

## TESIS DOCTORAL

**Estudio del papel de los genes *cio* en la resistencia al cianuro de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344**

**María Isabel Carmona Gallardo**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética**

**Conformidad de los directores:**



**Fdo: Alberto Quesada Molina**



**Fdo: Rafael Blasco Plá**



*A mis padres, porque lo que soy, se lo debo a ellos*



*“La educación es el arma más potente  
para cambiar el mundo”*

***Nelson Mandela***



## **AGRADECIMIENTOS**

Si a alguien debo dar las gracias por este trabajo, es a las dos personas que más saben de él, mis directores de tesis, Dr. Alberto Quesada Molina y Dr. Rafael Blasco Plá, porque sin ellos esto no hubiese sido posible, gracias por vuestra paciencia, y por transmitirme todo lo que habéis podido y más. A Rafa, por tantas explicaciones en los papeles de la mesa del laboratorio, que me hacían ver las cosas mucho más claras y sencillas, y por transmitir con tanta ilusión hipótesis acerca de futuros resultados y experimentos. A Alberto, por enseñarme tantas técnicas de biología molecular, por explicarme las dudas tantas veces y con tanta paciencia. Por todo esto y mucho más, gracias.

Al grupo Biomic, por ser un equipo estupendo, a Maribel Guijo, por ser la persona que más me ayudó en los inicios de este trabajo, y porque siempre me ha brindado su ayuda. A Maribel Igeño, porque siempre se ha preocupado por mi, tanto dentro del laboratorio como fuera de él. Siempre recordaré las risas en las clases de inglés. A Tino e Inma, gracias, sois una pareja estupenda.

A todo el departamento de Bioquímica y Biología Molecular, porque todas las personas que forman parte de él siempre están dispuestas a ayudar y dar apoyo.

A Fernando Rojo, por cedernos tan amablemente la cepa de *Pseudomonas putida* KT2440, a Chus, por ayudarnos con el protocolo del Northern blot. A Inés, por cedernos su laboratorio para usar la Real Time PCR de 96 pocillos.

A los que han trabajado conmigo cada día. A Glori y a Graci, porque tendría para escribir otra tesis sólo con agradecimientos hacia ellas, este trabajo desde luego también les pertenece. Anthony, que sepas que te echo de menos después de tantos años juntas, eres una AMIGA de verdad, gracias por haberme hecho partícipe de momentos tan importantes para ti, como el día de tu boda, la lectura de tu tesis... y con lo que más feliz me vas a hacer, con el nacimiento de tu baby (con lo que me gustan a mi los niños). Ojalá algún día volvamos a coincidir trabajando juntas. A Glori, el terremoto del laboratorio,

eres el apoyo moral que toda persona necesita, haces reír a cualquiera, como disfrutaba cuando nos poníamos a hablar haciendo limpieza o preparando material para el autoclave. Por supuesto mi tesis también va para Alejandro y Alicia, después de lo pesada que fui diciéndote que tuvieses un niño, que menos que incluirlos en los agradecimientos. A Dani, por hacernos reír con ese acento andaluz. A Alex, por haberme ayudado tanto con la Real Time, y haber compartido tantos ratitos de charla al final de las mañanas. A Montaña, gracias por preocuparte por mi tesis, y recordarme plazos. A Felipe, Marta, Ana...A Lorena, muchísimas gracias por los buenos ratos que hemos pasado juntas, gracias por intentar convencerme de que agobiarse no merecía la pena, aunque pocas veces lo hayas conseguido.

A mis amig@s, espero compensar a partir de ahora todos los ratos que me he perdido con vosotros, sobre todo con Isa (gracias por ayudarme en los últimos días de escritura), Toñi, Manoli, Yoli, Conchi, Ana y García. A Chema y Olga, por preocuparse tanto por mi.

A mi familia, porque siempre he sabido que tengo una familia estupenda, pero este verano me he dado cuenta que tengo la mejor. A mis padres, que siempre me han animado a hacer lo que me gusta, espero tener mejor humor a partir de ahora. A mi hermano, porque es mi ejemplo a seguir, y es la persona que más me animó a meterme en el mundo de la investigación. A mi hermana, la que nos hace ver a todos en casa la vida de forma más positiva, la que nos hace reír cada día, y por que no dudo que será la mejor matrona.

Por último, a Andrés, por ser capaz de ir a comprarme una multifunción para imprimir con tal de no agobiarme, porque aún en los momentos de más agobio acabas haciéndome reír, y mira que eso es difícil. Has logrado lo que querías, ser profesor, enhorabuena y Gracias por TODO. Te prometo que a partir de ahora todo va a ser más fácil. A J.Andrés, Nati, Bea, Inma, Alberto, Lolo, Gloria y por supuesto, Jesús y Adriana, gracias por ser mi segunda familia.



## ***FINANCIACIÓN***

### Ministerio de Ciencia e innovación



- BIO2008-04542-C02-02
- BIO2011-30026-C02-01
- Ayuda predoctoral FPI BES-2009-027073

### Gobierno de Extremadura

GOBIERNO DE EXTREMADURA  
Consejería de Empleo, Empresa e Innovación



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

- PRI07A097
- Ayuda a Grupos-BioMic GR10165-CCV019 y GRU09078

### Fondo Europeo de Desarrollo Regional



- FEDER 2007-2013



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:

- V Congreso de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana. Oviedo. 15-17 Octubre 2014.
- XXXVII Congreso SEBBM. Congreso anual de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Granada. 9-12 de Septiembre de 2014.
- XII Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Bilbao. 7-9 de Julio de 2014.
- Anque. Icce. Biotec. Congreso Sociedad de Biotecnología. Madrid. 1-4 de Julio de 2014.
- 8th CeBiTec Symposium. The Genomics Revolution and its Impact on Future Biotechnology. Bielefeld. 28-30 de Octubre 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.
- XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). Córdoba. 14-17 de Septiembre de 2010.
- X Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Benalauría (Málaga). 23-25 de Junio de 2010

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., Escribano 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., Igeno, M. I., Bremges, A., Roldan, M. D., Merchan, F., Saez, L. P., Guijo, M. I., Manso, M. I., Macias, D., Cabello, P., Becerra, G., Ibanez, M. I., Carmona, M. I., Carmona, M. I., Escribano, M. M., Castillo, F., Sczyrba, A., Moreno-Vivian, C., Blasco, R., Puhler, A. y Schluter, A. (2014)** Complete genome sequence of the cyanide-degrading bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Journal Biotechnology* **175**: 67-8.

## **Índice**

<b>1. Índice de Tablas .....</b>	<b>9</b>
<b>2. Índice de figuras.....</b>	<b>11</b>

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>15</b>
--------------------------	-----------

### **I. INTRODUCCIÓN**

1. Contaminación ambiental .....	21
1.1. Tipos de contaminantes.....	22
2. Biotecnología y biorremediación .....	25
3. El cianuro .....	27
3.1. Cianuro libre.....	28
3.2. Complejos de cianuro .....	29
3.3. Métodos analíticos en la determinación de la concentración de cianuro	31
3.4. Usos industriales del cianuro .....	32
3.5. Otras fuentes del cianuro .....	36
3.6. Eliminación del cianuro .....	38
3.7. Rutas de biodegradación de cianuro y nitrilos .....	41
3.8. Toxicidad del cianuro .....	45
3.9. Legislación europea respecto al uso del cianuro en industrias mineras	46
4. <i>Pseudomonas</i> .....	48
4.1. <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT 5344.....	50
5. La respiración bacteriana .....	52
5.1. Oxidasas terminales en la respiración bacteriana.....	55

5.1.1 . Citocromo oxidasa <i>cbb</i> <sub>3</sub> .....	56
5.1.2 . Citocromo oxidasa <i>aa</i> <sub>3</sub> .....	60
5.1.3 . Citocromo <i>bo</i> <sub>3</sub> quinol oxidasa ( <i>cyo</i> ).....	61
5.1.4 . Citocromo <i>bd</i> y sus homólogos .....	61
6. Familia de reguladores transcripcionales GntR.....	65
6.1. Subfamilia MocR .....	66
7. Las nitrilasas .....	68
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>77</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. Material biológico .....	81
1.1. Estirpes bacterianas .....	81
2. Medios de cultivo .....	82
2.1. Medio líquido Luria-Bertani (LB o medio rico) .....	83
2.2. Medio sólido LB-AGAR .....	83
2.3. Medio mínimo líquido M9 .....	83
2.4. Medios selectivos .....	85
2.5. Condiciones de cultivo .....	85
3. Determinaciones analíticas .....	86
3.1. Determinación de la concentración de amonio .....	86
3.2. Determinación de la concentración de cianuro .....	86
3.3. Determinación de la concentración de proteínas .....	87
4. Obtención de extractos acelulares .....	87

4.1. Recolección de células .....	87
4.2. Preparación de extractos acelulares .....	88
5. Determinación de actividades enzimáticas .....	88
5.1. Actividad respiratoria en extractos acelulares .....	88
6. Técnicas de biología molecular .....	89
6.1. Plásmidos .....	89
6.2. Extracción de DNA plasmídico.....	90
6.3. Extracción de DNA genómico .....	91
6.4. Extracción del RNA total .....	92
6.5. Tratamiento con DNasa .....	93
6.6. Determinación de la concentración de DNA y RNA .....	93
6.7. Retrotranscripción (RT) del RNA .....	94
6.8. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa .....	94
6.9. Purificación de DNA de soluciones y geles de agarosa .....	95
6.10. Digestión del DNA con enzimas de restricción .....	96
6.11. Defosforilación de los extremos de las moléculas de DNA .....	96
6.12. Ligación del DNA .....	96
6.13. Transformaciones .....	97
6.13.1. Preparación de células competentes .....	97
6.13.2. Transformación por electroporación .....	97
6.13.3. Selección de colonias recombinantes .....	98
6.14. Amplificación del DNA .....	99
6.14.1. Amplificación del DNA mediante PCR convencional .....	99
6.14.1.1. Diseño de la técnica de PCR para amplificar el gen <i>aph(3')</i> ...	102

6.14.1.2. Diseño de la técnica de PCR para amplificar los genes <i>cio2</i> y <i>cio3</i> .....	102
6.14.1.3. Diseño de la técnica de PCR para amplificación de la región <i>cio</i> .....	103
6.14.1.4. Diseño de la técnica de PCR para amplificación de los operones <i>cio1</i> , <i>cio2</i> y <i>cio3</i> .....	103
6.14.1.5. Diseño de la técnica de PCR para amplificación de las oxidasas <i>cbb<sub>3</sub></i> y <i>aa<sub>3</sub></i> .....	103
6.14.2. PCR de colonias .....	104
6.14.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR cuantitativa) .....	104
6.14.3.1. Cuantificación del mRNA en la PCR a tiempo real .....	106
7. Secuenciación y anotación del genoma de <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	108
8. Transcriptómica .....	108
8.1. Extracción, purificación y cuantificación del RNA .....	109
8.2. Sustracción del RNA ribosómico (rRNA) .....	109
8.3. Electroforesis de mRNA en gel de agarosa formaldehído .....	109
8.4. Tratamiento del mRNA y análisis bioinformático .....	110
8.5. Preparación de las muestras .....	110
8.5.1. Control de calidad .....	110
8.5.2. Construcción de librerías .....	110
8.5.3. Obtención de microesferas para secuenciación .....	111
8.5.4. Secuenciación .....	111
8.5.5. Análisis de los datos .....	111
8.5.5.1. Análisis primario. Control de calidad del dato bruto .....	111
8.5.5.2. Análisis secundario. Mapeo y cuantificación de transcritos .....	112
8.5.5.3. Análisis terciario. Comparación de muestras .....	112



8.5.5.3.1 Análisis terciario. Anotación de los genes diferencialmente expresados .....	113
8.5.5.3.2 Análisis terciario. Estudio de enriquecimiento funcional .....	113
9. Análisis bioinformático .....	113
10. Hibridación y transferencia del RNA (Northern blot) .....	114
10.1. Transferencia del RNA a membranas .....	114
10.2. Preparación y marcaje de la sonda .....	115
10.3. Condiciones de hibridación para RNA .....	115
10.4. Bloqueo e incubación con el anticuerpo .....	116
10.5. Revelado inmunológico .....	116
11. Disrupción insercional del gen cromosómico <i>mocR</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 R1 .....	117
12. Equipos .....	118
13. Reactivos .....	119

#### **IV. RESULTADOS**

<u>Capítulo I. Expresión de los genes para las oxidasas terminales de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344</u> .....	123
1. Regulación de la expresión génica de los operones <i>cio1</i> , <i>cio2</i> y <i>cio3</i> .....	125
1.1. Ámbito de estudio: genes para las oxidasas insensibles a KCN .....	125
1.2. Diseño de sistemas de qPCR para la cuantificación de la concentración de los mRNA de los genes <i>cioA1</i> , <i>cioA2</i> y <i>cioA3</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 .....	127
1.3. Efecto del KCN y mutaciones en el operón <i>cio1</i> sobre la expresión de los operones <i>cio1</i> , <i>cio2</i> y <i>cio3</i> .....	130

1.4. Efecto del NOC-12 y KCN sobre la expresión de los operones <i>cio1</i> , <i>cio2</i> y <i>cio3</i> .....	136
1.5. Efecto del grado de aireación sobre la expresión de los operones <i>cio1</i> , <i>cio2</i> y <i>cio3</i> .....	139
1.6. Efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de los operones <i>cio1</i> , <i>cio2</i> y <i>cio3</i> .....	140
2. Expresión funcional de los operones <i>cio2</i> y <i>cio3</i> .....	141
2.1. Construcción de los vectores para la expresión funcional de <i>cio2</i> y <i>cio3</i> .....	141
2.2. Análisis funcional de la expresión de <i>cio2</i> y <i>cio3</i> en <i>P. putida</i> KT2440	143
3. Regulación de la expresión génica de los operones <i>cco1</i> , <i>cco2</i> y <i>cox</i> .....	146
3.1. Ámbito de estudio: genes para las oxidasas <i>cbb<sub>3</sub></i> y <i>aa<sub>3</sub></i> .....	146
3.2. Diseño de sistemas de qPCR para la cuantificación de la concentración de los mRNA de los operones <i>cco</i> y <i>cox</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 .....	147
3.3. Efecto del KCN y mutaciones en el operón <i>cio1</i> sobre la expresión de los operones <i>cco</i> y <i>cox</i> .....	148
3.4. Efecto del NOC-12 y KCN sobre la expresión de los operones <i>cco</i> y <i>cox</i> .....	151
3.5. Efecto del grado de aireación sobre la expresión de los operones <i>cco</i> y <i>cox</i> .....	152
3.6 Efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de los operones <i>cco</i> y <i>cox</i> .....	153
<u>Capítulo II. Estructura génica del operón <i>cio1</i></u> .....	155
1. Expresión de los genes asociados a la región <i>cio1</i> .....	157
1.1. Cotranscripción de los genes adyacentes al operón <i>cio1</i> .....	157

1.2. Construcción y análisis de mutantes del gen <i>mocR</i> .....	160
1.2.1. Mutagénesis de <i>mocR</i> .....	160
1.2.2. Estudio fenotípico de los mutantes MocR y MocR+T .....	162
1.3. Regulación de los genes del operón <i>cio1</i> por mutaciones con efectos polares sobre su propia expresión .....	163
1.4. Regulación de la expresión de los genes del operón <i>cio1</i> por mutaciones en el gen <i>mocR</i> .....	167
1.5. Regulación de la expresión del gen <i>nit4</i> .....	170
1.6. Regulación de la expresión de genes agrupados en el entorno de los genes <i>cio</i> .....	171

### Capítulo III. Análisis transcriptómico de la estirpe silvestre y mutante T1 y MocR

.....	177
1. Análisis transcriptómico .....	179
1.1. Estudio transcriptómico del mutante T1 frente a la estirpe silvestre <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 en presencia de cianuro en medio LB .....	180
1.1.1. Genes sobreexpresados en el mutante T1 .....	181
1.1.2. Genes infraexpresados en el mutante T1 .....	184
1.2. Estudio transcriptómico del mutante MocR frente a la estirpe silvestre <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 en presencia de cianuro en medio LB .....	188
1.2.1. Genes sobreexpresados en el mutante MocR .....	188
1.2.2. Genes infraexpresados en el mutante MocR .....	190
1.3. Estudio transcriptómico de las oxidasas presentes en el genoma de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 .....	191
1.3.1. Regulación del operón <i>cio1</i> .....	192
1.3.2. Regulación del operón <i>cio2</i> .....	194
1.3.3. Regulación del operón <i>cio3</i> .....	195

1.3.4. Regulación de la oxidasa <i>cbb<sub>3</sub>-2</i> .....	196
1.3.5. Regulación de la oxidasa <i>cbb<sub>3</sub>-1</i> .....	197
1.3.6. Regulación de la oxidasa <i>aa<sub>3</sub></i> .....	197

## **V. DISCUSIÓN**

1. Regulación de las oxidasas terminales de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 .....	215
2. Estructura génica de <i>cio1</i> : papel de MocR en su regulación .....	220
3. Estudio transcriptómico de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT 5344 y sus mutantes .....	224

<b>CONCLUSIONES</b> .....	239
---------------------------	-----

<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	243
---------------------------	-----

## **1. Índice de Tablas**

<b>Tabla 1.</b> Estabilidad de los complejos de cianuro en agua .....	31
<b>Tabla 2.</b> Principales accidentes con cianuro en las últimas décadas .....	35
<b>Tabla 3.</b> Fuentes naturales y fuentes artificiales del cianuro .....	38
<b>Tabla 4.</b> Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.....	81
<b>Tabla 5.</b> Antibióticos empleados en este trabajo .....	85
<b>Tabla 6.</b> Plásmidos empleados en este trabajo .....	89
<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	99
<b>Tabla 8.</b> Genes sobreexpresados e infraexpresados en los mutantes T1 y MocR .....	199
<b>Tabla 9.</b> Análisis transcriptómico en el mutante T1 de las oxidasas terminales presentes en el genoma de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 .....	208
<b>Tabla 10.</b> Análisis transcriptómico en el mutante MocR de las oxidasas terminales presentes en el genoma de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344.....	210



## 2. Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Clasificación de los cianuros .....	28
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo de la biodegradación aeróbica .....	42
<b>Figura 3.</b> Resumen del sistema básico bioenergético de transporte electrónico aeróbico de una mitocondria mamífera UQ, ubiquinona, UQH <sub>2</sub> ubiquinol; Cyt, citocromo .....	53
<b>Figura 4.</b> Flexibilidad respiratoria en <i>Paracoccus denitrificans</i> (a) y en <i>E. coli</i> (b) MQ, menaquinona; UQ, ubiquinona; DMQ, dimetilmenoquinona .....	54
<b>Figura 5.</b> Cadenas respiratorias bacterianas .....	55
<b>Figura 6.</b> Esquema del complejo <i>cbb<sub>3</sub></i> en <i>P. stutzeri</i> .....	58
<b>Figura 7.</b> Esquema del citocromo <i>bd</i> bacteriano .....	62
<b>Figura 8.</b> Oligomerización de GntR y unión a su diana .....	68
<b>Figura 9.</b> Electroforesis de la extracción del RNA .....	93
<b>Figura 10.</b> RNA extraído y purificado .....	93
<b>Figura 11.</b> Muestras de mRNA utilizadas en el análisis transcriptómico .....	110
<b>Figura 12.</b> Oxidasas terminales de <i>Pseudomonas</i> .....	125
<b>Figura 13.</b> Estructura de los operones <i>cio</i> .....	127
<b>Figura 14.</b> Diseño de cebadores específicos para los genes <i>cioA</i> .....	128
<b>Figura 15.</b> Optimización de la concentración de los cebadores para las qPCR de los genes <i>cioA</i> .....	129
<b>Figura 16.</b> Especificidad de los cebadores para los genes <i>cioA</i> .....	130
<b>Figura 17.</b> Expresión de los operones <i>cio</i> en medio mínimo M9. ....	131
<b>Figura 18.</b> Expresión de la actividad respiratoria en medio mínimo M9 .....	133
<b>Figura 19.</b> Expresión de los operones <i>cio</i> en medio rico LB .....	134
<b>Figura 20.</b> Estructura del NOC-12 .....	137
<b>Figura 21.</b> Efecto del NOC-12 y del KCN sobre el crecimiento del mutante T1 .....	137
<b>Figura 22.</b> Regulación de la expresión de los genes de los genes <i>cio</i> por el NOC-12 y KCN en medio LB. ....	138
<b>Figura 23.</b> Efecto del grado de aireación sobre la expresión de los genes <i>cio</i> en medio LB. ....	139

<b>Figura 24.</b> Efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de los genes <i>cio</i> .....	140
<b>Figura 25.</b> Clonación en PGem-TEasy de los operones <i>cio2</i> y <i>cio3</i> .....	142
<b>Figura 26.</b> Clonación en pVLT33 de los operones <i>cio2</i> y <i>cio3</i> .....	143
<b>Figura 27.</b> Expresión de actividad respiratoria en <i>P. putida</i> expresando los genes <i>cio</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 .....	145
<b>Figura 28.</b> Tolerancia al KCN de las cepas que expresan los operones <i>cio</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 en el mutante <i>cio</i> de <i>P. putida</i> .....	146
<b>Figura 29.</b> Estructura génica de los operones <i>cco1</i> , <i>cco2</i> y <i>cox</i> de <i>P. pseudoalcaligenes</i> CECT5344 .....	147
<b>Figura 30.</b> Diseño de cebadores específicos para los genes <i>ccoP1</i> y <i>ccoP2</i> .....	147
<b>Figura 31.</b> Optimización de la concentración de cebadores para las qPCR de los genes <i>ccoO</i> .....	149
<b>Figura 32.</b> Estudio de la expresión en medio mínimo para las oxidasas <i>cbb<sub>3</sub>-1</i> , <i>cbb<sub>3</sub>-2</i> y <i>aa<sub>3</sub></i> .....	149
<b>Figura 33.</b> Expresión de los genes <i>ccoP1</i> , <i>ccoP2</i> y <i>coxB</i> en medios con cianuro y en mutantes afectados en la expresión de <i>cio1</i> .....	150
<b>Figura 34.</b> Regulación de la expresión de <i>ccoP1</i> , <i>ccoP2</i> y <i>coxB</i> por NOC-12 .....	152
<b>Figura 35.</b> Efecto del grado de aireación sobre la expresión de <i>ccoP1</i> , <i>ccoP2</i> y <i>coxB</i> . .....	153
<b>Figura 36.</b> Efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de <i>ccoP1</i> , <i>ccoP2</i> y <i>coxB</i> .....	154
<b>Figura 37.</b> Expresión génica en la región de <i>cio1</i> .....	158
<b>Figura 38.</b> Detección del transcrito de <i>cio1</i> mediante hibridación .....	159
<b>Figura 39.</b> Construcción de vectores para la mutagénesis del gen <i>mocR</i> ....	161
<b>Figura 40.</b> Comprobación de la construcción de los mutantes MocR y MocR+T .....	162
<b>Figura 41.</b> Crecimiento en medios con KCN de los mutantes MocR y MocR+T .....	163
<b>Figura 42.</b> Regulación de la expresión del operón <i>cio1</i> en la estirpe silvestre y mutantes T1, T18, T25 y T10 .....	164



<b>Figura 43.</b> Estudio de la expresión en la estirpe silvestre y mutantes T1 y T10 .....	165
<b>Figura 44.</b> Regulación de la expresión de la estirpe silvestre y mutantes T10, MocR y MocR+T .....	167
<b>Figura 45.</b> Estudio de la expresión en los mutantes T10, MocR y MocR+T..	169
<b>Figura 46.</b> Regulación por KCN de la expresión del gen <i>nit4</i> .....	171
<b>Figura 47.</b> Entorno génico del operón <i>cio1</i> .....	172
<b>Figura 48.</b> Regulación de la expresión en <i>BN5_1898</i> y en <i>BN5_1892</i> .....	174
<b>Figura 49.</b> Regulación de la expresión en los genes <i>BN5_1898</i> y <i>BN5_1892</i> para los mutantes de CIO. ....	175
<b>Figura 50.</b> Entornos génicos conteniendo <i>mocR</i> y genes <i>cio</i> o <i>cyo</i> en diferentes especies bacterianas .....	221



- A** Adenina
- ADP** Adenosín difosfato
- Ap<sup>r</sup>** Resistencia a ampicilina
- AP** Azul de Prusia
- atm** Atmósfera
- ATP** Adenosín trifosfato
- BLAST** *Basic Local Alignment Search Tool*
- BSA** Seroalbúmina bovina
- BPB** Azul de Bromofenol (3',3'',5',5''-tetrabromofenolsulfotaleína)
- C** Citosina
- CIO** Cyanide Insensitive Oxidase
- CNAIa** Cianoalanina
- CoA** Coenzima A
- Ct** Ciclo umbral (*Cycle threshold*)
- Da** Dalton
- DCPIP** 2,6-diclorofenolindofenol
- DDT** Dicloro Difenil Tricloroetano
- DMQ** dimetilmenoquinona
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- DNA** Ácido desoxirribonucleico
- cDNA** DNA copia
- DNAsa** Desoxirribonucleasa
- dNTP** Desoxinucleótido trifosfato
- D.O.<sub>600 nm</sub>** Densidad óptica ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ )
- $\epsilon$  Coeficiente de extinción molar
- EDA** Entner Doudoroff Aldolase
- EDTA** Ácido etilendiaminotetracético
- g** Unidades de fuerza G
- G** Guanina
- Gm<sup>r</sup>** Resistencia a gentamicina
- HCOs** Superfamilia hemo cobre
- HPLC** Cromatografía líquida de alta resolución

## Abreviaturas

**HTH** hélice-giro-hélice

**IPTG** Isopropil-1-tio- $\beta$ -galactopiranosido

**Kb** Kilobase

**KDa** Kilodalton

**Km<sup>r</sup>** Resistencia a kanamicina

l litro

**LB** Medio de cultivo Luria-Bertani

**M** Molar

**mM** Milimolar

**nM** Nanomolar

**$\mu$ M** Micromolar

**fM** Fentomolar

**M9** Medio mínimo M9

**Mb** Megabases

**mg** Miligramo

**min** Minuto

**ml** Mililitro

**$\mu$ g** Microgramo

**$\mu$ l** Microlitro

**MM9** Medio mínimo MM9

**MOPS** Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico

**MQ** menaquinona

**mV** MiliVoltio

**NAD** Dinucleótido de nicotinamina adenina oxidado

**NADH** Dinucleótido de nicotinamina adenina reducido

**ORF** Marco abierto de lectura

**PBS** Tampón fosfato salino

**PHA** polihidroxiclcanoatos

**PLP** Piridoxal 5'-fosfato

**pb** Pares de bases

**ppb** Partes por billón

**p/v** relación peso/volumen

**PCR** Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente

**phu** *pseudomonas* heme uptake

**q-PCR** Reacción cuantitativa de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente

**rcf** Fuerza centrífuga relativa

**Rf<sup>r</sup>** Resistencia a rifampicina

**RNA** Ácido ribonucleico

**RNAsa** Ribonucleasa

**mRNA** RNA mensajero

**sRNA** Pequeño RNA

**Sd** Desviación estándar

**ROS** Especies reactivas de oxígeno

**rpm** Revoluciones por minuto

**RT** Reacción de retrotranscripción

**s** Segundo

**SAD** Disociables en ácido fuerte

**SOC** Medio de cultivo SOC

**T** Timina

**TBE** Tampón borato-EDTA

**TE** Tampón Tris-EDTA

**Tet<sup>r</sup>** Resistencia a tetraciclina

**Tris** Tri-hidroximetil-aminometano

**U** Unidad de actividad enzimática

**UE** Unión Europea

**UQ** ubiquinona

**v/v** relación volumen/volumen

**WAD** Complejos metálicos de cianuro disociables por ácido débil

**X-gal** 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

$\lambda$  Longitud de onda



# ***I. INTRODUCCIÓN***





## 1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.

La contaminación es la presencia en el ambiente de toda sustancia, que en cualquiera de sus estados físicos y químicos, al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altera o modifica su composición y condición natural, causando desequilibrio ecológico. Las actividades humanas han provocado siempre contaminación, por lo que no podemos considerar la contaminación ambiental como un fenómeno reciente. Hasta el S. XIX la economía estaba basada en la agricultura, siendo muy fáciles de reciclar los residuos producidos. Esta producción de desechos es una característica que distingue a la humanidad, y durante miles de años un objetivo primordial de la humanidad ha sido obtener suministros que estuvieran libres de contaminación, sobre todo el agua (Ander-Egg, 1985).

Con la llegada de la sociedad moderna, basada principalmente en la actividad industrial y el uso de nuevas tecnologías, aumentaron tanto los tipos como la cantidad de contaminantes de una forma considerable, provocando también riesgos en la salud humana y en el medio ambiente. La contaminación ambiental debido a fuentes naturales y antropogénicas está aumentando día a día a causa del incremento de la población, la industrialización y la urbanización (Fry *et al.*, 1992).

El problema de la contaminación del agua ha aumentado paralelamente al desarrollo de la Humanidad. Un país desarrollado consume más agua en hogares, agricultura, industria, y, en consecuencia, produce mayor volumen de aguas residuales. En la actualidad se utilizan y fabrican productos, antes inexistentes, de gran poder contaminante. Unos miligramos de DDT, por ejemplo, pueden envenenar un gran volumen de agua. La naturaleza ya no es capaz por sí sola de diluir y autodepurar sus vertidos. Se estima que en los laboratorios se han sintetizado del orden de  $6 \times 10^6$  compuestos químicos, y que anualmente se sintetizan unos 1000 compuestos completamente nuevos (Singleton, 1994).

### 1.1 Tipos de contaminantes.

Los contaminantes se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios, siendo los dos principales de acuerdo a su naturaleza, y al medio al que afectan.

Todo cambio significativo en la composición o condiciones normales de un medio, constituye una forma de contaminación. Tales cambios afectan al recurso en sí o a su uso para un fin determinado. Atendiendo a su naturaleza, los contaminantes pueden ser:

- químicos.
- físicos.
- biológicos.

El medio afectado puede ser aire, agua, suelo o cualquier sustrato orgánico. Los contaminantes químicos pueden ser a su vez inorgánicos (generalmente sales) u orgánicos (derivados más o menos sustituidos de moléculas inicialmente formadas por carbono e hidrógeno, por ejemplo, hidrocarburos) (Fry *et al.*, 1992; Singleton, 1994).

Normalmente los lugares contaminados pueden ser tratados con métodos físicos o químicos, que son métodos tradicionales y además relativamente caros. La contaminación por metales en *India*, por ejemplo, es principalmente debida a actividades industriales. En el caso de los Estados Unidos se estima que serían necesarios aproximadamente 3 billones de dólares para eliminar la contaminación causada por metales (Glass, 2000). En el último siglo la industria química ha sufrido un enorme desarrollo, lo que ha provocado un aumento excesivo en la liberación de contaminantes **xenobióticos**, cuya definición es la de compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio. Debido a su estructura inusual, algunos compuestos xenobióticos persisten mucho tiempo en la biosfera sin alterarse y por eso se dice que son recalcitrantes a la biodegradación. Los procesos más importantes por los que se degradan los compuestos

xenobióticos son la fotodegradación por radiaciones solares, los procesos de oxidación y reducción química y la biodegradación por los microorganismos. Los métodos tradicionales son generalmente ineficientes, lentos e implican procesos físico-químicos que no conducen a la eliminación completa de los contaminantes (Bouwer y Zehnder, 1993), de ahí que los procesos de biodegradación estén tomando cada vez más relevancia en la actualidad, ya que los microorganismos son capaces de transformar *in situ* una gran variedad de compuestos contaminantes en otros menos dañinos para el medio ambiente (Bouwer, 1992).

Atendiendo a los diferentes grupos de compuestos orgánicos, según los tipos de enlace y los grupos funcionales que contienen, el proceso de biodegradación presenta grandes diferencias:

-Alcanos: La estrategia general es convertir la cadena en un ácido graso. Para ello, en el primer paso de oxidación es necesario oxígeno molecular, y por tanto, existe la evidencia de que los alcanos (con excepción del metano) son anaeróbicamente bastante recalcitrantes (Britton, 1984).

-Alquenos y alquinos: Son degradados aeróbicamente por mecanismos similares a los de alcanos, aunque al ser más reactivos químicamente pueden sufrir reacciones adicionales como epoxidación e hidratación (Britton, 1984). En algunos casos el doble enlace de los alquenos puede ser hidratado anaeróbicamente para formar un alcohol, el cual ya puede ser utilizado en una ruta aeróbica (Schink, 1988). Los alquinos, como el acetileno, pueden ser usados tanto como fuente de carbono como de energía por organismos aerobios y anaerobios. Ambos tipos de organismos atacan la molécula inicialmente por hidratación (Schink, 1988).

-Compuestos aromáticos: La biodegradación aeróbica de muchos compuestos aromáticos es común y procede con un intermediario clave, el catecol (Bouwer y Zehnder, 1993). Anaeróbicamente, el anillo aromático no es ni reducido ni oxidado, y el intermediario clave en esta ruta es una ciclohexanona (Evans y Fuchs, 1988). Los organismos eucarióticos producen

catecoles a partir de compuestos aromáticos sencillos, a través de la formación de un epóxido y un trans-diol usando una monoxigenasa (Bouwer y Zhender, 1993). Los organismos procariotas introducen una molécula de oxígeno por una reacción a través de una dioxigenasa formando primero un cis-diol (Bouwer y Zehnder, 1993).

-Compuestos halogenados: Pueden ser dehalogenados mediante reducción durante su degradación, o también puede ser usado como aceptor terminal de electrones para el crecimiento de microorganismos (Mohn y Tiedje, 1991; Holliger *et al.*, 1992).

Debido a la acción del hombre, está teniendo lugar gran acumulación de algunas de las sustancias citadas anteriormente, que sin ser recalcitrantes y siendo fácilmente metabolizables por los seres vivos, causan grandes problemas medio ambientales. Como ejemplo de compuestos xenobióticos nos encontramos con los pesticidas organoclorados, como el DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), cuya resistencia a la degradación y su carácter lipofílico ha provocado su bioacumulación a lo largo de la cadena trófica. Por tratarse de plaguicidas muy efectivos aún se siguen utilizando para el control de la malaria en países subdesarrollados, para evitar la proliferación de los insectos vector (Beard, 2006). El Programa Ambiental de las Naciones Unidas (UNEP) prohibió su uso en la Convención de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes del 2001 (Sharm, 2003), ya que su presencia se asocia a cáncer de páncreas y desórdenes reproductores y neurofisiológicos (Beard, 2006).

Otros contaminantes producidos por el hombre, pero que son ubicuos en la naturaleza, pueden causar grandes problemas medioambientales debido a su uso masivo. Un ejemplo claro es el nitrato, que debido a su uso masivo como fertilizante provoca graves problemas de contaminación en los acuíferos. Sin embargo, el nitrato es un compuesto asimilable tanto por plantas como por microorganismos. Además, también puede convertirse en nitrógeno molecular en el proceso de desnitrificación, vía óxido nítrico y óxido nitroso. Hasta 50 géneros bacterianos, entre ellos *Pseudomonas sp.*, pueden llevar a cabo la desnitrificación (Delwiche 1981; Skiba *et al.*, 1993). Se puede estar

produciendo un cambio a nivel global en el ciclo del nitrógeno cuyas consecuencias son imprevisibles. El principal actor de este efecto es el uso masivo de fertilizantes en la agricultura, aunque también existen otros compuestos nitrogenados naturales, como el cianuro, que el hombre sintetiza en grandes cantidades por sus aplicaciones en la industria y en la minería, fundamentalmente.

## **2. BIOTECNOLOGÍA Y BIORREMEDIACIÓN.**

La biorremediación es una tecnología efectiva en cuanto a costes se refiere, saludable para el medio ambiente, y alternativa a tratamientos convencionales. Además, en algunos casos los tratamientos convencionales simplemente transfieren contaminantes, o crean un nuevo residuo, y por tanto no eliminan el problema (Iwamoto y Nasu, 2001). La biorremediación es una opción que ofrece la posibilidad de destruir o neutralizar varios contaminantes usando actividad biológica natural, y de ahí que el coste sea relativamente bajo y se haga uso de técnicas sin exceso de tecnología, provocando una buena aceptación, a lo que se suma la posibilidad de poder llevarse a cabo *in situ* (Vidali, 2001). La biorremediación puede ser especialmente efectiva para el tratamiento de aguas y suelos contaminados (Kamaludeen *et al.*, 2003), siendo llevado a cabo el proceso tanto por hongos, levaduras o bacterias (Strong y Burgess, 2008).

La mayoría de los sistemas de biorremediación se llevan a cabo bajo condiciones aeróbicas. Los principales parámetros a tener en cuenta en la biorremediación son (Dua *et al.*, 2002):

- La naturaleza de los contaminantes.
- La estructura del suelo, el pH, la hidrogeología.
- El estado nutricional, la diversidad microbiológica del sitio.
- La temperatura y el estado de óxido-reducción (potencial redox).

En los procesos de biorremediación, los microorganismos usan los contaminantes como nutrientes o fuente de energía (Tang *et al.*, 2007). El agua subterránea es una de las fuentes principales del agua apta para consumo en la tierra, aunque cada vez con mayor frecuencia se encuentran contaminadas con diferentes compuestos, como hidrocarburos procedentes del petróleo que se filtran a través del subsuelo por derrames accidentales. Estos compuestos orgánicos han causado mucha preocupación pública ya que el benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (denominada fracción BTEX) son contaminantes muy peligrosos para la salud humana (Lokhande *et al.*, 2009). La tecnología de biorremediación “in situ” ha sido empleada con éxito para la limpieza de sitios contaminados con petróleo y fracciones BTEX (Keshav *et al.*, 2010).

Las bacterias presentan una enorme versatilidad catabólica. Sin embargo, las interacciones entre bacterias y contaminantes son complejas y no siempre es posible esta tecnología. La rizorremediación y la aplicación de nuevas técnicas experimentales, como la ingeniería de proteínas y la ingeniería metabólica, ayudadas por las nuevas ómicas (transcriptómica, proteómica, metagenómica, ...), quizá permita mejorar las técnicas de biorremediación para la degradación de contaminantes recalcitrantes tales como alifáticos clorados y bifenilos policlorados (Wood, 2008).

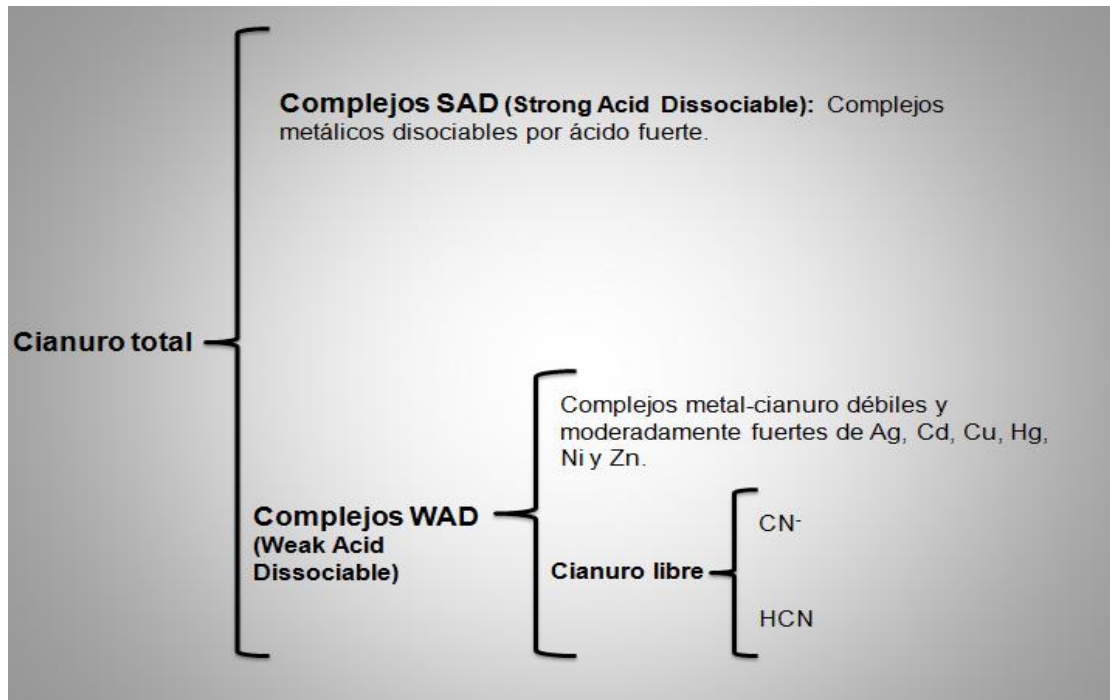
Las técnicas de biorremediación están divididas en tres categorías, *in situ*, *ex situ* en sólido, y *ex situ* en lodos líquidos. Las técnicas *ex situ* requieren de una excavación previa. Para seleccionar la tecnología apropiada entre las estrategias de biorremediación hay que basarse en tres principios fundamentales (Dua *et al.*, 2002):

- La sensibilidad del contaminante a la transformación biológica: Bioquímica.
- La accesibilidad de los contaminantes a los microorganismos: Biodisponibilidad.
- La optimización de la actividad biológica: Bioactividad.

### 3. EL CIANURO.

El cianuro es un anión monovalente que consiste en un átomo de carbono (C) unido con un enlace triple a un átomo de nitrógeno (N), que se representa con la fórmula  $\text{CN}^-$ . Se denominan compuestos cianurados a una amplia variedad de compuestos que contienen este grupo químico (Greenwood y Earnshaw, 1997). Los compuestos cianurados pueden ser tanto de origen natural como artificial. Las principales formas de cianuros fabricadas por el ser humano son el cianuro de hidrógeno (HCN), el cianuro de sodio (NaCN) y el de potasio (KCN). Todos estos productos son altamente tóxicos (Logsdon *et al.*, 2001). El cianuro puede ser letal si se ingiere o se inhala en cantidades suficientes, pero gracias al conocimiento de sus propiedades, y llevando a cabo los procesos adecuados de manipulación y una actitud responsable, se puede llevar a cabo un uso seguro y beneficioso del cianuro.

El cianuro se emplea fundamentalmente en procesos relacionados con la extracción y manipulación de metales, por lo que los residuos cianurados suelen contener mezclas complejas de cianuro y metales. Atendiendo a su composición y estabilidad los complejos metálicos cianurados se pueden clasificar de acuerdo con el esquema de la Figura 1.



**Figura 1. Clasificación de los cianuros (Botz, 2001).** Esta clasificación está basada en la estabilidad de los complejos frente al tratamiento con ácidos. La cantidad de cianuro total es la suma de la presente en complejos disociables por ácidos débiles (WAD), incluido el cianuro libre, más el cianuro que está formando complejos fuertes con metales como el hierro. El cianuro libre y los complejos cianurados WAD son las formas más tóxicas del cianuro.

### 3.1 Cianuro libre (los cianuros libres son las formas más tóxicas del cianuro, incluyendo el anión y el HCN).

Cianuro libre es el término utilizado para describir tanto el ión cianuro ( $\text{CN}^-$ ) como el HCN que se forma como resultado de la interacción del  $\text{CN}^-$  aniónico con el agua (Reacción 1). La concentración de cada una de las especies dependerá del pH. El HCN es un ácido muy débil encontrándose en el agua en equilibrio según la reacción:



*Relación entre HCN Y CN con el pH (Ma y Purnendu, 2010).*

Casi todo el cianuro libre está en forma de HCN por debajo de pH 8. En estas circunstancias el HCN, que es volátil, puede dispersarse en el aire.



Sin embargo, cuando el pH es superior a 10,5 casi todo el cianuro libre está presente como  $\text{CN}^-$ , en condiciones normales de temperatura y presión. La concentración de HCN y  $\text{CN}^-$  son iguales a un valor de pH de 9,22 ( $\text{pK}_a$ ). Estas formas de cianuro libre son importantes porque son las más tóxicas.

El cianuro de hidrógeno o ácido cianhídrico es un líquido incoloro o azul claro, o un gas con un ligero olor a almendras amargas. El ácido cianhídrico es soluble en agua y alcohol y está comercialmente disponible como gas o como líquido. El ácido fosfórico se añade al HCN líquido como un estabilizador para prevenir la descomposición y la explosión del mismo (ATSDR, 2006).

El cianuro sódico ( $\text{NaCN}$ ) es un polvo blanco cristalino con un ligero olor a almendras amargas. Comercialmente el  $\text{NaCN}$  está disponible con una pureza del 95-98%. La solución acuosa de cianuro sódico es fuertemente alcalina y se descompone rápidamente. El  $\text{NaCN}$  produce HCN en contacto con ácidos o sales.

El cianuro de potasio ( $\text{KCN}$ ) es un sólido deliquescente blanco con un olor similar al del cianuro de hidrógeno. El  $\text{KCN}$  está disponible comercialmente con un 95% de pureza. La solución acuosa de este compuesto es fuertemente alcalina. También produce HCN en contacto con ácidos y sales.

El cianuro cálcico  $\text{Ca}(\text{CN})_2$ , es un sólido blanco cristalino. La disolución acuosa de este compuesto libera gradualmente cianuro de hidrógeno. Los cianuros como por ejemplo, el cianuro sódico, el cianuro potásico, y cianuro cálcico forman fuertes complejos con muchos metales.

El cianógeno  $(\text{CN})_2$  es un gas tóxico incoloro con un olor a almendras amargas. El cianógeno es lentamente hidrolizado en solución acuosa, dando lugar a ácido oxálico y amonio.

### **3.2 Complejos de cianuro.**

El cianuro puede estar presente en el medioambiente en una gran variedad de formas, incluyendo HCN, sales (como  $\text{NaCN}$  o  $\text{KCN}$ ) y varios complejos de cianuro como el  $\text{Zn}(\text{CN})_2$  y ferricianuro potásico (Akcil, 2003;

Aksu *et al.*, 1999; Botz, 2001; Dubey y Holmes, 1995; Ebbs, 1999; Patil y Paknikar, 2000; Young y Jordan, 1995). Los cianuros no son retenidos ni adsorbidos de manera permanente por el suelo, con lo cual permanecen en la fase acuosa y a menudo forman complejos con otros contaminantes metálicos procedentes de diferentes vertidos industriales, tal como Fe, Cu, Ni y Zn.

Aunque el KCN y NaCN se disocian fácilmente a la forma  $\text{CN}^-$  y HCN a un pH neutro, los metal-complejos cianurados tienen un amplio rango de estabilidad química y biológica. Los complejos metálicos son clasificados en función de la fuerza de enlace entre el metal y el cianuro. Los disociables por ácidos débiles (WAD) se refieren a los complejos de cianuro con metales como cadmio, cobre, níquel y zinc, como ya aparece reflejado en la Figura 1. Aunque el tiocianato puede parecer un WAD (Botz, 2001; Young y Jordan, 1995), a menudo es considerado en su propia categoría. Los disociables por ácidos fuertes (SAD) se refieren a complejos de cianuro con metales como cobalto, oro, hierro y plata.

Los cianuros también existen como cianuros orgánicos en la forma de nitrilos como acrilonitrilo, propionitrilo, etc (Kao *et al.*, 2006). La mayoría de estos complejos son solubles en agua y de estabilidad variable, la velocidad a la cual los complejos se disocian y liberan cianuro libre en la solución depende de varios factores, entre ellos, la concentración inicial del complejo de cianuro, la temperatura, el pH de la solución y la intensidad de la luz, especialmente la radiación ultravioleta.

Se muestra una tabla con los complejos más relevantes del cianuro clasificados atendiendo a su estabilidad (Tabla 1).

La estabilidad extrema de los complejos fuertes del cianuro puede ser un problema para el tratamiento de los residuos que los contengan. Los complejos de hierro se disocian muy poco, aunque están sujetos a la fotólisis por luz natural (Dubey y Holmes, 1995).

**Tabla 1. Estabilidad de los complejos de cianuro en agua (Deschenes y Goo, 2005).**

<b>Estabilidad relativa de los complejos de cianuro en agua</b>		
<b>Términos</b>		<b>Ejemplos</b>
1. Cianuro libre		$\text{CN}^-$ , HCN
2. Compuestos simples		
a) Fácilmente solubles		$\text{NaCN}$ , $\text{KCN}$ , $\text{Ca}(\text{CN})_2$ , $\text{Hg}(\text{CN})_2$
b) Realmente insolubles		$\text{Zn}(\text{CN})_2$ , $\text{CuCN}$ , $\text{Ni}(\text{CN})_2$ , $\text{AgCN}$
3. Complejos débiles (fáciles de ionizar)		$\text{Zn}(\text{CN})_4^{2-}$ , $\text{Cd}(\text{CN})_3^-$ , $\text{Cd}(\text{CN})_4^{2-}$
4. Complejos moderadamente fuertes (moderadamente ionizables)		$\text{Cu}(\text{CN})_2^-$ , $\text{Cu}(\text{CN})_3^{2-}$ , $\text{Ni}(\text{CN})_4^{2-}$ , $\text{Ag}(\text{CN})_2^-$
5. Complejos fuertes (muy estables)		$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ , $\text{Co}(\text{CN})_6^{4-}$ , $\text{Au}(\text{CN})_2^-$
6. Inorgánicos (inestables)		$\text{SCN}^-$ , $\text{CNO}^-$
7. Orgánicos (Nitrilos)	Alifáticos	Acetonitrilo, Acilonitrilo, Adiponitrilo, Propionitrilo
Orgánicos (Nitrilos).	Aromáticos	Benzonitrilo.

### 3.3 Métodos analíticos en la determinación de la concentración de cianuro.

Los cianuros en el medio ambiente son normalmente recogidos en disolución de hidróxido de sodio o potasio y medidos por espectrofotometría (Agrawal *et al.*, 1991), por colorimetría, mediante electrodo ión-específico, o por cromatografía de gases espacio cabeza con un detector específico de nitrógeno o un detector de captura electrónica (Maseda *et al.*, 1989; Seto *et al.*, 1993). El cianuro procedente de matrices acuosas es normalmente medido por colorimetría (US EPA. Methods for chemical analysis of water and waste, 1983), o métodos electroquímicos después del pretratamiento para producir cianuro de hidrógeno y absorción en disolución de hidróxido de sodio.

El cianuro total incluye todo el cianuro disponible en una muestra, en el agua potable este cianuro se mide por colorimetría semi-automática, además de por electrodo selectivo, espectrofotometría ultravioleta, y cromatografía iónica (US EPA. Methods for the determination of inorganic substances in environmental samples, 1993a).

El análisis de WAD (usados principalmente por la industria minera de metales preciosos), principalmente de cobre, cadmio, níquel, zinc, plata y complejos de estaño, y otros con constantes de disociación, bajas y similares, pueden ser determinados en los residuos de agua por intercambio de ligando o por inyección de flujo (US EPA. Draft Method 1677. Ligand exchange/flow injection/amperometric technique for cyanide analysis, 1997; Milosavljevic *et al.*, 1995).

La técnica cromatográfica con detección de fluorescencia es usada para detectar cantidades de trazas de cianuro en células sanguíneas (Chinaka *et al.*, 1998). El cianuro en tejidos biológicos y fluidos se puede determinar espectrofotométricamente después de la reacción con metahemoglobina. El tiosulfato de sodio puede interferir en análisis colorimétrico o potenciométricos (Sylvester *et al.*, 1982). Los límites de detección en los diferentes métodos para el cianuro de hidrógeno abarcan de 0,8 a 400 mg/m<sup>3</sup> para muestras de aire, de 0,04 a 200 µg/litro para muestras acuosas, y de 0,8 a 300 µg/litro para muestras biológicas.

### **3.4 Usos industriales del cianuro.**

Desde su introducción comercial en Nueva Zelanda hace aproximadamente un siglo, el cianuro ha sido usado en todo el mundo en la extracción de oro y plata. En el año 2000, había alrededor de 875 explotaciones de oro y plata en el mundo, de las cuales aproximadamente 500 eran productoras importantes (Mudder y Botz, 2004). La producción de HCN anual en todo el mundo es de 1.100.000 toneladas de cianuro de hidrógeno (HCN). De toda esta producción, solo el 6% es utilizado en la síntesis de NaCN para su posterior uso en la minería (Chemical Market Reporter, 1998). El 94%

restante es usado en otras industrias. Casi el 50% del total del HCN sintetizado es utilizado en la síntesis de adiponitrilo, que es un precursor orgánico del nylon.

La demanda anual de cianuro sódico en el mundo es de 360000 toneladas por año de las cuales 120000, o lo que es lo mismo, un tercio de la producción, es empleado en la extracción de oro y plata.

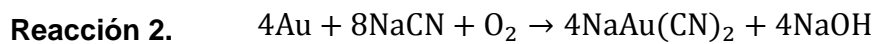
La minería es una actividad industrial que utiliza una cantidad significativa de cianuro. La solución de cianuro se ha utilizado principalmente para extraer oro y plata de los minerales, que de otro modo no podrían extraerse eficazmente. Además, el cianuro se utiliza en bajas concentraciones como un reactivo de flotación para ayudar a la recuperación de metales como plomo, cobre y zinc (Logsdon *et al.*, 2001).

Debido a que los elementos por los que está compuesto el cianuro son muy comunes, y a su alta reactividad, éste es dedicado a la producción de químicos orgánicos como el nitrilo, el nylon y los plásticos acrílicos. Otras aplicaciones industriales incluyen la galvanoplastia, el procesamiento de metales, el endurecimiento del acero, las aplicaciones fotográficas y la producción de goma sintética.

Los cianuros de hierro se utilizan con frecuencia como aditivo antiaglutinante en la sal utilizada para fundir el hielo en los caminos, aunque ya no es muy recomendable su aplicación debido a que el cianuro es muy contaminante para el ambiente. El HCN gaseoso se ha utilizado ampliamente para exterminar a los roedores y depredadores grandes; y, en la práctica hortícola, para controlar las plagas de insectos que han desarrollado resistencia a otros pesticidas. Además, el cianuro se utiliza en productos farmacéuticos como el laetril, sustancia para combatir el cáncer, y el nitroprusiato, una droga para reducir la presión arterial. Los compuestos de cianuro también se utilizan en vendas quirúrgicas, ya que promueven la cicatrización. La producción de cianuro restante se utiliza para fabricar cianuro de sodio, una forma de cianuro cuyo manejo es relativamente fácil y seguro. Más del 90% de la recuperación

de oro en el mundo se basa en la utilización de cianuro y aunque hay minas de oro y plata en todo el mundo, la producción se está concentrando cada vez más en América del Sur y Australia, en minas a cielo abierto y lixiviación en pila.

Por sus características químicas este compuesto es capaz, en condiciones ligeramente oxidantes, de disolver el oro contenido en el mineral. El proceso de disolución de metales se denomina lixiviación, mientras que la disolución de oro por cianuro se denomina específicamente cianuración. Este proceso se describe mediante la ecuación de Elsner (Mudder *et al.*, 2001) (Reacción 2):



Una vez disuelto, el oro es recuperado de la disolución por precipitación con 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.

Concretamente en España, la contaminación por cianuro se debe de manera importante a la industria joyera, que utiliza el cianuro en los sistemas de limpieza de metales preciosos como el oro y en los baños electrolíticos (Gallagher y Manoil, 2001).

Además de en todas estas fuentes, se puede decir que en el día a día, estamos constantemente rodeados de cianuro con un origen antropogénico, como el humo del tabaco, emisiones de coches o el asfalto y hasta la sal de mesa contiene algo de cianuro (Logsdon *et al.*, 2001).

El cianuro es producido industrialmente de dos formas: como subproducto en la síntesis de plásticos o fibras acrílicas, o por combinación de gas natural y amonio a altas temperaturas y presiones para producir HCN gas. Posteriormente, el HCN gas puede ser combinado con NaOH para producir

NaCN y agua en exceso, eliminando la sobrante por secado y filtración (Logsdon *et al.*, 2001).

Los tres mayores productores de CN sólido, líquido y gas en el mundo son, las empresas Dupont, en los Estados Unidos, ICI en Inglaterra, y Degussa en Alemania.

Según las estimaciones de la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades del gobierno de los Estados Unidos (ATSDR) se cifran en 14 millones de kg la cantidad de cianuro liberada al medio ambiente en todo el mundo (ATSDR, 2006).

Una de las amenazas mayores que representa el uso de cianuro en las industrias, viene de riesgos de grandes accidentes. Entre los desastres más graves de contaminación en el mundo podemos destacar por orden cronológico, los indicados en la Tabla 2.

**Tabla 2. Principales accidentes con cianuro en las últimas décadas (Environmental and Safety Incidents concerning Tailings Dams at Mines, 1996; Tailings Dam Incidents, 1994; Tailings Dams - Risk of Dangerous Occurrences, 2001).**

Fecha	Lugar	Tipo y cantidades de contaminantes	Consecuencias
1991	Mochikoshi, Japón	Rebase de una represa. 39000 m <sup>3</sup> de desechos cargados de cianuro	
22/02/1994	África del Sur	Colapso de una represa después de lluvias fuertes, 600000 m <sup>3</sup>	Los residuos viajaron 4 Km aguas abajo, 17 personas murieron.
11-14/03/1995	E.E.U.U	Derrame de 26.5 millones de litros de solución de cianuro con una concentración de 0.2 mg por litro.	
1995	Guyana	Colapso de una presa de residuos sólidos. 4.2 millones de m <sup>3</sup> de desechos cargados de cianuro	Afectó a un río hasta 80 Km aguas abajo de la mina
1995	Australia	Rebase de una represa. 5000 m <sup>3</sup> de aguas cargadas de cianuro	
1997	Nevada, E.E.U.U	Después del colapso de una pila de lixiviación, derrame de 1000 m <sup>3</sup> de solución cianurada	

**Tabla 2. Continuación**

Fecha	Lugar	Tipo y cantidades de contaminantes	Consecuencias
29/05/1998	Dakota, EEUU	Explosión de una tubería. Toneladas cargadas de cianuro.	
26/04/1999	Filipinas	Derrame de residuos de tratamiento de un tubo de cemento dañado. 700000 toneladas de residuos cianurados.	
2000	Papúa Nueva Guinea	Accidente de transporte. 150 kg de cianuro de sodio sólido	
30/01/2000	Baia Mare, Rumania	Colapso de una represa después de fuertes lluvias, 100000 m <sup>3</sup> de derrame de una solución contaminada con cianuro	Contaminación del río Somes, afluente del río Tisza. 1200 toneladas de peces muertos. 2 millones de personas sin agua potable.
23/10/2004	Ghana, Dumase	Derrame de cianuro desde un dique de colas	Centenares de ríos muertos
30/04/2006	China	Colapso de una presa de residuos. Derrame de cianuro de potasio en el río Huashui	Contaminado el río 5 km abajo
16/06/2006	Dumase, dos años más tarde	De nuevo, derrame desde un dique de colas.	
29/08/2009	Rusia	Colapso de un dique después de lluvias	Al menos un muerto.
1995	Guyana	Colapso de una presa de residuos sólidos. 4.2 millones de m <sup>3</sup> de desechos cargados de cianuro	Afectó a un río hasta 80 Km aguas abajo de la mina

### 3.5 Otras fuentes de cianuro.

Se conocen más de 2000 fuentes naturales de cianuro con un grado de complejidad y toxicidad variable (Logsdon *et al.*, 2001). Producen cianuro distintas especies de artrópodos, insectos, bacterias, algas, hongos y, sobre todo, plantas superiores (Dash *et al.*, 2009). En el reino animal lo producen mariposas, ciempiés y escarabajos (Department of Interior U.S., 2001; Dubey y



Holmes, 1995). Como consecuencia de su origen natural, el cianuro también se encuentra presente en algunos alimentos (judías, almendras, manzana), pero la fuente que más cianuro aporta al medioambiente son los residuos industriales (Mooney y Quin, 1965). El cianuro existe en forma de glucósidos cianogénicos en al menos 2000 plantas (Tabla 3).

Entre los residuos industriales incluidos como fuentes antropogénicas más importantes de cianuro están los procedentes de industrias dedicadas principalmente al procesado y limpieza de metales, fabricación de automóviles, minería, fotografía, farmacéuticas, industrias del carbón, de plástico, etc. (Aksu *et al.*, 1999; Patil y Paknikar, 2000). Por ejemplo los residuos procedentes de industrias de galvanoplastia contienen entre el 0,5% 20% de cianuro en peso (Watson, 1973). Las aguas residuales industriales generalmente contienen entre 0,01 y 10 mg/L de cianuro total (Ganczarczyk *et al.*, 1985; Wild *et al.*, 1994). Sin embargo, algunos residuos cianurados de operaciones de acabados de metales pueden permanecer almacenados durante años, después de los cuales la concentración se puede elevar hasta 10000-30000 mg/L de cianuro por litro de residuo líquido (Ganczarczyk *et al.*, 1985; Wild *et al.*, 1994).

Respecto a las formas de cianuro encontradas en las aguas residuales, predominan normalmente las formas complejadas con metales. Además, el tiocianato (SCN) suele ser uno de los complejos de cianuro más importantes presentes en los residuos industriales. El tiocianato se encuentra sobre todo en industrias del carbón e industrias farmacéuticas con rangos entre 10-1500 mg/L y 11-50 mg CN<sup>-</sup>/L, respectivamente (Kelada, 1989; Luthy y Bruce, 1979). El HCN y otros compuestos volátiles que contienen cianuro se encuentran en el aire como resultado de las emisiones de plantas de galvanoplastia y fumigación de edificios y barcos. La combustión incompleta de sustancias que contienen nitrógeno de operaciones de procesado químico también contribuyen a la presencia de cianuro en el aire (Katz, 1968). A continuación se muestra una tabla resumen con las fuentes naturales y antropogénicas más significativas del cianuro (Tabla 3).

**Tabla 3. Fuentes naturales y fuentes artificiales del cianuro.** Entre las fuentes naturales están los principales organismos productores de cianuro, y en las fuentes artificiales las principales industrias donde se generan grandes cantidades de cianuro.

Fuentes naturales	Fuentes artificiales
<b>Bacterias cianogénicas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Chromobacterium violaceum</i></li> <li>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i></li> <li>• <i>Pseudomonas chloraphis</i></li> <li>• <i>Pseudomonas fluorescens</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Industrias de galvanoplastia.</li> <li>• Plantas de tratamiento de carbón.</li> <li>• Industrias de gas.</li> <li>• Industrias productoras de fibra sintética.</li> <li>• Operaciones de metalurgia y limpieza metálica.</li> <li>• Recuperación de metales preciosos.</li> <li>• Industrias farmacéuticas.</li> <li>• Industrias de pinturas.</li> </ul>
<b>Algas cianogénicas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Chlorella vulgaris</i></li> <li>• <i>Nostoc muscorum</i></li> <li>• <i>Plectonema boryanum</i></li> <li>• <i>Anacystis nidulans</i></li> </ul>	
<b>Hongos patógenos generadores de cianuro:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Marasmius oreades</i></li> <li>• <i>Stemphyllium loti</i></li> <li>• <i>Gloeocercospora sorghii</i></li> </ul>	
<b>Cultivos cianogénicos:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Almendras</li> <li>• Manzana</li> <li>• Vainas de lima</li> <li>• Mandioca</li> <li>• Nísperos</li> </ul>	

### 3.6 Eliminación del cianuro.

Los residuos industriales contaminados por cianuro deben ser tratados previamente a su liberación al medio ambiente, existiendo unos límites máximos de concentración en muchos países y agencias de protección del medio ambiente. Por ejemplo, la agencia de protección del medio ambiente de Estados Unidos (USEPA) ha establecido en agua apta para consumo unos niveles máximos de 200 ppb de cianuro total, que se refiere al cianuro libre y a los complejos metálicos del mismo (Dash *et al.*, 2008; US EPA. Drinkingwater criteria document for cyanide, 1985).

La mayoría de los procesos de destrucción de cianuro operan basándose en el principio de convertir el cianuro en uno o varios productos menos tóxicos. Los principales métodos para el tratamiento de efluentes contaminados con cianuro son técnicas de oxidación química (Dash *et al.*, 2009). A continuación se pasan a discutir los procesos químicos más importantes basados en la eliminación del cianuro (Mudder y Smith, 2001):

Debido a la peligrosidad del cianuro, las aguas contaminadas con este compuesto pueden ser tratadas por **cloración alcalina** (Patil y Paknikar, 2000; Young y Jordan, 1995) que consiste en el tratamiento del residuo con cloro o hipoclorito para producir cloruro de cianógeno, el cual reacciona para dar lugar a una forma menos tóxica que es el cianato sódico. Posteriormente, la cloración oxida el cianato a dióxido de carbono y nitrógeno molecular (Wild *et al.*, 1994). El método presenta ciertos inconvenientes, como la baja efectividad sobre algunos complejos cianurados de metales como níquel, plata, etc, debido a las bajas velocidades de reacción, es decir, esta técnica es sólo efectiva para el cianuro libre y para complejos metálicos débiles. Además es un proceso relativamente caro debido a la cantidad de cloro requerida (Patil y Paknikar, 2000).

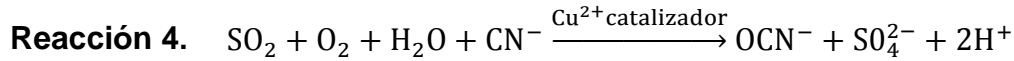


Este proceso puede también oxidar tiocianato y amonio a nitrógeno gas.

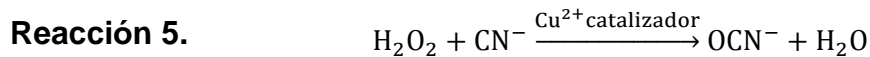
Entre los diversos métodos de oxidación para el tratamiento de residuos cianurados están:

- **Aire/Dióxido de azufre:**

Este proceso fue desarrollado por INCO en la década de los ochenta. El proceso utiliza  $\text{SO}_2$  o un derivado y aire en presencia de un catalizador de cobre soluble, para oxidar cianuro a un cianato, que es menos tóxico ( $\text{OCN}^-$ ):



- **Oxidación con peróxido de hidrógeno catalizado por cobre (kitisa et al., 2005):** La química del proceso del tratamiento con peróxido de hidrógeno es muy similar al descrito por el proceso INCO, pero este método es más utilizado que el anterior. Con este proceso, donde es requerido el cobre soluble como catalizador, el producto final de la reacción es el cianato:



Este proceso principalmente se aplica a disoluciones líquidas, ya que en desechos sólidos el consumo de peróxido de hidrógeno es muy elevado. Es un proceso que puede llevarse a cabo en un amplio rango de pH, además las aguas residuales obtenidas no son perjudiciales para el medio ambiente.

Otros métodos utilizados son:

- **Ozonización (Parga et al., 2003).** El ozono es una nueva alternativa para la eliminación del cianuro. Su principal ventaja es que es un proceso muy rápido que consigue la descomposición completa de cianuros, cianatos, y tiocianatos. La primera reacción de soluciones acuosas de cianuro libera oxígeno molecular que puede continuar el proceso de oxidación de cianuro.

- **Descomposición electrolítica (Kowalska et al., 1998; Parga et al., 2003; Wild et al., 1994; Young y Jordan, 1995).** Este proceso funciona por la combinación de la luz solar y un catalizador semiconductor, que normalmente es el dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ). Cuando el catalizador es expuesto a la luz solar, este absorbe gran cantidad de energía, formándose el radical hidroxilo. Estos radicales son oxidantes que rompen los enlaces del cianuro obteniéndose como primer producto el cianato ( $\text{CON}^-$ ) (Augugliaro et al., 1999).

El principal objetivo en cualquiera de los métodos es conseguir la máxima eficiencia con los mínimos costes, y los procesos físico-químicos en la

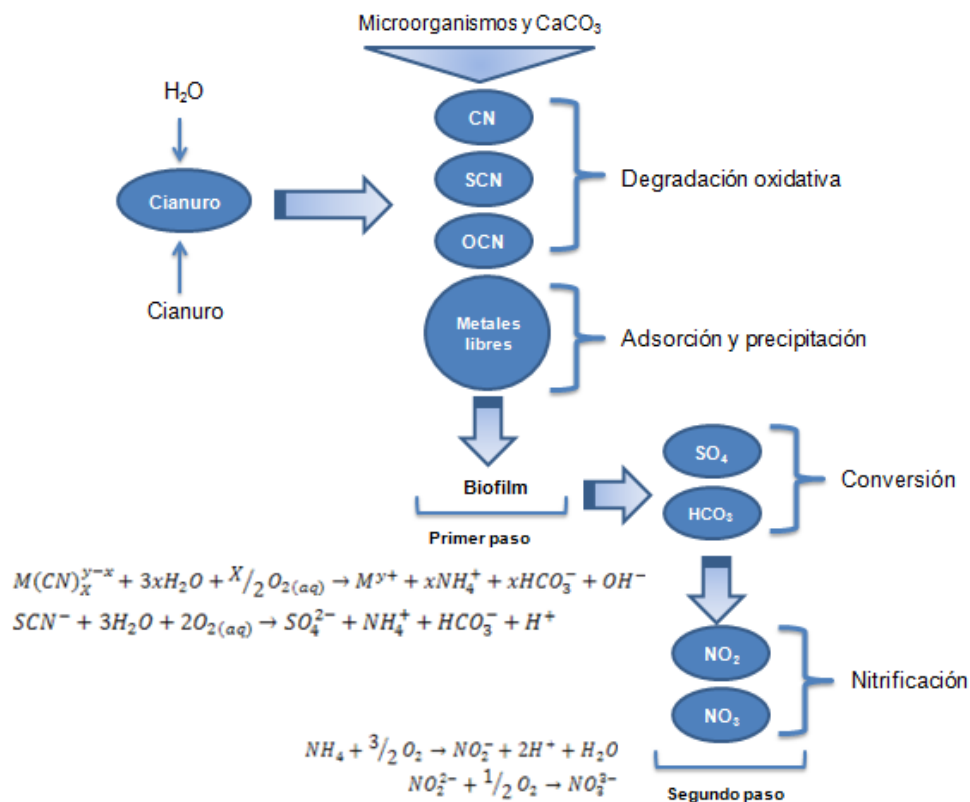
mayoría de las ocasiones no lo son, por ello, una alternativa a estos procesos es el tratamiento biológico, que puede ser más barato y respetuoso con el medioambiente (Dash *et al.*, 2008).

### **3.7 Rutas de biodegradación de cianuro y nitrilos.**

La biodegradación de cianuro procedente de las industrias mineras, ha sido ampliamente descrita (Mudder y Smith, 2001). En el tratamiento biológico del cianuro las bacterias convierten el cianuro libre, y los complejos metálicos de éste, en bicarbonato y amonio. Los metales liberados son adsorbidos sobre biofilm o precipitados desde la disolución. La facilidad con la que se degradan los complejos metálicos de cianuro es directamente proporcional a la estabilidad del complejo. Los complejos de hierro son los más difíciles de degradar (Akcil, 2003).

El primer paso en el tratamiento biológico de cianuro procedente de las industrias mineras es la descomposición oxidativa de cianuro y tiocianato, y la posterior adsorción y precipitación de metales libres en el biofilm, como ya se ha indicado anteriormente. El cianuro y el tiocianato son degradados a una combinación de amonio, carbonato y sulfato. El segundo paso convierte el amonio a nitrato a través del proceso de nitrificación convencional en dos pasos, con nitrito como intermediario. Varias especies de *Pseudomonas* son las responsables de la oxidación completa de cianuro, tiocianato y amonio (Akcil, 2003). En la Figura 2, se muestra un esquema del proceso de biotratamiento aeróbico.

Los tratamientos biológicos son los más eficientes en cuanto a costes para la eliminación de cianuro. El reactor conteniendo las bacterias debe ser expuesto a condiciones aeróbicas para la nitrificación y posteriormente a condiciones anóxicas para la desnitrificación. Durante la nitrificación, el amonio se oxida primero al intermediario nitrito lentamente y posteriormente rápidamente a nitrato. En la desnitrificación el nitrato es reducido a nitrógeno gas resultando la eliminación completa del nitrógeno de la solución inicialmente tratada.



**Figura 2. Esquema representativo de la biodegradación aeróbica.** El proceso está basado en varias etapas. El primer paso en el tratamiento biológico del cianuro producido en la minería es la descomposición oxidativa de cianuro y tiocianato, y la posterior adsorción y precipitación de metales libres en el biofilm. El cianuro y el tiocianato son degradados a una combinación de amonio, carbonato y sulfato. El segundo paso convierte el amonio a nitrato a través del proceso de nitrificación convencional en dos pasos, con nitrito como intermediario.

El tiocianato (SCN<sup>-</sup>), encontrado principalmente en el agua decantada, se forma como resultado de la reacción del cianuro libre con varias especies reducidas de azufre presentes en los minerales (pirita).

Constantemente son aislados nuevos organismos con capacidad de biodegradación de cianuro y se describen nuevas rutas (Baxter y Cummings, 2006; Ebbs, 2004). Hay 4 rutas generales para la biodegradación de cianuro (Raybuck, 1992): hidrolítica, oxidativa, reductiva y de sustitución/transferencia (Ebbs, 2004):

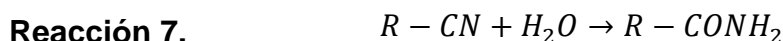
- **Reacciones hidrolíticas:**

Consisten en la adición de agua. Son catalizadas por algunas enzimas como, la cianuro hidratasa, la cianidasa, la nitrilo hidratasa, y la nitrilasa (Baxter y Cummings, 2006; Dubey y Holmes, 1995; Ebbs, 2004). Las dos primeras actúan sobre el HCN mientras que las otras dos actúan sobre los nitrilos. Estas enzimas degradan los compuestos cianurados a través de diferentes reacciones que se muestran a continuación (Desai y Ramakrishna, 1998; Ebbs, 2004):

- *Cianuro hidratasa:*



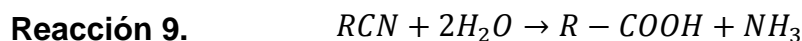
- *Nitrilo hidratasa:*



- *Cianidasa:*



- *Nitrilasa:*

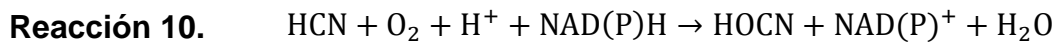


En muchos hongos patógenos y plantas cianogénicas, la actividad cianuro hidratasa es inducida a bajas concentraciones de cianuro, tal y como se ha descrito en *Stemphylium loti* y *Gloeocercospora sorghi* (Desai y Ramakrishna, 1998). Es sabido que la biodegradación de los cianuros orgánicos (nitrilos) es llevada a cabo por la enzima nitrilasa o nitrilo hidratasa junto con la amilasa (Desai y Ramakrishna, 1998). Las nitrilasas y las nitrilo hidratasas convierten los nitrilos alifáticos y aromáticos al correspondiente ácido o amida, respectivamente, pero muestran menos especificidad de sustrato que la cianuro hidratasa y la cianidasa (Ebbs, 2004).

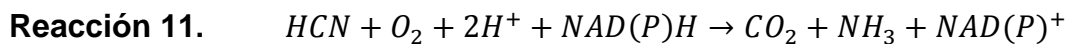
- **Reacciones oxidativas.**

Las reacciones oxidativas para la biodegradación de cianuro forman amonio y dióxido de carbono. La cianuro monoxigenasa (Ebbs, 2004; Raybuck, 1992) convierte cianuro a cianato. El cianato es sustrato de la cianasa resultando la conversión final a dióxido de carbono y amonio. Las cianasas han sido identificadas en muchas bacterias, hongos, plantas y animales. Hay otro patrón oxidativo que utiliza la dioxigenasa para formar amonio y dióxido de carbono directamente (Ebbs, 2004).

*Cianuro monoxigenasa*



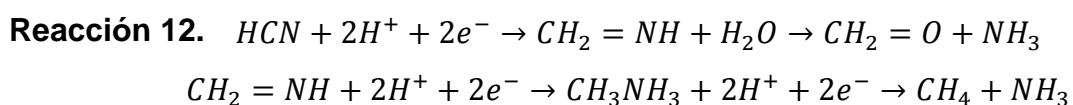
*Cianuro dioxigenasa*



Varias especies de *Pseudomonas* son responsables de la oxidación completa de cianuro y tiocianato (Dubey y Holmes, 1995; Ebbs, 2004). *Pseudomonas fluorescencens* NCIMB11764 utiliza el cianuro como fuente de nitrógeno para su crecimiento y cataliza la conversión de HCN con el consumo de un mol de oxígeno por mol de cianuro y NADH O NAD(P)H, usando la enzima cianuro oxigenasa (Desai y Ramakrishna, 1998).

- **Reacciones reductivas**

No son muy comunes y las enzimas requeridas en esta ruta son encontradas en especies raras. Estas reacciones siguen un mecanismo en dos pasos (Raybuck, 1992) resultando la formación final de metano y amonio (Ebbs, 2004; Desai y Ramakrishna, 1998).

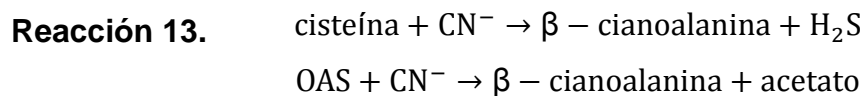




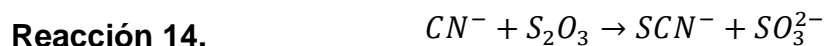
- **Reacciones de transferencia/ sustitución**

El cianuro puede ser transformado en  $\beta$ -cianoalanina (Raybuck, 1992) o  $\alpha$ -aminonitrilo, catalizado por  $\beta$ -cianoalanina sintasa, seguido por la hidrólisis de los productos que dan lugar a amoníaco y a un ácido. Durante este proceso no hay necesidad directa de  $O_2$  o NAD(P)H, ni tampoco es liberado  $CO_2$ .

*Cianoalanina sintasa*



*Tiosulfato: cianuro sulfotransferasa*



### 3.8 Toxicidad del cianuro.

Hay al menos tres mecanismos conocidos de toxicidad del cianuro (Solomonson, 1981):

- Formación de complejos de cianuro con metales di- o trivalentes presentes en el sitio activo de metalo-enzimas, como por ejemplo la citocromo oxidasa.
- Formación de intermediarios con bases de Schiff durante la catálisis enzimática para formar nitrilos derivados estables.
- Formación de cianohidrinas con grupos ceto de intermediarios metabólicos.

El ión  $CN^-$  es un potente inhibidor de crecimiento y metabolismo celular, incluyendo la respiración y los metabolismos de nitrógeno y fosfato (Knowles, 1976; Knowles y Bunch, 1986; Solomonson, 1981); altera la morfología de *Bacillus pumillus* (Skowronski y Strobel, 1969), aumenta el tiempo de generación de *Escherichia coli* (Ashcroft y Haddock, 1975), altera la movilidad de *Spirillum oolufans* (Bowdre y Krieg, 1974) y causa mutaciones en

*Neurospora crassa* (Bergquist *et al.*, 1974). También inhibe la citocromo oxidasa mitocondrial, la catalasa, la peroxidasa, la tirosinasa, la oxidasa del ácido ascórbico y la fosfatasa. Por ejemplo, la citocromo oxidasa es completamente inhibida por 33 nM de cianuro (DiPalma, 1971). Normalmente el cianuro inhibe la actividad enzimática por unirse a cofactores metálicos en metaloenzimas (Fasset *et al.*, 1963).

Los cianuros son tóxicos para un amplio rango de microorganismos, incluyendo hongos, bacterias y algas. Por ejemplo, *Microregma heterostoma* (protozoo) y *Scenedesmus quadricauda* (alga verde) son ambos altamente sensibles al cianuro, teniendo los umbrales de toxicidad entre 0,04 y 0,16 µg cianuro/ ml, respectivamente (Becker y Thatcher, 1973).

### **3.9 Legislación europea respecto al uso del cianuro en las industrias mineras.**

El parlamento Europeo llevó a cabo una resolución el día 5 de mayo de 2010 sobre la prohibición general del uso de las tecnologías mineras a base de cianuro en la Unión Europea (2011/C 81 E/13). Se presentó de conformidad con el artículo 115, apartado 5, y el artículo 110, apartado 2, del 17 de marzo de 2010 sobre la pregunta a la Comisión sobre la prohibición del uso de las tecnologías mineras a base de cianuro en la UE (O-0035/2010-B7-0206/2010). Considerando que, en la posición común de los ministros de medio ambiente de la República Checa, Hungría, Polonia y Eslovaquia sobre minería sostenible, emitida en la 14ª reunión de los Ministros de Medio Ambiente del grupo de Visegrado celebrada el 25 de mayo de 2007 en Praga (República Checa), estos manifestaron su preocupación por las tecnologías peligrosas utilizadas y previstas para las actividades mineras en diversas zonas de la región que entrañan riesgos medioambientales considerables con posibles consecuencias transfronterizas. Considerando que los efectos transfronterizos de los accidentes con cianuro, en particular con respecto a la contaminación de grandes cuencas hidrográficas y de aguas subterráneas, subrayan la necesidad de adoptar un enfoque común a escala de la Unión Europea frente a la grave amenaza medioambiental que supone el uso de cianuro en la minería.

Los eurodiputados dictaron una resolución que cuestiona la extracción de minerales utilizando cianuro. Advirtieron sobre los riesgos sobre la salud y el ambiente. Y pidieron la “prohibición total” de su uso en los 27 Estados miembros. Se aseguró que la minería no creaba empleo real ni duradero, además de poner de manifiesto que es una industria insegura (hubo accidentes y los seguirá habiendo, ya que en los últimos 25 años ha habido más de 30), se destacó que tanto la salud humana como el medio ambiente corren peligro y se remarcó que la minería en base a cianuro pone en riesgo las fuentes de agua y la biodiversidad. La resolución fue aprobada con 488 votos a favor, 57 abstenciones y 48 votos en contra, que coincide con las demandas que desde hace décadas realizan asambleas vecinales de pueblos de Argentina. En la resolución también se remarca la necesidad de que los 27 Estados miembros no presten apoyo “de forma directa o indirecta” a ningún proyecto minero que emplea cianuro, tanto dentro como fuera de Europa. Solicita que los gobiernos promuevan la reconversión industrial de las zonas mineras facilitando apoyo financiero para la implementación de industrias alternativas, ecológicas, como la generación de energías renovables y el turismo. El cianuro en minería es un recurso económico y efectivo para la separación de los metales (oro y plata, entre otros) de la roca. El método técnico se llama “lixiviación” (tratar una sustancia sólida con disolventes para separar sus partes) y las empresas eluden suministrar datos reales de las cantidades de cianuro utilizadas. El método de lixiviación, el más usado en la minería metalífera a gran escala, también emplea enormes cantidades de agua, que es contaminada e irrecuperable. Se Pidió a la Comisión que impusiese una prohibición total del uso de tecnologías mineras a base de cianuro en la Unión Europea antes de que finalizara 2011.

#### 4. PSEUDOMONAS.

El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia *Pseudomonaceae*, que se sitúa dentro del orden Pseudomonales. Se cree que el género fue presentado por primera vez en 1985 por Walter Migula en el *Bacteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe* en una publicación que llevaba por título “*Ueber ein neues System der Bakterien*” (Migula, 1985), donde describía y comparaba todas las bacterias conocidas hasta el momento. La descripción inicial de *Pseudomonas* por Migula estaba basada únicamente en características morfológicas, y hasta los años 60 la clasificación de bacterias se llevaba a cabo teniendo en cuenta solo estos aspectos (Palleroni, 2003).

El desarrollo de técnicas como la hibridación de DNA/DNA o rRNA/DNA permitió una clara clasificación de las especies de *Pseudomonas* (Palleroni *et al.*, 1972). Basándose en la secuenciación comparativa del RNA ribosómico, las *Pseudomonas* son clasificadas dentro del *phylum* proteobacterias, que a su vez se divide en 5 grupos denominados mediante letras griegas: alfa, beta, gamma, delta y épsilon, y el género *Pseudomonas* se encuadra dentro de las 16S gamma (Kerstens *et al.*, 1996). Atendiendo a la homología en el rRNA, hay 5 grupos taxonómicos diferentes de *Pseudomonas* (Anzai *et al.*, 2000; Bergey *et al.*, 2005; Palleroni *et al.*, 1973). Son catalasas positivas y pueden ser oxidasas negativas o positivas.

Las *Pseudomonas* son bacterias Gram negativas, aeróbicas, móviles, con uno o más flagelos polares, que no forman esporas y tienen forma de bastoncillo (Starr, 1983). Es un género capaz de utilizar un amplio rango de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, y capaces de vivir bajo muy diversas condiciones ambientales, de ahí que podamos encontrarlos en ecosistemas terrestres y acuáticos y, son importantes como patógenos de plantas, animales y humanos (Palleroni, 1992; Schroth y Hildbrand, 1992), además de promover el crecimiento de ciertas plantas (Rothmel, 1991). Este grupo de bacterias se caracteriza por su extrema versatilidad metabólica (Palleroni, 1992; Stainer, 1966). Entre los compuestos orgánicos que son capaces de metabolizar se encuentran hidratos de carbono, ácidos alifáticos,

aminas, amidas, aminoácidos, compuestos aromáticos y alcoholes. Presentan un tipo de metabolismo respiratorio, con oxígeno como aceptor final de electrones aunque en algunos casos el nitrato puede ser usado como aceptor alternativo de electrones, permitiendo el crecimiento anaerobio (Mena y Gerba, 2009).

Algunas *Pseudomonas* son productoras de polihidroxicanoatos [PHA's] bajo condiciones limitadas en la fuente de nitrógeno y exceso en la fuente de carbono (Haywood *et al.*, 1990; Steinbüchel y Fächtenbusch, 1998; Timm y Steinbüchel, 1990). Como los PHA's son biomateriales que se caracterizan por ser biocompatibles y biodegradables, esto les confiere un gran potencial industrial como sustitutos de los plásticos sintéticos y un amplio espectro en aplicaciones biotecnológicas (Lee, 1996; Madison y Huisman, 1999). Hay patógenos oportunistas como *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.*, 2000) y *P. entomophila* L48 (Vodovar *et al.*, 2006), un patógeno vegetal como *P. syringae* (Buell *et al.*, 2003) y bacterias inocuas como *P. putida* KT2440 y *P. fluorescens* pf-15 (Paulsen *et al.*, 2005). Las cepas virulentas y no virulentas comparten propiedades tales como adhesión y biosíntesis de polímero, adhesinas, proteínas relacionadas con el estrés, etc (Nelson *et al.*, 2002). La cepa JLR11 de *P. putida*, puede utilizar el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como aceptor alternativo de electrones (Esteve-Nunez *et al.*, 2000).

El genoma de *P. aeruginosa* PAO1 fue el primer genoma secuenciado del género *Pseudomonas* (Stover *et al.*, 2000); es una bacteria que causa infecciones en amplia variedad de hospedadores, incluyendo insectos, plantas y animales. Las infecciones pueden ser de corta duración y superficiales como ocurre en pacientes con fibrosis quística (Lee *et al.*, 2006).

*P. syringae* es un organismo fitopatógeno. Las cepas de esta especie se caracterizan por su diversidad y capacidad para infectar diferentes especies de plantas (Jamir *et al.*, 2004).

*Pseudomonas fluorescens* es una rizobacteria que promueve el crecimiento de plantas y protege las raíces de algunas especies de plantas (Paulsen *et al.*, 2005).

Las *Pseudomonas* poseen múltiples plásmidos y transposones conjugativos que codifican genes necesarios para el metabolismo de hidrocarburos y resistencia a agentes nocivos; de ahí su interés en biotecnología (Dejonghe *et al.*, 2001; Ramos *et al.*, 1994), mejora en la calidad de combustibles (Galan, 2000), producción de bioplásticos (Olivera *et al.*, 2001) y agentes para fomentar el crecimiento de plantas y control de plagas (Walsh *et al.*, 2001).

#### **4.1 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344.**

La bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 presenta la capacidad de crecer en medio mínimo con cianuro como única fuente de nitrógeno, usando acetato y otros compuestos como fuente de carbono. Fue clasificada como tal comparando la secuencia del gen 16S RNA con el de otras bacterias. La bacteria se aisló por enriquecimiento selectivo, con cianuro como única fuente de nitrógeno, utilizando como inóculo lodo procedente de la margen izquierda del río Guadalquivir tras su paso por Córdoba (Luque-Almagro *et al.*, 2005). Esta bacteria tolera hasta 30 mM de cianuro libre, a un pH de 11,5, y también lleva a cabo la asimilación de complejos metal-cianuro, de ahí que sea un buen candidato para el tratamiento de residuos industriales contaminados con cianuro, y evitar así la volatilización del HCN (pKa: 9,2) (Luque-Almagro *et al.*, 2005). El cianuro inhibe la asimilación de nitrato y nitrito en esta bacteria (Luque-Almagro *et al.*, 2005).

Hay un gran número de microorganismos que son capaces de degradar cianuro y sus complejos metálicos (Barclay *et al.*, 1998; Dubey y Holmes, 1995; Gonç,alves *et al.*, 1998; Harris y Knowles, 1983; Raybuck, 1992;). Además también existen cepas que están adaptadas a la supervivencia en presencia de cianuro a pH alcalino pero sin ser capaz de degradarlo (Dumestre *et al.*, 1997).

El hongo *Fusarium solani* usa cianuro como única fuente de carbono (Dumestre *et al.*, 1997). La bacteria *Burkholdria cepacia* es capaz de consumir cianuro a un pH=10 pero necesita glucosa como fuente de carbono (Adjei y Ohta, 1999; Adjei y Ohta, 2000).

El potencial biotecnológico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha sido demostrado en un reactor discontinuo donde se ha llevado a cabo la detoxificación de cianuro (Huertas *et al.*, 2010), y también a través de la construcción de un biosensor para la detección de cianato, mediante la enzima cianasa, la cual se induce por cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2003).

Recientemente ha sido secuenciado el genoma de la bacteria (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014). La anotación del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 ha sido realizada a través de la plataforma GenDB (Meyer *et al.*, 2003). El tamaño total del genoma es de 4.686.340 bp con un contenido en CG del 62,34 %. La predicción génica reveló 4434 secuencias codificantes (CDSs), 67 genes tRNA y cuatro operones de RNA ribosomal (Wibberg *et al.*, 2014). La versión final del genoma es 29.896 bp más grande en tamaño que la versión del borrador y comprende 110 genes más basados en un mejora el enfoque de predicción de genes al aplicar el programa Prodigal (Hyatt *et al.*, 2010).

El genoma de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 muestra gran similitud con el de *P. mendocina ymp* (GenBank Accession No. CP000680), y este hecho fue aprovechado para rellenar todos los huecos que previamente no había sido posible ensamblarlos (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Los genomas de ambas bacterias comparten 3200 genes, presentando 1103 genes únicos *P. pseudoalcaligenes* mientras que *P. mendocina* presenta 1364 genes únicos.

*Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 es la estirpe con mayor número de nitrilasas (Nit1-4) de todas las *Pseudomonas* cuyos genomas han sido secuenciados hasta la fecha (Luque-Almagro *et al.*, 2013). También tiene

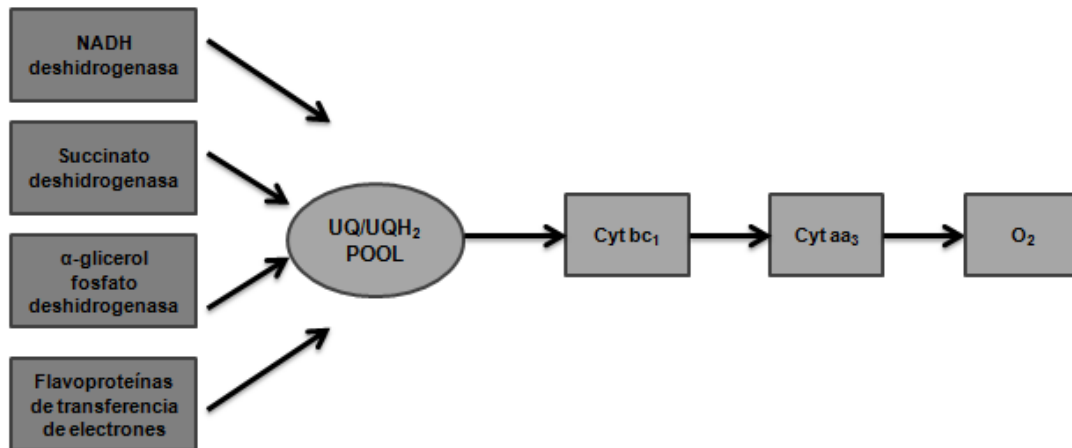
un número inusualmente alto de oxidasas terminales insensibles al cianuro (*cio*).

## 5. LA RESPIRACIÓN BACTERIANA.

La función primordial de la respiración es la obtención de la energía a través de la fosforilación oxidativa, proceso que consiste en la transferencia de electrones ( $e^-$ ) desde sustratos reducidos hasta aceptores terminales de electrones. Estos procesos respiratorios implican la donación de electrones por donadores de bajo potencial redox como el NADH. Posteriormente, hay una transferencia de electrones a través de cofactores redox, asociados a membranas o complejos proteicos de membrana. El proceso termina en la reducción de un aceptor final de electrones con un alto potencial redox, como el oxígeno. La energía libre liberada durante este proceso de transferencia de electrones es usado para la translocación de protones a través de la membrana mitocondrial para generar un gradiente electroquímico de protones transmembrana ( $\Delta p$ ), que se emplea fundamentalmente en la síntesis de ATP.

A diferencia del sistema respiratorio mitocondrial, que consta de una única oxidasa terminal (Figura 3), las especies bacterianas se caracterizan por presentar cadenas respiratorias ramificadas con múltiples oxidasas terminales que presentan distinta afinidad por el aceptor terminal de electrones, el oxígeno (Richardson, 2000). Un buen ejemplo de flexibilidad en el mecanismo de respiración es *Paracoccus denitrificans*, una bacteria de suelo que en su genoma contiene genes que codifican tres oxidasas bioquímicamente distintas (Figura 4) (de Gier *et al.*, 1994). En la Figura 5 se muestra un esquema de posibles donadores y aceptores en la respiración bacteriana.

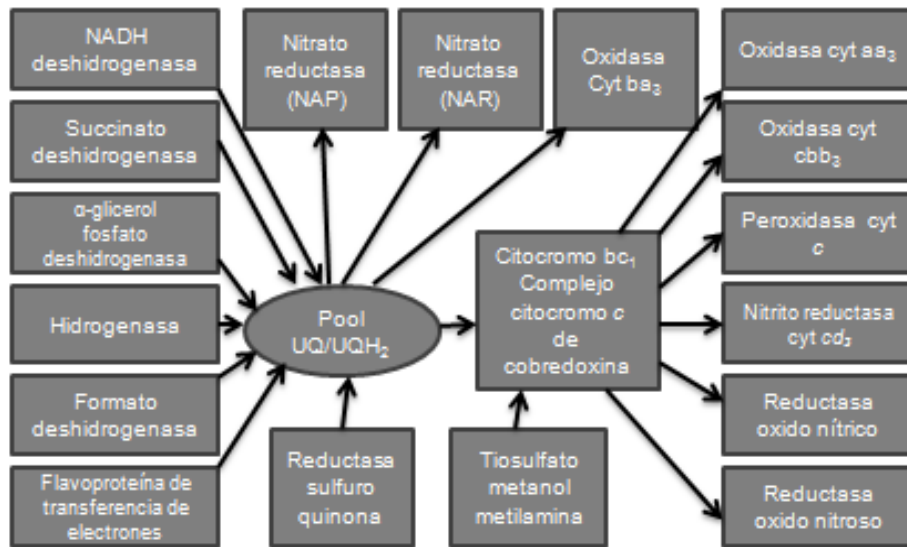




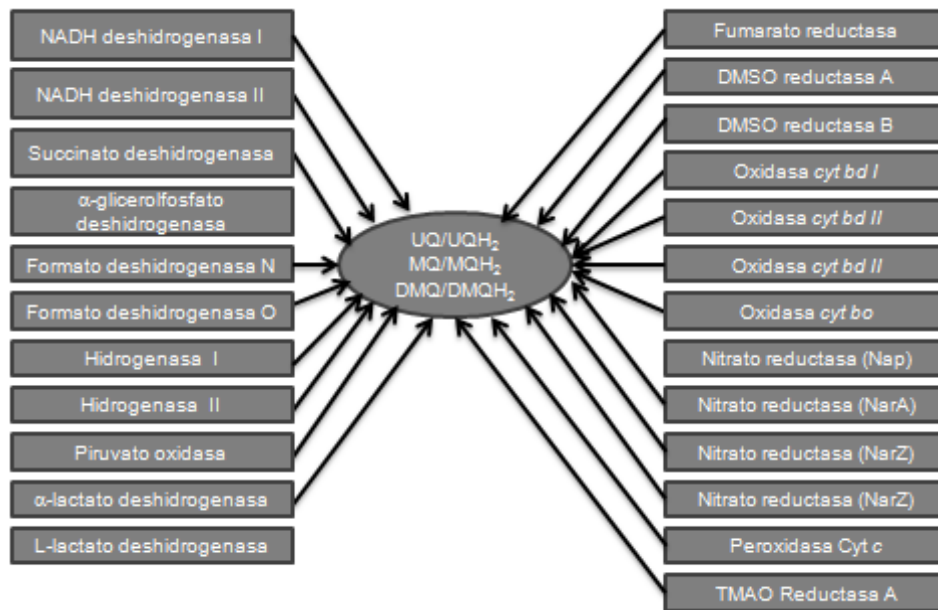
**Figura 3. Resumen del sistema básico bioenergético de transporte electrónico aeróbico de una mitocondria mamífera UQ, ubiquinona, UQH<sub>2</sub>, ubiquinol; Cyt, citocromo.** Sistema de transferencia de electrones desde sustratos reducidos hasta aceptores terminales de electrones. Los procesos respiratorios implican la donación de electrones por donadores de bajo potencial redox como el NADH, posteriormente hay una transferencia electrónica a través de cofactores redox. El proceso termina en la reducción de un aceptor final de electrones con un alto potencial redox, como el oxígeno.

Las cadenas respiratorias bacterianas comienzan con la reducción de sustratos carbonados (succinato, lactato, malato, butirato, glucosa) o cofactores reducidos (NADH) mediante la acción de deshidrogenasas específicas. Los electrones liberados son transferidos hasta las quinonas, localizadas en la membrana citoplasmática, reduciéndolas hasta quinoles. A partir de ese punto, los electrones pueden ser conducidos a dos tipos de oxidasas terminales: citocromo *c* oxidasas o quinol oxidasas, que son los lugares de reducción de  $O_2$  hasta agua, o bien reductasas alternativas que emplean sustratos distintos al  $O_2$  como aceptores terminales de electrones, como son el nitrato, nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso, DMSO, sulfato, sulfito, fumarato, etc. Las citocromo *c* oxidasas son más eficaces desde el punto de vista energético, pues generan una mayor proporción de  $H^+/e^-$  que las quinol oxidasas y por lo tanto pueden generar más ATP. Las cadenas respiratorias bacterianas se componen de elementos transportadores de electrones de distinta naturaleza, entre ellos flavoproteínas, proteínas de hierro y azufre, quinonas y citocromos.

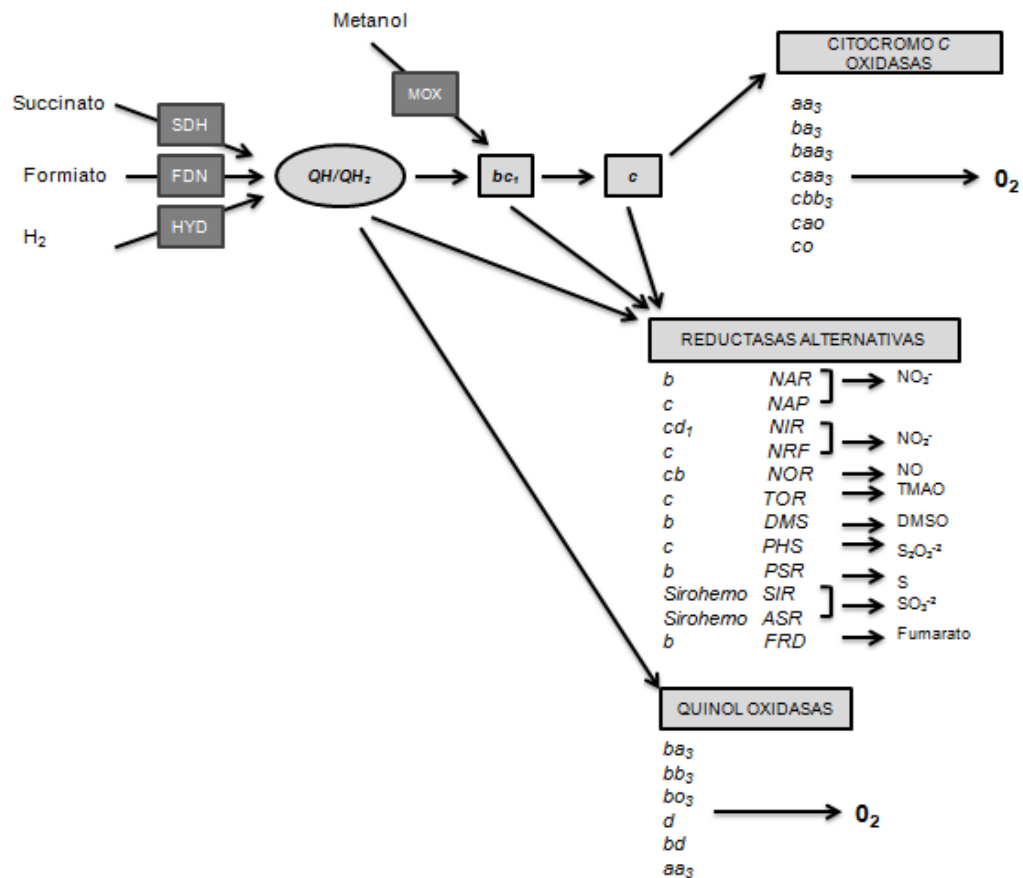
A)



B)



**Figura 4. Flexibilidad respiratoria en *Paracoccus denitrificans* (A) y en *Escherichia coli* (B). MQ, menaquinona; UQ, ubiquinona; DMQ, dimetilmenoquinona.** Las distintas especies bacterianas se caracterizan por presentar cadenas respiratorias ramificadas con múltiples oxidasas terminales que presentan distinta afinidad por el aceptor terminal de electrones, el oxígeno. En ambas especies se observa una flexibilidad respiratoria.



**Figura 5. Cadenas respiratorias bacterianas.** Comienzan con la reducción de sustratos carbonados (succinato, lactato, malato, butirato, glucosa) o cofactores reducidos (NADH) mediante la acción de deshidrogenasas específicas. Los electrones liberados son transferidos hasta las quinonas, localizadas en la membrana citoplasmática, reduciéndolas hasta quinoles. A partir de ese punto, los electrones pueden ser conducidos a dos tipos de oxidasas terminales: citocromo c oxidasas o quinol oxidasas, que son los lugares de reducción de O<sub>2</sub> hasta agua. Además de oxígeno, en condiciones anaeróbicas pueden actuar como oxidantes una gran variedad de sustratos, tanto orgánicos como inorgánicos (reductasas alternativas).

### 5.1 Oxidasas terminales en la respiración bacteriana

El genoma de *P. pseudoalcaligenes* presenta secuencias codificantes tanto para citocromo oxidasas como para quinol oxidasas, que son dos ramificaciones terminales de la cadena respiratoria (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Sin embargo, carece de genes para respiración anaeróbica de nitrógeno

oxidado que es un hecho bastante común entre otros procariotas (Richardson, 2000).

### **5.1.1 Citocromo oxidasa *cbb*<sub>3</sub>.**

Los miembros de las superfamilias hemo y cobre oxidasas (HCOs) forman parte de las cadenas respiratorias de organismos tanto eucariotas como procariotas (Garcia-Horsman *et al.*, 1994). Estas enzimas catalizan la reducción de oxígeno molecular a agua, acoplado el potencial redox a la translocación de protones a través de la membrana plasmática (Malatesta *et al.*, 1995; Schultz y Chan, 2001). Diferentes estudios de las relaciones evolutivas han permitido su clasificación en tres familias distintas, A, B y C (Pereira *et al.* 2001). Las oxidasas del tipo A, o citocromo *c* oxidasas del tipo *aa*<sub>3</sub> como las de *Paracoccus denitrificans* (Ludwig y Schatz, 1980) y *Rhodobacter sphaeroides* (Shapleigh *et al.*, 1992), las cuales son estructural y funcionalmente cercanas a las oxidasas mitocondriales; las oxidasas del tipo B, como la quinol oxidasa *bo*<sub>3</sub> de *E. coli* (Hill *et al.*, 1992) y las oxidasas del tipo C o *cbb*<sub>3</sub>. Estas superfamilias son bastante diversas en cuanto a los grupos hemo, y a los donadores de electrones que utilizan. La principal diferencia entre estos dos grupos HCOs es la presencia de un centro metálico, conocido como Cu<sub>A</sub>, en el dominio hidrofílico de la subunidad II de las citocromo *c* oxidasas. Cu<sub>A</sub> contiene dos átomos de cobre (Farrar *et al.*, 1996), y es el aceptor primario de electrones del citocromo *c* (Hill, 1993). Las quinol oxidasas por el contrario aceptan electrones directamente de un derivado quinol en la membrana citoplasmática. Años después se incluyeron oxidasas del tipo *c*, donde se incluyen las citocromo oxidasas *cbb*<sub>3</sub>, descritas en proteobacterias. Las más antiguas filogenéticamente son las del tipo *c*, su secuencia presenta gran similitud con las oxido nítrico reductasas, se cree que estas oxidasas provienen de enzimas implicadas en el proceso de desnitrificación (Van der Oost *et al.*, 1994).

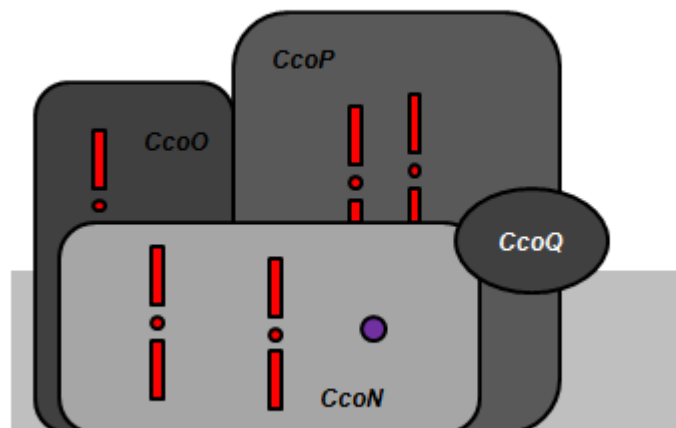
La citocromo oxidasa *cbb*<sub>3</sub> ha sido purificada de varios organismos incluyendo *P. denitrificans* (de Gier *et al.*, 1996), *R. sphaeroides* (Garcia-Horsman *et al.*, 1994a), *Rhodobacter capsulatus* (Gray *et al.*, 1994) y

*Bradyrhizobium japonicum* (Preisig *et al.*, 1996). Diversos estudios han demostrado que estas oxidasas son bastante diferentes de otros HCOs, tanto en la forma de recibir electrones, como en el grupo prostérico hemo presente en el sitio activo, como en su afinidad por el oxígeno. Se ha determinado la  $K_m$  en *B. japonicum* y es del orden de 7 nM (Preisig *et al.*, 1996). Estos valores de  $K_m$  son más bajos que para otras HCOs, por ejemplo la citocromo oxidasa  $bo_3$  de *E. coli* tiene una  $K_m$  para el oxígeno molecular de 0,15-0,35  $\mu$ M (D'Mello *et al.*, 1995). Estudios fisiológicos han demostrado que la citocromo  $cbb_3$  es menos eficiente en la transducción de energía que la citocromo  $aa_3$  (de Gier *et al.*, 1996).

Los genes que codifican la citocromo oxidasa  $cbb_3$  fueron identificados inicialmente en *B. japonicum* (Preisig *et al.*, 1993). Más recientemente, se han identificado genes homólogos en proteobacterias, por ejemplo en *R. capsulatus* (Thony-Meyer *et al.*, 1994), y en tres patógenos humanos como *Campylobacter jejuni* (Parkhill *et al.*, 2000), *Helicobacter pylori* (Tomb *et al.*, 1997) y *Neisseria meningitidis*, en la cual el citocromo  $cbb_3$  es la única oxidasa respiratoria codificada por el genoma, lo cual sugiere que pueda ser determinante para la patogenicidad.

En *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 la citocromo oxidasa  $cbb_3$  es codificada, como en otras *Pseudomonas*, por una repetición de los genes  $ccoNOQP$  (Pitcher y Watmough, 2004). La subunidad I está codificada por el gen  $ccoN$  y es un citocromo  $b$  transmembrana con un centro binuclear hemo- $Cu_B$  de alto spin y un hemo  $b_3$  de bajo spin. Las subunidades II y III son codificadas por  $ccoO$  y  $ccoP$  respectivamente, son citocromo  $c$  anclados a la membrana que transfieren electrones desde el citocromo  $c$  a la subunidad I. Por último,  $ccoQ$  codifica la subunidad IV y es una proteína requerida para la estabilidad del complejo (CcoQ) (Oh y Kaplan, 1999; Pitcher y Watmough, 2004; Zufferey *et al.*, 1996). En la Figura 6 se muestra un esquema de esta oxidasa terminal. Aguas abajo de los genes  $ccoNOQP$  existe un operón,  $ccoGHIS$ , que codifica proteínas de membrana maduradoras las cuales son esenciales para el ensamblaje del complejo del citocromo  $cbb_3$  (Pitcher y

Watmough, 2004). Uno de los principales determinantes para la expresión del citocromo *cbb*<sub>3</sub> es el regulador anaeróbico Anr/Fnr (Kawakami *et al.*, 2010), que se encuentra localizado aguas abajo del operón *ccoGHIS* en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Dicha proteína reguladora (Fnr) es capaz de detectar el oxígeno regulando la expresión del operón *ccoNOQP* en *Rhodobacter sphaeroides*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* UMP791, *Rodobacter capsulatus* MT1131 (Mouncey y Kaplan, 1998; Otten *et al.*, 2001). Este regulador transcripcional fue primeramente identificado en *Escherichia coli*, en la cual controla la inducción de genes en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno. La proteína Fnr contiene un cluster [4Fe-4S].



**Figura 6. Esquema del complejo *cbb*<sub>3</sub> en *P. stutzeri*.** El operón *ccoNOQP* de *P. stutzeri* codifica las cuatro proteínas estructurales que abarca el complejo citocromo oxidasa *cbb*<sub>3</sub>. Aunque CcoQ es mostrada como parte integral del complejo no hay evidencia de su presencia en la citocromo oxidasa *cbb*<sub>3</sub> de *P. stutzeri* que presenta un complejo de tres subunidades (Saraste y Castresana, 1994). En el esquema del complejo de membrana, los grupos hemo se representan en rojo, y el cobre en morado.

La expresión de *cbb*<sub>3</sub> es máxima bajo limitación de oxígeno para *P. aeruginosa* (Kawakami *et al.*, 2010). Cuando la expresión de las oxidasas *cbb*<sub>3</sub> de *P. aeruginosa* se analizó en células crecidas bajo condiciones semi-aeróbicas fue significativamente más alta que en células crecidas a alta

aireación. La oxidasa terminal *cbb<sub>3</sub>-1* de *P. aeruginosa* juega un papel importante en los cultivos aeróbicos, mientras que *cbb<sub>3</sub>-2* aumenta a concentraciones bajas de oxígeno (Comolli y Donohue, 2002). Se cree que Anr, que se activa por baja concentración de oxígeno, juega un importante papel en esta regulación (Batut *et al.*, 1989; Lopez *et al.*, 2001; Mandon *et al.*, 1994; Otten *et al.*, 2001a; Preisig *et al.*, 1993; Schluter *et al.*, 1997; Toledo-Cuevas, 1998; Van Spanning *et al.*, 1997; Richardson, 2000).

La abundancia de la proteína CcoO puede ser utilizada como indicativo de la expresión de la oxidasa *cbb<sub>3</sub>*, ya que esta subunidad es requerida para la estabilidad de la enzima (Zufferey *et al.*, 1996). Además, las dos subunidades CcoP están presentes con alto nivel de aireación en *Pseudomonas aeruginosa*, sugiriéndose que los dos operones *ccoNOQP* están regulados de forma independiente. El hecho de que el complejo *cbb<sub>3</sub>-2* se regule positivamente en condiciones de baja concentración de oxígeno o en fase estacionaria ha permitido sugerir que, mientras que *cbb<sub>3</sub>-1* es la oxidasa terminal que juega un papel primordial en el crecimiento aeróbico independientemente de la concentración de oxígeno, *cbb<sub>3</sub>-2* tendría un papel compensatorio o suplementario en condiciones de agotamiento de oxígeno. Así, se ha demostrado que ANR está implicado en la inducción de los genes *cco2* para la oxidasa *cbb<sub>3</sub>-2* bajo concentraciones bajas de oxígeno (Comolli y Donohue, 2004). Además RoxSR está también implicada en la inducción de los genes *cco1* y *cco2* (Bosma *et al.*, 1987; Fernandez-Pinar *et al.*, 2008). El nivel de transcripción de los genes *cco1* en la fase estacionaria temprana decreció a menos de la mitad que en la fase exponencial sugiriendo que los genes *cco1* están sujetos a una regulación dependiente de fase.

Las agrupaciones de operones *ccoNOQP* existen en las secuencias de genomas de diversas especies de *Pseudomonas*, pero el patógeno de plantas *P. syringe* contiene un único operón. Es posible que la presencia de dos oxidosas *cbb<sub>3</sub>* pueda proporcionar la flexibilidad respiratoria que ciertas *Pseudomonas* necesitan para sobrevivir en diversos medios. Estos dos operones también están presentes en especies rizobiales, aunque en estos

casos, los plásmidos de simbiosis y las oxidasas resultan redundantes en cuanto a función se refiere (Patschkowski *et al.*, 1996; Schluter *et al.*, 1997). En *P. aeruginosa*, ambas oxidasas *cbb<sub>3</sub>-1* y *cbb<sub>3</sub>-2* contribuyen a la conservación de energía a altos niveles de aireación, sugiriéndose que un sistema alternativo como CioAB podría proporcionar la compensación de las limitaciones respiratorias permitiendo la generación de energía de forma efectiva en diferentes medios (Comolli y Donohue, 2004).

### **5.1.2 Citocromo oxidasa aa<sub>3</sub>.**

Otra de las oxidasas que *P. pseudoalcaligenes* presenta en el genoma es del tipo aa<sub>3</sub>, que es una citocromo c oxidasa perteneciente a la superfamilia de oxidasas hemo-cobre (HCO), y se encuentra en un amplio rango de bacterias. Está relacionada con las oxidasas terminales mitocondriales y tiene una alta actividad de bombeo de protones (Arai, 2011). Estas oxidasas tienen baja afinidad por el oxígeno pero juega un papel dominante cuando la concentración de oxígeno es alta en muchas bacterias como *P. denitrificans*, *B. japonicum*, *R. sphaeroides*, y *Bacillus subtilis* (Arai, 2011; Bosma *et al.*, 1987; Flory y Donohue, 1997; Gabel y Maier, 1993; Winstedt y Von Wachenfeldt, 2000). Es codificada por cuatro genes del operón *coxBA-cox11-cox3*. Los centros binucleares (hemo a<sub>3</sub>-Cu<sub>B</sub>) y mononucleares (Cu<sub>A</sub>) están presentes en las subunidades I y II (Cox<sub>A</sub> y Cox<sub>B</sub>), mientras que Cox11 puede ser una proteína de ensamblaje implicada en la inserción de cobre en la subunidad I de la oxidasa terminal (Arai, 2011). El promotor *cox* dependiente de un factor sigma RpoS, donde su expresión es máxima en fase estacionaria de crecimiento y es reprimido por RoxSR (Kawakami *et al.*, 2010; Schuster *et al.*, 2004). En fase estacionaria es cuando RpoS presenta un nivel de expresión más alto, activando el promotor *cox*, pero el promotor es reprimido simultáneamente por RoxSR. En la especie *Bradyrhizobium japonicum*, la expresión del citocromo aa<sub>3</sub> está regulada por oxígeno. Esta regulación ocurre a nivel transcripcional, mediante una caída de 6 veces en células cultivadas con 1% de oxígeno respecto a medio aeróbico (Gabel y Maier, 1993). En *P. aeruginosa*, el nivel de expresión de los genes *cox* para la oxidasa aa<sub>3</sub> fue



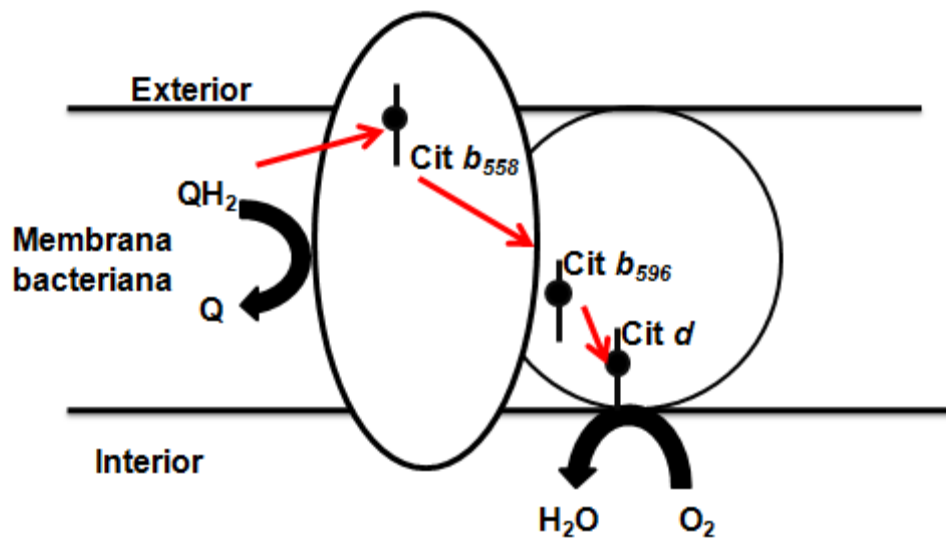
mantenido bajo hasta el 20 % de oxígeno en *P. aeruginosa*. El promotor *cox* fue regulado positivamente en fase estacionaria, donde RpoS es altamente expresado y activa el promotor *cox*. Debido a que las oxidasas tipo  $aa_3$  tienen una alta eficiencia de translocación de protones en algunos organismos, se ha sugerido que la oxidasa  $aa_3$  puede ser importante para la conservación de energía bajo condiciones de baja disponibilidad de nutrientes (Lauraeus y Wikström, 1993; Pitcher y Watmough, 2004).

### **5.1.3 Citocromo $bo_3$ quinol oxidasa (*cyo*).**

Es también un miembro de la superfamilia de las oxidasas terminales tipo hemo-cobre, pero le falta el sitio de unión de  $Cu_A$  y posee hemo *b* y hemo *o* (Arai, 2011). En las *Pseudomonas* en general el complejo es codificado por el operón *cyoABCDE* que no está presente en el genoma de *P. pseudoalcaligenes*, aunque un fragmento del primer gen, *cyoA* puede ser detectado corriente arriba del operón *cio1*. En *P. aeruginosa* el promotor de *cyo* responde positivamente a la presencia de agentes productores de NO y a la escasez de hierro (Kawakami *et al.*, 2010).

### **5.1.4 Citocromo *bd* y sus homólogos**

Este sistema fue descrito por primera vez en *E. coli* y abarca dos grupos, el citocromo *bd* y la oxidasa terminal insensible a cianuro (denominada CIO, por "cyanide insensitive oxidase"), siendo al igual que el citocromo *bo*, una quinol oxidasa (Borisov *et al.*, 2011). Este sistema, que no pertenece a la superfamilia de oxidasas hemo-cobre, está formado por dos subunidades entre las que se anclan tres grupos hemo; el hemo b-558 de bajo spin, asociado a la subunidad I y el hemo b-595 de alto spin y el hemo d, ambos asociados a la subunidad II (Green *et al.*, 1984; Miller y Gennis, 1983; Figura 7). En *E. coli*, los genes que dan lugar a estas subunidades se denominan *cyd*, con tamaños esperados a partir de la secuencia aminoacídica de 48 kDa para la subunidad I y 36 para la subunidad II, que se aproximan a los valores obtenidos experimentalmente de 58 y 43 kDa, respectivamente (Junemann, 1997).



**Figura 7. Esquema del citocromo *bd* bacteriano.** Aparecen representadas las orientaciones de los citocromos con respecto a la bicapa lipídica (Junemann, 1997).

Las genes *cydA* y *cydB* de *E. coli*, que codifican las dos subunidades del citocromo *bd*, se cotranscriben organizándose en un operón. Ambos se inducen en condiciones de baja aireación, en las que el citocromo *d* situada en la subunidad II (donde también se ubica el hemo *b595*, es responsable de unir fuertemente el oxígeno molecular (Junemann y Wrigglesworth, 1995). Diagramas de hidropatía a partir de la secuencia proteica de las oxidasas de *E. coli*, *A. vinelandii* y *P. aeruginosa* han permitido deducir la existencia de varias hélices transmembrana en ambas subunidades: 9 en la subunidad I y ocho en la subunidad II (Cunningham *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2004).

A diferencia del citocromo *bo*, que se expresa en *E. coli* en condiciones de elevada aireación y que posee un sitio donde se une muy fuertemente la ubiquinona, no se ha detectado quinona alguna en las preparaciones puras de citocromo *bd*. Sin embargo, la afinidad por el oxígeno de la enzima es muy elevada con valores de  $K_m$  de 2 y 4 nM para la proteína purificada de *E. coli* y *Azotobacter vinelandii* respectivamente (D'Mello *et al.*, 1996). Estos experimentos se realizaron en condiciones saturantes del donador de electrones y utilizando oxileghemoglobina como fuente de oxígeno. En estas

condiciones la afinidad del enzima se acerca a la constante de difusión de oxígeno.

El genoma de *P. pseudoalcaligenes* contiene tres operones *cio*, algo que contrasta bastante con la organización encontrada en otras *Pseudomonas*, que solo presentan un operón por genoma, como en *P. aeruginosa*, *P. putida* o *P. mendocina*, o dos copias por genoma, como en *P. stutzeri*, *P. fluorescens* o *P. syringae*. Además de los genes *cioA* y *cioB*, el operón *cio1* contiene una posible sulfito/nitrito reductasa, y dos secuencias codificantes conservadas, aunque de función desconocida. Al igual que *cio1*, la última secuencia codificante de los operones *cio2* y *cio3* están muy relacionados con los genes homólogos encontrados en los operones *cio* de *Pseudomonas* y otras bacterias. Mientras que *cioA* y *cioB* de los operones *cio1* y *cio3* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 presentan máxima similaridad con estos mismos genes de cualquier otra especie de *Pseudomonas*, los genes del operón *cio2* tienen una relación más estrecha con una de las dos copias de los genes *cio* de *P. stutzeri*, a su vez más cercana a los genes *cyd* de enterobacterias (Luque-Almagro *et al.*, 2013).

Los genes *cioA* y *cioB* de *Pseudomonas* son muy similares a los genes *cyd* de enterobacterias (Cunningham *et al.*, 1997; Junemann, 1997; Zhang *et al.*, 2004), pero presentando una versión “corta” del denominado “Q-loop”, el conector hidrofóbico entre las hélices 6 y 7 que queda localizado en el periplasma. En su topología, estas proteínas incluyen nueve  $\alpha$ -hélices transmembrana, y los tres ligandos de hemo (*b558*, *b595* y *d*), posicionados en H-159, H-234, y H-339 de la secuencia primaria de la proteína CioA de *P. pseudoalcaligenes* (Quesada *et al.*, 2007). Estas proteínas carecen de la señal espectroscópica del hemo *d* (Cunningham y Williams, 1995; Cunningham *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 2007; Quesada *et al.*, 2007) y presentan una mayor resistencia al cianuro, por lo que encajan mejor en la denominación de CIO (Borisov *et al.*, 2011).

La secuencia de *cioB*, el gen que codifica la subunidad II de la oxidasa *cio*, está menos conservada evolutivamente que la de *cioA*, si bien se

mantiene las 8 alfa hélices transmembrana en las proteínas codificadas (Junemann, 1997). Los análisis filogenéticos han revelado una evolución asimétrica de *cioB* respecto a *cioA*, lo que podría sugerir la existencia de una presión selectiva más alta para la evolución de *cioB* (Hao y Golding, 2006). Aunque la contribución de *cioB* (*cydB*) a la evolución de la resistencia al cianuro no ha sido estudiada en la mayoría de las bacterias, en *Staphylococcus* se ha evidenciado que la baja susceptibilidad al cianuro de las especies más resistentes se transfiere a las menos resistentes mediante el intercambio de las secuencias de *cydB* (Voggu *et al.*, 2006).

El gen que inicia la secuencia del operón *cio* en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 codifica una proteína quimérica, los 550 residuos del dominio C-terminal corresponden a NIR/SIR, una sulfito o nitrito reductasa ferredoxina dependiente (Crane y Getzoff, 1996; Dhillon *et al.*, 2005), mientras que los 119 residuos del dominio N comparten homología con fragmentos de lectura abierta de función desconocida encontrados en distintos genomas (Quesada *et al.*, 2007). La secuencia codificante del dominio C-terminal podría comenzar en un potencial codón de inicio “gug” y una secuencia Shine/Dalgarno situada en posición -12 que podría conducir la traducción de una “forma clásica” SIR/NIR a partir del residuo 120. Además, un posible promotor para el operón *cio* provocaría la coexpresión de los genes *nir/sir* y *cio*, controlando la correulación de NIR/SIR y de la oxidasa CIO, responsable de la respiración resistente a cianuro. Esta correulación, desconocida en otros sistemas, podría indicar la existencia de conexiones funcionales entre NIR/SIR y la oxidasa terminal que explicarían la evolución de la organización del operón *cio* encontrado en esta bacteria (Quesada *et al.*, 2007).

El operón *cio1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 presenta una pequeña fase abierta de lectura corriente debajo de *cioB*, inicialmente denominado *orf2*. La mutagénesis de esta secuencia impide la expresión de CIO y disminuye drásticamente la resistencia al cianuro (Tesis Doctoral F. Acera, 2011), por lo que se había propuesto inicialmente denominarlo *cydZ*, como tercer componente del complejo CIO en *P. pseudoalcaligenes*

CECT5344. Estos pequeños genes situados corriente abajo del gen para la subunidad II del citocromo *bd* (ó CIO) presentan una gran diversidad de estructuras, y se han clasificado como *cydX*, *cydY* y *cydZ*, dependiendo de sus características estructurales, correspondiendo esta última a las secuencias identificadas en *Pseudomonas* (Allen *et al.*, 2014).

Respecto a la función del citocromo *bd*, en *A. vinelandii* se ha sugerido que se encarga de mantener extremadamente bajas las concentraciones de oxígeno, para que la nitrogenasa continúe activa y se pueda fijar el nitrógeno (Kelly *et al.*, 1990). Este sistema también se encarga de mantener el funcionamiento del metabolismo aeróbico, que energéticamente es más favorable y, además, diferentes estudios han demostrado que la oxidasa es importante en la virulencia de patógenos como *Shigella flexneri* (Way *et al.*, 1999). Todo ello explica que la expresión de los genes *cioAB* en *P. aeruginosa* esté sujeto a un control complejo (Comolli y Donohue, 2002; Cooper *et al.*, 2003).

Debido a la alta reactividad del cianuro, sobre todo por su capacidad de unirse a cofactores metálicos, el cianuro provoca el bloqueo de transporte de electrones en la respiración, al unirse al ión férrico de la citocromo *c* oxidasa. Este bloqueo impide la síntesis de ATP, derivando hacia un metabolismo anaeróbico. Muchos organismos aerobios presentan oxidasas alternativas insensibles a cianuro, como el citocromo *bd* y la oxidasa alternativa de algas, plantas y hongos, donde los electrones no pasan por la citocromo *c* oxidasa, aunque sea a expensas de reducir el rendimiento energético (Junemann, 1997; McDonald y Vanlerberghe, 2005; Vanlerberghe y McIntosh, 1997).

## 6. FAMILIA DE REGULADORES TRANSCRIPCIONALES GNTR.

Las proteínas con el motivo HTH (hélice-giro-hélice, del inglés “héliturn-hélice”) constituyen el grupo mejor caracterizado hasta la fecha de los denominados factores de transcripción o proteínas reguladoras de la transcripción (Harrison, 1991; Pabo y Sauer, 1992). En estas proteínas, el

motivo de reconocimiento del DNA consiste en una  $\alpha$ -hélice, seguido de un giro y de una segunda  $\alpha$ -hélice, que a menudo se llama sitio de “reconocimiento”. Generalmente las proteínas HTH funcionan como dímeros, en la cual cada monómero reconoce su sitio. Este grupo es considerado una referencia para comprender las reglas generales que gobiernan las interacciones DNA-proteína (Pabo y Sauer, 1992; Wintjens y Rooman, 1996). Normalmente, la oligomerización entre subunidades regulatorias y/o los cambios conformacionales debido a la unión o separación de la molécula inductora/represora lo que permite la disposición del dominio HTH correcta y por tanto la unión al DNA de la proteína reguladora completa (Rigali *et al.*, 2002). El motivo HTH es sin duda el más común entre los factores transcripcionales bacterianos ya que casi un 95% de los mismos contiene un motivo HTH para el reconocimiento de su secuencia diana en el DNA (Ramos *et al.*, 2005).

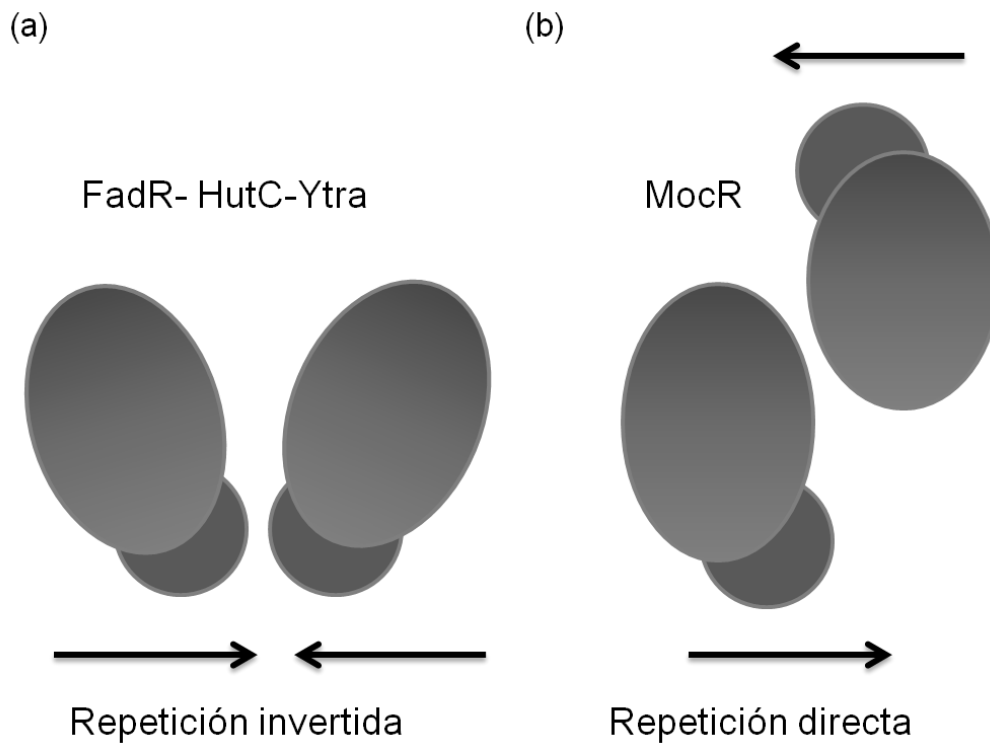
Haydon y Guest fueron los primeros en explicar la estructura del regulador transcripcional bacteriano GntR en el año 1991 (Haydon y Guest, 1991; Rigali *et al.*, 2002), pero fue nombrada como GntR posteriormente por actuar como represor del operón del gluconato en *Bacillus subtilis* (Fujita *et al.*, 1986; Reizer *et al.*, 1991). La familia GntR comprende alrededor de 270 miembros distribuidos entre los grupos bacterianos más diversos, además de que regulan los procesos biológicos más variados. Los miembros de la familia GntR presentan un motivo HTH de unión al DNA en su extremo N-terminal (D-b) y una gran heterogeneidad en sus extremos C-terminales, donde se ubica su dominio de oligomerización y de unión a efectores (E-b/O). Al construirse árboles filogenéticos del dominio E-b/O se observa el agrupamiento en 4 subfamilias, denominadas: FadR, HutC, MocR y YtrA (Rigali *et al.*, 2002).

### **6.1 . Subfamilia MocR.**

El dominio E-b/O de esta subfamilia es inmediatamente distinguible de los otros a causa de una longitud media mucho mayor, de unos 350 aminoácidos, y de su estrecha homología con las aminotransferasas de la clase I (Sung *et al.*, 1991). Estas enzimas catalizan la transferencia reversible

del grupo amino de un aminoácido a un aceptor  $\alpha$ -ceto ácido, requiriendo piridoxal 5'-fosfato (PLP) que se une al grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo conservado de lisina, como cofactor para catalizar la reacción y actuando como dímeros en una configuración cabeza-cola (Ko *et al.*, 1999). La presencia de este dominio en las proteínas de la subfamilia MocR sugiere que su oligomerización ocurriría de la misma forma que en las transaminasas y que el PLP es requerido como cofactor para la actividad reguladora. La evidencia más clara de este hecho está en PdxR de *Streptomyces Venezuela*, la cual está implicada directamente en la regulación de la síntesis de piridoxal fosfato (Magarvey *et al.*, 2001). Este caso es excepcional ya que la mayoría de las proteínas de la subfamilia MocR presentan función desconocida.

Las predicciones estructurales han revelado que la tipología del dominio D-b de GntR está bastante bien conservada, con todos los elementos de la estructura secundaria en posiciones relativas similares dispuestos en configuración  $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 1$ - $\beta 2$ . Respecto a los análisis de operadores, aunque no hay consenso preciso que implique una correspondencia de uno a uno entre las cadenas laterales aminoacídicas y los pares de bases en el DNA (Pabo y Sauer, 1984), es lógico suponer que los dominios altamente conservados de enlace del DNA pueden enlazarse con secuencias de operadores similares. Para los miembros de la familia GntR, casi todos los sitios de unión están organizados en torno a una secuencia palindrómica constante, siendo la divergencia más importante entre los diferentes sitios operadores el número y la naturaleza de los nucleótidos que están situados alrededor. Para la subfamilia MocR hay poca información sobre sus secuencias de unión, aunque sobre la base de la posible oligomerización antiparalela “cabeza-cola” se ha sugerido que es probable el reconocimiento de repeticiones directas separadas por un amplio espaciador, mientras que una interacción antiparalela “cabeza-cabeza” requeriría la presencia de repeticiones invertidas (Figura 8).



**Figura 8. Oligomerización de *GntR* y unión a su diana.** Para las distintas subfamilias se han propuesto diferentes configuraciones estructurales, siendo la de la familia *mocR* una configuración antiparalela cabeza-cola (Rigali *et al.*, 2002).

## 7. LAS NITRILASAS.

Hook y Robinson en 1964 presentaron el aislamiento y características de la primera nitrilasa bacteriana que posee una actividad elevada sobre la ricina, un alcaloide muy tóxico presente en las semillas del Ricino (Hook y Robinson, 1964). Esta enzima toma el nitrilo y dos moléculas de agua, liberando amonio y el ácido correspondiente. Las nitrilasas como tales han sido muy estudiadas a causa de su implicación en la síntesis de auxinas y de su uso en la industria química de síntesis.

Gracias a la evolución de las herramientas bioinformáticas, se puso de manifiesto la similitud de la secuencia aminoacídica de las nitrilasas con distintas proteínas. Éstas catalizan reacciones que involucran la hidrólisis de enlaces carbono-nitrógeno no peptídicos. Una división inicial en 6 grupos de



hidrolasas de carbono-nitrógeno (Bork y Koonin, 1994) que se amplió posteriormente hasta llegar a las 13 ramas que emergen de la superfamilia (Pace y Brenner, 2001).

La familia de las nitrilasas es parte de la superfamilia de las hidrolasas carbono-nitrógeno PF00795, un conjunto de enzimas que comparten homologías estructurales significativas y que generalmente mantienen conservada una triada catalítica E-K-C. Esta familia se puede clasificar en 13 ramas, incluyendo nitrilasas, amidasas alifáticas, biotinidasas,  $\beta$ -ureidopropionasas, carbamilasas y N-aciltransferasas. El genoma de *P. pseudoalcaligenes* codifica 10 miembros de esta superfamilia, perteneciendo cuatro de ellos a la familia de nitrilasas propiamente dicha. Merece la pena señalar que *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es la cepa de *Pseudomonas*, cuyos genomas han sido secuenciados hasta la fecha, con mayor número de nitrilasas (nit1-4). De hecho, *P. mendocina* ymp, que es muy similar a *P. pseudoalcaligenes* no presenta ninguna nitrilasa en su genoma. Recientemente ha sido sugerido que la cepa tiene una nueva ruta de asimilación de cianuro que implica la formación de nitrilo como intermediario (Luque-Almagro *et al.*, 2011). Nit1, Nit3 y Nit4 son nitrilasas específicas de *P. pseudoalcaligenes*, mientras que Nit2 es homóloga a otras presentes en este género. Se ha considerado que las nitrilasas son enzimas menos específicas que las nitril hidratasas aunque actúen frente al mismo grupo funcional (kobayashi y Shimizu, 2000), debido a que algunas nitrilasas catalizan la hidrólisis de una amplia gama de sustratos, en algunos casos desde voluminosas moléculas aromáticas (benzonitrilo, tolunitrilo y cianopiridina) hasta sencillas cadenas de 4 carbonos (succinonitrilo) (Yeom *et al.*, 2008). Se ha demostrado la intervención de las nitrilasas en la síntesis de determinados metabolitos, ejemplificando la producción de ácido indolacético (Barceló *et al.*, 2001), en la detoxificación del cianuro en plantas (Piotrowski y Volmer, 2006), también en plantas se las ha relacionado con la degradación de glucosinolatos (Bestwick *et al.*, 1993), y probablemente se vean envueltas en la degradación de aldoximas (Kato y Asano, 2005; Kato *et al.*, 2005). Nitrilos, amidas y ácidos carboxílicos poseen diversas aplicaciones en la industria química y farmacéutica.

Algunas nitrilasas han mostrado ser selectivas a la hora de producir o transformar isómeros. El ácido mandélico ([RD]-ácido 2-fenil-2-hidroxiacético) usado en la industria cosmética y como bacteriostático (Kaul *et al.*, 2004; Mateo *et al.*, 2006) puede ser sintetizado mediante el uso de nitrilasas. Otro ejemplo se da en la síntesis de ibuprofeno a partir de la enzima purificada y caracterizada de la estirpe *Acinetobacter sp.* AK226: presenta 180 veces más actividad sobre la mezcla racémica de su sustrato (2-(4'-isobutilfenil) propionitrilo) que sobre su isómero dextrógiro, originando únicamente ácido S-(+)-2-(4'-isobutilfenil)-propiónico, conocido como S-ibuprofeno (Yamamoto y Komatsu, 1991). A pesar de la intensa actividad investigadora en torno a hidrólisis de los compuestos cianurados por parte de las nitrilasas y las nitril hidratadas, existen ciertas barreras que dificultan su uso industrial a gran escala. Son pocas las enzimas bien caracterizadas y disponibles en cantidad suficiente, siendo por lo general bastante lábiles y presentado en muchos casos inhibición por sustrato o producto (Brady *et al.*, 2004). En ocasiones la escasa solubilidad del sustrato orgánico en medios acuosos limita la velocidad de la catálisis (Brady *et al.*, 2004). Además, el rango de sustratos sobre los que actúan de manera eficiente es aún escaso, razón por la que mediante el análisis de las secuencias de proteína depositadas en las bases de datos se busca predecir las posibles moléculas diana (Seffernick *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de estas limitaciones ya han sido utilizadas con éxito distintas nitrilasas y nitril hidratadas en procesos industriales, principalmente en la síntesis de ácidos orgánicos y amidas respectivamente.

La asimilación de cianuro a través de la formación de 3CNAla ha sido demostrada en varias especies bacterianas (Brysk *et al.*, 1969; Castric y Strobel, 1969; Dunill y Fowden, 1965). Castric y Conn en 1971 purificaron una sulfidrilasa de *Bacillus megaterium* que, partiendo de cianuro potásico y O-acetilserina o L-cisteína, daba lugar al nitrilo (Castric y Conn, 1971). En estas fechas también se demostró que las asparaginasas obtenidas de extractos de *E. coli* y a partir del suero sanguíneo del conejillo de indias (*Cavia porcellus*) transformaban la 3CNAla en aspartato y amonio (Lauinger y Ressler, 1970). En 1983 finalmente se publicó la purificación de la única nitrilasa de la 3CNAla

bacteriana descrita hasta la fecha, que no posee actividad asparaginasa, originando la amida junto con el correspondiente ácido y amonio en una proporción 2:1:1 (Yanase *et al.*, 1983). El cianuro es fijado en el nitrilo pero tampoco se ha demostrado en bacterias que las enzimas que los transformen estén reguladas por cianuro.

La nitrilasa de la 3CNAla purificada por Yanase y sus colaboradores a partir de una estirpe de *Pseudomonas* presenta inducción por el propio nitrilo, utilizándolo además con única fuente de nitrógeno durante el crecimiento (Yanase *et al.*, 1983). Trabajos anteriores con otros géneros bacterianos mostraron como el isótopo radioactivo del carbono perteneciente al cianuro termina formando parte del nitrilo, revelando la implicación de la formación de la 3CNAla en la eliminación del compuesto tóxico. Sin embargo, en esta última referencia no se muestra si la nitrilasa es inducible por cianuro o no, ni la ruta de formación del nitrilo.

En la tesis Doctoral de F. Acera, se demostró por primera vez que *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 posee una nitrilasa (Nit4) que presenta una fuerte inducción por cianuro (Figuras no mostradas), hasta ese momento es la única cianoalanina nitrilasa bacteriana purificada y descrita hasta el momento que se encuentra regulada por la presencia de cianuro y por tanto probablemente implicada en su degradación. Los extractos acelulares obtenidos a partir de células cultivadas en ausencia de cianuro también son capaces de catalizar la liberación de amonio a partir del nitrilo, evidenciando la presencia de enzimas inespecíficas que utilizan el nitrilo. La actividad nitrilasa es la que posiblemente permitió el crecimiento en medio mínimo con la 3CNAla como fuente de nitrógeno que se observa en placa y cultivos líquidos. Al añadir cianuro al medio, el crecimiento se aceleró.

Se conoce con bastante precisión la vía de la 3CNAla para la eliminación del cianuro en vegetales. La síntesis del nitrilo se lleva a cabo a partir de cianuro y cisteína, con la intervención de la 3CNAla sintasa, homóloga a la cisteína sintasa (Blumenthal *et al.*, 1968; Hendrickson y Conn, 1969; Maruyama *et al.*, 1998; Tesis Doctoral F. Acera, 2011), el nitrilo resultante es transformado

en asparagina, aspartato y amonio en proporción 4:1:1, por el producto del gen *nit4* (Piotrowski *et al.*, 2001; Piotrowski y Volmer, 2006). En *E. coli*, en 1965, fue detectada la formación del nitrilo a partir de cisteína y cianuro (Dunnill y Fowden, 1965; Floss *et al.*, 1965). Se conoce la existencia de una enzima degradadora de la 3CNAla: la asparaginasa que posee a su vez actividad nitrilasa (Lauinger y Ressler, 1970).

La única 3CNAla nitrilasa bacteriana purificada proviene de una estirpe de *Pseudomonas* sin clasificar específicamente (Yanase *et al.*, 1983). La 3CNAla de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* presenta dos características que parecen inherentes a esta actividad: la elevada especificidad y la producción tanto de asparagina como aspártico (Tesis Doctoral F. Acera, 2011), además de poseer actividad nitril hidratasa.

Termodinámicamente, la reacción catalizada por la nitrilasa es completamente irreversible. La actividad hidratasa le podría permitir la recuperación del nitrógeno que es uno de los nutrientes más escasos en el medio ambiente. Hasta el momento, no se conoce que la 3CNAla intervenga en ningún otro proceso celular (Tesis Doctoral F. Acera, 2011). Gracias a la 3CNAla se recuperan ambos nitrógenos en forma de amonio, aspartato y asparagina, proporcionando un claro carácter asimilador a la nitrilasa de la 3CNAla. En *Pseudomonas pseudoalcaligenes* la expresión de la enzima 3CAN ha quedado vinculada a la presencia de cianuro (resultados no mostrados), por lo que se podría afirmar, a pesar de no demostrar la vía de síntesis del nitrilo, que posee un papel de asimilación de cianuro.

Cuando se construyó un mutante en el gen *nit4*, el crecimiento siguió siendo de igual forma que la estirpe silvestre en medios con cianuro, lo cual puso de manifiesto que esta no era la ruta clave de asimilación. En 2011, se sugirió que *P. pseudoalcaligenes* presenta una nueva ruta de asimilación que implica la formación de un nitrilo como intermediario (Luque-Almagro *et al.*, 2011). En el genoma de *P. pseudoalcaligenes* hay presente 4 nitrilasas, Nit1 y Nit3 presentan una homología del 48%, mientras que Nit2 es similar a Nit4, 50,8%. De acuerdo a los genomas secuenciados en *pseudomonas*, Nit1, Nit3 y

Nit4 son específicos para *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Por el contrario, Nit2 están presentes en otras especies de *Pseudomonas*. Los análisis filogenéticos de los genes nitrilasa mostraron que Nit1 y Nit3 pertenecen a la subfamilia 1 (Robertson *et al.*, 2004). Los genes *nit2* y *nit4* son similares a los de las bacterias eucariotas. Ambos genes *nit2* y *nit4* están próximos a genes que no están relacionados funcionalmente con las nitrilasas. Hasta ese momento no se habían hecho estudios de expresión respecto a la 3-cianoalaninanitrilasa.



## ***II. OBJETIVOS***





- Mapeo de transcritos y análisis de la regulación de los genes agrupados en el operón *cio1* de *P. pseudoalcaligenes*.
- Análisis funcional de los operones *cio2* y *cio3* de *P. pseudoalcaligenes*.
- Estudio de la regulación de la expresión génica de las oxidasas terminales de *P. pseudoalcaligenes*.
- Estudio del papel del regulador *mocR* sobre la expresión de *cio1*.
- Análisis transcriptómico de la resistencia al cianuro en *P. pseudoalcaligenes*.



### ***III. MATERIALES Y MÉTODOS***



## 1. MATERIAL BIOLÓGICO.

### 1.1 Estirpes bacterianas.

La cepa principal utilizada habitualmente en este trabajo ha sido una cepa de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 R1, mutante espontáneo a rifampicina de la estirpe original proveniente de Córdoba (Luque-Almagro *et al.*, 2005). Para clonación de plásmidos se usó la estirpe XL1 de *E.coli*. A continuación, se muestra una tabla de todas las estirpes y mutantes utilizados en este trabajo.

**Tabla 4. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.**

	<b>Denominación<sup>1</sup></b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
	CECT 5344 R1 (R1)	Mutante espontáneo de CECT 5344 resistente a rifampicina. Rf <sup>r</sup> .	Luque-Almagro <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	PpS1AB2 (T1)	Mutante polar en <i>nir/sir</i>	
	PpS(1AB2+) (T10)	Mutante no polar en <i>nir/sir</i>	
	PpAB2 (T18)	Mutante polar en el gen <i>cioA</i>	
	PpAB2 (28.2)	Mutante no polar en el gen <i>cioA</i>	
	PpB(2+)(CioB)	Mutante no polar en el gen <i>cioB</i>	(Tesis Doctoral F. Acera, 2011)
	PpΔorf2 (CioC)	Mutante polar en el gen <i>cioC</i>	
	PpΔserC(-) (T25)	Mutante polar en el gen <i>serC</i>	
	PpΔserC(+) (T33)	Mutante no polar en el gen <i>serC</i>	
	PpΔ3can	Mutante polar en el gen <i>nit4</i>	
	PpΔmocR(+) (MocR)	Mutante no polar en <i>mocR</i>	Este trabajo
PpΔmocR (MocR+T)	Mutante no polar en <i>mocR</i> con parada de transcripción		
<i>P. Putida</i>	KT2442	Derivado de KT2440. Rf <sup>r</sup>	(Franklin <i>et al.</i> , 1981)
	KT2440	Mutante dirigido en <i>cioA</i>	Cedida por F. Rojo
	PputΔAp33ABC1(PCCi)	KT2440 transformado con el plásmido pVLT33cioAB1	(Tesis Doctoral, F. Acera 2011)
	PputΔAp33ABC2(PCCio2)	KT2440 transformado con el plásmido pVLT33cioAB2	Este trabajo

**Tabla 4. Continuación**

	PputΔAp33ABC3(PCCio3)	KT2440 transformado con el plásmido pVLT33cioAB3	
	PputΔApVLT33 (POCi)	KT2440 transformado con el plásmido pVLT33 no recombinante	
	PputpVLT31 (POKT)	KT2442 transformado con el plásmido pVLT31 no recombinante	(Tesis Doctoral F. Acera, 2011)
	PputpVLT31ABC1 (PCKT)	KT2442 transformado con el plásmido pV33cioAB1	
<i>E. coli</i>	XL1-Blue MRF'	Δ (mcra)183, Δ (mcrcb-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lac [F'proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 tn10 (Tet <sup>r</sup> )].	(Sambrook <i>et al.</i> , 1982)
	XL1pGEMcio2	XL1-Blue MRF' con el plásmido PGcio2	
	XL1pGEMcio3	XL1-Blue MRF' con el plásmido PGcio3	Este trabajo
	XL1pGEMaph(3')	XL1-Blue MRF' con el plásmido PGaph(3')	

<sup>1</sup>Entre paréntesis se indica la denominación común en el laboratorio

La conservación de las cepas bacterianas a corto plazo se realizó en medio sólido suplementado con los antibióticos adecuados, y fueron mantenidas a 4 °C. A largo plazo, se hizo por congelación a -80 °C de cultivos líquidos conteniendo glicerol a una concentración final del 20% (v/v). Todos los mutantes en *P. pseudoalcaligenes* se realizaron mediante inserción por recombinación homóloga de un casete de resistencia a gentamicina, excepto el mutante polar en *mocR*, cuya resistencia es a kanamicina.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo de *P. pseudoalcaligenes*, se ajustaron siempre a pH 8.5, mientras que para *E. coli* y *P. putida* KT2440 el pH óptimo para su crecimiento fue 7.5. Estos ajustes de pH se llevaron a cabo con NaOH 10N. Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, a 1 atmósfera de presión.

### 2.1 Medio líquido Luria-Bertani (LB o medio rico) (Sambrook y Russell, 2001).

La composición de este medio utilizado tanto para el cultivo de *E. coli*, *P. pseudoalcaligenes*, y KT2440, se detalla a continuación:

Bacto-triptona.....	10 g
Extracto de levadura.....	5 g
Cloruro sódico.....	5 g
Agua.....	Hasta 1 litro

### 2.2 Medio sólido LB-AGAR.

Al medio líquido LB se añadieron 15 gr de Bacto-agar por litro (Sambrook y Russell, 2001), que permite que el medio sea líquido a temperaturas entre los 50 y 55 °C. Los antibióticos se añadieron después de su esterilización y antes de que el medio solidificara. Cuando fue necesario, se añadieron los reactivos 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -Dgalactopiranosido (X-Gal) a una concentración de 0,2 mM e isopropil-1-tio- $\beta$ -galactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0,5 mM.

### 2.3 Medio mínimo líquido M9.

En algunas ocasiones se cultivó *Pseudomonas pseudoalcaligenes* en este medio, ajustado a un pH de 8,5; que contenía por litro:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3 g
NaCl.....	0,5 g
NaCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> .....	4,1 g
Solución trazas.....	2 ml

Toda la mezcla anterior se estilizó en autoclave, excepto las trazas, que se esterilizaron por filtración y contenían:

MgCl <sub>2</sub> .....	10,75 g,
CaCO <sub>3</sub> .....	2 g,
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O.....	6,16 g
FeSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O.....	4,75 g
ZnSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O.....	1,44 g
MnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O.....	1,12 g
CuSO <sub>4</sub> •5 H <sub>2</sub> O.....	0,25 g
CoSO <sub>4</sub> •7 H <sub>2</sub> O.....	0,28 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,06 g
51,3 ml de HCl 12 N.	

La solución de trazas del medio M9 se esterilizó por separado, sin el MgSO<sub>4</sub> y con sólo 4,5 g de FeSO<sub>4</sub>. El MgSO<sub>4</sub> y el resto del FeSO<sub>4</sub> se prepararon aparte, esterilizándose 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 fuente de carbono se añadió acetato de sodio 50 mM, malato 50 mM, glucosa o glicerol en función de las necesidades del experimento y como fuente de nitrógeno se añadió cianuro potásico, cloruro amónico o NOC-12 atendiendo también a las necesidades de los experimentos. Las concentraciones fueron variables.

Como medios de conservación y cultivo para las células competentes se utilizó medio SOC (Sambrook y Russell, 2001), que contenía por litro:

**SOC:**

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



## 2.4 Medios selectivos.

Cuando fue necesario, los medios fueron suplementados con antibióticos para seleccionar determinadas estirpe frente a otras. Los antibióticos fueron esterilizados por filtración y fueron almacenados a una concentración mil veces mayor que la necesaria en los cultivos. Estos se añadieron a los medios estériles una vez enfriados. En la tabla 5 se detallan todos los que fueron empleados y las concentraciones de almacenaje.

**Tabla 5. Antibióticos empleados en este trabajo.**

Antibiótico	Concentración stock 1000x (mg/mL)
Rifampicina	40
Ampicilina	100
Tetraciclina	12
Gentamicina	40
Kanamicina	50
Cloranfenicol	34

## 2.5 Condiciones de cultivo.

Todos los inóculos se iniciaron a partir de una siembra en estría en placas con medio LB-agar, con antibiótico de selección. Se partió de las estirpes originales conservadas en viales a -80 °C en medio líquido con un 20% de glicerol. Tomando una colonia aislada se realizaron cultivos líquidos también en presencia del antibiótico de selección. Las células de *E. coli* y *P. pseudoalcaligenes* se incubaron a 37 y 30°C, respectivamente, 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. 600nm) empleando un espectrofotómetro Helyos β (Termo Spectronics).

### **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 un medio básico proporcionado por el reactivo B de Nessler, el amonio presente en el medio reacciona con ioduro de mercurio y el ioduro potásico del reactivo A de Nessler. El color resultante puede abarcar desde el amarillo, característico de bajas concentraciones de nitrógeno amoniacal (0,4 a 5 mg/l), al pardo rojizo que indica niveles cercanos a los 500 mg/l.

A 980 µl de la muestra problema se le añaden 20 µl de mezcla a partes iguales de reactivo de Nessler A y B (Panreac). La absorbancia a 420 nm se interpoló en una recta patrón obtenida con NH<sub>4</sub>Cl.

Esta determinación fue utilizada para seguir 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.*, 2005a). El cianuro libre reacciona con Cloramina-T a pH 8 originando cloruro de cianógeno, reaccionando éste posteriormente con piridina para dar lugar al ácido glutacónico. Este último, en presencia de ácido barbitúrico da lugar a la aparición de un compuesto coloreado cuya determinación colorimétrica es posible a 578 nm.

A 1 ml de muestra diluida convenientemente (para una concentración inicial de 2 mM es necesario diluir unas 250 veces), se añadieron 40 µl de cloramina T al 1 % (p/v) y se incubó durante 1 min. Transcurrido este tiempo se añadieron 120 µl 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 células cultivadas en su presencia y para valorar la evaporación de la forma protonada.

### **3.3 Determinación de la concentración de proteínas.**

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford, que permite cuantificar proteínas totales debido a las propiedades del colorante azul Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford, 1976). Este colorante se une a proteínas mediante interacciones hidrofóbicas cambiando su máximo de absorción desde 465 nm hasta 595 nm. La intensidad del color a 595 nm es proporcional a la concentración de proteínas. En presencia de detergentes o para la determinación de proteínas de membrana no es adecuado usar este método debido a la gran cantidad de interferencias que se producen. A 1 ml del colorante comercial (BioRad) diluido 5 veces se añadieron 20 µl de muestra convenientemente diluida, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia de la muestra a 595 nm. La concentración de proteínas se determinó utilizando como patrón una solución de seroalbúmina bovina (BSA, BioRad).

## **4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACELULARES.**

### **4.1 Recolección de células.**

Las células de *P. pseudoalcaligenes* y *P. putida* se recogieron por centrifugación a 4°C durante 15 minutos a 10000 rpm en una centrífuga Avanti J-25 (rotor JA-14), resuspendiéndose posteriormente en tampón Tris/HCl 50 mM pH 8. Este proceso se repitió hasta en dos ocasiones para eliminar posibles restos procedentes del medio de cultivo. Finalmente, las células se

resuspendieron en 3,5 mL de tampón conteniendo 50 mM de Tris/HCL pH 8 e inhibidor de proteasas (Roche). Los extractos se conservaron a -20 °C hasta su uso.

#### **4.2 Preparación de extractos acelulares.**

Las células destinadas a medidas de actividad enzimática se rompieron por diferencia de presión en prensa de French, ya que es un método muy reproducible, y además genera muy poco calor lo cual evita en gran medida la desnaturalización proteica, el proceso se llevó a cabo a una presión aproximada de 68 atm (mini-cell de Thermo Spectronic). Se usó la prensa “mini cell”, ya que el volumen en ningún caso fue superior a los 4 mL. Los extractos posteriormente se centrifugaron durante 15 minutos a 10000 rpm en una centrifuga eppendorf 5810 (Rótor F-34-6-38) a 4°C para eliminar restos celulares, conservando el sobrenadante.

Por el contrario, las células destinadas a medidas de actividad respiratoria fueron rotas en sonicador. Las condiciones fueron 3 repeticiones de 30 segundos, con un minuto entre repetición, a la máxima potencia y con una eficiencia del 33%. Durante el proceso se mantuvo en hielo el material biológico para evitar un calentamiento excesivo. El tratamiento posterior fue exactamente igual al indicado anteriormente en células tratadas en la prensa de French.

### **5. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.**

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la desaparición de 1  $\mu$ mol de sustrato, o la aparición de 1  $\mu$ mol de producto, por minuto.

#### **5.1 Actividad respiratoria en extractos acelulares.**

Tras obtener extractos acelulares se calculó la actividad NADH deshidrogenasa que poseían. La oxidación del compuesto se determina espectrofotométricamente (Helyos  $\beta$  de Thermo Spectronics) al determinar la

variación de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm, a una temperatura estabilizada de 30 °C. La mezcla de reacción presentó concentraciones de 50 mM de tampón Tris-HCl, pH 8; 0,14 mM de NADH, que da lugar a una D.O. 340 nm inicial de aproximadamente 1,0 debido a que su coeficiente de extinción molar es de  $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; y la cantidad adecuada de extracto (entre 15 y 100  $\mu\text{L}$  en función de su concentración) para que el descenso de absorbancia por unidad de tiempo no fuera mayor de  $0,1 \text{ min}^{-1}$ , evitando así subestimar la actividad enzimática.

## 6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

### 6.1 Plásmidos.

Se usaron plásmidos con unas características específicas, para su uso en distintas funciones, como la clonación de secuencias de DNA, mutagenizar genes de *P. pseudoalcaligenes*, y expresar homóloga y heterológamente genes *cio*. El resumen de los plásmidos utilizados en este trabajo se muestra en la Tabla 6.

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

Plásmido	Descripción	Referencia
pGEM-T Easy	Vector de clonación de productos de PCR (Promega), no replica en <i>P. pseudoalcaligenes</i> ( $\text{Ap}^r$ )	-
pVLT31	Vector de clonación, replica en <i>P. pseudoalcaligenes</i> ( $\text{Tc}^r$ ).	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1993)
pVLT33	Vector de clonación, replica en <i>P. pseudoalcaligenes</i> ( $\text{Km}^r$ ).	
pBluescriptSKII (-)	Vector de clonación (Stratagene) ( $\text{Ap}^r$ )	Stratagene
pKl8mob	Vector para mutagénesis, no replica en <i>P. pseudoalcaligenes</i> ( $\text{Km}^r$ )	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)

**Tabla 6. Continuación**

pGcio2	pGEMT-Easy con el fragmento <i>cio2</i> bajo control del promotor Lac.	
PGcio3	pGEMT-Easy con el fragmento <i>cio3</i> bajo control del promotor Lac.	Este trabajo
pGaph(3')	Vector pGEM-T Easy que contiene el gen <i>aph(3')</i> . Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	
pLE4.2	pBSKII+ con el extremo del gen <i>mocR</i> clonado (fragmento EcoRI-Sall de la secuencia AM 115695)	(Quesada <i>et al.</i> , 2007)
pMS255	Vector pMS255 que contiene el gen <i>aacC1</i> . Ap <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	Becker <i>et al.</i> , 1995)
pKmocR	pKI8mob con el gen <i>mocR</i> recuperado desde pLE4.2	
pKΔ <i>mocR</i> (+)	pKmocR con el gen <i>mocR</i> interrumpido por el casete <i>aacC1</i> en orientación no polar con respecto al operón	Este trabajo
pKΔ <i>mocR</i> (+)	pKmocR con el gen <i>mocR</i> interrumpido por el casete <i>aph(3')</i> en orientación no polar con respecto al operón	
pVLT33 <i>cio2</i>	PvLT33 con el operón <i>cio2</i> controlado por LacI	
pVLT33 <i>cio3</i>	PvLT33 con el operón <i>cio3</i> controlado por LacI	

## 6.2 Extracción de DNA plasmídico.

Para la extracción de DNA plasmídico se utilizó el kit “*High Pure Plasmid Isolation Kit*” de Roche, siguiendo las instrucciones del fabricante que se detallan a continuación. Las muestras de DNA plasmídico se almacenaron a -20 °C.

**Protocolo**

---

1. Centrifugar de 0.5-4 mL de cultivo, con  $D.O_{600nm}$  de 1.5-5.0, durante 30 segundos a 6000x g. Descartar el supernadante.
  2. Resuspender el pellet en 250 $\mu$ L de tampón/RNasa.
  3. Añadir 250  $\mu$ L de tampón de lisis. Mezclar por inversión de 3 a 6 veces, nunca hacer uso de vortex. Incubar durante 5 minutos a una temperatura entre 15-25 °C. (Es muy importante respetar el tiempo señalado).
  4. Tratar la solución lisada con 350  $\mu$ L de tampón binding. Mezclar por inversión, de 3 a 6 veces.
  5. Incubar en hielo durante 5 minutos. (Se debe formar un precipitado floculante blanco).
  6. Centrifugar a 13000 x g durante 10 minutos aproximadamente.
  7. Pasar la solución por la columna y centrifugar durante 1 minuto. Descartar el filtrado.
  8. Añadir 500  $\mu$ L de tampón de lavado I y volver a centrifugar durante un minuto descartando el filtrado.
  9. Añadir 700  $\mu$ L de tampón de lavado II, y centrifugar durante 60 segundos y eliminar el filtrado.
  10. Centrifugar 1 minuto más para eliminar posibles restos.
  11. Añadir 100  $\mu$ L de tampón de elución a la columna y recuperar el filtrado.
- 

**6.3 Extracción de DNA genómico.**

Al igual que las muestras de DNA plasmídico, el DNA genómico se almacena a -20°C, una vez llevada a cabo su extracción, haciendo uso del sistema comercial de extracción de DNA genómico *GNOME (QBIOgene<sup>R</sup>)*.

**Protocolo**

---

1. Tras haber crecido durante toda la noche, centrifugar 5 mL de cultivo, y resuspender el pellet en 1.85 mL de solución de suspensión celular, mezclándose hasta obtener una solución homogénea.
  2. Añadir 50  $\mu$ L de mezcla de RNasa.
  3. Añadir 100  $\mu$ L de solución de lisis, mezclar bien, e incubar a 55°C durante 15 minutos.
  4. Añadir 25  $\mu$ L de mezcla de proteasa, y mezclar enérgicamente. Incubar a 55°C durante 45 minutos.
  5. Añadir 500  $\mu$ L de la mezcla "salt out". Enfriar a 4°C durante 10 minutos.
  6. Centrifugar 10 minutos a 10000 x g. Recoger cuidadosamente el supernadante, añadir 2 mL de TE y mezclar.
  7. Posteriormente añadir 8 mL de etanol 100%. Centrifugar durante 15 minutos a 1000-1500 x g. Eliminar el exceso de etanol secando al aire.
  8. Disolver el DNA genómico en TE.
-

#### 6.4 Extracción del RNA total.

La extracción del RNA se llevo a cabo según las recomendaciones del fabricante del kit “*Aurum<sup>TM</sup> Total RNA Mini Kit*” de Biorad, que se detallan a continuación. Las muestras de RNA se sometieron posteriormente a un tratamiento con DNAasa I con el fin de eliminar la contaminación residual de DNA genómico. Para ello se utilizó el *kit Turbo DNA-free<sup>TM</sup>* de Ambion. Las muestras se mantuvieron durante un par de horas a -20 °C y posteriormente se pasaron a -80°C.

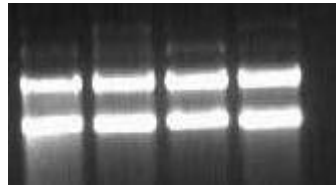
##### **Protocolo**

---

1. El volumen de células recogidas, que será la cantidad de células para obtener 3 UDO, se centrifuga 10 minutos a 10000 rpm, se elimina el sobrenadante y al pellet se le añaden 100 µL de lisozima en TE (10 mM Tris, 1mM de EDTA, pH 7,5). Resuspender el pellet pipeteando vigorosamente.
  2. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
  3. Añadir 100 µL de lisozima.
  4. Añadir 350 µL de solución de lisis, pasarlo a un eppendorf de 2 mL y pipetear vigorosamente para reducir la viscosidad.
  5. Añadir 250 µL de isopropanol 70%, pipetear hasta apreciar que la viscosidad ha sido considerablemente reducida.
  6. Introducir el tampón de elución en el baño térmico a 70 °C.
  7. Insertar las columnas en eppendorf.
  8. Introducir el lisado en la columna de RNA, centrifugar 30 segundos, y decantar el filtrado.
  9. Añadir 700 µL de solución de low stringency wash, centrifugar 30 segundos. Descartar la solución de lavado.
  10. La DNasa se prepara a partir de stock preparado anteriormente. Introducir en cada eppendorf 80 µL e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
  11. Añadir 700 µL de solución high stringency a la columna de RNA. Centrifugar 30 segundos. Descartar la solución.
  12. Añadir 700 µL de solución low stringency a la columna. Centrifugar 1 minuto. Descartar el filtrado y volver a centrifugar durante 2 minutos para eliminar restos.
  13. Pipetear 80 µL de la solución de elución en la membrana, y dejar durante 1 minuto que la solución saturate las membranas. Centrifugar 2 minutos para eluir el RNA total.
- 

En la Figura 9 se aprecia la electroforesis de 4 RNAs sin haber sido aún purificados, donde en la parte superior de la figura se aprecian restos de DNA genómico.





**Figura 9. Electroforesis de la extracción del RNA.**

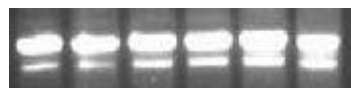
## 6.5 Tratamiento con DNasa.

### **Protocolo**

---

1. La purificación se hace en un volumen total de 50 $\mu$ L, partiendo de 5 $\mu$ g de RNA.
  2. Añadir Tampón Turbo DNasa 10X.
  3. Añadir 1  $\mu$ L de DNasa (2U), y completar con agua miliQ estéril tratada con DEPC.
  4. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
  5. Añadir 5  $\mu$ L de reactivo inactivante.
  6. Incubar durante dos minutos a temperatura ambiente, mezclando ocasionalmente.
  7. Centrifugar a 4°C, a 10000 x g durante 2 minutos.
  8. Recuperar el DNA con cuidado de no tocar el reactivo inactivante.
- 

El aspecto general de la extracción de RNA tras haber sido tratado con DNasa es tal y como se muestra en la Figura 10.



**Figura 10. RNA extraído y purificado.** En las Figuras se aprecian los RNAs 25S y 16S.

## 6.6 Determinación de la concentración de DNA y RNA.

Para determinar la concentración de DNA o RNA se utilizó el método de cuantificación mediante comparación de intensidad de fluorescencia de bandas en geles de agarosa al 0,8% teñidos con el colorante no tóxico Gel Red Nucleic Gel Acid Stain (Biotium) (Sambrook y Russell, 2001), comparando con varios patrones de concentración conocida cargados en el gel. La estimación de la pureza del DNA o RNA se obtiene por la relación entre las D.O a 260 nm y 280 nm ( $A_{260nm}/A_{280nm}$ ). En general se acepta que un DNA o RNA es puro cuando el

cociente es  $\sim 1,8$  y  $\sim 2,0$  respectivamente, un valor inferior de estos cocientes por debajo de 1.8 es indicativo de contaminación por proteínas y/o polisacáridos (Kalb *et al.*, 1977). Para valorar la concentración de DNA de doble cadena se consideró un coeficiente de extinción a 260 nm de 0,02 mL/( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}$ ) (Cardenas, 1988).

### **6.7 Retrotranscripción (RT) del RNA.**

Para el proceso de retrotranscripción se usó el iScript cDNA Synthesis Kit, siguiendo los pasos del fabricante. El protocolo aparece especificado a continuación.

#### ***Protocolo***

---

1. Mezclar 2  $\mu\text{L}$  de iScript reaction mix, 0.5  $\mu\text{L}$  de reverse Transcriptase, el RNA y agua hasta 5  $\mu\text{L}$ . De cada muestra se lleva a cabo la retrotranscripción de un control negativo (sin añadir retrotranscriptasa).
  2. Incubar la reacción:
    - 5 minutos a 25 °C.
    - 30 minutos a 42 °C.
    - 5 minutos a 85 °C.
- 

### **6.8 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.**

Los segmentos de DNA y RNA se visualizaron en geles de agarosa (Sambrook y Russell, 2001). Por calentamiento, se disuelven 0,8 g de agarosa en 100 mL de tampón TBE 1X (Tris base 20 mM, ácido bórico 5mM y EDTA 0.5 mM. pH 7.8). Por cada 100 mL de gel se añaden 10 $\mu\text{L}$  del compuesto no tóxico *Gel Red Nucleic Gel Acid Stain* (Biotium), que permite la visualización por fluorescencia del DNA o RNA según corresponda, al iluminarlo con luz UV.

A las muestras se les añadió tampón de carga, que se almacena 10 veces concentrado y que está compuesto por 2 colorantes: azul de bromofenol al 0,25 (p/v) y glicerol al 50% (v/v) en tampón TBE. La electroforesis se llevó a cabo en las cubetas horizontales Sub-Cell GT MINI y Sub-Cell GT WIDE MINI de Biorad, con un voltaje constante entre 40-60 V durante el tiempo necesario

para visualizar correctamente todas las bandas. Como marcadores de peso molecular se han utilizado:

-DNA del bacteriófago A digerido con HindIII de Roche (fragmentos de 23.130, 9.416, 6.557, 23.22, 2.027 y 564 pb).

-100 bp DNA Ladder de invitrogen (un primer fragmento de 2072 pb seguido por otro de 1500, y desde aquí de 100 en 100 pb).

-1 kb DNA Ladder de invitrogen (fragmentos desde 12 kb hasta 1 kb y después de 850, 650, 500, 400, 300, 200 y 100 pb).

-1 kb Plus DNA Ladder de invitrogen (fragmentos de 12, 5, 2, 1.65, 1 kb y después 850, 650, 500, 400, 300, 200 y 100 pb).

El DNA se visualizó iluminado los geles con luz ultravioleta de 220 nm. Se fotografiaron con el digitalizador de imágenes Visible-UV Biorad Chemi Doc provisto del software Quantity One 4.3.1 necesario para su manejo, proporcionado por la misma casa comercial.

### **6.9 Purificación de DNA de soluciones y de geles de agarosa.**

Para purificar fragmentos de PCR o algunas secuencias de interés se recuperaron a partir de geles de agarosa al 0,8%. Se cortó la sección del gel que contenía la banda con una punta de bisturí estéril y se transfirió a un tubo tipo eppendorf. Se empleó posteriormente el kit "Speedtools PCR clean-up kit" de biotools.

#### ***Protocolo***

---

1. Para la lisis del gel se añaden 200  $\mu$ L de Tampón B por cada 100 mg de gel, y posteriormente incubar a 50 °C hasta la disolución del gel.
  2. Cargar todo el lisado en una columna y se centrifuga a 11000 x g durante un minuto.
  3. Eliminar el lisado, añadir 600  $\mu$ L de tampón T3 y centrifugar un minuto a 11000 x g.
  4. Eliminar de nuevo el lisado y se centrifuga 2 minutos a 110000 x g para secar la membrana. De nuevo eliminar el lisado.
  5. Para la elución del DNA purificado añadir 15-50  $\mu$ L de tampón E (70°C), se incubaba un minuto a temperatura ambiente, y por último centrifugar 1 minuto a 11000 x g.
-

### **6.10 Digestión del DNA con enzimas de restricción.**

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas, fijadas por el fabricante para cada enzima, suministradas por las casas Invitrogen y Fermentas. Las reacciones se llevaron a cabo en volúmenes de entre 10-50  $\mu$ L; cuando se realizaron digestiones con más de una enzima se utilizó un tampón compatible a la concentración adecuada.

### **6.11 Defosforilación de los extremos de las moléculas de DNA.**

Los extremos fosforilados de un plásmido, generados tras una digestión enzimática simple se defosforilaron, para impedir la autoligación, mediante la acción de la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP, Roche). Se añadió 1 U de fosfatasa alcalina por cada 5-10 pmoles de extremos 5'. La reacción se incubó a 37°C durante 30 min en presencia del tampón adecuado según las instrucciones recomendadas por el fabricante. La reacción se detuvo mediante la adición de EDTA 0,5 M pH 8,0.

### **6.12 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 los DNA en un volumen final de 10  $\mu$ l completado con H<sub>2</sub>O. Las ligaciones de fragmentos con extremos romos se llevaron a cabo durante 24 h a 14°C. Las ligaciones con los fragmentos cohesivos se realizaron a 22°C durante 4 ó 5 horas. La relación molar plásmido/inserto se varió según el tamaño de éstos y según el tipo de extremos (romos o cohesivos) considerando que las condiciones ideales incluyen 20-60 fmol de vector y una relación molar de inserto/vector de entre 1-3 veces para las ligaciones con extremos cohesivos y entre 1-5 veces para las ligaciones con extremos romos (Sambrook *et al.*, 1982).

## 6.13 Transformaciones.

### 6.13.1 Preparación de células competentes (Choi et al., 2006).

Este protocolo, que se llevó a cabo en esterilidad, se utilizó tanto para transformaciones de *E. coli* como de todos los tipos de *Pseudomonas*.

#### **Protocolo**

---

1. Preparar sacarosa 300 mM, esterilizando por filtración.
  2. Preparar un preinóculo líquido con el antibiótico correspondiente, e incubar toda la noche, a la temperatura correspondiente. (37 °C para *E. coli* y 30 °C para *Pseudomonas*).
  3. Inocular un matraz con 250 mL de medio LB, y ajustar la D.O<sub>600nm</sub> de 0,1. Incubar a la temperatura adecuada hasta alcanzar una D.O<sub>600nm</sub> de 0,600 UDO.  
NOTA: A partir de este momento todo el proceso se realizará en frío.
  4. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
  5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 250 mL de sacarosa 0.3 M.
  6. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
  7. Repetir los pasos 5 y 6.
  8. Resuspender en 25 mL de sacarosa 0.3 M fría y centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
  9. Eliminar todo el sobrenadante y resuspender en 1.25mL de sacarosa 0.3M.
  10. Alicuotar en volúmenes de 100 µL.
  11. Conservar a -80°C.
- 

### 6.13.2 Transformación por electroporación (Sambrook y Russell, 2001).

Todo el proceso se lleva a cabo en condiciones estériles. Las cubetas de electroporación (Biorad) de 0,2 cm se mantienen en frío. Las condiciones de electroporación son 25 µF de capacitancia, 2,5 Kv con una resistencia de 200 ohm, que se fijan en un equipo Micropulser (Biorad). Se añaden de 10 pg y 25 ng de DNA al vial de 100 µL de células competentes previamente descongeladas (ya que se conservan a -80°C) se homogeniza bien, y se transfiere esta mezcla de células y DNA a la cubeta, se tapa, se seca la condensación exterior de la cubeta y se coloca en el dispositivo de electroporación suministrándole el pulso eléctrico. La constante temporal tras el pulso que ha de registrarse es de entre 4 y 5 milisegundos con una intensidad

de campo eléctrico de 12,5 kV/cm. Tras electroporar, se añaden 900  $\mu$ L de medio SOC, compuesto por 2% de bacto triptona, 0,5% de extracto de levadura, 10mM de NaCl, 2,5mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $MgSO_4$  y 20 mM Glucosa, a temperatura ambiente. Las células electroporadas y mezcladas con el medio SOC son transferidas a un tubo de ensayo donde se incuban en agitación una hora en el caso de *E. coli*, y dos horas para *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, a 37°C y 30°C respectivamente. Una vez transcurrido este tiempo, se siembran 100  $\mu$ L en LB-agar con el antibiótico correspondiente. Tras dejar que el medio líquido sea absorbido por el agar, se incuba el tiempo necesario a la temperatura adecuada.

### **6.13.3 Selección de colonias recombinantes.**

Para diferenciar las bacterias transformantes que han incorporado el plásmido recombinante de las que han incorporado el plásmido sin inserto se usó el método de la complementación del fragmento *a* de la  $\beta$ -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 la bacteria huésped exprese el otro fragmento de la  $\beta$ -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  $\beta$ -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).

## 6.14 Amplificación del DNA.

### 6.14.1 Amplificación del DNA mediante PCR convencional.

Este método se utilizó con distintos fines: la obtención de fragmentos de DNA para su posterior clonación, o para estudios de expresión génica.

Las secuencias de los distintos oligonucleótidos empleados como cebadores en las reacciones de PCR, diseñados con el programa OLIGO 6 y encargada su síntesis a una casa comercial (StabVida), se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'—3'</b>	<b>Descripción</b>
<b>Oligonucleótidos utilizados para estudios de expresión génica de los tres operones <i>cio</i></b>		
A	TCACCATCGGGCTGGCAACG	Amplificación de <b><i>cioA1</i></b> para estudios de expresión génica
B	GCAGTGGGCCGGTAATGCTG	
C	CATGCTGTTCGGCTGGAATC	Amplificación de <b><i>cioA2</i></b> para estudios de expresión génica
D	GCCCGTCGATGATCTCGAAC	
E	GGCCTTCCTGCTGGCGATCA	Amplificación de <b><i>cioA3</i></b> para estudios de expresión génica
F	GCGGCGCACCGAAGATGTCA	
G	CGGCGGACGGGTGAGTAATG	Amplificación de <b>16S</b> RNA
H	CGGATCGTCGCCTTGGTGAG	
<b>Oligonucleótidos utilizados para estudios de expresión génica de la región <i>cio</i></b>		
3	GCTGCGCTCCCGAACCTGT	Estudio de expresión de <i>serC</i>
4	CGCGCAGGTCCCGACTCATC	
10	TCATGGGATCGACCGGAGAG	Estudio de expresión de <i>dapA</i>
11	GTGCGGCTTGGAACGTCGTA	
13	TCGCGTCGTTCTTCAAGGTA	Estudio de la expresión de <i>ppsal_1885</i>
14	CATCGGCGGCATCTTCATTC	

**Tabla 7. Continuación**

15	CAGACGCCCTCCTTGAAAC	Estudio de la expresión de <i>metF</i>
16	GTGAATCGCGTGCTGAAAC	
17	TCTGCTCACGCCAAAGGAAG	Estudio de la expresión de <i>cysM</i>
18	ACCCGACGACGCTCCACAAA	
19	CGACTTTCGGCGGTATCAAC	Estudio de la expresión de <i>maeB</i>
20	ATCGTGCTCGGGATTGGTTA	
21	GCGCTCCCACAGTCGATGCT	Estudio de la expresión de <i>nit4</i>
22	TCTCCGGTCCTTGCGTCTTG	
1	GACTGGTTGACGCCGTTCTC	Estudio de la expresión entre los genes <i>cioB-serC</i>
4	CGCGCAGGTCCCGACTCATC	
2	GGGCATCGTCGCGCTCGGTA	Estudio de expresión entre los genes <i>cioC-serC</i>
4	CGCGCAGGTCCCGACTCATC	
3	GCTGCGCTCCCGGAACCTGT	Estudio de expresión entre los genes <i>serC-hisC</i>
5	TAGGGTGCCAGGCGATGAAC	
6	CTGGCCGCCAATCCGAATGT	Estudio de la expresión entre los genes <i>hisC-argD</i>
7	GAAGTGGGTATGCCGAATCT	
8	CGGCATACCCACTTCGTTTC	Estudio de la expresión entre los genes <i>argD-dapA</i>
9	GTGCGGCTTGGAACGTCGTA	
12	AGCGCTCTTCATCGAGTCCA	Estudio de la expresión entre los genes <i>dapA-ppsa_1885</i>
14	CATCGGCGGCATCTTCATTC	
13	TCGCGTCGTTCTTCAAGGTA	Estudio de la expresión entre los genes <i>ppsa_1885-metF</i>
16	GTGAATCGCCGTGCTGAAAC	
15	CAGACGCCCTCCTTGAAAC	Estudio de la expresión entre los genes <i>metF-cysM</i>
18	ACCCGACGACGCTCCACAAA	
17	TCTGCTCACGCCAAAGGAAG	Estudio de la expresión entre los genes <i>cysM-maeB</i>
20	ATCGTGCTCGGGATTGGTTA	
19	CGACTTTCGGCGGTATCAAC	Estudio de la expresión entre los genes <i>maeB-nit4</i>
22	TCTCCGGTCCTTGCGTCTTG	



Tabla 7. Continuación

<b>Oligonucleótidos utilizados para la complementación de <i>cio2</i> y <i>cio3</i></b>		
72U23	CT <b>GAATTC</b> TGTGGCTCGGCTTTG	<i>Cio2</i> - EcoRI
2972L23	GG <b>GGATCC</b> TTGGCTAGCGACGAA	<i>Cio2</i> - BamHI
17U23	CACTGCAGGCATTGATCCGCTAA	<i>Cio3</i> up sin enzima de restricción polilinker sacI
3489L23	<b>GAAGCTT</b> GCGTTCAGGCCGTTTCG	<i>Cio3</i> low con enzima hindIII
<b>Amplificación del cassette de resistencia a kanamicina <i>aph(3')</i></b>		
3U23	GCT <b>GGATCC</b> TGCCGCAAGCACTC	Amplificación del gen <i>aph(3')</i> para la construcción del mutante MocR+T. BamHI
1607L23	AAG CT <b>GGATCC</b> TTGTAAA CCG TT	
<b>Amplificación del casete de resistencia a gentamicina <i>aacC1</i></b>		
gent-upper	CCCTGAG <b>GAATTC</b> GAGCTCGG	Dianas <b>EcoRI</b> y <b>BamHI</b>
gent-lower	<b>CCCGGGGATCCTCTAGAGT</b> CG	Dianas <b>XmaI</b> , <b>SmaI</b> , <b>BamHI</b> y <b>XbaI</b>
<b>PCRI sobre el plásmido <i>pKmocR</i></b>		
355 up	CC <b>GGATCC</b> CAGTACCAGGATG	Diana <b>BamHI</b>
469 low	CG <b>GGATCC</b> ATCTCACCATGCT	Diana <b>BamHI</b>
<b>Oligonucleótidos utilizados para estudios de expresión génica de otras oxidasas</b>		
254U23	GCCTGCTGCCGGGCTATGAGGAT	Estudio de la expresión de la oxidasa <i>cbb<sub>3</sub>-2</i>
351L23	CCTCGATGGGCATGGCGGCATAT	
290U23	AGACCCCTTTTCGCTGCCGGTGTA	Estudio de la expresión de la oxidasa <i>cbb<sub>3</sub>-1</i>
417L23	CCTCGATGGGCATGGCAGCGTAC	
55U23	GCGCATGCCAGTGGACGGTGAA	Estudio de la expresión la oxidasa <i>aa<sub>3</sub></i>
163L23	CAGAACATGGCGCCGAACACGAT	
<b>Oligonucleótidos utilizados para estudios de expresión génica de real time PCR</b>		
428U20	CATCGCTTACGCTCGTTCTG	Amplificación de <i>orf2</i> para estudios de expresión génica
479L20	CATCGGCGGCATCTTCATTC	
675U20	CCCCAGCATCTTCCGTCCAG	Amplificación de <i>cysM</i> para estudios de expresión génica
776L20	ACCCGACGACGCTCCACAAA	
145U20	CTGGCCGCCAATCCGAATGT	Amplificación de <i>maeB</i> para estudios de expresión génica
197L20	GCCATCGGGATAGCGGGTAA	

**Tabla 7. Continuación**

767U21	GGCAGCCGTTCAACGTCAACA	Amplificación de <i>hisC-argD</i> para estudios de expresión génica
853L21	TTTCAAGCCCTGCCGGTTCAC	

La reacción de PCR contiene además del DNA a amplificar, (1 µL de cDNA), y la polimerasa Ecotaq (Ecogen), los cebadores correspondientes (100nm-500nm), una mezcla equimolecular de desoxinucleótidos (dNTP's) (Bioline), MgCl<sub>2</sub> y el tampón especificado por la casa comercial en un volumen final de 20 µL.

Los parámetros de la reacción de PCR se eligieron en función de los tamaños de los fragmentos de DNA a amplificar, temperatura de hibridación de los cebadores y tiempo de elongación. Al concluir la reacción, el tamaño y la calidad de los productos se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### 6.14.1.1 Diseño de la técnica de PCR para amplificar el gen *aph(3')*.

El gen *aph(3')*, que confiere resistencia a kanamicina, se amplificó a partir de DNA plasmídico del vector pVLT33 (10 ng) con los oligonucleótidos 3U23 y 1607L23. En este caso se hizo uso de "PCR extender system" (PRIME) Las condiciones de PCR usadas fueron: 3 min a 94°C, seguidos por 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 61,6 °C y 2 min a 68°C; y una extensión final de 10 min a 68°C. Se obtuvo un fragmento de 1627 pb, que posteriormente se clonó en pGEM-T Easy originándose el plásmido pGEM-TE *aph(3')*.

#### 6.14.1.2 Diseño de la técnica de PCR para amplificar los genes *cio2* y *cio3*.

Para estos dos genes se hizo uso de la polimerasa PCR extender polymerase. Se amplificaron a partir de genómico (20 ng), 500 nm de oligonucleótidos 17U23 y 3489L23. Las condiciones de PCR fueron 94°C durante dos minutos, seguidos por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, y 4 min30s a 68°C, los fragmentos amplificados son de 3004 y 3495 pb,

respectivamente, posteriormente se clonaron en PGEM-TE, originándose los plásmidos pGcio2 y pGcio3.

#### 6.14.1.3 Diseño de la técnica de PCR para amplificación de la región cio.

Para esta región, se hizo uso de la EcoTaq polimerasa, con una concentración 500 nM de los oligonucleótidos indicados en el apartado de la tabla 7. Las condiciones de PCR se establecieron según los tamaños de los fragmentos a amplificar: 3min a 94°C, 15 ciclos que constan de las etapas: 30 seg a 94°C, 30 seg a 62°C y 5 min a 72 °C, y otros 15 ciclos que constan de las etapas: 30 seg a 94°C, 30 seg a 62°C, y 5 min a 72°C, en esta última etapa en cada ciclo aumentamos 20 segundos más.

Para los fragmentos menores de 1kb, la PCR constaba de las etapas: 3 min a 94°C, y 25 ciclos divididos en 30 seg a 94°C, 30 seg a 62 °C y 1 min a 72 °C. Por último, una etapa de 10 min a 72°C.

#### 6.14.1.4 Diseño de la técnica de PCR para amplificación de los operones cio1, cio2 y cio3.

Para estos operones, se hizo uso de la EcoTaq polimerasa, con una concentración 200 nm de oligonucleótidos correspondientes, que fue previamente optimizada. Las condiciones de PCR se establecidas fueron: 94°C durante 1 min, y 30 ciclos compuestos de 94°C durante 1 min, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 5 min; por último una etapa de 72 °C durante 5 minutos.

#### 6.14.1.5 Diseño de la técnica de PCR para amplificación de las oxidasas cbb<sub>3</sub>, y aa<sub>3</sub>

Para estas oxidasas, se hizo uso de la EcoTaq polimerasa, con una concentración 100 nm de oligonucleótidos para las oxidasas cbb<sub>3</sub>, 200 nm para la oxidasa aa<sub>3</sub>, 500 nm para la rodanasa. Las condiciones de PCR se establecidas fueron: 94°C durante 1 min, y 30 ciclos compuestos de 94°C

durante 30 seg, 72°C durante 1 min 30 segundos. Para el caso de las oxidasas aa<sub>3</sub>, los ciclos establecidos fueron 25.

#### **6.14.2 PCR de colonias.**

El análisis rutinario de las colonias transformante se realizó mediante PCR de colonias. Con el asa de platino se seleccionaron las colonias necesarias, y se disgregaron en 250 µL de tampón TE (Tris-HCl 10mM y EDTA 1 mM pH 8), que se incubó a 96 °C durante 5 minutos en un termo-bloque. Posteriormente, para separar el DNA de los demás fragmentos celulares, se centrifugó a 10000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5804 Rotor F-34-6-38) durante 10 minutos a 4 °C. Por último el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo para su análisis.

#### **6.14.3 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR cuantitativa).**

La PCR cuantitativa es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de DNA o mRNA de una muestra. La PCR en tiempo real puede amplificar fragmentos muy pequeños (desde 60 pb) lo que la hace ideal para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas o experimentales, así como para la cuantificación de niveles de mRNA en muestras de tejidos con RNA parcialmente degradado (Bustin, 2002). El producto de PCR se mide al final de cada ciclo. Para poder llevar a cabo la cuantificación es necesaria la presencia de dos componentes: Elementos ópticos integrados en el equipo y marcadores fluorescentes que proporcionan información acerca de la amplificación a lo largo de los ciclos de la PCR (Heid *et al.*, 1996).

Hay dos tipos principales de marcadores fluorescentes: genéricos y específicos. Las técnicas que usan los marcadores específicos emplean sondas de ácidos nucleicos que se unen a productos de PCR específicos, y presentan la ventaja de ser muy precisos y evitar posibles secuencias inespecíficas presentes en el producto de PCR, por el contrario el inconveniente es que se necesita un diseño de secuencias específicas para su

uso como sondas y por consiguiente más laborioso y costoso (Lee *et al.*, 2004). Los colorantes genéricos, sin embargo, se unen a todas las secuencias de doble cadena de DNA en una reacción de PCR. Una vez que el colorante se une al ácido nucleico formado en la reacción, éste emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real (Walker, 2002). Por lo tanto, un aumento del producto de la PCR conduce a un aumento de la fluorescencia detectada en cada ciclo de la PCR, que es lo que permite que las concentraciones de cDNA puedan ser cuantificadas (Ririe *et al.*, 1997). Los marcadores genéricos más utilizados son los colorantes SYBR® Green (Lee *et al.*, 2004). Estos marcadores presentan la ventaja de que son más baratos y además son distribuidos como cócteles listos para usar (Giglio *et al.*, 2003; Ririe *et al.*, 1997), la desventaja que presentan es que al unirse al total de ácidos nucleicos en la reacción de PCR, emiten una señal luminosa tanto para productos específicos como para los que no lo son (dímeros de cebadores), por ello, al final de los ciclos de la PCR cuantitativa a tiempo real se genera una curva de fusión para comprobar la uniformidad del producto generado, que permite eliminar productos no específicos amplificados (Ririe *et al.*, 1997), la identificación de los productos específicos se realiza conociendo la temperatura de fusión que se expresa en una curva cuya forma se relaciona con el contenido de GC, tamaño de los productos amplificados y la secuencia de los mismos (Ririe *et al.*, 1997). Para poder discriminar los productos específicos de la PCR es necesario saber que estos se disocian a una temperatura más alta que los artefactos como los dímeros de los cebadores (Ririe *et al.*, 1997).

Los resultados de la PCR en tiempo real se basan en la detección y cuantificación de los marcadores fluorescentes a lo largo de la reacción de PCR. Esto permite conocer la cantidad de fluorescencia emitida durante la fase exponencial de la reacción, donde un aumento significativo del producto de la PCR se correlaciona con la cantidad inicial de DNA o cDNA en estudio (Walker, 2002). Para obtener estos resultados, los valores umbral de ciclo ( $C_t$ ) deben ser obtenidos. Los valores  $C_t$  son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la reacción de PCR. El valor de  $C_t$

está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido. Es importante considerar que un valor de  $C_t$  superior a 40 ciclos indica que no hay amplificación y por consiguiente no deben incluirse en los cálculos. Los criterios más importantes para la optimización son especificidad, sensibilidad, eficiencia y reproducibilidad de la PCR en tiempo real (Edwards *et al.*, 2004).

#### 6.14.3.1 Cuantificación del mRNA en la PCR a tiempo real.

Normalmente se pueden llevar a cabo dos estrategias de cálculos en la PCR a tiempo real: cuantificación absoluta y cuantificación relativa. En este trabajo todos los cálculos se realizaron por el método relativo, que proporciona la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de un gen en estudio en comparación con uno o más genes de referencia (Pfaffl, 2004). Hay que tener en cuenta que la expresión de los genes de referencia debe ser constante en las células estudiadas. Los cálculos en cuantificación relativa de expresión genética se basan en la comparación de los valores  $C_t$  utilizando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección, tanto para los genes de objeto de estudio como para los genes de referencia (Pfaffl, 2001). En este sistema de cálculo es necesario conocer la eficiencia de la PCR para cada gen estudiado, que se define como la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de DNA o cDNA en cada ciclo (Bustin y Nolan, 2004a). Las eficiencias de la PCR en tiempo real se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo real (Pfaffl, 2004) atendiendo a la fórmula:

$$E = 10 \left[ -1 / \text{pendiente} \right] - 1$$

Las concentraciones de cDNA y DNA genómico se calcularon por extrapolación de las señales ( $C_T$ ) obtenidas en las rectas de calibrado previamente determinadas para cada uno de los genes. A partir la purificación de productos de pcr, con el kit "Speedtools PCR clean-up kit" de biotools, para cada pareja de oligonucleótidos, y posterior cuantificación en gel de agarosa, partiendo de una concentración de la muestra patrón de 0,1 ng/ $\mu$ L, se

realizaron diluciones seriadas (1/20), (1/50) para llevar la construcción de las rectas patrón.

Una vez obtenida la eficiencia, el cálculo global de expresión en la PCR se lleva a cabo a partir de la siguiente expresión:

$$Exp. Rel. = \frac{([cDNA]_m - [DNA]_{g,m}) / ([cDNA]_{16s} - [DNA]_{g,16s})}{([cDNA]_c - [DNA]_{g,c}) / ([cDNA]_{16sc} - [DNA]_{g,16sc})}$$

donde [cDNA]<sub>m</sub> y [cDNA]<sub>16s</sub> se refieren a la concentración de cDNA obtenido para el gen estudiado en cada caso y el gen endógeno utilizado (16S), respectivamente, y [DNA]<sub>g,m</sub> y [DNA]<sub>g,16s</sub> muestran la concentración de DNA genómico presente en las muestras. En el denominador aparece la concentración de cDNA utilizado como control, relativo a la concentración del gen endógeno, denominándose a esta expresión calibrador. La expresión relativa de la muestra calibrador es la que presenta el valor 1 y a la que se refiere la expresión de las demás muestras.

### **Protocolo**

---

#### **1. Cada reacción contenía la mezcla siguiente:**

cDNA o una dilución de DNA .....	1µL
(Dilución 1/100 para la amplificación del gen 16s)	
Cebador directo (2 µM).....	2 µL
Cebador inverso (2 µM).....	2 µL
2x iQ SYBR GREEN PREMIX (takara).....	10 µL
Agua.....	Hasta 20 µL

#### **2. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:**

- 95°C durante 10 segundos (Desnaturalización).
- 40 ciclos de:
- 95°C durante 5 segundos (desnaturalización).
  - 60 °C durante 1 minuto (hibridación- extensión)

#### **3. Al final de los ciclos de la PCR cuantitativa a tiempo real se generó una curva de fusión para comprobar la uniformidad del producto generado, cuyas condiciones son:**

- 95°C durante 15 segundos.
  - 60°C durante 1 minuto.
  - 95 °C durante 15 segundos.
-

Para cada uno de los genes, el análisis de las curvas de fusión mostró un pico limpio sin productos inespecíficos ni artefactos. Las curvas de calibrado fueron obtenidas a partir de los fragmentos amplificados por pcr convencional y posteriormente purificados mediante el kit “Speedtools PCR clean-up kit” de biotools, y con ellos se hacen diluciones seriadas de 1/50 o 1/20 en función de la eficacia con la que trabajemos en la PCR REAL TIME.

## **7. SECUENCIACIÓN Y ANOTACIÓN DEL GENOMA DE PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES CECT 5344.**

El genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 R1 se secuenció según lo descrito por Luque *et al.* (Luque-Almagro *et al.*, 2013), en primer lugar se llevó a cabo una anotación automática del borrador del genoma, mediante el sistema de anotación GenDB 2.0, y su enlace con la base de datos KEGG. Posteriormente se llevó a cabo una anotación manual de las secuencias, permitiendo así una identificación más precisa de los genes.

## **8. TRANSCRIPTÓMICA.**

El transcriptoma se define como el conjunto de RNA mensajero resultante de la traducción del genoma bajo determinadas condiciones. Hay que tener cuenta que en algunas células la actividad transcripcional es constante durante toda su vida, pero en otras depende de estados fisiológicos o patológicos y estímulos específicos. 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. El transcriptoma no incluye sólo el *mRNA*, sino también los RNA no codificantes (como *tRNA*, *rRNA* y *microRNA* o *miRNA*).



### **8.1 Extracción, purificación y cuantificación del RNA.**

Tanto la extracción como la purificación del RNA para llevar a cabo los experimentos de transcriptómica se llevaron a cabo siguiendo los mismos pasos que en las demás extracciones y haciendo uso de los mismos kits. (Véanse los apartados 6.4, 6.5 y 6.6)

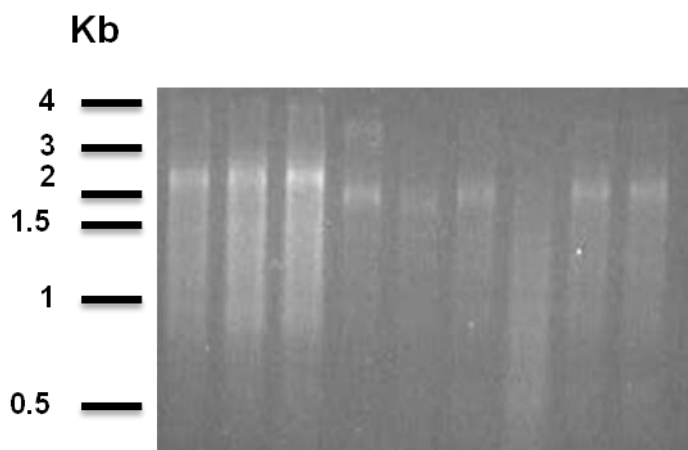
### **8.2 Sustracción del RNA ribosómico (rRNA).**

La sustracción del RNA ribosómico se realizó con el sistema comercial MICROB Express Kit (Ambion). Cuando la cantidad de RNA de partida fue inferior a 5 µg, se llevó a cabo un paso previo de precipitación según instrucciones del fabricante.

### **8.3 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 a los que se añadió formaldehído en 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. 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 Lader (Invitrogen), los pocillos de la Figura 11 son diferentes muestras utilizadas en el análisis transcriptómico.



**Figura 11. Muestras de mRNA utilizadas en el análisis transcriptómico.**

#### **8.4 Tratamiento del mRNA y análisis bioinformático.**

Todo el tratamiento del mRNA y el análisis bioinformático fue llevado a cabo por la empresa Sistemas Genómicos, S.L. (Valencia, España). Todos los pasos llevados a cabo para el estudio de las diferencias de expresión entre los transcriptomas de la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 R1 y los mutantes *P. pseudoalcaligenes* CECT 5344 MocR y T1 se explican a continuación.

#### **8.5. Preparación de las muestras.**

##### **8.5.1 Control de calidad.**

La cantidad y la calidad del RNA se consideró de tres formas distintas, mediante la relación de absorbancias 260/280 nm, con un NanoDrop 1000, cuantificación por fluorescencia con Qubit y electroforesis en Agilent 2100 Bioanalyzer.

##### **8.5.2 Construcción de librerías.**

Las librerías de fragmentos compatibles se construyeron a partir del mRNA con la plataforma SOLiD. Fueron obtenidas siguiendo las recomendaciones proporcionadas por Life Technologies para la secuenciación

en SOLiD v4. Se llevó a cabo el estudio de calidad y cantidad mediante su análisis con Qubit y Agilent 2100 Bioanalyzer.

### ***8.5.3 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.

### ***8.5.4 Secuenciación.***

La calidad y cantidad de 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).

### ***8.5.5 Análisis de los datos.***

Los datos se analizaron a distintos niveles:

- Primario: control de calidad de las secuencias generales.
- Secundario: Mapeo de lecturas, cuantificación e identificación de transcritos.
- Terciario: Comparación entre muestras. Estudios funcionales.

#### ***8.5.5.1 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.

#### 8.5.5.2 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://0www.ncbi.nlm.nih.gov/ilsprod.lib.neu.edu/nucore/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 seleccionadas 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).

#### 8.5.5.3 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 FoldChange inferior a -2 o superior a 2 y con un valor de pValue de 0,1.

### **8.5.5.3.1 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”.

### **8.5.5.3.2 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 p-value fueron inferiores a 0,1.

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

## **9. ANALISIS BIOINFORMÁTICO.**

Para identificar sitios de restricción, efectuar cambios de formato y otras operaciones simples se emplearon los programas disponibles en el servidor <http://www.bioinformatics.org/sms2/>. 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 en otras bacterias de las proteínas ortólogas a las proteínas estudiadas se identificaron, entre otros, en el servidor <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 <http://0-www.ncbi.nlm.nih.gov.ilsprod.lib.neu.edu/Traces/wgs/?val=cig#> (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Wibberg *et al.*, 2014).

## **10. HIBRIDACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL RNA (NORTHERN BLOT).**

Es una técnica para determinar la cantidad y tamaño de un transcrito específico en una mezcla compleja mediante hibridación a una sonda complementaria de RNA marcada. Una vez preparado el *mRNA*, las muestras son normalmente separadas en gel de agarosa que contienen formaldehído como agente desnaturizante del RNA para obtener su estructura secundaria

### **10.1 Transferencia del RNA a membranas.**

Finalizada la electroforesis se tomó una imagen fotográfica del gel iluminado con radiación UV (254 nm) y utilizando una regla como referencia del desplazamiento de los fragmentos. Seguidamente se procedió a dos lavados sucesivos del gel de 15 minutos cada uno en una disolución 10x SSC bajo agitación suave, la disolución de SSC se preparó a partir de una 20x compuesta por:

- 17.5 % (w/v) NaCl.
- 8.82% (w/v) Tri-Sodio-Citrato-2 hidratado.

La transferencia se realizó por capilaridad con 10x SSC mediante un puente salino con papel Whatman. El gel se depositó invertido sobre el puente, colocando sobre éste la membrana de Nylon, equilibrada con agua primero y

10x SSC después. Para finalizar, sobre la membrana se colocaron dos láminas de papel Whatman, igualmente equilibrados, y sobre éstos gran cantidad de papel absorbente. Encima de la estructura se colocó una superficie lo suficientemente rígida y pesada de forma que el peso estuviera uniformemente repartido. La transferencia se dejó durante toda una noche.

Después de la transferencia la membrana se lavó brevemente con una disolución SSC 6x y 0.1 % de SDS, fijándose de esta forma el RNA mediante tratamiento con radiación UV en un dispositivo denominado “DNA TRANSFER LAMP” de Fotodyne, encargado de la fijación de los ácidos nucleicos. La fijación del RNA a la membrana es de forma covalente.

### **10.2 Preparación y marcaje de la sonda.**

La sonda utilizada para el análisis por hibridación del RNA, se obtiene mediante PCR en la cual no se incluyen los dntp's usados habitualmente, si no que se añade una mezcla de marcaje (Dig Labeling mix de Roche), que junto con los demás reactivos necesarios darán lugar a la obtención final del producto de PCR marcado. Por tanto, las mezclas y condiciones fueron las mismas que se utilizaron en las reacciones convencionales. Posteriormente el fragmento de PCR se purificó con el kit speedclean de biotools.

### **10.3 Condiciones de hibridación para RNA.**

Para llevar a cabo la hibridación molecular se utilizó el kit comercial de Roche Dig-High Prime DNA labeling and Detection Starter kit II. La reacción consta de tres etapas: prehibridación, hibridación y lavados.

Para llevar a cabo las hibridaciones se utilizó un horno de hibridación con sistema de agitación giratoria, Hybridation oven proporcionado por Ecogen. En la prehibridación la membrana se colocó dentro de un tubo de vidrio específico para el proceso, y se incubó a 42°C en solución de prehibridación (Dig Easy Hyb granules), reconstituida previamente con agua ultrapura estéril durante 30 minutos con agitación continua. La solución de hibridación se prepara añadiendo 1-1,5 µg de sonda marcada por PCR en 25 mL de solución de prehibridación. La sonda se sometió a un calentamiento a 95°C durante 5

minutos para ser desnaturalizada antes de ser añadida a la solución de prehibridación. La hibridación se llevó a cabo durante toda la noche a 42°C en agitación.

Concluida la hibridación se procedió a dos lavados sucesivos de 30 minutos a 60°C (2x 200 mL) de SSC 2x y 0,1% de SDS. Posteriormente se llevaron a cabo otros dos lavados con SSC 0,5X y SDS al 0,1% a 65°C de temperatura. En todos los lavados se mantiene la agitación. Los lavados post hibridación se llevan a cabo para eliminar la sonda que no se haya unido a su diana.

#### **10.4 Bloqueo e incubación con el anticuerpo.**

Se realizó a temperatura ambiente y con agitación. Se sumergió durante 1-5 minutos en tampón maleico:

- 0,1M Maleico.
- 0,15M NaCl.

A pH 7,5 a 20°C.

Posteriormente se llevó a cabo una nueva incubación de 30 minutos con 20 mL de solución de Anticuerpo (Antibody Solution). El anticuerpo antidigoxigenina está conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (Anti-Digoxigenin-AP Conjugate). Transcurridos los 30 minutos con el anticuerpo se realizaron 2 lavados (2x100mL) de 15 minutos en tampón de lavado.

#### **10.5 Revelado inmunológico.**

En primer lugar antes de revelar había que equilibrar la membrana, para ello se sumergió en tampón de detección (Detection Buffer) o de fosfatasa alcalina (0,1M Tris-HCl, 0,1M NaCl pH 9,5). Pasados entre 2 y 5 minutos se extrajo del tampón y se escurrió sobre papel de filtro. Para la visualización de los resultados es necesario el uso de una solución quimioluminiscente. Para el revelado se sometió a una exposición la membrana sobre un film fotográfico (Amersham Biosciences). Para ellos se introdujo un cassette (Amersham Biosciences) el film y sobre éste la membrana. Posteriormente se procedió al revelado del film empleando soluciones 1:5 de líquido revelador y fijador.



## 11. DISRUPCIÓN INSERCIONAL DEL GEN CROMOSÓMICO *mocR* de *P. PSEUDOALCALIGENES* CECT 5344 R1.

Se tomó el plásmido pLE2.2 que contiene un fragmento de 786 bp del gen *mocR* (Tabla 6), proveniente de una digestión EcoRI y SalI. Dicho fragmento se recupera mediante digestión con KpnI y PstI, que posteriormente se ligó al plásmido pKmob18, que previamente fue digerido con las mismas enzimas. La construcción final, denominada pKmocR, recupera el gen *mocR* casi completo. Posteriormente, mediante PCR haciendo uso de los primers 355UP y 469LOW con las enzimas de restricción BamHI, se introdujo el casete de gentamicina aacC1 proveniente del vector PMS255, con la enzima BamHI, originándose el mutante pK $\Delta$ mocR (+) MocR.

Para el mutante pK $\Delta$ mocR(+)*MocR*+T, que presenta resistencia a kanamicina, la construcción fue igual, pero la kanamicina fue amplificada a partir del pVLT33, y posteriormente extraída con las enzimas BamHI, y clonada en el pGemT-easy, originándose el plásmido p*Gaph*(3'), de donde se extrajo con esta misma enzima de restricción para clonarlo en la construcción final pKmocR.

Las bacterias transformadas obtenidas serán el resultado de una mezcla de recombinación homóloga doble o simple entre el gen nativo cromosómico y el correspondiente fragmento interno clonado en el vector suicida, con la consiguiente disrupción génica por integración plasmídica. Dichos transformantes fueron seleccionados en medio LB suplementado con gentamicina (10  $\mu$ g/ml) o kanamicina (50  $\mu$ g/ml). Para favorecer el proceso de doble recombinación en los transformantes que sufrieron recombinación simple, varias colonias escogidas al azar se crecieron en medio líquido sin método de selección. Posteriormente, una alícuota de este cultivo se sembró en placa por el método de agotamiento, con los antibióticos de selección, y posteriormente se sembró una placa con kanamicina como antibiótico, para ver la sensibilidad, con el fin de obtener colonias aisladas de bacterias transformantes que habían sufrido una recombinación homóloga doble entre el

gen nativo cromosómico y el correspondiente fragmento interno clonado en el vector suicida (Junker *et al.*, 2001).

## 12. EQUIPOS.

- Balanza analítica de Cobos.
- Balanza de Cobos.
- Baño termostatzado de Selecta.
- Campana de flujo laminar Telstar MH-100 provista de luz ultravioleta.
- Centrífuga de sobremesa minispin plus de 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 BioRad Chemi Doc provisto del software Quantity One 4.3.1.
- Electroporador Micropulser de Biorad.
- Espectrofotómetro Helyos B de Termo Spectronics.
- Estufas de incubación Selecta Incudigit (empleada a 30°C) y Raypa incuterm (a 37°C).
- Fuentes de alimentación BioRad PowerPac HV y PowerPac Basic.
- Incubadores orbitales Infors Multitron y Multitron II.
- Kit de electroforesis de Mini-PROTEAN 3 Cell de BioRad.
- pHmetro GLP21 de Crison.
- Prensa de French SLM-Amino.
- Termobloques Tembloc de Selecta y Digital Heatblock de VWR.
- Termociclador Eppendorf Mastercycle.
- Termociclador S1000 Thermal Cyclor de Biorad.

- Termociclador StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems) provisto de software StepOne v2.1.
- Ultracentrífuga Beckman Coulter.
- Vórtex de Fisher Scientific.

### **13. REACTIVOS.**

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



## ***IV. RESULTADOS***



**Capítulo I. Expresión de los**  
**genes para las oxidasas**  
**terminales de *P.***  
***pseudoalcaligenes* CECT5344**

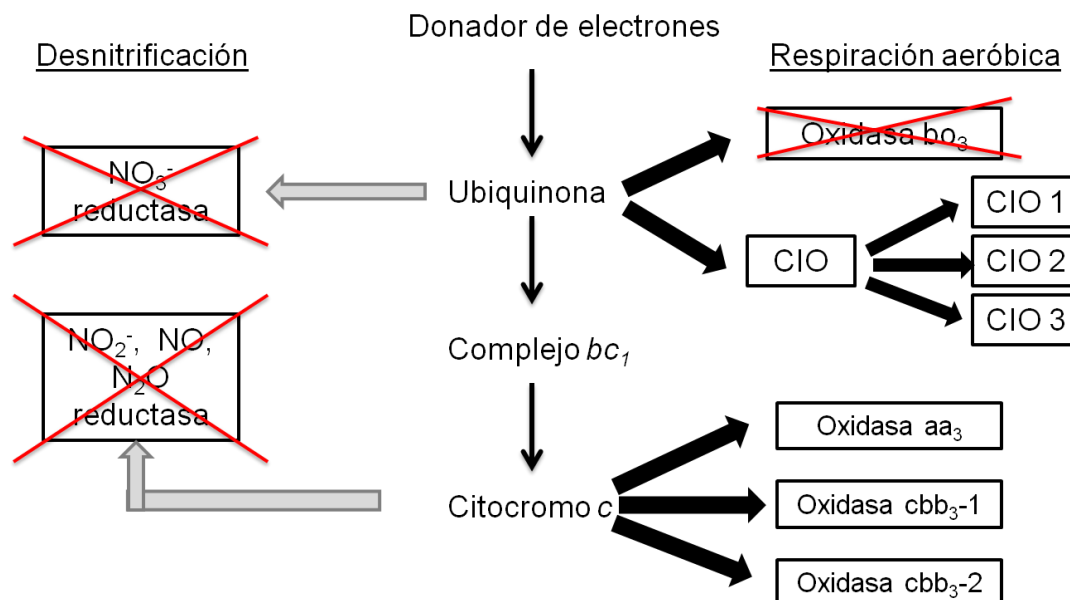




## 1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS OPERONES *cio1*, *cio2* Y *cio3*.

### 1.1. **Ámbito de estudio: genes para las oxidasas insensibles a KCN.**

El análisis genómico de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 permitió encontrar los genes para las oxidasas terminales de este microorganismo, que constituyen un conjunto diferente al de otras especies de *Pseudomonas* (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Así, *P. aeruginosa* y *P. putida* presentan cinco oxidasas terminales (Arai, 2011), tres de ellas de tipo citocromo *c* oxidasa (*cbb<sub>3</sub>-1*, *cbb<sub>3</sub>-2* y *aa<sub>3</sub>*), mientras que las otras dos son ubiquinol oxidasas (*bo<sub>3</sub>* y citocromo *bd*, comúnmente denominados Cyo y CIO, respectivamente). En la Figura 12 se muestran todas las oxidasas presentes en *Pseudomonas* tomando como referencia las de *P. aeruginosa*, estando marcadas en rojo aquellas oxidasas que no están presentes en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, ya que esta *Pseudomonas* carece de sistemas de desnitrificación y de genes funcionales para la oxidasa *bo<sub>3</sub>* (sólo se detecta un pseudogen para su subunidad I).



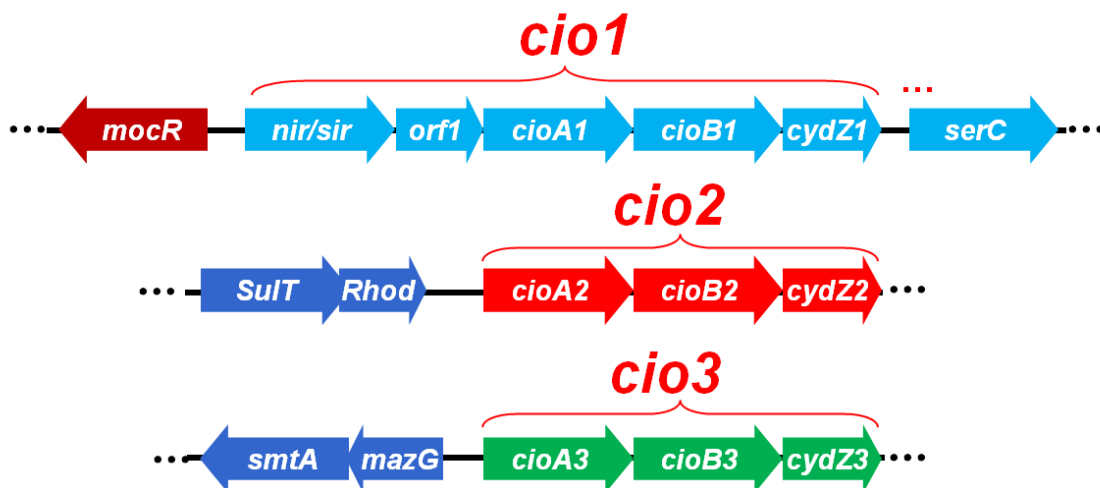
**Figura 12. Oxidasas terminales de *Pseudomonas*.** En el esquema aparecen las ubiquinol oxidasas, las citocromo *c* oxidasas y las oxidasas desnitrificantes de *P. aeruginosa* (Arai, 2011). En el genoma de *P.pseudoalcaligenes* CECT5344 están presentes las citocromo *c* oxidasas (una del tipo  $\text{aa}_3$  y dos de tipo  $\text{cbb}_3$ ) y las oxidasas insensibles a cianuro (representadas por 3 operones de genes *cio*), no detectándose

genes funcionales para ninguna oxidasa del tipo  $bo_3$  ni para sistemas de respiración anaeróbica (Luque-Almagro *et al.*, 2013).

La bacteria *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 utiliza el KCN como única fuente de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2005). Se ha descrito que los genes *cioA* y *cioB* codifican las subunidades I y II, respectivamente, de una oxidasa terminal insensible a KCN muy similar al citocromo *bd* de enterobacterias, codificado por los genes *cydA* y *cydB* (Junemann, 1997). La expresión del operón *cio1* resultó ser esencial para la resistencia al KCN de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Quesada *et al.*, 2007), aunque el genoma de la bacteria presenta otros dos operones, *cio2* y *cio3* (Luque-Almagro *et al.*, 2013) (Figura 13).

El operón *cio1* además de los genes estructurales para la oxidasa terminal, *cioA1* y *cioB1*, se cotranscribe con otros tres genes, dos situados corriente arriba y uno corriente abajo (Quesada *et al.*, 2007). Entre ellos hay un pequeño orf, denominado *cydZ*, que se presenta también en los otros operones *cio* de ésta y muchas otras bacterias, y un gen que codifica para una posible sulfito/nitrito reductasa. Aunque sólo se conoce la cotranscripción desde *nir/sir* hasta *cydZ1* (Quesada *et al.*, 2007), corriente abajo se detecta el gen *serC*, que codifica una fosfoserina aminotransferasa (Figura 13). El operón *cio2* está únicamente constituido por los genes *cioA2*, *cioB2* y *cydZ2*, y en su entorno más próximo se detectan los genes para una rodanasa, enzima relacionada con el metabolismo del KCN, y de un transportador de sulfato. Por último, el operón *cio3* está constituido por los genes *cioA3*, *cioB3* y *cydZ3*, estando su entorno desprovisto de genes relacionados con el metabolismo del KCN (Figura 13).

Ninguna cepa de *Pseudomonas* analizada hasta la fecha presenta en su genoma tres operones *cio*, como es el caso de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, que además también se diferencia en la ausencia de genes *cyo* funcionales. Partiendo de los antecedentes mencionados se decidió estudiar la regulación de la expresión génica de las oxidasas terminales de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.



**Figura 13. Estructura de los operones *cio*.** Se muestra la estructura génica de los operones *cio* y sus regiones vecinas en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

### 1.2. Diseño de sistemas de qPCR para la cuantificación de la concentración de los mRNA de los genes *cioA1*, *cioA2* y *cioA3* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

Para poner a punto la qPCR de expresión de *cio1*, *cio2* y *cio3*, se diseñaron cebadores localizados en las secuencias iniciales (genes *cioA*) de cada operón (Figura 14). El diseño se efectuó teniendo en cuenta, además de las variables habituales para cualquier PCR (una elevada  $T^a$  de alineamiento, baja estabilidad relativa del apareamiento de cada cebador en su extremo 3' y una reducida tendencia a la formación de dímeros y horquillas), un límite de tamaño de los productos de amplificación de entre 75 y 150 pb. Además, en el caso de secuencias estrechamente relacionadas como es el caso de los genes de los operones *cio1*, *cio2* y *cio3*, la especificidad de los cebadores se garantizó mediante la existencia de al menos dos bases diferentes entre los extremos 3' de cualquiera de los oligonucleótidos diseñados sobre regiones homólogas.

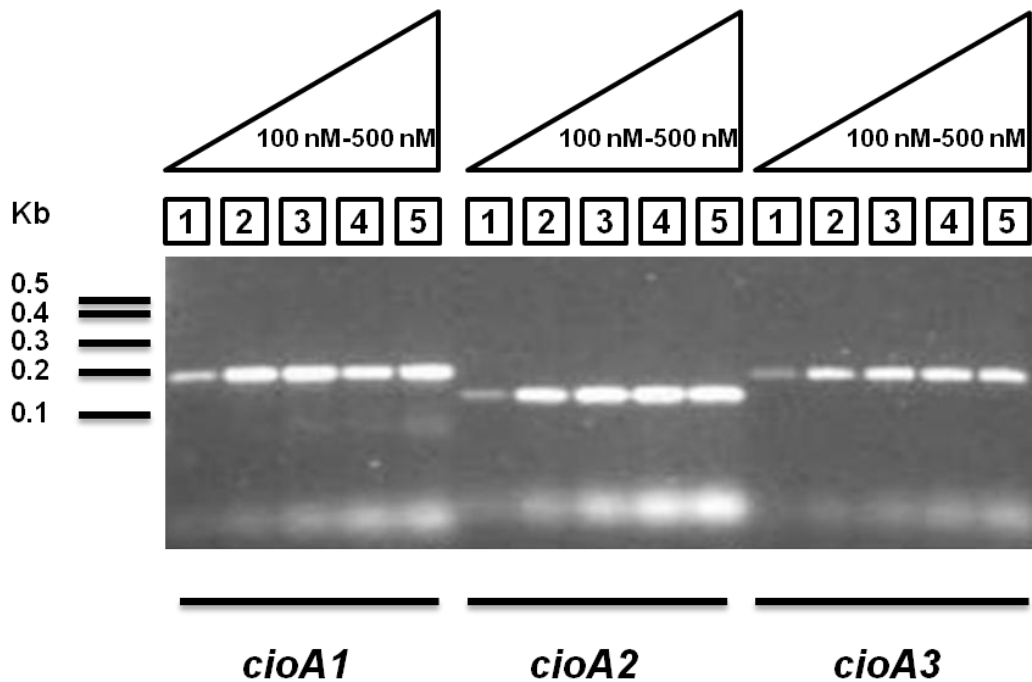
```

cioA1 -----ATGTTCAACTCACTGCACTCGAACTGGCGCGAATTC AAT 60
cioA2 -----ATGTTGGGTCTAGAGGGGCTTGATCTCGCCCGAATCCAGT -
cioA3 -----ATGATCTCGGAATCAGTCGTGACCTTTCACGCCTGCAGT -
      * * * * *
cioA1 TC GGATTCACGATCAAGTTCCACATCATCTTTCCGGCATCACCATCGGGCTGGCAACGT 120
cioA2 TTGCCTTCACCAATTCCTTCCACATCGTCTTCCGGCCATCACCATTGGCCGCGCAGTT -
cioA3 TCGCCATGACAGOGATGTATCACTTTCATCTTCGTCCCTGACCCTGGGCTGGCCTTCC -
      * * * * *
cioA1 ATCTGGCCATCCTCGAAAGGATGTGGTGTGAAAAACAGGATGCGGTCTACAAGACCTGT 180
cioA2 ATCTGGCGGTGCTCGAAAGGTCGTGGCTGAAAGACGGCAATAOGCTATACCGCATCTCT -
cioA3 TGCTGGGGATCATGGAGTCGGTCTAOGTGATGACGGCAACAGGTCTACAAGGACATGG -
      * * * * *
cioA1 ACCACTTCGTGTCGAAGATTTCCGGTCAACTTCCGGATGGCGGTGGTGTGGGTCTAG 240
cioA2 ACCACTTCGTGTCGAAGATCTTCGGTCAACTTCCGGATGGCGGTGGTCTCCGGTCTGG -
cioA3 TCAAGTTCGGGGCAAGCTGTTCGGCATCAACTTCCGGTGGCGGTGACCAACGGGCTGA -
      * * * * *
cioA1 TGATGGCTACCAGTTCGGCACCAACCTGGAGCCAGTACTCCGAGTTCCCGGGCAGCATT A 300
cioA2 TCATGGCTACCAGTTCGGCACCAACCTGGAGCCAGTACTCCGAGTTTCGGGGGCGGTCA -
cioA3 CCATGGAGTTCCAGTTCGGCACCAACCTGGCCCTACTACAGCCACTATGTGGTGACATCT -
      * * * * *
cioA1 CCGGCCCACTGCTCAACTATGAGGTCTCACGGCGTCTTCTCCTCGAAGCAGGCTTCTCG 360
cioA2 CCGGCCCACTACTGAAGTACGAGGTGCTCACGGCGTCTTCTCCTCGAAGCAGGCTTCTCG -
cioA3 TCGGTGGCGCCCTGGCCATCGAAGGACATGATGGCTCTTCTCCTCGAATCCACTTCATCG -
      * * * * *
cioA1 GCGTGTGCTGTTCGCTGGAAACAAGGTCCGGCCCGCCTGCACCTTCTTCCGACGGTTA 420
cioA2 GCGTGTGCTGTTCGCTGGAAACAAGGTCCGGCCCGCCTGCACCTTCTTCTCCAGGTGA -
cioA3 GCCTGTCTTCTTCGCTGGGACCGCTAAGCAAGCTGCAGCACCTGACCGTGACCTGGC -
      * * * * *
cioA1 TGGTGGCGATGGAACTTGTCTCCGCTACCTGGATCTTGGCTCCCAACAGCTGGATGC 480
cioA2 TGGTGGCCATCGCAAGCTGTCTCGACTTCTGGATTCTGGCTCCCAATAGCTGGATGC -
cioA3 TGGTGGCAATGGCTCGAACCCTTCGGGCTGTGGATCTCTCATCGCCAATGGCTGGATGC -
      * * * * *
cioA1 AGACGCCGCGAGGACACGAGGTCA---TCAATGGCGTG---GTGGTGCCGGTGGATTGGG 534
cioA2 ACACGCCGCGAGGCTCGAGATCA---TCGACGGCGG---GTGATTCGGTGGACTGGT -
cioA3 AGAACCCGGTGGGTGCCGATTCAACTTCGAGACCATGGCCATGGAACTGACCGATTTCG 540
      * * * * *

```

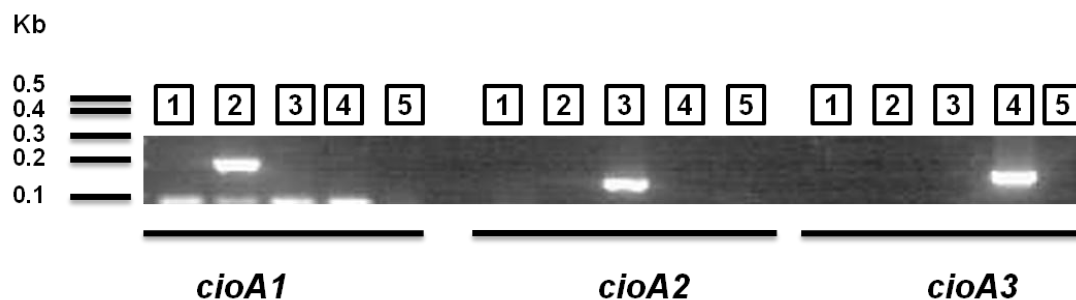
**Figura 14. Diseño de cebadores específicos para los genes *cioA*.** Los extremos 5' de los genes *cioA1* (AM115695), *cioA2* y *cioA3* (ambos en HG916826.1) de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se alinearon mediante Clustal-omega, indicándose las posiciones idénticas mediante asteriscos. Las posiciones de los cebadores específicos diseñados para la detección mediante qPCR de la expresión génica se muestran coloreados en rojo (*cioA1*), azul (*cioA2*) y verde (*cioA3*).

A continuación se optimizaron las concentraciones de cebadores a utilizar, para minimizar la formación de dímeros que pudiera afectar la cuantificación del RNA. El resultado óptimo establecido fue una concentración final de 200 nM para las 3 parejas de cebadores, ya que la amplificación presentó una buena eficiencia con escasa o nula formación de dímeros (Figura 15).



**Figura 15. Optimización de la concentración de cebadores para las qPCR de los genes *cioA*.** rtPCR a tiempo final en la que la retrotranscripción se efectuó sobre el RNA del mutante T10 que se incubado en medio mínimo suplementado con cianuro, que se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 17, empleándose en la PCR las siguientes concentraciones (nM) de cebadores: 100 (1), 200 (2), 300 (3), 400 (4) y 500 (5), respectivamente.

Una vez optimizadas las concentraciones de los cebadores para la qPCR, se procedió a comprobar la especificidad de los cebadores. Para ello se realizaron amplificaciones con las tres parejas de cebadores sobre el DNA de tres cepas de *P. putida* en las que, se han introducido por separado los tres operones *cio* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Figura 16). Una vez descartada la posibilidad de que los cebadores diseñados pudiesen amplificar secuencias de los otros operones, se procedió al estudio del papel de diversos efectores sobre la regulación de la expresión de los operones *cio*.



**Figura 16. Especificidad de los cebadores para los genes *cioA*.** Se muestra el resultado obtenido de las amplificaciones con cada pareja de cebadores sobre el DNA de las cepas obtenidas por transformación de *P. putida* con las construcciones para cada uno de los tres operones *cio* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (la naturaleza de estas cepas se explica en el apartado 2.1 de este trabajo). 1, *P. putida* KT2440 con pVLT33 vacío (sin genes *cio*); 2, *P. putida* KT2440 con pVLT33-*cio1*; 3, *P. putida* KT2440 con pVLT33-*cio2*; 4, *P. putida* KT2440 con pVLT33-*cio3*; 5, control sin DNA.

### 1.3. Efecto del KCN y mutaciones en el operón *cio1* sobre la expresión de los operones *cio1*, *cio2* y *cio3*.

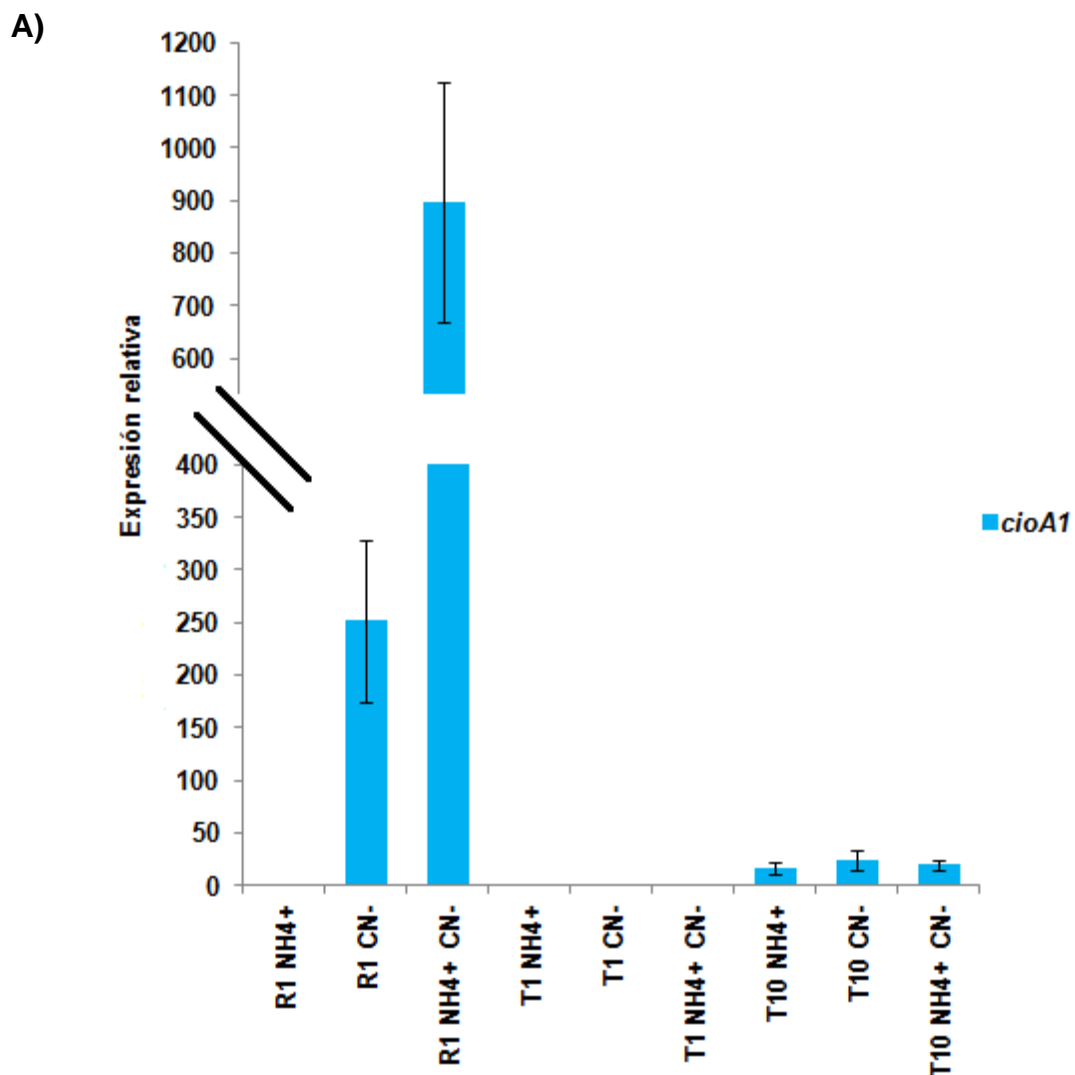
La inhibición de la citocromo *c* oxidasa, mediante  $\text{CN}^-$  u  $\text{NO}$ , condiciona la expresión de las otras oxidasas terminales bacterianas (Arai, 2011), por lo que se utilizaron tratamientos con estas moléculas para evidenciar su posible efecto sobre la expresión de los operones *cio1*, *cio2* y *cio3*.

En los tratamientos con  $\text{CN}^-$  (Figura 17) se observó una fuerte sobreexpresión de *cio1*, considerando como referencia la expresión en medios con amonio, cuando la estirpe silvestre de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (R1) se incubaba en medio M9 suplementado con amonio y KCN, mientras que en medio con KCN el aumento de expresión fue menor (X200). La expresión de *cio2* y *cio3* respondió en una medida mucho menor a la presencia de KCN, observándose para *cio2* una cierta sobreexpresión con KCN o amonio-KCN, muy inferior a la de *cio1* (X10) y siendo aún menor para *cio3*.

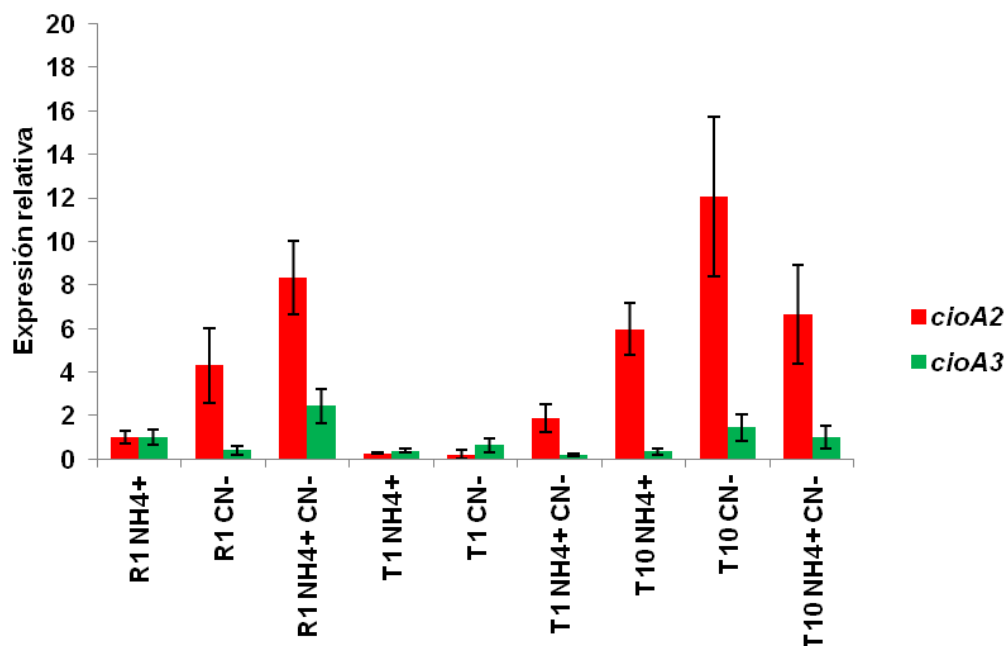
Para comprobar el efecto de la eliminación específica del CIO codificado en el operón *cio1* se utilizó la estirpe T1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, un mutante donde se ha producido la inserción antisentido del marcador *aac(3)* (que confiere resistencia a la gentamicina y se utiliza para la selección de los

recombinantes) en el gen *nir/sir* (Tesis Doctoral F. Acera, 2011). En este mutante se observa que, en medio mínimo, la expresión de *cioA1* está afectada muy negativamente, lo que no se compensa mediante un incremento significativo de la expresión relativa de *cio2* y *cio3* (Figura 17).

La expresión de los genes *cioA1*, *cioA2* y *cioA3* se determinó también en la cepa T10, un mutante de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 que expresa constitutivamente el operón *cio1* a partir de la inserción en el sentido de su transcripción en el primer gen del operón del marcador *aac(3)* (Tesis Doctoral F. Acera, 2011). Este mutante expresa niveles constitutivos de *cioA1* en medios con amonio, KCN y amonio más KCN, siendo en estos dos últimos casos sensiblemente inferiores a la expresión detectada en la cepa R1 (Figura 17). Por otro lado, no se observaron grandes diferencias en el mutante T10 para la expresión de los genes *cioA2* y *cioA3*.



B)

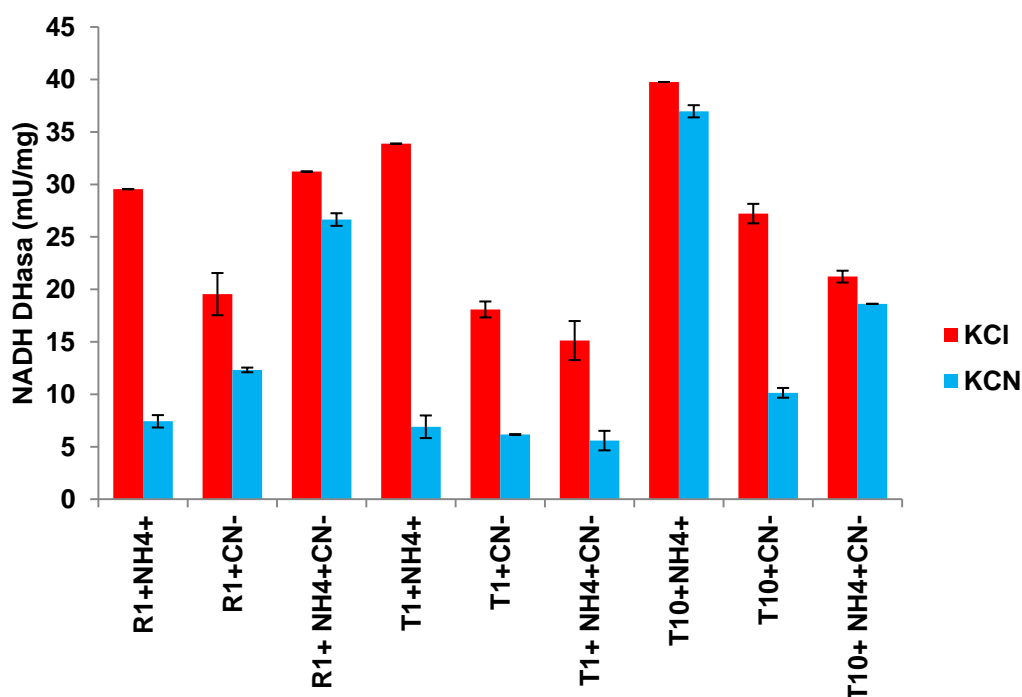


**Figura 17. Expresión de los operones *cio* en medio mínimo M9.** Las células se cultivaron en medio mínimo M9, utilizando acetato como fuente de carbono, y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5 mM como fuente de nitrógeno, hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0.3, tomándose entonces el volumen de medio conteniendo 3 unidades de  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  (muestras incubadas con amonio), o bien se suplementó el cultivo con KCN 2mM ó  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5 mM más KCN 2mM, prosiguiéndose la incubación durante dos horas, recogiendo entonces muestras celulares conteniendo 3 unidades de  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  (muestras incubadas con cianuro o con cianuro más amonio). La extracción, purificación, cuantificación y retrotranscripción del RNA se llevó a cabo según los protocolos descritos (véase apartados 6.4, 6.5, 6.6 6.7 de materiales y métodos), incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA 16S. Como condición calibradora se utilizó la expresión en medio con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5 mM como fuente de nitrógeno. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en un análisis por triplicado de un experimento, elegido como representativo de tres experimentos diferentes realizados. **A)** Representa la expresión del operón *cioA1* y **B)** la expresión del operón *cioA2* y *cioA3*.

Para contrastar la regulación de la expresión génica de los operones *cio* con su expresión funcional en medio mínimo se determinó la capacidad respiratoria, medida como actividad NADH deshidrogenasa, de las mismas estirpes en tratamientos similares, incluyendo la inhibición por KCN que no debe afectar la actividad de las oxidasas insensibles a esta molécula, producto



de los genes *cio* (Figura 18). En ausencia de KCN la actividad respiratoria es muy similar en la estirpe silvestre y en el mutante T1. Se puede observar como la estirpe silvestre presenta entre un 30-40% de actividad resistente al KCN cuando se cultiva en su ausencia, mientras que cuando el medio está suplementado con KCN, este valor se incrementa hasta aproximadamente el 90%, mientras que en el mutante T1 se expresa una actividad respiratoria resistente al KCN residual que no aumenta con los tratamientos con KCN, evidenciando que, al igual que ocurre con la expresión génica, la falta del operón *cio1* no conduce a mecanismos que compensen la limitación de capacidad respiratoria resistente al KCN. Por otra parte, la expresión constitutiva del operón *cio1* en el mutante T10 resultó en la detección de niveles elevados de actividad respiratoria resistente al KCN, incluso en células cultivadas en su ausencia (Figura 18).

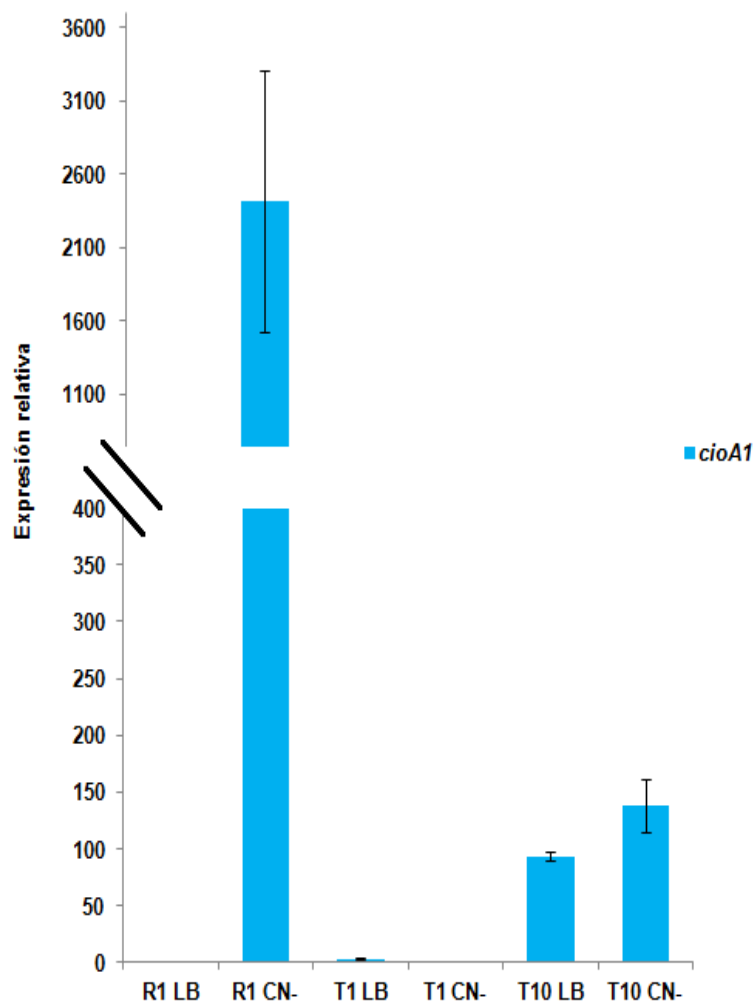


**Figura 18. Expresión de actividad respiratoria en medio mínimo M9.** Las células se cultivaron en medio mínimo con acetato como fuente de carbono y amonio limitante como fuente de nitrógeno hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,5. Tras alcanzar la fase estacionaria, las células se incubaron con cianuro o amonio/ cianuro 2mM durante dos horas. Las medidas de actividad se realizaron en presencia o ausencia de KCN 2 mM (o de una cantidad equivalente de K+ añadido en forma de KCl). Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en un análisis por

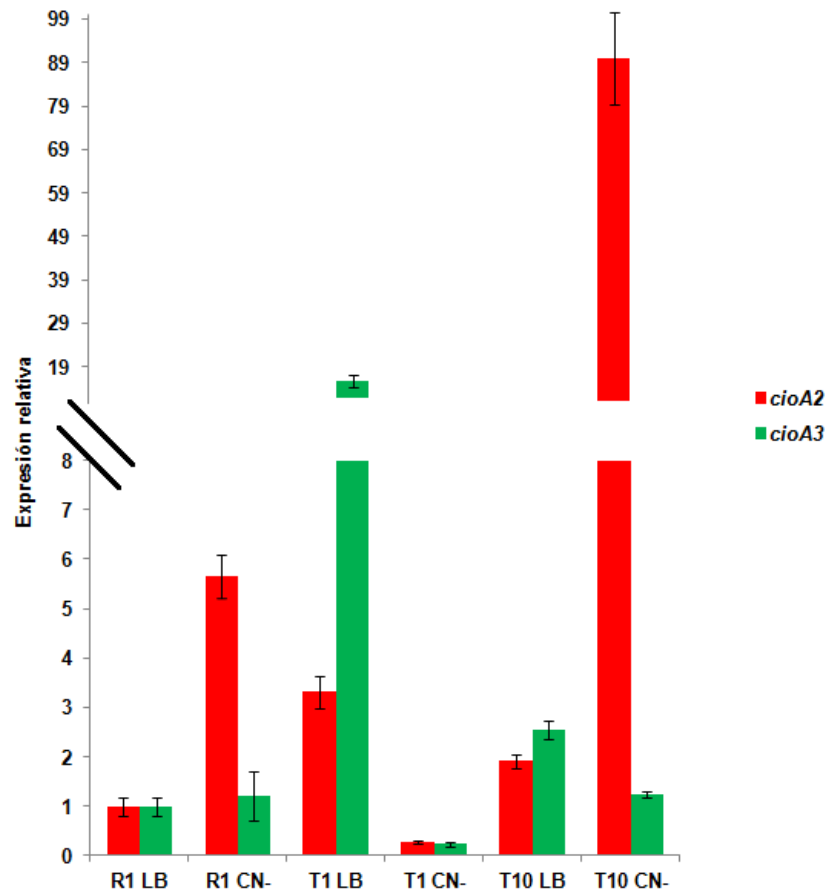
triplicado de un experimento, elegido como representativo de tres experimentos diferentes realizados.

Un fenómeno similar al observado en medio mínimo también se aprecia en medio LB, donde la inducibilidad por KCN del gen *cioA1* es incluso mayor que en medio mínimo, detectándose también una cierta inducibilidad para el gen *cioA2* y no observándose la existencia de efectos compensatorios en el mutante T1 (Figura 19). Antes al contrario, la pequeña inducibilidad que presenta *cio2* en la cepa silvestre se pierde casi por completo en el mutante T1, tanto en medio mínimo como en LB. Las únicas alteraciones significativas de regulación se observan únicamente en la sobreexpresión relativa de *cioA3* el mutante T1 en LB y de *cioA2* en el mutante T10 en KCN. Los resultados obtenidos para la expresión génica relativa en medio LB se validaron utilizando la calibración frente al rRNA16S o al mRNA *rpoD*, obteniéndose patrones de regulación muy similares.

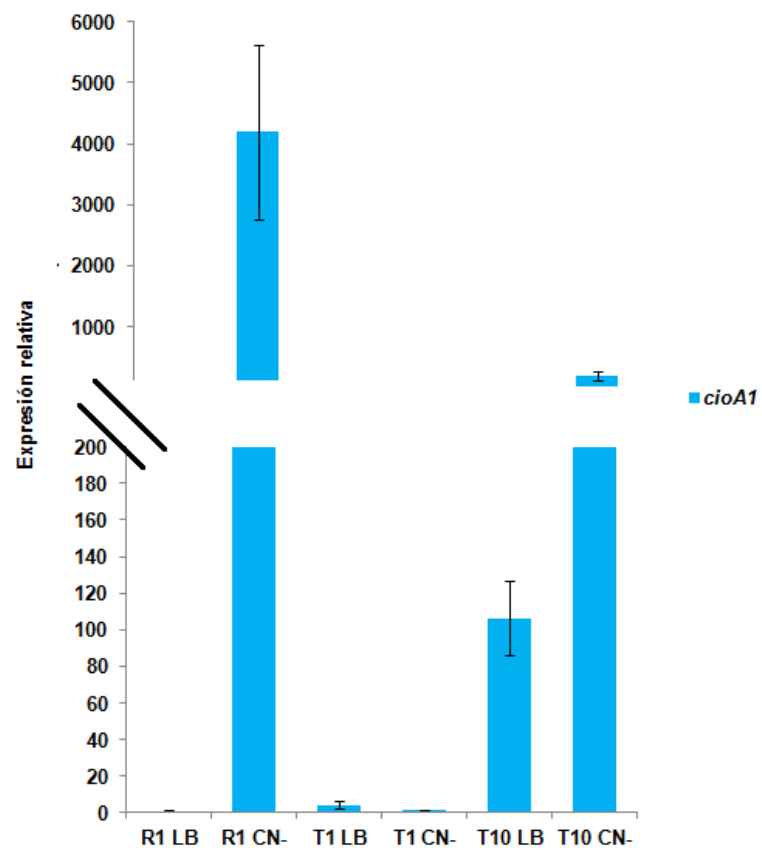
### 1.A)



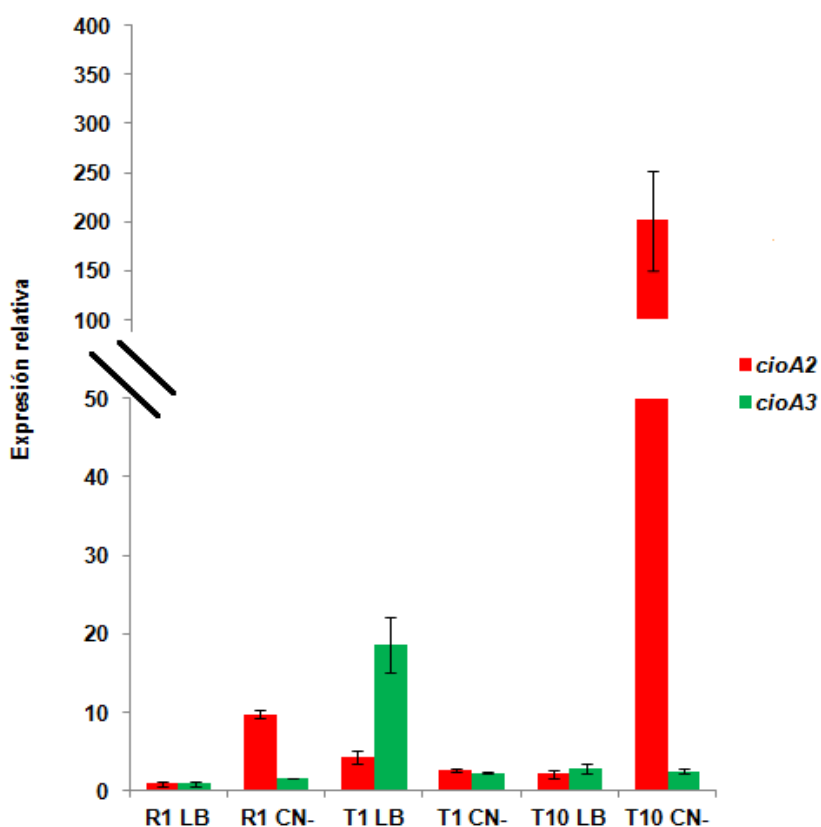
2.A)



1.B)



## 2.B)

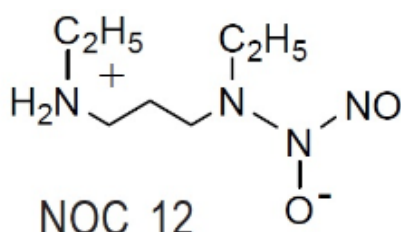


**Figura 19. Expresión de los operones *cio* en medio rico LB.** Las células se cultivaron en medio LB, hasta un crecimiento de 0,3 UDO. En este punto se recogió el volumen de células proporcional a 3 UDO y al volumen restante se le añadió KCN 2 mM, dejándolo en incubación un periodo de tiempo de dos horas. La extracción, purificación, cuantificación y retrotranscripción del RNA se llevó a cabo según los protocolos descritos (véase apartados 6.4, 6.5, 6.6 6.7 de materiales y métodos), incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA 16S (**A**) o bien del mRNA *rpoD* (**B**). Como condición calibradora se utilizó la condición de R1-LB en ausencia de KCN. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en un análisis por triplicado de un experimento, elegido como representativo de tres experimentos diferentes realizados. **1.A)** y **2.A)** representan la expresión del operón *cioA1* y **1.B)** y **2.B)** representan la expresión de los operones *cioA2* y *cioA3*.

#### 1.4. Efecto del NOC-12 y KCN sobre la expresión de los operones *cio1*, *cio2* y *cio3*.

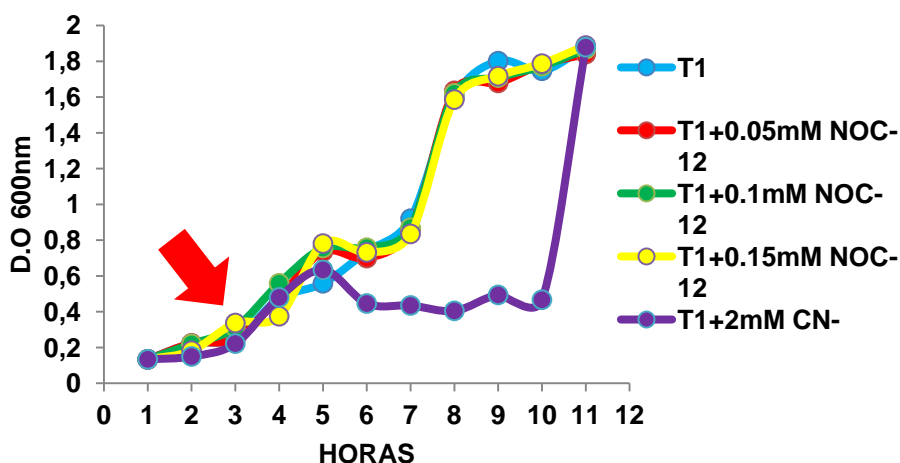
Otra molécula que se puede utilizar para inhibir la actividad de la citocromo c oxidasa es el NO. Entre los compuestos que liberan NO al medio destacan los NOCs, complejos amino-NO estables que espontáneamente

liberan NO sin necesidad de cofactores. La velocidad de liberación del NO depende de la estructura química del NOC. El mecanismo de generación espontánea de NO es muy simple comparada con el de los donadores de NO tradicionales como el nitroprusiato y la nitroglicerina. Una molécula de NOC-12 (Figura 20) libera dos moléculas de NO, aunque la velocidad de liberación de la segunda molécula es mucho más lenta que la primera. Entre los diferentes compuestos NOCs, que se diferencian principalmente en la vida media de liberación de la molécula de NO, destaca el NOC-12 que ya ha sido empleado previamente en bacterias.



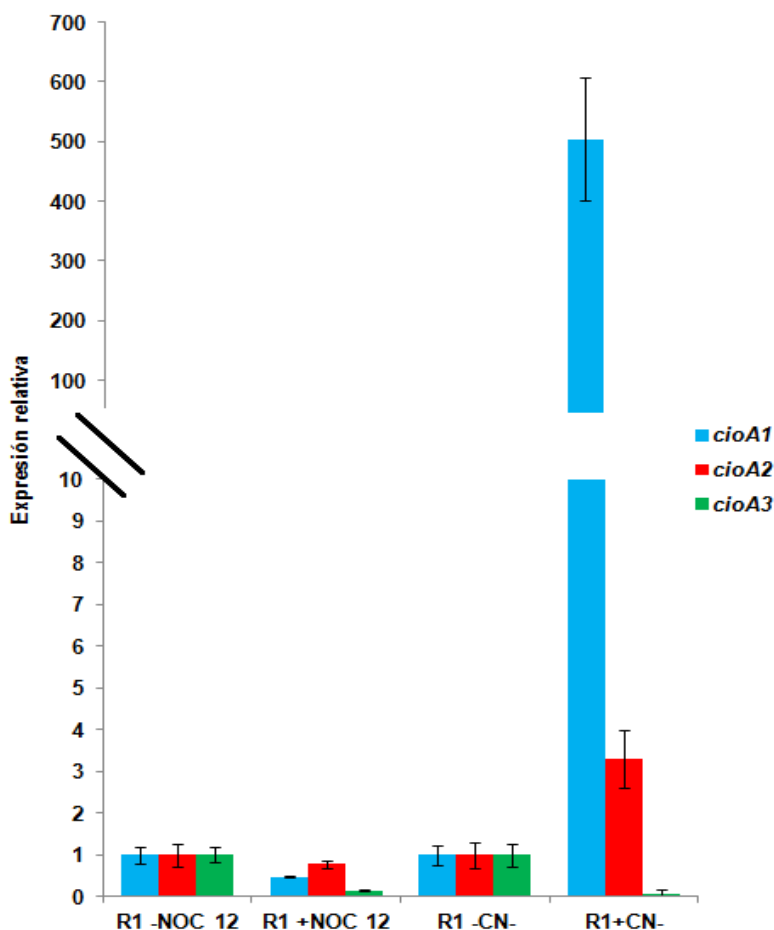
**Figura 20. Estructura del NOC-12.** El compuesto NOC-12 ó 1-hidroxi-2-oxo-3-(N-etil-2-aminoetil)-3-etil-1-triazona, un R-amino-(NO)<sub>2</sub>.

Antes de llevar a cabo estudios de expresión, se valoró el efecto del NOC-12 sobre el crecimiento del mutante T1 (Figura 21), ya que es una cepa muy sensible a la inhibición de la citocromo *c* oxidasa por carecer del operón *cio1* funcional (Quesada *et al.*, 2007).



**Figura 21. Efecto del NOC-12 y del KCN sobre el crecimiento del mutante T1.** Las células se cultivaron en medio LB hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub> de 0.3, momento en el cual se añadió NOC-12 (0.05 mM, 0,1 mM, y 0,15 mM) ó KCN 2mM.

Se puso de manifiesto que la adición de NOC-12 produjo una parada transitoria del crecimiento bacteriano, de manera independiente de la concentración empleada, entre 0.05 y 0.2 mM (Figura 21). Este efecto fue mucho menos drástico que el producido por la adición de KCN, aunque éste último se empleó a una concentración mucho mayor (2 mM).



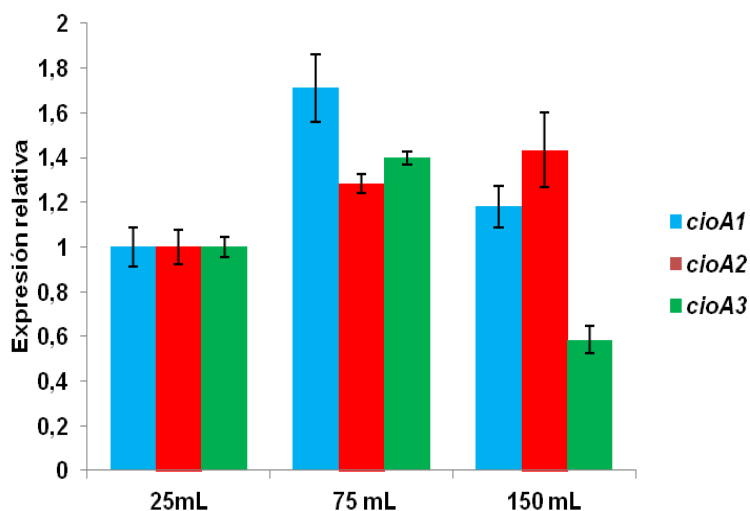
**Figura 22. Regulación de la expresión de los genes *cio* por el NOC-12 y KCN en medio LB.** Las células se cultivaron en medio LB hasta una  $DO_{600nm}$  de 0.3 UDO, momento en el que se añadió NOC12 0.1 mM ó KCN 2 mM a los cultivos indicados, mientras que a los controles negativos (R1-NOC12 y R1-CN) se añadieron cantidades equivalentes de NaOH y KOH. El tratamiento del RNA se llevó a cabo igual que en la Figura 19. La normalización fue frente a la cuantificación del rRNA16S. Como condición calibradora se utilizó R1-NOC12 para cada uno de los tres operones, y el R1-CN también para los tres operones. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en un análisis por triplicado de un experimento, elegido como representativo de tres experimentos diferentes realizados.

En la Figura 22 se muestra que la adición de 0,1 mM de NOC-12 no afecta significativamente la expresión de ninguno de los tres operones *cio* de *P.*

*pseudoalcaligenes* CECT5344. Por lo tanto, el NO no parece ser el inductor de estas oxidasas, o al menos el NO generado a partir de 0,1 mM de NOC-12.

### 1.5. Efecto del grado de aireación sobre la expresión de los operones *cio1*, *cio2* y *cio3*

Las diferentes oxidasas terminales pueden tener afinidades diferentes por el oxígeno, por lo que cabe esperar un efecto sobre la expresión génica dependiendo de la concentración de O<sub>2</sub> disuelto en el medio. Para modificar la disponibilidad de O<sub>2</sub> en el medio, se llevaron a cabo experimentos en medio líquido LB variando el volumen de llenado de los matraces, que es inversamente proporcional a la variable *K<sub>la</sub>*, considerada una referencia válida del nivel de O<sub>2</sub> disuelto en el medio de cultivo, un estudio que se llevó a cabo para los tres operones *cio* en la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT5344R1 (Figura 23).



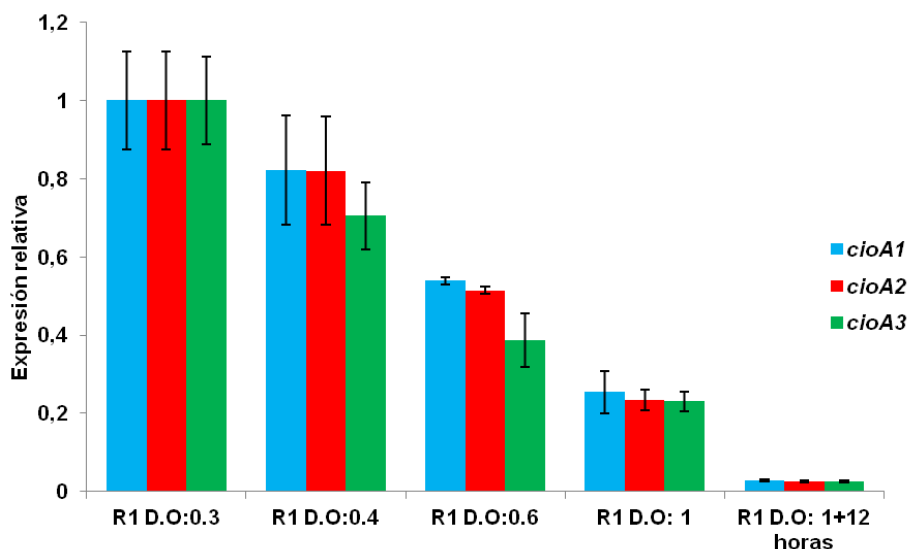
**Figura 23. Efecto del grado de aireación sobre la expresión de los genes *cio* en medio LB.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 19, incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA16S. Como condición calibradora se utilizó el volumen de 25 mL. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en un análisis por triplicado de un experimento, elegido como representativo de tres experimentos diferentes realizados.

Los resultados obtenidos muestran que los mayores niveles de expresión para los genes *cioA1* y *cioA3* se observan con un volumen medio de llenado de los cultivos, lo que equivale a un nivel intermedio de aireación. Por el contrario,

la expresión de *cioA2* se correlaciona inversamente con el grado de aireación. No obstante, las diferencias de expresión génica detectadas fueron escasamente significativas (Figura 23).

### 1.6. Efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de los operones *cio1*, *cio2* y *cio3*

Se ha descrito un efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de genes para oxidasas terminales (Cooper *et al.*, 2003). Para determinar esta posible variable de la expresión génica, se cultivó la estirpe R1 en medio mínimo M9, usando acetato como fuente de carbono y amonio como fuente de nitrógeno, determinándose la concentración de los mRNA de *cioA1*, *cioA2* y *cioA3* a medida que aumenta el crecimiento. Se observó que la expresión génica relativa de los tres operones disminuyó paralelamente a lo largo de la fase de crecimiento, tal y como se aprecia en la Figura 24.



**Figura 24. Efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de los genes *cio*.** Las células de la estirpe silvestre CECT5344R1 se cultivaron en medio M9 con acetato como fuente de carbono y amonio 5 mM como fuente de nitrógeno, creciéndose la estirpe silvestre CECT5344R1 hasta la DO<sub>600nm</sub> de 0.3, 0.4, 0.6, 1 y, 1+12 horas más de incubación. El tratamiento del RNA se llevó a cabo igual que en la Figura 19, incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA16S. Como condición calibradora se utilizó la cuantificación de las muestras con menor densidad óptica para los tres operones. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en un análisis por triplicado de un experimento, elegido como representativo de tres experimentos diferentes realizados.



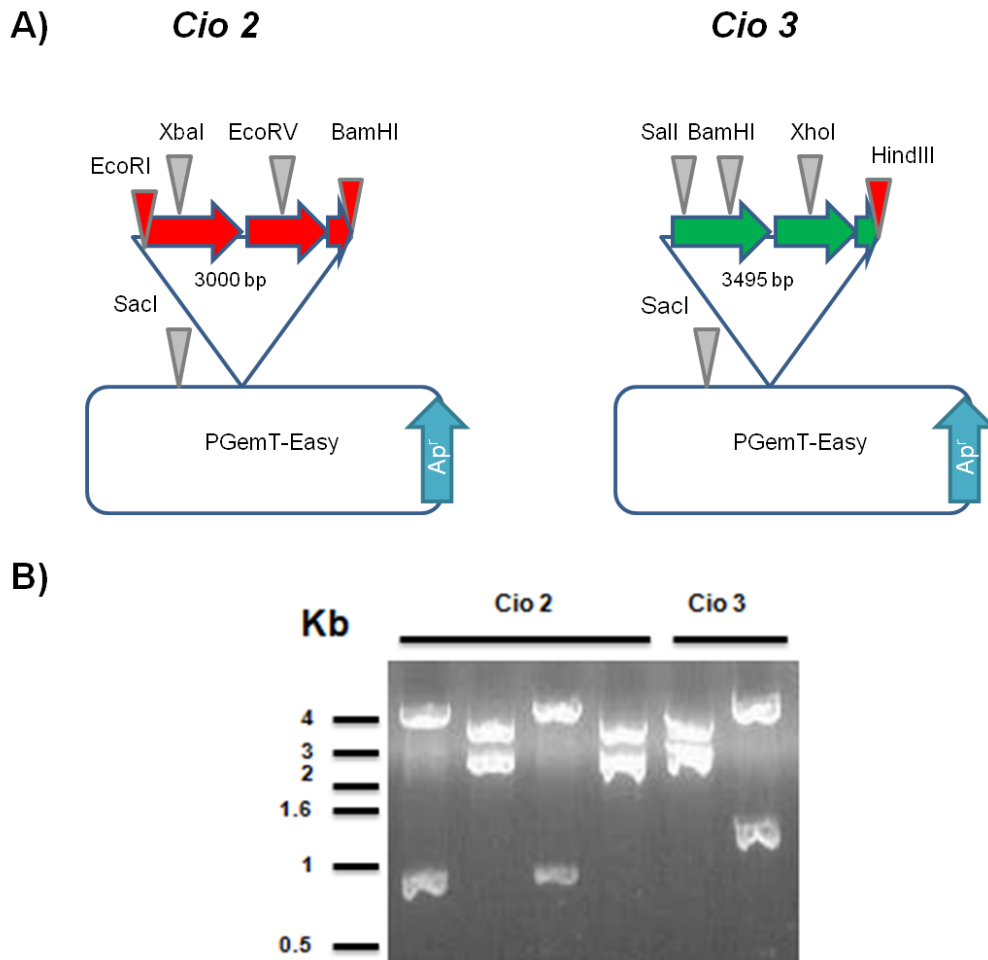
## 2. EXPRESIÓN FUNCIONAL DE LOS OPERONES *cio2* Y *cio3*.

La comprobación de la funcionalidad del operón *cio1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se había ya realizado previamente (Tesis Doctoral F. Acera, 2011), empleándose para ello un mutante deficiente en los genes *cio* de *P. putida* (estirpe KT2440, amablemente cedida por F. Rojo, del CNB-CSIC) y una construcción del operón *cio1* (genes *cioA1*, *cioB1* y *cydZ1*) en el plásmido pVLT33. Un abordaje similar se ha empleado en este trabajo para la expresión en *P. putida* de los operones *cio2* y *cio3* de *P. pseudoalcaligenes*.

### 2.1. Construcción de los vectores para la expresión funcional de *cio2* y *cio3*.

Para llevar a cabo las construcciones en primer lugar se amplificaron mediante PCR los fragmentos *cio2* y *cio3*, haciendo uso de los cebadores 72U23 y 2972L23 para *cio2* y 17U23 y 3489L23 para *cio3* (Tabla 7, materiales y métodos), generando fragmentos de DNA con tamaños de 2923 y 3492 bp, respectivamente, que contienen los operones completos, *cioA2-cioB2-cydZ2* y *cioA3-cioB3-cydZ3*. Una vez amplificados los fragmentos mediante PCR, se purificaron los fragmentos y se ligaron al vector pGEM-Teasy, transformándose en *E. coli* XL1-Blue MRF' (Figura 25A). Para identificar la orientación correcta de las construcciones, se llevaron a cabo las digestiones con EcoRV+SacI para *cio2* y con SacI+XhoI para *cio3*, debiéndose obtener fragmentos de 2.2+3.8 kb para *cio2* y 2.4+4.1 kb para *cio3* (Figura 25B). Se analizaron 6 construcciones, 4 para *cio2* y 2 para *cio3*, identificándose recombinantes con la orientación correcta en ambos casos (Figura 25B; 2ª y 4ª construcción de *cio2* y 2ª construcción de *cio3*). Una vez identificadas, las construcciones con la orientación correcta se transfirieron al vector pVLT33 mediante digestión de pGEMT-*cio2* y pGEMT-*cio3* con las enzimas EcoRI+BamHI y SacI+HindIII, respectivamente. Posteriormente se realizaron ligaciones con el vector pVLT33, digerido previamente con las mismas enzimas, transfiriéndose los recombinantes mediante transformación a la cepa *P. putida* KT2440, donde se

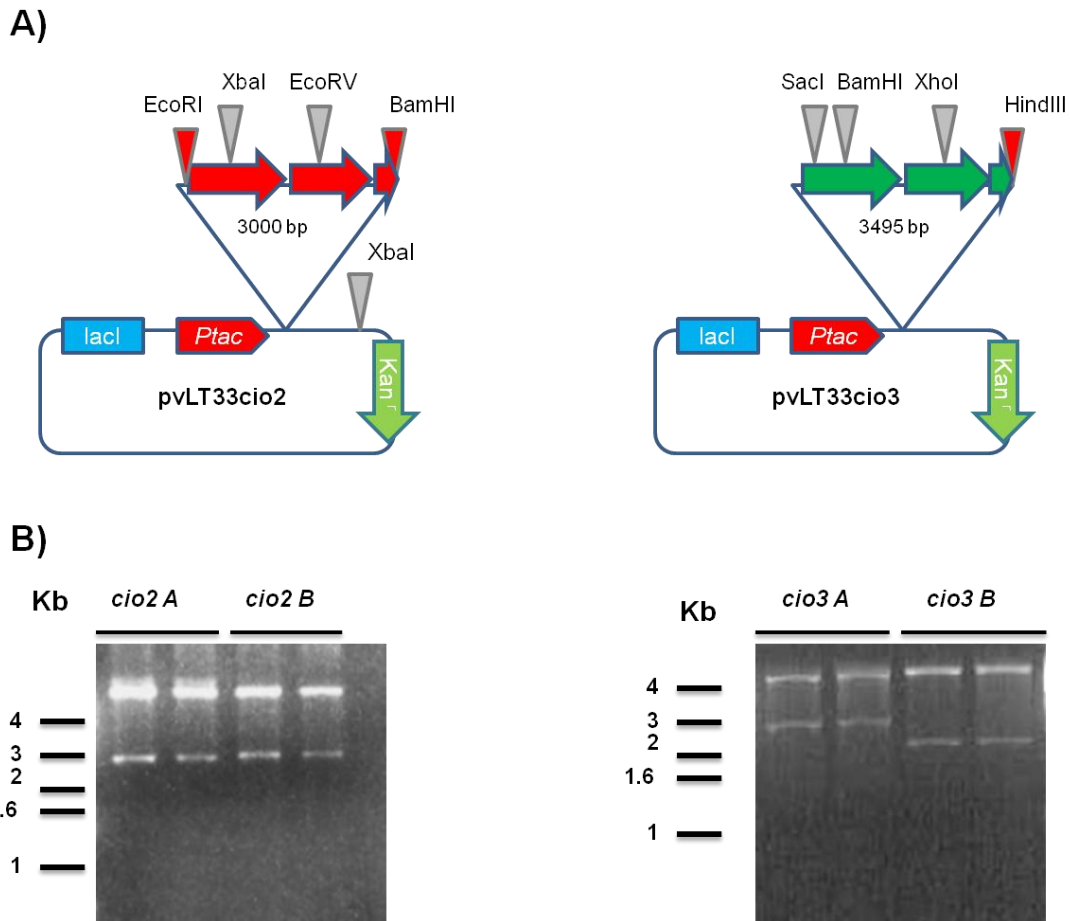
seleccionaron clones resistentes a la kanamicina que se caracterizaron mediante digestión con enzimas de restricción (Figura 26A).



**Figura 25. Clonación en pGEM-Teasy de los operones *cio2* y *cio3*.** A). Estructura de los vectores intermedios pGEMT-*cio2* y pGEMT-*cio3*, con indicación de la ubicación de las dianas de restricción empleadas en su caracterización. Las dianas de restricción simbolizadas en rojo están situadas en los cebadores utilizados para la PCR. B). Caracterización de los clones recombinantes obtenidos por transformación en *E. coli* XL1-Blue MRF', mediante digestiones EcoRV+Sacl ó Sacl+XhoI, para pGEMT-*cio2* y pGEMT-*cio3*, respectivamente.

Las construcciones correspondientes a pVLT33-*cio2* se digirieron con XbaI y en una segunda comprobación con EcoRI y BamHI, obteniéndose unas bandas de 2.8+10 kb para el primero y el operón completo, 3kb+10 kb, en el segundo (Figura 26B).

La comprobación de la construcción pVLT33-cio3 se realizó mediante las digestiones dobles *SacI*+*HindIII* y *BamHI*+*HindIII*, debiéndose obtener bandas de 3,5 + 10 kb, para el primer caso, y 2,7+10,8 kb en el segundo, resultado que concuerda con los observado (Figura 26).



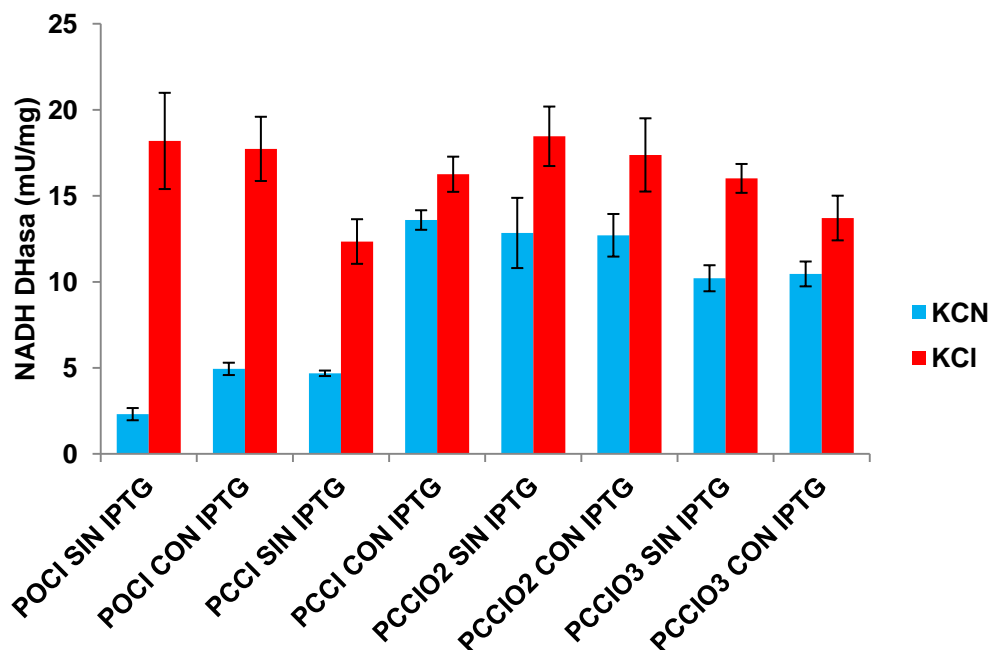
**Figura 26. Clonación en pVLT33 de los operones *cio2* y *cio3*.** **A).** Estructura de los vectores pVLT33-cio2 y pVLT33-cio3, con indicación de la ubicación de las dianas de restricción empleadas en su caracterización. Las dianas de restricción simbolizadas en rojo están situadas en los cebadores utilizados para la PCR. **B).** Caracterización de los clones recombinantes obtenidos por transformación en *E. coli* XL1-Blue MRF', mediante las digestiones *XbaI* (*cio2A*) y *EcoRI* y *BamHI* (*cio2B*) para pVLT33-cio2 y *SacI*+*HindIII* (*cio3A*) y *BamHI*+*HindIII* (*cio3B*) para pVLT33-cio3.

## 2.2. Análisis funcional de la expresión de *cio2* y *cio3* en *P. putida* KT2440

La expresión de actividad respiratoria resistente al KCN se determinó en las dos cepas de *P. putida* que contienen los plámidos pVLT33-cio2 (PCCio2) y

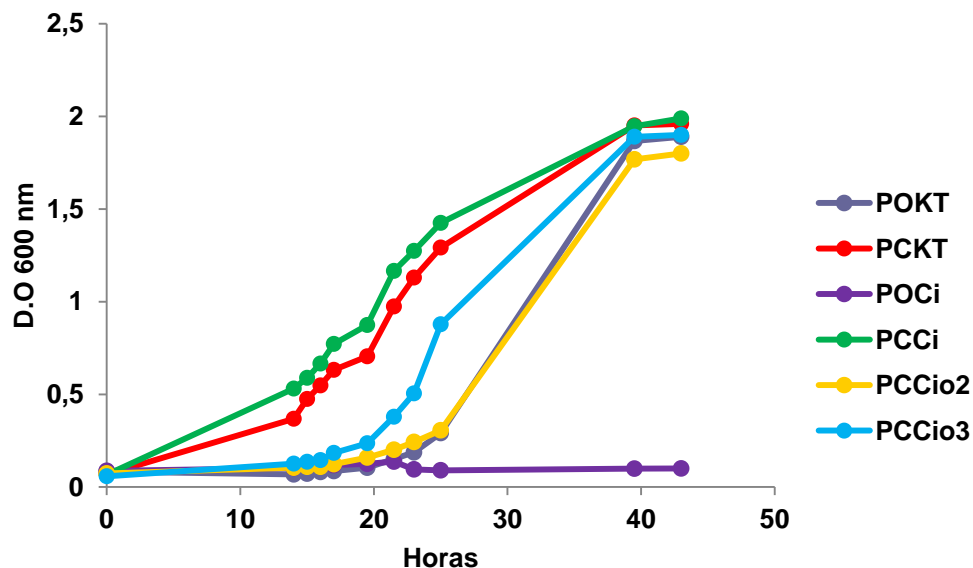
pVLT33-cio3 (PCCio3) (Figura 27). En paralelo se incluyó, como control negativo, la misma cepa mutante *P. putida* KT2440 transformada con pVLT33 no recombinante (POCi), y como control positivo la cepa mutante *P. putida* KT2440 transformada con pVLT33-cio1 (PCCi), en la que previamente se había evidenciado la funcionalidad de la expresión del CIO codificado por el operón *cio1*, que aumenta la capacidad respiratoria resistente al KCN y mejora su tolerancia en la cepa mutante *P. putida* KT2440 (Tesis Doctoral F. Acera, 2011). Los resultados obtenidos muestran como la expresión de *cio2* ó *cio3*, al igual que la de *cio1*, producen una elevada capacidad respiratoria resistente al KCN. Sin embargo, a diferencia de *cio1*, la expresión de actividad respiratoria resistente al KCN fue independiente de la inducción con IPTG desde el promotor TAC de los plásmidos pVLT33-cio2 y pVLT33-cio3, hecho que puede deberse a la posible presencia de secuencias promotoras en su estructura (las construcciones incluyen 61 y 356 pb, respectivamente, de secuencias corriente arriba desde el ATG de inicio de sus secuencias codificantes).

Una vez evidenciada la expresión funcional de capacidad respiratoria resistente al KCN a partir de los operones *cio2* y *cio3*, se procedió a analizar si esta actividad confiere un fenotipo de mayor tolerancia al KCN. Para ello se analizó el crecimiento en medios con KCN (Figura 28) de las cuatro cepas derivadas de *P. putida* KT2440 (POCi, PCCi, PCCio2 y PCCio3), incluyéndose también como controles positivos adicionales las cepas *P. putida* KT2442 transformada con el plásmido pVLT33-cio1 (PCKT) o pVLT33 no recombinante (POKT). Los resultados obtenidos muestran que la expresión de *cio2* y *cio3*, al igual que *cio1*, aumenta la tolerancia al KCN de la cepa *P. putida* KT2440 (Figura 28), cuyo fenotipo se debe a la ausencia de genes *cio* funcionales.



**Figura 27. Expresión de actividad respiratoria en *P. putida* expresando los genes *cio* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.** Las células se cultivaron en medio LB hasta una  $DO_{600nm}$  de 0,5, tras lo cual se incubaron con o sin IPTG 0.1 mM durante 2 horas. Las medidas de actividad se realizaron en presencia o ausencia de KCN 2 mM (ó de una cantidad equivalente de  $K^+$  añadido en forma de KCl). Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en un análisis por triplicado de un experimento, elegido como representativo de tres experimentos diferentes realizados.

Aunque se observan diferencias notables en las velocidades de crecimiento en KCN entre las diferentes cepas, siendo significativamente mayor para la cepa con *cio1* que para aquellas con *cio2* o *cio3*, se debe considerar el hecho de que las construcciones empleadas para la expresión de los genes *cio* presentan fusiones transcripcionales con el promotor Tac del vector pVLT33, y por tanto heterogeneidad en los extremos 5' de los transcritos. No pudiendo descartarse un efecto de este hecho sobre la velocidad de síntesis y la estabilidad de los transcritos, motivando posibles diferencias de expresión, no se consideró procedente realizar una comparación relativa entre las velocidades de crecimiento de las distintas cepas en medios con KCN.

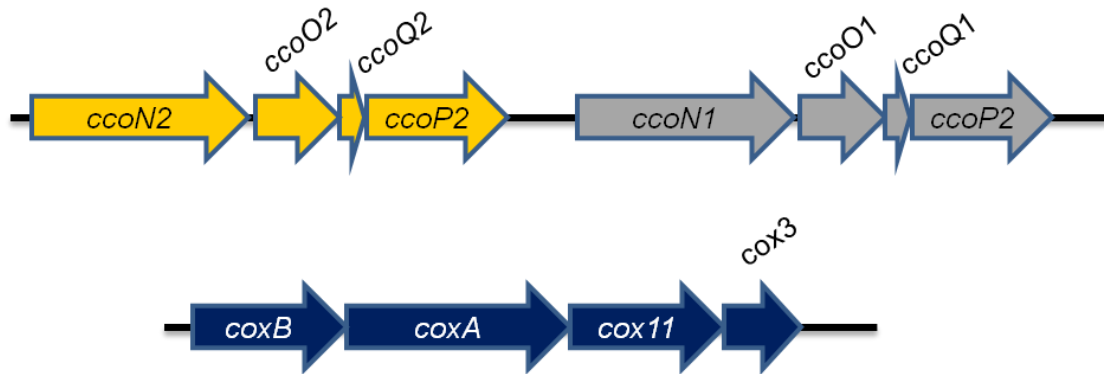


**Figura 28. Tolerancia al KCN de las cepas que expresan los operones *cio* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en el mutante *cio* de *P. putida*.** Los preinóculos celulares se cultivaron en presencia de kanamicina, para asegurar el mantenimiento de los plásmidos, diluyéndose 1/100 en medio fresco suplementado con IPTG 0.1 mM y KCN 2 mM y siguiéndose su crecimiento a partir de ese momento.

### 3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS OPERONES *CCO1*, *CCO2* Y *COX*.

#### 3.1. Ámbito de estudio: genes para las oxidasas *cbb<sub>3</sub>* y *aa<sub>3</sub>*.

Además de los tres operones *cio* presentes en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, también se encuentran operones para dos oxidasas *cbb<sub>3</sub>* y una oxidasa *aa<sub>3</sub>* (Figura 29). Los genes estructurales para la oxidasa *cbb<sub>3</sub>* están agrupados en forma de 2 operones con genes *ccoNOQP* estrechamente relacionados y en posiciones contiguas del genoma bacteriano, denominados operones *cco1* y *cco2*. Por otra parte, un único operón *coxBA-11-3*, denominado *cox*, se detectó en el genoma de esta bacteria.



**Figura 29. Estructura génica de los operones *cco1*, *cco2* y *cox* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.** La secuencia del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se ha descrito recientemente (Luque-Almagro *et al.*, 2011), estando accesible para su análisis (HG916826.1).

### 3.2. Diseño de sistemas de qPCR para la cuantificación de la concentración de los mRNA de los operones *cco* y *cox* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.

Para estudiar la expresión génica de las oxidasas terminales *cbb<sub>3</sub>* y *aa<sub>3</sub>* se procedió al diseño de cebadores específicos, para lo que se hubo de tener en cuenta la elevada identidad existente entre las secuencias de los operones *cco1* y *cco2*. Se seleccionaron las secuencias de los genes *ccoP1* y *ccoP2*, por presentar una mayor divergencia genética, incluyendo una delección, que pudo facilitar el diseño de cebadores específicos de cada operón (Figura 30).

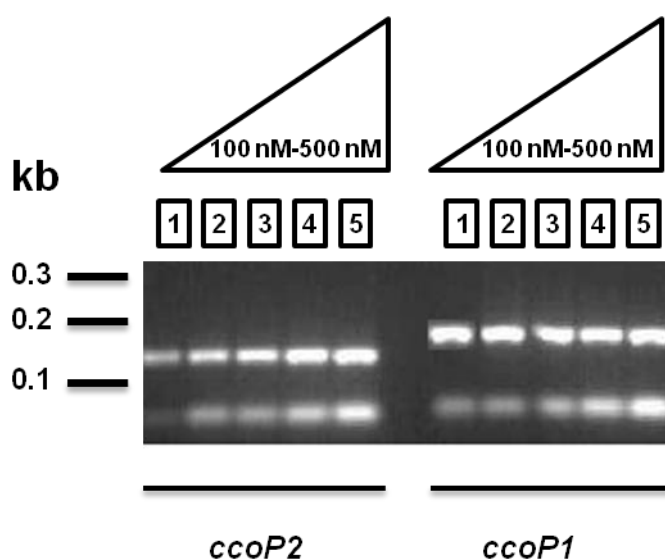
```

ccoP1      GGTAACTTCAAGGGCCTGCTGCCGGGCTATGAGGATG----- 277
ccoP2      GGTAACTTCAAGGGCCTGCTGCCGGGCTACGACTACGTCGACAGCGAGAAGCAGACCCCT 297
*****
ccoP1      -----GCTGGACCCAGGTC 291
ccoP2      TTCCGCTGCCGGTGTACAGATCGCTGACGGCACCATGCGTTACTCCGGCTGGACCGCGTG 357
*****
ccoP1      AACCAGTGGCAGCGCGAAATGGATCGCGCCGATGAGCTGTACGGCCCGATTTCGCCAAA 351
ccoP2      CACCAGTGGGAAAAGGAAATGGCGCGTGCCGATGCGCAATACGGCCCGCTGTTCCGCCAG 417
*****
ccoP1      TATGCCGCCATGCCCATCGAGGAAGTGGCCAAAGGACGAGCGCGCGCTGAAAATGGGCGGT 411
ccoP2      TACGCTGCCCATGCCCATCGAGGAAGTGGCCAAAGGACGAGCAAGCCCTGAAAATGGGTGGC 477
*****

```

**Figura 30. Diseño de cebadores específicos para los genes *ccoP1* y *ccoP2*.** Se muestran las secuencias génicas (HG916826.1) parciales (regiones con mayor divergencia) alineadas mediante Clustal-X, indicándose las posiciones idénticas mediante asteriscos. Las posiciones de los cebadores específicos diseñados para la detección mediante qPCR de la expresión génica se muestran coloreadas en rojo (*ccoP1*) y verde (*ccoP2*).

Se llevó a cabo la optimización de la concentración de cebadores para las PCR (Figura 31). El resultado de dicha optimización fue la selección de la concentración de 100 nM para las parejas específicas de los operones *cco1* y *cco2*. Respecto a la pareja de cebadores específicos para el operón *cox* (ver Materiales y Métodos, Tabla 7), la PCR para la optimización de su concentración no muestra aparición de dímeros a concentraciones detectables entre 100 y 500 nM de cada cebador (resultados no mostrados), aunque sí se observó la saturación de la PCR, por lo que se bajaron los ciclos de 30 a 25 y se mantuvo una concentración de 500 nM de cebadores en la qPCR.



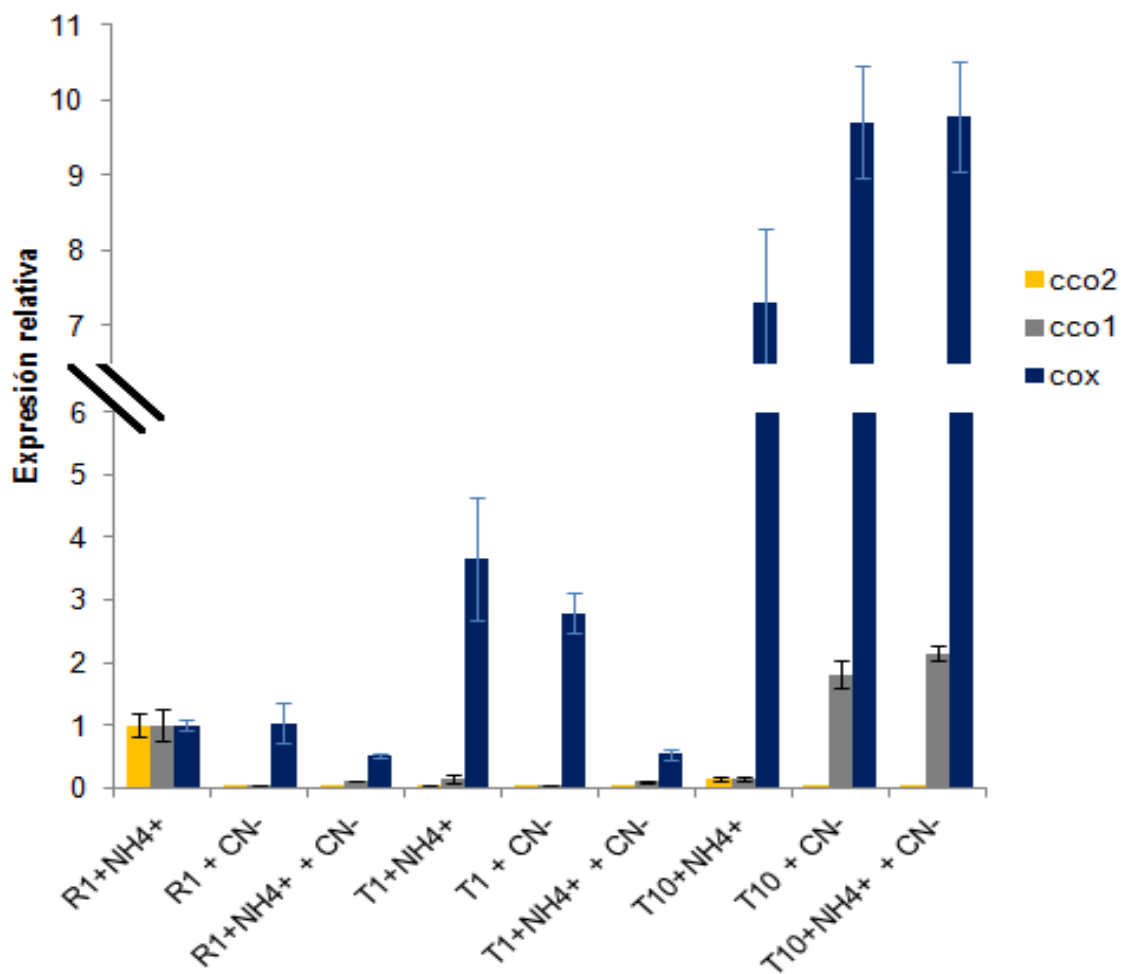
**Figura 31. Optimización de la concentración de cebadores para las qPCR de los genes *cco*.** rtPCR a tiempo final en la que la retrotranscripción se efectuó sobre el RNA del mutante T10 que se incubado en medio mínimo suplementado con cianuro, que se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 19, empleándose en la PCR las siguientes concentraciones (nM) de cebadores: 100 (1), 200 (2), 300 (3), 400 (4) y 500 (5), respectivamente.

### 3.3. Efecto del KCN y mutaciones en el operón *cio1* sobre la expresión de los operones *cco* y *cox*.

Comparando con la expresión en medio mínimo de la estirpe silvestre (R1) de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, todas las variables utilizadas tienen efectos dispares sobre la expresión de los operones *cco* y *cox* (Figura 32), incluyendo la adición de KCN, el bloqueo de la expresión del operón *cio1* en la



estirpe T1 y la sobreexpresión del operón *cio1* (con el gen *nir/sir* bloqueado) en la estirpe T10. Así, la expresión del operón *cco2* disminuyó drásticamente como efecto de todas las variables mencionadas, mientras que, de manera general, la expresión génica de los genes *cco1* y *cox* aumentó como efecto de todas, o la mayoría, de estas variables. La inducción de la expresión génica fue especialmente notable para el operón *cox* en la estirpe T10 tratada con KCN.

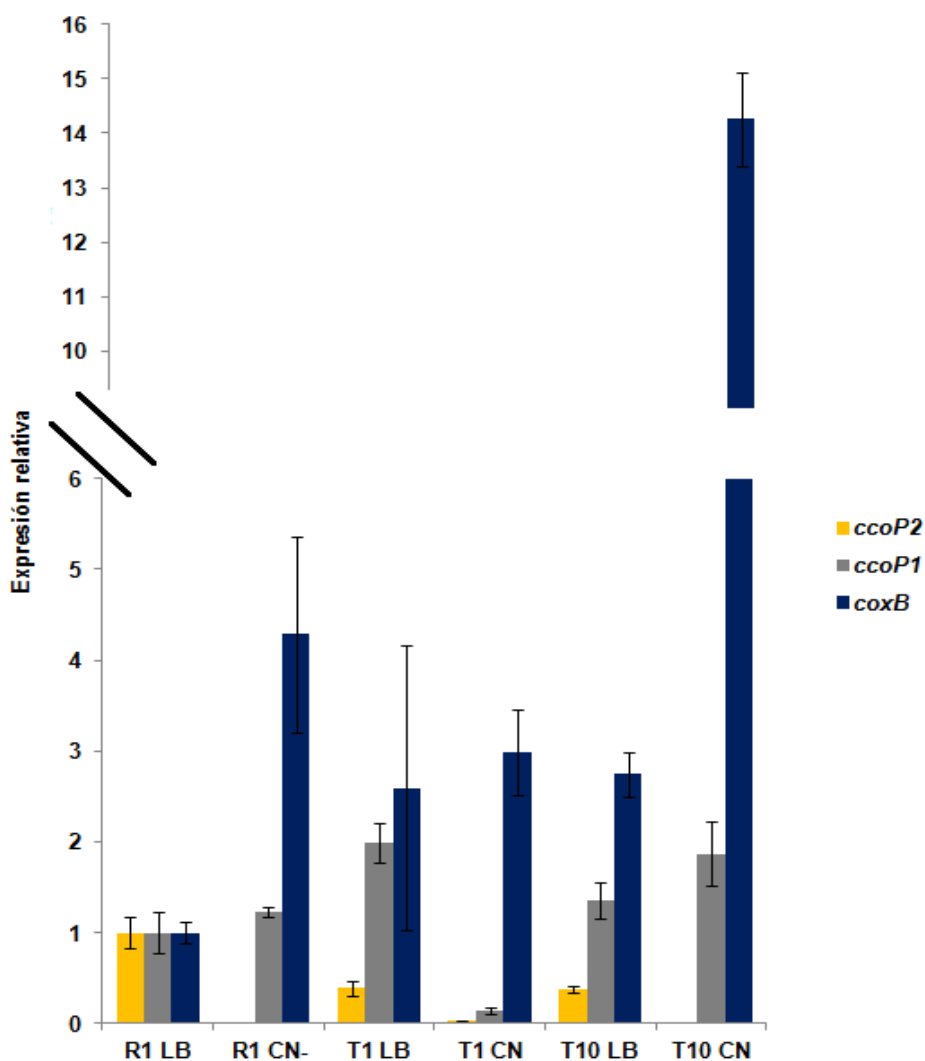


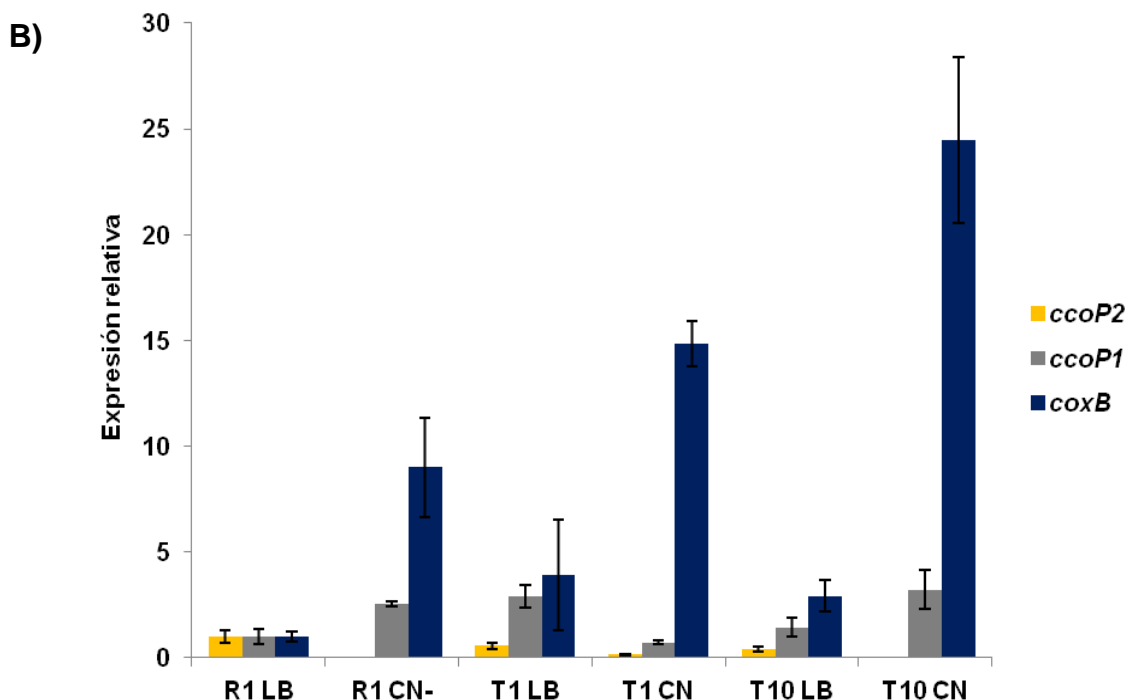
**Figura 32. Estudio de la expresión en medio mínimo para las oxidasas *cbb<sub>3</sub>-1*, *cbb<sub>3</sub>-2* y *aa<sub>3</sub>*.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 19, incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA16S. Como condición calibradora se utilizó R1-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> para cada uno de los tres operones. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en un análisis por triplicado de un experimento, elegido como representativo de tres experimentos diferentes realizados.

## Resultados

Posteriormente, se estudió el efecto de la expresión para las tres oxidasas en medio LB, en presencia o ausencia de KCN (Figura 33). El patrón de expresión en medio LB fue similar al obtenido en medio mínimo, destacando una elevada sobreexpresión en el mutante T10 en presencia de cianuro, para el operón *cox*, así como en el *cco1*, aunque en menor medida. En el operón *cco2*, se repite el mismo patrón de expresión para cada una de las estirpes, siendo los valores muy bajos. Los resultados obtenidos para el cálculo de los niveles de expresión haciendo uso del gen endógeno *rpoD*, siguieron el mismo patrón que utilizando el gen 16S (Figura 33B).

A)

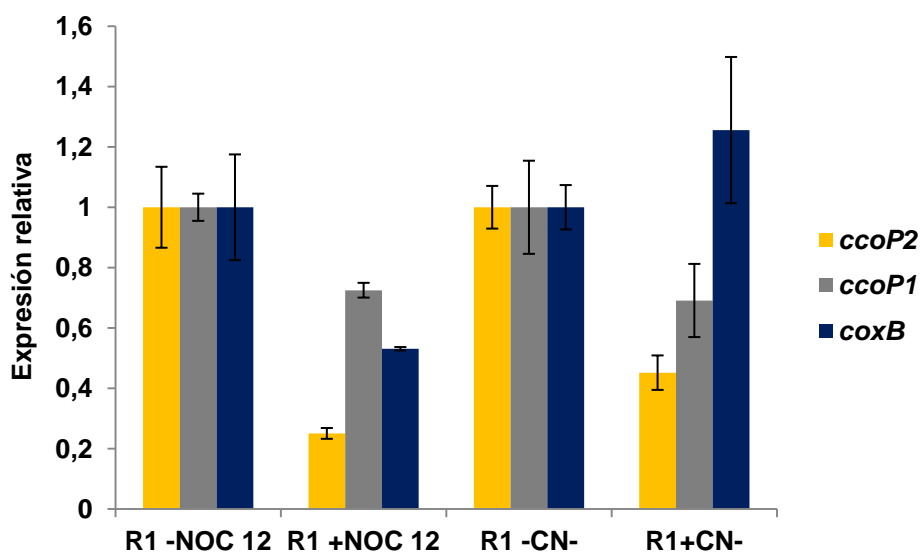




**Figura 33. Expresión de los genes *ccoP1*, *ccoP2* y *coxB* en medios con cianuro y en mutantes afectados en la expresión de *cio1*.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 19, incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA16S **A)** o del mRNA *rpoD* **B)**. Como condición calibradora se utilizó R1-LB para cada uno de los tres operones. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en un análisis por triplicado de un experimento, elegido como representativo de tres experimentos diferentes realizados.

### 3.4. Efecto del NOC-12 y KCN sobre la expresión de los operones *cco* y *cox*.

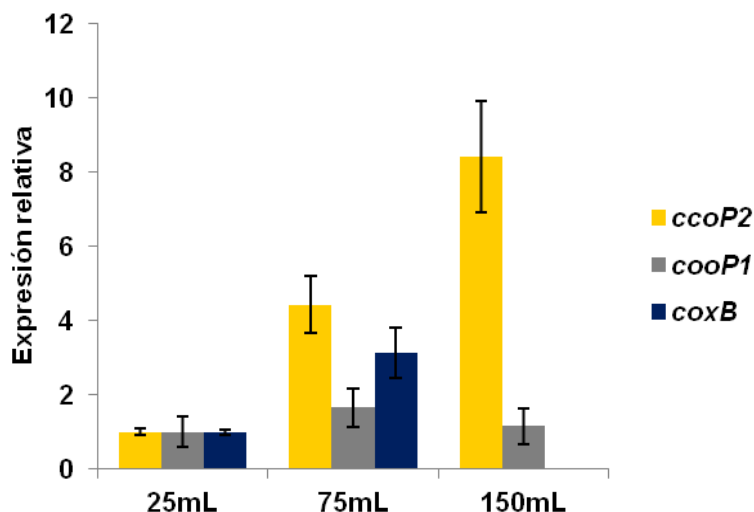
Como en los casos anteriores, haciendo uso del RNA ya preparado para el estudio de las otras tres oxidاسas, se estudió del efecto del dador de óxido nítrico NOC-12 en las tres oxidاسas correspondientes a los genes *cco* y *cox* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. Los resultados de la Figura 34, muestran como el NOC-12 tiene un efecto ligeramente negativo sobre la expresión de las tres oxidاسas, al igual que el KCN, excepto en la oxidاسa *aa<sub>3</sub>*, donde el KCN tiene un efecto positivo sobre su expresión de dicha oxidاسa.



**Figura 34. Regulación de la expresión de *ccoP1*, *ccoP2* y *coxB* por NOC-12.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 22, incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA16S. Como condición calibradora se utilizó R1-NOC12 para cada uno de los tres operones, y el R1-CN<sup>-</sup> también para los tres operones. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en un análisis por triplicado de un experimento, elegido como representativo de tres experimentos diferentes realizados.

### 3.5. Efecto del grado de aireación sobre la expresión de los operones *cco* y *cox*.

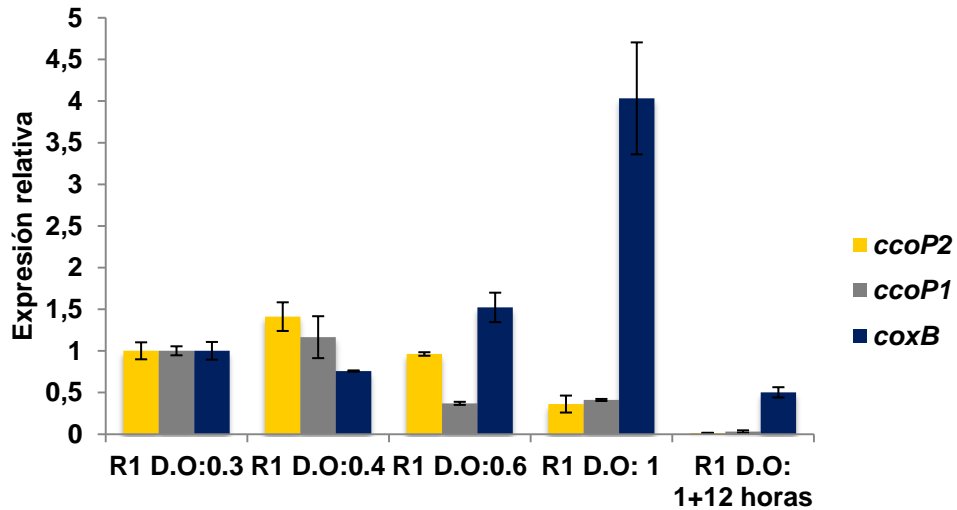
Al igual que para los tres operones *cio*, en las dos oxidasas *cbb<sub>3</sub>* y la oxidasa *aa<sub>3</sub>* se llevó a cabo el estudio de la influencia del grado de aireación, las distintas fases de crecimiento, y el efecto del NOC-12 sobre los niveles de expresión. Mientras que en el operón *cco2* la disminución de la concentración de oxígeno provoca un incremento en los niveles de expresión, en el operón *cco1* la concentración de oxígeno no tiene influencia alguna sobre los niveles de expresión (Figura 35). Por el contrario, para el operón *cox* la baja concentración de oxígeno disminuye los niveles de expresión.



**Figura 35. Efecto del grado de aireación sobre la expresión de *ccoP1*, *ccoP2* y *coxB*.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 23, incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA16S. Como condición calibradora se utilizó el volumen de 25 mL, experimentos en los que la cantidad de oxígeno era mayor, para cada operación respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en un análisis por triplicado de un experimento, elegido como representativo de tres experimentos diferentes realizados.

### 3.6. Efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de los operones *cco* y *cox*

Al llevar a cabo el estudio de las distintas fases de crecimiento sobre la expresión de las tres oxidاسas, lo más significativo observado fue que en fase estacionaria avanzada, todas las oxidاسas sufren una caída de expresión, pero es menor en el operón *cox*, y en fase estacionaria temprana, solo el operón *cox*, muestra una fuerte sobreexpresión, mientras que los otros dos siguen mostrando una caída de expresión aunque no tan acusada. En fase exponencial, los niveles de expresión para las tres oxidاسas no varían significativamente.



**Figura 36. Efecto de la fase de crecimiento sobre la expresión de ccoP1, ccoP2 y coxB.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 24, incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA16S. Como condición calibradora se utilizó la muestra con menor densidad óptica para cada oxidasa respectivamente. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en un análisis por triplicado de un experimento, elegido como representativo de tres experimentos diferentes realizados.

## **Capítulo II. Estructura génica** **del operón *cio1***





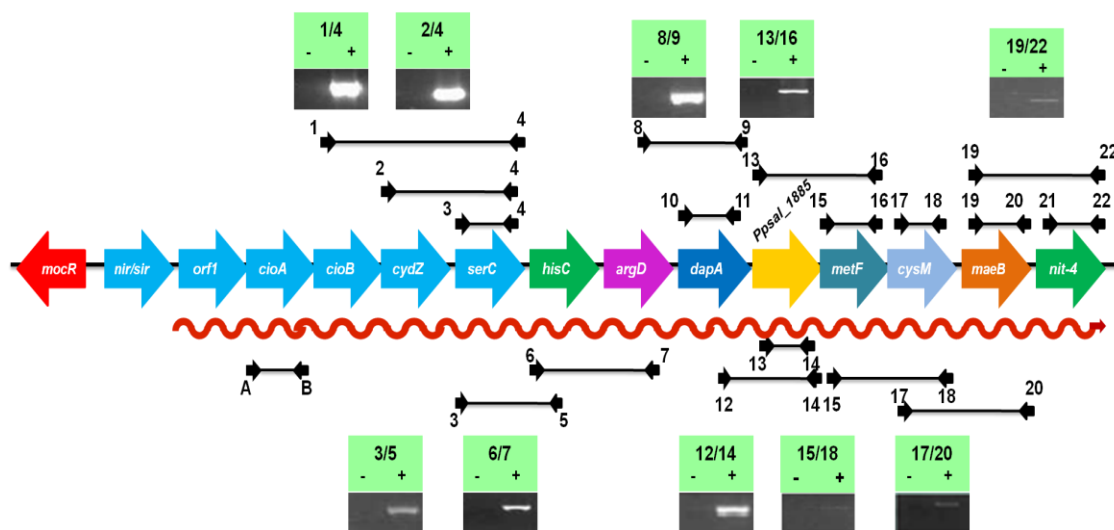
## 1. EXPRESIÓN DE LOS GENES ASOCIADOS A LA REGIÓN *CIO1*.

En el entorno más cercano al operón *cio1* hay una serie de genes (Figura 37) que abarcan desde la secuencia codificante de una fosfoserina aminotransferasa (*serC*) hasta la de la 3-CN-Ala (*nit4*), un gen de *P. pseudoalcaligenes* que había sido estudiado en trabajos previos (Tesis Doctoral F. Acera, 2011). Entre los genes identificados aparece también la secuencia que codifica una posible cisteína sintasa (*cysM*). Puesto que el aminoácido Ser es precursora de la síntesis de Cys y ésta lo es a su vez de la CN-Ala, los genes *serC*, *cysM* y *nit4* podrían ser parte de una ruta de síntesis de 3-CN-Ala descrita en plantas y procariontes (Dunnill y Fowden, 1965; Floss *et al.*, 1965). Aguas arriba de *serC* se encuentra el operón *cio1*, responsable de la síntesis de una oxidasa terminal insensible a KCN de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (capítulo 1 de la sección de resultados de este trabajo). El término de transcripción de *cio* no ha sido mapeado más allá de *cioB*, aunque el gen *cydZ* se puede asumir como cotranscrito al iniciarse su secuencia codificante en la posición +1 respecto al término de la de *cioB* (Tesis Doctoral F. Acera, 2011)

### 1.1. Cotranscripción de los genes adyacentes al operón *cio1*.

Para el estudio de la expresión de los genes situados en la proximidad del operón *cio1* se empleó la estirpe silvestre incubada en medios con cianuro, ya que, como se ha mostrado en el capítulo 1 de esta Tesis, en esta condición aumenta mucho la expresión de *cio1*. Se realizó la PCR con parejas de cebadores que amplifican fragmentos de cDNA cubriendo regiones codificantes de genes vecinos, con un límite máximo de distancia entre cebadores de 2,7 Kb, de manera que su tamaño no dificultase la eficiencia de la amplificación y se pudiese establecer la cotranscripción, en los casos en que ocurriese y siempre que los controles sin retrotranscriptasa diesen resultado negativo (Figura 37). De los resultados obtenidos se deduce la cotranscripción con el operón *cio1* a lo largo de todos los genes situados en la región estudiada hasta

llegar al gen *nit4*, aunque en algunos casos (genes *metF-cysM-maeB*) la detección del RNA está en el límite de la sensibilidad de la técnica.

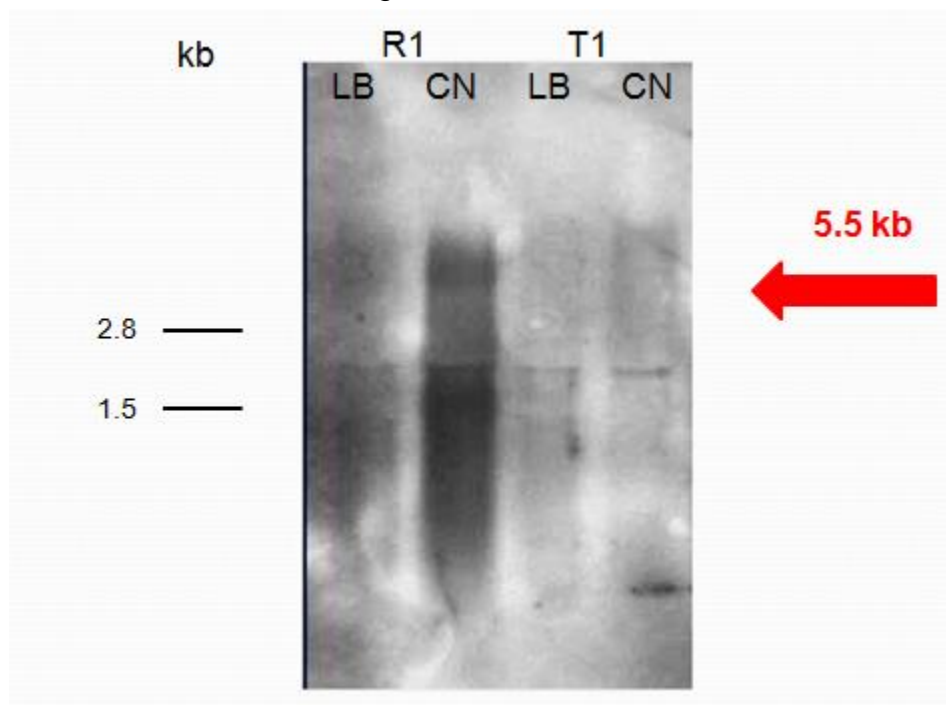


**Figura 37. Expresión génica en la región de *cio1*.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 19. Para las reacciones de PCR se empleó, con cada pareja de cebadores, un control negativo consistente en la amplificación sobre una reacción de retrotranscripción en la que se había omitido (-) la enzima retrotranscriptasa. Como control positivo se utilizó DNA genómico, para comprobar la amplificación de las distintas parejas de cebadores utilizadas (no mostrado en la Figura). Se muestran como flechas todos los cebadores utilizados en este trabajo. Los tamaños de los genes no guardan correspondencia con el tamaño mostrado en la Figura.

La región en la que se detecta la cotranscripción desde el operón *cio1* abarca 16143 pb, incluyendo desde el codón de inicio del gen *nir/sir* hasta el codón de parada de *nit4*. La pertenencia del gen *nir/sir* al operón *cio1* ha sido tratada con anterioridad (Quesada *et al.*, 2007) (Tesis Doctoral F. Acera, 2011). Al tratarse de una secuencia de esta envergadura no puede excluirse que existan promotores y/o terminadores de la transcripción en posiciones internas. Para su análisis se llevaron las estrategias que se describen en los apartados siguientes, incluyendo la detección del mRNA de *cio1* mediante hibridación molecular, para estudiar el tamaño y la regulación de la expresión génica de su mRNA.

Mediante la electroforesis de RNA y su posterior transferencia a membrana e hibridación (“northern blot”) con una sonda específica de *cio1* se

intentó detectar la existencia de posibles transcritos que procediesen de esta región (Figura 38), observándose una señal, en el RNA procedente de células de la cepa silvestre incubadas con KCN, de aproximadamente 5,5 Kb, un tamaño que se corresponde con el del operón *cio1* previamente definido (5069 pb desde el codón de inicio del gen *nir/sir* hasta el codón de parada de *cydZ* (Quesada *et al.*, 2007). Además, este mRNA presentó el patrón de regulación detectado por qPCR para los genes del operón *cio1* (véase capítulo 1), siendo inducible por KCN al no detectarse en medio LB su presencia y no expresándose en la cepa T1, que carece de operón *cio1* funcional por una inserción antisentido en el gen *nir/sir*.



**Figura 38. Detección del transcrito de *cio1* mediante hibridación.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 19. La sonda utilizada se amplificó mediante PCR con los cebadores 1 y 4 (Figura 37), que abarcan desde *cioB* hasta *serC* en presencia de DIG-UTP, y la detección de los híbridos se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones establecidas (“PCR DIG Labeling Mix” y “DIG DNA Labeling and Detection Kit”, Roche).

Por tanto estos datos sugieren la existencia de una parada de transcripción entre los genes *cydZ* y *serC* para el transcrito del operón *cio1* que comienza en el gen *nir/sir*. Por otra parte, no se detectan señales de hibridación de transcritos de tamaño mayor al mencionado, que pudiesen corresponder a

la cotranscripción desde *cio1* hasta *nit-4* detectada mediante PCR en el apartado anterior, aunque no puede descartarse su existencia ya que un mRNA de 16 Kb debería ser extremadamente inestable y, por tanto, de difícil detección como molécula intacta, lo que también podría explicar la existencia de un rastro de degradación en la zona de bajo peso molecular en el carril correspondiente a las células incubadas con KCN (Figura 38).

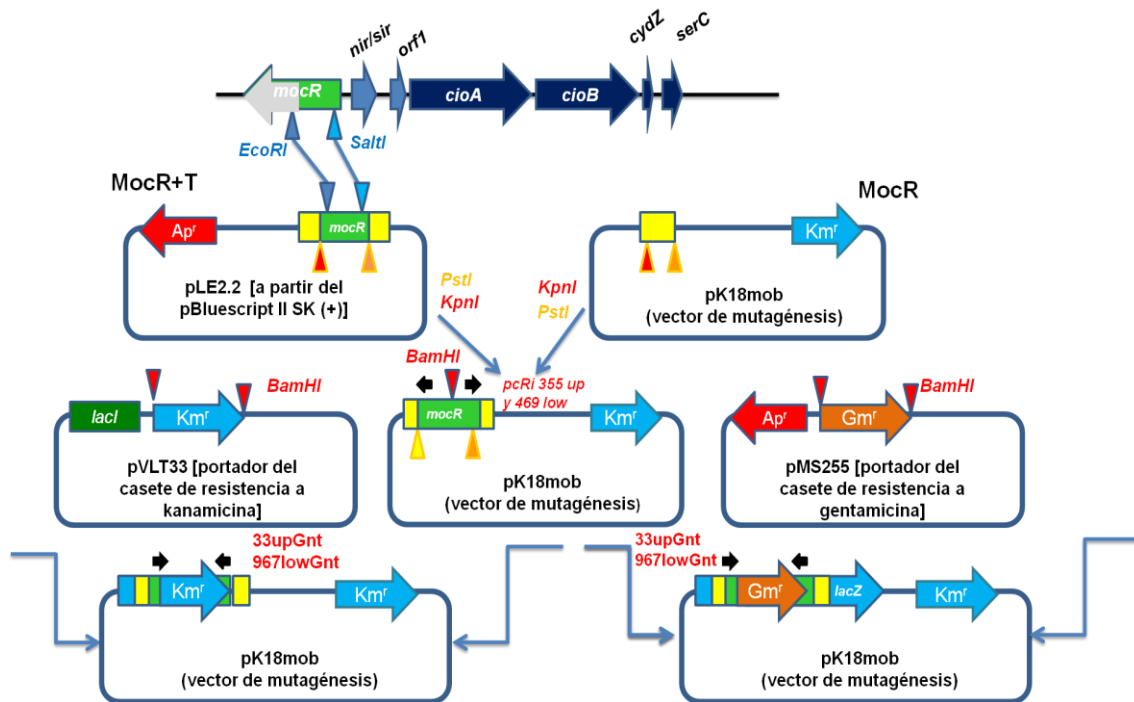
## **1.2. Construcción y análisis de mutantes del gen *mocR*.**

Como se indicó al final del anterior apartado, el estudio de la expresión génica en esta región se llevó a cabo haciendo uso de RNA que había sido preparado de células cultivadas en medio LB pH=8.5, en presencia o ausencia de KCN 2 mM. Las estirpes en las que se decidió analizar el control de la expresión génica fueron, a parte de la propia cepa silvestre (R1) de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y de los mutantes T1 y T10, anteriormente mencionados (véase el capítulo 1 de este trabajo), los mutantes en el gen *mocR* cuya preparación se describe a continuación.

### **1.2.1. Mutagénesis de *mocR*.**

Aguas arriba y con orientación de transcripción contraria al operón *cio1* se localiza un gen de la familia *gntR*, subfamilia *mocR* (Milano *et al.*, 2015), cuyos miembros codifican reguladores transcripcionales con una estructura multimodular caracterizada por presentar un dominio N-terminal para la unión al DNA y un dominio C-terminal con homología a la enzima Asp aminotransferasa que incluye el sitio de unión al coenzima piridoxal-fosfato. Se tomó el plásmido pLE2.2, que corresponde al vector pBluescript II SK (-) con un fragmento EcoRI-Sall de 786 bp procedente del genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y que contiene el extremo N-terminal del gen *mocR* (Milano *et al.*, 2015). Dicho fragmento se transfirió mediante digestión con KpnI-PstI al vector pKmob18 (Schäfer *et al.*, 1994), un plásmido que no se replica en *Pseudomonas* pero que puede ser transferido mediante conjugación. Posteriormente, la PCRi con los cebadores 355up y 469low (véase materiales y métodos, (Tabla 7) y su digestión con BamHI, permitió introducir el gen *aac(3)*,

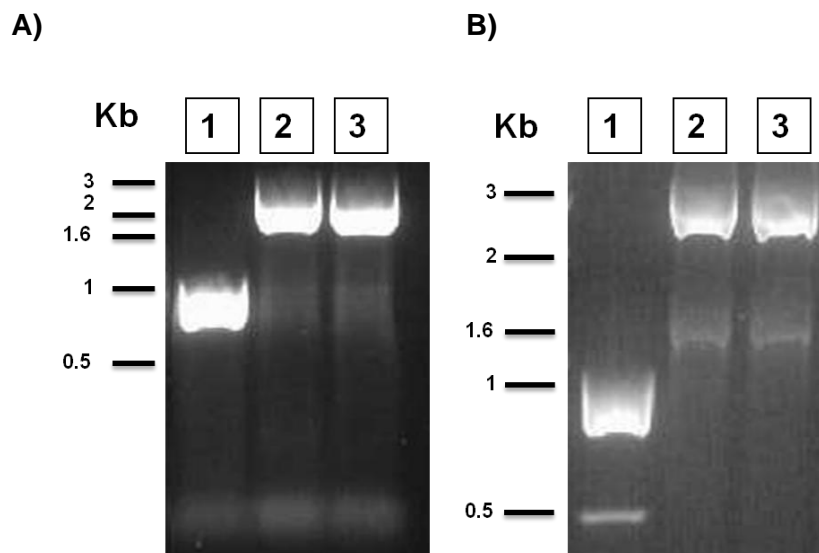
que confiere resistencia a la gentamicina, amplificado con los cebadores gent-upper y gent-lower a partir del vector pMS255 (Becker *et al.*, 1995), o bien el gen *aph(3')*, que confiere resistencia a la kanamicina, amplificado con los cebadores 3U23 y 1607L23 a partir del vector pVLT31 (de Lorenzo *et al.*, 1993), digeridos también ambos fragmentos con BamHI y dando lugar a los plásmidos pKmob18mocRGm y pKmob18mocRkm, respectivamente. Las construcciones finales tienen la secuencia *mocR* interrumpida por el gen *aac(3)*, que no presenta parada de transcripción, o bien *aph(3')*, que sí contiene término de transcripción, habiéndose seleccionado las inserciones con los genes de resistencia orientados transcripcionalmente según se muestra en la Figura 39.



**Figura 39. Construcción de vectores para la mutagénesis del gen *mocR*.** Se muestran los genes, enzimas de restricción y cebadores utilizados.

Las construcciones así obtenidas se transformaron por electroporación en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (apartado 6.13.2, Materiales y Métodos), dónde se seleccionaron clones resistentes a la gentamicina o a la kanamicina, según correspondiese. La comprobación de la inserción por doble recombinación se efectuó mediante PCR con los cebadores 33upGnt y

967lowGnt, obteniéndose en la cepa silvestre la banda con el tamaño esperado y en los dos clones analizados de cada mutante el aumento de tamaño que únicamente puede ser producto de eventos de integración por doble recombinación.

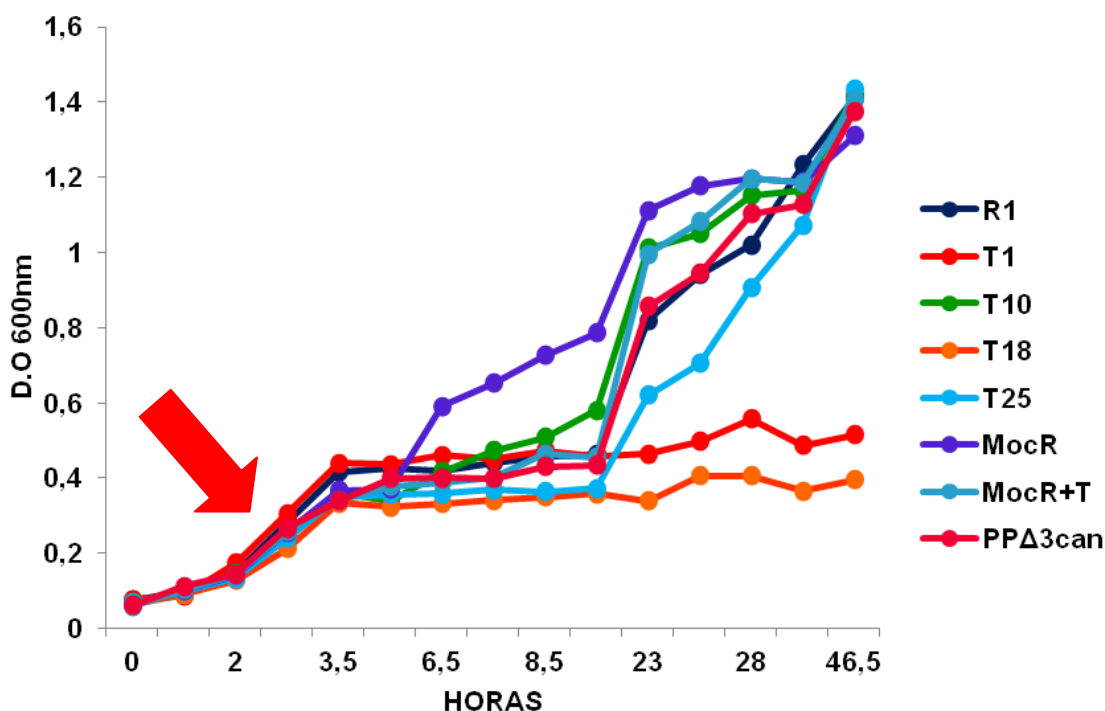


**Figura 40. Comprobación de la construcción de los mutantes MocR y MocR+T.** Se amplificó el DNA genómico de la estirpe R1 y de un clon de cada uno de los mutantes, MocR y MocR+T. Los cebadores empleados fueron 33upGnt y 967lowGnt (inserción de *aac(3)* en MocR) o bien inserción de *aph(3')* en MocR+T), en ambos casos. **A)** 1, se corresponde con la amplificación de la estirpe silvestre; 2, se corresponde con la cepa mutante MocR-1; 3, se corresponde con la cepa mutante MocR-2. **B)** 1, se corresponde con la amplificación de la estirpe silvestre; 2, se corresponde con la cepa mutante MocR+T-1; 3, se corresponde con la cepa mutante MocR+T-2.

### 1.2.2. Estudio fenotípico de los mutantes MocR y MocR+T.

Una vez construidos los mutantes en el gen *mocR* se analizó si su falta de expresión, asociada o no a una posible expresión constitutiva del operón *cio1*, provoca alguna alteración en su tolerancia al KCN. Para ello se realizaron experimentos de crecimiento en medios con KCN dónde se cultivaron la estirpe silvestre R1 de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, los mutantes T1 y T10 ya mencionados anteriormente (T1 presenta mutación con efecto polar en el gen *nir/sir* y T10 tiene la inserción en el mismo gen con la misma orientación transcripcional que *cio1*, confiriéndole expresión constitutiva; ver capítulo 1 y por último los mutantes MocR y MocR+T. Los resultados obtenidos (Figura 41)

muestran una leve mejora en el crecimiento del mutante MocR en presencia de KCN con respecto a las estirpes R1, T10 y MocR+T; mientras que en el mutante T1 se observó una parada del crecimiento después de la adición de KCN.

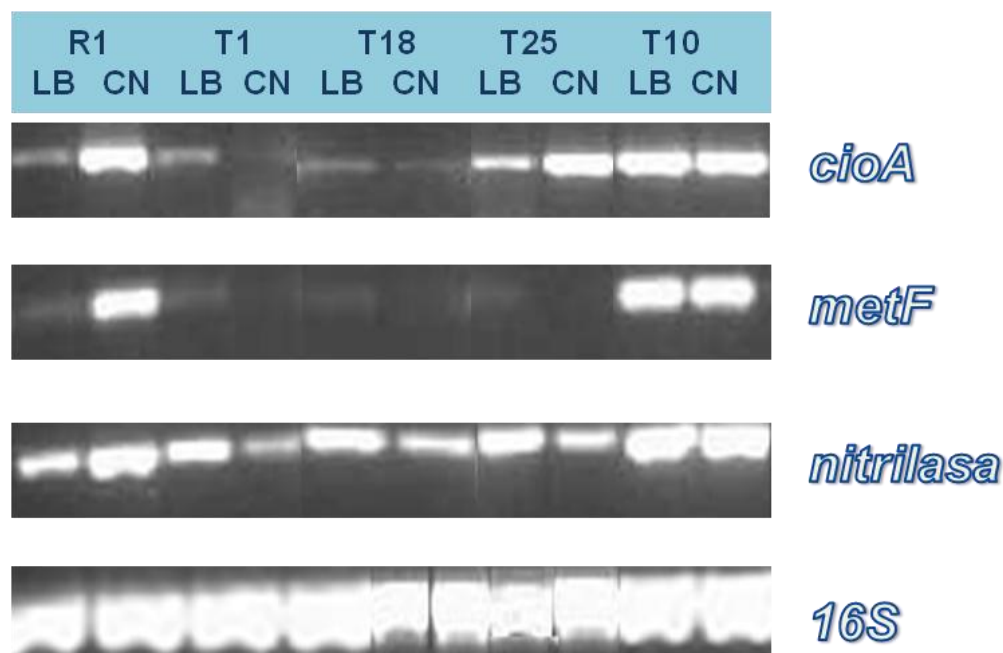


**Figura 41. Crecimiento en medios con KCN de los mutantes MocR y MocR+T.** El estudio se llevó a cabo en medio LB añadiendo el KCN al alcanzar el crecimiento de las estirpes una D.O. de 0,3. La concentración de KCN utilizada fue de 2 mM. Se muestra un experimento representativo de tres repeticiones, en las que se obtuvieron resultados similares. La flecha roja indica el momento en el que fue añadido el KCN.

### 1.3. Regulación de los genes del operón *cio1* por mutaciones con efectos polares sobre su propia expresión.

Se utilizaron los mutantes T1, T18 y T25, que corresponden a inserciones en los genes *nir/sir*, *cioA* y *serC*, respectivamente, con un efecto polar potencial sobre la expresión del transcrito en el que se sitúan. El objetivo inicial de este estudio es valorar el efecto de la anulación del promotor *cio1* sobre la expresión de los genes de su propio operón, evidenciando la cotranscripción de las secuencias codificantes del operón y, en su caso,

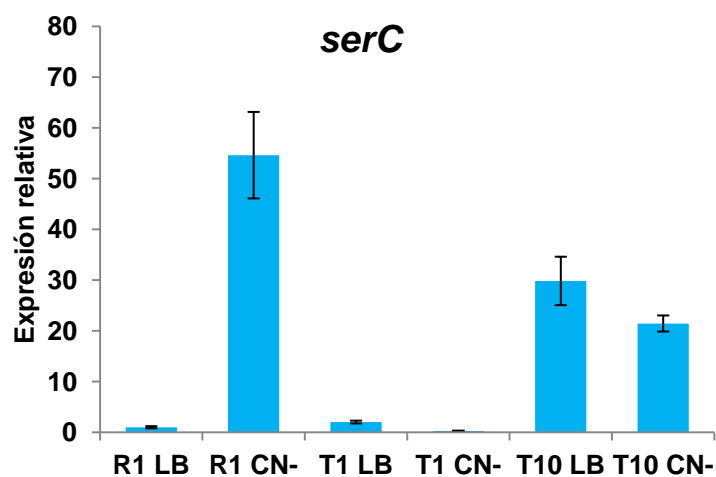
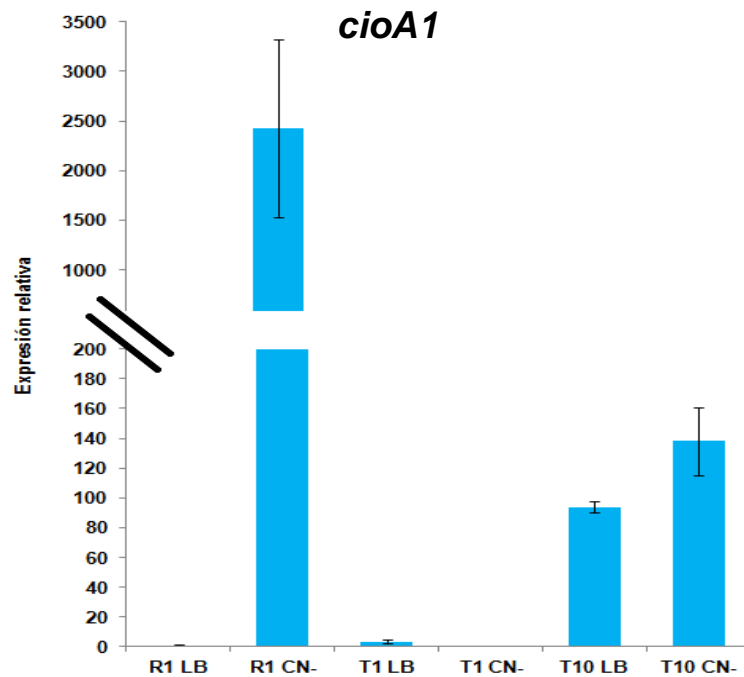
detectar la posible presencia de promotores adicionales. Por otro lado, la expresión constitutiva del operón *cio1* desde la inserción en *nir/sir* del mutante T10 debería conducir a la expresión constitutiva de todas las secuencias cotranscritas de *cio1* (Figura 42). Se determinó la expresión génica mediante rtPCR y análisis semi-cuantitativo de la abundancia de su RNA en tres regiones del operón *cio*, correspondientes a los genes *cioA*, *metF* y *nit-4*. Así, se observó que la expresión en KCN de *cio1* está bloqueada para los tres genes en los mutantes T1, T18 y T25, no detectándose (a este nivel de sensibilidad) alteraciones que pudieran ser debidas a la existencia de promotores intermedios. De la misma manera, la expresión constitutiva de *cio1* desde la inserción en el gen *nir/sir* produjo un aumento de expresión en medios sin KCN para las tres secuencias analizadas, descartándose la existencia de señales internas que produzcan paradas completas de la transcripción.

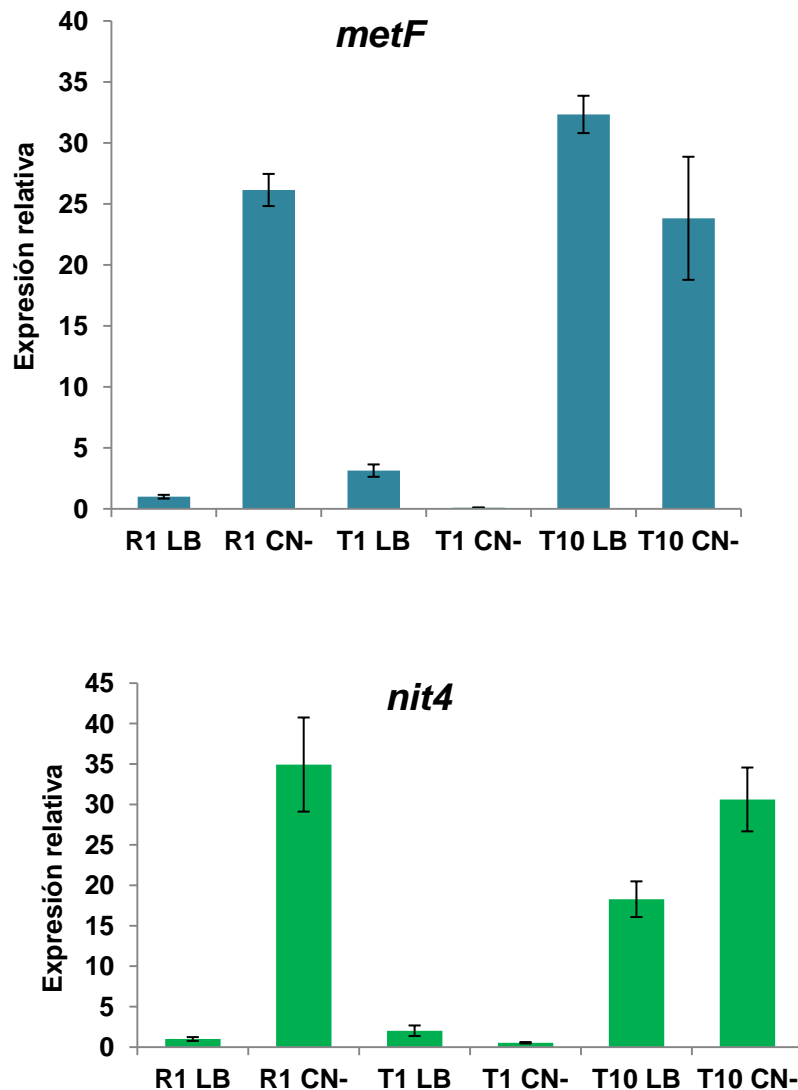


**Figura 42. Regulación de la expresión del operón *cio1* en la estirpe silvestre y mutantes T1, T18, T25 y T10.** Las células se cultivaron en medio LB, hasta un crecimiento de 0,3 UDO. En este punto se recogió el volumen de células proporcional a 3UDO y al volumen restante se le añadió KCN 2mM, dejándolo un periodo de tiempo de dos horas. En estos dos puntos se extrajo el RNA, se hizo rtPCR, y con el cDNA se llevaron a cabo las amplificaciones con las correspondientes parejas de cebadores.



La expresión génica se cuantificó por qPCR en uno de los mutantes con inserción polar (T1) y en el mutante T10, para los tres genes anteriormente mostrados y añadiendo la secuencia codificante de *serC*, situada inmediatamente después de la parada de transcripción (parcial) detectada anteriormente (Figura 43). Además de corroborarse lo observado en PCR a tiempo final, la qPCR evidencia en la cepa R1 una bajada en el nivel de expresión de los tres genes situados a la derecha de *cio1*, desde una inducción de aproximadamente  $2 \cdot 10^3$  veces en medios con KCN para *cioA* hasta valores de inducibilidad de 20-50 veces para el resto de genes, lo que resulta compatible con una parada de transcripción (parcial) después de la secuencia codificante de *cydZ*, como ya se ha sugerido en este trabajo (apartado 1.1 capítulo 2 ).

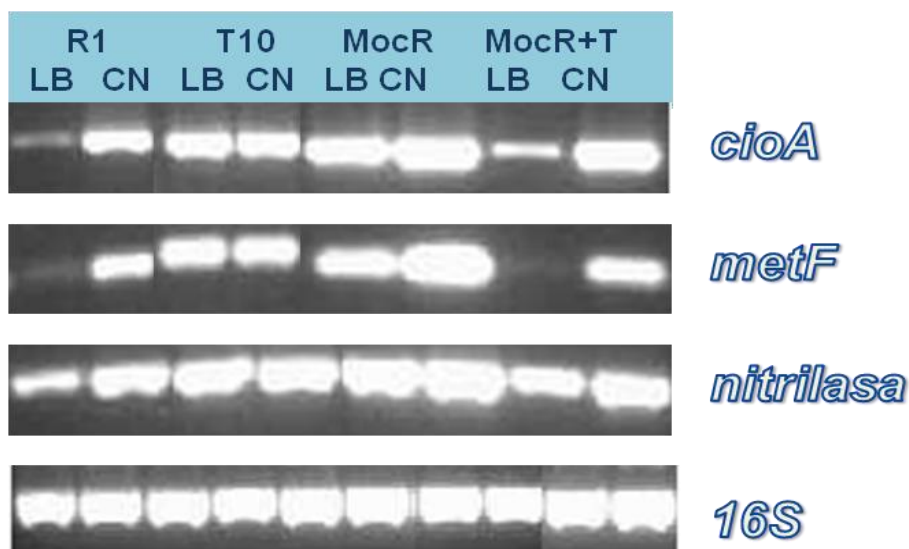




**Figura 43. Estudio de la expresión en la estirpe silvestre, y mutantes T1 y T10.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 19, incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA16S. El mRNA se determinó mediante q-PCR y se normalizaron con los valores de mRNA del gen 16S, utilizado como gen endógeno. Como condición calibradora se utilizó la condición de R1-LB en ausencia de KCN. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos diferentes.

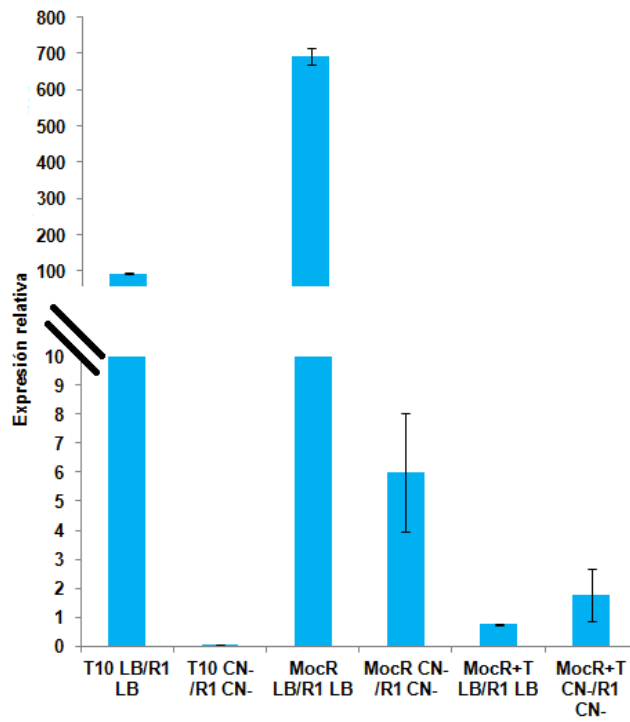
#### 1.4. Regulación de la expresión de los genes del operón *cio1* por mutaciones en el gen *mocR*.

Los dos mutantes construidos en el gen *mocR* se diferencian en la polaridad de su efecto sobre la transcripción de *cio1*. Así, mientras que el mutante MocR no tiene parada de transcripción y podría conducir a la expresión constitutiva de *cio1*, el mutante MocR+T sí tiene parada transcripcional en la secuencia del gen de resistencia, luego no debería afectar la expresión de *cio1*. Cuando se determinó la expresión de los genes *cioA*, *metF* y *nit4* en los mutantes MocR y MocR+T, en comparación con la cepa R1 e incluyendo como referencia al mutante T10, se detecta una fuerte expresión constitutiva en el mutante MocR, pero no en el MocR+T (Figura 44). Puesto que en estos mutantes se está anulando la propia expresión del gen *mocR*, lo que podría tener un efecto sobre *cio1*, se cuantificó la expresión por qPCR en estas condiciones (Figura 45).

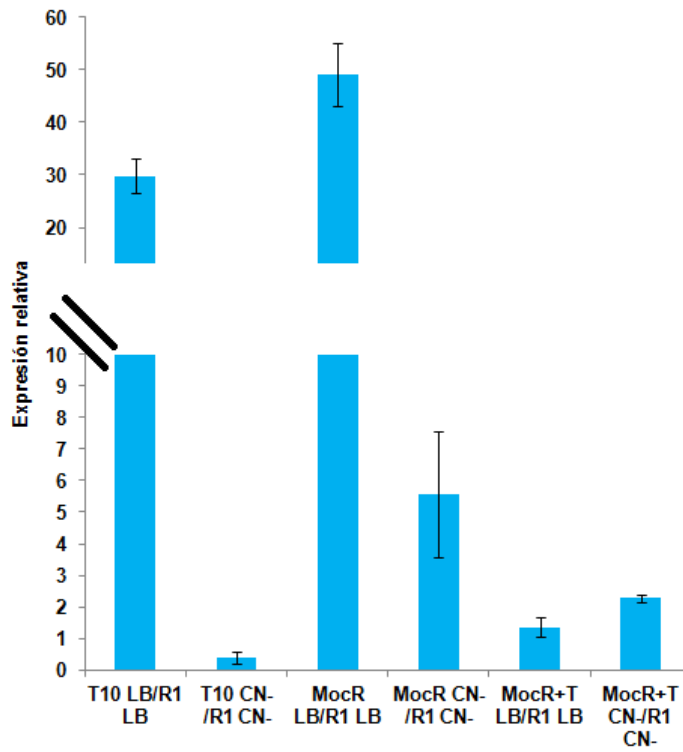


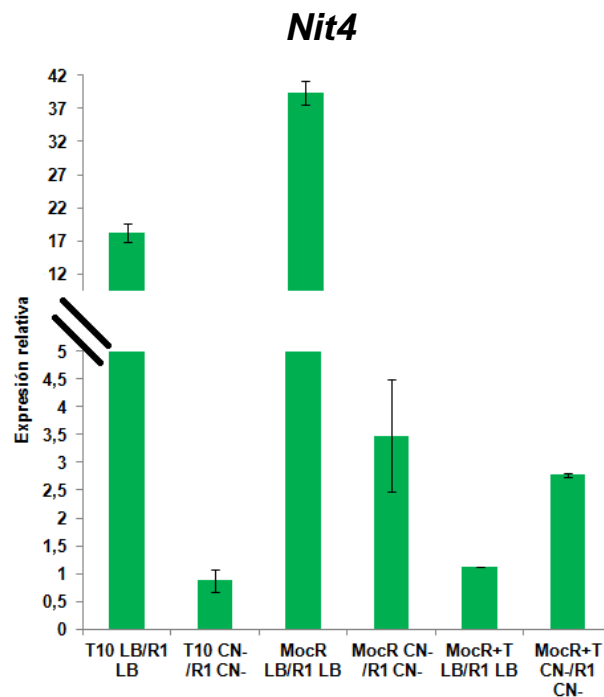
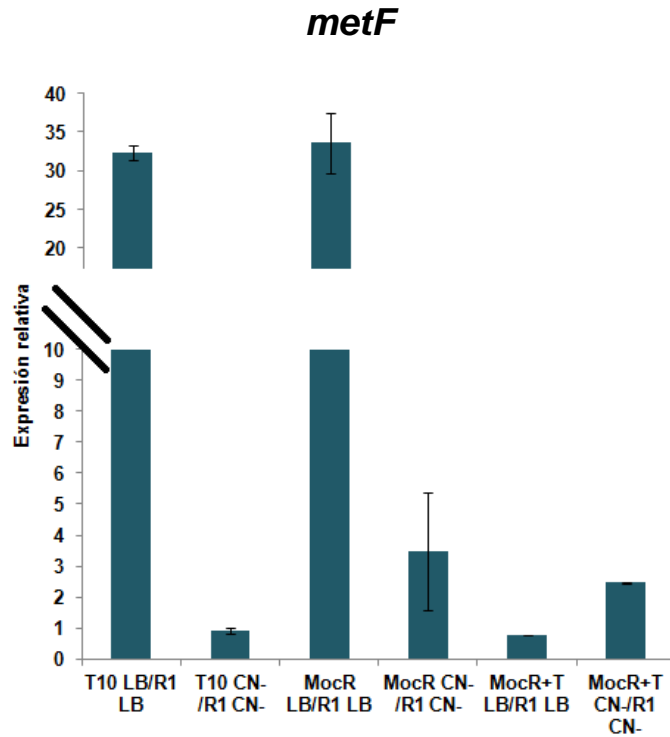
**Figura 44. Regulación de la expresión de la estirpe silvestre y mutantes T10, MocR y MocR+T.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 19, incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA16S. Se hizo rtPCR, y con el cDNA se llevaron a cabo las amplificaciones con las correspondientes parejas de cebadores.

*cioA*



*serC*



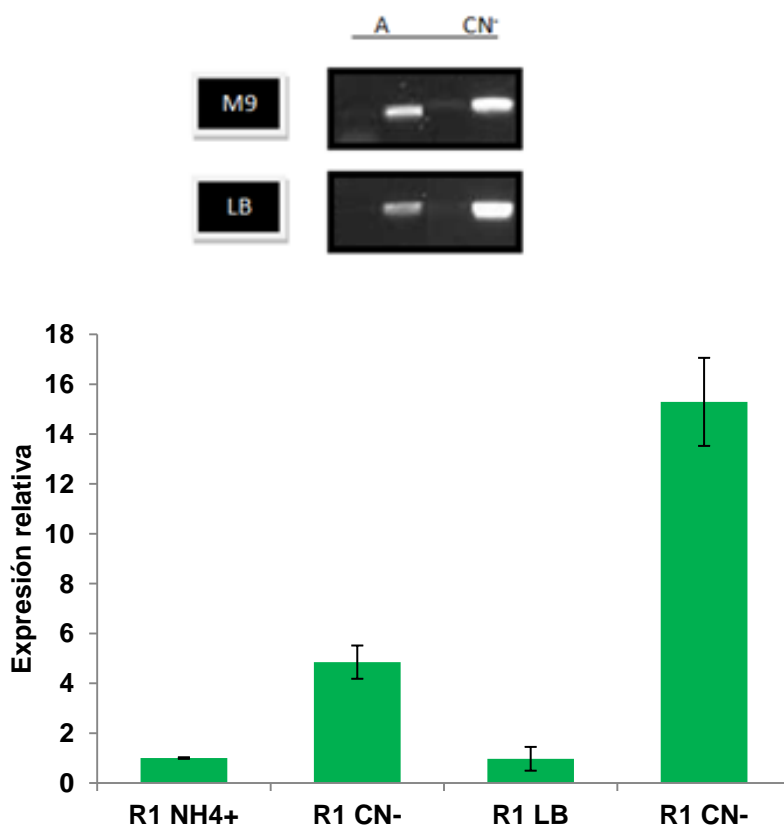


**Figura 45. Estudio de la expresión en los mutantes T10, MocR y MocR+T.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 19, incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA16S. El mRNA se determinó mediante q-PCR y se normalizaron con los valores de mRNA del gen 16S, utilizado como gen endógeno. Como condición calibradora se utilizó la condición de R1-LB en ausencia de KCN. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos diferentes.

### 1.5. Regulación de la expresión del gen *nit4*.

*Pseudomonas pseudoalcaligenes* utiliza KCN como fuente de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2005), aunque puede usar derivados del KCN como la 3-cianoalanina, un posible intermediario en la asimilación de KCN como se ha demostrado tanto en bacterias como en plantas (Luque-Almagro *et al.*, 2005; Piotrowski y Volmer, 2006; Yanase *et al.*, 1983). La mayoría de las enzimas implicadas en el metabolismo del KCN y de otros tóxicos son inducibles por la presencia de estas moléculas, sin embargo en los trabajos previos con *P. pseudoalcaligenes* la actividad nitrilasa de 3CNAIa pareció ser constitutiva (Tesis Doctoral Victor Luque-Almagro, 2005). En trabajos previos (Tesis Doctoral F. Acera, 2011) se intentó determinar la inducibilidad de dicha enzima, por ello se llevaron a cabo medidas de actividad en medio LB, medio mínimo y en medios con KCN, observándose en ausencia de KCN una actividad constitutiva, y en las medidas donde el KCN estuvo presente, una cierta inducibilidad de su expresión.

Existe una aparente contradicción entre las medidas de regulación de la expresión del gen *nit4* que se muestran en este capítulo (Figura 43), donde se detecta una clara inducibilidad por cianuro en consonancia con su cotranscripción en el operón *cio1*, y las medidas de actividad enzimática anteriormente mencionadas. Además, el resultado de la rtPCR a tiempo final (Figura 42) podría también interpretarse como contradictorio con su propia qPCR (Figura 43), ya que la abundancia de transcritos en LB de *nit4* evidenciada por electroforesis en agarosa de los productos de PCR es relativamente mayor que la detectada en otras regiones de *cio1* (Figura 42). Por ello se decidió efectuar un estudio comparativo específico para la expresión génica de *nit4* en medio mínimo y LB, intentado contrastar la hipótesis de una supuesta regulación diferencial entre *nit4* y *cio1*, lo que supondría la existencia de un promotor específico interno a la propia estructura de *cio1* (Figura 46). El resultado obtenido demuestra la inducibilidad por cianuro y la co-regulación de este gen dentro del operón *cio1* (Figura 46).



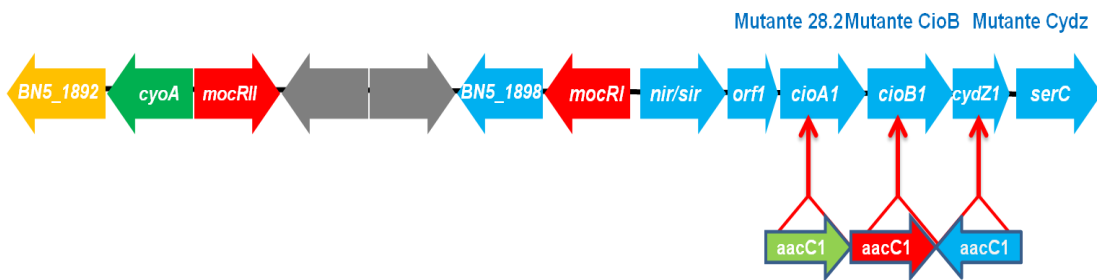
**Figura 46. Regulación por KCN de la expresión del gen *nit4*.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en las Figuras 17 y 19, incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA16S. El mRNA se determinó mediante q-PCR y se normalizaron con los valores de mRNA del gen 16S, utilizado como gen endógeno. Como condición calibradora se utilizó la condición de R1-LB y R1 amonio en ausencia de KCN. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos diferentes.

### 1.6. Regulación de la expresión de genes agrupados en el entorno de los genes *cio*.

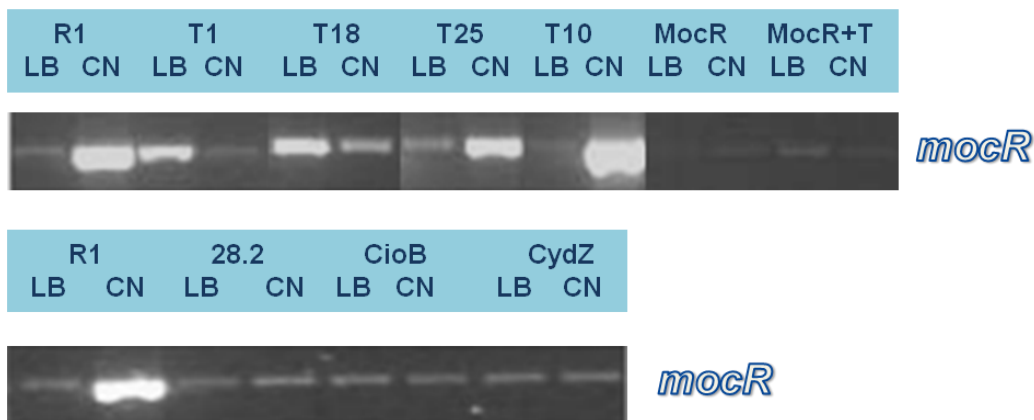
Por último se analizó la expresión de genes que, estando agrupados con el operón *cio1* aunque formando parte de distintas unidades transcripcionales, pudiesen estar relacionados funcionalmente con el proceso de la asimilación y/o resistencia al cianuro. Estos genes son el propio regulador *mocR*, *BN5\_1898* y *BN5\_1892*. En algunos casos, fueron los estudios de transcriptómica, cuyos resultados serán mostrados en el capítulo siguiente, los que permitieron detectar patrones de expresión diferenciales en respuesta a la presencia de KCN. El gen *BN5\_1898* codifica una 2-ceto-3-deoxifosfogluconato

aldolasa, conocida comúnmente como EDA (*Entner Doudoroff Aldolase*), estando localizado contiguo a *mocR* y en la misma dirección de transcripción (Figura 47A). Corriente arriba está localizado el pseudogen *cyoA*, anteriormente mencionado (capítulo 1), y en su misma orientación transcripcional se detecta un gen para un regulador transcripcional de la familia *lysR*, *BN5\_1892*, estando ambas secuencias fuertemente reguladas por KCN, según se desprende de los análisis transcriptómicos (capítulo 3).

A)



B)



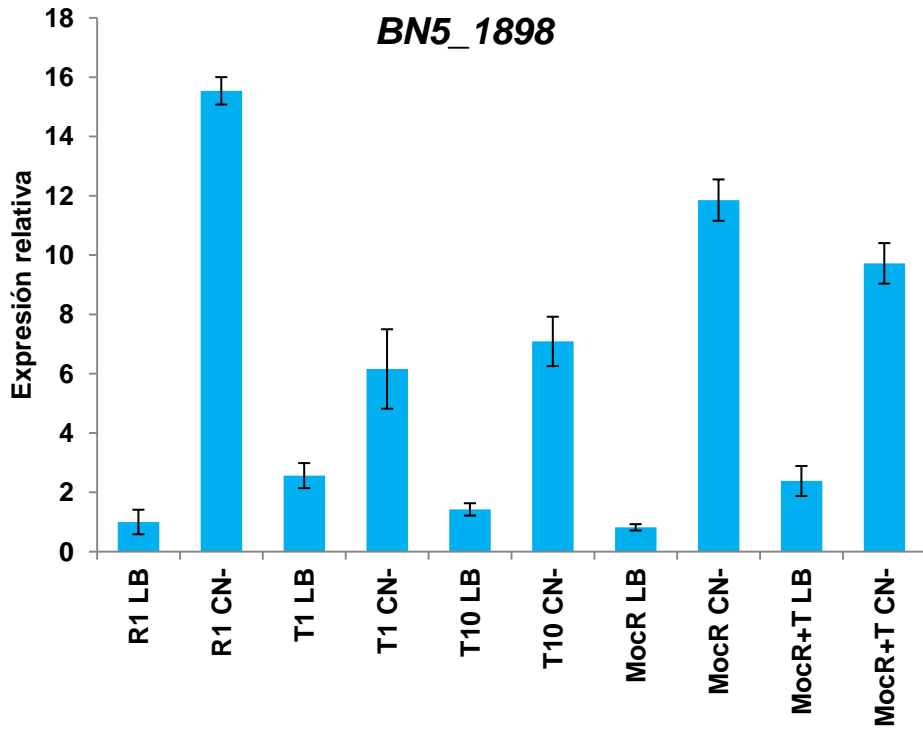
**Figura 47. Entorno génico del operón *cio1*.** A) Esquema de los mutantes en el operón *cio1*, y localización de genes situados corriente arriba del operón *cio1*. B) Expresión del gen *mocR*, en la estirpe silvestre y en los mutantes de la región *cio*.

El estudio de la regulación de la expresión del gen *mocR* permitió confirmar la supresión de su transcripción en los mutantes MocR y MocR+T, y también se observaron posibles efectos motivados por las mutaciones en el operón *cio1* (Figura 47A). Resulta llamativa la fuerte caída de expresión en medios con KCN en todos los mutantes con inserciones que bloquean la

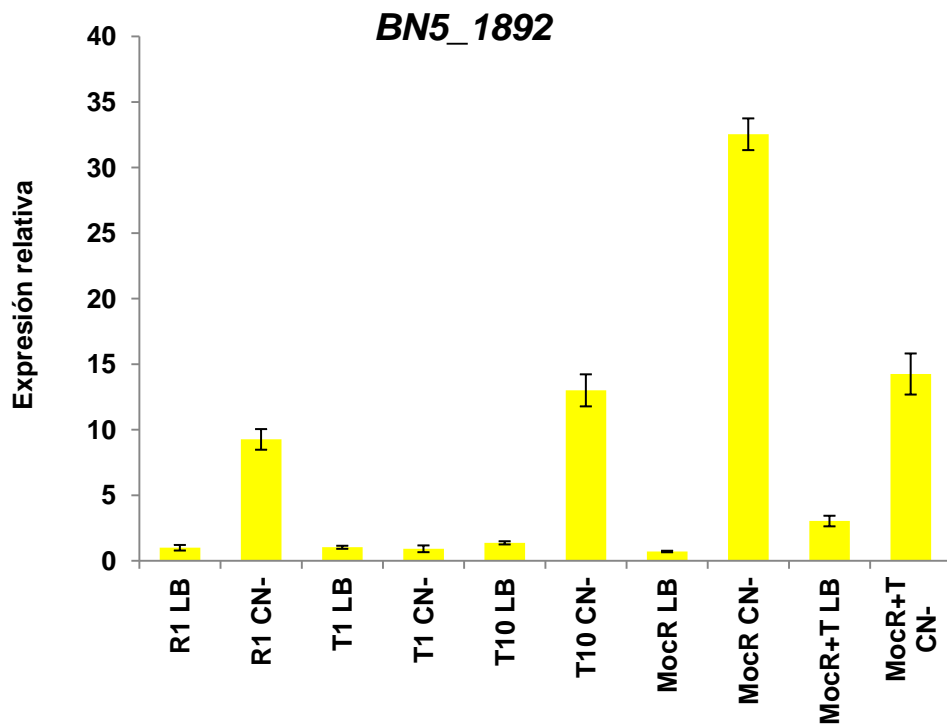


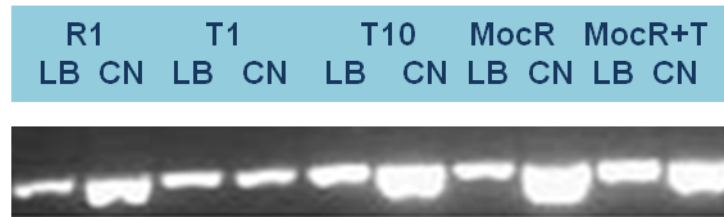
expresión del CIO, como son las cepas T1 y T18, no siendo así para el caso del mutante T25, cuya inserción únicamente bloquea la expresión de los genes situados corriente abajo de *cydZ* (Figura 47B). Puesto que las mutaciones T1 y T18 bloquean la expresión de los dos genes que codifican las subunidades I y II del CIO, *cioA* y *cioB*, además de la posible tercera subunidad del complejo, codificada por *cydZ*, se decidió hacer un análisis más profundo en el que se pudiera valorar el efecto de la ausencia de uno solo de estos tres componentes sobre la expresión de *mocR*. Para ello se utilizaron los mutantes 28.2, CioB y CydZ, que presentan inserciones sin parada de transcripción en los genes *cioA*, *cioB* y *cydZ*, respectivamente, las dos primeras en el sentido de transcripción de *cio1* y la última (CydZ) en el sentido contrario (Figura 47B). El resultado obtenido evidencia que eliminando la expresión de cualquiera de los componentes de CIO que están codificados en el operón *cio1* se bloquea la expresión del gen *mocR*, de donde se deduce que, en medios con KCN, se requiere un CIO funcional para que ésta tenga lugar.

Los genes *BN5\_1898* y *BN5\_1892* también presentaron una fuerte inducción por KCN, aunque el efecto de las distintas mutaciones fue diferente (Figura 48). Así, mientras que para *BN5\_1898* se observa la inducción por KCN en todos los mutantes ensayados, incluyendo MocR y MocR+T, el gen *BN5\_1892* tiene bloqueada la inducción por KCN en el mutante T1 y aumentada la expresión en los mutantes MocR (Figura 48).



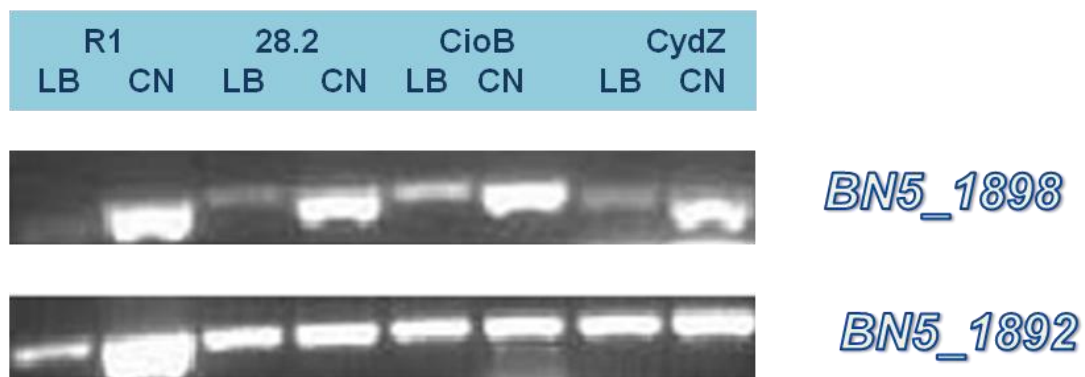
R1	T1	T10	MocR	MocR+T
LB	LB	LB	LB	LB
CN	CN	CN	CN	CN





**Figura 48. Regulación de la expresión en *BN5\_1898* y *BN5\_1892*.** El RNA se preparó a partir de células tratadas como se indica en la Figura 19, incluyendo la normalización frente a la cuantificación del rRNA16S. El mRNA se determinó mediante q-PCR y se normalizaron con los valores de mRNA del gen 16S, utilizado como gen endógeno. Como condición calibradora se utilizó la condición de R1-LB en ausencia de KCN. Las barras de error representan la desviación estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos diferentes.

Al igual que ocurre para la expresión del gen *mocR*, las mutaciones en *cioA*, *cioB* o *cydZ* tienen el mismo efecto de disminución de la expresión del gen *BN5\_1892*, algo que no ocurre en el caso del gen *BN5\_1898* (Figura 49).



**Figura 49. Regulación de la expresión en los genes *BN5\_1898* y *BN5\_1892* para los mutantes de CIO.**

## Resultados

**Capítulo III. Análisis**  
**transcriptómico de la estirpe**  
**silvestre y mutante T1 y MocR**



## 1. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO.

Una técnica que puede resultar útil en la caracterización de los mutantes reguladores, como MocR, y T1, es el análisis transcriptómico, ya que este permite detectar los cambios de expresión globales en el genoma como consecuencia de la mutación.

Para identificar los genes cuya expresión está afectada por la interrupción de los genes *mocR* y *nir-sir* se han comparado los perfiles de transcripción de los mutantes con respecto a los de la cepa silvestre.

Además, se ha utilizado la transcriptómica para estudiar el efecto del cianuro sobre la expresión de las oxidasas terminales presentes en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 R1, tanto en medio mínimo como en medio LB. Por último, también se ha comparado la expresión de estas mismas oxidasas en los diferentes medios en los que se cultiva la estirpe silvestre *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 R1, medio LB y medio mínimo M9 con acetato o alcohol furfúrico como fuente de carbono.

Para comparar los niveles de expresión génica en el mutante T1 y MocR con respecto a la cepa silvestre se han buscado condiciones de crecimiento óptimas en las que se acentúen las diferencias entre las cepas objeto de estudio.

Además de la regulación por cianuro que presentan las diferentes oxidasas, estudiada en capítulos anteriores, hay otros muchos genes cuya expresión se encuentra regulada por la presencia o ausencia de cianuro, tanto en la cepa silvestre como en los mutantes de *P. pseudoalcaligenes*, mutante T1, y mutante MocR.

Para sistematizar y facilitar la comprensión de la regulación en ambos mutantes, se han agrupado los genes en dos categorías, genes cuya expresión se encuentra aumentada o genes cuya expresión está disminuida con respecto a los niveles de expresión de los mismos en la cepa silvestre. Se han descartado aquellos genes cuyo valor estadístico *p\_value* es mayor de 0,05, o

cuyo valor de cambio haya sido 2-3 veces por encima o por debajo con respecto a la estirpe silvestre, excepto en aquellos casos en los que dicho gen forme parte de un operón en el que los demás genes o gran parte de ellos, cumplan los requisitos de selección. En la mayoría de los casos, los genes que no cumplen dichos requisitos son genes de pequeño tamaño, en los que, estadísticamente, el número de lecturas ha sido menor. En cualquier caso, se ha tenido en cuenta que todos los genes del operón sigan la misma tendencia de cambio y que éste sea del mismo orden. Se ha construido otra tabla para cada mutante en la que se han incluido los genes objeto de estudio en este trabajo, aun cuando su expresión no cambie significativamente de acuerdo con los criterios fijados anteriormente. Debido a que a lo largo del desarrollo de este trabajo el genoma ha evolucionado “in silico” como consecuencia de sucesivas secuenciaciones y anotaciones, también lo ha tenido que hacer el análisis transcriptómico. Como en trabajos previos a este se ha utilizado la nomenclatura de la primera anotación (Luque-Almagro *et al.*, 2013), en algunas ocasiones para la descripción del gen se ha usado la nomenclatura antigua o la actual, mientras que en las tablas se ha usado solamente la nomenclatura más reciente haciendo referencia a la última publicación del genoma (Wibberg *et al.*, 2014).

### **1.1 Estudio transcriptómico del mutante T1 frente a la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en presencia de cianuro en medio LB.**

En la Tabla 8 se muestran los genes regulados en el mutante T1 frente a la estirpe silvestre, separados los sobreexpresados y los infraexpresados. Sin embargo, en esta Tesis solamente se discuten aquellos genes cuyos cambios de expresión han sido más significativos en el mutante T1, así como aquellos que han sido objeto de estudio también en apartados anteriores de esta Tesis (Tabla 10), para así contrastar los datos experimentales con los aportados por el estudio transcriptómico.

Como se presuponía atendiendo a los resultados mostrados en los capítulos anteriores, la mayoría de los genes regulados por el mutante T1, están afectados negativamente, al igual que se demuestra en el estudio



experimental de las oxidasas terminales mostradas en este trabajo. A continuación, se muestran los resultados transcriptómicos obtenidos para cada gen o agrupación de genes, con valores de cambio aceptables y valores estadísticos significativos.

### **1.1.1 Genes sobreexpresados en el mutante T1.**

A continuación se comentan los valores de expresión de los genes con valores aceptables de expresión, desde los mayores valores a los menores, teniendo en cuenta a la vez los valores estadísticos.

El gen más sobreexpresado en el mutante T1 frente a la estirpe silvestre, ambas cultivadas en medio LB en presencia de cianuro, es el gen BN5\_1545 (nomenclatura nueva), que no parece estar relacionado con el metabolismo del cianuro, con un valor de 26,27 de veces de cambio, y un valor estadístico muy aceptable (Tabla 8). Se trata de un tRNA-Met (CAT), es decir, un RNA de transferencia.

Otro conjunto de genes sobreexpresados en el mutante T1 se encuentra en el entorno génico de *phuV* y el propio gen *phuV* (BN5\_0959, en la antigua nomenclatura BN5\_03060), agrupados todos ellos previsiblemente en forma de dos operones. Estos genes son: *Psal\_975* (BN5\_0961) (BN5\_03058 en antigua nomenclatura) *phuW* (BN5\_0960), *phuV* (BN5\_0959), *phuU* (BN5\_0958), *phuT* (BN5\_0957), *phuS* (BN5\_0956), *phuR* (BN5\_0955) y *Ppsal\_968* (BN5\_0954, en la nomenclatura antigua BN5\_0954) (Tabla 8). Aunque todos ellos están consecutivos en el genoma, forman dos unidades transcripcionales divergentes, una de seis genes que abarca desde *phuS* (BN5\_0956) hasta *Ppsal\_975* (BN5\_0961) y otra de dos, *phuR* (BN5\_0955) y *Ppsal\_968* (BN5\_0954). En *P. aeruginosa*, el sistema Phu (de *Pseudomonas Heme Uptake*) incluye al gen *phuR*, que codifica un receptor de membrana externa de hemo y hemoglobina, y el operón *phuSTUVW* que codifica transportadores del tipo ABC (Ochsner *et al.*, 1999). En *P. aeruginosa* estos genes se encuentran regulados por la proteína Fur, con una expresión máxima en condiciones de deficiencia de hierro (Ochsner *et al.*, 1999). Los genes del operón *phu* también

se sobreexpresaron de forma significativa en respuesta al cianuro (resultados no mostrados). El gen *phuR* (BN5\_0955), cuya expresión es solo 4 veces más alta en el mutante T1 que en la cepa silvestre, se expresa unas 6 veces más en medio LB suplementado con cianuro que en medio LB, no habiendo sobreexpresión en medio mínimo suplementado con cianuro, ambos casos en la estirpe silvestre (resultados no mostrados). Algo parecido ocurre con *phuT* (BN5\_0957) y el resto de genes del posible operón *phuSTUVW*. El gen *phuR* (BN5\_0955), codifica un posible receptor de hemo dependiente de TonB. También se sobreexpresa el posible receptor dependiente de TonB, *fhuA* (BN5\_0695, antiguo *fhuA\_BN5\_03323*). De igual manera, aunque no tenga una posible función asignada, la mutación de *fur* provoca la sobreexpresión de unas 20 veces del gen BN5\_3002 (antiguo *yjcS\_BN5\_01064*), mientras que en el mutante T1 la sobreexpresión es de unas 4 veces (tabla 8). De este mismo orden es la sobreexpresión de BN5\_0358 (*nfeD\_BN5\_00362*, una posible serín-proteasa unida a membrana) y BN5\_3776 (*prkA\_BN5\_03712*, una posible serín proteasa) (Tabla 8), mientras que la expresión de estos genes aumenta unas 15 y 20 veces, respectivamente, en medio mínimo con cianuro respecto a medio mínimo con amonio (resultados sin publicar).

El siguiente gen sobreexpresado en el mutante T1 en orden decreciente de número de veces después de los genes *phu* es el gen *ppsal\_3146*, BN5\_1431, antiguo BN5\_02597, que presenta un valor de 9,06 de veces de cambio respecto a la cepa silvestre, con un valor estadístico muy aceptable (Tabla 8); este gen parece formar un operón con el gen contiguo *ppsal\_3147*, (BN5\_1430, antiguo BN5\_02598); aunque la función del primer gen no está definida, el segundo gen codifica una posible proteína de membrana. Otro gen regulado positivamente es BN5\_4107, antiguo BN5\_04026 (*yhiH*), que es homólogo a uno de los componentes de un sistema de transporte tipo-ABC. En *P. aeruginosa* PAO1 está descrito que este gen se encuentra asociado a *yhil* y *yhij*, que también se encuentran presentes en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* pero en los estudios realizados parece que no se encuentran formando un operón y aún no se han llevado a cabo estudios experimentales en estos genes.

Siguiendo en orden decreciente en las veces de cambio, el siguiente gen de la Tabla 8 es BN5\_0449, antiguo *trxC\_BN5\_00453*, cuya expresión aumenta unas 5 veces en el mutante. Se trata de una posible tiorredoxina, un grupo de proteínas homólogas que actúan como antioxidantes. También una función antioxidante parece tener el gen BN5\_3669 (*katG\_BN5\_03614*, una posible catalasa) cuya expresión aumenta unas 3 veces en el mutante. La expresión de este gen también aumenta unas 3 veces en medio mínimo con cianuro (resultados no publicados). El cianuro también provoca la expresión del gen *ppsal\_3016* (BN5\_1565) (17 veces), mientras que en el mutante T1 la sobreexpresión es de unas 3 veces (Tabla 8).

Después de una serie de posibles genes de función desconocida o con homologías a genes cuya función difícilmente se puede relacionar con las oxidasas terminales resistentes a cianuro, como los genes BN5\_0371, *betA*, y BN5\_0372, *betB*, que codifican una posible aldehído deshidrogenasa (Tabla 8), cabe destacar la sobreexpresión del gen BN5\_1524, *fumC*, que codifica una fumarasa, y del cual hay trabajos previos en esta bacteria (Tesis Doctoral G. Becerra, 2013). Este gen se sobreexpresa 4 veces en el mutante T1 con respecto a la estirpe silvestre en cianuro. Si se compara la expresión en medio mínimo con cianuro con respecto al mismo medio en ausencia de este compuesto se observa una sobreexpresión de dos veces, mientras que en LB, el cianuro provoca una sobreexpresión de 4 veces. Según los datos de transcriptómica este gen parece formar un operón con una posible NADH deshidrogenasa (*ppsal\_3058*, BN5\_1523).

Además del t-RNA mencionado más arriba, en el mutante T1 se encontraron una serie de pequeños RNA's regulados positivamente por cianuro, que son BN5\_RNA00048 (BN5\_0927), BN5\_00046 (BN5\_1248), BN5\_RNA00041 (BN5\_1546), BN5\_RNA00039 (BN5\_1575), y BN5\_RNA00021 (BN5\_1732). Aunque los niveles de sobreexpresión no fueron muy elevados para ninguno de ellos, se encontraron dentro del rango estadístico aceptable. En el caso de las comparativas en la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 R1 en presencia y ausencia de cianuro en medio LB y medio

mínimo, solamente en el RNA 00041 en la estirpe silvestre suplementada con cianuro en medio mínimo, donde el RNA se encuentra infraexpresado, con un valor de -2,8, presentó un valor significativo aceptable. En el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 R1 hay más pequeños RNA's. Se han llevado a cabo estudios de RT-PCR para intentar clarificar el papel de estos RNA's en medios con cianuro, pero los resultados experimentales obtenidos (no mostrados) no aportaron claridad ante una posible función.

### **1.1.2 Genes infraexpresados en el mutante T1.**

Como era de esperar, el operón *cio1*, junto con toda la región contigua, a la que hemos denominado región Cio, contiene los genes que presentan mayores valores de cambio negativos dentro del rango de valores estadísticamente aceptables. La razón es obvia, ya que se trata de un mutante polar en el primer gen del operón. El fenotipo más destacable del mutante T1 es la sensibilidad a cianuro, ya que éste operón es necesario para resistir, y por tanto metabolizar, este compuesto (Quesada *et al.*, 2007).

Los datos del estudio transcriptómico confirman que el operón *cio1* abarca desde el gen *nir-sir*, BN5\_1900 (*sir3\_BN5\_01633*) hasta el BN5\_1912 (*nit4\_BN5\_01621*), ya que la mutación del primero afecta negativamente a la expresión del resto (Tabla 8), algo que se ha demostrado también en esta Tesis mediante PCR en tiempo real. Como el casete de resistencia está integrado en el gen BN5\_1900 (*nir-sir*) y en dirección contraria a la del operón *cio1*, cabe esperar una expresión constitutiva del gen regulador BN5\_1899 (*mocR\_BN5\_01634*) y del gen anterior (BN5\_1898). Sin embargo, estos presentaron también una regulación negativa. Debido a la inserción de la resistencia a gentamicina en el gen *nir-sir* en dirección polar, todo el operón *cio1* se encuentra afectado por esta mutación, y, por tanto, el efecto que pueda tener el cianuro sobre dicho operón, también cambia. Los genes que presentaron mayor número de veces de cambio fueron *cioA*, *cioB* y *cydZ*; junto con el gen BN5\_1910, antiguo gen BN5\_01623, denominado *cysM*, que se encuentra en la región *cio*, asociada al operón *cio1*.

La expresión de la oxidasa *cbb<sub>3</sub>-1* también se encuentra regulada negativamente en el mutante (Tabla 8). Ya se ha explicado en el capítulo 1 que esta oxidasa está consecutiva a otra, con la que, atendiendo a los resultados experimentales y bibliográficos, no se co-transcribe. Además, para que sea funcional es necesaria la expresión del operón *ccoGHIS*. Tanto la agrupación génica de la oxidasa *cbb<sub>3</sub>-1* como la de la *cbb<sub>3</sub>-2* están constituidas por 4 genes de la forma *ccoPQON*. De este conjunto de oxidasas se hablará más extensamente en el siguiente apartado del capítulo.

Hay otros genes cuyo análisis transcriptómico ha revelado datos importantes acerca de la regulación por cianuro, por ejemplo la cianasa, enzima estudiada previamente en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Luque-Almagro *et al.*, 2008). La cianasa (EC 4.2.1.104) es una enzima que cataliza la descomposición del cianato en CO<sub>2</sub> y amonio. El reactivo nucleofílico que ataca y disocia el cianato es el bicarbonato, con carbamato como intermediario inestable (Anderson, 1980). Por esta razón, la importancia del bicarbonato en el proceso y el papel de la anhidrasa carbónica en el reciclaje del dióxido de carbono en bicarbonato (Johnson y Anderson, 1987). Por ello que probablemente la cianasa (*cynS*), (BN5\_0442) y la anhidrasa carbónica a menudo vayan agrupadas (Guilloton *et al.*, 1992), no siendo el caso en *P. pseudoalcaligenes*, pero sí ocurre en *P. aeuruginosa* y *E. coli* por ejemplo (Sung y Fuchs, 1988). A la actividad cianasa se le han atribuido al menos 3 papeles fundamentales: asimilación de nitrógeno, detoxificación de cianato y regulación metabólica. Debido a la conversión directa de cianato a amonio, la actividad cianasa permite la utilización de cianato como fuente de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2008). El cianato fue propuesto como intermediario en el metabolismo del cianuro (Harris y Knowles, 1983a; Luque-Almagro *et al.*, 2005). En *P. fluorescens*, la cianasa no es esencial para la degradación de cianuro, ya que un mutante carente de actividad cianasa es capaz de degradar cianuro (Kunz *et al.*, 1994). Tampoco en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 la cianasa parece ser imprescindible en la asimilación de cianuro, pero el hecho de que su actividad se induzca en medios con cianuro sugiere que en la

asimilación de cianuro se produce algo de cianato como intermediario (Luque-Almagro *et al.*, 2008).

Todos los genes que codifican esta enzima se encuentran formando un operón que abarca desde *cynF* (BN5\_0438, antiguo gen BN5\_00442) hasta *hemE* (BN5\_0443, antiguo gen BN5\_0447) (Tabla 8), presentando todos una caída de expresión en el mutante con respecto a la estirpe silvestre, ambos cultivados en medios con cianuro, aunque el gen *cynD* es el que presenta mayor valor, siendo este de 15 unidades, frente a 4,7 veces de cambio que presenta el gen *cynA*. Los demás genes presentan un valor próximo a uno, con lo cual no presentan la suficiente fiabilidad para ser considerados en el análisis. Los genes *cynABDS* se transcriben en la misma dirección, excepto el gen *cynF* que lo hace en la dirección contraria. La función de los genes *cynA*, *cynB* y *cynD* es la de transportador de cianato del tipo ABC, aunque pudiera ser que también codifiquen un posible transportador de bicarbonato. El gen *cynF* por otro lado es un regulador transcripcional que no presenta similitud con el gen *cynR*, que codifica un activador transcripcional descrito para otros sistemas *cyn* bacterianos. Análisis filogenéticos revelaron que *cynS* está muy relacionada con varias cianasas del grupo de *Pseudomonas* y *cianobacterias* (Luque-Almagro *et al.*, 2005). Cabe señalar que tanto en medio LB como en medio mínimo en presencia de cianuro para la estirpe silvestre, todos estos genes fueron sobreexpresados, siendo más acusada esta sobreexpresión en medio LB suplementada con cianuro que en medio mínimo. Esta sobreexpresión se observó en todos los genes excepto para los genes *hemE* y *cynF*, que presentaron valores fuera del rango de estudio en esta comparativa. Trabajos previos realizados en *P. pseudoalcaligenes* muestran que el cianuro podría ser un inductor directo de la cianasa (Luque-Almagro *et al.*, 2005), o más exactamente, durante el metabolismo del cianuro se forman pequeñas cantidades de cianato, así se explica la inducción de la cianasa en presencia de cianuro, eso sí, siempre que esté presente el operón *cio1*, porque si no, tal y como ocurre en el caso del mutante T1, en vez de sobreexpresión, se observaría una inhibición de la cianasa. La expresión de esta cianasa aumenta claramente en cultivos de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 que utilizan cianuro

como fuente de nitrógeno (Luque-Almagro *et al.*, 2008), por lo que este resultado podría indicar que el mutante T1 no metaboliza cianuro. De acuerdo con esta hipótesis aparece el hecho de la caída de expresión en el mutante T1 de los genes *nit*, incluido *nitC* (BN5\_1632, antiguo BN5\_02400) (Tabla 8), cuya expresión se induce en medios con cianuro, siendo éste esencial para la utilización de este compuesto como fuente de nitrógeno (Estepa *et al.*, 2012). La regulación de estos genes *nit* en presencia de cianuro fue mostrada al llevar a cabo estudios proteómicos de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, donde el clúster de genes tiene un tamaño de aproximadamente 7,8 kb, que incluye 7 genes que codifican proteínas con distintas funciones. En la Tabla 8 no está especificado el gen *nitA*, ya que trabajos previos en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 demostraron que este gen no forma parte del operón *Nit1C*, dicho gen tiene una función reguladora y codifica un activador transcripcional del tipo FIS (Factor para la estimulación de inversión). Fis es una proteína multifuncional implicada en diferentes procesos de recombinación específicos (Finkel y Johnson, 1993). En 2012, los análisis de RT-PCR sugirieron que *nitBCDEFGH* estaban probablemente cotranscritos. Se demostró que el cianuro induce la expresión de estos genes y el amonio actúa como represor, algo contrario a lo que se ha observado hasta ahora, lo que vuelve a poner de manifiesto que es esencial la presencia del operón *cio1* para que se metabolice el cianuro y aumente la expresión en el clúster *Nit1C* (Estepa *et al.*, 2012). En el mutante T1 sólo están dentro de los valores aceptables los genes *nitD*, *nitE* y *nitH*, los demás presentan valores estadísticos de p-value elevados, aunque el número de veces de cambio en todos ellos es muy similar.

Otros genes que merece la pena mencionar son los genes que codifican las proteínas ribosomales, aunque no son valores muy elevados de expresión, siempre son valores negativos, y con p-values aceptables en la mayoría de los casos.

No hay muchos más operones regulados negativamente en cianuro en el mutante T1, cabe destacar algunos genes con posibles funciones de interés en el metabolismo del cianuro. El gen *glnA* que está co-transcrito con otro gen

contiguo según los datos transcriptómicos, en otras especies dicho gen codifica una glutamina sintetasa, aunque en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 no está muy clara la función de la proteína codificada. El gen *puuB* codifica una oxidorreductasa dependiente de FAD.

## **1.2 Estudio transcriptómico del mutante MocR frente a la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en presencia de cianuro en medio LB.**

Como ya se ha venido observando a lo largo de todo este trabajo, el efecto de la mutación sobre el gen *mocR*, es sobre todo de gran interés en el operón *cio1*. Al llevar a cabo los experimentos transcriptómicos, y teniendo en cuenta los baremos de elección de los genes en cuanto al factor estadístico p-value referido anteriormente, caben mencionarse los genes de la región *cio1*. Los valores de expresión obtenidos en los experimentos están reflejados en la Tabla 9. En todos estos genes el número de veces de cambio fue positivo, y el p-value fue muy aceptable para todos ellos, los valores de cambio oscilan entre 12,97 para *nir-sir* y 27,74 para *argD*, cayendo los niveles de expresión en los genes más lejanos a CIO, y siendo estos niveles más elevados en los genes constituyentes de CIO.

### **1.2.1 Genes sobreexpresados en el mutante MocR.**

Aparte de la región *cio* de la cual ya se ha hablado previamente, hay otra serie de operones que se encuentran regulados positivamente en este mutante cultivado en LB con respecto a la estirpe silvestre cultivada en el mismo medio.

Hay un clúster de genes, denominados *hmf*, cuya expresión varía significativamente en el mutante MocR. Estos genes son homólogos a los *hmf* de *Cupriavidus basilensis* HMF14, implicados en la transformación de furfural en ácido furoico (Koopman *et al.*, 2010). En una segunda parte de la ruta el ácido furoico se transforma en intermediarios del ciclo de krebs (Koopman *et al.*, 2010). El operón está formado por los genes *hmfABCDE* y el gen *benE* (BN5\_2303, antiguo BN5\_02205) (Luque-Almagro *et al.*, 2013). Los genes *hmfABC* codifican las tres subunidades de furoil-CoA deshidrogenasa, el gen



*hmfD* (BN5\_2301) codifica la furoil-CoA sintetasa, y *hmfE* (BN5\_2302) codifica la hidrolasa requerida para la formación del 2-oxoglutarato (Koopman *et al.*, 2010). La acción consecutiva de las proteínas HmfD, HmfABC y HmfE provoca la conversión catalítica de ácido furoico en el intermediario del ciclo de Krebs 2-oxoglutarato. Curiosamente, corriente abajo del gen *hmfE* hay un posible transportador de benzoato que no ha sido encontrado en otras cepas que degradan cianuro (Luque-Almagro *et al.*, 2013; Tesis Doctoral D. Macías, 2014). Atendiendo a los estudios transcriptómicos, los resultados muestran que el operón abarca los genes *hmfABCDE* y *benE*. Todos los genes cumplen el p-value excepto el gen *hmfC*. Las veces de cambio de estos genes oscilan entre 1,78 para *hmfC* y 3,4 para *hmfB*. Al estudiar el comportamiento de este operón en la estirpe silvestre en cianuro en medio LB, se observa una regulación positiva, con valores muy bajos, próximos a 2, y con unos valores estadísticos fuera de rango. En medio mínimo suplementado con cianuro, los valores tanto para las veces de cambio, como para los valores estadísticos son valores en torno a 1, y los valores de p-value del orden de las veces de cambio. Si comparamos el estudio de ambos medios, para la estirpe silvestre en medio LB con respecto al medio mínimo, no hay variación en la regulación. Es de destacar el hecho ocurrido en la comparación del medio mínimo con alcohol furfúrico como fuente de carbono, donde en este último medio la sobreexpresión de esta agrupación de genes es muy alta, ya que se observan unos valores de cambio en torno a las 200 unidades con unos p-value muy aceptables. Se ha demostrado experimentalmente que todos estos genes se sobreexpresan cuando usan alcohol furfúrico como fuente de carbono (Tesis Doctoral D. Macías, 2014).

Hay un conjunto de genes que presenta valores bajos de expresión, siendo estos en torno a dos veces de cambio, formado por los genes *dadA*, *tdcF*, *dadX*, *ppsal\_211* y *ppsal\_212*. En la estirpe silvestre suplementada con cianuro, tanto para LB como medio mínimo, no se han encontrado datos relevantes acerca de la regulación de este conjunto de genes, excepto para el gen *dadA* que presenta una sobreexpresión de aproximadamente 3 veces de cambio en medio mínimo suplementado con cianuro para la estirpe silvestre.

Respecto a la comparativa de medios, no se han encontrado diferencias destacables en ningún medio excepto en el gen *dadx* en la comparativa de medio LB y medio mínimo donde hay una sobreexpresión de 8 veces del primero con respecto del segundo. No se han encontrado referencias bibliográficas acerca de la posible regulación de estos genes en el mutante o en presencia de cianuro.

Al igual que se ha señalado anteriormente en el estudio de la regulación del mutante T1, en el mutante MocR también existe una regulación positiva de pequeños RNA's, que son el BN5\_RNA00055, BN5\_RNA00054, BN5\_RNA00014 y BN5\_RNA00015, aunque es una regulación mínima, los valores estadísticos mostrados son muy aceptables, y como se ha citado anteriormente, aunque se han llevado a cabo estudios experimentales con este tipo de genes, no se ha podido clarificar su posible papel en el metabolismo del cianuro en estos mutantes.

Los genes *gntT* y *glxK* muestran una ligera sobreexpresión en el mutante, con un valor de cambio de 2,55 y 2,21 respectivamente. Estudios en *E. coli* han demostrado que el gen *gntT* es un transportador con alta afinidad hacia el gluconato (Porco *et al.*, 1997), y juega un papel fundamental en el metabolismo del gluconato.

No hay muchos más operones regulados en el mutante MocR, aunque hay una serie de genes en solitario que sí se encuentran regulados positivamente al igual que los operones anteriores.

### **1.2.2 Genes infraexpresados en el mutante MocR.**

Al hacer la comparación del mutante MocR en LB con respecto a la estirpe silvestre en este mismo medio, se regulan negativamente las oxidasas *cbb<sub>3</sub>*, aunque los valores no son muy elevados al igual que ocurría anteriormente en los operones regulados positivamente. Al igual que en la mayoría de los casos de los operones regulados, los niveles de veces de cambio en ningún caso fueron valores muy elevados, siempre fueron en torno a

1, lo que pone en duda el posible papel de este mutante en LB con respecto a la estirpe silvestre y la veracidad de los datos.

### **1.3. Estudio transcriptómico de las oxidasas presentes en el genoma de *P. pseudoalcaligenes*.**

Uno de los objetivos principales de este trabajo ha sido estudiar la regulación de la expresión de las oxidasas presentes en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 R1 bajo diferentes condiciones ambientales, y en especial, en presencia o ausencia de cianuro. Aprovechando los estudios transcriptómicos realizados en la estirpe silvestre, en los mutantes T1 y MocR, y en mutantes construidos en otros genes con diversos intereses biotecnológicos, relacionados con el metabolismo del hierro y el metabolismo de furfurales, en *P. pseudoalcaligenes* (Tesis Doctoral G. Becerra, 2013; Tesis Doctoral D. Macías, 2014), se han podido conocer aspectos relevantes desconocidos hasta el momento sobre *P. pseudoalcaligenes*, además de permitir la comprobación de datos obtenidos experimentalmente sobre los diferentes genes estudiados con anterioridad.

Al llevar a cabo el estudio de los datos transcriptómicos obtenidos de todas las oxidasas, se comprobó que sólo los genes del operón *cio1*, y de la oxidasa *ccb<sub>3</sub>-1* estuvieron dentro de los valores estadísticos aceptables para el mutante T1 y MocR, y presentaron valores significativos en el análisis transcriptómico. Todos estos valores junto con los de expresión de las demás oxidasas están incluidos en la Tabla 10 al final de este capítulo, aunque no presenten valores estadísticos aceptables. Los estudios transcriptómicos para las diferentes oxidasas se llevaron a cabo tanto en el mutante T1 suplementado con cianuro, como en el mutante MocR crecido en medio LB, ambos comparados con la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, en el mismo medio en el que se cultivaron dichos mutantes. Las muestras de *mRNA* con las que se hizo el estudio transcriptómico, fueron utilizadas posteriormente en el laboratorio para corroborar los datos obtenidos mediante PCR cuantitativa y cualitativa, y poder así contrastar 3 tipos de datos obtenidos, los experimentales a partir de cDNA, los transcriptómicos obtenidos

experimentalmente a partir del *mRNA* y los datos de RNA-seq. Debido a que el estudio transcriptómico de la estirpe silvestre en presencia de cianuro se ha llevado a cabo tanto en LB como en medio mínimo, así como en alcohol furfurílico, esto permite estudiar posibles efectos del medio sobre el crecimiento de la estirpe silvestre, y su posible influencia en los diferentes metabolismos que se puedan llevar a cabo en las células. A continuación se describe la expresión diferencial de cada una de las oxidasas terminales en cada una de las condiciones de cultivo y fondo genético.

### **1.3.1. Regulación del operón *cio1*.**

Se sabe que la expresión del operón *cio1* se induce por cianuro (Quesada *et al.*, 2007) y, por lo tanto, la mutación polar en el primer gen provoca valores de cambio negativos en expresión de estos genes. Los valores transcriptómicos obtenidos fueron para las 3 subunidades de CIO, *cioA*, *cioB* y *cydZ*, de -19,74; -19.74 y -20,89 respectivamente, siendo el más afectado por el efecto del cianuro el gen *cydZ*. Para el resto de la región *cio*, todos los valores de expresión fueron negativos, hasta el gen *nit-4* que codifica la 3-cianoalanininitrilasa, pero el gen contiguo a este último, (BN5\_1913 antiguo BN5\_01620), corriente abajo, no presentó valor significativo, lo cual puso de manifiesto que toda la región *cio* forma parte de un mismo operón, cuyo gen final es el *nit-4* (BN5\_1912). Para el caso del gen *mocR*, que codifica un regulador transcripcional, presentó un valor también negativo, aunque no fue significativo.

Los otros dos genes del entorno génico de *cio1* estudiados, también aportaron valores negativos de expresión, tanto el gen que codifica la EDA, gen BN5\_1898, antiguo BN5\_01635, como el otro regulador transcripcional estudiado que se corresponde con el gen BN5\_1892, antiguo BN5\_01640, y todos los intermedios entre estos dos también tuvieron valores negativos de expresión en presencia de cianuro, incluido el gen *cyoA* (BN5\_1893 antiguo BN5\_01639), que forma parte de un operón en otras estirpes, pero en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 R1 solamente está presente este gen con su secuencia truncada, faltando el resto del operón.

Para el caso del mutante MocR en LB, todos los valores obtenidos para la región *cio* fueron positivos. Para *cioA*, *cioB* y *cydZ* los valores fueron de 19,51; 26,31 y 15,91 respectivamente, y para el resto de genes de la región *cio* que abarca desde *serC* hasta *nit-4*, los valores transcriptómicos oscilaron entre 15,91 para *cysM* y 27,74 para *argD*.

Para el caso de la estirpe silvestre suplementada con cianuro en medio mínimo y en medio LB, los valores fueron mucho más elevados para la estirpe silvestre cultivada en medio LB suplementado con cianuro que en medio mínimo, pero en ambos casos fueron valores positivos siendo los valores en medio mínimo para *cioA*, *cioB* y *cydZ* de 3,11; 3,57 y 3,59 respectivamente, y 28,08; 29,56 y 33,40 respectivamente para la estirpe silvestre en medio LB suplementada con cianuro.

Los valores para el resto de genes de la región *cio* tanto en LB como en medio mínimo son más bajos, pero la caída no es tan acusada en medio mínimo como en medio LB, además la caída en ambos medios fue progresiva desde los genes *cio* hasta el gen *nit4*.

La expresión del gen regulador *mocR* de la familia GntR es destacable debido a la gran diferencia de expresión en cuanto a los valores obtenidos en medio mínimo con respecto a LB, siendo estos valores de 5,17 en medio mínimo y 17,24 en medio LB, lo cual pone de manifiesto que en medio mínimo la presencia del cianuro tiene un menor efecto en la regulación, aunque al llevar a cabo estudios experimentales en el mutante MocR+T en medio mínimo, se observó en ambos medios una regulación muy similar.

Al comparar un posible efecto del medio LB y medio mínimo en acetato, los niveles de expresión del primero con respecto del segundo fueron de 1 aproximadamente, aunque los valores no estuvieron dentro del rango estadístico, lo cual indica que el medio no tiene ningún efecto en la región *cio* del operón *cio1*.

Al compararse el medio alcohol furfurílico con respecto al medio mínimo, los valores de expresión también fueron de 1 vez de cambio, lo que indica que el medio en esta región tampoco tuvo ningún efecto, igualmente los valores estadísticos estuvieron fuera de rango.

### **1.3.2. Regulación del operón *cio2*.**

En el mutante T1 suplementado con cianuro con respecto a la estirpe silvestre en cianuro, los valores obtenidos en el estudio transcriptómico no fueron muy significativos, ya que el valor estadístico p-value fue superior a 0,05. Los valores para los genes *cioA*, *cioB* y *cydZ* del operón *cio2*, oscilaron entre 1 y 3, con respecto a la estirpe silvestre en cianuro, para los genes *cioA* y *cioB* respectivamente, por tanto tampoco presentan valores aceptables para tenerlos en cuenta.

El gen que codifica la rodanasa (BN5\_2520, antiguo *BN5\_01986*), tampoco presentó un valor significativo, ya que las lecturas para este gen no fueron favorables, y el gen que codifica el transportador de sulfato (*BN5\_01987*), contiguo al que codifica la rodanasa, tampoco presentó un valor transcriptómico significativo; aunque de este último gen no se han obtenido valores experimentales en el laboratorio, estos estudios transcriptómicos han permitido estudiar su comportamiento, en los distintos medios y en cianuro.

Para *cio2*, en el mutante Mocr, los valores fueron positivos para *cioA*, *cioB* y *cydZ*, pero en ningún caso fueron superiores a 2, y los de p-value en todos los casos fueron también cercanos a 1, lo que hizo que dichos valores no fueran significativos.

En la comparativa hecha para la estirpe silvestre en medio rico y medio mínimo, suplementadas con cianuro, con respecto a la misma en ausencia de cianuro, los resultados obtenidos fueron para ambos medios, negativos, pero en valor absoluto fueron más altos para el medio LB, que para el medio mínimo, con estos datos, no se hizo otra cosa que comprobar los datos experimentales obtenidos previamente, en el que la mutación en *sir* en

presencia de cianuro siempre tuvo un efecto negativo sobre la expresión en los distintos genes, de los distintos operones estudiados en este trabajo. En el operón *cio2*, el efecto del cianuro, fue represor.

En la comparativa de los diferentes medios para el operón *cio2*, se apreciaron grandes diferencias entre el medio LB y medio mínimo, observándose una diferencia que se incrementa en la expresión de *cioA*, *cioB* y *cydZ*, con unos valores de expresión de 4,96; 11,21 y 12,85 respectivamente, y unos p-value muy favorables en los tres casos, para el gen que codifica la rodanasa y que se encuentra contiguo al operón *cio2*, no hay diferencias entre el medio LB y medio mínimo. Al comparar el medio de alcohol furfurílico con medio mínimo de acetato se observó que en el gen *cioA* apenas hay diferencias, pero *cioB* y *cydZ* si presentan diferencias apreciables y con valores estadísticos favorables, mostrando unos valores de expresión de 3,58 y 5,18 respectivamente.

### **1.3.3. Regulación del operón *cio3*.**

Para este operón en el caso de los dos mutantes estudiados, el comportamiento de ambos fue contrario, para T1 en cianuro, la regulación fue negativa y para el mutante MocR en LB la regulación fue positiva, pero para todos los genes en el caso de ambos mutantes, los valores estadísticos no fueron favorables.

Para el caso la estirpe silvestre en ambos medios en cianuro, con respecto a la estirpe silvestre en el mismo medio sin suplementar, el comportamiento del operón *cio3*, no presentó ninguna similitud con lo observado en el operón *cio2*, pero si con el operón *cio1*. En este operón el cianuro mostró un efecto inductor sobre la expresión, al igual que en *cio1*. En este caso los valores fueron muy similares en ambos medios suplementados con cianuro. Todos los valores oscilaron en torno a 3 unidades, aunque los valores estadísticos estuvieron en torno a 3.

En la comparación de los dos medios LB y medio mínimo en la estirpe silvestre para llevar a cabo la comparación de medios, los valores estadísticos

no fueron aceptables, y en medio LB hubo una caída en los valores de expresión de 2 unidades con respecto al medio mínimo. En el caso de alcohol furfurílico con respecto al medio mínimo ambos medios, los valores de expresión fueron en torno a 1, lo que pone de manifiesto que el medio no tiene ningún efecto en la expresión.

### 1.3.4 Regulación de la oxidasa *cbb<sub>3</sub>-2*

En las tres oxidasas restantes, las dos *cbb<sub>3</sub>* y la *aa<sub>3</sub>*, su regulación fue muy similar en ambos mutantes, algo opuesto a lo que sucedió en los tres operones *cio*. En el caso del mutante T1, en los cuatro genes de esta oxidasa los valores de expresión fueron en torno a 1, y ninguno de los datos fue aceptable estadísticamente, para el caso del mutante MocR ocurrió lo mismo, los valores fueron en torno a 1 negativos, pero fueron valores favorables estadísticamente, excepto para el gen *ccoN3* (BN5\_2441).

Mientras que en los operones *cio1* y *cio3*, el cianuro tuvo un efecto inductor, en las oxidasas *cbb<sub>3</sub>* fue represor, la expresión de estas oxidasas cayó totalmente en presencia de cianuro en los datos experimentales. Los datos transcriptómicos mostraron que para ambos medios en presencia de cianuro, la expresión fue negativa, siendo la caída de expresión muy similar en ambos medios, ambos suplementados con cianuro. En medio LB en presencia de cianuro, hubo valores de expresión negativos en torno a 3 y con valores de p-value no aceptables.

Al llevar a cabo la comparativa de los diferentes medios de cultivo, se observó que en medio LB, los niveles de expresión fueron más altos que en medio mínimo, lo cual pone de manifiesto que la riqueza del medio puede influir en la expresión de estos genes. Los valores estadísticos fueron muy aceptables para todos los genes, sin embargo, al comparar los medios mínimos, alcohol furfurílico y medio M9, los niveles de expresión fueron en torno a 1 para todos los genes, lo que mostró que no hubo diferencia entre los dos medios mínimos.



### 1.3.5. Regulación de la oxidasa *cbb<sub>3</sub>-1*

Esta oxidasa mostró una regulación muy similar a la de la oxidasa anterior, de hecho están contiguas en el genoma de la bacteria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 R1.

En el mutante T1, la regulación fue negativa y de valores más elevados en valor absoluto que en la oxidasa *cbb<sub>3</sub>-2*, con valores de p-value en torno a 0,01. En el mutante MocR, la regulación fue positiva con valores próximos a 1, aunque los valores de p-value fueron poco aceptables, ya que en la mayoría de los casos fueron cercanos al valor transcriptómico.

Con respecto a la estirpe silvestre suplementada con cianuro en los dos medios estudiados, la caída fue menos acusada que en *cbb<sub>3</sub>-2*, el comportamiento en medio mínimo y en medio LB fue prácticamente igual, con valores muy próximos a 1, en ambos casos valores negativos de expresión. Para ambos casos, los errores estadísticos fueron demasiado elevados con respecto a lo admisible, aunque estos datos sirvieron para establecer la veracidad de los datos obtenidos en el laboratorio, y estos valores fueron así en los datos experimentales, se apreció en medio LB con cianuro, una expresión constitutiva, mientras que en medio mínimo se observó la caída de expresión citada anteriormente.

Al comparar los medios, no hubo grandes diferencias apreciables entre medio LB y medio mínimo, fueron valores negativos en LB con respecto al medio mínimo, pero ningún valor lo suficientemente aceptable. Sin embargo, si hubo diferencias entre los dos medios mínimos, en alcohol furfurílico fue 3 veces aproximadamente menor la expresión que en acetato, con valores de p-value mínimos.

### 1.3.6 Regulación de la oxidasa *aa<sub>3</sub>*

En este caso, cabe mencionarse que a diferencia de lo observado en otras oxidasas, la regulación en ambos mutantes fue positiva, que en el

mutante MocR no fue nada novedoso, pero sí para el mutante T1 que hasta entonces había mostrado valores negativos en cianuro.

Los valores para el mutante T1 fueron para los 4 genes que forman parte de esta oxidasa en torno a 2, y ahora los valores estadísticos, aunque no fueron inferiores a 0,1, estuvieron cercanos a 0,2, lo cual indicó que los valores fueron más significativos que en casos anteriores. Para el mutante MocR con respecto a la estirpe silvestre en LB, los valores fueron en torno a uno para todos los genes, pero con valores estadísticos no aceptables.

En el caso de la estirpe silvestre en medio LB y medio mínimo en presencia de cianuro, este provocó una inducción en la expresión con respecto a los mismos medios en ausencia de este compuesto. Los valores fueron más elevados en el caso de medio LB suplementado con cianuro, siendo los valores de 7,56; 8,69; 8,54 y 5,39 para *coxB*, *coxA*, *cox11* y *cox3* respectivamente, siendo el único valor significativo el gen *cox11*. En medio mínimo, los valores fueron más bajos, estando los 4 valores para los genes en torno a 3 unidades, pero en ningún caso, fueron valores significativos.

En el medio LB y medio mínimo no hubo diferencias de expresión, estuvieron todos los valores en torno a 1, donde hubo diferencias muy acusadas fue en los medios mínimos, siendo valores muy elevados para alcohol furfurílico y todos los p-value fueron bajos. El gen *cox11* presentó un valor de expresión de 40,18 con un p-value de  $4,27 \cdot 10^{-5}$ , los valores de expresión de los otros tres genes estuvieron en torno a 15.

**Tabla 8. Genes sobreexpresados e infraexpresados en los mutantes T1 y MocR**

ORF (a)	ORF (a,*)	Nombre	Veces de cambio	p-value	Descripción
<b>Genes sobreexpresados en T1</b>					
BN5_1545		<i>ppsal_2686</i>	26,27	$9,3 \cdot 10^{-7}$	Gluconato liasa
	BN5_0961	<i>ppsal_975</i>	2,00	0,442	-
BN5_0960		<i>phuW</i>	4,52	0,021	Proteína sin caracterizar
BN5_0959		<i>phuV</i>	6,73	0,005	Sistema de transporte ABC-ATPasa
BN5_0958		<i>phuU</i>	12,26	0,000	Sistema de transporte ABC
BN5_0957		<i>phuT</i>	6,46	0,003	Sistema de transporte hemo ABC
BN5_0956		<i>phuS</i>	7,04	0,001	Hemo proteína de degradación
BN5_0955		<i>phuR</i>	4,00	0,023	Receptor de membrana
-		<i>ppsal_968</i>	2,75	0,370	-
BN5_1431		<i>ppsal_3146</i>	9,06	0,000	Proteína conservada sin caracterizar
BN5_1430		<i>ppsal_3147</i>	6,82	0,002	Proteína de membrana
BN5_4107		<i>yhiH</i>	5,29	0,004	ATPasa, sistema de transporte tipo-ABC
BN5_0449		<i>trxC</i>	5,38	0,005	Proteína que contiene tioredoxina
	BN5_0448	<i>ppsal_481</i>	-1,33	0,665	Proteína sin caracterizar
BN5_0927		<i>BN5_RNA00048</i>	5,24	0,006	-
BN5_1248		<i>BN5_RNA00046</i>	5,05	0,008	-
BN5_1546		<i>BN5_RNA00041</i>	6,48	0,024	-
BN5_1575		<i>BN5_RNA00039</i>	3,42	0,039	-
BN5_1732		<i>BN5_RNA00021</i>	4,50	0,023	-
BN5_3358		<i>ppsal_1329</i>	5,48	0,007	Proteína hipotética
BN5_0713		<i>ppsal_738</i>	4,80	0,007	Regulador de respuesta
BN5_2236		<i>ppsal_2457</i>	5,20	0,009	Proteína hipotética
BN5_1185		<i>ppsal_3387</i>	5,14	0,012	Proteína hipotética
BN5_0863		<i>ppsal_878</i>	9,74	0,013	Proteína hipotética

**Tabla 8. Continuación**

BN5_1183	<i>Ppsal_3389</i>	4,53	0,013	Proteasa/amidasa
BN5_1181	<i>Ppsal_3391</i>	4,99	0,016	-
BN5_0372	<i>betB</i>	4,03	0,017	Deshidrogenasa aldehídica dependiente de NAD
BN5_0371	<i>betA</i>	3,26	0,052	Oxidorreductasa de glucosa-metanol
BN5_1523	<i>ppsal_3058</i>	3,18	0,047	Quinona
BN5_1524	<i>fumc</i>	3,88	0,021	Fumarasa
BN5_0694	<i>fhuA</i>	3,82	0,022	Receptor de membrana externa
BN5_2495	<i>recQ</i>	3,86	0,023	DNA helicasa superfamilia II
BN5_4308	-	10,45	0,024	Proteína hipotética
BN5_3950	<i>ppsal_3786</i>	3,68	0,025	-
BN5_0358	<i>nfeD</i>	3,64	0,027	
BN5_2777	-	3,60	0,027	Proteína hipotética conservada
BN5_2776	<i>ynfM</i>	3,57	0,030	Proteína transportadora
BN5_1377	<i>ppsal_3198</i>	3,45	0,03	-
BN5_3002	<i>yjcS</i>	3,98	0,035	Alquil sulfatasa
BN5_3518	<i>Ppsal_1181</i>	3,39	0,039	Proteína hipotética
BN5_3776	<i>prkA</i>	3,25	0,04	Posible proteína quinasa
BN5_4357	<i>ppsal_4182</i>	4,48	0,042	Regulador transcripcional
BN5_0235	<i>yhhJ</i>	3,20	0,046	Permeasa
BN5_3669	<i>katG</i>	3,10	0,048	Catalasa
BN5_1565	<i>Ppsal_3016</i>	3,14	0,048	-
BN5_3393	<i>Ppsal_1301</i>	3,10	0,049	Proteína hipotética
<b>Genes infraexpresados en T1</b>				
BN5_1898	<i>Ppsal_1875</i>	-1,92	0,250	2-ceto-3-deoxi-6- fosfogluconato aldolasa
BN5_1899	<i>mocR</i>	-2,32	0,148	Regulador transcripcional
BN5_1900	<i>sir3</i>	-1,87	0,268	Sulfito reductasa, subunidad beta
BN5_1902	<i>cioA</i>	-19,74	2,3·10 <sup>-6</sup>	Quinol oxidasa, tipo citocromo <i>bd</i> , subunidad I

Tabla 8. Continuación

BN5_1903	<i>cioB</i>	-19,74	$2,4 \cdot 10^{-6}$	Proteína sin caracterizar conservada en bacterias
BN5_1901	<i>cydZ</i>	-20,89	$1,6 \cdot 10^{-6}$	-
BN5_1904	<i>serC</i>	-15,08	$1,3 \cdot 10^{-5}$	Aminotransferasa histidinol-fosfato
BN5_1905	<i>hisC</i>	-15,21	$1,4 \cdot 10^{-5}$	Aminotransferasa ornitina/acetilornitina
BN5_1906	<i>argD</i>	-16,96	$6,8 \cdot 10^{-6}$	dihidropicolinato
BN5_1907	<i>dapA</i>	-14,48	$1,7 \cdot 10^{-5}$	Permeasa, miembro de MFS
BN5_1908	<i>ppsal_1885</i>	-4,55	0,01	5,10-metilentetrahidrofolato reductasa
BN5_1909	<i>metF</i>	-5,96	0,004	Cisteína sintasa
BN5_1910	<i>cysM</i>	-17,74	$1,2 \cdot 10^{-5}$	Enzima málica
BN5_1911	<i>maeB</i>	-8,96	0,000	Amidohidrolasa
BN5_1912	<i>nit4</i>	-5,38	0,005	
BN5_0343	<i>ppsal_380</i>	-30,22	0,0001	Proteína resistente al telurito
BN5_3378	-	-8,92	0,001	-
BN5_3063	<i>fpr</i>	-6,70	0,002	Reductasas flavodoxina
BN5_1913	<i>ppsal_2761</i>	-11,62	0,002	Proteína hipotética
BN5_1354	<i>cysl</i>	-6,64	0,003	Sulfito reductasa, subunidad beta
BN5_3262	<i>ppsal_1425</i>	-8,29	0,004	Proteína hipotética
BN5_1224	<i>ppsal_3348</i>	-7,11	0,005	Permeasa/Transportador de metabolito
BN5_1356	<i>lrgA</i>	-8,08	0,006	Proteína de membrana
BN5_0531	-	-7,06	0,009	-
BN5_1893	<i>cyoA</i>	-4,78	0,009	Quinol oxidasa/citocromo tipo cobre
BN5_0438	<i>cynF</i>	1,38	0,67	Regulador transcripcional
BN5_0439	<i>cynA</i>	-4,66	0,012	Bicarbonato/sulfonato/nitrato tipo ABC
BN5_0440	<i>cynB</i>	-1,63	0,395	Bicarbonato/sulfonato/nitrato tipo ABC
BN5_0441	<i>cynD</i>	-15,67	0,0003	Bicarbonato/sulfonato/nitrato tipo ABC

**Tabla 8. Continuación**

	BN5_0442	<i>cynS</i>	-2,09	0,27	Cianato liasa
	BN5_0443	<i>hemE</i>	-1,31	0,67	Decarboxilasa
BN5_1352		<i>ppsal_3222</i>	-4,95	0,014	Regulador transcripcional
BN5_3818		<i>ppsal_3722</i>	-7,86	0,017	Flavoproteína
BN5_1631		<i>nitB</i>	-2,94	0,07	Peroxiredoxinas
	BN5_1632	<i>nitC</i>	-2,62	0,12	Amidohidrolasa
BN5_1633		<i>nitD</i>	-5,82	0,017	Enzima relacionada con la síntesis de biotina
BN5_1634		<i>nitE</i>	-6,22	0,01	Histona acetiltransferasa
	BN5_1635	<i>nitF</i>	-2,07	0,30	Selenofosfato sintetasa
	BN5_1636	<i>nitG</i>	-1,82	0,40	-
BN5_1637		<i>nitH</i>	-4,17	0,02	Flavoproteína
BN5_1638		<i>aceK</i>	-3,99	0,03	-
BN5_1355		<i>ppsal_3219</i>	-5,25	0,017	Proteína conservada sin caracterizar
BN5_3008		<i>ppsal_1172</i>	-4,73	0,020	Transferasa
BN5_2853		<i>Ppsal_1868</i>	-4,03	0,020	Proteína hipotética
BN5_0673		<i>ppsal_597</i>	-4,50	0,023	-
BN5_4059		<i>ppsal_3893</i>	-11,94	0,024	-
BN5_2808		<i>ppsal_1913</i>	-3,95	0,029	Esterasa
	BN5_2448	<i>ccoP</i>	-2,87	0,07	Citocromo c, variantes mono- y dihemo-
BN5_2447		<i>ccoQ</i>	-3,53	0,040	-
BN5_2446		<i>ccoO</i>	-3,77	0,027	Citocromo oxidasa tipo <i>ccb<sub>3</sub></i> , citocromo c
	BN5_2445	<i>ccoN</i>	-1,78	0,31	Citocromo <i>ccb<sub>3</sub></i> , subunidad I
BN5_2291		<i>ppsal_2407</i>	-5,29	0,028	Deshidrogenasa
BN5_1031		<i>ppsal_1028</i>	-3,65	0,031	Metilasa específica para adenina
BN5_1029			-3,53	0,032	Proteína hipotética
BN5_1030		<i>ppsal_3527</i>	-3,70	0,03	Peroxiredoxina
BN5_1503			-3,61	0,034	Quinol oxidasa, tipo citocromo <i>bd</i> , subunidad II
BN5_2308		<i>ppsal_2390</i>	-3,61	0,036	Aminotransferasa
BN5_2311		<i>puuB</i>	-3,45	0,037	Oxidasas de glicina/D-amino ácidos
BN5_4325		<i>metI</i>	-4,95	0,037	Permeasa
BN5_1736		-	-3,65	0,038	Proteína hipotética

Tabla 8. Continuación

BN5_1352		<i>Ppsal_3222</i>	-25,6	0,004	Regulador transcripcional
BN5_3266		<i>iscA</i>	-3,27	0,046	Proteína conservada
BN5_3267		<i>iscU</i>	-3,37	0,04	-
BN5_2528		<i>BN5_RNA026</i>	-11,66	0,044	
BN5_3647		<i>nrdR</i>	-7,93	0,04	Regulador transcripcional
BN5_1407		<i>ppsal_3171</i>	-13,68	0,048	
	BN5_3670	<i>rplQ</i>	-2,25	0,262	Proteína ribosomal L17
	BN5_3671	<i>rpoA</i>	-2,50	0,146	RNA polimerasa, subunidad alfa
BN5_3672		<i>rpsD</i>	-4,42	0,011	Proteína ribosomal S4
BN5_3673		<i>rpsK</i>	-3,29	0,118	Proteína ribosomal S11
BN5_3674		<i>rpsM</i>	-3,38	0,039	Proteína ribosomal S13
	BN5_3675	<i>rpmJ</i>	-1,69	0,404	-
	BN5_3676	<i>secY</i>	1,11	0,868	-
	BN5_3677	<i>rplO</i>	-2,45	0,172	Proteína ribosomal L15
BN5_3678		<i>rpmD</i>	-3,75	0,024	Proteína ribosomal L30/L7E
BN5_3681		<i>rplF</i>	-3,23	0,044	Proteína ribosomal L6P/L9E
BN5_3682		<i>rpsH</i>	-3,50	0,03	Proteína ribosomal S8
BN5_3687		<i>rpsQ</i>	-3,22	0,04	Proteína ribosomal S8
BN5_3689		<i>rplP</i>	-8,61	0,002	Proteína ribosomal S17
BN5_3690		<i>rpsC</i>	-3,80	0,021	Proteína ribosomal L16/L10E
BN5_3691		<i>rplV</i>	-3,363	0,069	Proteína ribosomal S3
BN5_3692		<i>rpsS</i>	-2,154	0,267	Proteína ribosomal L22
BN5_3693		<i>rplB</i>	-5,33	0,004	Proteína ribosomal S19
	BN5_3694	<i>rplW</i>	-1,892	0,322	Proteína ribosomal L2
	BN5_3695	<i>rplD</i>	-1,389	0,600	Proteína ribosomal L23
	BN5_3696	<i>rplC</i>	-1,849	0,329	Proteína ribosomal L4
	BN5_3697	<i>rpsJ</i>	-2,634	0,140	Proteína ribosomal S10

Tabla 8. Continuación

ORF (a)	ORF (a,*)	Nombre	Veces de cambio	p-value	Descripción
<b>Genes sobreexpresados en MocR</b>					
	BN5_1898	<i>ppsal_1875</i>	-1,67	0,18	2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato aldolasa
BN5_1899		<i>mocR</i>	31,44	$9,2 \cdot 10^{-45}$	Regulador transcripcional
BN5_1900		<i>Sir3</i>	12,97	$7,8 \cdot 10^{-33}$	Sulfito reductasa, subunidad beta
BN5_1902		<i>cioA</i>	19,51	$1,1 \cdot 10^{-40}$	Quinol oxidasa, tipo citocromo <i>bd</i> , subunidad I
BN5_1903		<i>cioB</i>	-4,72	$1,2 \cdot 10^{-46}$	Quinol oxidasa, tipo citocromo <i>bd</i> , subunidad II
BN5_1901		<i>cydZ</i>	15,91	$2,5 \cdot 10^{-35}$	Proteína sin caracterizar conservada
BN5_1904		<i>serC</i>	-4,33	$1,7 \cdot 10^{-41}$	-
BN5_1905		<i>hisC</i>	-4,60	$3,6 \cdot 10^{-45}$	-
BN5_1906		<i>argD</i>	-4,79	$3,2 \cdot 10^{-48}$	Aminotransferasa ornitina/acetilornitina
BN5_1907		<i>dapA</i>	-4,66	$1,2 \cdot 10^{-46}$	dihidropicolinato
BN5_1908		<i>ppsal_1885</i>	-4,39	$8,1 \cdot 10^{-40}$	Permeasa, miembro MFS
BN5_1909		<i>metF</i>	-4,26	$2,9 \cdot 10^{-35}$	5,10-metilentetrahidrofolato reductasa
BN5_1910		<i>cysM</i>	-3,99	$4 \cdot 10^{-32}$	Cisteína sintasa
BN5_1911		<i>maeB</i>	-4,20	$6,6 \cdot 10^{-40}$	Enzima málica
BN5_1912		<i>nit4</i>	-4,06	$3,8 \cdot 10^{-37}$	Amidohidrolasa
BN5_1913		<i>ppsal_2761</i>	12,10	$3,0 \cdot 10^{-15}$	Proteína hipotética
BN5_3164		-	8	$2,4 \cdot 10^{-5}$	Proteína hipotética
BN5_2303		<i>benE</i>	2,26	0,003	Proteína de membrana de transporte con benzoato
BN5_2302		<i>hmfE</i>	2,71	0,0001	Hidratasa Enoil/CoA/ racemasa carnitina
BN5_2301		<i>hmfD</i>	2,47	0,0001	Sintetasa Acyl-Coa
	BN5_2300	<i>hmfC</i>	1,78	0,150	Deshidrogenasa monóxido de carbono tipo aeróbico
BN5_2299		<i>hmfB</i>	3,40	0,002	Deshidrogenasa monóxido de carbono tipo aeróbico
BN5_2298		<i>hmfA</i>	2,28	0,003	Deshidrogenasa monóxido de carbono



Tabla 8. Continuación

BN5_0168	<i>ppsal_212</i>	-1,21	0,34	-
BN5_0167	<i>ppsal_211</i>	1,07	0,75	Regulador transcripcional XRE
BN5_0166	<i>dadX</i>	2,11	0,0082	-
BN5_0165	<i>tdcF</i>	2,18	0,0002	Inhibidor de iniciación de translación
BN5_0164	<i>dadA</i>	1,8	0,003	Oxidasa glicina y amino ácidos
BN5_2934	<i>gntT</i>	2,55	0,0008	Permeasa
BN5_2933	<i>glxK</i>	2,21	0,028	-
BN5_2700	<i>ppsal_2013</i>	2,21	0,001	-
BN5_1266	<i>Ppsal_3308</i>	3,35	0,002	Regulador
BN5_2311	<i>puuB</i>	1,83	0,016	Glicina oxidasa
BN5_2310	<i>ppsal_2388</i>	2,73	0,009	-
BN5_3143	<i>ppsal_1581</i>	1,86	0,004	Histidina quinasa
BN5_3144	<i>cheB</i>	1,72	0,019	Regulador de respuesta
BN5_3713	<i>BN5_RNA55</i>	1,54	0,036	
BN5_3712	<i>BN5_RNA54</i>	1,67	0,012	
BN5_1720	<i>BN5_RNA14</i>	2,58	0,048	
BN5_2529	<i>BN5_RNA15</i>	1,91	0,026	
BN5_1692	<i>ppsal_1514</i>	1,71	0,013	Acyltransferasa
BN5_4235	<i>phoB</i>	1,73	0,013	Regulador de respuesta
BN5_3176	<i>ppsal_1553</i>	1,93	0,013	Regulador transcripcional
BN5_0115	<i>pstS</i>	1,45	0,05	Sistema de transporte ABC
BN5_0116	<i>pstC</i>	1,66	0,014	Sistema de transporte ABC
BN5_0117	<i>pstA</i>	1,63	0,023	Sistema de transporte ABC
BN5_2645	<i>rsbU</i>	1,65	0,020	Serina fosfatasa
BN5_3493	<i>ppsal_1204</i>	1,84	0,021	Proteína conservada
BN5_0918	<i>ppsal_935</i>	1,62	0,022	-
BN5_2100	-	9,00	0,026	Transposasa
BN5_1984	<i>ppsal_2692</i>	3,87	0,027	Regulador transcripcional
BN5_3148	<i>ppsal_1575</i>	1,56	0,028	
BN5_3178	<i>ppsal_1551</i>	2,53	0,028	
BN5_2511	<i>ppsal_2193</i>	1,65	0,03	Permeasa, sistema de transporte del tipo ABC

**Tabla 8. Continuación**

BN5_0077	<i>mrr</i>	1,64	0,03	Proteína hipotética	
BN5_3803	<i>czcD</i>	1,53	0,037	Sistema de flujo de cationes	
BN5_2773	<i>phoQ</i>	1,55	0,038	Histidina quinasa	
BN5_3039	<i>ppsal_1684</i>	1,69	0,038	Fosfodiesterasa	
BN5_1959	-	1,79	0,04	Proteína hipotética	
BN5_3021	-	8,1	0,04	Transposasa	
BN5_2306	<i>psfD</i>	4,3	0,04	Deshidrogenasa xantina	
BN5_1615		1,73	0,04	Proteína hipotética	
BN5_2568	<i>xdhB</i>	1,61	0,04	Deshidrogenasa aeróbica	
BN5_2567	<i>xdhA</i>	1,74	0,03	Deshidrogenasa xantina	
BN5_2736	<i>ppsal_1978</i>	1,49	0,05	Proteína hipotética	
BN5_1938	<i>ppsal_1915</i>	3,7	0,05	-	
BN5_4080	<i>ABC.PA.P</i>	1,80	0,05	Permeasa, sistema de transporte del tipo ABC	
BN5_2664	<i>parD</i>	1,65	0,05		
BN5_1690	<i>ppsal_1512</i>	1,55	0,05	Proteína hipotética	
<b>Genes infraexpresados en MccR</b>					
	BN5_4214	<i>ppsal_4045</i>	-1,23	0,571	Proteína conservada sin caracterizar en bacterias
	BN5_4215	<i>rph</i>	-1,66	0,016	RNasa
	BN5_2838	<i>arsC</i>	-2,01	0,006	Arsenato reductasa y proteínas relacionadas
	BN5_3374	<i>ychF</i>	-1,13	0,616	
BN5_3373		<i>ppsal_1316</i>	-2,66	$2,35 \cdot 10^{-6}$	-
	BN5_3372	<i>ppsal_3323</i>	-1,37	0,107	Proteína ribosomal L25
	BN5_3371	<i>prs</i>	-1,38	0,112	-
	BN5_2669	<i>flgJ</i>	-1,70	0,011	Proteína de enlace
	BN5_0891	<i>ppsal_908</i>	-2,36	$6,3 \cdot 10^{-5}$	1-acil-glicerol-3-fosfato
	BN5_3063	<i>fpr</i>	-1,86	0,006	Flavodoxin reductasas

Tabla 8. Continuación

BN5_2780		<i>napB</i>	-1,63	0,020	Nitrato reductasa, subunidad tipo citocromo <i>c</i>
BN5_2024		<i>deaD</i>	-2,00	0,001	Helicasas superfamilia II DNA y RNA
BN5_0772		<i>ppsaI_791</i>	-1,73	0,007	Proteína sistema CRISPR
	BN5_4105	<i>phaC</i>	-1,36	0,120	Poli-(3-hidroxialcanoato) sintetasa
BN5_4106		<i>yhil</i>	-1,83	0,005	Bomba de resistencia a múltiples medicamentos
	BN5_4107	<i>yhiH</i>	-1,28	0,222	ATPasa, sistema de transporte ABC
	BN5_2441	<i>ccoN3</i>	-1,27	0,2	Citocromo <i>c</i> oxidasa
BN5_2442		<i>ccoO3</i>	-1,52	0,03	Citocromo <i>c</i> oxidasa
BN5_2443		<i>ccoQ3</i>	-1,4	0,08	citocromo tipo <i>cbb<sub>3</sub></i>
	BN5_2444	<i>ccoP3</i>	-1,41	0,07	-
	BN5_2445	<i>ccoN1</i>	-1,08	0,7	Citocromo <i>c</i> , variantes mono y dihemo
	BN5_2446	<i>ccoO1</i>	1,09	0,7	citocromo oxidasa <i>cbb<sub>3</sub></i> , subunidad I
	BN5_2447	<i>ccoQ1</i>	1,08	0,73	Citocromo <i>c</i> , citocromo oxidasa <i>cbb<sub>3</sub></i>
	BN5_2449	<i>ccoP1</i>	1,07	0,73	-
	BN5_2449	<i>ccoG</i>	-1,08	0,709	Citocromo <i>c</i> , variantes mono y dihemo
	BN5_2450	<i>ccoH</i>	-1,29	0,208	NapH, poliferredoxina
	BN5_2451	<i>ccoI</i>	-1,11	0,633	Proteína conservada sin caracterizar
	BN5_2452	<i>ccoS</i>	-1,14	0,594	ATPasa transporte de cationes
	BN5_3333	<i>ppsaI_1354</i>	-2,02	0,004	Proteína sin caracterizar
	BN5_3068	<i>yfiP</i>	-1,80	0,03	-
	BN5_1447	<i>rne</i>	-1,66	0,01	Proteína conservada sin caracterizar
	BN5_2781	<i>napC</i>	-1,67	0,013	Ribonucleasas G y E
	BN5_0929	<i>nusA</i>	-1,49	0,042	Nitrato/TMAO reductasa
					Factor de elongación de transcripción

**Tabla 8. Continuación**

BN5_1291	<i>nrdA</i>	-1,46	0,05	Reductasa ribonucleotido, subunidad alfa
BN5_2890	<i>hepA</i>	-1,52	0,042	Helicasa superfamilia II DNA/RNA

(\*) Se representan ORF cuya expresión presenta un valor de *p-value* > 0,1, no estadísticamente aceptable.

Se han incluido todos los posibles miembros del operón, aunque alguno de ellos no experimenten cambios en su expresión.

**Tabla 9. Análisis transcriptómico en el mutante T1 de las oxidasas terminales presentes en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344**

ORF(a)	ORF (a,*)	Nombre	Veces de cambio	p-value	Descripción
<b>Regulación en el mutante T1</b>					
<i>cio 1</i>					
	BN5_1899	<i>mocR</i>	-2,32	0,148	Sulfito reductasa, subunidad beta (hemoproteína)
	BN5_1900	<i>sir3</i>	-1,865	0,268	Quinol oxidasa citocromo tipo- <i>bd</i> , subunidad 1
BN5_1901		<i>cioA</i>	-20,890	$1,6 \cdot 10^{-6}$	quinol oxidasa citocromo tipo- <i>bd</i> , subunidad 2
BN5_1902		<i>cioB</i>	-19,740	$2,3 \cdot 10^{-6}$	Proteína sin caracterizar conservada en bacteria
BN5_1903		<i>cydZ</i>	-19,742	$2,4 \cdot 10^{-6}$	Fosfoserina aminotransferasa
BN5_1904		<i>serC</i>	-15,084	$1,3 \cdot 10^{-5}$	Histidinol-fosfato/aromáticos aminotransferasa
BN5_1905		<i>hisC</i>	-15,209	$1,4 \cdot 10^{-5}$	Ornitina/acetilornitinaa aminotransferasa
BN5_1906		<i>argD</i>	-16,956	$6,8 \cdot 10^{-6}$	Dihidrodipicolinato
BN5_1907		<i>dapA</i>	-14,480	$1,7 \cdot 10^{-5}$	Permeasa, miembro MFS
BN5_1908		<i>Ppsal_1885</i>	-4,552	0,010	5,1-metilentetrahidrofolato reductasa

**Tabla 9. Continuación**

BN5_1909	<i>metF</i>	-5,956	0,004	Cisteína sintasa
BN5_1910	<i>cysM</i>	-17,738	1,2·10 <sup>-5</sup>	Enzima málica
BN5_1911	<i>maeB</i>	-8,956	0,000	amidohidrolasa
BN5_1912	<i>Nit4</i>	-5,378	0,005	-
<b><i>cio2</i></b>				
BN5_2519	<i>sulP</i>	1,598	0,465	Sulfato permeasa y transportadores Rodanasa
BN5_2520	<i>ppsal_2490</i>	1,271	0,764	relacionada con la sulfotransferasa
BN5_2521		1,571	0,584	-
BN5_2522	<i>cioA</i>	1,007	0,999	Quinol oxidasa tipo citocromo <i>bd</i> , subunidad 1
BN5_2523	<i>cioB</i>	2,700	0,088	Quinol oxidasa tipo citocromo <i>bd</i> , subunidad 2
BN5_2524	<i>cydZ</i>	-1,147	0,837	-
<b><i>cio3</i></b>				
BN5_0625	<i>ppsal_0620</i>	2,98	0,08	Metiltransferasas dependientes de SAM
BN5_0626	<i>ppsal_0621</i>	-1,30	0,84	Pirofosfatasa
BN5_0627	<i>cioA</i>	-1,39	0,58	Quinol oxidasa tipo citocromo <i>bd</i> , subunidad 1
BN5_0628	<i>cioB</i>	-1,70	0,37	quinol oxidasa tipo citocromo <i>bd</i> , subunidad 2
BN5_0629	<i>cydZ</i>	-2,36	0,40	-
BN5_0630	<i>ppsal_0625</i>	-2,11	0,36	Proteasas dependientes de Zn
BN5_0631	<i>ppsal_0626</i>	-1,01	1	Proteasas dependientes de Zn
<b>Oxidasa <i>cbb<sub>3</sub>-2</i></b>				
BN5_2441	<i>ccoN3</i>	1,16	0,79	Citocromo oxidasa tipo <i>cbb<sub>3</sub></i> , subunidad 1
BN5_2442	<i>ccoO3</i>	-1,14	0,81	citocromo oxidasa tipo <i>cbb<sub>3</sub></i>
BN5_2443	<i>ccoQ3</i>	-1,68	0,37	-
BN5_2444	<i>ccoP3</i>	1,05	0,93	Citocromo <i>c</i> , mono- and dihemo
<b>Oxidasa <i>cbb<sub>3</sub>-1</i></b>				
BN5_2445	<i>ccoN1</i>	-1,78	0,31	citocromo oxidasa tipo <i>cbb<sub>3</sub></i> , subunidad 1

**Tabla 9. Continuación**

BN5_2446	<i>ccoO1</i>	-3,77	0,03	citocromo oxidasa tipo <i>cbb<sub>3</sub></i> , citocromo <i>c</i>
BN5_2447	<i>ccoQ1</i>	-3,53	0,04	Citocromo oxidasa tipo <i>cbb<sub>3</sub></i> , subunidad 3
BN5_2449	<i>ccoP1</i>	-2,87	0,07	Citocromo <i>c</i> , mono y dihemo
<b>Oxidasa <i>aa<sub>3</sub></i></b>				
BN5_0092	<i>coxB</i>	2,17	0,17	Hemo/cobre-tipo citocromo/quinol
BN5_0093	<i>coxA</i>	1,97	0,24	Hemo/cobre-tipo citocromo/quinol
BN5_0094	<i>cox11</i>	2,03	0,26	Factor de unión
BN5_0095	<i>cox3</i>	1,79	0,34	Hemo/cobre-tipo citocromo/quinol

(\*) Se representan ORF cuya expresión presenta un valor de *p-value* > 0,1, no estadísticamente aceptable.

Se han incluido todos los posibles miembros del operón, aunque alguno de ellos no experimenten cambios en su expresión.

**Tabla 10. Análisis transcriptómico en el mutante MocR de las oxidasas terminales presentes en el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344**

ORF(a)	ORF (a,*)	Nombre	Veces de cambio	p-value	Descripción
<b>Regulación en el mutante MocR</b>					
<b><i>cio 1</i></b>					
BN5_1899		<i>mocR</i>	31,44	$9,17 \cdot 10^{-45}$	Sulfito reductasa, subunidad beta (hemoproteína)
BN5_1900		<i>sir3</i>	12,97	$7,83 \cdot 10^{-33}$	quinol oxidasa tipo Citocromo <i>bd</i> , subunidad 1
BN5_1901		<i>cioA</i>	15,91	$2,50 \cdot 10^{-35}$	Quinol oxidasa tipo Citocromo <i>bd</i> , subunidad 2
BN5_1902		<i>cioB</i>	19,51	$1,09 \cdot 10^{-40}$	Proteína sin caracterizar conservada en bacterias
BN5_1903		<i>cydZ</i>	26,31	$1,62 \cdot 10^{-46}$	Fosfoserina aminotransferasa
BN5_1904		<i>serC</i>	20,15	$1,67 \cdot 10^{-41}$	Histidinol-fosfato/aromático aminotransferasa
BN5_1905		<i>hisC</i>	24,24	$3,57 \cdot 10^{-45}$	Ornitina/acetilornitina aminotransferasa
BN5_1906		<i>argD</i>	27,74	$3,24 \cdot 10^{-48}$	Dihidrodipicolinato

**Tabla 10. Continuación**

BN5_1907	<i>dapA</i>	25,37	$1,19 \cdot 10^{-46}$	Permeasa, miembro MFS
BN5_1908	<i>ppsal_1885</i>	21,03	$8,11 \cdot 10^{-40}$	5,1--metilnetetrahidrofolato reductasa
BN5_1909	<i>metF</i>	19,12	$2,94 \cdot 10^{-35}$	Cisteína sintasa
BN5_1910	<i>cysM</i>	15,91	$4,06 \cdot 10^{-32}$	Enzima málica
BN5_1911	<i>maeB</i>	18,33	$6,57 \cdot 10^{-40}$	Amidohidrolasa predicho
BN5_1912	<i>Nit4</i>	16,69	$3,79 \cdot 10^{-37}$	-
<b><i>cio2</i></b>				
BN5_2519	<i>sulP</i>	-1,04	0,91	Sulfato permeasa y transportadores (MFS)
BN5_2520	<i>ppsal_2490</i>	2,22	0,14	Rodanasa
BN5_2521	<i>ppsal_2491</i>	1,22	0,44	-
BN5_2522	<i>cioA</i>	1,28	0,21	quinol oxidasa tipo citocromo <i>bd</i> , subunidad 1
BN5_2523	<i>cioB</i>	0,93	0,2	quinol oxidasa tipo citocromo <i>bd</i> , subunidad 2
BN5_2524	<i>cydZ</i>	1,08	0,76	-
<b><i>cio3</i></b>				
BN5_0625	<i>ppsal_0620</i>	1,16	0,75	Metiltransferasas dependientes SAM
BN5_0626	<i>ppsal_0621</i>	-1,52	0,47	Pirofosfatasa predicha
BN5_0627	<i>cioA</i>	1,1	0,73	Quinol oxidasa tipo citocromo <i>bd</i> , subunidad 1
BN5_0628	<i>cioB</i>	1,2	0,47	Quinol oxidasa tipo citocromo <i>bd</i> , subunidad 2
BN5_0629	<i>cydZ</i>	1,25	0,8	-
BN5_0630	<i>ppsal_0625</i>	-1,67	0,42	Proteasas dependientes de Zn
BN5_0631	<i>ppsal_0626</i>	1,25	0,8	Proteasas dependientes de Zn
<b>Oxidasa <i>cbb3-2</i></b>				
BN5_2441	<i>ccoN3</i>	-1,27	0,200	citocromo oxidasa tipo <i>cbb3</i> , subunidad 1
BN5_2442	<i>ccoO3</i>	-1,52	0,030	citocromo oxidasa tipo <i>cbb3</i>
BN5_2443	<i>ccoQ3</i>	-1,4	0,080	-

**Tabla 10. Continuación**

BN5_2444	<i>ccoP3</i>	-1,41	0,070	Citocromo c, mono- and dihemo
<b>Oxidasa <i>cbb<sub>3</sub>-1</i></b>				
BN5_2445	<i>ccoN1</i>	-1,08	0,700	Citocromo oxidasa tipo- <i>cbb<sub>3</sub></i> , subunidad 1
BN5_2446	<i>ccoO1</i>	1,09	0,700	Citocromo oxidasa tipo- <i>cbb<sub>3</sub></i> , citocromo c
BN5_2447	<i>ccoQ1</i>	1,08	0,730	citocromo oxidasa tipo- <i>cbb<sub>3</sub></i> , subunidad 3
BN5_2449	<i>ccoP1</i>	1,07	0,730	Citocromo c, mono- and dihemo
<b>Oxidasa <i>aa<sub>3</sub></i></b>				
BN5_0092	<i>coxB</i>	1,08	0,750	Hemo/cobre-tipo citocromo/quinol
BN5_0093	<i>coxA</i>	-1,06	0,870	Hemo/cobre-tipo citocromo/quinol
BN5_0094	<i>cox11</i>	1,29	0,680	Factor de ensamblaje citocromo oxidasa
BN5_0095	<i>cox3</i>	1,13	0,800	Hemo/cobre-tipo citocromo/quinol

(\*) Se representan ORF cuya expresión presenta un valor de *p-value* > 0,05, no estadísticamente aceptable.

Se han incluido todos los posibles miembros del operón, aunque alguno de ellos no experimenten cambios en su expresión.



## ***V. Discusión***



## **1. REGULACIÓN DE LAS OXIDASAS TERMINALES DE *P. pseudoalcaligenes* CECT53444**

El análisis del operón *cio1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT53444 presentado en este trabajo profundiza en el papel de la oxidasa resistente al cianuro en su asimilación, evidencias que comenzaron con trabajos previos que mostraron que la disrupción de *cioA* transforma la bacteria en una cepa sensible al cianuro (Quesada et al., 2007; Tesis Doctoral F. Acera, 2011). En conjunción con el potencial biotecnológico de *P. pseudoalcaligenes* (Luque-Almagro et al., 2005), la singular organización de los genes *cio* encontrados en este organismo puede proporcionar nuevas herramientas para investigar e incrementar el conocimiento y del proceso de biodegradación de cianuro y sus potenciales aplicaciones biotecnológicas.

### ***Expresión de los genes cio en presencia de cianuro y de NOC-12***

En trabajos previos se ha observado que los mutantes de *P. pseudoalcaligenes* CECT53444 afectados en los genes *cio* presentes en el operón *cio1* presentaron un fenotipo de sensibilidad a cianuro que es compatible con la deficiencia de CIO pero que no abarca al gen *nir/sir*, que ocupa el primer ORF del operón *cio1* y cuya mutagénesis pareció no tener efecto sobre la respiración resistente a cianuro (Quesada et al., 2007; Tesis Doctoral F. Acera, 2011).

La oxidasa Cio es totalmente activa en presencia de 1 mM de KCN (IC<sub>50</sub> de 50 mM; Matsushita et al., 1983; Cunningham y Williams, 1995; Cunningham et al., 1997; Williams et al., 2007), mientras que las otras rutas respiratorias terminadas por oxidasas hemo-cobre son inhibidas a estas concentraciones. Este hecho es coherente con la expresión génica de los tres operones *cio* de *P. pseudoalcaligenes* CECT53444 detectada en este trabajo, que se regulan diferencialmente. Así, el efecto regulador más claro detectado en este trabajo es un fuerte efecto positivo por cianuro para la expresión de *cio1*, tanto en medio mínimo como LB (Figuras 17 y 19). Por lo que respecta a los otros dos operones *cio*, su expresión se vio alterada siempre en un rango de variación

mucho menor que la de *cio1*, detectándose un efecto positivo para *cio2* en medio mínimo y sobre todo en LB (Figuras 17 y 19).

Las mutaciones polares en *cio1* (mutante T1) o su sobreexpresión desde un marcador de resistencia sin parada de transcripción (mutante T10) generan fuertes efectos sobre la expresión de los genes *cio*. Además de los esperados cambios de expresión del propio *cio1*, su bloqueo en T1 y su expresión constitutiva (sin cianuro) en el mutante T10, se observó una fuerte estimulación de la expresión génica de *cio2* en el mutante T10, y de *cio3* en el mutante T1.

El óxido nítrico (NO) también actúa como inhibidor de diferentes oxidasas por unión a los grupos hemo (Brown *et al.*, 1997), estando el NO producido por macrófagos implicado en la eliminación de patógenos (Fang, 2004). Los genes *cio* se inducen por exposición al NO en *P. aeruginosa* (Arai, 2011) pero no en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Figura 22), quizás debido a las diferentes eficiencias como donadores de las distintas moléculas empleadas en cada caso.

### **Funcionalidad de los operones *cio***

El hecho de que un mutante dirigido en *cioA* sea incapaz de usar cianuro como única fuente de nitrógeno o ni siquiera crecer en medio LB suplementado con 1 mM de cianuro, no expresándose respiración insensible a cianuro en estas condiciones, sugiere que el CIO que se expresa desde el operón *cio1* es esencial para la resistencia a cianuro en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Quesada *et al.*, 2007), aun cuando la bacteria tiene otros dos operones *cio* presentes en su genoma (Tesis Doctoral F. Acera, 2011), que se expresan a mRNA (este trabajo), dejando abierta la cuestión de su posible funcionalidad.

La actividad NADH deshidrogenasa resistente al cianuro de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se induce por cianuro (Quesada *et al.*, 2007; Figura 18). En los ensayos realizados en este trabajo, al igual que en otros previos, se ha observado una disminución significativa de la expresión de la oxidasa terminal resistente al cianuro en el mutante T1, lo que sugiere que los productos de los genes del operón *cio1* son los responsables de la mayor parte de la actividad respiratoria resistente al inhibidor. No obstante, también es

cierto que los mutantes en el operón *cio1*, presentaron una actividad resistente al cianuro residual pero significativa, siendo el porcentaje de actividad resistente al inhibidor similar al de la estirpe silvestre. El hallazgo de otros dos operones *cio* en el genoma de la bacteria podría estar indicando el origen de la actividad residual en estos mutantes.

Al expresar los operones *cio2* y *cio3* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en un mutante CioA de *P. putida*, se obtuvo la complementación de la resistencia al cianuro de esta bacteria, que pudo crecer incluso mejor que *P. pseudoalcaligenes* en las mismas condiciones (Figura 28). Resultados similares se obtuvieron con la complementación del mismo mutante de *P. putida* con el operón *cio1* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Tesis Doctoral F. Acera, 2011), lo que demuestra que los tres operones *cio* de esta última bacteria son funcionales. No obstante, a mayores concentraciones de cianuro en LB o medio mínimo con cianuro, ni la cepa mutante transformada con los genes *cio* ni la cepa silvestre de *P. putida* alcanzaron la resistencia al cianuro y la capacidad de crecimiento en estas condiciones de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (resultados no mostrados; Tesis Doctoral F. Acera, 2011).

Se observaron diferencias entre el comportamiento que presentaron las cepas complementadas de *P. putida*, con una fase de latencia mucho menor para *cio1* que *cio2* y *cio3*, siendo *cio2* la que presentó un mayor tiempo en esta fase. Estas diferencias no deben ser atribuidas a las propias características de sus secuencias codificantes, sino que podrían deberse a alteraciones de expresión génica por secuencias residuales de sus correspondientes promotores. De hecho, las construcciones plasmídicas utilizadas para la expresión génica en *P. putida* contienen fusiones transcripcionales entre el promotor (Plac) y las secuencias codificantes *cio*, para las que se mantuvo parte de las secuencias reguladoras situadas corriente arriba de sus codones de inicio.

Por otra parte, la disponibilidad de estirpes de *P. putida* conteniendo copias de solo uno de los tres operones *cio* permitió comprobar la especificidad

de cebadores con los que se ha trabajado en todos los estudios de expresión génica, siendo las PCRs diseñadas específicas.

### ***Efecto de las condiciones del crecimiento sobre la expresión de los genes *cio****

La expresión de los operones *cio* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en medio LB no se modula al modificar el grado de aireación de los cultivos (Figura 23), basado en el denominado coeficiente de transferencia de oxígeno o *K<sub>la</sub>*, de manera similar a lo observado en *P. aeruginosa* (Cooper *et al.*, 2003). Sin embargo, la fase de crecimiento afectó de distinta manera la expresión de los genes *cio* de ambas bacterias ya que, si bien la expresión del gen *cioA* de *P. aeruginosa* en medio LB es baja en la fase exponencial del crecimiento y se incrementa aproximadamente 5 veces en la fase estacionaria (Cooper *et al.*, 2003), cambio que fue paralelo al aumento en la actividad de CIO y de proteína CioA, para todos los operones *cio* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se observó el efecto contrario, una caída de expresión génica en la fase estacionaria del crecimiento (Figura 24). No obstante, resulta destacable señalar que el experimento anterior se realizó en medio mínimo, diferencia que podría afectar la modulación de la expresión génica.

### ***Expresión de los genes *cox* y *cbb<sub>3</sub>* en presencia de cianuro***

Entre las demás oxidasas de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, los genes *cox* presentaron un incremento de expresión inducido por la presencia de cianuro en el medio de cultivo, aunque solo en medio LB (Figuras 32 y 33). El operón *cco2* mostró una regulación diferencial respecto a *cox*, con un descenso generalizado por la presencia de cianuro, mientras que *cco1* no presentó modulación de la expresión génica. Esta situación contrasta con la ausencia de efecto del cianuro sobre las oxidasas terminales de *P. aeruginosa*, donde estudios previos demostraron que el cianuro induce la actividad del promotor *cio* (Cooper *et al.*, 2003), mientras que los promotores de las demás oxidasas no se vieron afectadas por su efecto (Arai, 2011).

Respecto a las mutaciones que afectan la expresión del operón *cio1*, el efecto más notable observado fue la sobreexpresión de los genes *cox* en el mutante T10, que expresa de manera constitutiva el operón *cio1* (Figuras 32 y 33).

### **Efecto de las condiciones del crecimiento sobre la expresión de los genes *cox* y *cbb<sub>3</sub>***

La expresión génica de la oxidasa *aa<sub>3</sub>* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 sufre un incremento transitorio entre el grado de aireación medio y bajo, y también entre la fase estacionaria temprana y tardía (Figuras 35 y 36). También en *P. aeruginosa* se observa un incremento de la expresión génica de los genes *cox* con baja disponibilidad de oxígeno y en fase estacionaria del crecimiento, aunque en este último caso la expresión se mantiene relativamente elevada durante toda la fase estacionaria (Kawakami *et al.*, 2010).

Los genes para las dos oxidasas *cbb<sub>3</sub>* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se regularon de forma similar durante el crecimiento bacteriano, disminuyendo progresivamente hasta alcanzar valores casi nulos en la etapa más tardía determinada (Figura 36). Los resultados obtenidos en otras especies de *Pseudomonas* son diferentes, ya que en *P. aeruginosa* y *P. putida* los niveles de mRNA de los genes que codifican la oxidasa terminal *Cbb<sub>3</sub>* aumentan (Morales *et al.*, 2008; Kawakami *et al.*, 2010). Sin embargo, la baja disponibilidad de oxígeno sí estimula la expresión de uno de los operones *cco* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 (Figura 35), de manera similar a lo que ocurre en *P. putida* (Morales *et al.*, 2008) y *P. aeruginosa* (Kawakami *et al.*, 2010). La inactivación de algunas de estas oxidasas terminales tiene importantes consecuencias: el bloqueo de expresión en *P. aeruginosa* de la oxidasa *cbb<sub>3-1</sub>* hace que aumente la expresión de los genes *cioAB* hasta 10 veces (Comolli y Donohue, 2004), mientras que, en *P. putida*, la oxidasa terminal *cyo* es eficientemente expresada cuando las células crecen exponencialmente en un medio completamente aeróbico. Además, La mutación de *P. aeruginosa* en los genes *cioAB*, o su presencia en los plásmidos

multicopias, genera defectos en la división celular y un marcado aumento en la sensibilidad a varios antibióticos y al estrés oxidativo (Tavankar *et al.*, 2003).

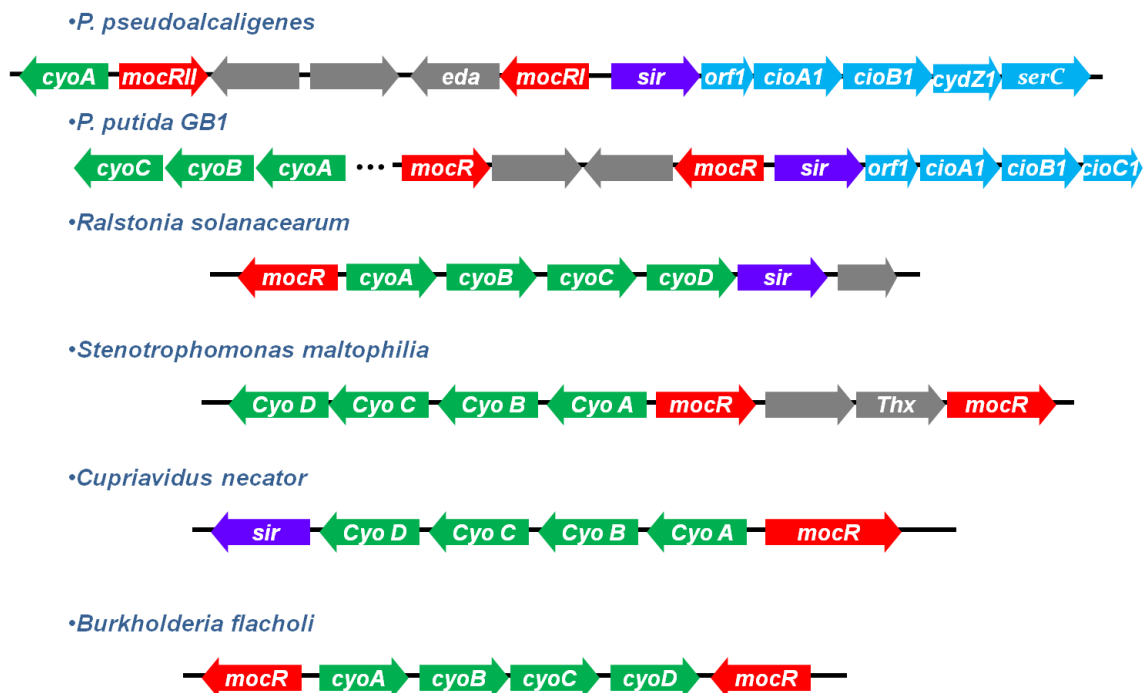
Los resultados presentados resaltan la importancia y plasticidad de la composición de la cadena de transporte electrónico para adaptarse a las condiciones de cambio medio ambiental, permitiendo coordinar la presencia de un conjunto apropiado de oxidasas terminales que optimizan la generación de

## **2. ESTRUCTURA GÉNICA DE *CIO1*: PAPEL DE MocR EN SU REGULACIÓN.**

En éste trabajo se ha observado la cotranscripción de 14 genes, desde *nir/sir* hasta *nit4*, en un mRNA de más de 16 Kb (Figura 37). Sin embargo, la hibridación en “Northern blot” reveló un tamaño de transcrito de 5.5 kb (Figura 38), lo que sería compatible con una parada de transcripción entre los genes *cydZ* y *serC*. Además de los datos de cotranscripción, obtenidos por rt-PCR entre secuencias codificantes contiguas (Figura 37), los genes de la región presentaron la misma regulación, desde *nir/sir* hasta *nit4*: efecto positivo del cianuro sobre su expresión génica, que resultó bloqueada por mutaciones en distintas secuencias codificantes (*nir/sir*, mutante T1; *cioA*, T18; *serC*, T25) y una expresión constitutiva en el mutante T10, que presenta la inserción de un marcador de resistencia sin parada de transcripción en el primer gen, *nir/sir*, del operón *cio1*. Todo ello sugiere la existencia de un único promotor responsable de la regulación transcripcional de *cio1*.

La presencia de genes de la subfamilia MocR en la proximidad de operones para oxidasas terminales, en especial los genes *cio* de varias especies de *Pseudomonas*, sugiere la posibilidad de que *mocR* participe en la regulación de la expresión de la respiración en estas bacterias (Figura 50). Además de la presencia de genes *mocR*, en algunas bacterias también se detecta la localización de genes *sir*, que codifican sulfito reductasas.





**Figura 50. Entornos génicos conteniendo *mocR* y genes *cio* o *cyo* en diferentes especies bacterianas.** El gen *mocR* se encuentra con frecuencia en las proximidades de genes para las oxidasas terminales CIO y Cyo. Se muestran algunos ejemplos localizados mediante rastreo de genomas.

El mutante MocR de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, dónde la inserción del marcador de resistencia en el gen *mocR* se realiza en el sentido de la transcripción de *cio1* y sin parada de transcripción, provoca un fuerte efecto sobre la expresión de todos los genes del operón *cio1*. La cuantificación de la expresión génica permite observar una sobreexpresión en medios con cianuro mayor que la que correspondería al nivel de expresión desde el propio promotor de *cio1*, más la de la expresión desde el marcador de resistencia, que puede ser estimada a partir de los valores de expresión que se observan en el mutante T10 en ausencia de cianuro (Figura 45). Estos resultados, que ya indican la existencia de un efecto negativo de *mocR* sobre la expresión de *cio1*, se corroboró mediante la construcción de un mutante MocR con para de transcripción en el marcador de resistencia, dónde se pudo evidenciar que sin interferencias ajenas al propio promotor *cio1*, la mutación de *mocR* aumenta la expresión de *cio1* (Figura 45).

El crecimiento en medios con cianuro de los mutantes MocR presenta características destacables (Figura 41). El mutante MocR, que no presenta para de transcripción y expresa de manera constitutiva y elevada el operón *cio1*, tiene un menor periodo de latencia previo a la fase exponencial de crecimiento en medios con cianuro. Este comportamiento había sido ya detectado para el mutante T10, que expresa constitutivamente el operón *cio1* aunque no tiene mutado el gen *mocR* (Tesis Doctoral F. Acera, 2011), aunque las numerosas repeticiones realizadas en el presente trabajo no han tenido la suficiente reproducibilidad, siendo éste un fenotipo cuya expresión depende de alguna variable desconocida. Sin embargo y a diferencia de T10, el mutante MocR sí presenta una mejora reproducible de su resistencia al cianuro (Figura 41).

El estudio de la regulación del propio gen *mocR* ha revelado interesantes conexiones con el producto funcional del operón *cio1*. Así, se ha observado que el propio gen *mocR* es inducible por cianuro y que las mutaciones en *cio1* que bloquean la expresión de los genes para el CIO también bloquean la inducibilidad por cianuro de la expresión de *mocR* (Figura 48). Estos resultados permiten sugerir que la expresión del CIO, producto del operón *cio1*, es necesaria para la inducibilidad por cianuro de *mocR*, gen que a su vez controla negativamente la expresión en medios con cianuro de *cio1*.

El gen *nit4*, que codifica la 3-cianoalanina nitrilasa, fue estudiado de manera individualizada ya que podían existir ciertas dudas sobre su posible expresión constitutiva elevada, en ausencia de cianuro, a la vista de algunos resultados de RT-PCR aparentemente discrepantes con su qPCR (Figuras 42 y 43). Los nuevos análisis realizados muestran una clara regulación por cianuro, expresión constitutiva en el mutante T10 y bloqueo de su expresión en el mutante T1 (Figuras 43, 44, 45 y 46) de manera similar al resto de genes del operón *cio1*, por lo que se ha descartado la existencia de un promotor independiente y específico para este gen. El que se puedan observar altos valores de expresión por RT-PCR en algunos experimentos podría deberse a una mayor eficiencia de las amplificaciones obtenidas para esta secuencia

codificante, hecho que desaparece al efectuar las normalizaciones frente al RNA 16S en la qPCR.

El operón *cio1* codifica genes de funciones aparentemente inconexas pero que presentan interesantes interrelaciones funcionales (<https://www.wikigenes.org>). Así, los genes *nir/sir* y *orf1* están cotranscritos en los genomas de diversas bacterias, estando anotado *orf1* en algunos casos como una hipotética oxido-reductasa. Además de los tres genes para el CIO; *cioA*, *cioB* y *cydZ*, el operón *cio1* también codifica para una sulfito reductasa (*nir/sir*), necesaria para la asimilación del S inorgánico a SH<sub>2</sub>, que posteriormente se incorpora en el aminoácido Cys mediante la ruta a la que pertenece la fosfoserina aminotransferasa (*serC*) y la cisteína sintasa (*CysM*). Partiendo de Cys se sintetiza 3-ciano alanina (*nit4*) y también la propia Met, en un proceso que requiere Metilen-THF Reductasa (*metF*) y poder reductor en forma de NADPH, que podría proceder de la actividad de la enzima málica (*maeB*). Tres genes restantes codifican enzimas para la biosíntesis de los aminoácidos básicos: histidinol-P aminotransferasa (*hisC*), para His; acetilornitiina aminotransferasa (*argD*), para Arg y Lys; dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*), para Lys. Por último, un gen para un transportador de la familia MFS se encuentra ubicado entre los 14 genes de *cio1*. La co-expresión de todos estos genes en medios con cianuro podría facilitar la resistencia al cianuro (*cioA*, *cioB* y *cydZ*), la asimilación de una parte del cianuro en forma de 3-cianoalanina (*nir/sir*, *orf1*, *serC*, *cysM* y *nit4*), la síntesis de un aminoácido esencial como la Met en un medio de elevada toxicidad (*metF* y *maeB*), la síntesis de los 3 aminoácidos básicos, cuyo transporte a favor del gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> debe verse seriamente comprometido en medios con cianuro debido al menor rendimiento energético de la respiración con CIO (*hisC*, *argD* y *dapA*), y el transporte de alguna de las moléculas anteriormente mencionadas (*ppsa1\_1885*).

### **3. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO DE *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 Y SUS MUTANTES.**

El estudio transcriptómico en la estirpe silvestre *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 y los distintos mutantes, ha aportado datos relevantes hasta ahora desconocidos, además, ha permitido verificar datos obtenidos previamente de forma experimental, relacionados con el metabolismo del cianuro. Como se ha explicado en el capítulo 3 de resultados, no todos los valores transcriptómicos obtenidos son válidos, ya que hay que tener en cuenta los parámetros estadísticos que establecen los datos a tener en cuenta.

De los mutantes elegidos en este estudio, del T1 suplementado con cianuro en medio LB, se obtuvieron datos más relevantes que del mutante MocR en medio LB ya que para casi todos los genes tuvo un comportamiento muy similar a la estirpe silvestre suplementada con cianuro, de ahí que los datos obtenidos no hayan muy relevantes para este último caso.

Además de la regulación debida al cianuro, se han encontrado otros genes relacionados con metabolismos muy diversos, algunos descritos en el borrador del genoma previamente (Luque-Almagro *et al.*, 2013), y posteriormente en la secuenciación completa del genoma (Wibberg *et al.*, 2014), aunque estos datos aun están sin comprobar experimentalmente en el laboratorio, ya que muchos de estos genes han sido estudiados por primera vez al llevar a cabo el estudio transcriptómico.

Los resultados más destacables obtenidos del estudio de transcriptómica son la influencia del cianuro en los operones *cio*, principalmente en el operón *cio1*, tanto en el mutante T1 como en el mutante MocR.

A continuación se procede a discutir cada una de las comparativas llevadas a cabo en los mutantes, así como las distintas condiciones estudiadas en la estirpe silvestre.

### **Regulación positiva en el mutante T1**

Los genes *phu* que codifican enzimas con una posible función de transporte ABC, aparecen sobreexpresados, y agrupados en forma de operón, este sistema de transporte probablemente se encuentre sobreexpresado debido a la ausencia de funcionalidad del CIO, ya que el mutante T1 tiene afectado todo el operón *cio1*, de ahí que otros sistemas alternativos en presencia de cianuro tengan que activarse, como es el caso de estos genes, no ocurriendo lo mismo en el mutante MocR, en el que el operón *cio* está, y por ello desaparece dicha sobreexpresión. Sin embargo, en la estirpe silvestre en ambos medios en presencia de cianuro, se observa algo muy diferente, ya que en medio mínimo, los valores de expresión no se encuentran afectados, pero en medio LB existe una sobreexpresión (resultados no mostrados). La expresión de *phuR* y *phuSTUVW* ocurrió bajo condiciones de crecimiento en ausencia de hierro y fue directamente controlado por la proteína Fur en *P. aeruginosa* (Ochner *et al.*, 1999), por tanto, al ser el cianuro un quelante, y no poder ser asimilado en medio LB, permanece más tiempo en el medio, y baja por tanto la concentración de hierro en el medio al formar complejos metálicos, aumentando los niveles de expresión de este operón en este medio, sin embargo en medio mínimo, al producirse asimilación de cianuro, los niveles de expresión no se encuentran alterados.

Debido a la ausencia de crecimiento del mutante T1 en presencia de cianuro, el cianuro permanece más tiempo en el medio, y, consecuencia de este hecho, parece provocar una deficiencia de hierro, que ha sido demostrado experimentalmente (Becerra *et al.*, 2014), pero además, Fur es un represor transcripcional de *phuR* y del operón *phuSTUVW* (comunicación personal, Tesis Doctoral G. Becerra, 2013; Becerra *et al.*, 2011).

El gen sobreexpresado en el mutante T1 *trxC*, forma un operón en *Rhodobacter capsulatus* con el gen *trxA*. Acerca de la regulación de estos genes hay muy pocos conocimientos (Zeller *et al.*, 2006), aunque la importancia de las

tioredoxinas en las funciones celulares son muy importantes. En *E.coli*, estos genes están regulados por OxyR.

El gen *fumC*, que podría estar regulado por la proteína FUR (Tesis Doctoral G. Becerra, 2013) se encuentra sobreexpresado en el mutante T1. El cianuro inhibe las hierro-proteínas, por eso en el caso del mutante T1, *fumB* se encuentra inhibido porque tiene hierro y *fumC* se encuentra sobreexpresado. En el caso de la estirpe silvestre en medio LB suplementado con cianuro, el comportamiento de ambos genes es el mismo, probablemente debido al mismo hecho que ocurre en el mutante con el efecto del cianuro.

Respecto a los pequeños RNA's que presentan valores aceptables en la sobreexpresión en el mutante, se han llevado a cabo experimentos para poder clarificar el posible papel de estos en el metabolismo del cianuro sin obtener ninguna conclusión aclaratoria.

En resumen, la mutación polar del operón *cio1* se traduce en una mayor persistencia del cianuro en el medio de cultivo (de hecho no se asimila), potenciando así el efecto inductor del cianuro sobre genes diana, como los relacionados con la resistencia a cianuro o la adquisición de hierro.

### **Regulación negativa en el mutante T1.**

Entre los genes regulados negativamente en el mutante T1, están la mayor parte de las oxidasas cuyo estudio de expresión se ha llevado a cabo en este trabajo, sobre todo el operón *cio1*, que desempeña un papel fundamental en la resistencia y asimilación del cianuro (Quesada *et al.*, 2007), y que en este mutante carece de funcionalidad. En *P. aeruginosa* esto también ocurre, ya que estos genes están implicados en mantener la respiración aeróbica durante la presencia de cianuro, aunque la tolerancia a cianuro en este organismo es algo menor (Cunningham *et al.*, 1997). La ausencia del operón *cio1*, hace que en presencia de cianuro 2mM, caiga la expresión de estos genes *cio*.

En el caso del gen *mocR*, *BN5\_1899* y del gen anterior, *BN5\_1898*, contiguos al operón *cio1*, en dirección corriente arriba, se esperaría que la

expresión fuese constitutiva. Sin embargo, la expresión de dichos genes también se regula negativamente por cianuro, de manera que el resultado neto observado en transcriptómica es una menor expresión de estos genes. La expresión constitutiva de estos dos genes desde el promotor del casete de resistencia al antibiótico no compensa el aumento de su expresión como consecuencia de la presencia de cianuro. Además, este resultado sugiere que la señal que provoca el aumento de la expresión de estos dos genes no es el cianuro, sino algún compuesto derivado de su metabolismo o que requiere la función de *cio1*.

Cabe destacar la regulación negativa de los genes que codifican la enzima cianasa, de las cuales se habla más extensamente a continuación.

### **Cianasas**

La cianasa de *P. pseudoalcaligenes* ha sido estudiada con anterioridad (Luque-Almagro *et al.*, 2008). Los datos transcriptómicos obtenidos en este trabajo abundan en la regulación de estos genes. Aunque en algunas cianobacterias la actividad cianasa parece estar expresada constitutivamente (Miller y Espie, 1994), en otras cepas parece estar regulada negativamente por amonio (Harano *et al.*, 1997). En *E. coli*, la expresión del operón *cynTSX* es inducido por cianato exógeno a través del regulador positivo CynR, que pertenece a la familia LysR (Sung y Fuchs, 1992). La regulación positiva por cianato también se pone de manifiesto en las cepas que degradan cianuro *P. fluorescens* NCIMB 11764, en la cual la cianasa está presente en células crecidas con cianato y también en presencia de amonio (Kunz y Nagappan, 1989). *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, parece tener un sistema de regulación más sofisticado, ya que la cianasa se controla positivamente por cianato bajo condiciones limitantes de nitrógeno, y es controlado negativamente por amonio, aún en presencia de cianato. La azida es un inductor de la cianasa en *E. coli* (Lamblin y Fuchs, 1994) pero no tiene el mismo efecto sobre *P. pseudoalcaligenes*. La urea por el contrario es un fuerte inductor de la actividad cianasa. Algo destacable es que la actividad cianasa no fue detectada en medio LB suplementado con cianuro, porque ya se sabe que *P.*

*Pseudoalcaligenes* no asimila cianuro en este medio (Luque-Almagro *et al.*, 2005), sugiriendo que el inductor debería ser un metabolito producido a partir del cianuro en la ruta de asimilación. Este metabolito podría ser cianato, ya que la inducción de la actividad cianasa se da a concentraciones bajas de cianato. En *P. pseudoalcaligenes* no se detectó la actividad cianuro monoxigenasa, que convierte cianuro en cianato. El cluster de genes *cyn* de *E. coli* y *P. aeruginosa* comparten la presencia del gen *cynT* que codifica la anhidrasa carbónica (Sung y Fuchs, 1988). La organización del clúster de genes *cyn* es diferente a la organización del de *E. coli*.

La organización de genes *cyn* en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 es similar a la encontrada en *S. elongatus* PCC7942, donde *cynS* se encuentra adyacente a un transportador de cianato del tipo ABC muy relacionada con un transportador de nitrato/nitrito (Harano *et al.*, 1997; Espie *et al.*, 2007). Por tanto, aunque los genes *cynA*, *cynB* y *cynD* podrían codificar un transportador de cianato, también podrían codificar un posible transportador de bicarbonato, teniendo en cuenta que la concentración de bicarbonato es relativamente alta a pH alcalino al cual la bacteria crece muy bien. Por otro lado, el único gen en el cluster *cyn* de *P. pseudoalcaligenes* que codifica una proteína reguladora (*cynF*) no muestra identidad con el gen *cynR* que codifica el activador transcripcional descrito para otros cluster de genes *cyn* bacterianos. Los análisis filogenéticos revelaron que CynS en *P. pseudoalcaligenes* está muy relacionada con varias cianasas de otras pseudomonas y cianobacterias. Sin embargo, esta distribución de cianasas parece ser independiente del grupo bacteriano. El cianato ha sido propuesto como intermediario en el metabolismo del cianuro en *P. fluorescens* NCIMB 11764 (Harris y Knowles, 1983a), sin embargo en *P. pseudoalcaligenes* el cianato no es un intermediario clave en la degradación del cianuro, puesto que el mutante *cynS* es capaz de usar cianuro como fuente de nitrógeno. Sin embargo, el cianuro podía ser un inductor directo de cianasa, o más claramente, cantidades bajas de cianato pueden ser formados durante el metabolismo de cianuro, y esta es la explicación de la inducción de cianasa en presencia de cianuro.



Aunque el cianato es relativamente tóxico, algunas bacterias lo usan como fuente de nitrógeno. Por ejemplo, el crecimiento de *P. fluorescens* NCIMB 11764 fue parcialmente inhibida por cianato a concentraciones más altas de 5 mM, y la inhibición total se observó a una concentración total de 20 mM (Kunz y Nagappan, 1989), mientras que *P. pseudoalcaligenes* fue capaz de usar cianato como única fuente de nitrógeno a concentraciones de hasta 100 mM. La cianasa de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 tiene un papel asimilador, ya que el mutante y la estirpe silvestre fueron igualmente resistentes al cianato. En el mutante T1 en presencia de cianuro, probablemente estos valores negativos sean debidos a que en medio LB no se produce asimilación de cianuro, por tanto no puede ser transformado en un metabolito intermedio que sirva como sustrato en la cianasa. Además, debido a que la actividad cianuro monoxigenasa no ha sido detectada en *P. pseudoalcaligenes*, el cianuro no puede transformarse en cianato. En el mutante MocR sin embargo, como el cultivo se lleva a cabo en medio LB sin presencia alguna de cianuro, se observan niveles de expresión normales del gen que codifica la cianasa.

En el caso de la estirpe silvestre suplementada con cianuro se observan valores significativamente aceptables y con valores estadísticos, pero todos los valores fueron de sobreexpresión, tanto en medio mínimo como en medio LB, probablemente debido a que la funcionalidad del operón *cio1* no está afectada así como la de las demás oxidetas, y el cianuro debe sufrir algún tipo de transformación, y transformarse en un algún metabolito que sirva como sustrato a la cianasa. El efecto del medio es nulo ya que los valores en las comparativas de ambos medios son de la unidad. En el mutante T1 como no se asimila cianuro, no se produce cianato y por lo tanto no se induce el operón de la cianasa.

Existe una serie de genes que codifican las proteínas ribosomales que se encuentran regulados negativamente en el mutante T1. Por tanto, parece que la síntesis de proteínas está afectada negativamente en el mutante, probablemente debido a que el mutante no crece en presencia de cianuro. Sin

embargo al estudiar el comportamiento en la estirpe silvestre de todas estas proteínas ribosomales, se observa una caída en la expresión, no ocurriendo esto en el mutante MocR, lo que pone de manifiesto que en este caso, la caída de expresión en los genes no es debida a la mutación sino a la presencia de cianuro. Siempre que este compuesto está presente en el medio, la síntesis de proteínas se encuentra afectada.

### **Regulación positiva en el mutante MocR**

La mutación de este gen no afecta significativamente el patrón de expresión en medio LB, excepto para el CIO, cuyos genes presentan valores positivos de expresión estadísticamente aceptables respecto de la cepa silvestre. En el apartado siguiente se discutirá el comportamiento de esta oxidasa en todas las condiciones estudiadas en transcriptómica. Otro conjunto de genes afectado positivamente son los genes *hmfABC*, encargados de la conversión de ácido furoico en el intermediario del ciclo de Krebs 2-oxoglutarato. No existe una relación directa entre el metabolismo del cianuro y el de compuestos aromáticos. Sin embargo, si lo hay entre el metabolismo del carbono y la expresión de las oxidasas terminales. En *P. pseudoalcaligenes* se ha demostrado que la expresión de las oxidasas terminales varía en respuesta a furfurales (Tesis Doctoral D. Macías, 2014). Por lo tanto, la relación entre la expresión constitutiva de *cio1* y el metabolismo de furfurales podría tener una relación funcional. Por último, hay un conjunto de genes contiguos en el genoma, que aunque parecen no formar un operón según los datos aportados en el estudio transcriptómico, presentan valores negativos de expresión. Está descrito que el gen *hutC* en *P. putida*, codifica un represor (Allison y Phillips, 1990), y regula la expresión para la conversión de histidina a glutamato, amonio y formiato. Al igual que en *P. pseudoalcaligenes*, en *P. putida*, también se encuentran en el genoma próximos a *hutC* los genes *hutHUGI*.

### **Análisis de las oxidasas.**

#### **Operón *cio1*.**

Para el mutante T1 la regulación por cianuro fue negativa en este operón, al igual que en los demás genes de la región *cio1*. Esto se debe a la ausencia en este mutante del CIO, lo cual ya se puso de manifiesto en capítulos anteriores, que el CIO es esencial para el metabolismo del cianuro.

En el caso de la estirpe silvestre en medio suplementado con cianuro, en LB se observan mayores valores de sobreexpresión que en medio mínimo, pero en estos dos casos el efecto del cianuro es positivo, lo cual pone de manifiesto que la falta del operón *cio1* es lo que provoca la caída de expresión en el operón, y no la presencia de cianuro. Los valores de comparativa de medios dieron valores de una unidad, y por tanto, el medio no tiene ningún tipo de efecto en el comportamiento de este operón.

#### **Operón *cio2*.**

Ya se ha mencionado la gran variedad de oxidasas que tiene *P. pseudoalcaligenes* CECT5344. El operón *cio2* no parece tan esencial atendiendo a los valores obtenidos en transcriptómica, sobre todo en presencia del operón *cio1*. Los valores en presencia de cianuro son negativos, solamente estos valores se vuelven positivos en el mutante T1, en el cual el operón *cio1*, carece de funcionalidad, por ello, posiblemente, el operón *cio2* cubra las funciones de *cio1*.

En este operón si se aprecia una influencia del medio que no se observó en *cio1*, y es que en medio LB hay una sobreexpresión de este operón, y los valores de sobreexpresión con respecto al acetato fueron más altos para el LB que el alcohol furfúrico, lo cual parece indicar que la expresión de *cio2* depende de la fuente de carbono. De hecho, la expresión de *cio2* en respuesta cianuro es mayor en medio LB que en medio mínimo con acetato (resultados no mostrados). Por último, la expresión de *cio2* aumenta significativamente (10-20 veces) en un mutante Fur de esta misma bacteria (Tesis Doctoral G. Becerra, 2013).

### **Operón *cio3*.**

El comportamiento de este operón es muy similar al de *cio1*, observándose una sobreexpresión siempre que haya cianuro en el medio, excepto cuando *cio1* está inactivado funcionalmente, condición ante la cual, *cio3* también sufre una caída en sus niveles. Este hecho queda poco clarificado el posible papel de este operón, ya que actúa prácticamente en las mismas condiciones de *cio1*, lo cual pone de manifiesto que su comportamiento está relacionado con la funcionalidad del operón *cio1*.

Al igual que en el caso de *cio1*, el medio no es influyente en los niveles de expresión de *cio3*, ya que sólo hay una ligera caída de expresión en la comparativa del medio LB con respecto al medio mínimo, pero los valores no superan las dos unidades en valores absoluto, y los valores estadísticos en ningún caso fueron significativos en este tipo de comparativas.

### **Oxidasas *cbb3*.**

En ambos operones se observa hay una caída de expresión en presencia de cianuro, esté presente o no el operón *cio1*, aunque la caída es más acusada en la oxidasa *cco1* que en la oxidasa *cco2*, aunque en ningún caso son valores numéricos muy elevados. Lo único en lo que difieren estas dos oxidasas es la influencia del medio, mientras que en la comparativa del alcohol furfurílico con respecto al acetato no hay apenas diferencias significativas de expresión, en la comparativa del medio LB y el medio mínimo con acetato como fuente de carbono, las diferencias son muy acusadas, observándose valores de sobreexpresión en la oxidasa *cco2* y valores de caída de expresión en la oxidasa *cco1*.

### **Oxidasa *aa3*.**

Esta oxidasa tiene un comportamiento peculiar en presencia de cianuro, ya que presenta unos valores de sobreexpresión siempre que haya cianuro en el medio, tanto en ausencia como en presencia del operón *cio1*, aunque los valores son más elevados en la estirpe silvestre en presencia de cianuro en LB que en medio mínimo. Lo que sí es destacable en esta oxidasa es que mientras que el comportamiento es similar en medio mínimo y en medio LB, en alcohol

furfurílico con respecto al medio mínimo en acetato, los valores presentan una sobreexpresión muy acusada. Los furfurales son una fuente de carbono de una “calidad” parecida a la de los azúcares. De hecho, químicamente es arabinosa deshidratada y por lo tanto se podría especular que la oxidasa *aa3* es la empleada para fuentes de carbono ricas, aunque evidentemente esto habrá que demostrarlo con otras fuentes de carbono como la glucosa.

### **Ciclo de entner Doudoroff**

Al llevar a cabo los estudios transcriptómicos se observó una regulación de algunas enzimas de este ciclo en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344.

Desde hace varias décadas se ha estudiado la importancia de las diferentes rutas de utilización de carbohidratos en el género *Pseudomonas*, basándose principalmente en el comportamiento de mutantes deficientes en enzimas de la ruta. En general, las bacterias del género *Pseudomonas* utilizan pocos carbohidratos como fuente de carbono, entre estos se encuentra, glucosa, gluconato, 2-cetoglutarato, fructosa, sorbitol y manitol (Lessi y Phibbs, 1984) lo que indica un espectro muy reducido cuando se compara con otras especies, como *Escherichiac coli* que utilizan glucosa, gluconato, fructosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, arabinosa, sorbitol, manitol, galactitol, etc... Además la información sobre el metabolismo de carbohidratos se reducía al de la glucosa fundamentalmente en las cepas patógenas de la especie *P. aeruginosa* (Lessi y Phibbs, 1984).

Las *Pseudomonas* se caracterizan por usar la ruta Entner-Doudoroff descubierta en *Pseudomonas saccharophila* (Entner y Doudoroff, 1952; De Ley, 1960), en la que se obtiene gliceraldehído 3-fosfato y piruvato a partir de 6-fosfogluconato que es el intermediario clave (Blevins *et al.*, 1975, Entner y Doudoroff, 1952). La ruta de Entner-Doudoroff parte del 6-fosfogluconato que se convierte por la 6-fosfogluconato dehidratasa (Edd) en 2-ceto-deoxi-6-fosfogluconato (KDPG), el cual y por la acción de la 2-ceto-3-deoxi-6-

fosfogluconato aldolasa (Eda) da lugar al piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (Lessie y Phibbs, 1984), que se convierten posteriormente en intermediarios del ciclo de Krebs. En bacterias como *P. aeruginosa* y *P. putida*, los mutantes en la 6-fosfogluconato dehidratasa (Edd) son incapaces de crecer en glucosa, gluconato, 2-cetogluconato o manitol, pero crecen igual que la cepa silvestre en citrato, succinato o acetato (Blevins *et al.*, 1975). Recientemente se ha podido demostrar que un mutante en el gen *edd* de en *P. pseudoalcaligenes* tampoco es capaz de utilizar glucosa como fuente de carbono (Tesis Doctoral D. Macias, 2014).

En *E. coli* los genes *edd/eda* están cotranscritos y regulados por un miembro de la familia GntR de represores que responden al gluconato (Tong *et al.*, 1996). Del Castillo *et al.* en 2007 (del Castillo *et al.*, 2007) sugirió que la ruta de la glucoquinasa podía contribuir a la entrada de hasta el 40% de la entrada de glucosa en *P. putida*.

Del Castillo *et al.*, 2007, mostraron que todos los genomas secuenciados de *Pseudomonas* muestran la misma organización física de los operones *zwf/edd/pgl* y *eda/glk*, con el gen *hexR* transcrito divergentemente con respecto al promotor de *edd*. Velazquez *et al.*, 2004, mostraron que la inactivación del gen *eda* y la consecuente acumulación de KDPG dio lugar a la represión catabólica en la ruta de degradación del tolueno, mientras que este efecto no se observó en un mutante *edd* donde el 6-fosfogluconato es acumulado (del Castillo *et al.*, 2007). Por tanto, se demostró que el KDPG es esencial en el cruce de la regulación catabólica entre la ruta fosforilativa para el metabolismo de la glucosa y la ruta para el tolueno.

La proteína HexR modula la expresión de la ruta fosforilativa para el metabolismo de la glucosa en *P. putida* a través del reconocimiento del KDPG, un intermediario de la ruta de Entner-Doudoroff (Daddaoua *et al.*, 2009). Esta ruta es necesaria para el catabolismo de otros azúcares tales como la fructosa y gluconato y 2-cetogluconato.

El gen contiguo al gen *mocR* próximo al operón *cio1*, es una aldolasa que forma parte del ciclo de Krebs, y muestra una caída en ambos mutantes,

aunque los valores se encuentran en torno a dos unidades. En la estirpe silvestre en presencia de cianuro, los valores son de sobreexpresión, además son mucho más elevados en medio mínimo que en medio LB. En ninguno de los medios estudiados se observan diferencias en los valores.





# **CONCLUSIONES**



1. El tratamiento con cianuro y/o las mutaciones que afectan la expresión de los genes del operón *cio1* alteran la expresión de los operones que codifican las oxidasas terminales CIO y COX de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.
2. La disminución en la aireación y/o la transición desde la fase exponencial a la fase estacionaria del crecimiento alteran la expresión génica de los operones *cco2*, *cox* y *cio* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344.
3. Los operones *cio2* y *cio3* de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 complementan una mutación de *P. putida* que bloquea la expresión del CIO.
4. El operón *cio1* se transcribe en un mRNA de más de 16 Kb, abarcando 14 secuencias codificantes de proteínas, con una parada de transcripción intermedia que produce un primer transcrito de unas 5,5 Kb, no detectándose promotores internos adicionales.
5. El producto del gen *mocR* controla negativamente la expresión del operón *cio1* situado en su inmediata vecindad.
6. La mutación polar en el gen *nir/sir*, que bloquea la expresión del operón *cio1*, se manifiesta a nivel transcriptómico potenciando el efecto inductor del cianuro, mientras que la mutación de *mocR*, en medio LB, tiene escasas consecuencias sobre la regulación génica a escala global.



# **BIBLIOGRAFÍA**



**Adjei M.D. y Ohta Y. (1999)** Isolation and characterization of a cyanideutilizing Burkholderia cepacia strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **15**: 699–704.

**Adjei M.D. y Ohta Y. (2000)** Factors affecting the biodegradation of cyanide by Burkholderia cepacia strain C-3. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **3**: 274–277.

**Agrawal V, Cherian L. y Gupta V.K. (1991)** Extraction spectrophotometric method for the determination of hydrogen cyanide in environmental samples using 4-aminosalicylic acid. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **45**: 235–244.

**Akcil A. (2003)** Destruction of cyanide in gold mill effluents: biological versus chemical treatments. *Biotechnology Advances* **21**(6): 501-511.

**Aksu Z., Calik A., Dursun A.Y. y Demircan Z. (1999)** Biosorption of iron(III)–cyanide complex ions on *Rhizopus arrhizus*: application of adsorption isotherms. *Process Biochemistry*. **(34)** 483–491.

**Allen R.J., Brenner E.P., VanOrsdel C.E., Hobson J.J., Hearn D.J., Hemm M.R. (2014)** Conservation analysis of the CydX protein yields insights into small protein identification and evolution. *BMC Genomics*. **5**(15):946.

**Allison S. L. y Phillips A.T. (1990)** Nucleotide sequence of the gene encoding the repressor for the histidine utilization genes of *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* **172**(9): 5470-5476.

**Ander-Egg E. (1985)**. El desafío ecológico. Buenos Aires, Editorial Humanitas.

**Anders S. y Huber W. (2010)**. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* **11**(10): R106.

**Anderson P.M. (1980)**. Purification and properties of the inducible enzyme cyanase. *Biochemistry* **19**: 2882–2888.

**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.

**Arai H. (2011)** Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology* **2**: 103.

**Ashcroft J.R. y Haddock B.A. (1975)** Synthesis of alternative membrane bound redox carriers during aerobic growth of *Escherichia coli* in the presence of potassium cyanide. *Biochemical journal* **148**: 349-352.

**ATSDR. (2006)** Toxicological profile for cyanide. P.H.S U.S. Department of Health and human Services, Editor. (Atlanta).

**Augugliaro V., Gálvez J., Blanco Vázquez J., Cáceres López E., García Loddó V., Muñoz M.J., Blanco Vázquez J., Cáceres López E., García Loddó V., Muñoz, M. J., López Rodríguez S., Malato Marcì G., Palmisano L. y Schiavello, M. (1999)** Photocatalytic oxidation of cyanide in aqueous TiO<sub>2</sub> suspensions irradiated by sunlight in mild and strong oxidant conditions. *Catalysis Today* **54**(2-3): 245-253.

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

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

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

**Batut J., Daveran-Mingot M.L., David M., Jacobs J., Garnerone A.M., y Kahn D. (1989)** fixK, a gene homologous with fnr and crp from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO Journal* **8**: 1279-1286.

**Beard J. (2006)** DDT and human health. *Science Total Environmental* **355**: 78-89.

**Becerra G., Blasco R., Quesada A., Merchán F., y Igeno M.I. (2011)** Role of Fur on cyanide tolerance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Biochemical Society Transactions* **39**(6): 1854-1858.

**Becerra G., Blasco R., Merchan F., y Igeño M.I. (2014)** Characterization of a ferric uptake regulator (Fur)-mutant of the cyanotrophic bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Journal of Biotechnology*.

**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.

**Becker C.D. y Thatcher T.O. (1973)** Cyanurates and cyanides. In Toxicity of Power Plank Chemicals fo Aquafic Life, Report Wash 1249. J1-J13.



**Bergey D.H., Garrity G.M., Krieg N.R. y Staley J.T. (2005)** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer (New York).

**Bergquist A., Eakin E.A., Eakin R.T. y Wagner R.P. (1974)** Growth, respiratory and cytochrome characteristics of certain of the isoleucine valine mutants of *Neurospora crassa*. *Biochemical Genetics* **12**: 39-49.

**Bestwick L.A., Gronning L.M., James D.C., Bones A. y Rossiter J.T. (1993)** Purification and characterization of a nitrilase from *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum* **89**: 811-816.

**Blevins W.T., Feary T.W. y Phibbs P.V. (1975)** 6-Phosphogluconate dehydratase deficiency in pleiotropic carbohydrate-negative mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Bacteriology* **121**(3): 942-949.

**Blumenthal S.G., Hendrickson H.R., Abrol Y.P. y Conn E.E. (1968)** Cyanide metabolism in higher plants. 3. The biosynthesis of  $\beta$ -cyanolanine. *Journal of Biological Chemistry* **243**: 5302-5307.

**Bork P. y Koonin E.V. (1994)** A new family of carbon-nitrogen hydrolases. *Protein Science* **3**(8): 1344-1346.

**Borisov V.B., Gennis R.B., Hemp J., Verkhovsky M.I. (2011)** The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1807:1398-413.

**Bosma G., Braster M., Touthamer 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**(3): 657-663.

**Botz M.M. (2001)** Overview of Cyanide Treatment Methods, Mining Environmental Management. *Mining Journal Ltd.*: 28–30 (London).

**Bouwer E.J. (1992)** in Environmental Microbiology (Mitchell, R.,cd.). John Wiley & sons. 287-318.

**Bouwer E.J. y Zehnder A. J. B.(1993)** Bioremediation of organic compounds — putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology* **11** (8): 360-367

**Bowdre J.H. y Krieg N.R. (1974)** Wafer Quality Monitoring: Bacteria as Indicators. Virginia Polytechnic Institute and State University (Blacksburg). Report PB-237061.

**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.

**Brady D., Beeton A., Zeevaart J., Kgaje C., Van Rantwijk F. y Sheldon R.A. (2004)** Characterisation of nitrilase and nitrile hydratase biocatalytic systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**(1): 76-85.

**Britton L.N. (1984)** in Microbial Degradation of Organic Compounds. Gibson, D.T., ed.:89-129, Marcel Dekker.

**Brown G.C., McBride A.G., Fox E.J., McNaught K.S.P. y Borutaite V. (1997)** Nitric oxide and oxygen metabolism. *Biochemical Society Transactions* **25**: 901–904.

**Brysk M. M., Corpe W.A. y Hanks L.V. (1969)**  $\beta$ -Cyanoalanine Formation by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Bacteriology* **97**: 322-327.

**Buell C.R., Joardar V., Lindeberg M., Selengut J., Paulsen I.T., Gwinn M.L., Dodson R.J., Deboy R.T., Durkin A.S., Kolonay J.F., Madupu R., Daugherty S., Brinkac L., Beanan M. J., Haft D. H., Nelson W.C., Davidsen T., Zafar N., Zhou L., Liu J., Yuan Q., Khouri H., Fedorova N., Tran B., Russell D., Berry K., Utterback T., Van Aken S.E., Feldblyum T.V., D'Ascenzo M., Deng W.L., Ramos A.R., Alfano J.R., Cartinhour S., Chatterjee A.K., Delaney T.P., Lazarowitz S.G. Martin, G.B., Schneider, D.J., Tang X., Bender C.L., White O., Fraser C.M. y Collmer A. (2003)** The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100**(18): 10181-10186.

**Bustin S.A. (2002)** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* **29**(1): 23-39.

**Bustin S.A. y Nolan T. (2004a)** Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR. In: Real-Time PCR; An Essential Guide. K.J.Edwards et al.,editors. *Horizon Bioscience Wymondham*: 125-184.

**Cardenas J. (1988)** Espectroscopia ultravioleta-visible de compuestos biológicos. Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba. Obra social y cultural, 1ª ed. (Córdoba).

**Castric P.A. y Strobel G.A. (1969)** Cyanide metabolism by *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry* **244**: 4089-4094.

**Castric P.A. y Conn E.E. (1971)** Formation of  $\beta$ -cyanoalanine by O-acetylserine sulfhydrylase. *Journal of bacteriology* **108**: 132-136.

**Chemical Market Reporter (1998)** Weekly Magazine.

**Chinaka S., Takayama N., Michigama Y. y Uneda K. (1998)** Simultaneous determination of cyanide and thiocyanate in blood by ion chromatography with fluorescence and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* **713**: 353–359.

**Choi K-H., Kumar A. y Scheweizer H.P. (2006)** A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of Microbiological Methods* **64**(3): 391-397.

**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**(3): 755-768.

**Comolli J.C. y Donohue T.J. (2004)** Differences in two *Pseudomonas aeruginosa* *cbb3* cytochrome oxidases. *Molecular Microbiology* **51**(4): 1193-1203.

**Cooper M., Tavankar G.R. y Williamns H.D. (2003)** Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **149**(Pt 5): 1275-1284.

**Crane B.R. y Getzoff E.D. (1996)** The relationship between structure and function for the sulfite reductases. *Current Opinion in Structural Biology* **6**(6): 744-756.

**Cunningham L. y Williams H.D. (1995)** Isolation and characterization of mutants defective in the cyanide-insensitive respiratory pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **177**(2): 432-438.

**Cunningham L., Pitt M. y Williams H.D. (1997)** The *cioAB* genes from *Pseudomonas aeruginosa* code for a novel cyanide-insensitive terminal oxidase related to the cytochrome *bd* quinol oxidases. *Molecular Microbiology* **24**(3): 579-591.

**D'Mello R., Hill S. y Poole R.K. (1995)** The oxygen affinity of cytochrome *bo3* in *Escherichia coli* determined by the deoxygenation of oxyleghemoglobin and oxymyoglobin:  $K_m$  values for oxygen are in the submicromolar range. *Journal of Bacteriology* **177**(3): 867-870.

**D'Mello R., Hill S. y Poole R.K. (1996)** The cytochrome *bd* quinol oxidase in *Escherichia coli* has an extremely high oxygen affinity and two oxygen-binding haems: implications for regulation of activity in vivo by oxygen inhibition. *Microbiology* **142** (4): 755-763.

**Daddaoua A., Krell T. y Ramos J.L. (2009)** Regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas*: the phosphorylative branch and entner-doudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. *Journal of Biology and Chemistry* **284**(32): 21360-21368.

**Dash R.R., Balomajumder C. y Kumar A. (2008)** Treatment of metal cyanide bearing wastewater by simultaneous adsorption and biodegradation (SAB). *Journal of Hazardous Materials* **152**(1): 387-396.

**Dash R.R., Gaur A y Balomajumder C. (2009)** Cyanide in industrial wastewaters and its removal: A review on biotreatment. *Journal of Hazardous Materials* **163**(1): 1-11.

**de Gier, J.-W. L., Schepper M., Reijnders W.N.M., Van Dyck S.H., Slotboom D.J., Warne A., Saraste M. Krab k., Finel M., Stouthamer A.H. Van Spanning R.J.M y Van der Oost J. (1996)** Structural and functional analysis of aa3-type and cbb3-type cytochrome c oxidases of *Paracoccus denitrificans* reveals significant differences in proton-pump design. *Molecular Microbiology* **20**(6): 1247-1260.

**de Gier J.W., Lubben M., Reijnders W.N., Tipker C.A., Slotboom D.J., Van Spanning R.J., Stouthamer A.H. y Van der Oost J. (1994)** The terminal oxidases of *Paracoccus denitrificans*. *Molecular Microbiology* **13**(2): 183-196.

**De Ley J. (1960).** Comparative carbohydrate metabolism and localization of enzymes in *Pseudomonas* and related microorganisms. *Journal of Applied bacteriology* **23**: 400-441.

**de Lorenzo V., Eltis L., Kessler B. y Timmis K.N. (1993)** Analysis of *Pseudomonas* gene products using lacIq/P<sub>trp</sub>-lac plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. *Gene* **123**: 17-24.

**Dejonghe W., Maertens S., Verstraete W. y Top E.M. (2001)** Rhizoremediation of a 3,4-dichloroaniline contaminated soil. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet* **66**(4): 97-99.

**del Castillo T., Ramos J.L. Rodríguez-Herva J.J., Fuhrer T., Sauer U. y Duque E. (2007)** Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis. *Journal of Bacteriology* **189**(14): 5142-5152.

**Delwiche C.C. (1981)** Denitrification, Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide.

**Department of Interior U.S. (2001)** Cyanide Fact Sheet. Bureau of Reclamation, Technical Service Center, Water Treatment Engineering and Research Group:1-4.

**Desai J.D. y Ramakrishna C. (1998)** Microbial degradation of cyanides and its commercial application. *Journal of Scientific and Industrial Research*. **57**: 441–453 (India).

**Deschenes G. y Goo H. (2005)** Cyanidation of Gold course notes. Mining and Mineral Sciences Laboratories.

**Dhillon A., Goswami S., Riley M., Teske A. y Sogin M. (2005)** Domain evolution and functional diversification of sulfite reductases. *Astrobiology* **5**(1): 18-29.

**DiPalma J.R. (1971)** Noxious gases and vapours: carbon monoxide, cyanides, methemoglobin and sulfhemoglobin. In *Drill's Pharmacology in Medicine*. McGraw-Hill.: 1189-1205 (New York).

**Dua M., Singh A., Sethunathan N. y Johri A.K. (2002)** Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied of Microbiology and Biotechnology* **59**(2-3): 143-152.

**Dubey S.K. y Holmes D.S. (1995)** Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **11**: 257–265.

**Dumestre A., Chone T., Portal J.-M., Gerard M. y Berthelin J. (1997)** Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soils. *Applied Environmental Microbiology*. **63**: 2729–2734.

**Dunnill P.M. y Fowden L. (1965)** Enzymatic formation of  $\beta$ -cyanoalanine from cyanide by *Escherichia coli* extracts. *Nature* **208**: 1206-1207.

**Ebbs S. (2004)** Biological degradation of cyanide compounds. *Current Opinion of Biotechnology* **15**: 1-6.

**Edwards K.J., Logan J. y Saunders N. (2004)** Real-Time PCR; An Essential Guide. *Horizon Bioscience Wymondham*.

**Entner N. y Doudoroff M (1952)** Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Biological Chemistry* **196**(2): 853-862.

**Environmental and Safety Incidents concerning Tailings Dams at Mines (1996)** Results of a Survey for the years 1980-1996 by Mining Journal Research Services; a report prepared for United Nations Environment Programme, Industry and Environment external link. 129 pages (París).

**Espie G.S., Jalali F., Tong T., Zacal N.J. y So A. K.-C. (2007)** Involvement of the *cynABDS* operon and the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in the light-

dependent transport and metabolism of cyanate by cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*. **189**: 1013–1024.

**Estepa J., Luque-Almagro V.M., Manso I., Escribano M.P., Martínez-Luque M., Castillo F., Moreno-Vivian C. y Roldan M.D. (2012)** The *nit1C* gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involved in assimilation of nitriles is essential for growth on cyanide. *Environmental Microbiology Report* **4**(3): 326-334.

**Esteve-Nunez A., Lucchesi G., Philipp B., Schink B., y Ramos J.L. (2000)** Respiration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JLR11. *Journal of Bacteriology* **182**(5): 1352-1355.

**Evans W.C. y Fuchs G. (1988)** *Annual Review of Microbiology*. **42**: 263-287.

**Fang F.C. (2004)** Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Review Microbiology* **2**(10): 820-832.

**Farrar J.A., Neese F., Lappalainen P., Kroneck P.M.H, Saraste M., Zumft W.G. y Thomson A.J. (1996)** The electronic structure of CuA: a novel mixed-valance dinuclear copper electron transfer center. *Journal of the American Chemical Society* **118** 11501–11514.

**Fasset D.W., Fasset D.W. y Irish D.D. (1963)** Cyanides and nitriles. In *Industrial Hygiene and Toxicology*. John Wiley & Sons. **2**: 1991-2036 (New York).

**Fernandez-Pinar R., Ramos J.L., Rodriguez-Herva J.J. y Espinosa-Urgel M. (2008)** A two-component regulatory system integrates redox state and population density sensing in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* **190**(23): 7666-7674.

**Finkel S.E. y Johnson R.C. (1993)** The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Molecular Microbiology* **7**(6): 1023.

**Flory J.E. y Donohue T.J. (1997)** Transcriptional control of several aerobically induced cytochrome structural genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* **143** (10): 3101-3110.

**Floss H.G., Hadwiger L. y Conn E.E. (1965)** Enzymatic formation of  $\beta$ -cyanoalanine from cyanide. *Nature* **208**: 207-208.

**Franklin F.C, Bagdasarian M., Bagdasarian M.M. y Timmis K.N. (1981)** Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 7458-7462.

**Fry J.C., Gadd G.M., Herbert R.A., Jones C.W y Watson-Craik I.A. (1992)** Microbial control of pollution. Cambridge Univ. Press 343 pags.

**Fujita Y., Fujita T., Miwa Y., Nihashi J. y Aratani Y. (1986)** Organization and transcription of the gluconate operon, gnt, of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* **261**(29): 13744-13753.

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

**Galan E. (2000)**. The role of clay minerals in removing and immobilising heavy metals from contaminated soils. *In Proceedings of the 1st Latin American Clay Conference*. 351-361.

**Gallagher L.A. y Manoil C. (2001)** *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *Journal of Bacteriology* **183**(21): 6207-6214.

**Ganczarczyk J.J., Takoaka P.T. y Ohashi D.A. (1985)** Application of polysulfide for pretreatment of spent cyanide liquors. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **57**: 1089-1093

**Garcia-Horsman J.A., Barquera B., Rumbley J., Ma J. y Gennis R.B. (1994)** The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *Journal of Bacteriology* **176**(18): 5587-5600.

**Garcia-Horsman J.A., Berry E., Shapleigh J.P., Alben J.O. y Gennis R.B. (1994a)** A novel cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* that lacks CuA. *Biochemistry* **33** 3113– 3119.

**Giglio S., Monis P.T. y Saint C.P. (2003)** Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research* **31**(22): e136.

**Glass D.J. (2000)** Economic potential of phytoremediation In: phytoremediation of toxic metals\_using plants to clean up the environment. John Wiley and Sons, **7**: 15-33.

**Gonçalves M.M.M., Pinto A.F. y Granato M. (1998)** Biodegradation of free cyanide, thiocyanate and metal complexed cyanides in solutions with different compositions. *Environmental Technology*. **19**: 133–142.

**Gray K.A., Grooms M., Myllykallio H., Moomaw C., Slaughter C. y Daldal F. (1994)** *Rhodobacter capsulatus* contains a novel cb-type cytochrome c oxidase without a CuA center. *Biochemistry* **33**(10): 3120-3127.

**Green G.N., Kranz J.E. y Gennisa R.B (1984)** Cloning the *cyd* gene locus coding for the cytochrome *d* complex of *Escherichia coli*. *Gene* **32**(1–2): 99-106.

**Greenwood N.N. y Earnshaw A. (1997)** Chemistry of the elements (2<sup>a</sup> ed.). Oxford: Butter-worth- Heinemann. ISBN 0-7506-3365-4.

**Guilloton M., Korte J., Lamblin A.F., Fuchs J.A. y Anderson P.M (1992)** Carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. **267**: 3731–3734.

**Hao W. y Golding G.B. (2006)** Asymmetrical evolution of cytochrome *bd* subunits. *Journal Molecular Evolution* **62**(2): 132-142.

**Harano Y., Suzuki I., Maeda S., Kaneko T., Tabata S. y Omata T. (1997)** Identification and nitrogen regulation of the cyanase gene from the cyanobacteria *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 and *Synechococcus sp.* strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology* **179**(18): 5744-5750.

**Harris R.E. y Knowles C.J. (1983)** Isolation and growth of a *Pseudomonas sp.* that utilizes cyanide as a source of nitrogen. *Journal of General Microbiology* **129**:: 1005–1011.

**Harris R.E. y Knowles C.J. (1983a)** The conversion of cyanide to ammonia by extracts of a strain of *Pseudomonas fluorescens* that utilizes cyanide as source of nitrogen for growth. *FEMS Microbiology Letters* **20**: 337– 341.

**Harrison S.C. (1991)** A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* **353**(6346): 715-719.

**Haydon D.J. y Guest J.R. (1991)** A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiology Letters* **63**(2-3): 291-295.

**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.

**Heid C.A., Stevens J., Livak K.J. y Williams P.M. (1996)** Real time quantitative PCR. *Genome Research* **6**(10): 986-994.

**Hendrickson H.R. y Conn E.E. (1969)** Cyanide metabolism in higher plants. IV. Purification and properties of the  $\beta$ -cyanolanine synthase of blue lupine. *The journal of Biological Chemistry* **244**: 2632-2640.

**Hill B.C. (1993)** The sequence of electron carriers in the reaction of cytochrome *c* oxidase with oxygen. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **25**(2): 115-120.



**Hill J., Goswitz V.C., Calhoun M., Garcia-Horsman J.A., Lemieux L., Alben J.O. y Gennis R.B. (1992)** Demonstration by FTIR that the *bo-type* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* contains a heme-copper binuclear center similar to that in cytochrome *c* oxidase and that proper assembly of the binuclear center requires the *cyoE* gene product. *Biochemistry* **31**: 11435–11440.

**Holliger C., Schraa G., Stams A.J.M. y Zehnder A.J.B. (1992)** Applied *Environmental Microbiology*. **58**: 1636-1644.

**Hook R.H. y Robinson W.G. (1964)** RICININE NITRILASE. II. PURIFICATION AND PROPERTIES. *Journal of Biological Chemistry* **239**: 4263-4267.

**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**(1–3): 72-78.

**Hyatt D., Chen G.L., Locascio P.F., Land M.L., Larimer F.W. y Hauser L.J. (2010)** Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* **11**: 119.

**Iwamoto T. y Nasu M. (2001)** Current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**(1): 1-8.

**Jackson R.J., Elverss K.T., Lee L.J., Gidley M.D., Wainwright L.M., Lightfoot J., Park S.F. y Poole R.K. (2007)** Oxygen reactivity of both respiratory oxidases in *Campylobacter jejuni*: the *cydAB* genes encode a cyanide-resistant, low-affinity oxidase that is not of the cytochrome *bd* type. *Journal of Bacteriology* **189**(5): 1604-1615.

**Jamir Y., Guo M., Oh H.S., Petnicki-Ocwieja T., Chen S., Tang X., Dickman M.B., Collmer A. y Alfano J.R. (2004)** Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant Journal* **37**(4): 554-565.

**Johnson W.C. y Anderson P.M. (1987)** Bicarbonate is a recycling substrate for cyanase. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 9021-9025.

**Junemann S. y Wrigglesworth J.M. (1995)** Cytochrome *bd* oxidase from *Azotobacter vinelandii*. Purification and quantitation of ligand binding to the oxygen reduction site. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 16213-16220.

**Junemann S. (1997)** Cytochrome *bd* terminal oxidase. *Biochimical and Biophysical Acta* **1321**(2): 107-127.

**Junker F., Rodríguez-Herva J.J., Duque E., Ramos-González M., Llamas M. y Ramos J.L. (2001)** A WbpL mutant of *Pseudomonas putida* DOT-T1E strain, which lacks the O-antigenic side chain of lipopolysaccharides, is tolerant to organic solvent shocks. *Extremophiles* **5**: 93-99.

**Kalb J.R., Vernon F. y Bernlohr R.W. (1977)** A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts. *Analytical Biochemistry* **82**(2): 362-371.

**Kamaludeen SPBK., Arunkumar K.R., Avudainayagam S. y Ramasamy K. (2003)** Bioremediation of chromium contaminated environments. *Indian Journal of Experimental Biology* **41**: 972-985.

**Kao C.M., Chem K.F., Liu J.K., Chou S.M., y Chen S.C. (2006)**. Enzymatic degradation of nitriles by *Klebsiella oxytoca*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**: 228–233.

**Kato Y. y Asano Y. (2005)** Purification and characterization of aldoxime dehydratase of the head blight fungus, *Fusarium graminearum*. *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry* **69**(11): 2254-2257.

**Kato Y., Yoshida S. y Asano Y. (2005)** Polymerase chain reaction for identification of aldoxime dehydratase in aldoxime- or nitrile-degrading microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* **246**(2): 243-249.

**Katz M. (1968)** Analysis of inorganic gaseous pollutants. In Air Pollution, Vol.2, Analysis, Monitoring and Surveying, 2nd edn, ed Stern, A.C.:684 (New York)

**Kaul P., Banerje A., Mayilraj S. y Banerjee U.C. (2004)** Screening for enantioselective nitrilases: kinetic resolution of racemic mandelonitrile to (R)-(-)-mandelic acid by new bacterial isolates. *Tetrahedron Asymmetry* **15**: 207-211.

**Kawakami T., Kuroki M., Ishii M., Igarashi Y. y Arai H. (2010)** Differential expression of multiple terminal oxidases for aerobic respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* **12**(6): 1399-1412.

**Kelada N.P. (1989)** Automated direct measurements of total cyanide species and thiocyanate and their distribution in wastewater and sludge. *Journal Water Pollution Control Federation*. **61**: 350–356.

**Kelly M.J., Poole R.K., Yates M.G. y Kennedy C. (1990)** Cloning and mutagenesis of genes encoding the cytochrome *bd* terminal oxidase complex in *Azotobacter vinelandii*: mutants deficient in the cytochrome *d* complex are unable to fix nitrogen in air. *Journal of Bacteriology* **172**: 6010-6019.

**Kerstens K., Ludwig W., Vancanneyt M., De Vos P., Gillis M. y Schleifer K-H. (1996)** Recent Changes in the Classification of the *Pseudomonads*: an Overview. *Systematic and Applied Microbiology* **19**(4): 465-477.

**Keshav P.S, Nand K.S. y Shivesh S. (2010)** Bioremediation: Developments, Current Practices and Perspectives.

**Kitisa M., Karakayaa E., Yigita N.O., Civelekoglua G. y Akcilb A. (2005)** Heterogeneous catalytic degradation of cyanide using copper-impregnated pumice and hydrogen peroxide. **39**: 1652–1662.

**Knowles C.J. (1976)** Microorganisms and cyanide. *Bacteriological Reviews*. (40): 652-680.

**Knowles C.J. y Bunch A.W. (1986)** Microbial cyanide metabolism. *Advances in Microbial Physiology* **27**: 73-111.

**Ko T.P., Wu S.P., Yang W.Z., Tsai H. y Yuan H.S. (1999)** Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the *Escherichia coli* tyrosine aminotransferase. *Acta Crystallographica D Biol Crystallographica* **55**(8): 1474-1477.

**Kobayashi M. y Shimizu S. (2000)** Nitrile hydrolases. *Current Opinion in Chemical Biology* **4**(1): 95-102.

**Koopman F., Wierckx N., de Winde J.H. y Ruijsenaars H.J. (2010).** Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**(11): 4919-4924.

**Kowalska M., Bodzek M. y Bohdziewicz J. (1998)** Biodegradation of phenols and cyanides using membranes with immobilized organisms. *Process Biochemical* **33** 189–197.

**Kunz D.A. y Nagappan O. (1989)** Cyanase-mediated utilization of cyanate in *Pseudomonas fluorescens* NCIB 11764. *Applied Environmental Microbiology* **55**(1): 256-258.

**Kunz D.A., Wang C.-S y Che J.L. (1994)** Alternative routes of enzymatic cyanide metabolism in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Microbiology* **140**: 1705–1712.

**Lamblin A.F. y Fuchs J.A. (1994)** Functional analysis of the *Escherichia coli* K-12 cyn operon transcriptional regulation. *Journal of Bacteriology* **176**(21): 6613-6622.

**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. et al. (2007)** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **21**: 2947-2948.

**Lauinger C. y Ressler C. (1970)**  $\beta$ -cyanoalanine as a substrate for asparaginase. Stoichiometry, kinetics, and inhibition. *Biochimical and Biophysics Acta* **198**: 316-323.

**Lauraeus M. y Wikström M. (1993)** The terminal quinol oxidases of *Bacillus subtilis* have different energy conservation properties. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 11470–11473.

**Lee S.Y. (1996)** Plastic bacteria. Progress and prospects for polyhydroxyalkanoates production in bacteria. *Trends in Biotechnology*. **14**:431-438.

**Lee M.A., Squirrell D.J., Leslie D.L. y Brown T. (2004)** Homogeneous Fluorescent Chemistries. In: Real-Time PCR; An Essential Guide. *Horizon Bioscience. Wymondham*: 31-70.

**Lee D.G., Urbach J.M., Wu G., Liberati N.T., Feinbaum R.L., Miyata S., Diggins L.T., He J., Saucier M., De´ziel E., Friedman L., Li L., Grills G., Montgomery K., Kucherlapati R., Rahme L.G. y Ausubel F.M. (2006)** Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology*:7.

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

**Logsdon M.J., Iagelstein K.I. y Mudder T.I. (2001)** The management of cyanide in gold extraction. *International council on metals and the environment*.

**Lokhande P.B., Patil V.V. y Mujawar H.A. (2009)** Multivariate statistical study of seasonal variation of BTEX in the surface water of Savitri River. *Environmental Monitoring and Assessment* **157**(1-4): 51-61.

**Lopez O., Morera C., Miranda-Rios J., Girard L., Romero D. y Soberon M. (2001)** Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli*: role of FnrN in *fixNOQP* expression and in symbiotic nitrogen fixation. *Journal of Bacteriology* **183**: 6999–7006.

**Ludwig B. y Schatz G. (1980)** A two-subunit cytochrome *c* oxidase (cytochrome aa3) from *Paracoccus denitrificans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **77**(1): 196-200.

**Luque-Almagro V.M., Blasco R., Fernandez-Romero J.M. y de Castro M.D. (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., Martínez-Luque M., Moreno-Vivián 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 Environmental Microbiology* **71**(2): 940-947.

**Luque-Almagro V.M., Blasco R., Huertas M.J., Martínez-Luque M., Moreno-Vivián C., Castillo F. y Roldán M.D. (2005a)** Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Biochemical Society Transactions* **33**(Pt 1): 168-169.

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

**Luque-Almagro V.M., Merchan F, Blasco R, Igeno M.I., Martínez-Luque M., Moreno-Vivian C., Castillo F. y Roldan M.D. (2011)** Cyanide degradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 involves a malate:quinone oxidoreductase and an associated cyanide-insensitive electron transfer chain. *Microbiology* **157**(Pt 3): 739-746.

**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.

**Luthy R.G. y Bruce S.G. (1979)** Kinetics of reaction of cyanide and reduced sulfur species in aqueous solution. *Environmental Science and Technology* **13**: 1481–1487.

**Ma J. y Purnendu K.D. (2010)** Temperature dependence of Henry's law constant for hydrogen cyanide. Generation of trace standard gaseous hydroge cyanide. *Environmental Science Technology*. **44**:: 3028-3034.

**Madison L.L. y Huisman G.W. (1999)** Metabolic Engineering of poly(3-hydroxyalkanoates):from DNA to plastic. **63**:21-53.

**Magarvey N., He J., Aidoo K.A. y Vining L.C. (2001)** The pdx genetic marker adjacent to the chloramphenicol biosynthesis gene cluster in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: functional characterization. *Microbiology* **147**(Pt 8): 2103-2112.

**Malatesta F., Antonini G., Sarti P. y Brunori M. (1995)** Structure and function of a molecular machine: cytochrome c oxidase. *Biophysical Chemistry* **54**(1): 1-33.

**Mandon K., Kaminski P.A., y Elmerich C. (1994)** Functional analysis of the fixNOQP region of *Azorhizobium caulinodans*. *Journal of Bacteriology* **176**: 2560–2568.

**Maseda C., Matsubara K. y Shiono H. (1989)** Improved gas chromatography with electron-capture detection using a reaction pre-column from the determination of blood cyanide: a higher content in the left ventricle of fire victims. *Journal of Chromatography* **490**: 319–327.

**Mateo C., Chmura A., Rustler S., van Rantwijk F., Stolz A. y Sheldon R.A. (2006)** Synthesis of enantiomerically pure (S)-mandelic acid using an oxynitrilase-nitrilase bienzymatic cascade: a nitrilase surprisingly shows nitrile hydratase activity. *Tetrahedron: Asymmetry* **17**: 320-323.

**Maruyama A., Ishizawa K, Takagi T y Esashi Y. (1998)** Cytosolic beta-cyanoalanine synthase activity attributed to cysteine synthases in cocklebur seeds. Purification and characterization of cytosolic cysteine synthases. *Plant & cell physiology* **39** (7): 671-80.

**Matsushita K., Yamada M., Shinagawa E., Adachi O. y Ameyama M. (1983)** Membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas aeruginosa* grown aerobically. A KCN-insensitive alternate oxidase chain and its energetics. *Journal of Biochemistry* **93**: 1137–1144.

**McDonald A.E. y Vanlerberghe G.C. (2005)** Alternative oxidase and plastoquinol terminal oxidase in marine prokaryotes of the Sargasso Sea. *Gene* **349**: 15-24.

**Mena K.D. y Gerba C.P. (2009)** Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **201**(2009): 71–115.

**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.

**Migula W. (1985)** Ueber ein neues System der Bakterien. Arb. Bakteriolog. Inst. Technisch. Hochsch. Karlsruhe **1**: 235-238.

**Milano T., Contestabile R., Lo Presti A., Ciccozzi M. y Pascarella S. (2015)** The aspartate aminotransferase-like domain of Firmicutes MocR transcriptional regulators. *Computational Biology and Chemistry* **21**(58):55-61.

- Miller M.J. y Gennis R.B. (1983)** The purification and characterization of the cytochrome *d* terminal oxidase complex of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Journal of Biological Chemistry* **258**: 9159-9165.
- Miller A.G. y Espie G.S. (1994)** Photosynthetic metabolism of cyanate by the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. *Archives of Microbiology* **162**: 151–157.
- Milosavljevic E.B., Solujic L. y Hendrix J.L. (1995)** Rapid distillationless "free cyanide" determination by a flow injection ligand exchange method. *Environmental Science and Technology* **29**: 426–430.
- Mohn W.W. y Tiedje J.M. (1991)** *Archives of Microbiology* **157**:151-156.
- Mooney R.B. y Quin J.P. (1965)** Alkali metal cyanides. *In Encyclopaedia of Chemical Technology*: 585-560. John Wiley 588s Sons (New York).
- Morales G., Ugidos A. y Rojo F. (2006)** Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome *o* ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and *cbb<sub>3</sub>-1* terminal oxidases. *Environmental Microbiology* **8**(10): 1764-1774.
- Morrison G.R. (1971)** Microchemical determination of organic nitrogen with Nessler reagent. *Analytical Biochemistry* **43**: 527-532.
- Mouncey N.J. y Kaplan S. (1998)** Oxygen regulation of the *ccoN* gene encoding a component of the *cbb<sub>3</sub>* oxidase in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1T: involvement of the FnrL protein. *Journal of Bacteriology* **180**(8): 2228-2231.
- Mudder T. y Smith A. (2001)**. The cyanide compendium. *Mining Journal Books* (London).
- Mudder T.I., Botz M.M. y Smith A. (2001)** Chemistry and treatment of cyanidation wastes. *Mining Journal Books Ltd* (London).
- Mudder T.I. y Botz M.M. (2004)** Cyanide and society: a critical review. *The european Journal of Mineral Processing and Environmental Protection* **4**(1, 1303-0868): 62-74.
- Nelson K.E., Weinel C., Paulsen I.T., Dodson R.J., Hilbert H., Martins dos Santos V.A., Fouts D.E., Gill S.R., Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., DeBoy R.T., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Chris Lee P., Holtzapple E., Scanlan D., Tran K., Moazzez A., Utterback T., Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Hoheisel J., Straetz M., Heim S., Kiewitz C., Eisen J.A., Timmis K.N., Düsterhöft A., Tümmler B., Fraser C.M.(2002)** Complete genome sequence and comparative analysis of the

metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **4**(12): 799-808.

**Ochsner U.A., Johnson Z. y Vasil M.L. (1999)** Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**(1): 185-198.

**Oh J.-I. y Kaplan S. (1999)** The *cbb3* Terminal Oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: Structural and Functional Implications for the Regulation of Spectral Complex Formation†. *Biochemistry* **38**(9): 2688-2696.

**Olivera E.R., Carnicero D., Jodra R., Minambres B., Garcia B., Abraham G.A., Gallardo A., Roman J.S., Garcia J.L., Naharro G. y Luengo J.M. (2001)** Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environmental Microbiology* **3**(10): 612-618.

**Otten M.F., van der Oost J., Reijnders W.N., Westerhoff H.V., Ludwig, B. y Van Spanning R.J. (2001)** Cytochromes *c<sub>550</sub>*, *c<sub>552</sub>*, and *c<sub>1</sub>* in the Electron Transport Network of *Paracoccus denitrificans*: Redundant or Subtly Different in Function. *Journal of Bacteriology* **183**: 7017-7026.

**Otten M.F., Stork D.M., Reijnders W.N., Westerhoff H.V. y Van Spanning R.J. (2001a)** Regulation of expression of terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*. *European Journal of Biochemistry* **268**(8): 2486-2497.

**Pabo C.O. y Sauer R.T. (1984)** Protein-DNA recognition. *Annual Review Biochemistry* **53**: 293-321.

**Pabo C.O. y Sauer R.T. (1992)** Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annual Review Biochemistry* **61**: 1053-1095.

**Pace H.C. y Brenner C. (2001)** The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biology* **2**(1): REVIEWS0001.

**Palleroni N.J., Ballard R.W., Ralston E., y Doudoroff M. (1972)** Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *Journal Bacteriology* **110**: 1-11.

**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.

**Palleroni N.J. (1992)** Present situation of the taxonomy of aerobic pseudomonads. *Pseudomonas: Molecular Biology and biotechnolgy*: 105-115 (Washington).

**Palleroni N.J. (2003)** Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology*. **149**: 1-7.



- Parga J.R., Shukla S.S., y Carrillo-Pedroza F.R. (2003)** Destruction of cyanide waste solutions using chlorine dioxide, ozone and titania sol. *Waste Management* **23**(2): 183-191.
- Parkhill J., Wren B.W., Mungall K., Ketley J.M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R.M., Feltwell T., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Moule S., Pallen M.J., Penn C.W., Quail M.A., Rajandream M.A., Rutherford K.M., Van Vliet A.H., Whitehead S. y Barrell B.G. (2000)** The genome sequence of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature Biotechnology* **403**: 665–668.
- Patil Y.B. y Paknikar K.M. (2000)** Development of a process for biodegradation of metal cyanides from waste waters. *Process Biochemistry* **35**(10): 1139-1151.
- Patschkowski T., Schluter A. y Priefer U.B. (1996)** Rhizobium leguminosarum bv. viciae contains a second fnr/fixK-like gene and an unusual fixL homologue. *Molecular Microbiology* **21**(2): 267-280.
- Paulsen I.T., Press C.M., Ravel J., Kobayashi D.Y., Myers G.S., Mavrodi D. V., DeBoy R.T., Seshadri R., Ren Q., Madupu R., Dodson R.J., Durkin A.S., Brinkac L.M., Daugherty S.C., Sullivan S.A., Rosovitz M.J., Gwinn M.L., Zhou L., Schneider D.J., Cartinhour S.W., Nelson W.C., Weidman J., Watkins K., Tran K., Khouri H., Pierson E.A., Pierson L.S. 3<sup>rd</sup>, Thomashow L.S. y Loper J.E. (2005)** Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology* **23**(7): 873-878.
- Pereira M.M., Santana M. y Teixeira M. (2001)** A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases. *Biochimical and Biophysics Acta* **1505**(2-3): 185-208.
- Pfaffl M.W. (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**(9): e45.
- Pfaffl M.W. (2004)** Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: A-Z of Quantitative PCR. S.A.Bustin.editor. International University Line.La Jolla: 87-120.
- Piotrowski M., Schonfelder S. y Weiler E.W. (2001)** The Arabidopsis thaliana isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode  $\beta$ -cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 2616-2621.
- Piotrowski M. y Volmer J.J. (2006)** Cyanide metabolism in higher plants: cyanoalanine hydratase is a NIT4 homolog. *Plant and Molecular Biology* **61**(1-2): 111-122.

**Pitcher R.S. y Watmough N.J. (2004)** The bacterial cytochrome cbb3 oxidases. *Biochimical and Biophysics Acta* **1655**(1-3): 388-399.

**Porco A., Peekhaus N., Bausch C., Tong S., Isturiz T. y Conway T. (1997)** Molecular genetic characterization of the *Escherichia coli* gntT gene of Gntl, the main system for gluconate metabolism. *Journal of Bacteriology* **179**(5): 1584-1590.

**Preisig O., Anthamatten D. y Hennecke H. (1993)** Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**(8): 3309-3313.

**Preisig O., Zufferey R., Thony-Meyer L., Appleby C.A. y Hennecke H. (1996)** A high-affinity cbb3-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology* **178**(6): 1532-1538.

**Quesada A., Guijo M.I., Merchan F., Blazquez B., Igeno M.I y Blasco R. (2007)** Essential role of cytochrome bd-related oxidase in cyanide resistance of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Applied Environmental Microbiology* **73**(16): 5118-5124.

**Ramos J.L., Diaz E., Dowling D., de Lorenzo V., Molin S., O'Gara F., Ramos C. y Timmis K.N. (1994)** The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Biotechnology* **12**(13): 1349-1356 (NewYork).

**Ramos J.L., Martinez-Bueno M., Molina-Henares A.J., Teran W., Watanabe K., Zhang X., Gallegos M.T., Brennan R. y Tobes R. (2005)** The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiology Molecular Biological Review* **69**(2): 326-356.

**Raybuck S.A. (1992)** Microbes and microbial enzymes for cyanide degradation. *Biodegradation* **3**:: 3-18.

**Reizer A., Deutscher J., Saier M.H. y Reizer J. (1991)** Analysis of the gluconate (gnt) operon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **5**(5): 1081-1089.

**Richardson D.J. (2000)** Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* **146** ( Pt 3): 551-571.

**Rigali S., Derouaux A., Giannotta F. y Dusart J. (2002)** Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *Journal of Biological Chemistry* **277**(15): 12507-12515.

**Ririe K.M., Rasmussen R.P. y Wittwer C.T. (1997)** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* **245**(2): 154-160.

**Robertson D.E., Chaplin J.A., DeSantis G., Podar M., Madden M. y Chi E. (2004)** Exploring nitrilase sequence space for enantioselective catalysis. *Applied Environmental Microbiology* **70**: 2429–2436.

**Robinson W.G. y Hook R.H. (1964)** RICININE NITRILASE. I. REACTION PRODUCT AND SUBSTRATE SPECIFICITY. *Journal of Biological Chemistry* **239**: 4257-4262.

**Rothmel R.K., Chakrabarty A.M., Berry A., y Darzins A. (1991)** Genetic Systems in *Pseudomonas*. *Methods in enzymology* **204**: 485-514.

**Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1982)** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory (New York).

**Sambrook J. y Russell D. (2001).** Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York).

**Saraste M. y Castresana J. (1994)** Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes. *FEBS Letters* **341**(1): 1-4.

**Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G. y Pühler A. (1994)** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**(1): 69-73.

**Schink B. (1988)** Biology of Anaerobic Microorganisms. *John Wiley & Sons*: 771-846.

**Schluter A., Patschkowski T., Quandt J., Selinger L.B., Weidner S., Kramer M., Zhou L. Hynes M.F. y Priefer U.B. (1997)** Functional and regulatory analysis of the two copies of the fixNOQP operon of *Rhizobium leguminosarum* strain VF39. *Molecular Plant Microbe Interaction* **10**: 605–616.

**Schroth M. y Hildbrand D. (1992)** Panopoulos N. Phytopathogenic *pseudomonads* and plant-associated *pseudomonads*. *The Prokaryotes, 2nd ed.* Springer-Verlag. **3**: 3104-3131 (New York)

**Schultz B.E. y Chan S.I (2001)** Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. **30**: 23-65.

**Schuster M., Hawkins A.C., Harwood C.S. y Greenberg E.P. (2004)** The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Molecular Microbiology* **51**: 973–985.

**Seffernick J.L., Samanta S.K., Louie T.M., Wackett L.P. y Subramanian M. (2009).** Investigative mining of sequence data for novel enzymes: a case study with nitrilases. *Journal of Biotechnology* **143**: 17-26.

**Seto Y., Tsunoda H., Ohta H., y Shinohara T. (1993)** Determination of blood cyanide by headspace gas chromatography with nitrogen phosphorus detection and using a megabore capillary column. *Analytica Chimica Acta* **276**: 247–259.

**Shapleigh J.P., Hill J.J., Alben J.O. y Gennis R.B. (1992)** Spectroscopic and genetic evidence for two heme-Cu-containing oxidases in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* **174**(7): 2338-2343.  
Gennis, R. B.

**Sharm V.P. (2003)** DDT: The fallen ange. *Current Science*. **85**: 1532-1537.

**Singleton I. (1994)** Microbial metabolism of xenobiotics: Fundamental and applied research." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **59**(1): 9-23.

**Skiba U., Smithy K.A. y Fowler D. (1993).** Nitrification and denitrification as sources of nitric oxid and nitrous oxide in a sandy loam soil. *Soil Biology. Biochemistry*.

**Skowronski B. y Strobel G.A. (1969)** Cyanide resistance and cyanide utilization by a strain of *Bucillus pwnillas*. *Cunudiun Journal of Microbiology* **15**: 93-98.

**Solomonson L.P. (1981)** Cyanide as a metabolic inhibitor. In Cyanide in Biology. Academic Press: 1X-28 (London)

**Starr M.S. (1983)** Phytopathogenic Bacteria. Universidad de California, USA. Ed. Springer-Vertag: 742-763.

**Steinbüchel A. y Fuchtenbusch B. (1998)** Bacterial and other biological systems for polyester production. *Reviews. Trends in Biotechnology* **16**:419-427.

**Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A, Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E., Lory S. y Olson M.V. (2000)** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**(6799): 959-964.

**Strong P.J. y Burgess J.E. (2008)** Treatment methods for wine-related ad distillery wastewater: a review. *Bioremediation Journal*, **12**: 70-87.

**Johnson W.C. y Anderson P. M. (1987)** Bicarbonate is a recycling substrate for cyanase. *Journal of Biological Chemistry* **262**: 9021–9025.

**Sung Y.C. y Fuchs J.A. (1988)** Characterization of the *cyn* operon in *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry* **263**: 14769–14775.

**Sung M.H., Tanizawa K., Tanaka H., Kuramitsu S., Kagamiyama H., Hirotsu K., Okamoto A., Higuchi T. y Soda K. (1991)** Thermostable aspartate aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species. Gene cloning, sequence determination, and preliminary x-ray characterization. *Journal of Biological Chemistry* **266**(4): 2567-2572.

**Sung Y.C. y Fuchs J.A. (1992)** The *Escherichia coli* K-12 *cyn* operon is positively regulated by a member of the *lysR* family *Journal of Bacteriology* **174**(11): 3645-3650.

**Sylvester D.M., Holmes R.K., Sander C. y Way J.L. (1982)** Interference of thiosulfate with potentiometric analysis of cyanide in blood and its elimination. *Toxicology and Applied Pharmacology* **65**: 116–121.

**Tailings Dam Incidents (1994)** U.S. Committee on Large Dams - USCOLD, Denver, Colorado, ISBN 1-884575-03-X: 82 pages [compilation and analysis of 185 tailings dam incidents]

**Tailings Dams - Risk of Dangerous Occurrences (2001)** Lessons learnt from practical experiences, Bulletin 121, Published by United Nations Environmental Programme (UNEP) Division of Technology, Industry and Economics (DTIE) and International Commission on Large Dams external link (ICOLD): 144 [compilation of 221 tailings dam incidents mainly from the above two publications, and examples of effective remedial measures] (París).

**Tang C.Y., Fu Q.S., Criddle C.S. y Leckie J.O. (2007)** Effect of flux (transmembrane pressure) and membrane properties on fouling and rejection of reverse osmosis and nanofiltration membranes treating perfluorooctane sulfonate containing wastewater. *Environmental Science Technology* **41**(6): 2008-2014.

**Tavankar G.R., Mossialos D. y Williams H.D. (2003)** Mutation or overexpression of a terminal oxidase leads to a cell division defect and multiple antibiotic sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 4524–4530.

**Thony-Meyer L., Beck C., Preisig O. y Hennecke H. (1994)** The *ccoNOQP* gene cluster codes for a *cb*-type cytochrome oxidase that functions in aerobic respiration of *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular Microbiology* **14**(4): 705-716.

**Timm A. y Steinbüchel A. (1990)** Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *Pseudomonads*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:3360-3367.

**Toledo-Cuevas M., Barquera B., Gennis R.B., Wikstro, M., y Garcia-Horsman J.A. (1998)** The cbb3-type cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*, a proton-pumping heme-copper oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1365**: 421–434.

**Tomb J.F., White O., Kerlavage A.R., Clayton R.A., Sutton G.G., Fleischmann R.D., Ketchum K.A., Klenk H.P., Gill S., Dougherty B.A., Nelson K., Quackenbush J., Zhou L., Kirkness E.F., Peterson S., Loftus B., Richardson D., Dodson R., Khalak H.G., Glodek A., McKenney K., Fitzgerald L.M., Lee N., Adams M.D. y Venter J.C.(1997)** The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 539-547

**Tong S., Porco A., Isturiz T. y Conway T. (1996)** Cloning and molecular genetic characterization of the *Escherichia coli* *gntR*, *gntK*, and *gntU* genes of Gntl, the main system for gluconate metabolism. *Journal of Bacteriology* **178**(11): 3260-3269.

**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**(5): 511-515.

**US EPA (Environmental Protection Agency U.S.) (1983)** Methods for chemical analysis of water and waste. Method 335.2. Cyanide total. *Environmental Monitoring and Support Laboratory* (Cincinnati)

**US EPA (Environmental Protection Agency U.S.) (1985)** Drinkingwater criteria document for cyanide. *Environment Criteria and Assessment office* (Cincinnati).

**US EPA (Environmental Protection Agency U.S.) (1993a)** Methods for the determination of inorganic substances in environmental samples. *Office of Research and Development* (EPA/600/R-93/100) (Washington).

**US EPA (Environmental Protection Agency U.S.) (1997)** Draft Method 1677. Ligand exchange/flow injection/amperometric technique for cyanide analysis. *National Risk Management Research Laboratory* (Cincinnati).

**Van der Oost J., de Boer A.P., de Gier J.W., Zumft W.G., Stouthamer A.H., y Van Spanning R.J. (1994)** The heme-copper oxidase family consists of three distinct types of terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase. *FEMS Microbiology Letters* **121**(1): 1-9.

**Vanlerberghe G.C. y McIntosh L. (1997)** ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 703-734.

**Van Spanning R.J., De Boer A.P., Reijnders W.N., Westerhoff H.V., Stouthamer A.H., y Van Der Oost J. (1997)** FnrP and NNR of *Paracoccus denitrificans* are both members of the FNR family of transcriptional activators but have distinct roles in respiratory adaptation in response to oxygen limitation. *Molecular Microbiology* **23**: 893–907.

**Velazquez F., di Bartolo I. y de Lorenzo V. (2004)** Genetic evidence that catabolites of the Entner-Doudoroff pathway signal C source repression of the sigma54 Pu promoter of *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* **186**(24): 8267-8275.

**Vidali M. (2001)** Bioremediation: An overview. *Pure Applied Chemistry*. (73): 1163-1172.

**Vodovar N., Vallenet D., Cruveiller S., Rouy Z., Barbe V., Acosta C., Cattolico L., Jubin C., Lajus A., Segurens B., Vacherie B., Wincker P., Weissenbach J., Lemaitre B., Medigue C. y Bocard F. (2006)** Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nature Biotechnology* **24**(6): 673-679.

**Voggu L., Schlag S., Biswas R., Rosenstein R., Rausch C. y Gotz F. (2006)** Microevolution of cytochrome *bd* oxidase in *Staphylococci* and its implication in resistance to respiratory toxins released by *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology* **188**(23): 8079-8086.

**Walker N.J. (2002)** Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* **296**(5567): 557-559.

**Walsh U.F., Morrissey J.P. y O'Gara F. (2001)** *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology* **12**(3): 289-295.

**Watson M.R. (1973)** Pollution Control in Metal Finishing. Park Ridge, NJ: Noyes Data Corporation.

**Way S.S., Sallustio S., Magliozzo R.S. y Goldberg M. B. (1999)** Impact of either increased or decreased levels of cytochrome *bd* expression on *Shigella flexinera* virulence. *Journal of Bacteriology* **181**: 1229-1237.

**Wibberg D., Luque-Almagro V.M., Igeno M.I., Bremges A., Roldan 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.

**Wild S.R., Rudd T. y Neller A (1994)** Fate and effects of cyanide during wastewater treatment processes. *Science of The Total Environment* **156**(2): 93-107.

**Williams H.D., Zlosnik J.E. y Ryall B. (2007)** Oxygen, cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Advances in Microbial Physiology* **52**: 1-71.

**Winsor G.L., Van Rossum T., Lo R., Khaira B., Whiteside M.D., Hancock, R.E.W y Brinkman F. (2009)** *Pseudomonas* genome database: facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Research* **37**(suppl 1): D483-D488.

**Winstedt L. y Von Wachenfeldt C. (2000)** Terminal oxidases of *Bacillus subtilis* strain 168: one quinol oxidase, cytochrome aa<sub>3</sub> or cytochrome bd, is required for aerobic growth. *Journal of Bacteriology*. **182**: 6557–6564.

**Wintjens R. y Rooman M. (1996)** Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. *Journal of Molecular Biology* **262**(2): 294-313.

**Wood T.K. (2008)** Molecular approaches in bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* **19**(6): 572-578.

**Yamamoto K. y Komatsu K. (1991)** Purification and characterization of nitrilase responsible for the enantioselective hydrolysis from *Acinetobacter* sp. AK 226. *Agricultural and Biological Chemistry* **55**: 1459-1466.

**Yanase H., Sakai T. y Tonomura K. (1983)** Purification, Crystallization and Some Properties  $\beta$ -Cyano-L-alanine-degrading Enzyme in *Pseudomonas* sp. 13. *Agricultural and Biological Chemistry* **47**: 10.

**Yeom S.J., Kim H.J., Lee J.K., Kim D.E. y Oh D.K. (2008)** An amino acid at position 142 in nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 33278 determines the substrate specificity for aliphatic and aromatic nitriles. *Biochemical Journal* **415**(3): 401-407.

**Young C.A. y Jordan T.S. (1995)**. Cyanide remediation: current and past technologies, in: Proceedings of the 10th Annual Conference on HazardousWaste Res: 104–129.

**Zeller T., Li K., y Klug G. (2006)** Expression of the *trxC* gene of *Rhodobacter capsulatus*: response to cellular redox status is mediated by the transcriptional regulator OxyR. *Journal Bacteriology* **188**(21): 7689-7695.



**Zhang J., Barquera B. y Gennis R.B. (2004).** Gene fusions with beta-lactamase show that subunit I of the cytochrome *bd* quinol oxidase from *E. coli* has nine transmembrane helices with the O<sub>2</sub> reactive site near the periplasmic surface, *FEBS Letters* **561**(1-3): 58-62.

**Zufferey R., Preisig O., Hennecke H. y Thony-Meyer L. (1996)** Assembly and function of the cytochrome *cbb3* oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Biological Chemistry* **271**(15): 9114-9119.