásmido suicida PGEM-TE *edd aacC1* como se esquematiza en la figura 70. Básicamente, utilizando como molde DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D y como cebadores las parejas de oligonucleótidos *edd*₉U/*edd*₇₃₀L y *edd*₁₁₄₀U/*edd*₁₇₃₇L (Tabla 8), se amplificaron mediante PCR dos fragmentos internos del gen *edd*. Los productos resultantes se clonaron por separado en el vector PGEM-T Easy originando los plásmidos PGEM-TE *edd*_{9/730} y PGEM-TE *edd*_{1140/1737} (Tabla 7), que contenían, además, la diana de restricción BamHI. El plásmido PGEM-TE *edd*_{1140/1737} se linealizó digiriéndolo con Apal y BamHI. Por otro lado, el plásmido PGEM-TE *edd*_{9/730} también fue digerido con Apal y BamHI, liberándose un inserto que contenía un fragmento del gen *edd*. El inserto se ligó con el plásmido PGEM-TE *edd*_{1140/1737} y se obtuvo un nuevo plásmido, PGEM-TE *edd*_{9/1737} (Tabla 7), que contenía dos fragmentos de DNA del gen *edd* unidos por la secuencia de restricción BamHI. Seguidamente, utilizando como molde el DNA del plásmido PMS255, se amplificó el gen *aacC1* que confiere resistencia a gentamicina, y el producto amplificado se digirió con la enzima BamHI. Por último, este fragmento (inserto) se ligó con PGEM-TE *edd*_{9/1737} previamente digerido con BamHI. Como resultado se obtuvo el plásmido PGEM-TE *edd aacC1* (Tabla 7), que contiene un fragmento del gen *edd* interrumpido por *aacC1*.

El plásmido resultante se transfirió a *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D por electroporación. Los transformantes seleccionados en medio LB suplementado con gentamicina (10 µg/ml) fueron el resultado de una doble recombinación homóloga entre el gen nativo cromosómico y los correspondientes fragmentos internos clonados en el vector suicida.

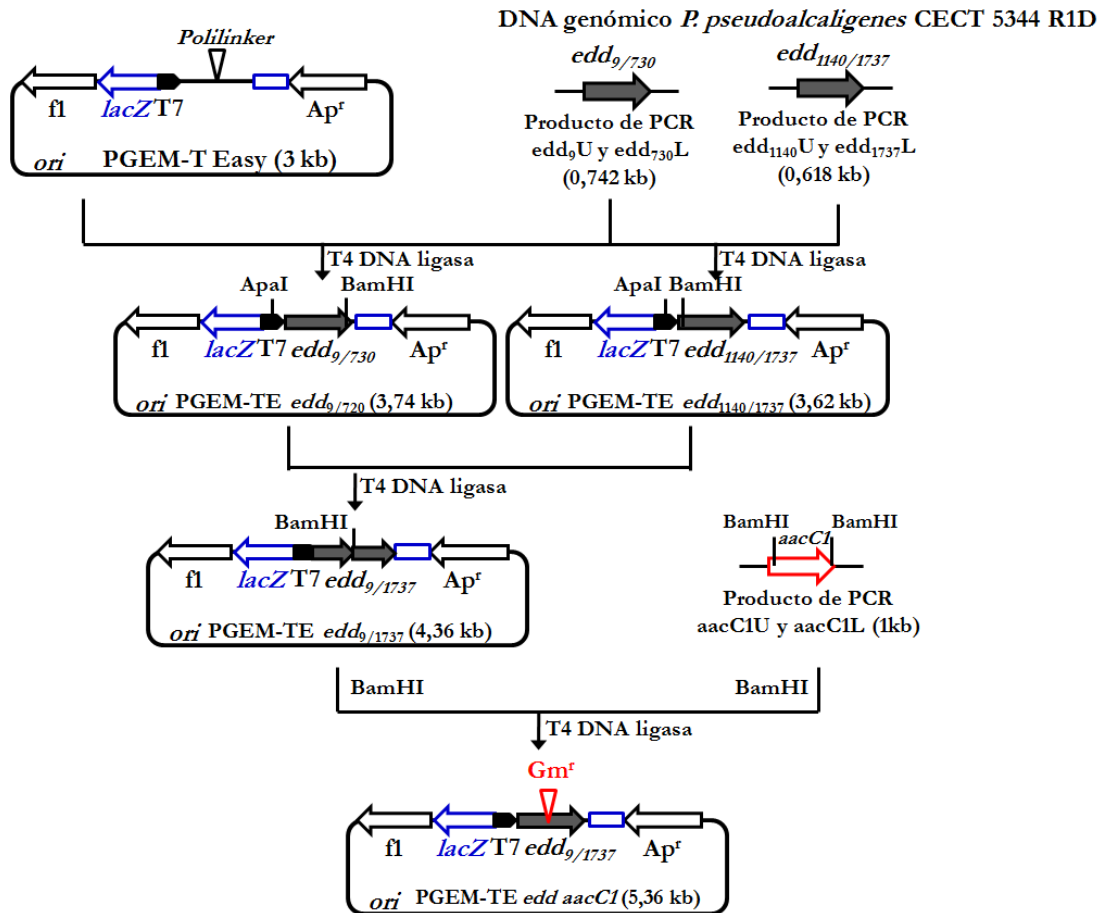


Figura 70. Esquema de la construcción del plásmido PGEM-TE *edd aacC1*. Las abreviaturas utilizadas son: T7, promotor de la RNA polimerasa del fago T7; *lacZ*, gen que codifica la β -galactosidasa; f1, región del fago 1 y ori, origen de replicación del plásmido.

La correcta integración del plásmido suicida por doble recombinación se comprobó mediante amplificación por PCR del DNA genómico mutado (Figura 71), utilizando los oligonucleótidos *edd*₉U y *edd*₁₇₃₇L (Tabla 8) como cebadores.

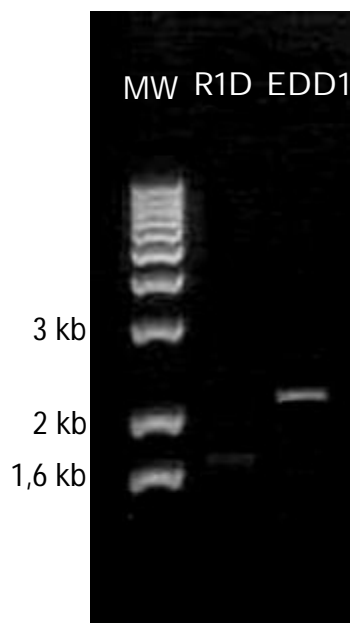


Figura 71. Comprobación de la inserción génica en el mutante EDD1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D mediante PCR. A partir de DNA genómico de la cepa R1D y de un clon positivo (EDD1) se realizó una amplificación por PCR utilizando los cebadores *edd*₉U/*edd*₁₇₃₇L. El tamaño de la banda obtenida para la cepa mutante fue de 2,299 kb (EDD1), que se corresponde a la suma del producto de *edd*_{9-730/1140-1737} (742 y 618 kb respectivamente) y el gen *aacC1* (0,939 kb) insertado, siendo 0,550 kb mayor que el fragmento amplificado de la cepa silvestre (1,749 kb, R1D), que corresponde al tamaño del gen *edd* amplificado por los cebadores *edd*₉U/*edd*₁₇₃₇L. MW representa el patrón de peso molecular 1 kb DNA *Ladder*.

3.7.2 Caracterización fenotípica del mutante en el gen *edd* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

Como se aprecia en la figura 72, el mutante en el gen *edd* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D (EDD1) fue incapaz de utilizar glucosa como única fuente de carbono y energía para el crecimiento.

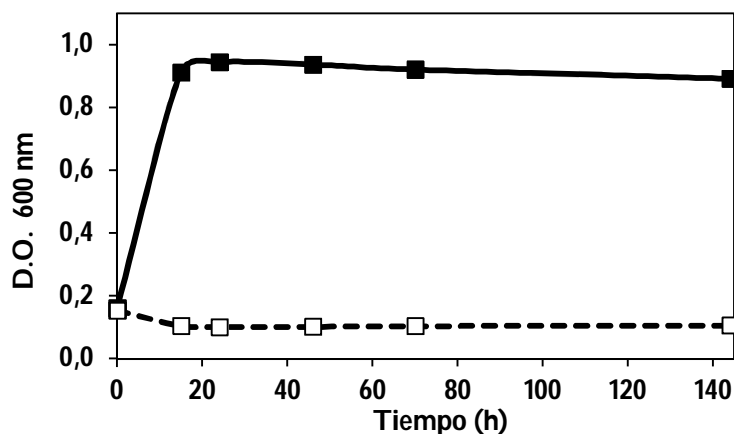


Figura 72. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D y el mutante EDD1 con glucosa como fuente de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con glucosa (5 mM) como única fuente de carbono y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. (■) Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D. (□) Crecimiento del mutante EDD1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D

En *P. putida* ATCC 12633 la mutación en el gen *edd* confiere el mismo fenotipo de incapacidad para la asimilar glucosa (Vicente y Canovas, 1973a; b). El hecho de que el mutante EDD1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D no asimile glucosa no implica que no la pueda transformar. Como el objetivo final es utilizar esta cepa en la detoxificación de hidrolizados lignocelulósicos, se estudió el comportamiento del mutante EDD1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D en medios con furfural y glucosa como fuentes de carbono (Figura 73).

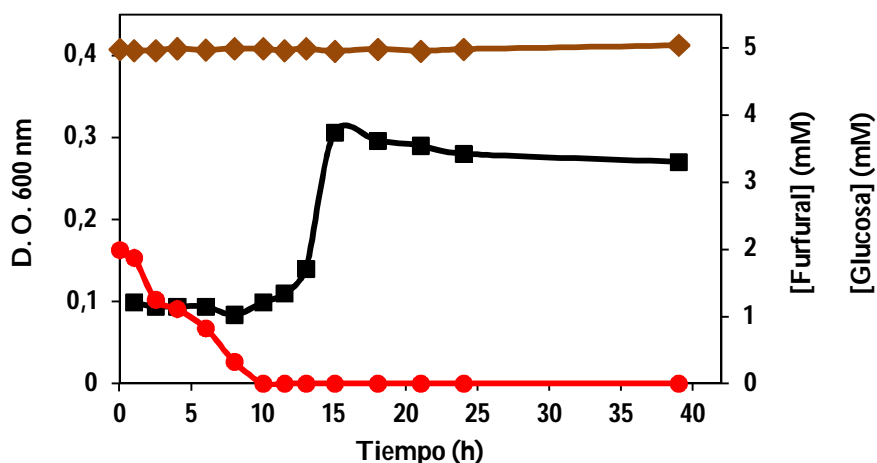


Figura 73. Crecimiento del mutante EDD1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D en medios con glucosa y furfural como fuentes de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con glucosa (5 mM) y con furfural (2,5 mM) como fuentes de carbono y NH_4Cl (5 mM) como única fuente de nitrógeno. El crecimiento (■) de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. La concentración de furfural (●) se determinó mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos) y la concentración de glucosa (◆) se determinó por colorimetría (3.3 de Materiales y Métodos). En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares.

A diferencia de la cepa silvestre R1D (Figura 69), el mutante EDD1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D en presencia de glucosa en el medio asimiló únicamente el furfural, y no fue capaz de consumir o transformar la glucosa cuya concentración permaneció constante a lo largo del experimento (Figura 73). Estos resultados son prometedores desde un punto de vista biotecnológico puesto que permitiría el uso de esta bacteria mutante en procesos de la eliminación de compuestos inhibidores (furfurales) en hidrolizados lignocelulósicos sin alterar la concentración azúcares.

Capítulo 4.

Perfil transcripcional global de la asimilación de alcohol furfurílico en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1D

En un trabajo pionero en la degradación de compuestos furánicos se demostró que la ruta bioquímica para la asimilación de ácido furoico por *Pseudomonas* F2 comienza con su activación con CoA, en un proceso dependiente de ATP, tras el cual el compuesto se oxida hasta 2-oxoglutarato (Trudgill, 1969). Esta ruta, con la inclusión de 5-hidroxi-2-furoil-CoA como intermediario clave (Kitcher y Trudgill, 1970), es básicamente la que hoy en día está aceptada y ha servido como base para asignar funciones a los genes del operón responsable de la degradación de ácido furoico en *C. basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a). Sin embargo, la base genética de la degradación de ácido furoico no es muy conocida en *Pseudomonas*. En *P. putida* se han descrito dos mutantes que, generados al azar con transposones, están afectados en la asimilación de ácido furoico (Nichols y Mertens, 2008). En ambos casos el transposón inactivó genes reguladores. En ese artículo se realizó un análisis transcripcional, mediante PCR en tiempo real, de los genes adyacentes a los lugares de inserción del transposón. Sin embargo, ninguno de estos genes tiene homología con los que se describieron poco después en *C. basilensis* HMF14, que a su vez son homólogos a los identificados en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Es decir, hasta la fecha no se han descrito en ninguna *Pseudomonaceae* los genes que codifican las enzimas necesarias para catalizar las reacciones de la ruta que se propuso hace 45 años para la asimilación de ácido furoico en *Pseudomonas* F2. Además, no está claro qué genes son los que codifican las deshidrogenasas necesarias para la transformación de alcohol furfurílico en furfural y de furfural en ácido furoico, ni en *C. basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a) ni en *Pseudomonas*. Para intentar resolver todas estas incógnitas se planteó realizar un estudio del perfil transcripcional global de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D en respuesta a la utilización de alcohol furfurílico como única fuente de carbono. De entre los compuestos furánicos, se eligió alcohol furfurílico porque en la ruta de asimilación del alcohol tanto el furfural como el ácido furoico son intermediarios.

Para el análisis transcriptómico los RNAs se extrajeron y procesaron como se indica en el apartado 7.13 de Material y Métodos, obteniéndose los datos que se resumen en la tabla 19.

Para sistematizar el estudio, en primer lugar los genes se han clasificado en dos categorías, por una parte aquellos cuya expresión aumenta en medios con alcohol furfurílico, y por otra aquellos cuya expresión disminuye. Como valor de corte se ha considerado significativo un nº de veces de cambio en la expresión de un gen de 2-3 veces respecto a su expresión en medio de cultivo con acetato como fuente de carbono (en valor

absoluto). Además, sólo se han considerado estadísticamente significativos aquellos cambios de expresión con un *p-value* menor de 0,1. Sin embargo, en algunos casos se han incluido genes que no se atienen a estos criterios, bien porque dicho gen forme parte de un operón en el que el resto de genes cumplen las pautas de selección adoptadas, o porque sean genes funcionalmente relevantes en el contexto de la asimilación de furfurales. Además, los genes se han ordenado en la tabla en orden decreciente de expresión diferencial (nº de veces de cambio), después de ser agrupados en operones. Es decir, el primer operón contiene al menos un gen cuya expresión varía más que los genes de los operones situados por debajo, pero puede no ocurrir así, ya que un determinado gen ha podido ser incluido en esa posición por formar parte del operón. Por último, para la predicción de operones se consideró que dos genes se co-expresan cuando las lecturas de la zona intergénica son comparables y estadísticamente significativas en comparación con las lecturas de los dos genes.

Tabla 19. Genes con expresión diferencial en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D cultivadas en alcohol furfurílico vs acetato potásico. Las células se cultivaron en medio M9 con alcohol furfurílico (10 mM) como fuente de carbono y cloruro amónico (5 mM) como fuente de nitrógeno hasta una D.O_{600 nm} de 0,3. El mRNA se extrajo y trató como se indica en el Apartado 7.13 de Materiales y Métodos. Como condición calibradora se utilizó la expresión génica de la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 cultivada con acetato potásico (50 mM) como fuente de carbono y cloruro amónico (5 mM) como fuente de nitrógeno.

ORF (a)	Nombre	Veces de cambio	<i>p-value</i>	Descripción
Genes regulados positivamente por R1D				
BN5_02210	<i>hmfA</i>	406,52	0,00037	Furoil-CoA deshidrogenasa, subunidad grande
BN5_02209	<i>hmfB</i>	418,17	0,00043	Furoil-CoA deshidrogenasa, subunidad mediana
BN5_02208	<i>hmfC</i>	694,47	0,00028	Furoil-CoA deshidrogenasa, subunidad pequeña
BN5_02207	<i>hmfD</i>	688,70	0,00016	Furoil-CoA sintetasa
BN5_02206	<i>hmfE</i>	303,19	0,00058	2-oxoglutaroil-CoA hidrolasa
BN5_02205	<i>benE1</i>	820,05	0,00012	Posible transportador de membrana
BN5_02204	--	813,85	0,00019	Posible transposasa
BN5_02203*	--	NA	NA	Posible transposasa
BN5_02202	--	155,02	0,00186	Transposasa por inserción similar a IS1106
BN5_02201	<i>psfD</i>	63,03	0,0079	Probable factor de maduración de Mo-proteínas
BN5_02200*	<i>araC</i>	1,58	0,716	Regulador transcripcional perteneciente a la familia AraC
BN5_02246	<i>Ppsal_2432</i>	219,46	0,004	Deshidrogenasa de cadena corta

BN5_02247	<i>Ppsal_2433</i>	32,20	0,023	Acetil-CoA acetiltransferasa
BN5_02245	<i>liuR</i>	80,78	0,011	Regulador transcripcional perteneciente a la familia MerR
BN5_02244	<i>liuA</i>	26,96	0,026	Isovaleril-CoA deshidrogenasa
BN5_02243	<i>liuB</i>	24,82	0,028	Metilcrotonil-CoA carboxilasa, subunidad b
BN5_02242	<i>liuC</i>	35,61	0,019	Carboxigeranoil.CoA hidratasa
BN5_02241	<i>liuD</i>	21,95	0,032	Metilcrotonil-CoA carboxilasa, subunidad a
BN5_02240	<i>liuE</i>	15,92	0,054	Hidroximetilglutaroil-CoA liasa
BN5_00090	<i>coxB</i>	9,907	0,090	Citocromo <i>c</i> oxidasa, subunidad I
BN5_00091	<i>coxA</i>	35,82	0,015	Citocromo <i>c</i> oxidasa, subunidad II
BN5_00092	<i>cox11</i>	55,97	0,0095	Citocromo <i>c</i> oxidasa Proteína de ensamblaje
BN5_00093	<i>cox3</i>	54,66	0,0086	Citocromo <i>c</i> oxidasa, subunidad III
BN5_00095	<i>Ppsal_146</i>	27,56	0,029	Proteína hipotética
BN5_00096	<i>Ppsal_147</i>	16,98	0,077	Proteína hipotética
BN5_00097	<i>ctaA</i>	35,66	0,027	Citocromo <i>b</i> ₅₆₁
BN5_00098	<i>ctaB</i>	13,56	0,073	Hemoproteína IX farnesiltransferasa
BN5_02259	<i>Ppsal_2445</i>	30,27	0,018	Proteína de membrana
BN5_02260	<i>Ppsal_2446</i>	37,77	0,016	Proteína de membrana
BN5_02158	<i>pedE</i>	31,57	0,017	Quinoproteína etanol deshidrogenasa
BN5_02157	<i>pedD</i>	21,58	0,031	Proteína con repeticiones pentapeptídicas
BN5_01316*	<i>Ppsal_1536</i>	9,699	0,130	Transportador. Tipo ABC
BN5_01317	<i>Ppsal_1537</i>	37,08	0,025	Transportador. Tipo ABC
BN5_01318*	<i>Ppsal_1538</i>	8,890	0,153	Transportador. Tipo ABC
BN5_01319	<i>Ppsal_1539</i>	19,60	0,058	Transportador. Tipo ABC
BN5_01320*	<i>Ppsal_1540</i>	4,06	0,348	Transportador. Tipo ABC
BN5_01321	<i>Ppsal_1541</i>	14,86	0,054	Transportador. Tipo ABC
BN5_00341	<i>ligB</i>	29,51	0,026	DNA ligasa NAD ⁺ -dependiente
BN5_02372	<i>comEA</i>	29,51	0,026	Proteína ComEA
BN5_00299	<i>fdhD</i>	16,63	0,045	Proteína de la familia Formiato deshidrogenasa, FdhD
BN5_00298*	<i>Ppsal_0332</i>	7,66	0,132	Posible oxidorreductasa
BN5_02333	<i>yohC</i>	14,73	0,052	Proteína hipotética
BN5_02153	<i>Ppsal_2345</i>	14,73	0,053	Proteína hipotética
BN5_03328	<i>Ppsal_714</i>	48,77	0,055	Proteína no caracterizada
BN5_04094	<i>kdpA</i>	17,53	0,064	ATPasa. Subunidad A
BN5_04093*	<i>kdpB</i>	3,157	0,414	ATPasa. Subunidad B

Resultados y Discusión

BN5_04092*	<i>kdpC</i>	4,572	0,462	ATPasa. Subunidad C
BN5_04091*	<i>kdpD</i>	-1,558	0,809	ATPasa. Subunidad D
BN5_04090*	<i>kdE</i>	-1,233	0,896	ATPasa. Subunidad E
BN5_03809	<i>Ppsal_3723</i>	18,59	0,065	Proteína hipotética
BN5_02044	<i>Ppsal_2240</i>	12,34	0,072	Proteína hipotética
BN5_02043	<i>Ppsal_2239</i>	9,87	0,088	Proteína hipotética
BN5_00662	<i>Ppsal_1277</i>	11,48	0,076	Componente del pilus tipo IV.
BN5_00661*	<i>Ppsal_1276</i>	1,294	0,480	Pilus tipo IV. Pre-pilina
BN5_00660*	<i>Ppsal_1275</i>	2,890	0,425	Pilus tipo IV. Similar a pre-pilina PilV
BN5_00659*	<i>Ppsal_1274</i>	1,873	0,620	Pilus tipo IV. Proteína de ensamblaje PilW
BN5_00658*	<i>Ppsal_1273</i>	1,488	0,778	Pilus tipo IV. Proteína de ensamblaje PilX
BN5_00657*	<i>Ppsal_1272</i>	1,912	0,606	Pilus tipo IV. Proteína de ensamblaje Tfp
BN5_00656*	<i>Ppsal_1271</i>	2,736	0,435	Pilus tipo IV. Pilina
BN5_00173	<i>comM</i>	11,41	0,082	Proteína quelante de magnesio, subunidad CHII
BN5_01534	<i>Ppsal_2675</i>	35,05	0,093	Proteína hipotética
BN5_00766*	<i>scoA</i>	9,716	0,103	Succinil-CoA:3-cetoacil-CoA transferasa
BN5_00765	<i>scoB</i>	11,40	0,088	Butiril-CoA: acetato de CoA transferasa
BN5_00764*	<i>atoB</i>	5,760	0,199	Acetil-CoA acetiltransferasa
BN5_00763*	<i>atoE</i>	2,477	0,503	Transportador de ácidos grasos de cadena corta
BN5_03131	<i>Ppsal_904</i>	9,866	0,096	Multi-sensor híbrido histidina quinasa
BN5_03130*	<i>Ppsal_905</i>	Inf	0,335	Multi-sensor híbrido histidina quinasa
BN5_03129*	<i>Ppsal_906</i>	Inf	0,704	Diguanilato ciclasa
BN5_03128*	<i>Ppsal_907</i>	2,540	0,631	Diguanilato ciclasa
Genes regulados negativamente por R1D				
BN5_04103	<i>Ppsal_4010</i>	-35,28	0,018	Regulador transcripcional de la familia Fis
BN5_04104	<i>Ppsal_4011</i>	-21,92	0,033	Hidrolasa alfa/beta
BN5_04105	<i>Ppsal_4012</i>	-94,48	0,015	Proteína hipotética
BN5_04106	<i>cysP</i>	-467,83	0,001	Transportador de sulfato. Tipo ABC. Proteína de unión a sustrato
BN5_04107	<i>cysU</i>	-44,18	0,024	Transportador de sulfato. Tipo ABC.
BN5_04108	<i>cysW</i>	-28,00	0,029	Transportador de sulfato. Tipo ABC
BN5_04109*	<i>cysA</i>	-7,26	0,142	Transportador de sulfato. Tipo ABC
BN5_04088	<i>lsfA</i>	-36,97	0,014	Proteína antioxidante
BN5_04087	<i>ssuE</i>	-33,48	0,016	Reductasa NAD(P)H dependiente
BN5_04086	<i>ssuA</i>	-130,63	0,002	Transportador de sulfato. Tipo ABC. Proteína de unión a sustrato
BN5_04085	<i>ssuD</i>	-179,45	0,002	Alcanosulfonato monooxigenasa
BN5_04084	<i>ssuC</i>	-120,54	0,003	Transportador de sulfonatos alifáticos
BN5_04083	<i>ssuB</i>	-Inf	0,002	Transportador de sulfonatos alifáticos
BN5_04082	<i>ssuF</i>	-54,46	0,008	Proteína unidora de molibdopterina SsuF
BN5_04081	<i>cysP</i>	-29,02	0,019	Transportador de sulfato. Tipo ABC
BN5_04080*	<i>cysU</i>	-4,68	0,239	Transportador de sulfato. Tipo ABC

BN5_04079*	<i>cysW</i>	-3,73	0,317	Transportador de sulfato. Tipo ABC
BN5_01815	<i>metE</i>	-29,51	0,019	5-metiltetrahidropteroltriglutamato homocisteína metiltransferasa
BN5_00588	<i>Ppsal_1206</i>	-23,39	0,027	Adenililsulfato quinasa. Subunidad 1
BN5_00587	<i>Ppsal_1205</i>	-16,06	0,046	Adenililsulfato quinasa. Subunidad 2
BN5_04334	<i>Ppsal_4236</i>	-15,22	0,051	Proteína hipotética
BN5_01513	<i>Ppsal_2656</i>	-12,14	0,072	Oxidoreductasa probablemente involucrada en la reducción de sulfito
BN5_01512*	<i>sir</i>	-5,797	0,184	Sulfito reductasa
BN5_04428*	<i>atpI</i>	-1,546	0,732	ATP sintasa, subunidad I
BN5_04427*	<i>atpB</i>	-4,466	0,251	ATP sintasa, subunidad a
BN5_04426*	<i>atpE</i>	-3,626	0,320	ATP sintasa, subunidad c
BN5_04425*	<i>atpF</i>	-5,240	0,208	ATP sintasa, subunidad b
BN5_04424	<i>atpH</i>	-11,24	0,077	ATP sintasa, subunidad δ
BN5_04423*	<i>atpA</i>	-8,517	0,110	ATP sintasa, subunidad α
BN5_04422*	<i>atpG</i>	-7,971	0,121	ATP sintasa, subunidad χ
BN5_04421*	<i>atpD</i>	-6,997	0,143	ATP sintasa, subunidad β
BN5_04420*	<i>atpC</i>	.6,914	0,146	ATP sintasa, subunidad ϵ
BN5_04247	<i>metQ</i>	-10,62	0,083	Transportador de D-metionina. Tipo ABC. Lipoproteína unidora de D-metionina.
BN5_04246*	<i>metI</i>	-6,965	0,157	Transportador de D-metionina. Tipo ABC. Permeasa.
BN5_04245*	<i>metN</i>	-6,011	0,189	Transportador de D-metionina. Tipo ABC. Proteína unidora de ATP
BN5_01775	<i>acnB</i>	-9,743	0,092	Aconitasa hidratasa
BN5_04159	<i>phoB</i>	-9,580	0,098	Proteína reguladora de la homeostasis de fosfato.
BN5_01364*	<i>glcA</i>	-3,739	0,309	Citrato sintasa
BN5_01369*	<i>sucA</i>	-3,427	0,340	2-oxoglutarato deshidrogenasa, componente E1
BN5_01370*	<i>sucB</i>	-4,963	0,221	2-oxoglutarato deshidrogenasa, componente E2
BN5_01371*	<i>lpdA</i>	-5,158	0,211	Dihidrolipoamida deshidrogenasa
BN5_01372*	<i>sucC</i>	-5,99	0,175	Succinil-CoA sintetasa, subunidad α
BN5_01373*	<i>sucD</i>	-5,37	0,201	Succinil-CoA sintetasa, subunidad β
BN5_01678*	<i>aceA</i>	-5,78	0,183	Isocitrato liasa
BN5_03848*	<i>glcB</i>	-5,47	0,197	Malato sintasa
BN5_00598*	<i>Ppsal_1216</i>	-3,285	0,357	Ubiquinol citocromo <i>c</i> oxidasa, subunidad Fe-S
BN5_00599*	<i>Ppsal_1217</i>	-3,557	0,326	Citocromo <i>b₁</i>
BN5_00600*	<i>Ppsal_1218</i>	-5,58	0,192	Ubiquinol citocromo <i>c</i> reductasa
BN5_02058*	<i>ccoP1</i>	-5,480	0,197	Citocromo <i>b</i> oxidasa, tipo <i>cbb3</i> , subunidad III
BN5_02059*	<i>ccoQ1</i>	-4,433	0,264	Citocromo <i>b</i> oxidasa, tipo <i>cbb3</i> , subunidad <i>ccoQ</i>
BN5_02060*	<i>ccoO1</i>	-3,827	0,302	Citocromo <i>b</i> oxidasa, tipo <i>cbb3</i> , subunidad II
BN5_02061*	<i>ccoN1</i>	-3,110	0,378	Citocromo <i>b</i> oxidasa, tipo <i>cbb3</i> , subunidad I
BN5_01365*	<i>sdhC</i>	-2,128	0,555	Succinato deshidrogenasa. Subunidad C

Resultados y Discusión

BN5_01366*	<i>sdhD</i>	-2,809	0,422	Succinato deshidrogenasa. Subunidad D
BN5_01367*	<i>sdhA</i>	-4,797	0,230	Succinato deshidrogenasa. Subunidad A
BN5_01368*	<i>sdhB</i>	-3,882	0,296	Succinato deshidrogenasa. Subunidad B

a) Los genes se han agrupado en posibles operones, o en su caso, en *loci*. Se representan los ORF cuya expresión presenta un *p-value* < 0,1, valor máximo estadísticamente aceptable.

(*) ORF cuya expresión presenta un valor de *p-value* > 0,1 o cuya expresión no varía más de 2-3 veces, pero que se han incluido por formar parte de un operón conteniendo genes que sí cumplen este criterio, o porque su función haya sido estudiada o discutida en este trabajo.

4.1 Sobreexpresión génica en respuesta a alcohol furfurílico en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

El gen más diferencialmente expresado (unas 820 veces) en los cultivos celulares con alcohol furfurílico fue *benE* (BN5_02205). Este gen parece formar parte de un operón que comienza con *hmfA* (BN5_02210), sigue con *hmfB* (BN5_02209), *hmfC* (BN5_02208), *hmfD* (BN5_02207), *hmfE* (BN5_02206), el citado *benE* (BN5_02205), y parece terminar con BN5_02204, una posible transposasa cuya expresión está aumentada unas 813 veces respecto a células cultivadas con acetato. No se disponen de las lecturas correspondientes gen contiguo (BN5_02203), pero de los tres siguientes (BN5_02202, BN5_02201 y BN5_02200), los dos primeros están claramente sobre-expresados en medios con alcohol furfurílico (Tabla 19) y los tres parecen formar parte de una agrupación génica que se expresa en la misma dirección que el operón *hmf*. Mientras que BN5_02202 codifica una posible transposasa, los dos siguientes son homólogos a *psfD* (B3FNL4) y a un gen de la familia *AraC* (B3FNL5), ambos descritos previamente como genes posiblemente relacionados con el metabolismo del ácido furoico en *P. putida* Fu1 (Nichols y Mertens, 2008). Es decir, en esta región del cromosoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se encuentran agrupados los genes *hmf*, que son necesarios para la asimilación de ácido furoico en *C. basilensis* HMF14, además de un posible transportador de benzoato, que no se ha descrito en contexto génico en ningún otro organismo, y también dos genes homólogos a los genes de *P. putida* posiblemente implicados en la asimilación de furoato, todo ello flanqueado por genes relacionados con la movilidad y transferencia horizontal de DNA. La presencia de todos estos genes en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 justificó la hipótesis inicial de que esta bacteria podría asimilar furfurales (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Lo que se demuestra en esta Tesis es que la expresión de estos genes responde positivamente, y de una forma muy acentuada, al crecimiento de la bacteria con alcohol furfurílico, lo cual es

coherente con la hipótesis de partida y con los antecedentes bibliográficos. Cabe destacar la naturaleza quimérica de la agrupación y la presencia de un gen no descrito hasta la fecha en este contexto, *benE*. Como se describirá más adelante en este capítulo, la disrupción insercional este gen provocó un retraso en el crecimiento de la bacteria en medios con ácido furoico, por lo que a BenE1 se le puede asignar la función de transportador de furoato.

El gen *psfD* (BN5_02201), que ha sido relacionado con el catabolismo del ácido furoico en *P. putida* Fu1 (Nichols y Mertens, 2008) codifica un posible factor de maduración de molibdoenzimas. Por otra parte, la furoil-CoA deshidrogenasa de *P. putida* Fu1 parece ser una Mo-enzima, lo que justifica que el molibdeno sea esencial para el metabolismo de furoato, pero no de succinato, (Koenig y Andreesen, 1989). En *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 adyacente a *psfD* (BN5_02201) se encuentra un regulador transcripcional perteneciente a la familia *AraC/XylS* (BN5_2200). Como se ha detallado en el capítulo 3 de esta Tesis, la función de este gen es esencial para el metabolismo de alcohol furfurílico, furfural y ácido furoico en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

Aparte de los citados y discutidos hasta este punto, no existen antecedentes bibliográficos para el resto de genes diferencialmente expresados como respuesta a alcohol furfurílico en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Tabla 19).

En una zona relativamente próxima a los genes *hmf* se identificaron varios genes cuya expresión también se indujo en medios con alcohol furfurílico. Por un lado está una posible deshidrogenasa de cadena corta (BN5_02246) y una acetil-CoA acetiltransferasa (BN5_02247), que se expresan unas 200 y 30 veces más, respectivamente. Contiguo pero con orientación contraria se localiza el operón *liuABCDER*, que se sobre-expresa entre 15 y 80 veces (Tabla 19). En lo referente a la posible deshidrogenasa de cadena corta (BN5_02246), este gen podría ser un candidato a codificar una deshidrogenasa que participe en la oxidación de alcohol furfurílico a furfural y/o de furfural a ácido furoico. Hasta la fecha no se conocen los genes codificantes de las deshidrogenasas necesarias para la oxidación de alcohol furfurílico hasta ácido furoico. Adyacente a BN5_02246, también se incrementaron los niveles de mRNA de *Ppsal_02433* (BN5_02247), que codifica una posible acetil-CoA acetiltransferasa, relacionada de alguna manera con reacciones en las que interviene el acil-CoA. Al siguiente operón inducido se le ha denominado *liu* por su homología con el operón *liuABCDER* de *P. aeruginosa* (Förster-Fromme y Jendrossek, 2008). Las rutas de degradación de leucina en *P. aeruginosa* (Förster-Fromme y Jendrossek,

2008) y de degradación de ácido furoico en *C. basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a), tienen un denominador común; en ambas participan intermediarios activados en forma de acil-CoA. Pero además, se da la circunstancia de que los genes *liuC* y *liuE* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D y los genes *hmfE* y *hmfD* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, comparten homología (24 %-28 % de identidad. Además de su sobre-expresión en medios con alcohol furfurílico, la implicación de este operón en el metabolismo de furfurales se ha puesto de manifiesto mediante la mutación del gen *liuA* (se verá más adelante en este capítulo), que provocó una disminución en el crecimiento de la cepa mutante en medios con compuestos furánicos como fuentes de carbono. La sobre-expresión (10 veces) del posible operón formado por los genes *scoA* (BN5_00766), *socB* (BN5_00765), *atoB* (BN5_00764) y *atoE* (BN5_00763), podría ser discutida en el mismo contexto funcional que el de los genes *liu*, es decir, en el del metabolismo de compuestos intermediarios activados con Coenzima A, excepto la inducción de *atoE* (BN5_00763), que podría codificar un transportador de ácidos de cadena corta y que, en cualquier caso, podría funcionar como un transportador alternativo de furoato. Los datos de transcriptómica predicen los genes *scoA_BN5_00766*, *scoB_BN5_00765* y *atoB_BN5_00764* componen un operón. En *Burkholderia pseudomallei* se ha confirmado mediante estudios de RT-PCR que *scoA* y *socB* se co-transcriben como un único mRNA (Chutoam *et al.*, 2013).

En el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 existen un alto número de genes de oxidasas terminales para el oxígeno, tres de ellas pertenecientes a la familia de las quinol-oxidasas, y otras tres a la familia de las citocromo oxidasas ((Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014). Como se observa en la tabla 19, los genes *coxBA*, *cox11y* *cox3* que codifican una citocromo *c* oxidasa (tipo *aa3*) e integrantes del operón *cox* (BN5_00090 a BN5_00093) también experimentaron un incremento en su expresión (10-50 veces). En esta región del cromosoma y en orientación opuesta se localiza otro operón, *BN5_00095*, *BN5_00096*, *BN5_00097* (*ctaA*) y *BN5_00098* (*ctaB*) que también se sobreexpresó. En general, las bacterias tienen una cadena de transporte electrónico muy ramificada que les permiten utilizar una gran variedad de donadores y aceptores de electrones alternativos para generar energía quimiosmótica y, a partir de ella, ATP. De las tres citocromo oxidasas identificadas en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D, en respuesta al alcohol furfurílico sólo se aumentó la expresión de la de tipo *aa3* (citocromo *c* oxidasa) que tiene una elevada actividad en el bombeo de protones. Además es una enzima de baja afinidad por el oxígeno, y por lo general, desempeña un importante papel en condiciones de elevadas

concentraciones de oxígeno en muchas bacterias, como es el caso de *B. japonicum*, *Paracoccus denitrificans* y *Bacillus subtilis* (Bosma *et al.*, 1987; Gabel y Maier, 1993; Winstedt y von Wachenfeldt, 2000). Las otras dos citocromo oxidasas (*cbb3-1* y *cbb3-2*) identificadas en el genoma son tipo *cbb3*, y están codificadas por dos operones contiguos, (BN5_02058-BN5_02061) y entre (BN5_02062-BN5_02065). Las citocromo oxidasas tipo *cbb3* poseen mayor afinidad por el oxígeno que las de tipo *aa3*, y por lo general, se inducen en condiciones microaeróbicas (Comolli y Donohue, 2002; Ray y Williams, 1997). La expresión de los genes *cbb3-1* (BN5_02058-BN5_02061) disminuyó (3 a 5 veces menos) en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D cultivada en alcohol furfurílico. También fue unas 4 veces menor la expresión de los genes del complejo *bc₁*, (BN5_00598, BN5_00599 y BN5_00600). Resumiendo, el alcohol furfurílico influye sobre la expresión de las oxidasas terminales de tipo citocromo oxidasa, aumentando la expresión de la *aa₃*, y disminuyendo la de *cbb3-1*. Por otra parte, también disminuye la expresión de los genes que codifican el equivalente al complejo III mitocondrial que, debería ser común a todas las citocromo oxidasas.

Analizados en su conjunto, estos datos muestran que en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D cultivada en alcohol furfurílico se altera la expresión de las oxidasas terminales, concretamente la de la familia de las citocromo oxidasas. Puesto que la bacteria se ha cultivado en medios con alcohol furfurílico y cloruro amónico, y puesto que no se adicionó cianuro al medio de cultivo, tiene sentido que no se vea afectada la expresión de las tres agrupaciones quinol-oxidasas.

En *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D cultivada en alcohol furfurílico aumentó la expresión de los genes que conforman el operón *kdpABCDE* (BN5_04090-BN5_04094), implicados en el transporte de potasio. El incremento de los productos de este operón está encaminada al aumento de la concentración de K⁺ en el citoplasma (Ozyamak *et al.*, 2013). Por lo tanto, este resultado parece lógico puesto la concentración de potasio intracelular con alcohol furfurílico debe ser menor que con acetato potásico.

También es significativa la sobreexpresión de los genes localizados entre BN5_00662 y BN5_00656, que podrían estar relacionados con cambios de motilidad de la bacteria como consecuencia de los cambios de fuente de carbono. Para el resto de genes cuya expresión aumenta, no parece evidente una relación funcional con el crecimiento con alcohol furfurílico (Tabla 19).

4.2 Represión génica en respuesta a alcohol furfurílico en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

En *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D disminuyó significativamente la expresión de los genes comprendidos entre *BN5_04088* y *BN5_04082*, ambos incluidos, que incluyen el operón *ssuABCDEF*. Las proteínas codificadas por los genes *ssuABC* conforman un sistema de transporte tipo ABC, mientras que *ssuD* y *ssuE* codifican una monooxigenasa y una reductasa dependiente de NAD(P)H, respectivamente (Eichhorn *et al.*, 1999). No existen antecedentes bibliográficos acerca de la posible relación entre metabolismo del azufre y el metabolismo de furfurales. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el entramado de reacciones que es el metabolismo todo está interrelacionado e integrado. Como se verá más adelante el alcohol furfurílico provoca un cambio en el perfil de expresión de prácticamente todas las enzimas del ciclo de Krebs y de muchas oxidasas terminales. Al ser muchas de estas enzimas especialmente abundantes en centros sulfoféricos, no sería descabellado establecer una relación entre el metabolismo del azufre y el de los furfurales. Evidentemente se trata de una hipótesis de trabajo que habría que contrastar, tratándose aquí de poner de manifiesto como dos procesos, en principio teóricamente distantes, podrían estar metabólicamente relacionados.

Ya se ha discutido anteriormente en el contexto de las oxidasas terminales que tanto la expresión del complejo *bc₁* (complejo III) como la de *cbb₃-1* disminuye en células cultivadas con alcohol furfurílico (Tabla 19). Además, como era de esperar, la expresión de los genes de las dos enzimas del ciclo del glioxilato, necesarias para el crecimiento con acetato como fuente de carbono, se reprime en medios con furfural como fuente de carbono (*aceA*_BN5_01678-isocitrato liasa y *glcB*_BN5_03848-malato sintasa, tabla 19). También disminuyó unas 9 veces la expresión de *acnB* (aconitasaB, BN5_01775) (Tabla 19) y unas 5 veces la de *fumB* (fumarasa B) y *mqaA* (malato oxidoreductasa A), aunque estos últimos con un *p_val* por encima de 0.1 (resultados no mostrados en la tabla). El mRNA de la citrato sintasa (BN5_01364) también disminuyó significativamente y unas 4-5 veces la expresión de los genes codificantes de la diferentes subunidades de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (BN5_01369, BN5_01370, BN5_01371, BN5_01372, BN5_01373 (Tabla 19). Todo esto, junto con la disminución de la expresión de la succinato deshidrogenasa (2-4 veces), aunque nuevamente con un *p_val* superior a 0.1 (no mostrado), pone de manifiesto que la expresión de todos los genes del ciclo de Krebs (al menos alguno de los parálogos detectados en el genoma) disminuye en las células cultivadas con alcohol

furfurílico. También parece disminuir la expresión de los genes localizados entre BN5_04420 y BN5_04428, que codifican todas las subunidades de la ATP sintasa. Hay que destacar que las variaciones no son muy grandes y que en muchos casos podrían no ser estadísticamente significativas, pero por el contrario son funcionalmente consistentes, ya que todo está relacionado con el metabolismo energético y las variaciones de expresión de los diferentes operones son del mismo orden y en el mismo sentido. Es difícil discutir estos resultados en su conjunto, ya que realmente no se sabe exactamente cuál es la relación P/O para cada oxidasa terminal ni de qué forma está regulada su expresión. Lo que parece claro es que existe una relación entre fuente de carbono y respiración (Dinamarca *et al.*, 2002). La validación de los resultados de transcriptómica obtenidos en esta Tesis quizá puedan añadir algo más de luz a la relación entre fuente de carbono y expresión de oxidasas terminales, aunque no podemos olvidar que la expresión de las oxidasas también varía mucho en función de la fase de crecimiento y la disponibilidad de oxígeno (Sevilla *et al.*, 2013).

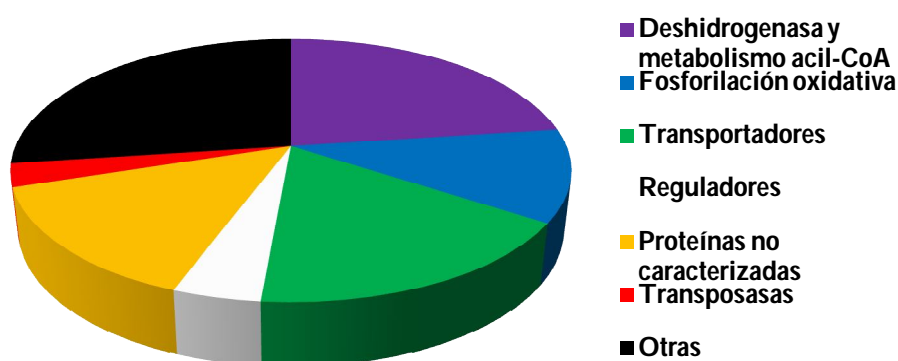


Figura 74. Representación esquemática de las categorías funcionales de los genes regulados en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1D en respuesta a alcohol furfurílico.

4.3 Construcción de una cepa mutante en el gen *benE1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

Los resultados del análisis transcriptómico pusieron de manifiesto que la expresión del gen *benE1* (BN5_02205) se co-regula con el resto de genes *hmf*, siendo su expresión unas 800 veces más alta con alcohol furfurílico que con acetato como fuente de carbono (Capítulo 4). Este gen, que se encuentra inmediatamente detrás del operón *hmfABCDE* en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1D, codifica un posible transportador de membrana. Este transportador contiene 12 dominios transmembrana, y presenta homología con

transportadores de benzoato, de ahí la nomenclatura *ben*. Sin embargo, no se han encontrado antecedentes bibliográficos acerca de un transportador de este tipo formando parte del operón *hmfABCDE*. Como tanto el ácido furoico como el benzoato son aniones monovalentes aromáticos, la hipótesis de partida es que BenE1 podría constituir el transportador específico de ácido furoico (en realidad furoato). Con objeto de comprobar esta hipótesis se construyó un mutante en el gen *benE1*.

La metodología empleada en la generación del mutante fue la misma seguida para la generación de otros mutantes descritos en esta Tesis. Mediante PCR se amplificaron dos fragmentos internos del gen *benE1* utilizando las parejas de oligonucleótidos *benE1*₇₃U/*benE1*₅₂₈L y *benE1*₇₇₀U/*benE1*₁₁₃₉L (Tabla 8), y DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D como molde. Los productos resultantes se clonaron, por separado, en el vector PGEM-T Easy originando los plásmidos PGEM-TE *benE1*_{73/528} y PGEM-TE *benE1*_{770/1139} (Tabla 7), que contenían dos fragmentos internos del gen *benE1* así como la diana de restricción BamHI. El plásmido PGEM-TE *benE1*_{770/1139} se linealizó por digestión con Apal y BamHI. Además, el plásmido PGEM-TE *benE1*_{73/528} también fue digerido por Apal y BamHI, liberándose un inserto que contenía un fragmento de DNA del gen *benE1*. El inserto obtenido se ligó con el plásmido PGEM-TE *benE1*_{770/1139} y se obtuvo un nuevo plásmido, PGEM-TE *benE1*_{73/1139} (Tabla 7), que contenía dos fragmentos de DNA del gen *benE1* unidos por la secuencia de restricción BamHI. Seguidamente, a partir del plásmido PMS255, se amplificó el gen *aacC1* que confiere resistencia a gentamicina, y el producto amplificado se digirió después con la enzima BamHI. La digestión del plásmido PGEM-TE *benE1*_{73/1139} con la enzima de restricción BamHI permitió su ligación con el gen *aacC1* previamente digerido. Como resultado se obtuvo el plásmido PGEM-TE *benE1 aacC1* (Tabla 7) (Figura 75), que contenía un fragmento del gen *benE1* interrumpido por *aacC1*, y que una vez integrado por doble recombinación en el cromosoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D, ocasionará la disrupción insercional de *benE1* (7.13 de Materiales y Métodos). Dicho plásmido se transfirió a *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D por electroporación. Los transformantes fueron el resultado de una recombinación homóloga doble entre el gen nativo cromosómico y los correspondientes fragmentos internos clonados en el vector suicida. Los transformantes fueron seleccionados en medio LB suplementado con gentamicina (10 µg/ml).

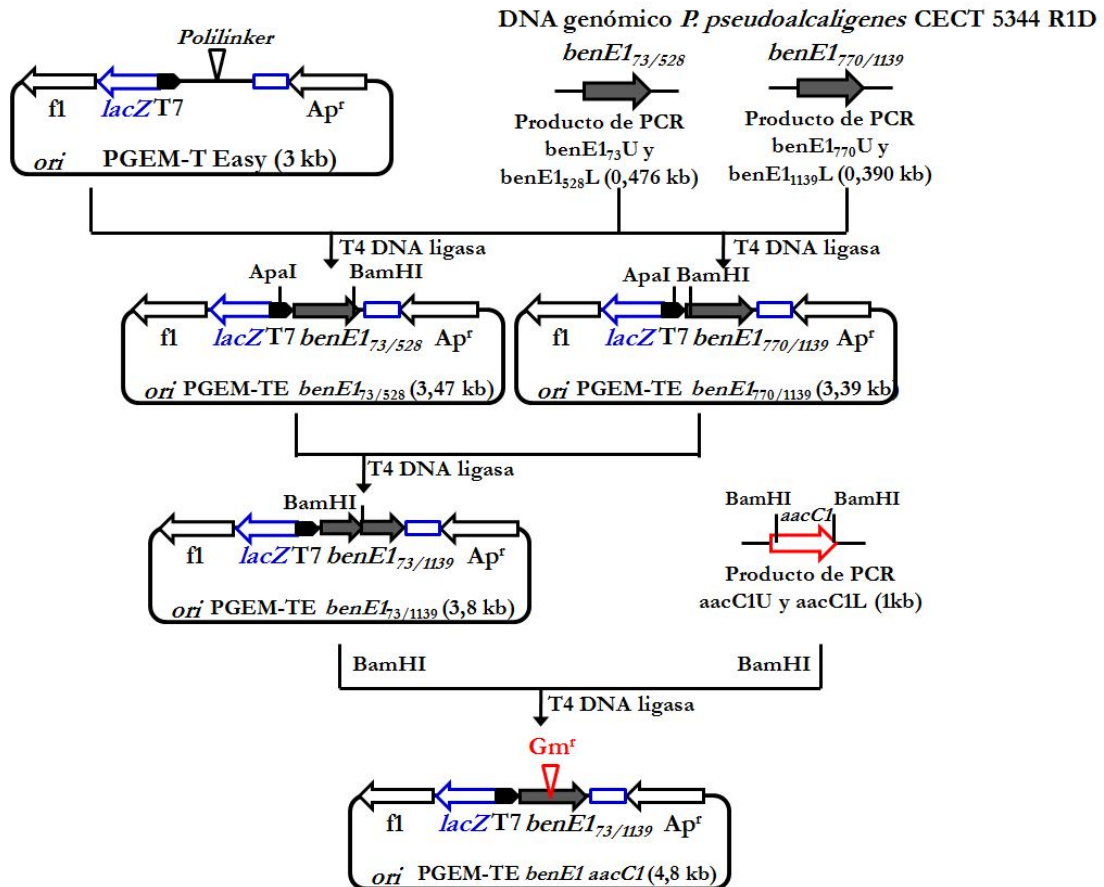


Figura 75. Representación esquemática de la construcción del plásmido PGEM-TE *benE1 aacC1*. Las abreviaturas utilizadas son: T7, promotor de la RNA polimerasa del fago T7; *lacZ*, gen que codifica la β -galactosidasa; f1, región del fago 1 y ori, origen de replicación del plásmido.

La correcta integración del plásmido suicida se comprobó mediante amplificación por PCR del DNA genómico del mutante en comparación la cepa silvestre (Figura 76), utilizando los oligonucleótidos *benE1₇₃U* y *benE1₁₁₃₉L* (Tabla 8) como cebadores.

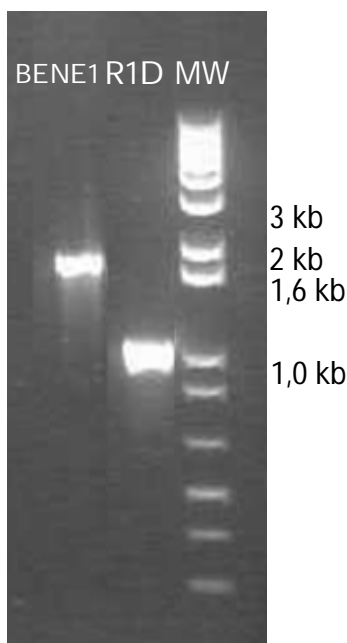


Figura 76. Comprobación de la inserción génica en el mutante BENE1.1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D mediante PCR. A partir de DNA genómico de la cepa R1D y de un clon positivo (BENE1.1) se realizó una amplificación por PCR utilizando los cebadores *benE*_{173U}/*benE*_{1139L}. El tamaño de la banda obtenida para la cepa mutante fue de 1,805 kb (BENE1.1), que se corresponde a la suma del producto de *benE*_{173-528/770-1139} (476 y 390 kb respectivamente) y el gen *aacC1* (0,939 kb) insertado, siendo 0,718 kb mayor que el fragmento amplificado de la cepa silvestre (1,087 kb, R1D), que corresponde al tamaño del gen *benE1* amplificado por los cebadores *benE*_{173U}/*benE*_{1139L}. MW representa el patrón de peso molecular 1kb DNA *Ladder*.

4.3.1 Caracterización fenotípica del mutante en el gen *benE1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

Si la hipótesis de partida fuera correcta, el mutante en *benE1* no debería crecer con furoato como fuente de carbono, ya que sería incapaz de transportarlo. Sin embargo, la mutación en el gen *benE1* no afectó significativamente al crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D en medios con 10 mM de alcohol furfurílico (Figura 77A). No obstante, el crecimiento del mutante sufrió un ligero retraso cuando se cultivó en medios con 10 mM de furfural o de ácido furoico como fuentes de carbono (Figura 77B, C).

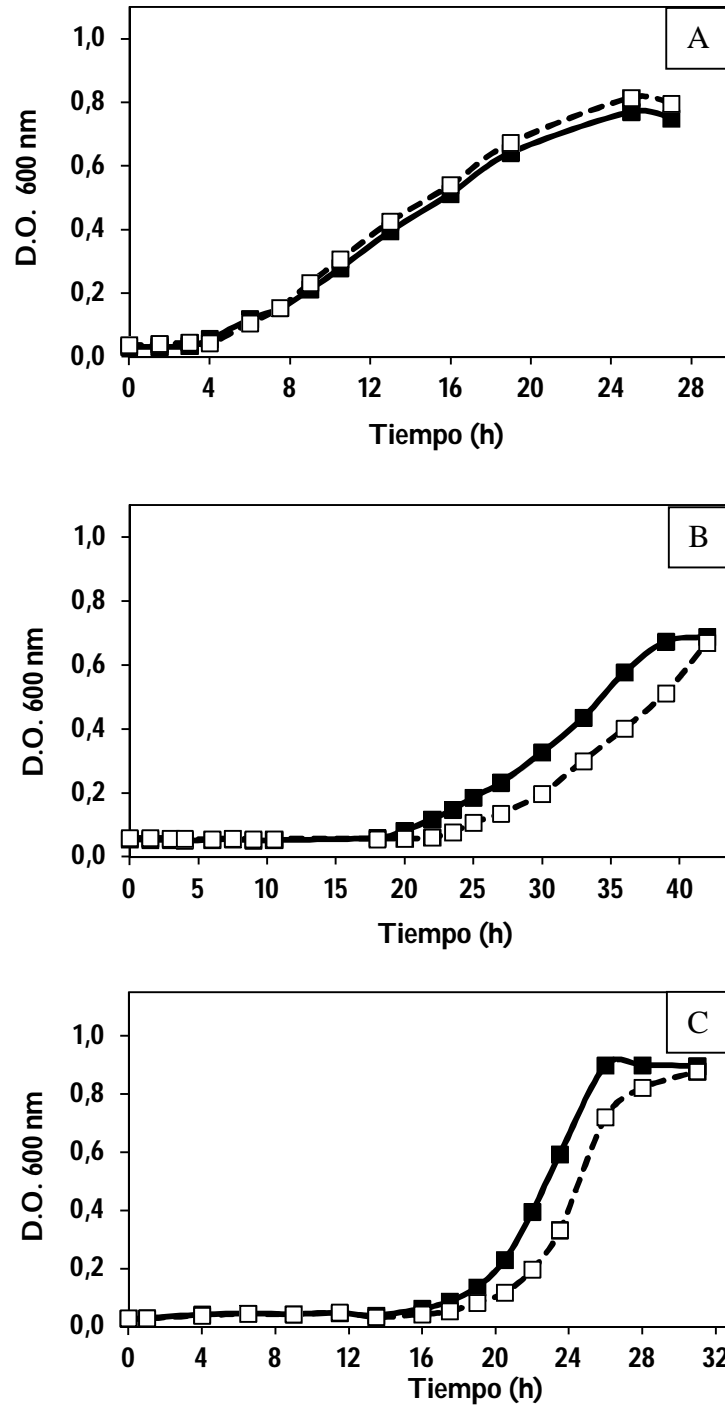


Figura 77. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D y BENE1.1 en medios con alcohol furfurílico (A), furfural (B) o ácido furóico (C) 10 mM como fuente de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con las diferentes fuentes de carbono y NH_4Cl 5 mM como única fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. (■) Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1D. (□) Crecimiento del mutante BENE1.1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1D

Resultados y Discusión

De los resultados mostrados en la figura 77 no se puede concluir que BenE1 no sea un transportador de furoato, al menos por dos razones. En primer lugar, porque a concentraciones muy altas los compuestos aromáticos pueden entrar en la célula por difusión pasiva, no siendo necesario el transporte activo (Nichols y Harwood, 1997). En segundo lugar, en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se ha encontrado otro gen (*benE2_BN5_02086*) ortólogo a los genes *benE2* identificados en otras *Pseudomonas*, y que podría actuar como transportador inespecífico a concentraciones elevadas de sustrato. Por lo tanto, para dilucidar realmente la implicación de *benE1* en el metabolismo de compuestos furánicos, se re-examinó el fenotipo del mutante utilizando concentraciones de sustrato menores (2 mM, Figura 78). Cuando se utilizó 2 mM de ácido furoico como fuente de carbono, el fenotipo del mutante BENE1.1 fue claro, presentando una fase de latencia considerablemente mayor que la cepa silvestre (Figura 78C). Sin embargo, en medios con 2 mM de alcohol furfurílico ambas cepas asimilaron el compuesto rápidamente y sin diferencias apreciables en la fase de latencia (Figura 78A), si bien el crecimiento celular máximo del mutante fue inferior al que tuvo la cepa silvestre debido, probablemente, a la acumulación de ácido furoico en el sobrenadante del medio de cultivo (Figura 78A). La incubación del cultivo durante un prolongado periodo de tiempo (35 horas) permitió al mutante la asimilación de todo el ácido furoico presente (resultados no mostrados). El comportamiento del mutante BENE1.1 en medios con 2 mM de furfural como fuente de carbono (Figura 78B) fue intermedio al mostrado con alcohol furfurílico y con ácido furoico. Todos estos resultados pueden ser interpretados aceptando la hipótesis de que BenE1 sea un transportador específico de furoato. El hecho de que el fenotipo del mutante no sea muy evidente con alcohol furfurílico puede ser debido a que el alcohol atraviese la membrana celular por difusión. Este alcohol intracelular puede ser reducido a furoato (con furfural como intermediario) que, estando dentro, puede ser asimilado sin necesidad de transportador. Es evidente que parte del furoato escapa al exterior celular y para ello es necesaria la presencia de otro transportador para furoato. El hecho de que pasadas 30 horas el mutante crezca con un perfil muy parecido a la cepa silvestre (Figura 78C) no parece ser debido a una reversión de la mutación, ya que el genotipo del cultivo se volvió a comprobar por PCR (de forma análoga a como se indica en la Figura 76) encontrándose que el gen *benE1* seguía interrumpido. En su conjunto estos experimentos sugieren que BenE1 es un transportador específico de furoato, pero que existe al menos otro transportador que puede suplir su función. Este transportador podría ser *BN5_02086*, pero

para probar esta hipótesis sería necesario construir un doble mutante deficiente en *benE1* y *benE2*.

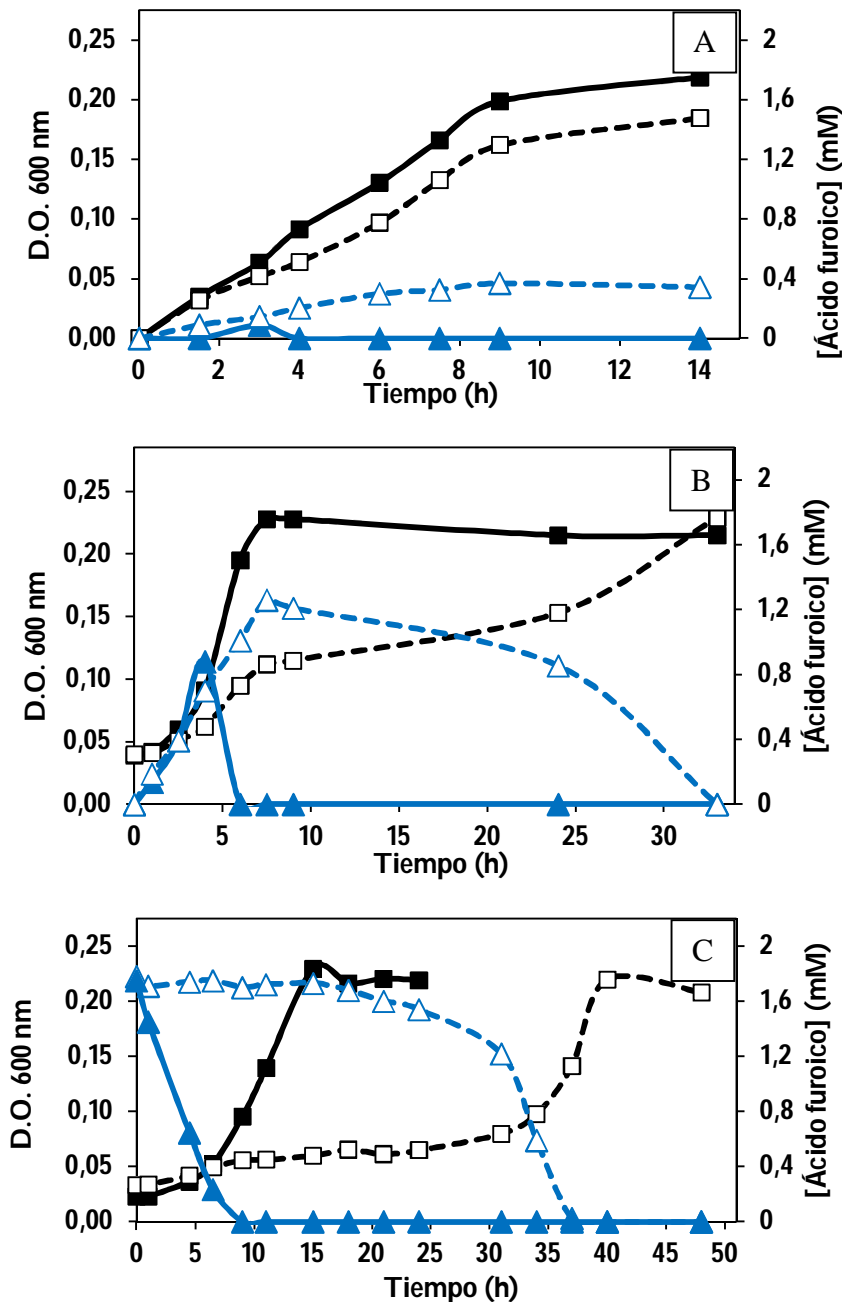


Figura 78. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D y BENE1.1 en medios con alcohol furfurílico (A), furfural (B) y ácido furoico (C) 2 mM como fuente de carbono. Las células se cultivaron en medio mínimo M9 con alcohol furfurílico, furfural y ácido furoico 10 mM como única fuente de carbono y NH_4Cl 5 mM como única fuente de nitrógeno. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. La concentración de ácido furoico se determinó mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos). En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico. Los experimentos se realizaron por triplicado obteniéndose resultados similares. (■) Crecimiento de R1D, (□) crecimiento del mutante BENE1.1, (▲) concentración de ácido furoico en sobrenadantes de R1D y (△) concentración de de ácido furoico en sobrenadantes de BENE1.1.

4.4 Papel del operón *liuABCDER* en el metabolismo de compuestos furánicos en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

4.4.1 Identificación del operón *liuABCDER* en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344.

En el análisis transcriptómico de la respuesta a la utilización de alcohol furfurílico frente a acetato de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D, se detectaron cambios en la expresión de una gran variedad de genes, tanto positiva como negativamente. Después de los genes del operón *hmf* (que incluyen *benE1*), la agrupación génica cuya expresión se indujo más con alcohol furfurílico (entre 15 y 80 veces) fue la de los genes *liuABCDER*, denominados así por su gran homología (70 - 85 % identidad) con el operón *liu* de *P. aeruginosa* (Förster-Fromme y Jendrossek, 2008) implicado en la degradación de leucina/isovalerato (Forster-Fromme y Jendrossek, 2006; Forster-Fromme *et al.*, 2006). Además de la homología en las secuencias, la disposición espacial de los genes que forman parte del operón *liu* en *P. aeruginosa* se conserva en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Figura 79). Sólo en algunas del género *Pseudomonas*, como es el caso de *P. fluorescens*, *P. resinovorans* (Förster-Fromme y Jendrossek, 2008) y *P. mendocina* se mantiene la misma organización interna del operón, (Förster-Fromme y Jendrossek, 2008). Como en otros casos, la identidad con los genes ortólogos de *P. mendocina* es del orden del 90 %. La presencia de transposones aguas arriba y abajo del operón *liuABCDER* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 podría ser indicativo de sucesos de movilidad y/o transferencia horizontal del operón.

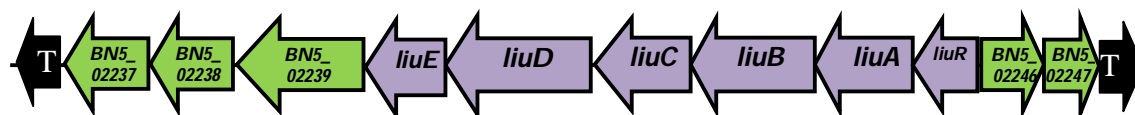


Figura 79. Esquema de una región de 13,5 kb del cromosoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 conteniendo el operón *liuABCDER*. La figura muestra la región génica entre las posiciones 2354389 y 2367889 del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1 conteniendo los genes *liu* (en morado). Los genes que flanquean *liu* codifican las siguientes proteínas: T, posibles transposasas y genes implicados en movilidad genética (BN5_02236 y BN5_02248). BN5_02237, diguanilato ciclasa; BN5_02238, alfa-beta hidrolasa; BN5_02239, acetoacetil CoA sintetasa. BN5_02246, probable deshidrogenasa de cadena corta; BN5_02247, acetilCoA acetiltransferasa.

En *P. aeruginosa*, LiuA es una isovaleril-CoA deshidrogenasa que cataliza la oxidación de isovaleril-CoA a 3-metilcrotonil-CoA. LiuBD cataliza la carboxilación de 3-metilcrotonil-CoA a 3-metilglutaconil-CoA, siendo LiuB la subunidad β y LiuD la subunidad α . LiuC cataliza la hidratación de metilglutaconil-CoA hasta 3-hidroxi-5-

metilglutaril-CoA. La proteína LiuE es una hidroximetilglutaroil-CoA liasa que cataliza la ruptura del 3-hidroxi-5-metilglutaril-CoA en acetilCoA y acetoacetato (Forster-Fromme *et al.*, 2006). La mutación de cualquiera de los genes *liu* de *P. aeruginosa* anula la capacidad de utilizar tanto terpenos acíclicos como isovalerato/leucina (Förster-Fromme y Jendrossek, 2008).

El hecho de que se produzca una sobreexpresión del operón *liu* cuando *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D asimila alcohol furfurílico, sumado a la novedad de que, hasta donde nosotros sabemos, no existan en la bibliografía trabajos que relacionen genes homólogos a estos con la asimilación de compuestos furánicos, hace muy atractivo el estudio de este operón. Como un primer paso, a continuación se describe la generación y caracterización de un mutante en el primer gen de la agrupación, *liuA*.

4.4.2 Construcción de una cepa mutante en el gen *liuA* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

La metodología aplicada para la generación de este mutante ha sido similar a la empleada anteriormente. Mediante PCR se amplificaron dos fragmentos internos del gen *liuA* utilizando las parejas de oligonucleótidos *liuA*₄₃U/*liuA*₄₆₄L y *liuA*₅₁₄U/*liuA*₁₀₄₀L (Tabla 8), y DNA genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D como molde. Los productos resultantes se clonaron por separado en el vector PGEM-T Easy originando los plásmidos PGEM-TE *liuA*_{43/464} y PGEM-TE *liuA*_{514/1040} (Tabla 7), que contenían dos fragmentos internos del gen *liuA* así como la diana de restricción BamHI. El plásmido PGEM-TE *liuA*_{514/1040} se linealizó mediante con *Apal* y BamHI. El plásmido PGEM-TE *liuA*_{43/464} también fue digerido por *Apal* y BamHI, liberándose un inserto que contenía un fragmento del gen *liuA*. El inserto obtenido se ligó con el plásmido PGEM-TE *liuA*_{514/1040} y se obtuvo un nuevo plásmido, PGEM-TE *liuA*_{43/1040} (Tabla 7), que contenía dos fragmentos de DNA del gen *liuA* unidos por un sitio de restricción BamHI. Seguidamente, a partir del plásmido PMS255, se amplificó el gen *aacC1* que confiere resistencia a gentamicina, y el producto amplificado se digirió después con la enzima BamHI. La digestión del plásmido PGEM-TE *liuA*_{43/1040} con la enzima de restricción BamHI permitió su ligación con el gen *aacC1* previamente digerido. Como resultado se obtuvo el plásmido PGEM-TE *liuA aacC1* (Tabla 7) (Figura 80), que contenía un fragmento del gen *liuA* interrumpido por *aacC1*, y que una vez integrado por doble recombinación en el cromosoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D, ocasionará la disrupción insercional de *liuA* (7.13 de Materiales y Métodos). Dicho

Resultados y Discusión

plásmido se transfirió a *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D por electroporación. Los transformantes fueron el resultado de una recombinación homóloga doble entre el gen nativo cromosómico y los correspondientes fragmentos internos clonados en el vector suicida. Los transformantes fueron seleccionados en medio LB suplementado con gentamicina (10 µg/ml).

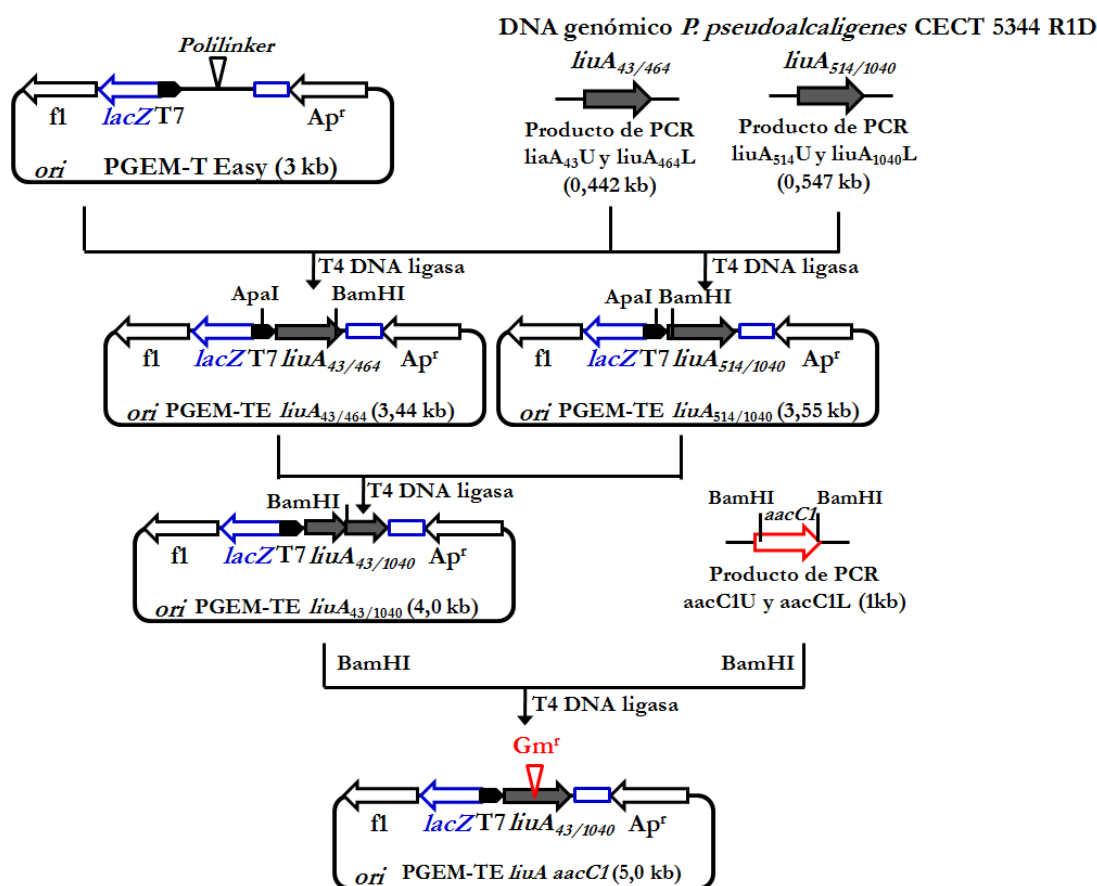


Figura 80. Representación esquemática de la construcción del plásmido PGEM-TE *liuA aacC1*. Las abreviaturas utilizadas son: *T7*, promotor de la RNA polimerasa del fago T7; *lacZ*, gen que codifica la β-galactosidasa; *f1*, región del fago 1 y *ori*, origen de replicación del plásmido.

La correcta integración del plásmido suicida se comprobó mediante amplificación por PCR del DNA genómico mutado (Figura 81), utilizando los oligonucleótidos *liuA*₄₃U y *liuA*₁₀₄₀L (Tabla 8) como cebadores.

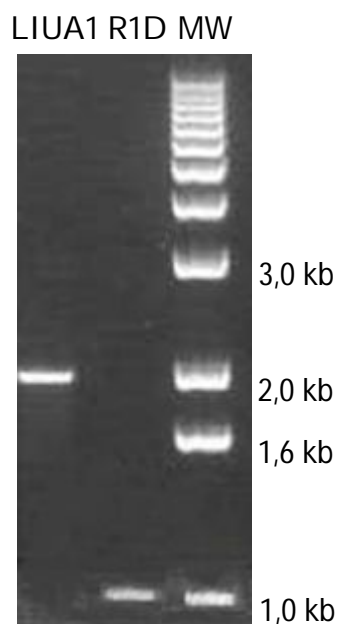


Figura 81. Comprobación de la inserción génica en el mutante LIUA1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D mediante PCR. A partir de DNA genómico de la cepa R1D y de un clon positivo (LIUA1) se realizó una amplificación por PCR utilizando los cebadores *liuA*_{43U}/*liuA*_{1040L}. El tamaño de la banda obtenida para la cepa mutante fue de 1,928 kb (LIUA1), que corresponde a la suma del producto de *liuA*_{43-464/514-1040} (0,442 y 0,547 kb respectivamente) y el gen *aacC1* (0,939 kb) insertado, siendo 0,910 kb mayor que el fragmento amplificado (*liuA*_{43U}/*liuA*_{1040L}) en la cepa silvestre (1,018 kb, R1D). MW representa el patrón de peso molecular 1kb DNA *Ladder*. La orientación del gen *aacC1* insertado en el gen *liuA* es la contraria a la del operón (resultados no mostrados).

4.4.3 Caracterización fenotípica del mutante en el gen *liuA* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

Con objeto de comprobar el efecto de la mutación, el mutante LIUA1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D se cultivó a la vez que la cepa silvestre R1D en medios con alcohol furfurílico, furfural o ácido furoico (FA) como fuentes de carbono (Figura 82). El mutante en el gen *liuA* presentó un crecimiento más lento que la cepa silvestre en medios que contenían compuestos furánicos como fuentes de carbono, especialmente con ácido furoico (Figura 82C).

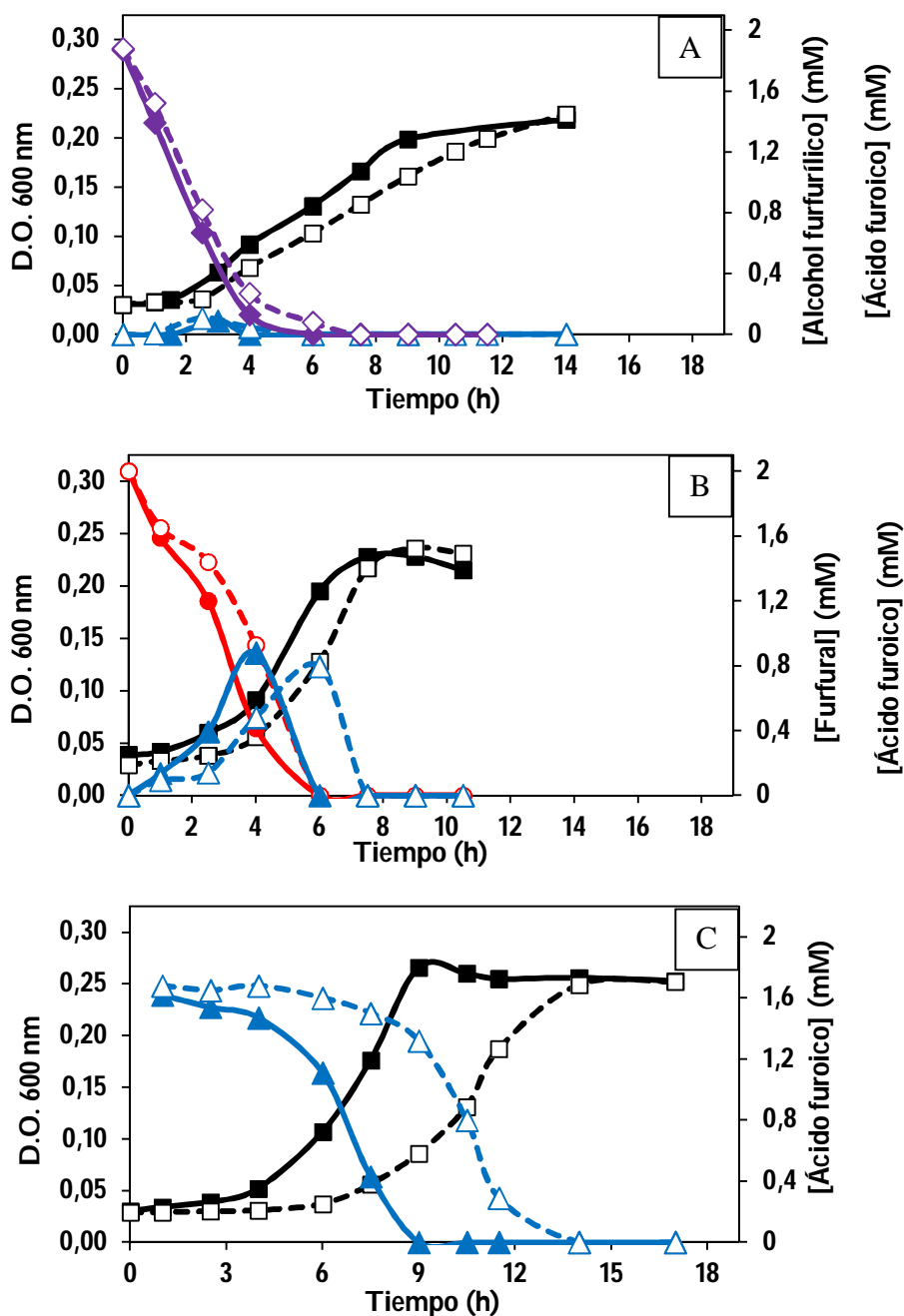


Figura 82. Efecto de la mutación del gen *liuA* sobre el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D con alcohol furfurílico (A), furfural (B) o ácido furoico (C) 2 mM como fuente de carbono. El crecimiento de los cultivos se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm a los tiempos indicados. Las concentraciones de alcohol furfurílico, furfural y ácido furoico en los sobrenadantes se determinaron mediante HPLC (6.2 de Materiales y Métodos). En la gráfica se muestran los resultados de un experimento típico, aunque los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose resultados similares. Crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1D (■), crecimiento del mutante LIUA1 (□), concentración de furfural en sobrenadantes de cultivos de R1D (●), concentración de furfural en sobrenadantes de cultivos del mutante LIUA1 (○), concentración de alcohol furfurílico en sobrenadantes con cultivos R1D (◆), concentración de alcohol furfurílico en sobrenadantes de cultivos del mutante LIUA1 (◇), concentración de ácido furoico en sobrenadantes de cultivos de R1D (▲) y concentración de ácido furoico en sobrenadantes de cultivos del mutante LIUA1 (△).

Hasta la fecha no se ha descrito ninguna relación entre el operón *liu* y la degradación de furfurales. La inducción de la expresión de este operón en medios con alcohol furfurílico podría ser debida a la similitud estructural entre su sustrato original (por ejemplo isovalerato) y el ácido furoico. Sin embargo, parece bastante evidente que, al menos en el caso de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D, el operón *liuABCDE* está implicado en la asimilación de ácido furoico (Figura 82C). La mutación en el gen *liuA* también repercute negativamente en el crecimiento con alcohol furfurílico y furfural, aumentando levemente su fase de latencia, pero ello podría justificarse por el hecho de que el metabolismo de ambos compuestos desemboca en ácido furoico. Además, aunque en otros microorganismos no se hayan identificado genes homólogos implicados en el metabolismo de ácido furoico, los datos parecen indicar que su función está relacionada con el metabolismo de ácidos orgánicos activados con coenzima A.

Con todo, los resultados mostrados en este capítulo indican que los genes *liu*, aunque no son esenciales para la asimilación de ácido furoico en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D, sí que son necesarios para su óptima asimilación. Estos resultados son, hasta donde sabemos, completamente novedosos, quedando por averiguar la función de este operón.

V. DISCUSIÓN GENERAL

En los procesos de galvanoplastia y electrolisis empleados en la industria joyera se generan millones de toneladas anuales de residuos cianurados que son potencialmente peligrosos para el medio ambiente y la salud humana por contener elevadas concentraciones de cianuro, tanto en su forma libre como formando complejos con metales pesados. *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es una bacteria cianotrofa capaz de asimilar el cianuro en su forma libre, aunque resulta poco eficiente degradando los complejos ciano-metálicos (Luque-Almagro *et al.*, 2005). Los residuos cianurados procedentes de la industria joyera contienen alrededor de 1/3 del cianuro total formando complejos metálicos, tanto débiles como fuertes. Para solucionar este problema existen en principio dos alternativas, o mejorar la cepa original en su capacidad de utilizar complejos cianurados como fuente de nitrógeno, o buscar nuevas cepas que complementen esta carencia. Una de las limitaciones de la cepa original en la asimilación del cianuro de los complejos metálicos podría radicar en la rotura de dichos complejos, que son muy estables. Cuando el hierro es poco abundante las bacterias producen sideróforos que tienen una enorme afinidad por él. La síntesis y excreción de sideróforos está regulada negativamente por Fur, por lo que se planteó que un mutante en el gen *fur* produciría sideróforos constitutivamente que, al quelar el hierro de los complejos, dejarían cianuro libre que podría ser asimilado por la bacteria. Sin embargo, estudios recientes muestran claramente que *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 no produce sideróforos (Becerra *et al.*, 2014). Además, Fur no solo es un represor transcripcional de genes implicados en la asimilación de cianuro, sino que también es un regulador positivo de la expresión de genes que son importantes en otros procesos como, por ejemplo, la resistencia a ROS (Becerra *et al.*, 2014). Debido a todo ello, el fenotipo del mutante fue de crecimiento más lento que la cepa silvestre en medio mínimo, y por tanto no resulta útil en los procesos de detoxificación de cianuro. La otra alternativa es el aislamiento de nuevas cepas bacterianas capaces de asimilar eficientemente los complejos cianurados, complementando la capacidad de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 en la asimilación de cianuro libre. En la búsqueda de nuevos microorganismos se aislaron un total de cinco cepas bacterianas de lodos recogidos en suelos contaminados con metales pesados del entorno de Río Tinto, que fueron capaces de degradar complejos cianuro-metálicos. La caracterización del crecimiento de estas cepas con complejos metálicos cianurados (ferrocianuro y ferricianuro), así como con residuos cianurados de la industria joyera, permitió centrar el estudio en *Achromobacter sp.* y *M. kitamiense*, microorganismos capaces de proliferar rápidamente medios de cultivo en los que el residuo cianurado de la

industria se usó como única fuente de nitrógeno. Puesto que las capacidades degradativas de cada cepa eran diferentes, y con el objetivo de degradar una mayor cantidad de cianuro total, se realizaron co-cultivos entre las cepas aisladas y *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 que condujeron a un mayor crecimiento en medios con residuo cianurado. Estos resultados son muy prometedores, quedando por analizar en cultivo continuo la cantidad de cianuro total remanente al final del crecimiento con las diferentes combinaciones de cepas.

Para el crecimiento de todos los microorganismos heterótrofos se necesitan una fuente de carbono orgánica y una fuente de nitrógeno asimilable, además de una serie de oligoelementos esenciales para el metabolismo. El cianuro es una buena fuente de nitrógeno para el crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344, sin embargo, es una pobre fuente de carbono, lo que hace imprescindible el uso de una fuente de carbono adicional para el crecimiento de la bacteria. Desde su aislamiento se han buscado fuentes de carbono óptimas para el proceso de asimilación de cianuro. Inicialmente se utilizó acetato potásico (Luque-Almagro *et al.*, 2005), aunque recientemente se ha demostrado que el DL-malato es más apropiado para la asimilación de cianuro (Igeño *et al.*, 2011). En esta Tesis se ha profundizado en el estudio de nuevas fuentes de carbono que, además de resultar eficientes en la asimilación de cianuro, sean un problema medioambiental o bien subproductos de otros procesos. Inicialmente se utilizaron algunos metabolitos que se encuentran implicados en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, como son citrato, succinato y fumarato, además del piruvato. Con todas estas fuentes de carbono la bacteria fue capaz de asimilar cianuro. En cambio, ninguno de los compuestos fue más adecuado que el DL-malato. Las especies del género *Pseudomonas* pueden formar polihidroxicanoatos (Haywood *et al.*, 1990), compuestos con gran valor añadido, a partir de compuestos orgánicos, entre ellos el octanoato. *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 asimiló más eficientemente el cianuro en medios con octanoato sódico, presentando unas velocidades específicas de crecimiento iguales que las obtenidas con DL-malato. Al final, con vistas al posible uso biotecnológico del proceso habrá que evaluar el costo de la fuente de carbono, su eficiencia, y el valor añadido de los posibles productos como son los bioplásticos o los metabolitos acumulados en el sobrenadante de los cultivos, y cuya naturaleza queda por determinar.

La reciente secuenciación del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2013), ha permitido un análisis más exhaustivo de regiones génicas que podrían estar implicadas en la degradación de diferentes compuestos carbonados, como es

el caso de los compuestos aromáticos, compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo algunos de ellos xenobióticos. La identificación en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 de un operón posiblemente implicado en la degradación de compuestos aromáticos por su similitud con otros descritos en *P. putida*, *P. reinekei* MT1 y *B. xenovorans* LB400. Los genes localizados en el operón mantenían una disposición y secuencia similar a la descrita en operones relacionados con la asimilación de compuestos aromáticos como el 2-aminofenol, 2,3-dihidroxibenzoato y catecol a través de una ruta *meta*-. *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 es capaz de asimilar todos estos compuestos aromáticos y probablemente lo haga a través de una ruta *meta*-, ya que en el genoma no se encuentran los genes de la ruta del β -cetoadipato.

Asimismo, en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 se ha identificado el operón *hmf*, previamente caracterizado en *C. basilensis* HMF14 (Koopman *et al.*, 2010a), involucrado en la degradación otro tipo de compuestos aromáticos, los compuestos furánicos, denominados así porque presentan un anillo furano en su estructura. La eliminación de estos compuestos es objeto de estudio debido a que encarece el coste del proceso de elaboración de bioetanol. Estos compuestos furánicos podrían ser una buena fuente de carbono para *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1 en el proceso de asimilación de cianuro, ya que en un mismo tratamiento la bacteria degradaría un compuesto tóxico generado en la industria joyera (cianuro) y un compuesto tóxico generado durante el proceso de la obtención de bioetanol (furfurales). Desafortunadamente se ha demostrado que, aunque esta bacteria tiene la capacidad de asimilar estos dos compuestos, no lo hace de forma simultánea.

En las primeras inoculaciones la asimilación de furfural, alcohol furfurílico y ácido furoico por *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1 era un proceso inusualmente lento en comparación con otras fuentes de carbono. La obtención de una nueva cepa de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1, denominada R1D, que metaboliza los compuestos furánicos de una forma más eficiente se consiguió por reinoculaciones sucesivas en medios con furfural. Algo similar se ha descrito para la cepa *P. putida* S12 pJT⁺hmfABCDE (Koopman *et al.*, 2010a). La comparación de las secuencias de los genes cuya expresión varía en medios con alcohol furfurílico en la cepa R1D con respecto a la cepa R1 permitió identificar la mutación posiblemente responsable de este nuevo fenotipo. La única diferencia detectada está en la posición 782 del gen *BN5_02200*, un gen regulador perteneciente a la familia de reguladores *AraC*. Este cambio de base provoca el cambio de un aminoácido no polar, la

leucina, por un aminoácido básico, la arginina, lo podría modificar la función de la proteína al encontrarse en el dominio HTH de interacción con el DNA y ser un aminoácido conservado en todas las proteínas homólogas de esa familia.

Los hidrolizados lignocelulósicos contienen una gran cantidad de inhibidores que deben de ser eliminados antes del proceso fermentativo de los azúcares a bioetanol. Resulta evidente que la eliminación de los furfurales no debe afectar al contenido en azúcares y, por esta razón, se ha estudiado qué azúcares son asimilables por la bacteria, generándose un mutante incapaz de asimilar glucosa, manteniendo intacta su capacidad para degradar los compuestos furánicos. El mutante EDD1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1D no asimila glucosa, además de ser eficiente en la degradación de compuestos furánicos. Estos resultados son prometedores desde un punto de vista biotecnológico.

La base genética de la degradación de furfurales en especies del género *Pseudomonas* está poco estudiada. La ruta de degradación de furfurales aceptada hasta la fecha es la propuesta para *C. basilensis* HMF14 (Koopman et al., 2010a), desconociéndose algunas de los genes que codifican enzimas implicadas en la ruta metabólica, como las deshidrogenasas que oxidan el alcohol furfurílico a furfural, y éste a ácido. Este desconocimiento a nivel molecular en la ruta de degradación de furfurales llevó a realizar un análisis transcriptómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1D en respuesta a la utilización de alcohol furfurílico. Los datos del análisis de transcriptómica presentados en esta Tesis demuestran que en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1D, cultivada con alcohol furfurílico, varía la expresión de aproximadamente 100 genes respecto a la cepa silvestre cultivada con acetato. En esta bacteria se produce una notable sobreexpresión de los genes *hmfABCDE*, que se han caracterizado en *C. basilensis* HMF14 y que se encuentran implicados en la degradación de ácido furoico (Koopman et al., 2010a). En la ruta metabólica descrita en *C. basilensis* HMF14 no se han propuesto los genes que codifican las deshidrogenasas implicadas en las oxidaciones del alcohol furfurílico. Ni la determinación de las actividades enzimáticas furfuril alcohol deshidrogenasa y furfural deshidrogenasa, ni la separación de estas por cromatografía de intercambio iónico, han desvelado si en el caso de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1D se trata de una enzima que cataliza las dos oxidaciones o si realmente existe una enzima para cada oxidación. Los datos de transcriptómica muestran la sobreexpresión de un gen cuyo producto es una deshidrogenasa de cadena corta, que podría ser la enzima que catalice ambas reacciones. También se observa una elevada sobreexpresión en el gen *psfD*, que se encuentra en el entorno génico del operón *hmf* de *P.*

pseudoalcaligenes CECT 5344R1D y que, en *P. putida* Fu1, está involucrado en la asimilación de ácido furoico (Nichols y Mertens, 2008). Hasta ahora no se sabe cómo tiene lugar el transporte de ácido furoico al interior celular de bacterias degradadoras de furfurales. En el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1D se ha detectado tres genes codificantes de posibles transportadores de ácido furoico, uno en el operón *hmfABCDE* (*benE1*), y otros dos alejados de éste (*benE2* y *atoE*). Los datos de transcriptómica han evidenciado la sobreexpresión del gen del transportador *benE1*, y en menor medida la de *atoE* (posible transportador de ácidos grasos de cadena corta.) pero no la de *benE2* (transportador de benzoato). La interrupción de *benE1* provocó un retraso en el crecimiento de la bacteria con furoato, aunque finalmente la bacteria es capaz de experimentar crecimiento. Este crecimiento tardío puede ser explicado porque la función de BenE1 pueda ser sustituida por la del también sobreexpresado transportador AtoE o bien por la de BenE2.

Otro incremento diferencial de expresión génica se produjo en el operón *liuABCDER*, bien caracterizado e implicado en la degradación de leucina en *P. aeruginosa* (Förster-Fromme y Jendrosseck, 2008). La mutación de *liuA*, una posible acil-CoA deshidrogenasa, aunque probablemente esté afectada la funcionalidad de todo el operón por la polaridad del mutante, afectó levemente al crecimiento de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344R1D cultivada con compuestos furánicos. La relación entre este operón, relacionado con la degradación de leucina, y la degradación de furfurales no se ha descrito hasta la fecha, aunque ambas rutas tienen en común reacciones de un ácido orgánico activado con coenzima A. Además, se han encontrado cierta similitud (24-28 %) entre la secuencia de los genes *liuC* y *liuE* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D y la de los genes *hmfE* y *hmfD* de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D. Esta redundancia funcional podría constituir un aporte extra en el catabolismo de furfurales que explique el fenotipo del mutante.

El crecimiento de la bacteria en alcohol furfurílico provocó una disminución de la expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en el ciclo del glioxilato, algo lógico ya que la comparativa se hizo con la bacteria cultivada en acetato. También se produjo una disminución de la expresión de los genes que codifican las enzimas del ciclo de Krebs, así como de las ATP sintasas. Asimismo se produce un cambio de expresión en los genes implicados en la respiración, aumentando la expresión de las citocromo *c* oxidasas tipo *cox* y disminuyendo la expresión de las citocromo *c* oxidasas tipo *cbb3*. Con todo, estos cambios no afectan al crecimiento, lo que sugiere que el crecimiento en alcohol furfurílico

Discusión General

no requiere de una fosforilación oxidativa tan activa como la requerida con acetato como fuente de carbono.

CONCLUSIONES

1. La utilización de cultivos mixtos de cepas degradadoras de compuestos cianurados supone una ventaja en la utilización del residuo cianurado procedente de la industria joyera como fuente de nitrógeno.
2. En *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 tanto el DL-malato como el octanoato sódico constituyen las fuentes de carbono óptimas para la biodegradación de cianuro.
3. *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 puede utilizar como fuentes de carbono para el crecimiento los ácidos, benzoico, vanílico, cumárico, quínico, 4-hidroxibenzoico, salicílico, picolínico, protocatecuico, 3-hidroxibenzoico, 2-aminobenzoico y furoico. Además, puede usar catecol, 2-aminofenol, furfural, alcohol furfurílico y ácido. De estos, el 2-aminofenol y ácido 2-aminobenzoico los puede usar también como fuente de nitrógeno para su crecimiento.
4. *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D es capaz de asimilar compuestos furánicos como única fuente de carbono, probablemente utilizando una ruta catabólica similar a la descrita en *C. basilensis* HMF14.
5. La cepa R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D, obtenida por reinoculación de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 en medios con furfural, metaboliza furfural, ácido furoico y alcohol furfurílico de forma más eficiente que la cepa original.
6. El mutante R1D de *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 contiene al menos una mutación puntual (*p.L261R*) localizada en un gen regulador de la familia AraC/XylS que supone una ventaja para la asimilación de compuestos furánicos.
7. *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D deficiente en la enzima 6-fosfogluconato deshidratasa (Edd) es incapaz de consumir glucosa.
8. En *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D, el alcohol furfurílico induce cambios que afectan a la expresión de cerca de un centenar de genes.
9. *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D cultivada en alcohol furfurílico no parece requerir un ciclo de Krebs y una fosforilación oxidativa tan activa como la requerida en acetato.
10. En *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D el gen *benE1* está implicado en el transporte de furoato al interior celular, aunque su función no es imprescindible para el catabolismo de compuestos furánicos en esta bacteria.
11. Los genes *liu*, son necesarios, aunque no esenciales, para una óptima asimilación de ácido furoico en *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1D.

BIBLIOGRAFÍA

Abdulmalik O., Safo M.K., Chen Q., Yang J., Brugnara C., Ohene-Frempong K., Abraham D.J. y Asakura T. (2005) 5-hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. *British Journal of Haematology* **128**: 552-561.

Abdulrashid N. y Clark D.P. (1987) Isolation and genetic analysis of mutations allowing the degradation of furans and thiophenes by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **169**: 1267-1271.

Acera F., Quesada A., Gutiérrez G. y Blasco R. (2009) Papel de la 3-cianoalanina en el metabolismo del cianuro en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Oviedo: XXXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Report no. JD.21: 120.

Akcil A. (2003) Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotechnol Adv* **21**: 501-511.

Akcil A. y Mudder T. (2003) Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review. *Biotechnology Letters* **25**: 445-450.

Alexander D.B. y Zuberer D.A. (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* **12**: 39-45.

Alexander M. (1965) Biodegradation: problems of molecular recalcitrance and microbial fallibility. *Advances in Applied Microbiology* **7**: 35-80.

Alexander M. (1999) Biodegradation and bioremediation. Academic Press. (New York).

Almeida J.R., Bertilsson M., Gorwa-Grauslund M.F., Gorsich S. y Liden G. (2009) Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**: 625-638.

Anders S. y Huber W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* **11**: R106.

Anderson R.L. y Wood W.A. (1969) Carbohydrate metabolism in microorganisms. *Annual Review of Microbiology* **23**: 539-578.

Andrade M.C., Figueira M.M. y Linardi V.R. (1995) Utilization of ammonia, generated from abiotic cyanide degradation, by *Rhodotorula rubra*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**: 343-344.

Andrews S.C., Robinson A.K. y Rodríguez-Quñones F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 215-237.

Bibliografía

Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H. y Oyaizu H. (2000) Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 1563-1589.

Askeland R.A. y Morrison S.M. (1983) Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **45**: 1802-1807.

Atlas R.M. y Pramer D. (1990) Focus on bioremediation. *ASM News* **56**: 352-353.

Atlas R.M. y Bartha R. (2002) Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Pearson Educación. (Madrid).

Barceló J., Nicolás G., Sabater B. y Sánchez R. (2001) Fisiología vegetal. Pirámide. (Madrid).

Barclay M., Tett V.A. y Knowles C.J. (1998a) Metabolism and enzymology of cyanide/metallo cyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions. *Enzyme and Microbial Technology* **23**: 321-330.

Barclay M., Hart A., Knowles C.J., Meeussen J.C.L. y Tett V.A. (1998b) Biodegradation of metal cyanides by mixed and pure cultures of fungi. *Enzyme and Microbial Technology* **22**: 223-231.

Baxter J. y Cummings S.P. (2006) The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie Van Leeuwenhoek* **90**: 1-17.

Becerra G., Blasco R., Merchán F. y Igeño M.I. (2014) Characterization of a ferric uptake regulator (Fur)-mutant of the cyanotrophic bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344. *Journal of Biotechnology*.

Becerra G., Blasco R., Quesada A., Merchán F. y Igeño M.I. (2011) Role of Fur on cyanide tolerance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Biochemical Society Transactions* **39**: 1854-1858.

Becker A., Schmidt M., Jäger W. y Pühler A. (1995) New gentamicin-resistance and lacZ promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* **162**: 37-39.

Blevins W.T., Feary T.W. y Phibbs P.V., Jr. (1975) 6-Phosphogluconate dehydratase deficiency in pleiotropic carbohydrate-negative mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **121**: 942-949.

Boopathy R., Bokang H. y Daniels L. (1993) Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. *Journal of Industrial Microbiology* **11**: 147-150.

- Bosma G., Braster M., Stouthamer A.H. y van Verseveld H.W. (1987)** Isolation and characterization of ubiquinol oxidase complexes from *Paracoccus denitrificans* cells cultured under various limiting growth conditions in the chemostat. *European Journal of Biochemistry* **165**: 657-663.
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Braun V. y Killmann H. (1999)** Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends in Biochemical Sciences* **24**: 104-109.
- Brenner V., Arensdorf J.J. y Focht D.D. (1994)** Genetic construction of PCB degraders. *Biodegradation* **5**: 359-377.
- Burcham P.C., Kaminskas L.M., Fontaine F.R., Petersen D.R. y Pyke S.M. (2002)** Aldehyde-sequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products. *Toxicology* **181-182**: 229-236.
- Burlage R.S., Hooper S.W. y Sayler G.S. (1989)** The TOL (pWW0) catabolic plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1323-1328.
- Canilha L., Kumar Chandel A., dos Santos Milessi T.S., Fernandes Antunes F.A., da Costa Freitas W.L., das Gracias Almeida Felipe M. y da Silva S.S. (2012)** Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**: 989572.
- Cárdenas J. y Pineda M. (1988)** Espectroscopía Ultravioleta-Visible de compuestos biológicos. Confederación Española de cajas de ahorros. (Córdoba).
- Cardona C.A. y Sánchez Ó.J. (2007)** Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology* **98**: 2415-2457.
- Cardona C.A., Quintero J.A. y Paz I.C. (2010)** Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology* **101**: 4754-4766.
- Cartmell E. y Fowles G.W.A. (1979)** Valencia y estructura molecular. Reverte. (Barcelona).
- Castillo F., Roldán M.D., Blasco R., Huertas M.J., Caballero F.J., Moreno-Vivián C. y Martínez M. (2005)** Biotecnología ambiental. Tébar. (Madrid).

Bibliografía

Comolli J.C. y Donohue T.J. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. *Molecular Microbiology* **45**: 755-768.

Conn E.E. (1979) Biosynthesis of cyanogenic glycosides. *Naturwissenschaften* **66**: 28-34.

Conrad T.M., Lewis N.E. y Palsson B.O. (2011) Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Molecular Systems Biology* **7**: 509.

Converti A., Domínguez J.M., Perego P., da Silva S.S. y Zilli M. (2000) Wood hydrolysis and hydrolyzate detoxification for subsequent xylitol production. *Chemical Engineering & Technology* **23**: 1013-1020.

Cowles C.E., Nichols N.N. y Harwood C.S. (2000) BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* **182**: 6339-6346.

Chandel A.K., Kapoor R.K., Singh A. y Kuhad R.C. (2007) Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology* **98**: 1947-1950.

Chapatwala K.D., Babu G.R.V., Vijaya O.K., Kumar K.P. y Wolfram J.H. (1998) Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **20**: 28-33.

Chen J.-L. y Kunz D.A. (1997) Cyanide utilization in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 involves a putative siderophore. *FEMS Microbiology Letters* **156**: 61-67.

Chen W., Bruhlmann F., Richins R.D. y Mulchandani A. (1999) Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 137-141.

Cheng K.-K., Cai B.-Y., Zhang J.-A., Ling H.-Z., Zhou Y.-J., Ge J.-P. y Xu J.-M. (2008) Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal* **38**: 105-109.

Chirino B., Strahsburger E., Agullo L., Gonzalez M. y Seeger M. (2013) Genomic and functional analyses of the 2-aminophenol catabolic pathway and partial conversion of its substrate into picolinic acid in *Burkholderia xenovorans* LB400. *PLoS One* **8**: e75746.

Choi E.N., Cho M.C., Kim Y., Kim C.K. y Lee K. (2003) Expansion of growth substrate range in *Pseudomonas putida* F1 by mutations in both *cymR* and *todS*, which recruit a ring-fission hydrolase CmtE and induce the *tod* catabolic operon, respectively. *Microbiology* **149**: 795-805.

- Chutoam P., Charoensawan V., Wongtrakoongate P., Kum-Arth A., Buphamalai P. y Tungpradabkul S. (2013)** RpoS and oxidative stress conditions regulate succinyl-CoA: 3-ketoacid-coenzyme A transferase (SCOT) expression in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology Immunology* **57**: 605-615.
- De Ley J. (1960)** Comparative carbohydrate metabolism and localization of enzymes in *Pseudomonas* and related microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology* **23**: 400-441.
- Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.-F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.-M. y Gascuel O. (2008)** Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **36**: W465-W469.
- Dhillon J.K. y Shivaraman N. (1999)** Biodegradation of cyanide compounds by a *Pseudomonas* species (S1). *Canadian Journal of Microbiology* **45**: 201-208.
- Di Tomaso G., Fedi S., Carnevali M., Manegatti M., Taddei C. y Zannoni D. (2002)** The membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 cells grown in the presence or absence of potassium tellurite. *Microbiology* **148**: 1699-1708.
- Díaz E. (2004)** Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology* **7**: 173-180.
- Dinamarca M.A., Ruiz-Manzano A. y Rojo F. (2002)** Inactivation of cytochrome o ubiquinol oxidase relieves catabolic repression of the *Pseudomonas putida* GPO1 alkane degradation pathway. *Journal of Bacteriology* **184**: 3785-3793.
- Dominguez J., Gong C. y Tsao G. (1996)** Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **57-58**: 49-56.
- Doudoroff M., Contopoulou R., Kunisawa R. y Palleroni N.J. (1974)** Taxonomic validity of *Pseudomonas denitrificans* (Christensen) Bergey et al. Request for an opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology* **24**: 294-300.
- Dua M., Singh A., Sethunathan N. y Johri A.K. (2002)** Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 143-152.
- Dubey S.K. y Holmes D.S. (1995)** Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World Journal of Microbiol & Biotechnology* **11**: 257-265.
- Dumestre A., Chone T., Portal J., Gerard M. y Berthelin J. (1997)** Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2729-2734.

Bibliografía

Dursun A.Y., Çalık A. y Aksu Z. (1999) Degradation of ferrous(II) cyanide complex ions by *Pseudomonas fluorescens*. *Process Biochemistry* **34**: 901-908.

Dzombak D.A., Ghosh R.S. y Wong-Chon G.M. (2006) Cyanide in water and soil: Chemistry, Risk, and Management. CRC Press. (Florida).

Ebbs S. (2004) Biological degradation of cyanide compounds. *Current Opinion in Biotechnology* **15**: 231-236.

Eichhorn E., van der Ploeg J.R. y Leisinger T. (1999) Characterization of a Two-component Alkanesulfonate Monooxygenase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 26639-26646.

Endo A., Nakamura T., Ando A., Tokuyasu K. y Shima J. (2008) Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* **1**: 3.

Entner N. y Doudoroff M. (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Biological Chemistry* **196**: 853-862.

Faraldo-Gomez J.D. y Sansom M.S. (2003) Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**: 105-116.

Finnegan I., Toerien S., Abbot L., Smit F. y Raubenheimer H.G. (1991) Identification and characterisation of an *Acinetobacter sp.* capable of assimilation of a range of cyano-metal complexes, free cyanide ions and simple organic nitriles. *Applied Microbiology and Biotechnology* **36**: 142-144.

Forster-Fromme K. y Jendrossek D. (2006) Identification and characterization of the acyclic terpene utilization gene cluster of *Pseudomonas citronellolis*. *FEMS Microbiology Letters* **264**: 220-225.

Forster-Fromme K., Hoschle B., Mack C., Bott M., Armbruster W. y Jendrossek D. (2006) Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4819-4828.

Förster-Fromme K. y Jendrossek D. (2008) Biochemical characterization of isovaleryl-CoA dehydrogenase (LiuA) of *Pseudomonas aeruginosa* and the importance of liu genes for a functional catabolic pathway of methyl-branched compounds. *FEMS Microbiology Letters* **286**: 78-84.

Gabel C. y Maier R.J. (1993) Oxygen-dependent transcriptional regulation of cytochrome aa3 in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* **175**: 128-132.

- Gallagher L.A. y Manoil C. (2001)** *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *Journal of Bacteriology* **183**: 6207-6214.
- Gallegos M.T., Schleif R., Bairoch A., Hofmann K. y Ramos J.L. (1997)** Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 393-410.
- Gámez S., González-Cabriales J.J., Ramírez J.A., Garrote G. y Vázquez M. (2006)** Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering* **74**: 78-88.
- García-Aparicio M., Ballesteros I., González A., Oliva J., Ballesteros M. y Negro M. (2006)** Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **129**: 278-288.
- Gibson J. y Harwood S.C. (2002)** Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annual Review of Microbiology* **56**: 345-369.
- Gong C.S., Chen C.S. y Chen L.F. (1993)** Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolyzate for ethanol production by yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **39-40**: 83-88.
- Goto M. (1983)** *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *konjaci* subsp. nov., the causal agent of bacterial leaf-blight of konjac (*Amorphophalus konjac* Koch). *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**: 539-545.
- Gray K.A., Zhao L. y Emptage M. (2006)** Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology* **10**: 141-146.
- Greated A., Lambertsen L., Williams P.A. y Thomas C.M. (2002)** Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* **4**: 856-871.
- Green P.N. y Bousfield I.J. (1983)** Emendation of *Methylobacterium* Patt, Cole, and Hanson 1976; *Methylobacterium rhodium* (Heumann 1962) comb. nov. corrig.; *Methylobacterium radiotolerans* (Ito and Iizuka 1971) comb. nov. corrig.; and *Methylobacterium mesophilicum* (Austin and Goodfellow 1979) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**: 875-877.
- Guo X., Cavka A., Jonsson L.J. y Hong F. (2013)** Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production. *Microbial Cell Factories* **12**: 93.
- Gupta G.D., Misra A. y Agarwal D.K. (1991)** Inhalation toxicity of furfural vapours: an assessment of biochemical response in rat lungs. *Journal of Applied Toxicology* **11**: 343-347.

Bibliografía

Gutierrez T., Ingram L.O. y Preston J.F. (2006) Purification and characterization of a furfural reductase (FFR) from *Escherichia coli* strain LYO1--an enzyme important in the detoxification of furfural during ethanol production. *Journal of Biotechnology* **121**: 154-164.

Hadi S.M., Shahabuddin y Rehman A. (1989) Specificity of the interaction of furfural with DNA. *Mutation Research* **225**: 101-106.

Hahn-Hagerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M., Liden G. y Zacchi G. (2006) Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* **24**: 549-556.

Harayama S. y Rekik M. (1989) Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 15328-15333.

Harayama S., Kok M. y Neidle E.L. (1992) Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annual Review of Microbiology* **46**: 565-601.

Harayama S., Mermod N., Rekik M., Lehrbach P.R. y Timmis K.N. (1987) Roles of the divergent branches of the meta-cleavage pathway in the degradation of benzoate and substituted benzoates. *Journal of Bacteriology* **169**: 558-564.

Harwood C.S. y Parales R.E. (1996) The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annual Review of Microbiology* **50**: 553-590.

Harwood C.S., Burchhardt G., Herrmann H. y Fuchs G. (1998) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiology Reviews* **22**: 439-458.

Hawes J.W., Jaskiewicz J., Shimomura Y., Huang B., Bunting J., Harper E.T. y Harris R.A. (1996) Primary structure and tissue-specific expression of human beta-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 26430-26434.

Haywood G.W., Anderson A.J., Ewing D.F. y Dawes E.A. (1990) Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas sp.* Strain NCIMB 40135. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 3354-3359.

Heider J. y Fuchs G. (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry* **243**: 577-596.

Heider J., Boll M., Breese K., Breinig S., Ebenau-Jehle C., Feil U., Gad'on N., Laempe D., Leuthner B., Mohamed M.E., Schneider S., Burchhardt G. y Fuchs G. (1998) Differential induction of enzymes involved in anaerobic metabolism of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*. *Archives of Microbiology* **170**: 120-131.

Hintner J.P., Lechner C., Riegert U., Kuhm A.E., Storm T., Reemtsma T. y Stolz A. (2001) Direct ring fission of salicylate by a salicylate 1,2-dioxygenase activity from *Pseudaminobacter salicylatoxidans*. *Journal of Bacteriology* **183**: 6936-6942.

Ho I.C., Yang S.P., Chiu W.Y. y Huang S.Y. (2007) Structure and polymer form of poly-3-hydroxyalkanoates produced by *Pseudomonas oleovorans* grown with mixture of sodium octanoate/undecylenic acid and sodium octanoate/5-phenylvaleric acid. *International Journal of Biological Macromolecules* **40**: 112-118.

Holden H.M., Benning M.M., Haller T. y Gerlt J.A. (2000) The crotonase superfamily: divergently related enzymes that catalyze different reactions involving acyl coenzyme a thioesters. *Accounts of Chemical Research* **34**: 145-157.

Huertas M.J., Luque-Almagro V.M., Martínez-Luque M., Blasco R., Moreno-Vivián C., Castillo F. y Roldán M.D. (2006) Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: role of siderophores. *Biochemical Society Transactions* **34**: 152-155.

Huertas M.J., Sáez L.P., Roldán M.D., Luque-Almagro V.M., Martínez-Luque M., Blasco R., Castillo F., Moreno-Vivián C. y García-García I. (2010) Alkaline cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 in a batch reactor. Influence of pH. *Journal of Hazardous Materials* **179**: 72-78.

Igeño M.I., Becerra G., Guijo M.I., Merchan F. y Blasco R. (2011) Metabolic adaptation of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 to cyanide: role of malate-quinone oxidoreductases, aconitase and fumarase isoenzymes. *Biochemical Society Transactions* **39**: 1849-1853.

Iwabuchi T. y Harayama S. (1998) Biochemical and molecular characterization of 1-hydroxy-2-naphthoate dioxygenase from *Nocardioides* sp. KP7. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 8332-8336.

Jiménez J., Miñambres B., García J. y Díaz E. (2004) Genomic Insights in the Metabolism of Aromatic Compounds in *Pseudomonas*. **3**: 425-462 In *Pseudomonas: Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*. Springer US.

Jiménez J.I., Minambres B., García J.L. y Díaz E. (2002) Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **4**: 824-841.

Jiménez J.I., Nogales J., García J.L. y Díaz E. (2010) A Genomic View of the Catabolism of Aromatic Compounds in *Pseudomonas*. 1297-1325 In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer

Jones D.A. (1998) Why are so many food plants cyanogenic? *Phytochemistry* **47**: 155-162.

Bibliografía

Kakinuma A. y Yamatodani S. (1964) L-glutamic acid formation from 2-furoic acid by soil bacteria. *Nature* **201**: 420-421.

Khan Q.A. y Hadi S.M. (1993) Effect of furfural on plasmid DNA. *Biochemistry and Molecular Biology International* **29**: 1153-1160.

Kitcher J.P. y Trudgill P.W. (1970) Oxidation of furan-2-carboxylate to 2-oxoglutarate by *Pseudomonas putida* F2: studies of enzymology and electron transport. *Biochemical Journal* **118**: 55-56.

Koenig K. y Andreesen J.R. (1989) Molybdenum involvement in aerobic degradation of 2-furoic acid by *Pseudomonas putida* Fu1. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 1829-1834.

Koenig K. y Andreesen J.R. (1990) Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition. *Journal of Bacteriology* **172**: 5999-6009.

Koopman F., Wierckx N., de Winde J.H. y Ruijsenaars H.J. (2010a) Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 4919-4924.

Koopman F., Wierckx N., de Winde J.H. y Ruijsenaars H.J. (2010b) Efficient whole-cell biotransformation of 5-(hydroxymethyl)furfural into FDCA, 2,5-furandicarboxylic acid. *Bioresource Technology* **101**: 6291-6296.

Krieg N.R. y Garrity G.M. (2001) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol: I. Springer Verlag. (New York).

Kuster B.F.M. (1990) 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). A Review Focussing on its Manufacture. *Starch - Stärke* **42**: 314-321.

Kwon H.K., Woo S.H. y Park J.M. (2002) Degradation of tetracyanonickelate (II) by *Cryptococcus humicola* MCN2. *FEMS Microbiology Letters* **214**: 211-216.

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. y Higgins D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.

Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg C., Stenberg K., Zacchi G. y Nilvebrant N.-O. (1999) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology* **24**: 151-159.

Le Meur S., Zinn M., Egli T., Thony-Meyer L. y Ren Q. (2012) Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered *Pseudomonas putida* KT2440. *BMC Biotechnology* **12**: 53.

Lecomte J., Finiels A. y Moreau C. (1999) A new selective route to 5-hydroxymethylfurfural from furfural and furfural derivatives over microporous solid acidic catalysts. *Industrial Crops and Products* **9**: 235-241.

Lee W., Lee J., Shin C., Park S., Chang H. y Chang Y. (1999) Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. 547-559 In *Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press.

Lessie T.G. y Phibbs P.V., Jr. (1984) Alternative pathways of carbohydrate utilization in *pseudomonads*. *Annual Review of Microbiology* **38**: 359-388.

Liu Z.L., Slininger P.J., Dien B.S., Berhow M.A., Kurtzman C.P. y Gorsich S.W. (2004) Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **31**: 345-352.

Lopez M.J., Nichols N.N., Dien B.S., Moreno J. y Bothast R.J. (2004) Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**: 125-131.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.

Lugtenberg B.J.J. y Dekkers L.C. (1999) What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology* **1**: 9-13.

Luque-Almagro V.M., Blasco R., Fernández-Romero J.M. y Castro M.D.L. (2003) Flow-injection spectrophotometric determination of cyanate in bioremediation processes by use of immobilised inducible cyanase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**: 1071-1078.

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

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

Bibliografía

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

Luque-Almagro V.M., Acera F., Igeño M.I., Wibberg D., Roldán M.D., Sáez L.P., Hennig M., Quesada A., Huertas M.J., Blom J., Merchán F., Escribano M.P., Jaenicke S., Estepa J., Guijo M.I., Martínez-Luque M., Macías D., Szczepanowski R., Becerra G., Ramírez S., Carmona M.I., Gutiérrez O., Manso I., Pühler A., Castillo F., Moreno-Vivián C., Schlüter A. y Blasco R. (2013) Draft whole genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Environmental Microbiology* **15**: 253-270.

Mains G.H. y Laforge F.B. (1924) Furfural from Corncobs. *Industrial & Engineering Chemistry* **16**: 356-359.

Marin M., Plumeier I. y Pieper D.H. (2012) Degradation of 2,3-dihydroxybenzoate by a novel meta-cleavage pathway. *Journal of Bacteriology* **194**: 3851-3860.

Martín C., Klinke H.B. y Thomsen A.B. (2007) Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 426-432.

Martinez A., Rodriguez M.E., Wells M.L., York S.W., Preston J.F. y Ingram L.O. (2001) Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. *Biotechnology Progress* **17**: 287-293.

Maruyama K., Shibayama T., Ichikawa A., Sakou Y., Yamada S. y Sugisaki H. (2004) Cloning and characterization of the genes encoding enzymes for the protocatechuate meta-degradation pathway of *Pseudomonas ochraceae* NGJ1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **68**: 1434-1441.

McFadden B.A. y Ramanandarao G. (1964) Enzymes of the Tricarboxylic Acid Cycle in *Pseudomonas Indigofera*. *Canadian Journal of Microbiology* **10**: 503-504.

Meyer F., Goesmann A., McHardy A.C., Bartels D., Bekel T., Clausen J., Kalinowski J., Linke B., Rupp O., Giegerich R. y Pühler A. (2003) GenDB: an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Research* **31**: 2187-2195.

Meyer J.-M., Geoffroy V.A., Baida N., Gardan L., Izard D., Lemanceau P., Achouak W. y Palleroni N.J. (2002) Siderophore typing, a powerful tool for the Identification of fluorescent and nonfluorescent *Pseudomonads*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2745-2753.

- Michail K., Matzi V., Maier A., Herwig R., Greilberger J., Juan H., Kunert O. y Wintersteiger R. (2007)** Hydroxymethylfurfural: an enemy or a friendly xenobiotic? A bioanalytical approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**: 2801-2814.
- Migula W. (1894)** Über ein neues System der Bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe* **1**: 235-238.
- Migula W. (1900)** System der Bakterien. Vol: 2. Gustav Fischer. (Jena).
- Mills T.Y., Sandoval N.R. y Gill R.T. (2009)** Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels* **2**: 26.
- Modig T., Liden G. y Taherzadeh M.J. (2002)** Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal* **363**: 769-776.
- Monias B.L. (1928)** Classification of *Bacterium alcaligenes*, *pyocyaneum* and *fluorescens*. *Journal of Infectious Diseases* **43**: 330-334.
- Moreau C., Belgacem M. y Gandini A. (2004)** Recent catalytic advances in the chemistry of substituted furans from carbohydrates and in the ensuing polymers. *Topics in Catalysis* **27**: 11-30.
- Morrison G.R. (1971)** Microchemical determination of organic nitrogen with nessler reagent. *Analytical Biochemistry* **43**: 527-532.
- Mudder T.I., Botz M.M. y Smith A. (2001)** Chemistry and treatment of cyanidation wastes. Mining Journal Books Ltd. (London).
- Munthal M.T., Timmis K.N. y Diaz E. (1996)** Restricting the dispersal of recombinant DNA: design of a contained biological catalyst. *Biotechnology (N Y)* **14**: 189-191.
- Mussatto S.I. y Roberto I.C. (2001)** Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters* **23**: 1681-1684.
- Mussatto S.I. y Roberto I.C. (2004)** Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology* **93**: 1-10.
- Neureiter M., Danner H., Thomasser C., Saidi B. y Braun R. (2002)** Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **98-100**: 49-58.

Bibliografía

Nichols N.N. y Harwood C.S. (1997) PcaK, a high-affinity permease for the aromatic compounds 4-hydroxybenzoate and protocatechuate from *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* **179**: 5056-5061.

Nichols N.N. y Mertens J.A. (2008) Identification and transcriptional profiling of *Pseudomonas putida* genes involved in furoic acid metabolism. *FEMS Microbiology Letters* **284**: 52-57.

Nichols N.N., Dien B.S., Guisado G.M. y Lopez M.J. (2005) Bioabatement to remove inhibitors from biomass-derived sugar hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **121-124**: 379-390.

Nishikawa Y., Yasumi Y., Noguchi S., Sakamoto H. y Nikawa J.-i. (2008) Functional analyses of *Pseudomonas putida* benzoate transporters expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **72**: 2034-2038.

Nishino S.F. y Spain J.C. (1993) Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 2520-2525.

Öhgren K., Rudolf A., Galbe M. y Zacchi G. (2006) Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass and Bioenergy* **30**: 863-869.

Ohta S. y Ohsawa I. (2006) Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease: on defects in the cytochrome c oxidase complex and aldehyde detoxification. *Journal of Alzheimer's Disease* **9**: 155-166.

Ohta S., Ohsawa I., Kamino K., Ando F. y Shimokata H. (2004) Mitochondrial ALDH2 deficiency as an oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1011**: 36-44.

Okuda N., Soneura M., Ninomiya K., Katakura Y. y Shioya S. (2008) Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **106**: 128-133.

Olofsson K., Rudolf A. y Lidén G. (2008) Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* **134**: 112-120.

Oro J. (1961) Mechanism of synthesis of adenine from hydrogen cyanide under possible primitive earth conditions. *Nature* **191**: 1193-1194.

Oro J. y Kimball A.P. (1961) Synthesis of purines under possible primitive earth conditions. I. Adenine from hydrogen cyanide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **94**: 217-227.

Oro J. y Kamat S.S. (1961) Amino-acid synthesis from hydrogen cyanide under possible primitive earth conditions. *Nature* **190**: 442-443.

Oro J. y Kimball A.P. (1962) Synthesis of purines under possible primitive earth conditions. II. Purine intermediates from hydrogen cyanide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **96**: 293-313.

Ozyamak E., de Almeida C., de Moura A.P., Miller S. y Booth I.R. (2013) Integrated stress response of *Escherichia coli* to methylglyoxal: transcriptional readthrough from the *nemRA* operon enhances protection through increased expression of glyoxalase I. *Molecular Microbiology* **88**: 936-950.

Palmqvist E. y Hahn-Hägerdal B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* **74**: 17-24.

Palumbo S.A. y Witter L.D. (1969) The influence of temperature on the pathways of glucose catabolism in *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology* **15**: 995-1000.

Palleroni N.J. (2010) The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology* **12**: 1377-1383.

Palleroni N.J., Kunisawa R., Contopoulou R. y Doudoroff M. (1973) Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **23**: 333-339.

Parajó J.C., Dominguez H. y Domínguez J.M. (1997) Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology* **21**: 18-24.

Peiser G.D., Wang T.T., Hoffman N.E., Yang S.F., Liu H.W. y Walsh C.T. (1984) Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 3059-3063.

Peng F., Ren J.-L., Xu F., Bian J., Peng P. y Sun R.-C. (2009) Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 6305-6317.

Perrone G.G., Tan S.X. y Dawes I.W. (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1783**: 1354-1368.

Petersson A., Almeida J.R., Modig T., Karhumaa K., Hahn-Hägerdal B., Gorwa-Grauslund M.F. y Liden G. (2006) A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast* **23**: 455-464.

Bibliografía

Pieper K.N.T.a.D.H. (1999) Bacteria designed for bioremediation.

Pirrung M.C., Kaiser L.M. y Chen J. (1993) Purification and properties of the apple fruit ethylene-forming enzyme. *Biochemistry* **32**: 7445-7450.

Pistorius E.K., Jetschmann K., Voss H. y Vennesland B. (1979) The dark respiration of *Anacystis nidulans*. Production of HCN from histidine and oxidation of basic amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta* **585**: 630-642.

Pohlmann A., Fricke W.F., Reinecke F., Kusian B., Liesegang H., Cramm R., Eitinger T., Ewering C., Potter M., Schwartz E., Strittmatter A., Voss I., Gottschalk G., Steinbuchel A., Friedrich B. y Bowien B. (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology* **24**: 1257-1262.

Prieto M., Eugenio L.d., Galàn B., Luengo J. y Witholt B. (2007) Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. 397-428 In *Pseudomonas*. Springer Netherlands.

Purwadi R. y Taherzadeh M.J. (2008) The performance of serial bioreactors in rapid continuous production of ethanol from dilute-acid hydrolyzates using immobilized cells. *Bioresource Technology* **99**: 2226-2233.

Quesada A., Guijo M.I., Merchan F., Blázquez B., Igeno M.I. y Blasco R. (2007a) Essential role of cytochrome bd-related oxidase in cyanide resistance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5118-5124.

Quesada A., Guijo M.I., Merchán F., Blázquez B., Igeño M.I. y Blasco R. (2007b) Essential role of cytochrome bd-related oxidase in cyanide resistance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5118-5124. Epub 2007 Jun 5115.

Raef S.F., Characklis W.G., Kessick M.A. y Ward C.H. (1977) Fate of cyanide and related compounds in aerobic microbial systems II. Microbial degradation. *Water Research* **11**: 485-492.

Raps S. y Demoss R.D. (1962) Glycolytic enzymes in *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology* **84**: 115-118.

Ray A. y Williams H.D. (1997) The effects of mutation of the *anr* gene on the aerobic respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* **156**: 227-232.

Raybuck S.A. (1992) Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. *Biodegradation* **3**: 3-18.

Reineke W. y Knackmuss H.J. (1988) Microbial degradation of haloaromatics. *Annual Review of Microbiology* **42**: 263-287.

Reynolds S.H., Stowers S.J., Patterson R.M., Maronpot R.R., Aaronson S.A. y Anderson M.W. (1987) Activated oncogenes in B6C3F1 mouse liver tumors: implications for risk assessment. *Science* **237**: 1309-1316.

Ribeiro M., Lourenço P., Monteiro J. y Ferreira-Dias S. (2001) Kinetics of selective adsorption of impurities from a crude vegetable oil in hexane to activated earths and carbons. *European Food Research and Technology* **213**: 132-138.

Roberto I.C., Mussatto S.I. y Rodrigues R.C.L.B. (2003) Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Industrial Crops and Products* **17**: 171-176.

Roberto I.C., Felipe M.G.A., Lacis L.S., Silva S.S. y de Mancilha I.M. (1991) Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. *Bioresource Technology* **36**: 271-275.

Rodrigues R.C.L.B., Felipe M.G.A., Silva J.B.A.e., Vitolo M. y Gómez P.V. (2001) The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **18**: 299-311.

Rodriguez-Arnaiz R., Romas Morales P. y Zimmering S. (1992) Evaluation in *Drosophila melanogaster* of the mutagenic potential of furfural in the mei-9a test for chromosome loss in germ-line cells and the wing spot test for mutational activity in somatic cells. *Mutation Research* **280**: 75-80.

Rollinson G., Jones R., Meadows M.P., Harris R.E. y Knowles C.J. (1987) The growth of a cyanide-utilising strain of *Pseudomonas fluorescens* in liquid culture on nickel cyanide as a source of nitrogen. *FEMS Microbiology Letters* **40**: 199-205.

Rudolf A., Alkasrawi M., Zacchi G. y Lidén G. (2005) A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology* **37**: 195-204.

Rudolf A., Baudel H., Zacchi G., Hahn-Hägerdal B. y Lidén G. (2008) Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. *Biotechnology and Bioengineering* **99**: 783-790.

Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. (New York).

Bibliografía

Sangarunlert W., Piumsomboon P. y Ngamprasertsith S. (2007) Furfural production by acid hydrolysis and supercritical carbon dioxide extraction from rice husk. *Korean Journal of Chemical Engineering* **24**: 936-941.

Sarvari Horvath I., Franzen C.J., Taherzadeh M.J., Niklasson C. y Liden G. (2003) Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 4076-4086.

Schaad N.W., Sowell G., Goth R.W., Colwell R.R. y Webb R.E. (1978) *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**: 117-125.

Schleissner C., Reglero A. y Luengo J.M. (1997) Catabolism of D-glucose by *Pseudomonas putida* U occurs via extracellular transformation into D-gluconic acid and induction of a specific gluconate transport system. *Microbiology* **143**: 1595-1603.

Schmid A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M. y Witholt B. (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**: 258-268.

Seidelmann K., Weinert H. y Ferenz H.-J. (2003) Wings and legs are production sites for the desert locust courtship-inhibition pheromone, phenylacetone nitrile. *Journal of Insect Physiology* **49**: 1125-1133.

Sevilla E., Alvarez-Ortega C., Krell T. y Rojo F. (2013) The *Pseudomonas putida* HskA hybrid sensor kinase responds to redox signals and contributes to the adaptation of the electron transport chain composition in response to oxygen availability. *Environmental microbiology reports* **5**: 825-834.

Sigler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N. y Hofer M. (1999) Oxidative stress in microorganisms--I. Microbial vs. higher cells--damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiology (Praha)* **44**: 587-624.

Silva-Avalos J., Richmond M.G., Nagappan O. y Kunz D.A. (1990) Degradation of the metal-cyano complex tetracyanonickelate(II) by cyanide-utilizing bacterial isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 3664-3670.

Siller H. y Winter J. (1998) Treatment of cyanide-containing wastewater from the food industry in a laboratory-scale fixed-bed methanogenic reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **49**: 215-220.

Smith A. y Mudder T. (1996) Tratamiento de residuos de cianuración. Mining Journal Books Ltd. (Londres).

Smith M. (1990) The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* **1**: 191-206.

- Smith R.M. y Martel A.E. (1976)** Critical stability constants. Inorganic complexes. Vol: 4. Plenum Press. (New York).
- Solomonson L.P. (1981)** Cyanide as a metabolic inhibitor. 11-28 In *Cyanide in biology*. Academic Press.
- Soni H. y Kango N. (2013)** Hemicellulases in lignocellulose biotechnology: recent patents. *Recent Patents on Biotechnology* **7**: 207-218.
- Spangler W.J. y Gilmour C.M. (1966)** Biochemistry of nitrate respiration in *Pseudomonas stutzeri*. I. Aerobic and nitrate respiration routes of carbohydrate catabolism. *Journal of Bacteriology* **91**: 245-250.
- Stanier R.Y., Palleroni N.J. y Doudoroff M. (1966)** The aerobic *Pseudomonads*: a taxonomic study. *Journal of General Microbiology* **43**: 159-271.
- Taherzadeh M.J., Eklund R., Gustafsson L., Niklasson C. y Lidén G. (1997)** Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **36**: 4659-4665.
- Taira K., Hirose J., Hayashida S. y Furukawa K. (1992)** Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 4844-4853.
- Takenaka S., Murakami S., Shinke R., Hatakeyama K., Yukawa H. y Aoki K. (1997)** Novel genes encoding 2-aminophenol 1,6-dioxygenase from *Pseudomonas* Species AP-3 growing on 2-aminophenol and catalytic properties of the purified enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 14727-14732.
- Timmis K.N. (2002)** *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environmental Microbiology* **4**: 779-781.
- Timmis K.N. y Pieper D.H. (1999)** Bacteria designed for bioremediation. *Trends in Biotechnology* **17**: 201-204.
- Tiwari N.P. y Campbell J.J. (1969)** Enzymatic control of the metabolic activity of *Pseudomonas aeruginosa* grown in glucose or succinate media. *Biochimica et Biophysica Acta* **192**: 395-401.
- Torres B., Jaenecke S., Timmis K.N., Garcia J.L. y Diaz E. (2000)** A gene containment strategy based on a restriction-modification system. *Environmental Microbiology* **2**: 555-563.
- Town W.G. (2004)** The Merck index 13.2 CD-ROM edition from CambridgeSoft. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **44**: 1883-1885.

Bibliografía

Trapnell C., Williams B.A., Pertea G., Mortazavi A., Kwan G., van Baren M.J., Salzberg S.L., Wold B.J. y Pachter L. (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology* **28**: 511-515.

Tremaroli V., Vacchi Suzzi C., Fedi S., Ceri H., Zannoni D. y Turner R.J. (2010) Tolerance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 to metals, polychlorobiphenyls and chlorobenzoates: effects on chemotaxis-, biofilm- and planktonic-grown cells. *FEMS Microbiology Ecology* **74**: 291-301.

Trudgill P.W. (1969) The metabolism of 2-fluoroic acid by *Pseudomonas* F2. *Biochemical Journal* **113**: 577-587.

Vaillancourt F., Bolin J. y Eltis L. (2004) Ring-Cleavage Dioxygenases. 359-395 In *Pseudomonas: Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*. Springer US.

van der Meer J.R., de Vos W.M., Harayama S. y Zehnder A.J. (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological Reviews* **56**: 677-694.

Vicente M. y Canovas J.L. (1973a) Regulation of the glucoytic enzymes in *Pseudomonas putida*. *Archiv für Mikrobiologie* **93**: 53-64.

Vicente M. y Canovas J.L. (1973b) Gluocolysis in *Pseudomonas putida*: physiological role of alternative routes from the analysis of defective mutants. *Journal of Bacteriology* **116**: 908-914.

von Sivers M., Zacchi G., Olsson L. y Hahn-Hagerdal B. (1994) Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* **10**: 555-560.

Wackett L.P. (1997) Biocatalysis, biodegradation and bioinformatics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**: 350-354.

Wackett L.P. (2003) *Pseudomonas putida*--a versatile biocatalyst. *Nature Biotechnology* **21**: 136-138.

Wackett L.P. y Hershberger C.D. (2001) Biocatalysis and biodegradation: microbial transformation of organic compounds. ASM Press. (Washington).

Wang X. y Forssberg K.S.E. (1990) The chemistry of cyanide-metal complexes in relation to hydrometallurgical processes of precious metals. *Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review* **6**: 81-125.

Wibberg D., Luque-Almagro V.M., Igeño M.I., Bremges A., Roldán M.D., Merchán F., Sáez L.P., Guijo M.I., Manso M.I., Macías D., Cabello P., Becerra G., Ibáñez

- M.I., Carmona M.I., Escribano M.M.P., Castillo F., Sczyrba A., Moreno-Vivián C., Blasco R., Pühler A. y Schlüter A. (2014)** Complete genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Journal of Biotechnology* **175**: 67-68.
- Wierckx N., Koopman F., Ruijsenaars H.J. y de Winde J.H. (2011)** Microbial degradation of furanic compounds: biochemistry, genetics, and impact. *Applied Microbiology and Biotechnology* **92**: 1095-1105.
- Wierckx N., Koopman F., Bandounas L., De Winde J.H. y Ruijsenaars H.J. (2010)** Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. *Microbial Biotechnology* **3**: 336-343.
- Williams P. y Sayers J. (1994)** The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation* **5**: 195-217.
- Winkler J., Reyes L.H. y Kao K.C. (2013)** Adaptive Laboratory Evolution for Strain Engineering. **985**: 211-222 In *Systems Metabolic Engineering*.
- Winsor G.L., Van Rossum T., Lo R., Khaira B., Whiteside M.D., Hancock R.E.W. y Brinkman F.S.L. (2009)** *Pseudomonas* genome database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Research* **37**: D483-D488.
- Winstedt L. y von Wachenfeldt C. (2000)** Terminal oxidases of *Bacillus subtilis* strain 168: one quinol oxidase, cytochrome aa(3) or cytochrome bd, is required for aerobic growth. *Journal of Bacteriology* **182**: 6557-6564.
- Wood W.A. y Schwerdt R.F. (1954)** Carbohydrate oxidation by *Pseudomonas fluorescens*. II. Mechanism of hexose phosphate oxidation. *Journal of Biological Chemistry* **206**: 625-635.
- Worsey M.J. y Williams P.A. (1975)** Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas (putida)* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *Journal of Bacteriology* **124**: 7-13.
- Yanase H., Sakamoto A., Okamoto K., Kita K. y Sato Y. (2000)** Degradation of the metal-cyano complex tetracyanonickelate (II) by *Fusarium oxysporum* N-10. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**: 328-334.
- Yu J. y Stahl H. (2008)** Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technology* **99**: 8042-8048.
- Zdzienicka M., Tudek B., Zielenska M. y Szymczyk T. (1978)** Mutagenic activity of furfural in *Salmonella typhimurium* TA100. *Mutation Research* **58**: 205-209.

Bibliografía

Zheng H., Wang X., Yomano L.P., Geddes R.D., Shanmugam K.T. y Ingram L.O. (2013) Improving *Escherichia coli* FucO for furfural tolerance by saturation mutagenesis of individual amino acid positions. *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 3202-3208.