

Capítulo 1

Biodegradación de cianuro por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Análisis proteómico

Huertas MJ¹, Luque-Almagro VM¹, Martínez-Luque M¹, García I², Blasco R³, Moreno-Vivián C¹, Castillo F¹, Roldán MD^{1,3}

¹Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Edificio Severo Ochoa (C6), Universidad de Córdoba; ²Dep. Ingeniería Química, Edificio Marie Curie (C3), Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ³Dep. Bioquímica, Biología Molecular y Genética, Universidad de Extremadura, Cáceres; ³CE: <bb2rorum@uco.es>

RESUMEN

El cianuro es un compuesto muy tóxico para los seres vivos ya que forma complejos muy estables con metales de transición, esenciales para la función de numerosas proteínas. A pesar de su toxicidad, se han descrito microorganismos que metabolizan cianuro debido a la posesión de estas características: una ruta para su degradación, un sistema de suministro de hierro (sideróforos) y una cadena de transporte de electrones insensible a cianuro. A partir de lodos procedentes del río Guadalquivir se ha aislado una bacteria que degrada cianuro en condiciones alcalinas, se ha identificado como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y se ha depositado en la colección española de cultivos tipo como CECT5344. El estudio del proteoma de *P. pseudoalcaligenes* ha permitido la identificación de proteínas relacionadas con resistencia a cianuro, biosíntesis de sideróforos y respuesta a estrés general. Otros estudios permitirán evaluar el uso potencial de la estirpe CECT5344 en la descontaminación de residuos y de zonas contaminadas con cianuro.

Palabras clave: Alcalófila, alquil hidroperóxido reductasa, cianotrofos, electroforesis bidimensional (2D), ferritina, fosforribosil glicinamida formiltransferasa, proteína PII, proteínas de choque térmico, MALDI-TOF.

Introducción

El cianuro es una molécula que se encuentra en la naturaleza en una gran variedad de formas debido fundamentalmente a las características químicas del grupo ciano ($-C\equiv N$). El cianuro puede presentarse como cianuro libre que comprende las formas de cianuro molecular (HCN) e iónica (CN^-), como cianuros simples que son las sales del ácido cianhídrico, formando complejos con metales de transición y uniéndose a sustancias orgánicas formando los nitrilos. La toxicidad del cianuro depende de la manera en que se presente; así el cianuro libre es un veneno muy potente mientras que los complejos con metales varían en toxicidad dependiendo del metal con el que están ligados y de su grado de liberación del mismo por parte de estos complejos.

El cianuro puede tener un origen natural ya que lo producen plantas superiores, artrópodos, hongos y bacterias en el proceso denominado cianogénesis. Las plantas producen glucósidos cianogénicos como defensa contra herbívoros y patógenos. Las bacterias y los hongos producen compuestos cianurados para defenderse o competir contra otros organismos. Sin embargo, la mayor parte del cianuro se produce por actividades humanas como la síntesis de nitrilos, nylon, adhesivos, pinturas, etc. Otra aplicación industrial del cianuro es la de extracción de oro y plata, en los procesos de galvanoplastia y electropulido usados en la industria joyera. La liberación de cianuro por parte de estas industrias se ha estimado en 2 ó 3 millones de toneladas por año.

El cianuro es muy tóxico para los seres vivos ya que interfiere con la función de metaloproteínas respiratorias como la citocromo c oxidasa. Por este motivo los efluentes derivados de estas actividades industriales se tienen que someter a tratamiento antes de su descarga al medio ambiente.

A pesar de su extrema toxicidad, el cianuro es un compuesto químico que apareció en la Tierra primitiva en las primeras fases de la evolución química y que participó en la evolución de las moléculas primordiales. Debido a esto, algunos organismos vivos han desarrollado procesos de desintoxicación, bien para evitar la inhibición de la respiración aerobia o para degradar el cianuro a productos carbonados o nitrogenados inocuos. Se han descrito bacterias y hongos capaces de degradar cianuro a través de rutas que utilizan mecanismos enzimáticos de tipo oxidativo, reductivo e hidrolíticos, así como reacciones de sustitución y adición que implican la síntesis e hidrólisis de nitrilos y cianhidrinas. Pero además de una ruta degradativa, un microorganismo cianotrofo debe presentar un sistema de suministro de hierro, ya que el cianuro forma complejos con el hierro extremadamente estables. Para extraer el hierro del medio, los microorganismos han desarrollado mecanismos muy eficaces como la síntesis de sideróforos, moléculas orgánicas de complejidad variada capaces de unir hierro con una elevada afinidad, que son liberados al medio y captados mediante mecanismos de transporte una vez que han ligado el hierro. Precisamente, una de las respuestas más tempranas a la presencia de cianuro es la biosíntesis y liberación de sideróforos. Por último, un efecto añadido de la inhibición de la citocromo oxidasa por cianuro es la inducción de estrés respiratorio. La

resistencia al cianuro por parte de microorganismos cianotrofos implica la existencia de una oxidasa alternativa insensible al mismo y además, como consecuencia del bloqueo de la citocromo oxidasa, también se pueden producir especies reactivas de oxígeno.

En la ciudad de Córdoba la industria joyera genera anualmente 4-5 toneladas de un residuo con un contenido en cianuro libre de 20 g/L que, además, presenta una elevada concentración de metales con los que este compuesto forma complejos de toxicidad variable. Las normas de la UE son muy estrictas en lo referente a las industrias que producen este tipo de residuos tóxicos. En la actualidad, la eliminación de los residuos se está llevando a cabo mediante tratamientos físico-químicos que en muchos casos son peligrosos y de bajo rendimiento. Los tratamientos biológicos se proponen como alternativa ya que son de menor coste y no producen sustancias tóxicas.

Para el posible tratamiento biológico de los residuos cianurados de la industria joyera en nuestro grupo de investigación se aisló una bacteria que asimila cianuro y que se ha identificado como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Esta estirpe es alcalófila y usa cianato, cianuro libre o en forma de complejos cianometálicos, nitrilos y otros cianoderivados como fuente de nitrógeno, desarrollando una respuesta compleja que implica la inducción de una ruta degradativa, la captación de hierro mediante la síntesis y transporte de sideróforos y la resistencia al cianuro por inducción de una oxidasa alternativa. Además, la asimilación de cianuro está favorecida en condiciones alcalinas ya que se limita el riesgo de la volatilización de ácido cianhídrico.

El estudio y caracterización de la estirpe CECT5344 se ha abordado desde diferentes aspectos. En este trabajo se muestra la aproximación al estudio de la degradación de cianuro mediante análisis proteómico. El estudio del proteoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 cultivada en cianuro ha permitido identificar proteínas relacionadas con resistencia a cianuro, biosíntesis de sideróforos y estrés general. La caracterización de la degradación de cianuro nos puede ayudar a conocer y entender el metabolismo de este compuesto por dicha bacteria para posteriormente abordar su utilización en el tratamiento biológico de zonas contaminadas.

Análisis proteómico de la respuesta a cianuro

Se ha utilizado una aproximación proteómica para entender las bases moleculares de los cambios fisiológicos que ocurren en los organismos para adaptarse a las diferentes condiciones medioambientales. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria alcalófila y cianotrofa que asimila el amonio producido a partir del cianuro procedente de los residuos de la industria joyera. Esta bacteria es capaz de utilizar el cianuro que forma parte de estos efluentes como única fuente de nitrógeno. Cuando se analizan mediante electroforesis bidimensional (2D) las fracciones solubles

de células cultivadas en el residuo de la joyería o en NaCN, comparadas con las cultivadas en amonio, se encuentran cambios en 44 proteínas. Debido a que el genoma del microorganismo no estaba secuenciado, sólo se pudieron identificar mediante MALDI-TOF cinco de estas proteínas denominadas: CN0, CN1, CN2, CN3 y CN4.

La proteína CN0 presenta una masa molecular de 18 kDa, un *pI* de 5,4 y un PMF ("mass fingerprinting") similar a la fosforribosil glicinamida formiltransferasa (GART, EC 2.1.2.2) de *Caulobacter crescentus*. Se ha descrito que esta enzima está implicada en la síntesis de purinas. Además, en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 participa en la síntesis de sideróforos tipo pioverdina. Debido a que *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 crece en presencia de ferrocianuro férrico, como única fuente de nitrógeno y de hierro, y debe producir sideróforos, esta proteína CN0 podría estar implicada en la respuesta a la limitación de hierro en medios con cianuro. Se ha medido la actividad GART en células de la estirpe CECT5344 cultivadas en cianuro y amonio y se ha encontrado un 41% más de actividad en las primeras con respecto a las cultivadas en amonio. Estos resultados nos permiten proponer que el cianuro induce una formiltransferasa implicada en la síntesis de sideróforos.

La proteína CN3 presenta una masa molecular de 16,8 kDa, un *pI* de 6,5 y un PMF similar a la proteína reguladora de nitrógeno PII-2 de *Clostridium acetobutylicum*. Esta proteína aparece desregulada en medios con cianuro, lo que implica que en ellos existen condiciones de hambre de nitrógeno. En general, la síntesis de la proteína PII es constitutiva y su actividad se regula a nivel postraduccional en respuesta al elevado balance C/N intracelular, una condición que induce genes responsables de la asimilación de nitrógeno inorgánico. Por el contrario, la proteína PII-2 se induce en condiciones de hambre de nitrógeno y es la responsable de que las células sobrevivan en estas condiciones y de que se multipliquen rápidamente una vez que las condiciones cambien. En el género *Pseudomonas*, la enzima glutamina sintetasa (GS) se regula por un mecanismo de adenilación/desadenilación que depende del suministro de nitrógeno. Si hay un exceso de carbono (hambre de nitrógeno) la enzima aparece desadenilada y, por lo tanto, activa y en el caso contrario, por exceso de fuente de nitrógeno, parecería adenilada o inactiva. Se propone que la estirpe CECT5344 en presencia de cianuro presenta una situación de hambre de nitrógeno. Cuando se mide el estado de adenilación de la enzima en células cultivadas en distintas fuentes de nitrógeno se comprueba que es muy bajo ($n < 2$) en medios con muy poco nitrógeno (amonio 2 mM) o cianuro y alto ($n > 8$) en medios con nitrato (condiciones no limitantes de fuente de nitrógeno).

La proteína CN1 presenta una masa molecular de 28 kDa, un *pI* de 6,5 y un PMF similar a la subunidad c de la alquil hidroperóxido reductasa (AHR) de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. La enzima AHR está implicada en la degradación de H₂O₂ y peróxidos orgánicos que se generan en la cadena respiratoria. Así, la inducción de

una enzima de este tipo en células cultivadas en presencia de cianuro nos hace pensar en la posibilidad de un estrés respiratorio causado por el cianuro debido a la inactivación de la citocromo oxidasa. El papel de esta enzima se pone de manifiesto cuando se incuban las células en presencia de hidróperóxido de cumeno, que se utiliza para medir la actividad de esta enzima *in vivo*. El cumeno inhibe totalmente el crecimiento de la estirpe cuando no hay cianuro en el medio y parcialmente cuando el cianuro está presente, lo que sugiere una protección por la presencia de esta actividad AHR.

La proteína CN2 presenta una masa molecular de 20 kDa, un *pI* de 5,6 y un PMF similar a una proteína de tipo ferritina de unión al ADN de *Pseudomonas fluorescens*. Esta proteína, igual que la enzima AHR, se ha propuesto que protege de la presencia de especies reactivas de oxígeno. Nuestros resultados muestran que el cianuro causa una situación de estrés oxidativo que lleva a la expresión de proteínas implicadas en este tipo de respuesta.

El estrés respiratorio causado por la presencia de cianuro puede ser el responsable de la inducción de otra proteína la CN4, que aparece en la membrana de células incubadas en medio rico y en presencia de cianuro. Esta proteína presenta una masa molecular de 18 kDa, un *pI* de 6,0 y un PMF con similitud a proteínas de choque térmico de *Pseudomonas alcaligenes*.

Evaluando los resultados obtenidos en el estudio preliminar del proteoma de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 podemos concluir que esta bacteria alcalófila responde a la toxicidad del cianuro induciendo proteínas relacionadas con la biosíntesis de sideróforos, la regulación de la ruta de asimilación de nitrógeno y la reparación y protección frente a estrés oxidativo.

Biotratamiento de zonas contaminadas con cianuro

La eliminación del cianuro derivado de las actividades industriales se ha abordado tradicionalmente mediante el tratamiento físico-químico. Se propone el tratamiento biológico como alternativa ya que es más barato y no se generan sustancias tóxicas. Las características de la estirpe CECT5344 ponen de manifiesto la capacidad de la misma para utilizarse en el tratamiento de los efluentes derivados de la joyería. Por eso se están llevando a cabo estudios en biorreactores con el objetivo de descontaminar los residuos joyeros. En estos estudios se están optimizando los parámetros para utilizar la estirpe

CECT5344 en la descontaminación. Así, en sistemas de fermentación discontinua se están evaluando parámetros como la agitación, temperatura, concentración de oxígeno y pH óptimo para eliminación del cianuro. Los resultados iniciales obtenidos indican que la estirpe elimina cianuro en las condiciones establecidas de temperatura (30°C), agitación (450 rpm), concentración de oxígeno disuelto (10%) y pH (9,5). El siguiente paso será optimizar el comportamiento de la cepa en sistemas continuos utilizando residuos procedentes de la joyería. Las características de esta cepa así como su capacidad para utilizar cianuro como fuente de nitrógeno en condiciones alcalinas proporcionarían importancia práctica a estos estudios.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de la empresa GEMASUR. Financiado por el MEC (proyectos BMC2002-4126-C03-03 y BIO2005-07741-C02-01), Proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía (CVI-1728) y Ayuda a grupos de la Junta de Andalucía (Grupo CVI 0117).

Referencias

- Akcil A, Mudder T (2003): Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review. *Biotechnol Lett* 25: 445-450.
- Ebbs S (2004): Biological degradation of cyanide compounds. *Curr Opin Biotechnol* 15: 231-236.
- Huertas MJ, Luque-Almagro VM, Martínez-Luque M, Blasco R, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD (2006): Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: role of siderophores. *Biochem Soc Trans* 34: 152-155.
- Luque-Almagro VM, Blasco R, Huertas MJ, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD (2005): Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Biochem Soc Trans* 33: 168-169.
- Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Roldán MD, García-Gil J, Castillo F, Blasco R (2005): Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Appl Environ Microbiol* 71: 940-947.
- Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Roldán MD, Moreno-Vivián C, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F (2007): The cyanotrophic bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 responds to cyanide by defence mechanisms against iron deprivation, oxidative damage and nitrogen stress. *Environ Microbiol* 9: 1541-1549.