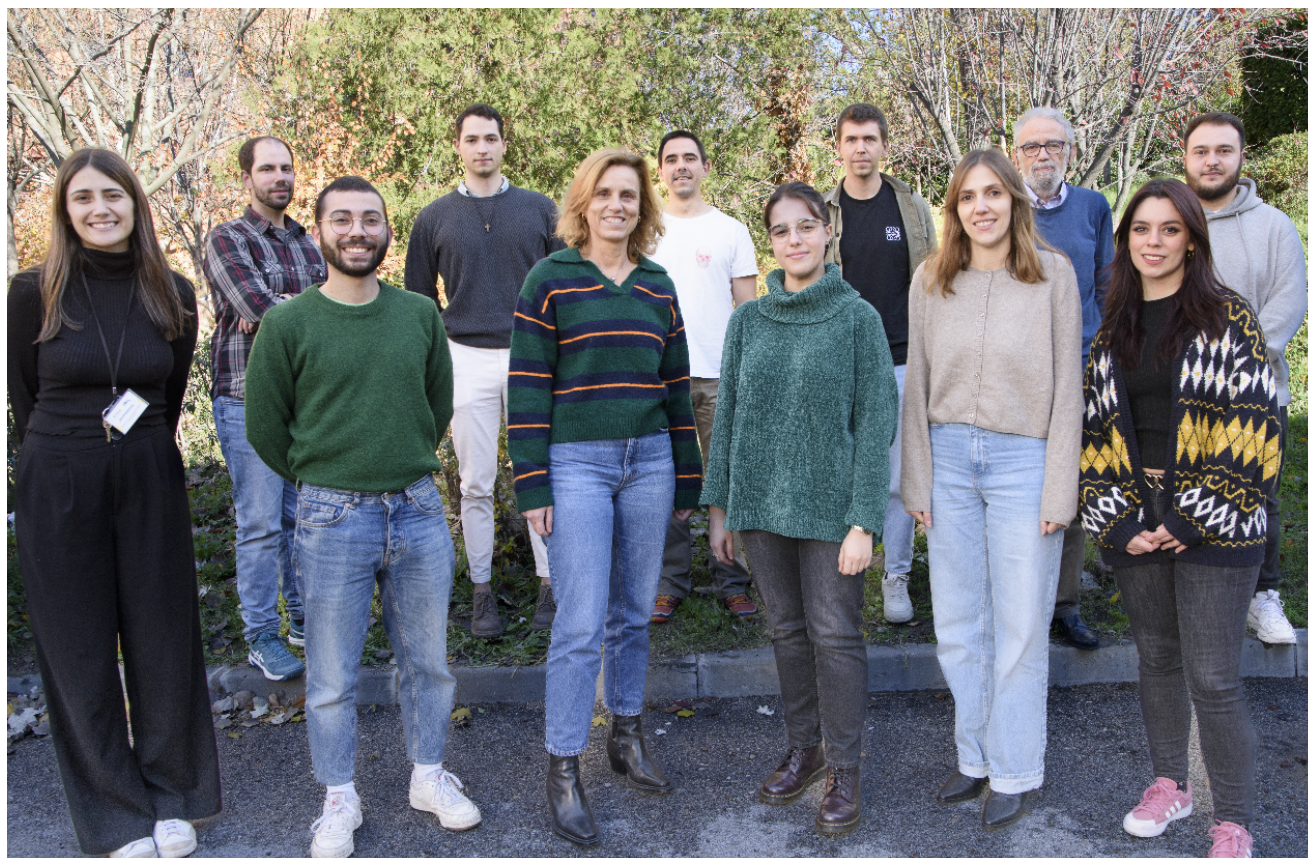


Degradación de disruptores endocrinos

JUAN IBERO, BEATRIZ GALÁN Y JOSÉ LUIS GARCÍA

Grupo de Biotecnología Medioambiental. Departamento de Biotecnología. Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. C/ Ramiro de Maeztu 9. 28040 Madrid.

✉ jicaballero@cib.csic.es | bgalan@cib.csic.es | jl Garcia@cib.csic.es



Grupo de Biotecnología Medioambiental.

Los esteroides son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, involucrados en muy diversas funciones biológicas y cuya estructura química los hace especialmente recalcitrantes a la degradación microbiana. Desde un punto de vista medioambiental los esteroides tienen relevancia por estar entre los medicamentos más producidos por la industria farmacéutica y porque su liberación al medio ambiente supone un riesgo para la salud humana y animal.

En los últimos años la contaminación ambiental producida por los esteroides denominados como disruptores endocrinos (EDCs) ha recibido una enorme atención, ya que son sustancias capaces de afectar la salud a nivel sistémico y cuya ubicuidad supone un riesgo a nivel global. Dentro de estos compuestos destacan por su creciente presencia en diferentes nichos ecológicos los estrógenos, un tipo de hormonas esteroideas, que poseen una alta toxicidad a muy bajas concentraciones.

Aunque se ha propuesto que la degradación microbiana de los EDCs podría ser un método eficaz para eliminar estos compuestos, apenas se conocen la genética y la bioquímica de las rutas metabólicas microbianas implicadas en estos procesos de degradación.

Las bacterias de la familia Sphingomonadaceae, caracterizadas por su capacidad de metabolizar diferentes compuestos contaminantes, se han propuesto como

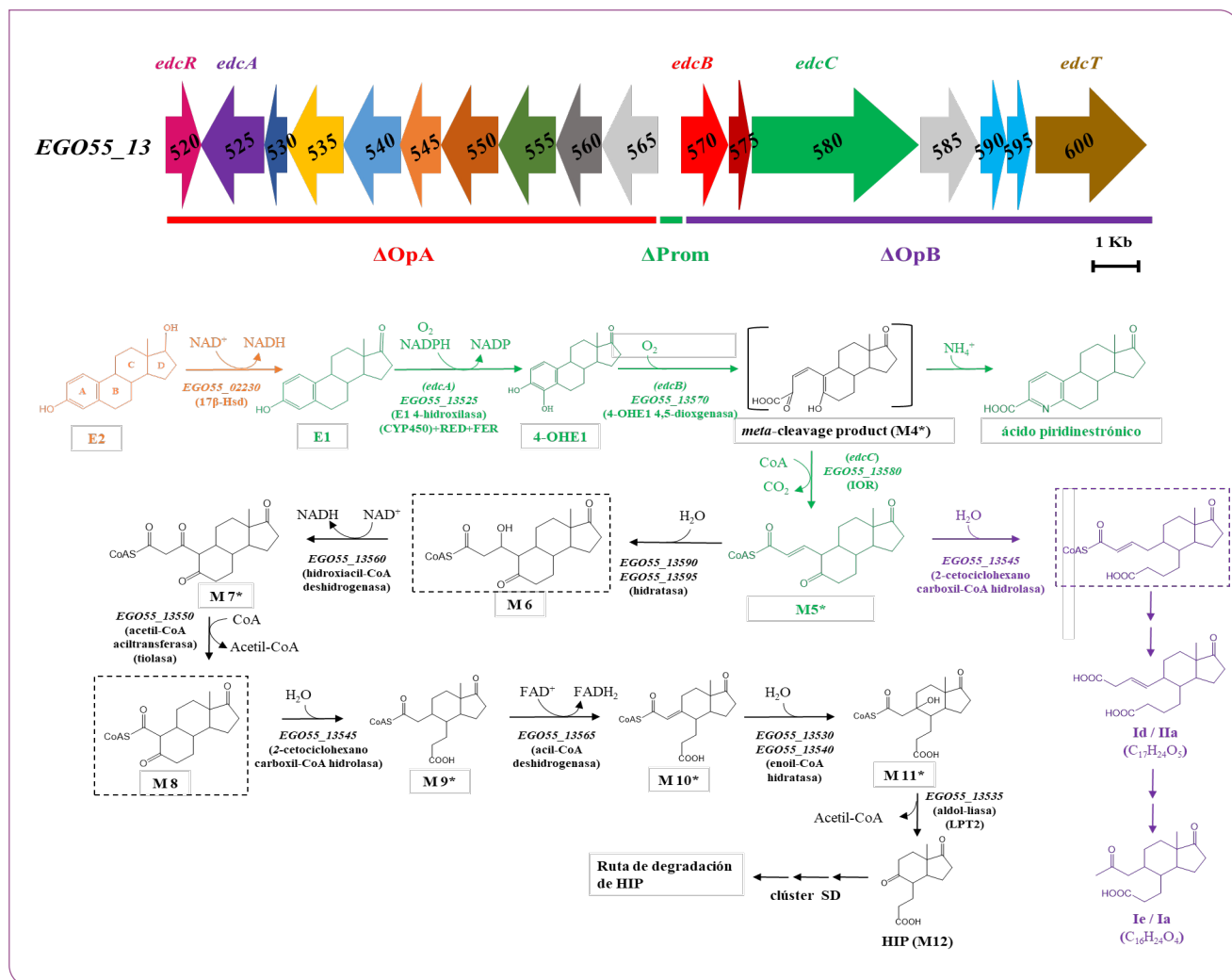


Figura 1. Clúster genético responsable de la degradación del estradiol y la estrona en *C. tardaugs* y esquema de la ruta metabólica propuesta (Ibero et al., 2020).

modelos para estudiar la degradación de estrógenos, sin embargo, la dificultad para producir modificaciones genéticas en las cepas naturales descritas complica las tareas de caracterización de las rutas.

Nuestros trabajos para caracterizar las rutas bacterianas de degradación de EDCs se iniciaron con la caracterización genómica de una bacteria inicialmente denominada como *Novosphingobium tardaugs* NBRC 16725 que fue aislada a partir de lodos de depuradora por su capacidad de degradar EDCs (Fujii et al., 2022). Esta alfaproteobacteria actualmente se ha reclasificado como *Caenibius tardaugs* (Hördt et al., 2020).

Un primer estudio comparativo del genoma de *C. tardaugs* (Ibero et al., 2019a) reveló la existencia de un clúster de genes

cuya organización era similar a la del clúster de genes implicados en la degradación de la testosterona en la bacteria modelo *Comamonas testosteroni* TA441. La identidad de secuencia de las proteínas codificadas en este clúster permitió asignar una función a cada una dentro de la ruta de degradación de testosterona en *C. tardaugs*. El desarrollo por primera vez de herramientas de ingeniería genética en esta bacteria ha permitido realizar estudios para asignar funciones a los genes de las rutas metabólicas realizando modificaciones en su genoma, facilitando su uso para el estudio de la degradación aeróbica de la testosterona en esta bacteria (Ibero et al., 2019b).

Por otro lado, el estudio del transcriptoma completo de *C. tardaugs* cultivada en estradiol como única fuente de carbono reveló la existencia de un clúster de genes

inducido específicamente por estradiol (clúster *edc*, EGO55_13520-EGO55_13600) (Ibero et al., 2020). La mutagénesis de la región promotora y de los dos operones que componían el clúster mostró que efectivamente estaba implicado en el metabolismo del estradiol. La mutagénesis dirigida de genes concretos del clúster sirvió para demostrar que, al menos 3 de ellos, eran esenciales para la degradación del estradiol. Especialmente, los ensayos enzimáticos llevados a cabo con el citocromo P450 EdcA, codificado por el gen EGO55_13525 contenido en este clúster, demostraron por primera vez que este citocromo tenía una actividad estrona 4-hidroxilasa que constituye el primer paso de la degradación metabólica de la estrona (Figura 1).

El estudio de la regulación transcripcional de la ruta de degradación del estradiol

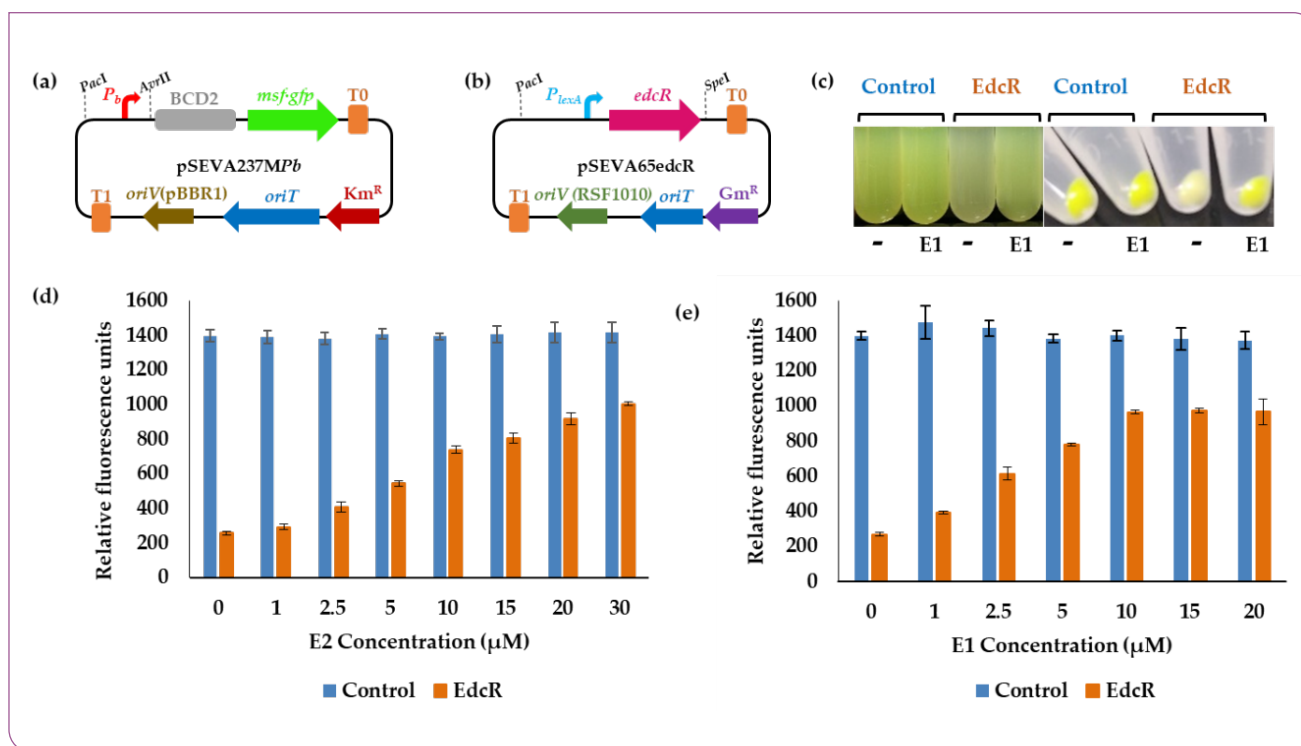


Figura 2. Construcción de un biosensor celular basado en el regulador EdcR para detectar estradiol (E2) y estrona (E1) en aguas contaminadas con estos compuestos. Se muestran los plásmidos utilizados para la detección mediante la proteína fluorescente verde (gfp) (Ibero et al., 2021).

reveló también la existencia de un represor, EdcR, codificado por el gen *EG055_13520*, asociado al clúster. Este regulador responde específicamente a estrona y estradiol, que actúan como inductores específicos (Ibero et al., 2021). Con este regulador, que de momento es el único regulador bacteriano conocido capaz de reconocer estrógenos de manera selectiva, hemos diseñado un biosensor celular de fluorescencia en *Escherichia coli* que permite detectar la presencia de estrona o estradiol en aguas contaminadas con estos EDCs a simple vista (Figura 2).

Otro resultado curioso de estos estudios, ha sido la demostración de que *C. tardauensis* acumula polihidroxialcanoatos (PHAs) en forma de gránulos, al crecer en condiciones de desbalance de nitrógeno, utilizando esteroides como única fuente de carbono (Ibero et al., 2022) (Figura 3). El PHA producido es un copolímero de polihidroxibutirato y polihidroxivalerato.

Por último, hay que señalar que esta bacteria tiene la capacidad de degradar, además de estrona, estradiol y testosterona, sales biliares como el colato y el desoxico-

NB

TES

E2

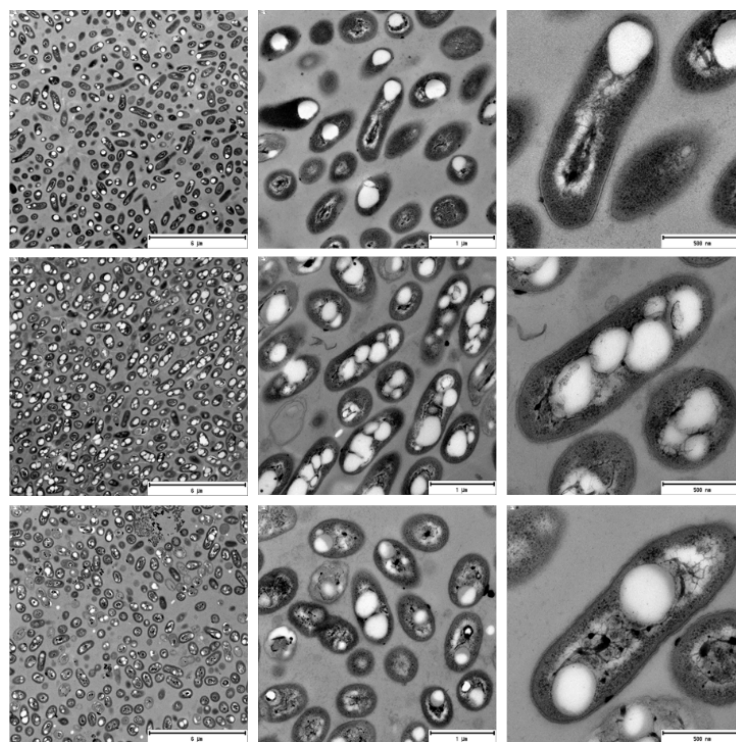


Figura 3. Producción de gránulos de polihidroxialcanoatos en *C. tardauensis* utilizando como sustratos los esteroides, testosterona (TES) y estradiol (E2). NB, control de Nutrient Broth (Ibero et al., 2022).

lato, y otros esteroides como progesterona y pregnenolona. Por lo tanto, *C. tardaughensis* es una bacteria con amplias posibilidades para ser utilizada en consorcios microbianos artificiales para depurar aguas contaminadas con diferentes compuestos esteroideos.

Pero lo más sorprendente de estos estudios es que esta bacteria es capaz de utilizar el colesterol como fuente de carbono y energía para crecer, una característica poco común en bacterias Gram-negativas. *C. tardaughensis* utilizaría una nueva ruta de degradación aún desconocida, y que actualmente estamos estudiando. La caracterización de una ruta no descrita presenta una prometedora oportunidad de producir esteroides y sintonas útiles para la semisíntesis de nuevos esteroides de uso farmacéutico. El conocimiento adquirido permitiría el desarrollo de un nuevo proceso biotecnológico de biotransformación de esteroides naturales, ya sea en esta bacteria o en otra bacteria que actúe como hospedadora de la nueva ruta metabólica.

Estos trabajos han sido financiados mediante los proyectos ELISA de la Fundación Ramón Areces, Intramural-202220E018 del CSIC, y PID2019-110612RB-I00 y

PID2021-125370OB-I00 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Referencias

Fujii K, Kikuchi S, Satomi M, Ushio-Sata N, y Morita N. (2002). Degradation of 17 β -estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan. *Appl Environ Microbiol* 68: 2057–60.

Hördt A, López MG, Meier-Kolthoff JP, Schleuning M, Weinhold LM, Tindall BJ, et al. (2020). Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of alphaproteobacteria. *Front Microbiol* 11: 468.

Ibero J, Sanz D, Galán B, Díaz E, y García JL. (2019a). High-quality whole-genome sequence of an estradiol-degrading strain, *Novosphingobium tardaughensis* NBRC 16725. *Microbiol Resour Announc* 11: e01715-18.

Ibero J, Galán B, Díaz E, y García JL. (2019b). Testosterone degradative pathway of *Novosphingobium tardaughensis*. *Genes* 10: 871.

Ibero J, Galán B, Rivero-Buceta V, y García JL. (2020). Unraveling the 17 β -estradiol degradation pathway in *Novosphingobium tardaughensis* NBRC 16725. *Front Microbiol* 11: 588300.

Ibero J, Galán B, y García JL. (2021). Identification of the EdcR estrogen-dependent repressor in *Caenibius tardaughensis* NBRC 16725: Construction of a cellular estradiol biosensor. *Genes* 12: 1846.

Ibero J, Rivero-Buceta V, García JL, y Galán B. (2022). Polyhydroxyalkanoate production by *Caenibius tardaughensis* from steroidal endocrine disruptors. *Microorganisms* 10: 706.

.....