

**Bases Genéticas y Bioquímicas del Metabolismo del Nitrógeno
del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) en
Pseudomonas putida JLR11**

Memoria que presenta el Licenciado en Ciencias Biológicas,
Antonio Caballero Reyes, para aspirar al Título de Doctor

Fdo. Antonio Caballero Reyes

Vº Bº

El Director

Juan Luís Ramos Martín

Doctor en Biología

Profesor de Investigación del CSIC

Universidad de Granada

2005

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Antonio Caballero Reyes
D.L.: Gr. 660 - 2005
ISBN: 84-338-3356-1

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en la Unidad Estructural de Bioquímica
y Biología Molecular de Plantas de la
Estación Experimental del Zaidín (CSIC) en Granada

*“Tú, caballero, quienquiera que seas, que el temeroso lago estás mirando,
si quieres alcanzar el bien que debajo destas negras aguas se encubre [...],
arrójate en mitad de su negro y encendido licor;
porque si así no lo haces, no serás digno de ver las altas maravillas que en sí encierran...”*

*De las discretas altercaciones que Don Quijote y el canónigo tuvieron, con otros sucesos.
“El ingenioso hidalgo Don Quijote de la Mancha”*

Miguel de Cervantes

A mi familia.

A mi madre, la incansable luchadora.

A mis hermanas, mi verdadera debilidad.

Poco había pasado desde del comienzo de esta Tesis cuando a Eduardo Galeano escuché decir que (en otras palabras claro, no tengo tanta memoria) “en un largo viaje, lo realmente interesante está en las experiencias del trayecto, no en lo que nos espera allá donde nos dirigimos”. No me cabe duda que en este momento, tan cerca del final de este viaje que aquí resumo, no puedo más que darle la razón, y reconocer que, si no lo mejor de todo, a poco se le queda, han sido las personas de las que me he rodeado, lo en mi han dejado tanto en experiencias, recuerdos, como en lo que han ayudado a ser quien soy a día de hoy, y de los que no puedo más que recoger de manera muy efímera mi gratitud por estar ahí, tan cerca...

Al Dr. Juan Luís Ramos Martín. Por dejarme tener el inmenso orgullo de haber pertenecido a su grupo de investigación y haberme “criado” en tal ambiente científico. Por una confianza en mí que a mi mismo me faltaba. Por su tenacidad y su esfuerzo impagable, mi más sincero reconocimiento queda aquí escrito.

Al Dr. Abraham Esteve Núñez, mi agradecimiento hacia ti se esconde y refleja en cada una de las páginas de esta Tesis. Tratar de seguir tus pasos ha sido una continua constante en mi trabajo, haberte tenido al otro lado de mis dudas y mis vacíos me ha puesto en pie cuando yo no creía poder hacerlo, transmitirme tu entusiasmo y goce en este trabajo, con sus largas horas de charlas y discusiones me ha enseñado a disfrutar del lado bonito de todo esto. Por todo lo que de ti aprendí, que ha sido mucho, gracias.

Al Dr. Bernard Schink, por dejarme visitar su laboratorio en la Universidad de Konstanz, Alemania y por lo que allí conocí. A los miembros de su grupo, el Dr. Bodo Phillip, a Jutta Hellstern, que tanto me ayudó allí y con quien tanto conviví aquí. Al grande y risueño Sven Hobbie, aún me resuenan tus carcajadas en los oídos.

Al Profesor Gerben J. Zylstra y a su grupo de la Universidad de Rutgers, por su inestimable apoyo en todos los sentidos durante el tiempo que estuve en su laboratorio, y por la casita entrañable que pagó por mí. A Sinead, a M. Murillo, que tanto me ayudó en el laboratorio, y sobre todo, a mis puertorriqueñas de New Jersey, Marie, María y Lizbeth, por ese ratito de cariño verdadero americano, esos viajes al super, y otros caminos inolvidables, no concibo otra New Jersey sin vuestros acentos “*puertorriqueños*”.

Al Ministerio de Educación y Ciencia, por concederme la beca FPI con la que he podido realizar esta Tesis. A la UE-US Environmental Task Force y a su coordinador el Dr. Spiros Agathos, por la beca que me permitió visitar Estados Unidos durante más de tres meses, toda una experiencia.

Al Dr. Juan J. Lázaro, por su ayuda, su tiempo y su paciencia con la purificación de proteínas y en el manejo del FPLC.

Al Dr. Pieter van Dillejwin, mi compañero y colega de TNT de los últimos años, por escuchar mi día a día en el laboratorio y no cansarse por ello, y a José Paz, junto a quien acabé literalmente pringado de TNT, quedamos para la próxima noche toledana.

A los miembros del proyecto MADOX, por las reuniones, por los consejos, y por enseñarme sobretodo a confiar en mis resultados.

A Silvia Marqués, por su inestimable punto de vista, sus críticas que siempre sirvieron de ayuda y sus consejos que nunca fueron desestimados, de todo ello aprendí lo que pude. A Chechu, por sus conocimientos transformados en incontables horas de enseñanzas que tan gustosamente me transmitió y que han sido indispensables para esta Tesis, y para lo que me espere en un futuro.

A Carlota Sajnani, esa fuente de energía positiva que tantas veces ha recargado mis baterías contrarrestando mi propio lado negativo. Tú con tus plantas has sido una autentica compañera en este viaje mío con mis “*tenetes*”. Al cabrerito Yañez, que nunca me faltó su apoyo. A Andreas, el *pseudoguiri*, por su amistad de última hora, por darme la réplica, ya sabes, “dale, pum, dale”; A Carmen Herrera, por tu vitalidad contagiosa y tu genial temperamento. A Tesi, por todo aquello que queda y que no desaparece, por dejarme ver otra Granada que nunca se me olvidará, contigo esta Tesis terminó saliendo adelante.

A mis niñas Marian, Mari Carmen e Irene, por hacer un poco de madres adoptivas cuando llegué a Granada tan verde, verde. Porque hacerme esta ciudad y lugar de trabajo un sitio tan fácil de disfrutar.

A la Bernal, que creo ha aguantado mi mal genio de los momentos *chungos* mejor que nadie, por no tenerlos en cuenta y cambiarlos por paciencia y comprensión, por tus preguntas y tu confianza en mis respuestas; a Euge, “Guasa”, tu inocencia, aderezada con su toquecito argentino ha sido un punto de frescura muy lindo, ché; a Javi Medina, cada una de tus sonrisas en esos incontables viajes de largo pasillo valen mucho, compañero; a la Domínguez, un cariño inagotable que tan cercano he sentido. A Wilson, pongan un cubano en su vida, y si encima te sabe ayudar con las primer, no tiene desperdicio...

A todos y cada uno de los numerosos miembros de ahora o de antes con los que coincidido en el grupo de “Degradación de Tóxicos Orgánicos”, colaborar con ellos ha sido una experiencia extraordinaria de la que, entre otras cosas, acaba saliendo esta Tesis, que también os pertenece.

A los miembros de Precarios, y a sus enormes corazones naranjas, por vuestra lucha incansable y desinteresada por tratar de mejorar las cosas. Sois para mí un ejemplo de grandeza humana. A la legión de *embrutecidos*. Que no os dejen engañar, en vosotros reside intacto el espíritu naranja. A las autoridades científicas de este país que han colaborado tanto en crear Precarios y en mantenerlo vivo después de 5 años. Salud y ¡¡¡contratos!!!

A Jose Luís, Curro, Misgue y Alfuan, mis magníficos roteños, porque aunque los últimos pasos hasta llegar a este punto los anduvimos físicamente lejos unos de otros, los

primeros, que tan importantes fueron los hicimos juntos por ese caminito de amistad que entre nosotros elaboramos. Eso que todavía perdura y será imborrable es un legado único en la vida.

Al Dr. Pedro Crevillén. Ya ves, llegué, y aunque te lo he dicho en más de una vez, que sirva este sitio en el puedo dejarlo escrito y donde se merece para decir que, sin ti, yo no hubiera llegado aquí.

Y a todos los demás que aquí no caben porque este simple papel no aguanta para tanto cariño, a todos los que aquí al final se reflejan y saben que los quiero muy mucho, mi trocito de gratitud hacia vosotros os lo dejo aquí juntito, que así guarda mucho más el calor.

Y por supuesto, a AC/DC, *'cos I'm TNT...*

*“Si dejas que camine tras de ti
prometo estarte agradecido...”*

Rosendo

Índice

Introducción	1
1. Degradación de compuestos aromáticos por microorganismos.	4
2. El 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como contaminante.	6
2.1. Propiedades químicas del TNT.	9
2.2. Toxicidad del TNT.	15
3. Metabolismo del TNT.	17
3.1. Metabolismo aerobio en bacterias.	18
3.1.1. Enzimología del TNT en bacterias aerobias.	28
3.2. Metabolismo anaerobio en bacterias.	33
4. Técnicas de descontaminación de TNT.	41
5. Metabolismo del TNT por <i>Pseudomonas putida</i> JLR11.	46

Objetivos **51**

Materiales y métodos **53**

1. Cepas bacterianas y su conservación.	57
2. Medios y condiciones de cultivos	58
2.1. Medios de cultivo.	58
2.2. Condiciones de los cultivos.	60
2.2.1. Cultivos en medios sólidos.	60
2.2.2. Cultivos líquidos aerobios.	61
2.2.3. Cultivos líquidos en anaerobiosis.	61
2.3 Antibióticos y sales metálicas.	61
2.4. Ensayos de resistencia en placas de gradiente.	62
3. Plásmidos	62
4. Aislamiento de ADN plasmídico	69
4.1 Método de la lisis alcalina (preparación a pequeña escala)	69

4.2. Método “QUIApreps”	70
5. Aislamiento de ADN total	70
6. Transferencia de plásmidos.	71
6.1. Por conjugación.	71
6.2. Por transformación mediante choque térmico.	71
6.3. Por electroporación.	71
7. Técnicas comunes de manipulación de ADN.	72
7.1. Restricción de ADN.	72
7.2 Electroforesis de ADN.	72
7.3. Recuperación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa.	73
7.4. Secuenciación de ADN.	73
7.5. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (“PCR”).	73
7.6. Reacción de amplificación de secuencias contiguas a transposones mediante “PCR arbitraria”.	74
7.7. Transferencia de ADN a membrana e hibridación (“Southern blotting”).	75
7.8. Otras técnicas de manipulación de ADN.	76
8. Preparación de genoteca de <i>P. putida</i> en cósmido.	76
8.1. Restricciones parciales de ADN.	76
8.2. Empaquetamiento de cósmidos.	77
8.3. Preparación de células transfectantes de <i>E. coli</i> HB101 y su transfección.	77
9. Construcción de mutantes.	78
9.1. Mutantes generados mediante intercambio alélico.	78
9.2. Mutantes por inserción por recombinación alélica.	79
10. Técnicas comunes de manipulación de ARN.	80
10.1. Extracción de ARN.	80
10.2. Determinación de la concentración de ARN.	81

10.3. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR).	81
11. Determinación de la expresión génica por medio de amplificación en cadena a tiempo real (RT-PCR).	82
11.1 Diseño de cebadores.	82
11.2. Síntesis de ADN _C .	83
11.3. Cuantificación de ADN _C en PCR a tiempo real.	83
12. Métodos analíticos.	84
12.1. Determinación de nitrito.	84
12.2 Determinación de amonio.	85
12.3 Determinación de proteína.	85
12.3.1 Determinación de proteína por el método de Bradford.	85
12.3.2 Determinación de proteína por el método de Lowry	85
12.4. Extracción de compuestos aromáticos de cultivos bacterianos	85
12.5 Técnicas de análisis cromatográfico.	86
12.5.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).	86
12.5.2 Cromatografía de gases y Espectrometría de Masas.	87
13. Análisis del metabolismo <i>in vivo</i> mediante ensayos de células en suspensión (“Resting cell”).	87
14. Preparación de extractos libres de células.	88
14.1. Preparación de extractos citoplasmáticos y de membrana.	88
14. Medida de actividades enzimáticas.	88
14.1. Ensayo de la actividad nitrito reductasa en <i>Pseudomonas putida</i> JLR11.	88
14.1.1. Ensayos <i>in vitro</i> con extractos libres de células	89
14.1.2. Ensayos de detección de la actividad en geles nativos de proteínas.	89

14.2. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad nitroreductasa en extractos libres de células de <i>Pseudomonas putida</i> JLR11.	90
15. Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA).	90
15.1. Separación electroforética en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS).	90
15.2. Separación electroforética en condiciones no desnaturalizantes (EGPA-nativo).	92
16. Sobreexpresión del gen <i>pnrA</i> en <i>E. coli</i> y purificación de la proteína PnrA.	92

Capítulo I: Determinación de las rutas de asimilación del nitrógeno del TNT en *Pseudomonas putida* JLR11.

1. Aislamiento de mutantes deficientes en el metabolismo del nitrito.	99
2. Mutagénesis dirigida del gen <i>nasB</i> de <i>P. putida</i> JLR11.	105
3. Crecimiento en medio líquido de los distintos mutantes con deficiencia en el metabolismo del nitrógeno.	106
4. Crecimiento de las cepas mutantes en TNT.	111
5. Determinación de la actividad nitrito reductasa.	113
6. Análisis comparativos del operón de la nitrito reductasa con respecto a otras <i>Pseudomonadaceas</i> .	114

Capítulo II: Aislamiento y caracterización bioquímica de la nitroreductasa PnrA en *P. putida* JLR11.

1. Identificación de actividad nitroreductasa en extractos libres de células de <i>Pseudomonas putida</i> JLR11 en diferentes condiciones de cultivo.	123
2. Identificación y clonación de genes de nitroreductasas en <i>P. putida</i> JLR11.	124
3. Determinación de la expresión de los genes <i>pnrA</i> y <i>pnrB</i> en <i>Pseudomonas putida</i> JLR11	129

4. Purificación y caracterización de las propiedades cinéticas del enzima PnrA.	130
---	-----

Capítulo III: Implicaciones de la nitroreductasa PnrA en el metabolismo del nitrógeno del TNT en *P. putida* JLR11

139

1. Construcción de la cepa mutante <i>pnrA</i> .	143
2. Resistencia a nitrofurazona de la cepa <i>pnrA</i> .	144
3. Crecimiento en TNT.	146
4. Construcción de la cepa mutante doble <i>nasBpnrA</i> .	150
5. Crecimiento en medio líquido de las cepas mutantes.	152

Discusión

157

1. Metabolismo del nitrito del TNT.	160
2. Mutantes GOGAT de <i>P. putida</i> JLR11.	161
3. Mutantes en sistemas de regulación.	166
4. Análisis comparativo de PnrA con otras nitroreductasas.	174
5. Propiedades funcionales de PnrA.	179

Conclusiones

187

Bibliografía

191

Introducción

Introducción

Uno de los fenómenos sociales de mayor crecimiento y que más repercusión ha tenido en las últimas décadas del siglo pasado ha sido, sin duda alguna, la concienciación hacia las cuestiones medioambientales y la difusión del ecologismo como una preocupación global. No se discute que la expansión e implantación de los idearios ecologistas se deben, sobre todo, a un hecho sin precedentes en la historia universal. Dicho es, el acelerado avance de las tecnologías durante el siglo XX que ha propiciado, entre otras repercusiones, la utilización ilimitada, y sin control en la mayoría de los casos, de los recursos naturales, la destrucción directa de los ecosistemas y la aparición en el medio de nuevos factores que han desmantelado muchos de los finos equilibrios biogeoquímicos que mantienen y regulan el funcionamiento del planeta. Todo ello ha contribuido en diversos grados hasta *propiciar* una pérdida de los balances naturales de los que aún no se pueden predecir todas las consecuencias futuras.

Entre dichos factores no controlados se puede destacar el debido al avance de la industria química, uno de los mayores motores económicos de la segunda mitad del siglo XX, que ha provocado la liberación al medio de compuestos de nueva síntesis, la mayoría de ellos no naturales (xenobióticos). El diseño de nuevas moléculas y estructuras químicas en muchos casos ha tenido como resultado que gran parte de los xenobióticos sean refractarios a su eliminación natural, o lentamente utilizados por uno de los principales sistemas de eliminación y reciclaje de la materia, es decir, la actividad biológica y su repertorio de sistemas enzimáticos para el metabolismo y degradación de la materia orgánica hacia estructuras simples e inocuas. En otras palabras, una gran proporción de los compuestos xenobióticos se acumulan en el medio sin llegar a ser degradados por la falta de mecanismos suficientes que los eliminen, convirtiéndose con ello en contaminantes, muchos de los cuales además son tóxicos ya que son capaces de interactuar con los sistemas biológicos afectando su funcionamiento o destruyéndolos por completo.

Todo ello ha contribuido para crear una inquietud cada vez más generalizada por parte de las agencias gubernamentales e industria por diseñar y poner en marcha protocolos de actuación para la recuperación de zonas contaminadas y la eliminación de estos compuestos xenobióticos del medio. Hasta

hace poco, las soluciones más utilizadas para la eliminación de estos compuestos contaminantes del medio han sido la incineración o el almacenaje en depósitos. Sin embargo, ambos presentan graves problemas que contribuyen a una aceptación cada vez menor por parte de la sociedad, sobre todo en el caso de la creación de vertederos de almacenamiento, de donde pueden acabar escapándose por filtración hacia aguas subterráneas o desgaste del sistema de almacenaje a largo plazo. Por otra parte, la incineración provoca la liberación de gases tóxicos que contribuyen al empeoramiento de la calidad del aire.

Una solución para muchos de los contaminantes de origen orgánico debe tener en cuenta por tanto la estimulación de los procesos naturales de degradación, en los cuales los microorganismos, tanto bacterias como hongos, debido a su versatilidad metabólica y su capacidad de adaptarse rápidamente a condiciones variables en su hábitat natural, juegan un papel vital al poder metabolizarlos hasta moléculas simples o fácilmente degradables. A ello hay que sumar unas ventajas claras en cuanto a costes (ver Tabla 1.1.) y aceptación social. Este tipo de prácticas tienen numerosos ejemplos positivos en la literatura que apoyan su utilización (de Bruin, *et al.*, 1992; Kaufman y Kreuger, 1997; Pritchard y Costa, 1991; Roberts, *et al.*, 1997; Suflita, *et al.*, 1988).

Tabla 1.1. Comparación de distintos métodos de tratamiento de zonas contaminadas.

Tipo de tratamiento	Coste por metro cúbico (\$)	Tiempo necesario (meses)	Factores adicionales	Cuestiones de seguridad
Incineración	325-1000	6-9	Energía	Contaminación atmosférica
Vertedero	195-325	6-9	Control a largo plazo	Lixiviación
Biotratamiento	50-130	6-9	Tiempo requerido	Metabolitos intermedios

^a Tabla adaptada de (Levin y Gealt, 1997)

1. Degradación de compuestos aromáticos por microorganismos.

Gran parte de los compuestos xenobióticos orgánicos emitidos a la biosfera contienen en su estructura un anillo aromático: gasolina y otros derivados

Introducción

del petróleo, bifenilos policlorados (PCBs), fungicidas policlorados (pentaclorofenol), nitroaromáticos como herbicidas (dinoseb) y explosivos (TNT), entre otros. El hecho de que los microorganismos tengan la capacidad de metabolizar estos compuestos no resulta extraño, ya que en la naturaleza abundan los compuestos aromáticos de bajo peso molecular como aminoácidos (triptófano, fenilalanina y tirosina), quinonas, flavonoides, compuestos fenólicos y taninos. Aun así, las estructuras con anillos aromáticos con mayor presencia en la naturaleza se encuentran en los polímeros de lignina de las plantas superiores. Algunos microorganismos han evolucionado de manera que han logrado adaptar a la perfección sus capacidades metabólicas para la utilización de compuestos xenobióticos. Se han descrito numerosos casos de rutas metabólicas perfectamente reguladas y estructuradas para la degradación de compuestos no naturales, como el naftaleno, el ácido prícrico, diversos nitrotoluenos o nitrobenzoatos, entre otros (Franklin, *et al.*, 1981; Kube, *et al.*, 2004; Mosqueda, *et al.*, 1999; Nga, *et al.*, 2004; Nishino y Spain, 2004; Nishino, *et al.*, 2000; Parales, 2000).

Todas las estructuras aromáticas resultan ser muy estables (Aihara, 1992), por lo que los microorganismos recurren a mecanismos que disminuyen la energía de resonancia del anillo que permitan su apertura y la utilización de la cadena carbonada resultante como sustrato en su crecimiento.

Los microorganismos aerobios siguen el mismo patrón metabólico en cuanto a degradación de aromáticos se refiere: la eliminación de los sustituyentes del anillo para dejar posiciones libres que resultan hidroxiladas. Estas hidroxilaciones suelen ser catalizadas por oxigenasas o dioxigenasas que utilizan O₂ como sustrato, y su objetivo es disminuir la estabilidad del anillo para proceder a su apertura oxidativa. Esto convierte al catecol y sus derivados en los intermedios centrales del metabolismo aerobio de compuestos aromáticos. Las enzimas que intervienen en estos procesos pueden ser de codificación cromosómica (Mosqueda, *et al.*, 1999) o plasmídica (Harayama, *et al.*, 1989; Ramos, *et al.*, 1987).

En aquellos lugares donde el oxígeno es un factor limitante, o no está disponible, como sucede en suelos, sedimentos y acuíferos (Atlas, 1997), la

disponibilidad de oxígeno es el principal problema de la biorrecuperación. La solubilidad del oxígeno en el agua es baja, y la demanda de oxígeno para la degradación de hidrocarburos muy alta. En estos ambientes no es posible la eliminación natural de los contaminantes aromáticos con un metabolismo basado en la ruptura oxigenolítica del anillo. Sin embargo, desde hace mucho tiempo se conoce que, en ambientes anóxicos, no se acumulaban compuestos aromáticos de bajo peso molecular, por lo que debían ser consumidos por microorganismos autóctonos (Evans, 1977).

La degradación de compuestos aromáticos en ambientes anóxicos se basa principalmente en “guiar” los compuestos aromáticos a través de rutas enzimáticas para converger hacia tres compuestos claves, de los cuales se pueden distinguir dos vías distintas de degradación (revisado por (Heider y Fuchs, 1997):

1. Ruta del Benzoil-CoA. El acetyl CoA. Activa el anillo de manera que la benzoil-CoA reductasa es capaz de reducir los dobles enlaces creándose posteriormente una estructura abierta que se metaboliza hasta acetyl-CoA y CO₂ (Harwood, *et al.*, 1999).
2. Ruta del floroglucinol y resorcinol. En este caso, los compuestos aromáticos se metabolizan hasta formar estos anillos bencénicos hidroxilados que se reducen hasta acetato y butirato sin requerir un aceptor de electrones externo; esto hace que se puedan utilizar, incluso, por organismos fermentativos estrictos como *Pelobacter* y *Clostridium sp.* (Brune y Schink, 1992; Kluge, *et al.*, 1990). El resorcinol también puede sufrir una ruptura hidrolítica, que sólo se ha descrito en bacterias denitrificantes (Gorny, *et al.*, 1992).

2. El 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como contaminante.

Dentro de los compuestos aromáticos, uno de los grupos xenobióticos de mayor uso es el de los nitroaromáticos (Hartter, 1985). Así por ejemplo, la mayoría de los herbicidas son compuestos de este tipo, como el dinoseb. Los nitrobenzenos se utilizan como disolventes, y los polinitroaromáticos como el TNT o el ácido pícrico se utilizan como explosivos. Otros muchos sirven como

Introducción

precursores de otros compuestos de síntesis como poliuretanos, fármacos, tintes, etc.

Dentro de todos ellos, la utilización del TNT como explosivo militar por parte de la mayoría de los estados durante la primera mitad del siglo XX lo ha convertido en el de mayor producción de todos los nitroaromáticos. Incluso los datos recientes hablan de una producción anual de TNT de aproximadamente 2 millones de toneladas (Hartter, 1985). La contaminación con TNT es muy abundante en el suelo y aguas subterráneas de instalaciones dedicadas a la producción y almacenaje de explosivos. Además, el agua utilizada durante su producción, de la que se necesitan grandes cantidades para la purificación del TNT (Levsen, *et al.*, 1993) debe ser almacenada ya que está fuertemente contaminada. Estas aguas residuales, que se denominan *aguas rosas* por el color característico que adquieren (ver Fig. 1.1.), contienen hasta 30 nitroaromáticos distintos junto con el TNT (Urbanski, 1985). Sin embargo, a menudo éstas acaban esparciéndose desde balsas construidas para su almacenaje, contaminando con ello las zonas y acuíferos adyacentes. A éstas se suman las liberaciones accidentales producidas durante la carga, empaquetamiento y ensamblaje de la munición que contiene una gran cantidad de explosivos además de otros nitroaromáticos (NDCEE, 1995).



Fig. 1.1. Aspecto de una zona empantanada con aguas contaminadas con TNT proveniente de una factoría de dedicada al desmantelado de munición militar. Este agua recibe el nombre de *aguas rosas* debido a la intensa coloración que adquieren por la presencia del TNT (Foto por cortesía de José A. Paz).

El uso masivo de TNT durante la Primera y Segunda Guerra Mundial provocó la liberación de cantidades ingentes de TNT en el medio, y con ello la contaminación de numerosas zonas y acuíferos que, en el caso de Alemania, debido a que la mayoría de las factorías de municiones (ver Fig. 1.2.) se desmantelaron sin ningún tipo de consideración hacia el daño ambiental, supuso un grave problema que aún persiste, ya que muchas de las zonas afectadas siguen presentando niveles excesivos de explosivos. Cabe usar este ejemplo como ilustración del carácter extraordinariamente recalcitrante del TNT, aún presente en las zonas contaminada en cantidades masivas tras el paso de 60 años.

Esta persistencia podría deberse, por un lado a que hasta la fecha tan sólo se conocen cuatro compuestos naturales de tipo nitroaromático, el cloramfenicol, la oxypirrolnitrina (Hattor, *et al.*, 1970), la nitropyoluteorina (Ohmori, *et al.*, 1978) y la fidolopina (Tischler, *et al.*, 1986). La baja degradabilidad de estos compuestos en la naturaleza se debería así a la falta de rutas enzimáticas adaptadas para eliminar este tipo de compuestos.



Fig. 1.2. Mapa de Alemania que muestra aquellos emplazamientos donde durante la II Guerra Mundial la producción de TNT superaba las 1700 toneladas al mes. Los números en paréntesis indican la producción mensual de TNT en toneladas. (Figura adaptada de (Spain, 2000)

En el caso del TNT sin embargo, el problema ambiental de su persistencia en el medio como contaminante se agrava por su alta toxicidad, y ambos fenómenos se explican por a la particular estructura molecular de este compuesto. Es necesario por tanto hacer un inciso en las propiedades químicas del TNT para poder explicar sus posibilidades como compuesto utilizable como metabolito por microorganismos.

2.1. Propiedades químicas del TNT.

El 2,4,6-trinitrotolueno muestra una estructura aromática tipo benzilo sustituida simétricamente con tres grupos nitro. La electronegatividad de los grupos nitro ejerce una atracción sobre los electrones β del anillo aromático, confiriendo a éste cierto carácter electrófilo. Esto será fundamental en lo referente al metabolismo microbiano del compuesto, ya que la deficiencia electrónica del anillo impedirá el ataque de las oxigenasas, enzimas que se encargan de abrir la estructura aromática, desestabilizándola mediante hidroxilaciones a partir de O_2 .

El grupo nitro está formado por dos elementos diferentes, ambos muy electronegativos, y que compiten por los electrones disponibles. La

electronegatividad del oxígeno es mayor que la del nitrógeno, originándose una polarización del enlace N-O. La carga positiva sobre el átomo de nitrógeno, combinada con la electronegatividad del elemento hace que el grupo nitro sea fácilmente reducible. Esta reducción influirá, notablemente, sobre la biodegradación del explosivo y su persistencia en ambientes contaminados.

El grupo metilo además es un elemento donante de electrones, lo que, por un lado, limita la deficiencia de electrones del anillo bencénico, pero por otro lado, este grupo deja de ser susceptible al ataque por oxigenasas, contribuyendo con ello a la denominada forma hiperconjugativa de la estructura del TNT (Rieger y Knackmuss, 1995).

La reducción del grupo nitro puede producirse mediante la transferencia de 2 e⁻ que daría lugar a los intermedios nitroso (Ar-NO), hidroxilamino (Ar-NHOH) y amino (Ar-NH₂), como se muestra en la Figura 1.3. Las enzimas nitroreductasas son capaces de catalizar esta reacción, y se describirán posteriormente en la sección X de esta *Introducción* debido al papel clave que juegan en el metabolismo del TNT. A éstas hay que añadir otras enzimas que son también capaces de reducir compuestos nitroaromáticos; entre ellas destacan la aldehído oxidasa (Wolper, *et al.*, 1973), la citocromo B5 reductasa (Mason y Holtzmann, 1975), la citocromo P450 (Eilers, *et al.*, 1999; Leung, *et al.*, 1995) y enzimas tipo diaforasas (Kato, *et al.*, 1969).

Los grupos nitro también se pueden reducir mediante transferencias de 1 e⁻ a través de un radical nitroanión (Figura 1.3.). Este radical podría reaccionar con oxígeno para producir un radical superóxido, y formar el nitroaromático original a través de un ciclo fútil. Se puede hacer una primera clasificación de enzimas nitroreductasas dependiendo de cómo lleven a cabo el primer paso de reducción (Cerniglia y Somerville, 1995): Las enzimas Tipo I o “insensibles a oxígeno”, que son aquellas que reduce el grupo nitro a través de transferencias sucesivas de 2 e⁻, y las Tipo II o “sensibles a oxígeno”. Aquellas que el primer paso de reducción es mediante creación del nitroanión por cesión de 1 e⁻. Éstas se pueden encontrar en bacterias del género *Clostridium* (Angermaier y Simon, 1983) y en enterobacterias como *E. coli* (Peterson, *et al.*, 1979).

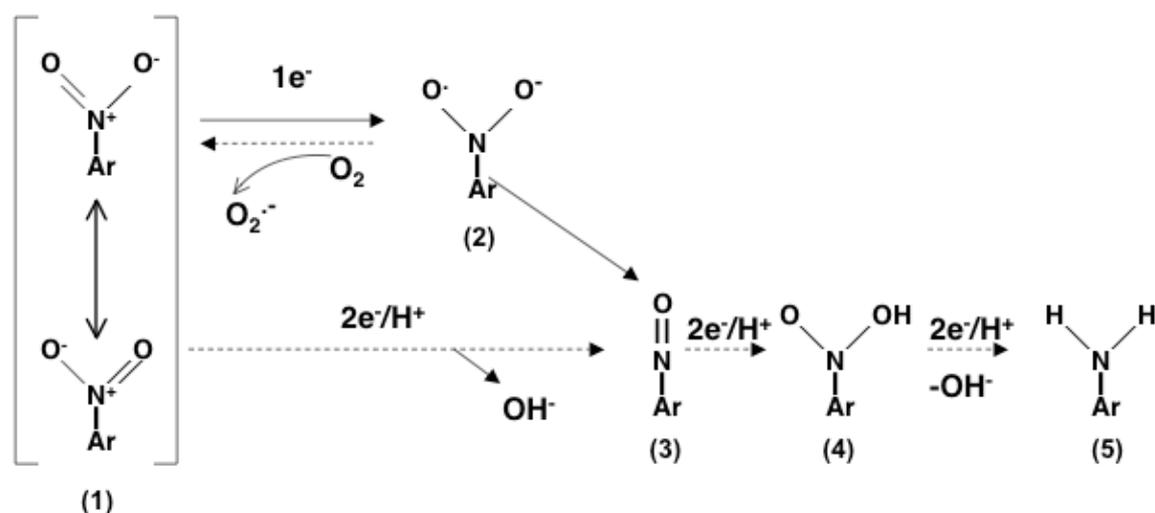


Figura 1.3. Mecanismos de reducción del grupo nitro en compuestos nitroaromáticos (ArNO_2). El primer paso en la reducción de un grupo nitro puede producirse por transferencia de un electrón (línea continua) o de dos electrones (línea discontinua). La primera genera un radical nitroanión que puede reaccionar con oxígeno para producir un radical superóxido (2) y la formación del nitroaromático original (1) a través de un ciclo futile (línea punteada). Una vez alcanzado el intermedio nitroso (3), sucesivas transferencias de dos electrones dan lugar a los intermedios hidroxilamina (4) y finalmente amina (5).

La reducción del grupo nitro es posible en ausencia del enzima, a través de transportadores de electrones en estado reducido, como el FADH_2 (Kamm y Gillette, 1963) o la ferredoxina (Lindmark y Muller, 1976).

La reducción abiótica del grupo nitro a amino es un fenómeno observado en suelo, sedimentos y acuíferos (Haderlein y Schwarzenbach, 1995). Este tipo de reacciones son posibles en ambientes naturales por la abundancia de materia orgánica y de especies de hierro y azufre reducidas que actúan como posibles donadores de electrones. Estas especies se encuentran implicadas de forma continua en los procesos biogeológicos y al encontrarse íntimamente acopladas a la actividad microbiana hacen que el estudio de estos procesos redox resulte fundamental (Haderlein, *et al.*, 2000; Hofstetter, *et al.*, 1999; Rügge, *et al.*, 1998).

En la molécula de TNT la velocidad con que se reduce el primer grupo nitro es mucho mayor que la reducción de los grupos restantes. Esto se debe a que la conversión de grupos nitro en grupos amino, donadores de electrones, hace que disminuya la deficiencia electrónica del anillo, dificultando con ello la reducción de otro grupo nitro. De hecho, Johnson y colaboradores han observado que el producto de reducción del TNT, el aminodinitrotolueno, al aumentar la densidad

electrónica del anillo aromático, es susceptible de ser atacado por distintas enzimas oxigenasas con la consiguiente hidroxilación del anillo aromático (Johnson, *et al.*, 2001). Así, para lograr la reducción de la totalidad de los grupos nitro del TNT y obtener triaminotolueno (TAT), se requieren potenciales redox inferiores a -200 mV, propios de ambientes anóxicos (Funk, *et al.*, 1993; Hofstetter, *et al.*, 1999; Preuss, *et al.*, 1993).

Los distintos grupos nitro del TNT no muestran el mismo comportamiento frente a la reducción. Barrows y colaboradores (1996) plantearon como hipótesis que el paso que establecía la regioselectividad, en la reducción de los nitroaromáticos, era la transferencia del primer protón al radical anión originado tras la reducción inicial, y que el grupo nitro con la carga negativa más localizada sería probablemente el más fácilmente protonable y en consecuencia reducible. En el caso del TNT, la posición *para* se reduce preferentemente, probablemente por el efecto desapantallante del metilo sobre el grupo nitro en *orto* (Figura 1.4.).

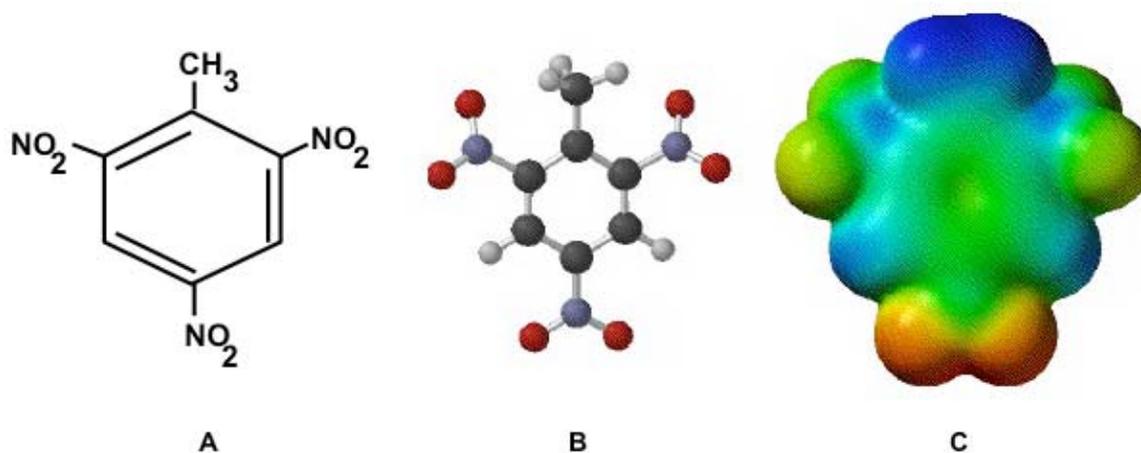


Figura 1.4. (Página anterior). Distintas representaciones de la molécula de TNT. La representación A, corresponde a la estructura tipo *Kekulé* para el compuesto; en la B, el TNT se representa mediante un modelo de esferas, apareciendo los átomos de carbono (esferas negras), hidrógeno (esferas grises), nitrógeno (esferas azules) y oxígeno (esferas rojas). En el modelo C, se ha representado las superficies con el mismo potencial electrostático mediante colores; así, el color rojo correspondería a regiones con el potencial más negativo (máxima atracción hacia cargas positivas); mientras que el color azul, correspondería a regiones con potenciales menos negativos. El grupo nitro, reducible experimentalmente, corresponde con el que muestra mayor carga negativa (color rojo) según los estudios teóricos. En el caso del TNT es el grupo nitro, en posición *para*, el que tiene el potencial más negativo (Figura adaptada (Barrows, *et al.*, 1996)

Introducción

La reducción del grupo nitro de compuestos aromáticos (Ar-NO_2) por bacterias, sucede de un modo similar a la reducción de nitrato durante la desnitrificación. Se podría esperar la existencia de paralelismo entre la química de reducción del nitrito (NO_2^-) y la del nitroaromático al contener ambos enlaces N-O y el mismo estado de oxidación (+3) para el nitrógeno; pero la distribución de los electrones de valencia en este elemento, especialmente la ausencia de pares solitarios, hace que el ArNO_2 presente mayor similitud con el nitrato (NO_3^-) que con el nitrito (NO_2^-). Las analogías entre la reducción de estas especies resultan de interés y fueron revisadas por (Averill, 1995).

La deficiencia electrónica del anillo aromático del TNT hace posible el ataque nucleófilo al anillo que daría lugar a estructuras no aromáticas del tipo de los complejos de Meisenheimer (Kaplan y Siedle, 1971). Estos compuestos presentan una intensa coloración roja-anaranjada en solución, y una carga negativa deslocalizada sobre el anillo y los grupos nitro (Figura 1.5.). Sucesivos ataques de H^- sobre la molécula podría generar complejos dihidruros de TNT (Vorbeck, *et al.*, 1998). Se conocen varias proteínas de la familia OYE (en inglés, **O**ld **Y**ellow **E**nzyme) que son reductasas de ésteres de nitrato, capaces de llevar a cabo esta reacción sobre el TNT (French, *et al.*, 1998; Pak, *et al.*, 2000; Williams y Bruce, 2000). Esta familia de proteínas se revisará posteriormente en la sección X de esta *Introducción*.

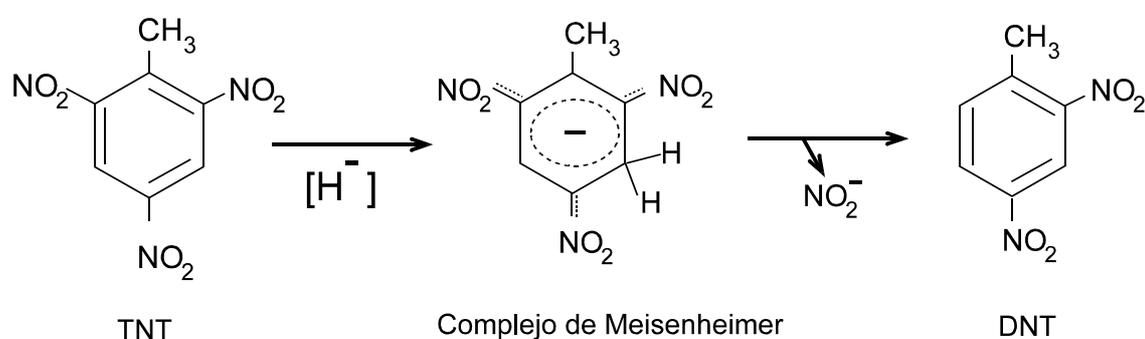


Figura 1.5. Mecanismo propuesto para la formación de complejos de Meisenheimer de TNT. La formación *in vivo* de estos complejos a partir de TNT se llevan a cabo mediante el ataque nucleófilo de iones hidruro

(H), posiblemente procedentes de piridín nucleótidos reducidos. El complejo de Meisenheimer tiende a perder un grupo nitro, en forma de nitrito, para estabilizarse y recobrar su carácter aromático como dinitrotolueno (French *et al.*, 1998).

En otros compuesto nitroaromáticos se han descrito reducciones del grupo nitro hasta hidroxilamina como reacción clave para la apertura del anillo. Así por ejemplo, el derivado hidroxilamino puede sufrir el ataque por parte de enzimas hidroxilaminoliasas que adicionan un hidroxilo proveniente de una molécula de agua con el resultado de la liberación de amonio (Groenewegen y de Bont, 1992; Hughes y Williams, 2001b; Meulenberg, *et al.*, 1996). Otro tipo de reacción es el reagrupamiento de Bamberger. Éste consiste en un mecanismo por el que una hidroxilamina de arilo sufre la ruptura del enlace N-OH, para convertirse en un compuesto fenólico mediante el reagrupamiento intramolecular en el que el grupo hidroxilo del hidroxilamino pasa a la posición *orto* del anillo aromático (Figura 1.6.). Dicho mecanismo se ha descrito en numerosos casos de degradación de mononitroaromáticos (Nishino, *et al.*, 2000) en las que este reagrupamiento lo llevan a cabo enzimas de tipo mutasas (He, *et al.*, 2000; Nadeau, *et al.*, 2003). En el caso del TNT, Hughes y colaboradores (Hughes, *et al.*, 1998b) han descrito un reagrupamiento de este tipo en extractos libres de células; más recientemente se ha atribuído a la CO deshidrogenasa (Huang, *et al.*, 2000) y a la Fe-hidrogenasa (Watrous, *et al.*, 2003) la formación de estos reagrupamientos en derivados del TNT.

Introducción

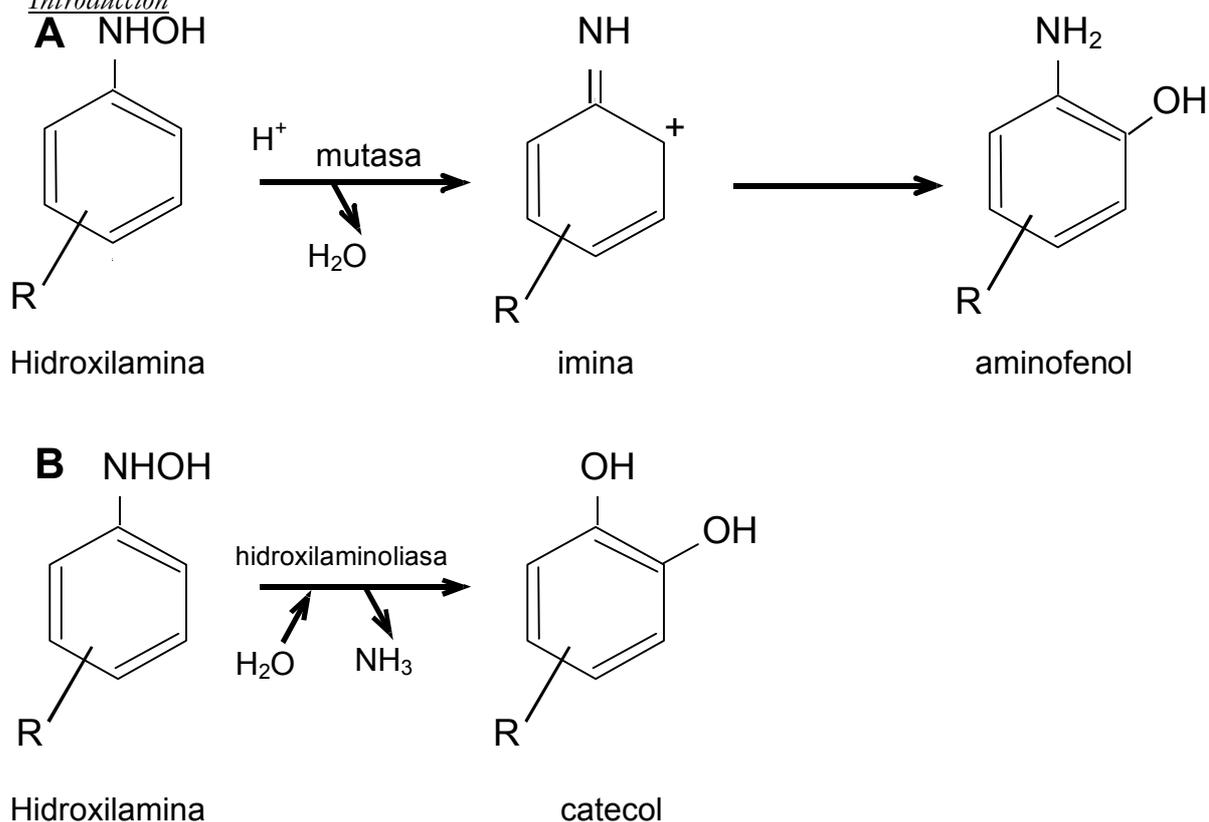


Figura 1.6. Reacciones iniciales en metabolismos productivos de hidroxilaminas aromáticas. **A.** Mecanismo propuesto para el reagrupamiento de Bamberger en hidroxilaminas mediado por enzimas mutasas. Las hidroxilaminas de arilo sufren un reagrupamiento interno sin la necesidad de participación de moléculas de H₂O externas, para dar el aminofenol. **B.** En la caso de una transformación por hidroxilaminoliasas, el amonio sale directamente formando el derivado catecol.

2.2. Toxicidad del TNT.

El TNT es un compuesto altamente tóxico, por lo que se encuentra en la lista de los contaminantes más importantes de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos. Es más, los productos derivados provenientes de sus posibles transformaciones ambientales, incluyendo arylaminas, arylhidroxiaminas, y productos resultantes de condensaciones como los azoxy- y azo-compuestos, son igualmente o incluso más tóxicos que el nitroaromático de partida (Hawari, *et al.*, 1999). Durante la I y II Guerra Mundial, por ejemplo, se dieron casos de muerte entre trabajadores en fabricas de munición por graves problemas de anemia e ictericia. Se sabe además que la dosis letal (DL₅₀) oral en ratas es de 1g/kg/día (NDCEE, 1995), y pruebas de toxicidad como el Mutatox o de algas verdes han confirmado al TNT como el más tóxico de todos los explosivos nitroaromáticos (Dodard, *et al.*, 1999; Tadros, *et al.*, 2000).

Los efectos tóxicos y mutagénicos del TNT sobre microorganismos (Honeycutt, *et al.*, 1996; Spanggord, *et al.*, 1995; Vaatanen, *et al.*, 1997), algas (Tadros, *et al.*, 2000; Won, 1976), invertebrados (Robidoux, *et al.*, 1999) y organismos superiores (Banerjee, *et al.*, 1999; Brooks, *et al.*, 1997; Gong, *et al.*, 1999; Johnson, *et al.*, 1994; Liu y Magasanik, 1995; Tchounwou, *et al.*, 2001) están bien documentados en la literatura científica. Aunque los nitroaromáticos pueden por si mismo producir mutagénesis en el ADN (Spanggord, *et al.*, 1982; Styles y Cross, 1983), su carácter mutagénico se encuentra ligado al proceso de reducción del grupo nitro (Rafii, *et al.*, 1994). En bacterias se ha descrito que el efecto mutagénico del TNT aumenta al hacerlo la actividad nitroreductasa de la cepa (Tan, *et al.*, 1992), pero la completa reducción del grupo nitro a amino parece hacer disminuir el efecto mutagénico del explosivo. Sin embargo los intermedios nitroso e hidroxilamina son los más reactivos y los últimos responsables de los efectos tóxicos. Una toxicidad también demostrada de los intermedios hidroxilaminos de dinitrotoluenos mediante la prueba de Ames (Padda, *et al.*, 2003). En los procesos de reducción de los grupos nitros por transferencia de $1e^-$, se generan radicales superóxido que dañan el ADN. Se sabe que la exposición de TNT a extractos enzimáticos de tejidos de cerebro, riñón o hígado en presencia de NAD(P)H provoca la liberación de especies reactivas de oxígeno (Zitting, *et al.*, 1982). También se ha descrito la formación de aductos entre hidroxilaminas esterificadas y la guanina (Heflich, *et al.*, 1985). Además, el derivado nitroso resultante de la reducción con 2 electrones del grupo nitro puede también reaccionar con los grupos tiol (-SH) de proteínas o de péptidos celulares como el glutatión, lo que ha propuesto la formación del semimercaptol y el consiguiente reagrupamiento que produce sulfinamidas (Savolainen, *et al.*, 1985). El estudio del transcriptoma en líneas celulares humanas expuestas a TNT demuestra una activación de numerosos genes implicados en respuesta a daños celulares, tanto de proteínas como de ADN (Tchounwou, *et al.*, 2001). Un estudio similar en la bacteria *Stenotrophomonas* sp. OK-5 (Ho, *et al.*, 2004) mostró resultados de las mismas características, incluyendo además un efecto claro en cuanto a la regulación de la síntesis y degradación de los lípidos de membrana.

En mamíferos se ha demostrado la reducción de la oxihemoglobina por parte de la hidroxilaminodinitrotolueno para formar ferrihemoglobina y nitrosodinitrotolueno. En los eritrocitos de la sangre estas reacciones se convierten en ciclos fútiles ya que el derivado nitroso se volverá a reducir a hidroxilamina, que reaccionará de nuevo con la oxihemoglobina (Bakhtiar, *et al.*, 1997; Kiese y Tager, 1976; Liu y Magasanik, 1995; Marozienne, *et al.*, 2001). Así, operarios que trabajaban en instalaciones de producción y manejo de TNT han mostrado síntomas de hemotoxicidad, y en su orina se detectaron metabolitos de reducción de TNT como hidroxilamina- y aminodinitrotolueno (Coombs y Schillack, 1998). La reducción de grupos nitro en organismos superiores podría llevarse a cabo a través de la microflora bacteriana del tracto gastrointestinal (Rafii, *et al.*, 1991; Zacariah y Juchau, 1974).

Por otra parte, la exposición prolongada al TNT se ha asociado con enfermedades como la pancytopenia, como resultado de un fallo en la médula ósea (Amdur, *et al.*, 1991), hepatitis, dermatitis, y daños oculares. En este sentido, se ha comprobado que el TNT induce un tipo característico de cataratas (Tiukina, 1967) cuyo origen se ha propuesto por la actividad NADPH reductasa del enzima β -cristalin, presente en la lente ocular, que capaz de transferir un electrón al TNT y provocando con ello la aparición de especies reactivas de oxígeno (Kumagai, *et al.*, 2000).

3. Metabolismo del TNT.

Aunque los compuestos xenobióticos nitroaromáticos se consideran como recalcitrantes, existen numerosos casos descritos en la literatura de metabolismo y mineralización de un número importante de ellos y que se ha recogido en diversos trabajos de revisión (Crawford, 1995b; Gorontzy, *et al.*, 1993; Higson, 1992; Kaplan, 1989; Meulenberg y de Bont, 1995; Nishino, *et al.*, 2000; Peres y Agathos, 2000; Spain, 1995; Walker y Kaplan, 1992). Sin embargo, la estructura de los nitroaromáticos hace que, a mayor número de sustituyentes nitro presentes en la molécula, más complicado resulta su mineralización (Rieger y Knackmuss, 1995) debido al comportamiento más refractario al metabolismo oxidativo (ver sección 2.1. de esta *Introducción*). Así, en el caso del TNT se han descrito muy pocos casos

de utilización del TNT como fuente de carbono y nitrógeno en bacterias. Sin embargo, se han descrito numerosos procesos bioquímicos y diferentes transformaciones llevadas a cabo por bacterias, hongos, plantas y organismos superiores sobre el TNT. De todo ello, y justificado por la importancia de este compuesto como contaminante, han surgido en la literatura varias revisiones dedicadas en concreto al metabolismo de este compuesto (Esteve-Núñez, 2001; Hawari, *et al.*, 2000; Heiss y Knackmuss, 2002; Lewis, *et al.*, 2004; Rodgers y Bunce, 2001; Snellinx, *et al.*, 2002). En esta sección de la *Introducción* se resumirá lo más destacado de los últimos años en cuanto al metabolismo del TNT por parte de microorganismos.

3.1. Metabolismo aerobio en bacterias.

Aunque el metabolismo oxigenolítico de compuestos nitroaromáticos se ha demostrado en varios géneros bacterianos, éste se ha limitado a compuestos mononitro- (Haigler y Spain, 1993; Haigler, *et al.*, 1994b; Hanne, *et al.*, 1993; Nishino y Spain, 1993; Rhys-Williams, *et al.*, 1993; Roldan, *et al.*, 1998; Spiess, *et al.*, 1998) y dinitroaromáticos (Haigler, *et al.*, 1996; Spanggord, *et al.*, 1991; Suen, *et al.*, 1996). La peculiar estructura del TNT, comentada anteriormente, impide que sea sustrato de oxigenasas, por lo que debe ser transformado inicialmente a través de un metabolismo reductivo.

Las bacterias aerobias tienden a transformar la molécula reduciendo uno o dos grupos nitro y produciendo diferentes isómeros de hidroxilaminas y aminas aromáticas que se acumulan en los medios de cultivo. Los intermedios de reducción nitroso e hidroxilamina reaccionan entre sí, en presencia de oxígeno, para formar azoxinitrotoluenos recalcitrantes (Haïdour y Ramos, 1996). Estas transformaciones reductivas pueden eliminar el explosivo en un alto grado, pero no puede considerarse una degradación completa del nitroaromático por resultar tóxicos los metabolitos de reducción generados (Banerjee, *et al.*, 1999; Brooks, *et al.*, 1997; Honeycutt, *et al.*, 1996; Johnson, *et al.*, 1994; Spanggord, *et al.*, 1995; Tadros, *et al.*, 2000), y no ser metabolizados por la mayoría de los microorganismos que los producen.

Tan sólo en algunas ocasiones se han documentado bacterias capaces de utilizar al explosivo como fuente de carbono o nitrógeno, e incluso menos

Introducción

frecuentes son los casos de mineralización descritos (ver Tabla 1.2). A continuación se revisarán los mecanismos más interesantes descritos para el metabolismo aerobio de bacterias que llevan a cabo transformaciones significativas de TNT en productos mineralizables por si mismos, o por otros microorganismos, además se ocupará una sección dentro de este apartado para describir la enzimología del TNT más interesante descrita hasta la fecha. Las distintas reacciones se ilustran, al final de este apartado, en la Figura 1.7.

Tabla 1. 2. Microorganismos aerobios que degradan o transforman TNT.

Microorganismo	Metabolismo	Referencia
<i>Pseudomonas sp.</i> IIBx	Primera evidencia de mineralización de ¹⁴ C-TNT.	(Traxler, <i>et al.</i> , 1974)
<i>Pseudomonas sp.</i> 1-2wt	Primera evidencia de mineralización de ¹⁴ C-TNT.	(Traxler, <i>et al.</i> , 1974)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B3468	Degradación de TNT hasta floroglucinol y pirogalol. El nitrógeno del TNT se liberó como amonio.	(Naumova, <i>et al.</i> , 1988)
<i>Pseudomonas sp.</i> FR2	Reducción de TNT a DANT.	(McCormick, <i>et al.</i> , 1976)
<i>Pseudomonas sp.</i> CBS3	Reducción de TNT a DANT.	(Schackmann y Muller, 1991)
<i>Pseudomonas sp.</i>	TNT como fuente de nitrógeno. Transformación de TNT en ADNTs.	(Jones, <i>et al.</i> , 1995)
<i>Pseudomonas sp.</i> clon A	Cepa híbrida capaz de utilizar el TNT como fuente de nitrógeno y degradar el anillo.	(Duque, <i>et al.</i> , 1993)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Participación en un consorcio capaz de mineralizar hasta un 45% del	(Robertson y Jjemba, 2005)

	TNT y utilizarlo como fuente de carbono y nitrógeno.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MX	Formación de ADNTs además de productos denigrados DNTs y NTs, y de la 3,5-dinitroanilina.	(Oh, <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MA101	Transformación de TNT y ADNTs en compuestos de alta polaridad, a través de un mecanismo dependiente de oxígeno.	(Alvarez, <i>et al.</i> , 1995)
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	Denitración de TNT y reducción del grupo nitro a amino.	(Martin, <i>et al.</i> , 1997)
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Reducción de grupo nitro y liberación de nitrito a partir de 2,4-dihydroxylamina-6-nitrotolueno.	(Fiorella, 1997)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> I-C	Una flavoproteína oxidoreductasa, dependiente de NADPH, cataliza la transformación de TNT en NHOH-DNT, H-TNT y 2H-TNT.	(Pak <i>et al.</i> , 2000)
<i>Mycobacterium vaccae</i>	50% de la radioactividad de ¹⁴ C-TNT se incorporó a lípidos.	(Vanderberg, <i>et al.</i> , 1995)
<i>Mycobacterium sp.</i> HL4NT-1	Células cultivadas en 4NT transforman TNT en complejos de Meisenheimer.	(Vorbeck, <i>et al.</i> , 1994)
<i>Enterobacter sp.</i>	Transformación de TNT en compuestos polares no identificados, y 3% de mineralización.	(Bae, <i>et al.</i> , 1995)
<i>Enterobacter cloacae</i> PB2	Reducción de TNT a complejos de Meisenheimer y liberación de nitrito.	(French, <i>et al.</i> , 1998)

Introducción

<i>Enterobacter sp.</i>	Participación en un consorcio capaz de mineralizar hasta un 45% del TNT y utilizarlo como fuente de carbono y nitrógeno.	(Robertson y Jjemba, 2005)
<i>Acinetobacter sp.</i>	Participación en un consorcio capaz de mineralizar hasta un 45% del TNT y utilizarlo como fuente de carbono y nitrógeno.	(Robertson y Jjemba, 2005)
<i>Klebsiella oxytoca</i> C1	Denitra el TNT formando 2,4-DNT y nitrito. Mineraliza hasta un 6% del TNT.	(Kim, <i>et al.</i> , 2002)
<i>Serratia Marcensens</i>	TNT como única fuente de carbono y energía en presencia de Tween 80.	(Montpas, <i>et al.</i> , 1997)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	TNT como única fuente de energía.	(Oh y Kim, 1998)
<i>Bacillus sp.</i>	Liberación de nitrito de la molécula de TNT y transformación hasta 2-amino-4-nitrotolueno.	(Kalafut, <i>et al.</i> , 1998)
<i>Bacillus subtilis</i> SK1	Liberación de nitrito de la molécula de TNT.	(Kurinenko, <i>et al.</i> , 2003)
<i>Staphylococcus sp.</i>	Liberación de nitrito de la molécula de TNT y transformación hasta 2-amino-4-nitrotolueno.	(Kalafut, <i>et al.</i> , 1998)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Células cultivadas en ácido pícrico, transforman TNT en complejos de Meisenheimer.	(Vorbeck, <i>et al.</i> , 1998)

La primera evidencia de mineralización de TNT la obtuvo Traxler y colaboradores (1974), aunque la cepa de *Pseudomonas sp.*, que utilizaron en sus experimentos obtuvo niveles muy bajos de mineralización (0,25%) del explosivo. Estos bajos niveles se atribuyeron a la fijación heterotrófica de CO₂ por parte de la bacteria.

En el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de Granada, se aisló una cepa de *Pseudomonas* del suelo de una fábrica de explosivos (Unión Española de Explosivos, Burgos) por su capacidad de utilizar TNT como única fuente de nitrógeno. La acumulación de nitrito y de metabolitos con pérdida de grupos nitro (2,4-; 2,6-dinitrotolueno, 2-nitrotolueno y tolueno) sugirió la eliminación secuencial de los grupos nitro en forma de nitrito; éste sería reducido a amonio que se incorporaría a los esqueletos carbonados por la acción de la glutamina sintetasa. Mediante el uso de cultivos continuos, y con TNT como factor limitante del crecimiento, se obtuvo una cepa derivada que mostraba una mayor eficacia en la degradación del explosivo. La ruta catabólica de esta cepa se expandió tras transferirle el plásmido TOL pWW0-Km, que permitió a la nueva cepa híbrida (clon A), utilizar la molécula de TNT como fuente de carbono y nitrógeno. Estos estudios representaron el primer caso de expansión vertical de una ruta catabólica de TNT, en el que la maquinaria enzimática del clon A para la eliminación de los grupos nitro se combinó con las enzimas para mineralizar tolueno codificadas por el plásmido TOL. La cepa híbrida degradaba el 50% del explosivo, mientras que el resto aparecía en forma de compuestos reducidos y azoxitetranitrotoluenos (Ramos, *et al.*, 1995).

En el mecanismo de eliminación de los grupos nitro se sugirió la formación de complejos de Meisenheimer (Haïdour A., 1996). Este tipo de complejos ha sido descrito por otros autores por participar en el metabolismo bacteriano de polinitroaromáticos (French, *et al.*, 1998; Knackmuss, 1996; Vorbeck, *et al.*, 1998). Lenke y colaboradores (Lenke y Knackmuss, 1992) aislaron una cepa de *Rhodococcus erythropolis* capaz de usar 2,4,6-trinitrofenol (ácido pícrico) como fuente de nitrógeno tras un ataque reductivo a través de un ion hidruro. Estas hidrogenaciones sobre el anillo del TNT (H-TNT y 2H-TNT) se han observado en dos especies que no pueden utilizar el TNT como fuente de nitrógeno: la cepa de *Rhodococcus erythropolis*, mencionada anteriormente, y una degradadora de 4-nitrotolueno, *Mycobacterium sp.* Las primeras observaciones mostraron la eliminación del nitrito del TNT mediante suspensiones celulares de *Mycobacterium sp.* (Vorbeck, *et al.*, 1994); pero resultados posteriores (Vorbeck *et al.*, 1998), muestran que, a diferencia del complejo H-ácido pícrico, el complejo H-TNT no

Introducción

soportó eliminación de nitrito ni rearomatización en condiciones fisiológicas, sino un segundo paso de hidrogenación del anillo (2H-TNT) que se acumulaba en el sobrenadante de los cultivos. Los autores propusieron que, al menos en estas cepas, la formación de este tipo de complejos podría ser improductiva en el metabolismo de TNT. Por el contrario, Haïdour y Ramos (1996) demostraron la formación *in vitro* de 2,4-dinitrotolueno a partir del complejo H-TNT. La eliminación de grupos nitro para formar el dinitrotolueno correspondiente sería deseable, ya que se ha descrito una cepa de *Pseudomonas sp.* capaz de metabolizar este nitroaromático, a través de dioxigenasas, para producir 4-metil-5-nitrocatecol, que tras sufrir una oxidación y la eliminación de nitrito, (Haigler, *et al.*, 1994a; Spanggord, *et al.*, 1991) se mineraliza. El ataque reductivo sobre el anillo aromático de TNT también ha sido propuesto por French y colaboradores (1998), mediante la purificación de una pentaeritriol tetranitrato reductasa (PETN reductasa) procedente de una cepa de *Enterobacter cloacae*. Reacciones de este tipo se han descrito con otras enzimas purificadas pertenecientes a la misma familia de proteínas que la PETN reductasa (ver sección 3.1.1. de esta *Introducción*).

Otros autores también han mostrado denitración de TNT (Martin, *et al.*, 1997; Kim, *et al.*, 2002; Ho, *et al.*, 2003) con cepas de *Pseudomonas*. Martin y colaboradores describieron una cepa de *P. savastanoi* capaz de transformar TNT en 2,4-DNT con eliminación de nitrito. Los autores describieron como el proceso se veía potenciado por la adición de nitrito e inhibido por amonio y glucosa. Mientras, *P. aeruginosa* MX parece mostrar más capacidad a la hora de denitrar TNT, llegando a formar dinitrotolueno, mononitrotolueno, y 3,5-dinitroanilina. Kim y colaboradores (2002) han descrito una cepa de *Klebsiella oxytoca* que también muestra capacidad de denitrar TNT y producir 2,4-DNT y nitrito. Los autores muestran una mineralización del 6% del ¹⁴C-TNT, aunque estos datos son tras 77 días de cultivo.

Otro mecanismo propuesto (Kalafut *et al.*, 1998) está basado en la transformación de TNT en 2-amino-4-nitrotolueno; este metabolito se detectó en cultivos de tres cepas bacterianas diferentes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus sp.* y *Staphylococcus sp.*), y su estructura presenta dos carbonos adyacentes no sustituidos que lo hacen posible sustrato de dioxigenasas.

La transformación de TNT en productos de mayor polaridad ha sido descrita por Bae y colaboradores (1995). Los autores encontraron un 3% de mineralización junto a una conversión del 80% en productos polares sin identificar por parte de una cepa de *Enterobacter sp.* Los cambios sobre la molécula de TNT que incrementen su polaridad pueden indicar reacciones de hidroxilación o de apertura del anillo, que conducirían a la formación de compuestos más fácilmente degradables. La identificación de estos compuestos es necesaria, por si pudieran constituir, por si mismos, sustratos para rutas catabólicas de otros microorganismos.

Vanderberg y colaboradores (1995) describieron una cepa de *Mycobacterium vaccae* por su capacidad de metabolizar TNT, en presencia de propano como fuente de carbono y energía. Aunque no se detectó mineralización del nitroaromático, una parte importante de la radioactividad asociada al anillo de ^{14}C -TNT (50%) se incorporó a la fracción de lípidos polares de la célula, lo que supuso la apertura del anillo. Se desconoce sin embargo el proceso de ruptura del anillo en esta cepa. Como subproductos del metabolismo del TNT, se ha detectado el ácido 4-aminodinitrobenzoico y el 2,4-diaminonitrobencilmetil eter; los autores sugieren la O-metilación sobre el alcohol bencílico como un mecanismo de detoxificación.

Como se describió en la sección 2.1 esta *Introducción*, la reducción parcial de nitroaromáticos a derivados hidroxilamina ha sido identificada como una reacción clave en muchas rutas catabólicas (Nishino, *et al.*, 2000). Fiorella y Spain, (1997) propusieron un mecanismo de reducción parcial de TNT usando suspensiones celulares y extractos libres de células de una cepa de *Pseudomonas alcaligenes* cultivada en medios con nitrobenzeno. Los autores identificaron los metabolitos 2-hidroxilamina-4,6-dinitrotolueno y 2,4-dihidroxi-6-nitrotolueno; el último derivado parece descomponerse en presencia de oxígeno para dar un producto de color amarillo y estructura desconocida. El mecanismo no se conoce, pero los autores sugieren una eliminación de nitrito, al detectarse pequeñas concentraciones de este anión en los ensayos. Vorbeck y colaboradores (1998) también sugirieron que las hidroxilaminas aromáticas puedan ser intermediarios clave en la eliminación del nitrógeno del TNT. Los autores utilizaron dos bacterias,

Introducción

aisladas por su capacidad de utilizar TNT como fuente de nitrógeno, para determinar la posible reducción del anillo aromático o la liberación de nitrito. Ninguna de las reacciones tuvo lugar, pero sí la acumulación de 2- y 4-hidroamilaminadinitrotolueno junto a un compuesto de mayor polaridad no identificado. Los autores sugirieron que estas cepas podrían utilizar el nitrógeno del TNT a través de un metabolismo reductivo de los grupos nitro. El paso metabólico en el que el nitrógeno se hace disponible para la bacteria no está resuelto, aunque los autores sugieron al amonio como posible producto de la reacción. Por el momento, esta última hipótesis, junto a la formación de complejos de Meisenheimer, parecen ser los mecanismos aerobios que las bacterias usan para la degradación de TNT.

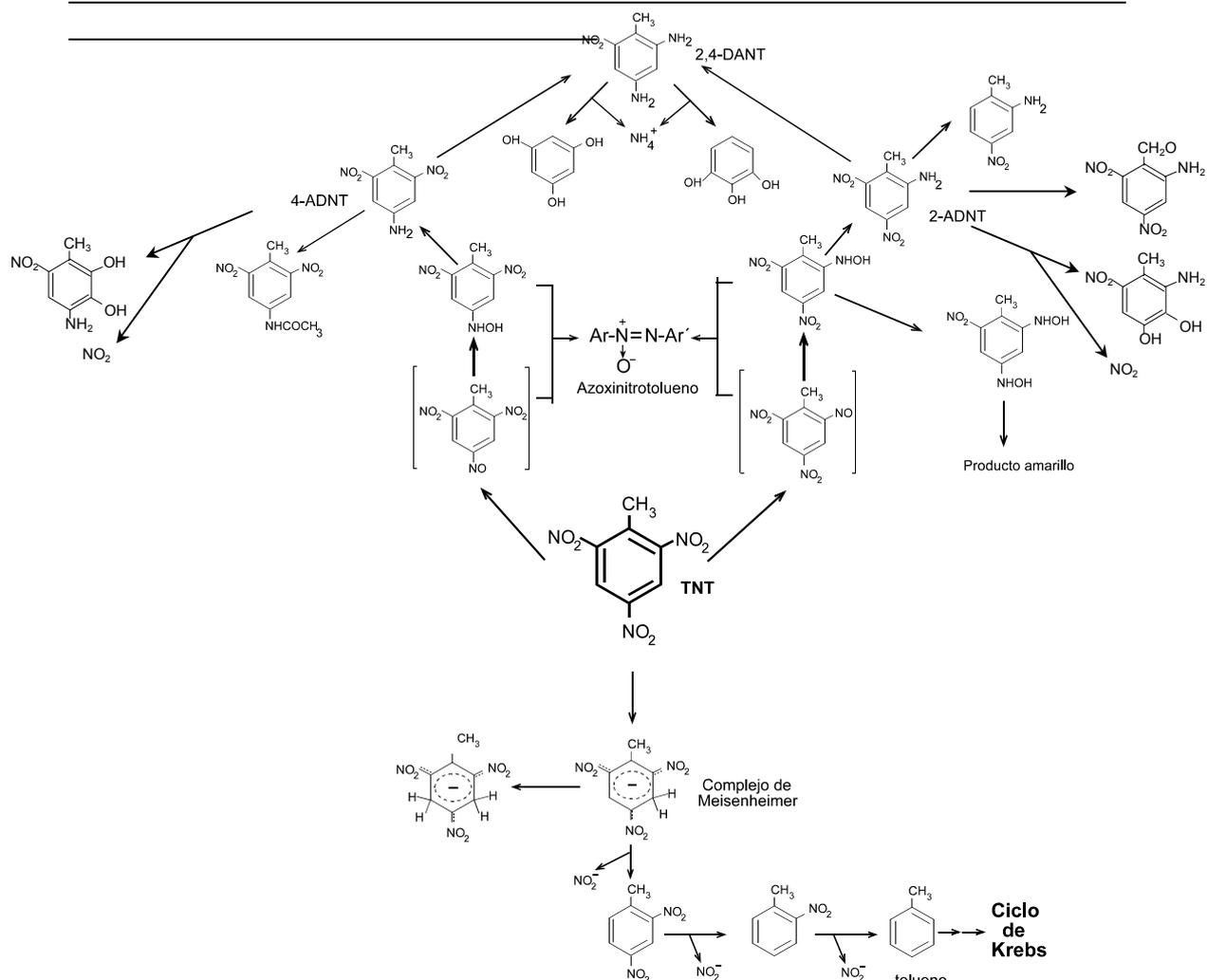


Figura 1.7. Mecanismos propuestos para el metabolismo aerobio bacteriano de TNT. Figura adaptada de Esteve-Núñez, 2000.

El metabolismo reductivo sobre el TNT, ampliamente extendido sobre las bacterias, produce grandes cantidades de aminas aromáticas que de forma general se acumulan. Tan sólo algunos estudios examinan el metabolismo aerobio de este tipo de compuestos (Alvarez, *et al.*, 1995; Gilcrease y Murphy, 1995; Johnson, *et al.*, 2001; Naumova, *et al.*, 1988).

Los estudios de Naumova y colaboradores (1988) mostraron cómo extractos libres de células de *Pseudomonas fluorescens*, cultivadas en diaminonitrotolueno como fuente de nitrógeno, fueron capaces de transformar esta amina aromática en floroglucinol y pirogalol; también se eliminó un 30% del nitrógeno del anillo en forma de amonio. Al detectar actividades enzimáticas de apertura del anillo aromático, los investigadores postularon la mineralización del derivado DANT, pero este microorganismo no fue capaz de utilizar DANT como única fuente de carbono energía. Gilcrease y Murphy (1995) observaron en

Introducción

cambio una transformación de *Pseudomonas fluorescens* del 2,4-DNT hasta 4-N-acetyl-amino-2-amino-6-nitrotolueno (4-N-AcANT), proponiéndolo como un sistema de detoxificación del compuesto por parte de la bacteria. Álvarez y colaboradores (1995) describieron una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que transformaba ADNT hasta un compuesto de alta polaridad no extraíble del medio acuoso mediante disolventes orgánicos. La posibilidad de que estas aminas sean metabolizadas por oxigenasas la comprobaron Johnson y colaboradores (2001), utilizando con éxito tres oxigenasas distintas sobrepresadas en *E. coli*. Los resultados mostraron que los productos de las reacciones dependían del enzima utilizada, así, la nitrobenzeno dioxigenasa de *Comamonas* sp. JS765 (Parales, *et al.*, 1997) transformaba el 2ADNT a un producto de oxidación del metilo, el 2-amino-4,6-dinitro-benzil alcohol, y el 4ADNT en el compuesto hidroxilado 3-amino-6-metil-5-nitrocatecol con la salida de una molécula de nitrito. Mientras, la 2,4-DNT dioxigenasa de las cepas *Pseudomonas putida* DNT (Spanggard, *et al.*, 1991; Suen y Spain, 1993) y *Burkholderia cepacia* R34 (Johnson, *et al.*, 2000) transformaban, aunque con distinta eficiencia, el 2ADNT al producto hidroxilado 3-amino-4-metil-5-nitrocatecol y nitrito. Ninguna de las dos transformó el 4ADNT. Todo ello abre múltiples vías alternativas de transformación de las aminas aromáticas.

Por último, recientemente se han aislado dos consorcios cuyas capacidades degradadoras de TNT son prometedoras. Popesku y colaboradores describen en dos trabajos recientes (Popesku, *et al.*, 2003, 2004) el aislamiento y caracterización de un enriquecimiento desde un cultivo mantenido en presencia de crudo de petróleo capaz de crecer en TNT como fuente de carbono y nitrógeno y cuyo producto más interesante de la reacción es el 2,6-DNT cometabolizando el TNT en presencia de glucosa, sin embargo, no se sabe qué cepas forman el consorcio ni cual de ellas es responsable de cada proceso. Por otra parte, Robertson y Jjemba (2005) han aislado un consorcio aislado de un sedimento altamente contaminado con TNT formado por tres cepas, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. y *Acinetobacter* sp., capaz de crecer con TNT como fuente de carbono y nitrógeno, y que en cultivos con suelo contaminado con TNT, mineraliza hasta un 45% de ¹⁴C-TNT utilizado. El efecto más importante parece llevarlo a cabo la *Enterobacter* sp., capaz de mineralizar por sí sola un 25% del ¹⁴C-TNT total.

3.1.1. Enzimología del TNT en bacterias aerobias.

Los estudios más recientes sobre el metabolismo del TNT se han concentrado en parte en la caracterización de dos familias de enzimas; la familia de enzimas OYE (de Old Yellow Enzyme) y la familia de Nitroreductasas clásicas, cuya importancia en cuanto al metabolismo del TNT en bacterias reside en que ambas llevan a cabo las transformaciones iniciales del TNT en numerosos microorganismos de los descritos.

La familia de proteínas OYE, denominada así por la primera enzima de esta familia identificada (Warburg y Christian, 1932), se caracteriza por ser reductasas de ésteres de nitrato, como la trinitroglicerina (GTN) o el pentaeritritol tetranitrato (PETN), llevando a cabo una rotura del enlace para dar nitrito y al derivado alcohol (Blehert, *et al.*, 1997; French, *et al.*; Marshall, *et al.*, 2004; Snape, *et al.*; Williams y Bruce, 2000). Son flavoproteínas oxidoreductasas homólogas que utilizan NADPH como agente reductor y flavín mononucleótido (FMN) como cofactor unido de manera no covalente al enzima (Williams y Bruce, 2000, 2002). La primera descripción de un enzima de la familia OYE capaz de metabolizar el TNT la realizaron French y colaboradores (1998), los cuales observaron que la enzima Pentaeritritol reductasa (PETN reductasa) de *Enterobacter cloacae* PB2 (French, *et al.*, 1996) utilizaba TNT como sustrato, reduciéndolo hasta el complejo de Meisenheimer H-TNT, utilizando NADPH como donador de iones hidruro, y liberando nitrito. La enzima también mostró tener actividad nitroreductasa al detectarse hidroxilamino- y aminodinitrotolueno como productos colaterales de la reacción. El gen que codifica este enzima, designado como *onr* (organic nitrate reductase) se clonó y sobreexpresó en *E. coli*, donde llevó a cabo la misma reacción. Éste constituyó el primer estudio sobre la liberación de nitrógeno de la molécula de TNT a través del ataque reductivo de su anillo aromático, por parte de una enzima purificada. La proteína XenB (del inglés xenobiotic reductase) de *Pseudomonas fluorescens* I-C, aislada por ser capaz de metabolizar el GTN (Blehert, *et al.*, 1999), puede llevar a cabo un ataque reductivo del anillo del TNT similar al de PETN reductasa, con la consiguiente formación de complejo de Meisenheimer (Pak, *et al.*, 2000). Los análisis *in vitro* con esta proteína purificada mostraron denitración del TNT, además de la formación de 4-HADNT y del producto

Introducción

doblemente reducido 2H-TNT. Sin embargo, el mecanismo de salida del nitrito tras la reducción del anillo propuesto por los autores se basa en una condensación del 2H-TNT con el 4-HADNT cuya inestabilidad provocaría la liberación de una molécula de nitrito.

El interés mostrado por la familia OYE se demuestra con los diversas estructuras de cristales de proteínas resueltas: morfina reductasa de *P. putida* (Barna, *et al.*, 2002), OYE de *S. carlsbergensis* (Fox y Karplus, 1994), 12-oxofitodienoato reductasa de *Lycopersicon esculentum* (Breithaupt, *et al.*, 2001), XenB de *P. fluorescens* (Orville, *et al.*, 2004a), XenA de *P. putida* (Orville, *et al.*, 2004b), y la PETN reductasa de *Enterobacter cloacae* (Barna, *et al.*, 2001; Khan, *et al.*, 2002). De ella se deduce una estructura común en forma de barril formado por 8 hojas β rodeadas por 8 hélices β . El FMN se une en la parte superior del barril, con una cara de la flavina accesible al sustrato.

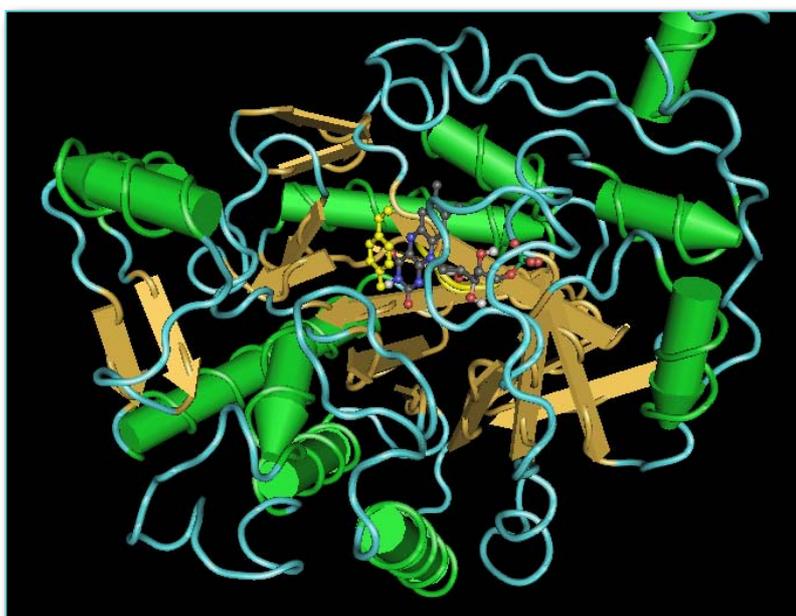


Fig. 1.8. (Página anterior). Estructura tridimensional de la proteína OYE oxidada con el ligando *p*-hidroxibenzaldehído. Las flechas indican las hojas plegadas β , y los cilindros verdes muestran las hélices β . El FMN aparece en gris junto con el sustrato (amarillo).

El mecanismo de la adición de iones hidruro al anillo aromático se ha estudiado usando la PETN reductasa (Khan, *et al.*, 2004; Khan, *et al.*, 2002). Los autores mostraron una reacción que comienza con la unión del NADPH al enzima para formar un complejo intermedio cargado NADPH-enzima del que se transfiere el hidruro desde la nicotinamida al grupo FMN. La oxidación de la

flavina por el sustrato aromático es cinéticamente indistinguible de la formación del complejo de Meisenheimer, lo cual está en consistencia con un mecanismo de ataque nucleofílico por hidruros desde el átomo N5 de la flavina al núcleo aromático del sustrato. La estructura del cristal del complejo enzima oxidado unido a TNT concuerda con una transferencia directa desde la flavina reducida al TNT.

Recientemente Williams y colaboradores han comparado las propiedades bioquímicas de algunas de las proteínas caracterizadas de esta familia con respecto a sus capacidades de transformar TNT *in vitro* (Williams, *et al.*, 2004). Las proteínas utilizadas para el estudio fueron la PETN reductasa de *Enterobacter cloacae* PB2 (French, *et al.*, 1996), y una proteína homóloga de la cepa *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, NemA de *Escherichia coli* (Miura, *et al.*, 1997), la morfina reductasa de *Pseudomonas putida* M10 (French y Bruce, 1995), y la OYE de la levadura *Saccharomyces carlsbergensis* (Saito, *et al.*, 1991). Por un lado, todas ellas redujeron los grupos nitro hasta 2,4-DHANT como compuesto mayoritario y, en una proporción del 4% del TNT, los isómeros 2- y 4-ADNT. Sin embargo su capacidad metabólica varió en cuanto a la síntesis del complejo de Meisenheimer, que se produjo mayormente en las reacciones catalizadas por las PETN reductasas y NemA. El di-Meisenheimer, sólo se observó en preparaciones con las PETN reductasa. Este di-Meisenheimer, considerado según Vorbeck y colaboradores (1998) como un producto que no se metabolizaba, desaparecía progresivamente por una reacción dependiente del enzima hacia compuestos más polares no identificados. Esta reacción no necesitaba la presencia de HADNT, lo cual supone un mecanismo de eliminación del di-Meisenheimer distinto al propuesto por Pak y colaboradores (2000). Por otra parte, tanto NemA como las PETN reductasas mostraron una gran producción de nitrito. Las enzimas OYE y morfina reductasa en cambio, no denitraron el TNT.

Acercas de las proteínas nitroreductasas, se han descrito numerosos casos de enzimas de éste tipo, capaces de reducir el a hidroxilamina el grupo nitro de los nitroaromáticos mediante cesiones consecutivas de dos electrones (se clasifican entonces como insensibles a oxígeno, ver sección 2.1 de esta *Introducción*), y que están presentes en numerosos microorganismos (ver Tabla 1.3.). La mayoría se

Introducción

han descrito por ser responsables de la reducción de grupos nitro de compuestos xenobióticos, sin tener otra función celular aparente. Las primeras enzimas de esta familia se aislaron en *Escherichia coli* por ser las responsables de la reducción del agente antimicrobiano nitrofurazona (Bryant, *et al.*, 1981), estando por tanto implicadas en la activación de esta prodroga. Ciertas enzimas nitroreductasas se han identificado en rutas de degradación de compuestos nitroaromáticos, como el 2,4-dinitrofenol (Blasco y Castillo, 1993), nitrobenzeno (Park y Kim, 2000; Somerville, *et al.*, 1995a) o 4-nitrobenzoato (Hughes y Williams, 2001). Sin embargo, la mayoría parecen reducir los nitroaromáticos de manera inespecífica, aunque no se conoce su función verdadera dentro de la célula. Las mejor representadas en cuanto a distribución entre bacterias y casos descritos pertenecen a una misma familia de proteínas bacterianas, llamada de “Nitroreductasas Clásicas” (el número de acceso de esta familia en la base de datos “Pfam” es el Pf00881), que se caracterizan por ser flavoproteínas, con flavín mononucleótido (FMN) como grupo prostético, dependientes de NAD(P)H como donador de electrones, insensibles a oxígeno (de tipo I), con un peso aproximado a 23-28 kDa y cuya estructura cuaternaria suele ser un homodímero. El mecanismo de reducción del sustrato es por Bi-Bi ping-pong.

La capacidad de reducir el TNT hasta 4-HADNT de esta familia de proteínas está bien documentado (Bryant y DeLuca, 1991; Kitts, *et al.*, 2000; Oh, *et al.*, 2001; Riefler y Smets, 2002; Sarlauskas, *et al.*, 2004). Kitts y colaboradores (2000) observaron por ejemplo que, al clonar la proteína Ntr de *E. cloacae* en *E. coli*, se observaba un incremento de la reducción del TNT en la cepa de *E. coli*, sugiriendo además que estas proteínas son las responsables de la reducción del explosivo en *Enterobacteraceas*.

Tabla 1.2. Enzimas nitroreductasas descritas en microorganismos.

Nitroreductasa	Microorganismo	Referencia
NfsA	<i>Escherichia coli</i>	(Zenno, <i>et al.</i> , 1996b)
NfsB	<i>Escherichia coli</i>	(Zenno, <i>et al.</i> , 1996a)

SnrA	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	(Nokhbeh, 2002)
Nfn	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	(Watanabe, <i>et al.</i> , 1990)
Ntr	<i>Enterobacter cloacae</i> 96-3	(Bryant y DeLuca, 1991; Bryant, <i>et al.</i> , 1991)
RdxA	<i>Helicobacter pylori</i>	(Goodwin, <i>et al.</i> , 1998)
FrxA	<i>Helicobacter pylori</i>	(Jeong, <i>et al.</i> , 2001)
TNT-nitroreductasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MX	(Oh, <i>et al.</i> , 2001)
Nitrofenol reductasa	<i>Rhodobacter capsulatus</i> E1F1	(Blasco y Castillo, 1993)
Nitrobenzeno reductasa	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenis</i> JS45	(Somerville, <i>et al.</i> , 1995a)
PnbA	<i>Pseudomonas putida</i> TW3	(Hughes y Williams, 2001a)
NbzA	<i>Pseudomonas putida</i> HS12	(Park y Kim, 2000)
Frp	<i>Vibrio harveyi</i>	(Lei, <i>et al.</i> , 1994)
FRaseI	<i>Vibrio fischeri</i>	(Zenno, <i>et al.</i> , 1994)
NOX	<i>Thermus thermophilus</i> HB8	(Park, <i>et al.</i> , 1992)

Cabe destacar que el espectro de sustratos de estas enzimas es muy variado. Proteínas como NfsA de *E. coli* (Zenno, *et al.*, 1996b), ó Ntr de *E. cloacae*, muestran un rango amplio de sustratos nitroaromáticos, aunque en el caso de la

Introducción

proteína Ntr se ha comprobado que el TNT es el de mayor afinidad (Bryant y DeLuca, 1991). Estos autores observaron además un incremento de la proteína Ntr en la cepa *Enterobacter cloacae* 96-3 en presencia de TNT. Esta cepa se aisló de zonas contaminadas con el explosivo, lo cual indica una adaptación de la bacteria para una mejor utilización de las propiedades metabólicas de esta proteína en cuanto a la transformación del TNT.

Se ha comprobado que la proteína NfsB de *Escherichia coli* es capaz de reducir el explosivo CL-20 (Bhushan, *et al.*, 2004) mediante la transferencia de un solo electrón, con ello la molécula se desestabiliza hasta romperse, liberando tanto nitrito como óxido nitroso y amonio, ácido fórmico y glioxilal. NfsA y NfsB pueden, a su vez, llevar a cabo la reducción de compuestos azo mediada por la 2-hidroxi-1,4-naftoquinona en condiciones anaerobias (Rau y Stolz, 2003). Las capacidades reductoras de estas proteínas se extiende más allá de los compuestos orgánicos, y por ejemplo, recientemente se ha comprobado que pueden funcionar como cromato reductasas (Kwak, 2003). Normalmente, la reducción del cromato es muy tóxica debido a que ésta sucede mediante la cesión de un electrón que acaba provocando numerosas especies reactivas de oxígeno (Lefebvre y Pezerat, 1992). En cambio, se ha comprobado que la reducción del cromato por NfsA provoca menos especies reactivas de oxígenos, lo cual sugiere una cesión de dos electrones a la molécula (Ackerley, *et al.*, 2004).

La capacidad de transformar el TNT por parte de estas enzimas se ha utilizado para crear plantas transgénicas de tabaco con el gen *ntr* de *E. cloacae* (Hannink, *et al.*, 2001). En ellas se ha observado una tolerancia mayor de la planta al TNT y un incremento de la absorción del compuesto por parte de ésta (ver sección 4 de esta *Introducción*).

3.2. Metabolismo anaerobio en bacterias.

Los procesos anaerobios presentan la ventaja potencial de permitir una reducción rápida a bajo potencial redox, minimizando así las reacciones de polimerización debidas al oxígeno. Por esta razón, los sistemas anaerobios para la degradación de TNT se han estudiado con el objeto de conseguir reducciones

eficientes y, evitar con ello, la formación de azoxitetranitrotoluenos (Haderlein y Schwarzenbach, 1995; Haïdour y Ramos, 1996).

La primera evidencia sobre el metabolismo anaerobio de TNT por bacterias se observó en *Veillonella alcalescens* (McCormick, *et al.*, 1976), que en suspensiones celulares y extractos libres de células reducía TNT hasta triaminotolueno (TAT), utilizando H₂ como donador de electrones.

La posibilidad de reducir el TNT completamente hasta TAT tan sólo en anaerobiosis debido al potencial redox tan negativo que requiere esta reacción, se ha considerado como la reacción más interesante en estas condiciones y por tanto la mayoría de las publicaciones han mostrado la reducción a TAT como el proceso clave del metabolismo anaerobio de TNT (Drzyzga, *et al.*, 1998; Ederer, *et al.*, 1997; Funk, *et al.*; Preuss, *et al.*, 1993). Los principales mecanismos de transformación de TNT en condiciones anóxicas se recogen, al final de este apartado, en la Figura 1.9.

Dos han sido los géneros bacterianos más ampliamente estudiados, por sus capacidades metabólicas sobre el explosivo TNT, en condiciones anóxicas: *Clostridium sp.* y *Desulfovibrio sp.* Las principales cepas descritas aparecen recogidas en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Microorganismos que degradan o transforman TNT en condiciones anóxicas.

Microorganismos	Metabolismo	Referencias
<i>Veillonella alcalescens</i>	Reducción de TNT a TAT.	(McCormick, <i>et al.</i> , 1976)
<i>Clostridium pasteariann</i>	Reducción de TNT a TAT.	(McCormick, <i>et al.</i> , 1976)
<i>Desulfovibrio sp.</i> cepa B	TNT como fuente de nitrógeno; tolueno como intermedio.	(Boopathy y Kulpa, 1992)
<i>Desufovibrio sp.</i>	TNT como única fuente de nitrógeno; reducción de TNT a TAT.	(Preuss, <i>et al.</i> , 1993)

Introducción

<i>Desulfovibrio sp.</i>	Transformación de TNT en TAT y DANT. El 42% de la radioactividad del ¹⁴ C-TNT se encontró asociada a material celular.	(Drzyzga, <i>et al.</i> , 1998)
<i>Methanococcus sp.</i> cepa B	Reducción de TNT a DANT.	(Boopathy y Kulpa, 1994)
<i>Clostridium bifermentans</i> CYS-1	Degradación de TNT a compuestos alifáticos polares vía 4-ADNT y 2,4-DANT.	(Shim y Crawford, 1995)
<i>Clostridium bifermentans</i> LJP-1	Reducción de TNT a TAT, derivado acetilado del TAT y productos fenólicos.	(Lewis, <i>et al.</i> , 1996)
<i>Clostridium sordelii</i>	Reducción de TNT a TAT	(Ederer, <i>et al.</i> , 1997)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Reducción de TNT a TAT	(Ederer, <i>et al.</i> , 1997)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Reducción de TNT hasta 2,4-DHANT y posterior reagrupamiento de Bamberger.	(Hughes, <i>et al.</i> , 1998b)
<i>Escherichia coli</i>	Reducción de TNT a DANT.	(Ederer, <i>et al.</i> , 1997)
<i>Lactobacillus</i>	Reducción de TNT a DANT.	(Ederer, <i>et al.</i> , 1997)
<i>Pseudomonas putida</i> JLR11	Asimilación del 85% del N-TNT para síntesis de material celular, y utilización de TNT como último aceptor de electrones en una cadena respiratoria.	(Esteve-Nunez, <i>et al.</i> , 2000; Esteve-Núñez y Ramos, 1998)

Ederer y colaboradores (1997) compararon la capacidad de reducir el TNT por el género *Clostridium*, que sin previa aclimatación de la cepa lo reducía hasta TAT, con respecto a *enterobacteraceas* (*E. coli* y *Salmonella thymimurium*) y Lactobacilli (*L. acidophilus*, *L. casei* y *L. lactis*), las cuales no redujeron el TNT más allá del DANT. Según estos experimentos, la facilidad que tiene *Clostridium* para reducir el TNT completamente parece determinado por reacciones inespecíficas asociadas a funciones metabólicas expresadas constitutivamente en las cepas de *Clostridium*.

Se ha analizado por tanto la participación de posibles proteínas que puedan actuar como nitroreductasas en *Clostridium*. Debido al metabolismo fermentativo de este género, hace que posea enzimas con capacidad de reducir posibles moléculas aceptoras de electrones de muy bajo potencial redox (también llamados “enzimas reductores de ferredoxinas”) de manera que se permitan transferencia de electrones a potenciales cercanos al electrodo de hidrógeno (Ahmad y Hughes, 2000).

Fueron McCormick y colaboradores (1976) quienes propusieron primer lugar el posible papel de enzimas hidrogenasas asociadas a ferredoxinas en la reducción del TNT. Estos estudios se corroboraron posteriormente en *Clostridium acetobutylicum*, cepa que presentaba mayores rendimientos de transformación de TNT y sus amino derivados, en la fase metabólica acidogénica. Los autores de este trabajo observaron además la necesidad de H₂ para poder llevar a cabo reducciones de TNT en extractos crudos, lo cual indica un papel de la actividad hidrogenasa en la reducción del TNT (Khan, *et al.*, 1997).

Hughes y colaboradores (1998) mostraron un reagrupamiento de Bamberger (ver apartado 3.1 de esta *Introducción*) sobre un dihidroxilaminadinitrotolueno, con la formación de 5-hidroxi-2-amino-4,6-dinitrotolueno. La reacción se detectó en extractos libres de células de *Clostridium acetobutylicum* incubados en condiciones anóxicas. Huang y colaboradores (2000) detectaron este tipo de productos por la acción catalítica de la CO deshidrogenasa de *Clostridium thermoaceticum* (CODH) sobre TNT, en ausencia de transportadores de electrones adicionales (ferredoxina, metilviológeno). Esta enzima transformaría el TNT en: 2-hidroxilamino-4,6-dinitrotolueno, 4-hidroxilamina-2,4-dinitrotolueno, 2,4-dihidroxi-6-nitrotolueno y como productos de la reagrupación

Introducción

el 4-amino-6-hidroxilamina-3-metil-2-nitrofenol y el 6-amino-4-hidroxilamino-3-metil-2-nitrofenol. Aunque este mecanismo ya se ha descrito, anteriormente, para el hidroxilaminobenceno (Nishino y Spain, 1993), no se había detectado antes para derivados del TNT. Se desconoce si podría estar implicado en un metabolismo que condujera a la degradación del compuesto, o si constituye una reacción aislada. Cabe señalar que Preuss y colaboradores (1993) habían estudiado anteriormente la actividad reductasa de la CODH de *C. thermoaceticum* sobre el 2,4-diaminonitrotolueno, cuyo producto final de la reacción fue el 2,4-diamino-6-hidroxiaminonitrotolueno.

Recientemente se ha aislado y caracterizado la Fe-hidrogenasa responsable de la reducción de TNT en *Clostridium acetobutylicum* mediante un proceso de purificación y seguimiento de la actividad TNT-nitroreductasa en extractos celulares (Watrous, *et al.*, 2003). El enzima purificado fue capaz de reducir el TNT de manera secuencial formando 4-HADNT y 2-HADNT, seguido de 2,4-DHANT y finalmente un reagrupamiento tipo Bamberger, lo que confirma lo visto con anterioridad en extractos celulares y por el enzima CODH de *C. thermoaceticum* (Huang, *et al.*, 2000; Hughes, *et al.*, 1998a; Hughes, *et al.*, 1998b).

Es interesante que los ensayos con enzimas purificadas o en extractos, no mostraron la reducción total a TAT observada previamente en cultivos de la misma cepa (Ederer, *et al.*, 1997), lo que parece indicar la necesidad de otros factores para la completa reducción del TNT, ya sean biológicos (otros enzimas u otros transportadores de electrones) o ambientales (condiciones de cultivos).

El TAT resulta ser el metabolito generado por *Clostridium* y *Desulfovibrio* en la reducción de TNT, por lo que la degradación completa del explosivo bajo condiciones anaerobias supone la eliminación de los grupos amino del TAT. En una atmósfera aerobia, la molécula resulta inestable siendo susceptible de oxidación y polimerización. La estabilidad de la molécula depende del pH del medio; así, en condiciones ácidas, (pH<1) el TAT se desamina y convierte en productos de estructura desconocida (Preuss y Rieger, 1995). Ésto hace que la transformación biológica de TAT sólo sea posible en condiciones de pH próximas a la neutralidad.

El grupo de Crawford, en la Universidad de Idaho, ha centrado sus investigaciones en el estudio de las transformaciones cometabólicas de TNT por parte de cepas del género *Clostridium*. Las cepas fueron aisladas de un bioreactor que durante varios años se alimentó de una mezcla de explosivos (TNT, RDX y HMX) como fuente de carbono, nitrógeno y energía (Crawford, 1995a).

En cultivos de *Clostridium bifermentans*, el TAT se detectó como producto final, junto a otros productos metabólicos resultante de su hidrólisis (Lewis *et al.*, 1996). La adición de un cosustrato, que proporcionase el poder reductor, era una condición necesaria para obtener una degradación significativa del explosivo.

Funk y colaboradores (1993) estudiaron la transformación de TNT en sistemas anaerobios utilizando cultivos mixtos de *Clostridium sp.* procedentes de suelo y fangos activados. En los sobrenadantes de estos cultivos, se detectó la presencia de TAT y de aromáticos que habían perdido los sustituyentes con nitrógeno: metilfloroglucinol y *p*-cresol. Estos estudios se aplicaron en un proceso de biorecuperación *ex situ* de suelo contaminado con TNT, que se tratará más ampliamente en la sección 4 de esta *Introducción*. El origen del *p*-cresol desde el TNT se ha puesto en duda, y Shen y colaboradores propusieron que éste puede tener su origen en el catabolismo de ciertos aminoácidos aromáticos (Shen, *et al.*, 2000).

El género *Desulfovibrio* se ha estudiado ampliamente por su capacidad de metabolizar TNT en condiciones respiratorias de sulfato. Boopathy y Kulpa (1992) aislaron una cepa denominada *Desulfovibrio sp.* strain B, por su capacidad de utilizar TNT como única fuente de nitrógeno. Los autores propusieron una reducción de los grupo nitro hasta la formación de TAT, que sufriría una desaminación reductiva a través de un metabolismo análogo al descrito para el aminotolueno (anilina) (Schenll y Schink, 1992). La hipótesis resulta un tanto preliminar ya que, pese a detectarse tolueno, los autores nunca presentaron evidencias de la presencia de TAT.

Preuss y colaboradores (1993) aislaron un cultivo de puro de *Desulfovibrio sp.* por su capacidad de utilizar TNT como fuente de nitrógeno y piruvato como fuente de carbono y energía. Una suspensión celular de esta bacteria catalizó la reducción completa de TNT a TAT, en ausencia de agentes reductores. Los

Introducción

autores sugirieron que la reducción de DANT a TAT constituía el paso limitante del proceso global. La inhibición de la reducción de DANT por parte del monóxido de carbono (CO) hizo plantear a los autores que fuera la sulfito reductasa la responsable de la producción de TAT, ya que se conoce la inhibición que el CO ejerce sobre esta enzima.

Drzyzga y colaboradores (1998) realizaron ensayos de biotransformación de ^{14}C -TNT por cepas de *Desulfovibrio sp.*; el explosivo no se mineralizó, pero el 42% de la radioactividad inicial se encontró asociada al material celular. Los metabolitos TAT y DANT se detectaron en los medios de ensayo.

Por otra parte, resultados posteriores han cuestionado el papel del TAT como metabolito clave en la degradación aerobia de TNT (Hawari, *et al.*, 1998). Tras analizar el comportamiento de la población microbiana en un lodo anaerobio, los autores concluyeron que el TAT no participaba en la degradación de TNT, sino más bien que constituía un subproducto que impedía la mineralización del nitroaromático.

También se ha estudiado la degradación de TNT en condiciones anóxicas, con distintos aceptores de electrones (nitrato, sulfato y dióxido de carbono). Las condiciones de respiración de nitrato fueron las óptimas en la degradación ejercida por un consorcio bacteriano de suelo (Boopathy, *et al.*, 1993), mientras que la microflora de sedimentos acuáticos mostró mejores niveles de eliminación del explosivo en condiciones metanogénicas (Krumholz, *et al.*, 1997). Recientemente se ha demostrado que la incorporación de H_2 en cultivos mixtos mantenidos en condiciones metanogénicas, o donadores de electrones que acaben produciéndolo, favorecen la reducción de TNT a TAT, indicando una eficiencia mayor de enzimas capaces de asociar la oxidación de hidrógeno molecular a la reducción de TNT (Adrian, *et al.*, 2003). Estos resultados concuerdan también con los mostrados previamente por Gorontzy y colaboradores (Gorontzy, *et al.*, 1993), los cuales observaron la reducción de diversos nitroaromáticos usando diferentes donadores de electrones. El resultado fue que el mejor donador era el H_2 , seguido por, piruvato, lactato, y finalmente etanol.

Debido a la relación del metabolismo descrito de *Pseudomonas putida* JLR11 con esta tesis doctoral, éste se tratará con detalle en la sección 5 de esta *Introducción*.

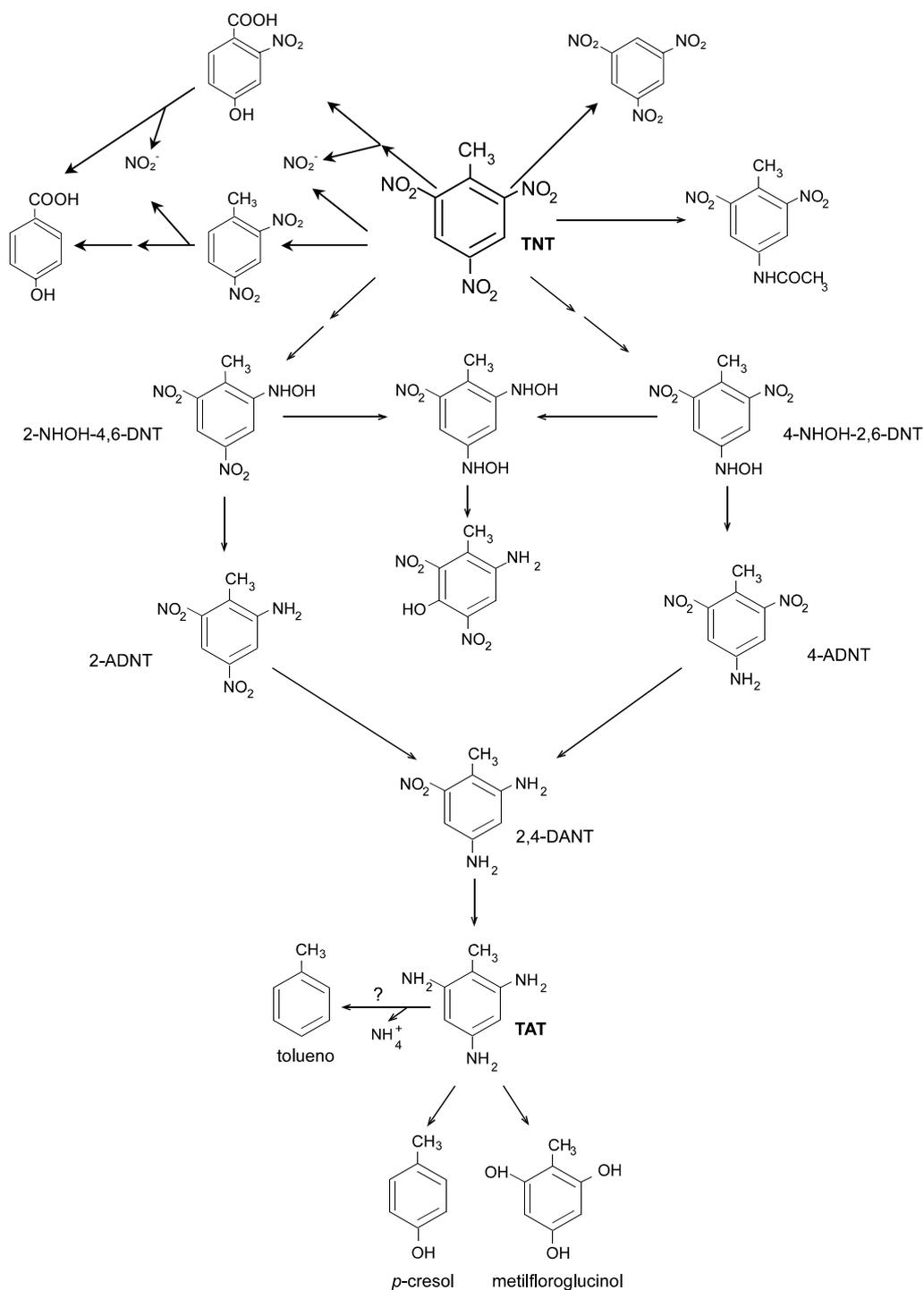


Fig. 1.9. Mecanismos propuestos para el metabolismo del TNT en anaerobiosis. Figura adaptada de (Esteve-Núñez, 2000a).

4. Técnicas de descontaminación de TNT.

La recuperación de zonas contaminadas con TNT se ha tratado durante los últimos años empleando para ello diversas técnicas. La más utilizada hasta ahora ha sido la retirada e incineración de los suelos contaminados, sin embargo esta técnica es muy destructiva para el suelo, muy costosa debido a la excavación, transporte del material y energía requerida en el proceso, además de la toxicidad de los gases liberados durante el proceso. Las diferentes alternativas, tanto abióticas como bióticas se han tratado en una revisión reciente (Rodgers y Bunce, 2001). Entre los procesos abióticos propuestos alternativos a la incineración se destacan la absorción a carbón activo (Edward y Dennis, 1999), la descomposición del TNT catalizada por procesos de oxidación avanzados (Bolton y Carter, 1993), como la mediada por el reactivo de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$) (Li, *et al.*, 1998), o la reducción química (Bunce, *et al.*, 1997).

Distintas tecnologías biológicas se han desarrollado para la biorrecuperación de suelos contaminados con TNT. Aunque diversos grupos han desarrollado experiencias de laboratorio, solo en algunos casos, se han intentado experiencias a escala real (Funk, *et al.*, 1995; Lenke, *et al.*, 1998).

El método de Funk y colaboradores (1993) desarrollado y patentado en la Universidad de Idaho, se muestra útil en la biorecuperación de suelos contaminados con explosivos contaminados (TNT, RDX y HMX). Este procedimiento se utilizó con anterioridad con éxito para la biorecuperación de suelos contaminados con el herbicida nitroaromático dinoseb (Roberts, *et al.*, 1997). Al proceso se le denominó SABRE [(Simplot Anaerobic Biological Remediation Ex-situ) J.R.Simplot Co. Brise, Idaho], y consistió en el uso de un consorcio anaerobio para transformar explosivos como el TNT en productos que habían perdido su toxicidad y aromaticidad, y que resultaban mineralizables aerobicamente. El consorcio estaba formado por diversas cepas del género *Clostridium* y su capacidad para formar esporas se pretende aprovechar para utilizarlas como inoculantes en tratamientos biológicos (Sembries y Crawford, 1997). El proceso biodegradativo resultó efectivo y requirió la adición de almidón como cosustrato para obtener un óptimo metabolismo de TNT. La acumulación del almidón en el suelo tratado produjo un incremento en la demanda biológica de

oxígeno (DBO), que podría ser perjudicial para suelos agrícolas debido al rápido desarrollo de condiciones anaerobias que se generarían al humedecerse el suelo por la lluvia o por el riego. Roberts y colaboradores (1996) describieron que la adición de bacterias que degradaban específicamente nitroaromáticos, potenciaba la mineralización de dinitrotoluenos en reactores de lodo, mientras que las bacterias autóctonas no fueron capaces de transformar los DNTs en el mismo tiempo de incubación.

Debido a la baja degradabilidad del TNT, los procesos cometabólicos que llevan a cabo una fácil reducción de los grupos nitro por parte de microorganismos se están utilizando como base para el desarrollo de técnicas de descontaminación (Daun, *et al.*, 1998; Drzyzga, *et al.*, 1998; Heiss y Knackmuss, 2002; Lenke, *et al.*, 1998; Pennington y Patrick, 1990). Los grupos hidroxilamino y amino de los anillos nitroarenos pueden reaccionar con las quinonas y grupos carbonilos de la fracción húmica del suelo, formando productos de condensación que quedan inmobilizados (Achnich, *et al.*, 2000; Lenke, *et al.*, 2000; Thorn y Kennedy, 2002). De esta manera, el TNT se convierte en parte de los elementos del suelo y, debido a que ya no es biodisponible, ya no presenta problemas de toxicidad.

Los tratamientos biológicos de campo incluyen el composting y el de reactores en agitación de suelo (bioslurry) o la fitorecuperación. La técnica del compost y su aplicación para el tratamiento de zonas contaminadas con explosivos se ha revisado por Bruns-Nagel y colaboradores (Bruns-Nagel, *et al.*, 2000). Esta técnica se basa en que el suelo a tratar se mezcla con diversos materiales espesantes orgánicos fácilmente degradables que se utiliza por parte de los microorganismos presentes en ese suelo para colaborar en la transformación del TNT. Las mejores condiciones alcanzadas para el compost se han alcanzado en un sistema secuencial anaerobio/aerobio (Bruns-Nagel, *et al.*, 1998) en la que casi todo el TNT queda inmobilizado. En este sistema, una primera parte anóxica conduce a una rápida reducción de los grupos nitro del TNT hasta aminas que se condensan con los materiales húmicos del suelo. En una segunda fase oxidativa, los productos derivados del tratamiento anaerobio se metabolizan por los

microorganismos del suelo de tal manera que los productos finales no se pueden extraer del suelo por hidrólisis ácida o alcalina o por extracción con metanol.

Los procesos de reactores de suelo empiezan con la mezcla del suelo con agua y nutrientes (Lenke *et al.*, 2000). El sistema de reactor de suelo es más rápido que el de compost, y se han descrito mayores niveles de reducción de TNT alcanzados (Lenke *et al.*, 1998). Experimentos llevados a cabo a escalas mayores que la de laboratorio en un sistema denominado Terranox usa una combinación secuencial de fase anaerobia/aerobia. No se detectó liberación de $^{14}\text{CO}_2$, pero por resonancia magnética nuclear (RMN) se analizó la presencia y estructura del ^{15}N -TNT (Knicker, *et al.*, 2001). La conclusión mostró que los productos de reducción del TNT formaron productos de condensación heterocíclicos y no heterocíclicos, derivados de anilina (aminas aromáticas substituidas) y otros productos de condensación diversos que hacían al TNT formar parte del suelo (Achtnich, *et al.*, 1999; Bruns-Nagel, *et al.*, 2000; Knicker, 2003; Thorn y Kennedy, 2002; Weiss, *et al.*, 2004a).

Recientemente, Weiss y colaboradores (Weiss, *et al.*, 2004b) han estudiado la rotura del enlace ^{15}N -C en suelo. Además de la producción de $^{15}\text{NH}_4^+$ and $^{15}\text{NO}_2^-$, los autores detectaron $^{15}\text{N}_2\text{O}$ que los autores sugieren como producto de la hidrólisis de derivados azoxidímeros producidos durante la condensación de metabolitos del TNT. Todo ello indica que con el tiempo puede dar un lento metabolismo de los productos inmovilizados.

En el caso del tratamiento por composting, aunque los datos de toxicidad en monolitos humanos indicaban una bajada drástica de ésta tras el tratamiento (Bruns-Nagel, *et al.*, 1999), algunos autores han identificado una toxicidad preocupante tras el proceso de compost probablemente debido a que no todo los grupos nitro se redujeron (Heiss y Knackmuss, 2002). Este no parece ser el caso de los reactores de suelo (Lenke, *et al.*, 2000). En ambos casos, parece claro que el tiempo de aplicación de la fase anaerobia es crucial para la reducción de la toxicidad, dando mejores resultados en fases más extensas ya que permite reducciones más intensas del TNT. Sin embargo, los resultados obtenidos demandan un seguimiento a largo plazo de la eficiencia del proceso de

recuperación para confirmar la seguridad y recuperación total del suelo tratado (Frische, 2003).

Una alternativa posible propuesta es la estrategia combinada entre métodos bióticos y abióticos (Schrader y Hess, 2004). En ella, un rápido pre-tratamiento abiótico mediante aplicación de una alta concentración de radicales hidroxilos se continúa por un tratamiento en reactores de suelo para degradar los compuestos formados en el primer paso. Como ventajas de este método, en vez de inmovilización del TNT, se alcanzan niveles de mineralización superiores al 95% de manera muy rápida. Por otra parte, se ha observado una drástica reducción de la población microbiana como consecuencia de la aplicación de la primera fase, lo que podría afectar al tratamiento biótico en algunos casos.

Entre estos métodos, la agencia de protección ambiental del ejercito de Estados Unidos ha estimado que los costes de los tratamientos de volúmenes de suelo contaminado mayores de 10 mil metros cúbicos. El composting tiene un coste estimado que varía en un rango entre 250 a 300 dólares por tonelada. En tratamiento por reactores de suelo el coste estimado está en un rango de 230-270 dólares por tonelada. Estos datos incluyen los costes de excavación y la posterior eliminación de la materia del compost (USAEC, 1999a, 1999b). Ambos procesos son mucho más baratos que la incineración (740 dólares/tonelada). Una desventaja del compost es la cantidad agentes espesantes como melazas, que incrementan en gran medida el volumen de material a tratar. Ambos procesos son medidas *ex-situ*, y por lo tanto más costosas que las *in-situ*.

Como tratamiento *in-situ*, la fitorremediación se considera cada vez más como una alternativa posible para la eliminación del TNT (Burken *et al.*, 2000; Hannink *et al.*, 2002). La planta parece actuar como un “hígado verde”, de manera que su función sería extraer el TNT del suelo y detoxificarlo mediante modificaciones químicas y conjugaciones con metabolitos de la planta de tal modo que acaben secuestrándose en tejidos o polímeros de la planta, como la lignina (Burken, *et al.*, 2000; Vila, *et al.*, 2005). La mayoría de las transformaciones del TNT en la planta produce compuestos reducidos en varios grados, incluyendo monoaminodinitrotoluenos (2-y 4-ADNT) en su mayoría, diaminomono-nitrotoluenos o incluso hidroxilaminos (Wang, *et al.*, 2003). La

Introducción

mayor parte de los ADNTs se acumulan en las raíces de la planta, donde llegan a exceder en proporción al TNT.

Los metabolitos reducidos se conjugan con derivados de glucosa, malonato, o glutatión mediante ttransferasas que reducen su toxicidad (Bhadra, *et al.*, 1999b). En *Miryophyllum aquaticum* se han encontrado además una gran proporción de compuestos oxidados: ácido 2-amino-4,6-dinitrobenzoico (4.4%), 2,4-dinitro-6-hidroxil-benzil alcohol (8.1%), 2-N-acetoxiamino-4-6-dinitrobenzaldehido (7.8%), aparte de 2,4-dinitro-6-hydroxytoluene (15.6%), y dos metabolitos binucleares (5.6%) (Bhadra, *et al.*, 1999a).

Por otra parte, Sens y colaboradores (Sens, *et al.*, 1999) encontraron que el 43% del TNT y sus derivados aparecían en el citoplasma celular, mientras que el restante 57% aparecía unido a la pared celular. De esta fracción, el 27% estaba unido a ligninas. El resultado mostró además que la mayor parte se acumulaba en las raíces, indicando que el TNT no se transportaba a las partes aéreas de la planta.

En la planta de municiones de Iowa (EEUU) se llevó a cabo un proyecto de fitorremediación a gran escala (Betts, 1997) en el que se construyeron zonas empantanadas capaces de eliminar 0,019 mg/L de TNT al día. Se utilizaron para ello tres especies de plantas acuáticas además de chopos que se sembraron en el borde de la zona pantanosa. Aunque las plantas se mostraron eficientes a la hora de eliminar el TNT, el hecho es que si se compara con los microorganismos, la capacidad de recuperación por unidad de biomasa de la planta es menor que la de éstos.

Dos posibilidades a tener en cuenta y que actualmente se están ensayando son, por un lado, combinar las capacidades metabólicas de ciertas bacterias que puedan colonizar la rizosfera de plantas junto con la labor de ésta (van Dillejwin y colaboradores, resultados no publicados), y por otro el de las plantas transgénicas que expresen enzimas capaces de metabolizar TNT. Existen así plantas genéticamente modificadas de tabaco expresando la PETN reductasa (French, *et al.*, 1999) ó la nitroreductasa (Hannink, *et al.*, 2001) de *Enterobacter cloacae*. Los resultados muestran un incremento en la tolerancia al explosivo en hidropónicos. Así, mientras que las silvestres no crecen a una concentración de 0,025 mM TNT

(5,7 mg/L), las transgénicas germinaron y crecieron perfectamente a concentraciones de 0,05 mM de TNT.

5. Metabolismo del TNT por *Pseudomonas putida* JLR11.

Esteve-Núñez y Ramos (1998) describieron el aislamiento de una cepa anaerobia facultativa de *Pseudomonas*, proveniente de aguas residuales, capaz de utilizar el TNT como única fuente de N con glucosa como cosustrato. Esta cepa que se denominó JLR11 y posteriormente se identificó como una *Pseudomonas putida* por secuenciación del ARN 16S. Los análisis de balances de masas indicaban una utilización de hasta el 85% de N-TNT, incorporándolo a material celular. Los análisis de sobrenadantes mostraron además la presencia de derivados del TNT que presentaban menor carga de grupos nitro, como por ejemplo el ácido 2-nitro-4-hidroxibenzoico y el 4-hidroxibenzaldehído (ver Fig. 1.9. y 1.10.). Esto indica una eliminación de los grupos nitro a la vez que una oxidación del metilo del TNT.

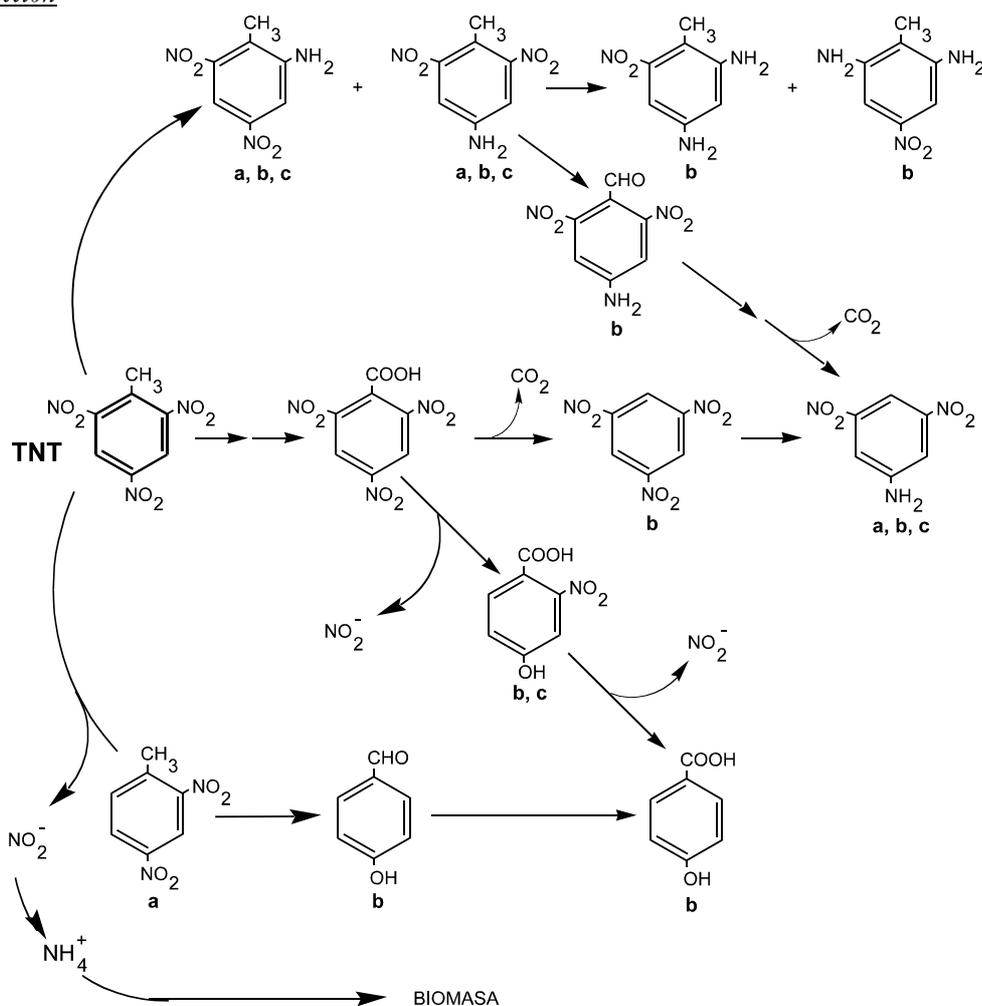


Fig. 1.10. Metabolismo del TNT en *P. putida* JLR11. Los productos mostrados en la figura fueron identificados de la siguiente manera: a, espectro UV-visible tras separación por HPLC; b, espectro de masas tras separación por GC; y c, espectroscopía de RMN-¹H. Figura adaptada de Esteve-Núñez, 2000a.

Los datos de ¹⁴C-TNT indicaban que tan sólo se producía 1% de ¹⁴CO₂, aunque el 45% del carbono permanecía asociado a la fracción precipitable con ácido tricloroacético (TCA). Por otra parte, se dedujo una posible vía inicial de ataque mediada por liberación de grupos nitro en forma de nitrito, ya que éste se acumulaba transitoriamente en los sobrenadantes de los cultivos. Extractos celulares de la cepa crecida en medio anaerobio con TNT como única fuente de nitrógeno mostraban actividad nitrito reductasa (Esteve-Núñez, 2000b).

Un 15% del TNT inicial aparecía acumulado como productos de reducción tipo ADNTs que no se metabolizaban. Una parte de estos productos en condiciones anaerobias procedían de un proceso respiratorio en el cual el TNT servía como último aceptor de electrones. En condiciones de anaerobiosis, con acetato como fuente de carbono y TNT, el acetato debe ser oxidado y tan sólo el

TNT puede servir como aceptor de electrones (Esteve-Núñez, 2000b). El crecimiento de *P. putida* JLR11 en estas condiciones demostraba inequívocamente esta capacidad. Los autores observaron además que en extractos celulares se observaba la translocación de protones asociada a reducción de TNT, pero no de nitrito, o nitrato. También se demostró la síntesis de ATP asociada a la translocación de estos protones en vesículas de membrana de células crecidas en estas condiciones (ver Figura 1.11).

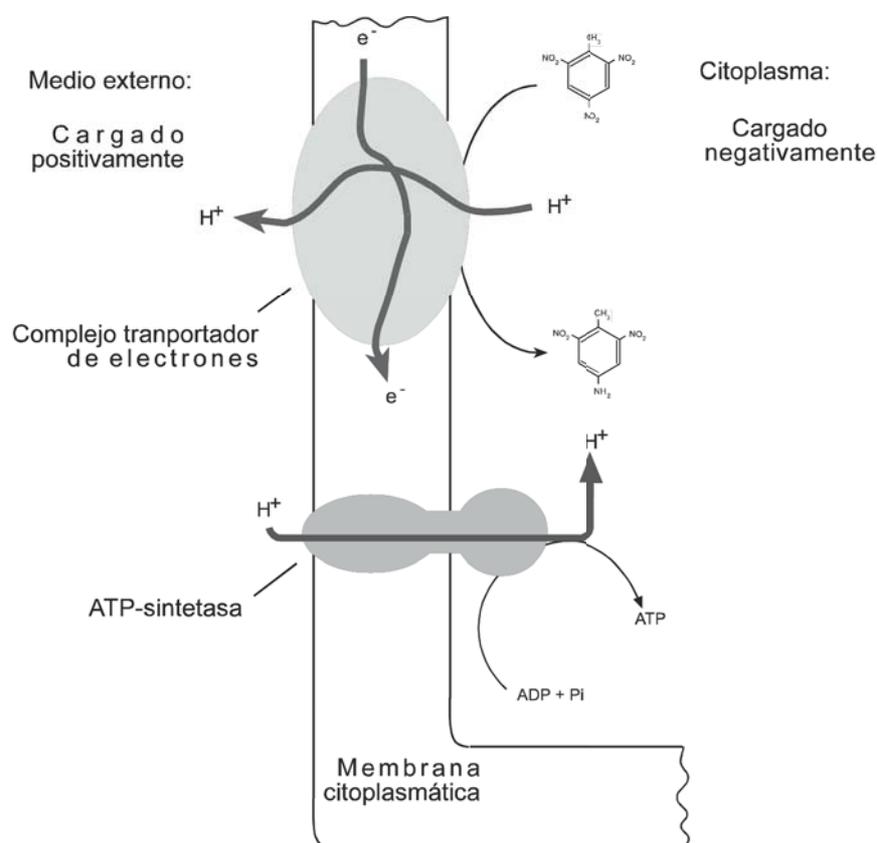


Fig. 1.11. Esquema que muestra la relación entre la reducción del TNT y la síntesis de ATP. Pi, indica fosfato inorgánico. Esquema adaptado de Esteve-Núñez, *et al.*, 2000b.

Objetivos

Objetivos

Pseudomonas putida JLR11 se aisló en una planta de tratamiento de aguas residuales de Granada por su capacidad para crecer en condiciones tanto anaeróbicas como aeróbicas utilizando el TNT como única fuente de nitrógeno. El estudio en profundidad del metabolismo del TNT en esta cepa por el Dr. Esteve-Núñez y colaboradores (1998) determinó que el 85% del nitrógeno del TNT se asimilaba como material celular pese a que no se observó una mineralización del compuesto (en experimentos de marcaje con ^{14}C tan sólo el 1% del TNT acaba en forma de CO_2), mientras un 15% del TNT inicial se acumula en forma de derivados reducidos del TNT en los sobrenadantes de los cultivos. Por otra parte, la acumulación transitoria de nitrito en el medio de cultivo indica una posible denitración del TNT con la formación de nitrito como la posible ruta asimilación del N-TNT. La confirmación de esta hipótesis es el punto donde se inicia el trabajo de investigación de esta Tesis Doctoral, cuyo trabajo se centró en el estudio en profundidad de las rutas de utilización del nitrógeno del TNT en *Pseudomonas putida* JLR11. Para ello se fijaron los siguientes objetivos:

1. Identificación de las rutas de eliminación del nitrógeno del TNT en *Pseudomonas putida* JLR11 .
2. Determinación de las rutas de incorporación del nitrógeno liberado del TNT en *Pseudomonas putida* JLR11.
3. Identificación y caracterización de proteínas nitroreductasas en *Pseudomonas putida* JLR11 y estudio de sus implicaciones en el metabolismo del TNT.

Materiales y métodos

1. Cepas bacterianas y su conservación.

Las estirpes utilizadas en este trabajo, junto con su genotipo o sus características fenotípicas más relevantes, se recogen en la Tabla 2.1. Las cepas se conservaron a corto plazo a 4°C, en cultivos en estría sobre placas de medio sólido, y a largo plazo a -80°C, en cultivos líquidos mezclados en proporción 1:1 con glicerol al 80% (v/v).

Tabla 2. 1. Estirpes bacterianas

Estirpe	Genotipo/Características	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>supE44 hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 (Sm^R) xyl-5 mtl-1</i>	(Boyer y Roulland-Dussoix, 1969)
CC118	<i>β (ara-leu) araD βlacX74 galE galK phoA20 thi1 rpsE (Sp^R) rpoB (Rif^R) argE recA1</i>	(Manoil y Beckwith, 1985)
CC118βpir	C118 lisogenizada con el fago βpir	(de Lorenzo, <i>et al.</i> , 1990)
DH5β	<i>supE44β lacU169(β80 lacZβM15) hsdR17 (r_k m_k⁺) recA1 endA1 gyrA96 (Nal^R) thi1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. putida</i> JLR11	Cepa anaerobia facultativa que utiliza TNT como única fuente de nitrógeno.	Esteve-Núñez y Ramos (1998)
JLR11-6.72 JLR11-40.48	Mutantes de la cepa JLR11 <i>gltB::miniTn5-Tel</i> obtenidos por inserción cromosómica al azar. Tel ^R	Este trabajo
JLR11-M20 JLR11-C42 JLR11-K12	Mutantes de la cepa JLR11 <i>gltD::miniTn5-Tel</i> obtenidos por inserción cromosómica al azar. Tel ^R	Este trabajo
JLR11-9.46	Mutante de la cepa JLR11 <i>ntrC::miniTn5-Tel</i> obtenido por inserción cromosómica al azar. Tel ^R	Este trabajo
JLR11-36.35	Mutante de la cepa JLR11 <i>nasT::miniTn5-Tel</i> obtenido por inserción cromosómica al azar. Tel ^R	Este trabajo
JLR11-10.51	Mutante de la cepa JLR11 <i>cnmA::miniTn5-Tel</i> obtenido por inserción cromosómica al azar. Tel ^R	Este trabajo
JLR11-Mut81	Mutante <i>nasB</i> de la cepa JLR11 por inserción del plásmido pAC.1 en el cromosoma. Gm ^R	Este trabajo

JLR34	Mutante de la cepa JLR11 <i>pnrA::Tel</i> generado por recombinación homóloga con el plásmido pMRSAC.1 <i>pnrA::Tel</i> . Gm ^R	Este trabajo
JLR5	Mutante de la cepa Mut81 <i>pnrA::Tel</i> generado por recombinación homóloga con el plásmido pMRSAC.1 <i>pnrA::Tel</i> . Tel ^R Gm ^R .	Este trabajo

2. Medios y condiciones de cultivos

2.1. Medios de cultivo.

Como medio rico para el crecimiento de *Escherichia coli* y las cepas del género *Pseudomonas* se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook, *et al.*, 1989), cuya composición se detalla a continuación:

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

Como medio habitual de crecimiento para las estirpes de *Pseudomonas* se utilizó el medio mínimo M8 (Abril, *et al.*, 1989) cuya composición por litro fue la siguiente:

Solución 10 x M8	100 ml
Solución goodies	2,5 ml
MgSO ₄ x 7H ₂ O (1M)	1 ml
Citrato férrico amónico 6‰(p/v)	1 ml
H ₂ O	hasta 1 l

La solución M8 fue se esterilizó autoclavándose durante 20 minutos a 121°C y una atmósfera de presión. La composición de la solución 10 x M8 fue la siguiente:

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	70 g
KH ₂ PO ₄	30 g
NaCl	10 g
H ₂ O	hasta 1 l

La solución goodies se esterilizó por filtración a través de filtros estériles de acetato de celulosa de 0,2 μ m de diámetro de poro y su composición fue:

HBO ₃	300 mg
ZnCl ₂	50 mg
MnCl ₂ x 4H ₂ O	30 mg
CoCl ₂	200 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	20 mg
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	30 mg
H ₂ O	hasta 1 l

Como fuentes de carbono se utilizaron las que se detallan a continuación, las concentraciones que se usaron en los distintos ensayos se describen en los correspondientes apartados en la sección *Resultados*.

Azúcares: glucosa, fructosa y sacarosa se prepararon en soluciones madre al 20% (p/v), esterilizándose en un autoclave en las mismas condiciones que las descritas anteriormente.

Ácidos: los ácidos acético, cítrico y succínico se prepararon en soluciones madre a concentración 1 M y se esterizaron en un autoclave.

Compuestos aromáticos: las soluciones de benzoato, 4-hidroxibenzoato se prepararon a concentración 0,5 M; para facilitar la disolución completa de los ácidos correspondientes se adicionó NaOH de manera que el pH final de la disolución fue ligeramente básico. La sal del ácido se esterilizó mediante autoclavado o filtración.

Como fuente de nitrógeno, se utilizaron las siguientes:

Aminoácidos: las soluciones de aminoácidos se prepararon a concentraciones distintas dependiendo de la solubilidad de éstos. Así, L-prolina, L-lisina, L-glutamato y L-alanina se prepararon a 1M, L-arginina a 0,5M, L-asparagina, L-glicina, L-histidina, y L-glutamina a 0,25M, y el L-aspartico a 0.05M.

Inorgánicos: Las fuentes de nitrógeno de naturaleza inorgánica que se utilizaron fueron urea, y las sales nitrato potásico, nitrito potásico y cloruro amónico, con las que se prepararon disoluciones madre a una concentración 1M que se autoclavaron.

Nitroaromáticos: Debido a la baja solubilidad en agua de algunos de los nitroaromáticos que se utilizaron como fuente de nitrógeno, éstos se suministraron en saturación, para ello cristales del producto correspondiente se mantuvieron en agitación en el medio de cultivo durante 24 horas antes de iniciar los ensayos. Cuando los nitroaromáticos, que se utilizaban como fuente de nitrógeno, eran de naturaleza líquida, éstos se suministraron en fase gaseosa de la misma forma en que se hizo con las fuentes de carbono volátiles.

La pureza del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) utilizado en este trabajo de Tesis Doctoral fue mayor del 99% y fue suministrado por la compañía Unión Española de Explosivos (UEE).

2.2. Condiciones de los cultivos.

2.2.1. Cultivos en medios sólidos.

Para la preparación de los medios sólidos se añadió bacto-agar (Difco, ref. 0140-01) a los medios líquidos hasta alcanzar una concentración final del 1,5% (p/v). Cuando se requirieron medios para ensayos con fuentes de nitrógeno específicas, se hizo uso de un agar de mayor pureza (Agar Noble, Difco, ref. 0142-17-0). Los cultivos en medio sólido se hicieron en placas de Petri que se incubaron a 37°C cuando se trató de una cepa de *E. coli* y a 30°C si se trataba de bacterias del género *Pseudomonas*. Para cultivos en condiciones anóxicas se incubaron las placas en una jarra de anaerobiosis (Anaerobic polycarbonate jar, Whitley) en la que se hicieron sucesivos ciclos de vacío-N₂ para crear una atmósfera anóxica. El

cambio de color del indicador de O₂ (Merck, ref.1.15112) situado en el interior de la jarra, confirmó la anoxia de ésta.

2.2.2. Cultivos líquidos aerobios.

Estos cultivos se hicieron en matraces Erlenmeyer con un volumen de cultivo entre el 25 y el 35% del volumen del matraz, y se incubaron a 30°C, para las cepas de *Pseudomonas*, o 37°C para las de *E. coli*, a 200 rpm en un agitador orbital Adolf Kühner ISF-4-V.

2.2.3. Cultivos líquidos en anaerobiosis.

Cuando la bacteria se cultivó en matraces Erlenmeyer, estos se sellaron con un septum de goma estéril y se desplazó el oxígeno del matraz mediante una corriente de nitrógeno. Una vez inoculados los medios de cultivo, éstos se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y agitación que los cultivos aerobios.

Cuando se indica, las bacterias se cultivaron en reactores de 2 litros (Biostat B, Braun-Biotech). En éstos la temperatura se mantuvo constante mediante un sistema de agua termostatizada a través de la camisa del reactor. El pH del medio de cultivo se mantuvo constante utilizando un controlador de pH conectado a bombas peristálticas que suministraban automáticamente NaOH, 2N o H₂SO₄, 1N al medio de cultivo. La agitación se llevó a cabo por un sistema rotacional de paletas a 600 rpm.

Los biorreactores se esterilizaron con el medio sin completar para evitar precipitación de ciertas sales durante el proceso de autoclavado durante 20 minutos a 120°C y a 1 atmósfera de presión. La solución de goodies y el citrato férrico se añadieron una vez el medio se hubo enfriado a una temperatura adecuada. Para conseguir condiciones anaerobias, el medio, recién autoclavado, se desgasificó utilizando la succión generada por una bomba de vacío. Inmediatamente después, se pasó una corriente N₂ que, a través de un filtro estéril, saturó el medio en este gas.

2.3. Antibióticos y sales metálicas.

Los antibióticos se prepararon en H₂O desionizada (H₂O_d) concentrados 1000 veces y se esterilizaron por filtración, excepto el cloramfenicol que se

preparó en etanol absoluto, y la rifampicina y la tetraciclina, que se disolvieron en metanol. Los antibióticos se usaron a las concentraciones finales siguientes ($\mu\text{g/ml}$): ampicilina, 100; cloramfenicol, 30; estreptomina, 50; gentamicina, 10 (para *E.coli*) y 40 (para *Pseudomonas putida* JLR11); kanamicina, 25; rifampicina, 10 y tetraciclina, 10.

Se prepararon soluciones acuosas de telurito potásico (Tel) 1000 veces concentradas, y se utilizaron a distintas concentraciones ($\mu\text{g/ml}$): 30 para *Pseudomonas putida* JLR11, y 5 para *E .coli* DH5 β .

2.4. Ensayos de resistencia en placas de gradiente.

La resistencia a nitrofurazona (NF) se comprobó mediante siembra en medios sólidos con gradiente de concentración de NF. Se usaron placas de Petri cuadradas de 10x10 cm en las que se añadieron 30 ml de LB sólido con 500 $\times\text{g/ml}$ de NF. El LB se vertió sobre las placas inclinadas por una de sus caras, de manera que el LB quedase sin cubrir esta cara de las placas. Una vez solidificado, se colocaron las placas en posición horizontal y se añadieron otros 30 ml de LB, esta vez sin NF. Una vez solidificadas, las placas se pusieron en oscuridad para evitar la degradación de la NF y se esperó 12 horas hasta conseguir una difusión vertical de la NF y con ello un gradiente de 500 a 0 $\times\text{g/ml}$ de ésta en las placas. Sobre ellas se sembraron diluciones de cultivos de las cepas a analizar de manera que quedasen homogéneamente repartidos. Se puede calcular la concentración de NF inhibitoria del crecimiento dependiendo de la distancia a la cara de la placa con mayor concentración de NF a la que se produzca el halo de no crecimiento.

3. Plásmidos

En la Tabla 2.2. se muestran los plásmidos utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes.

Tabla 2.2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pCHESI β KmGm	Ap ^R , Km ^R , Gm ^R ; <i>ori</i> TRP4	van Dillewijn <i>et al.</i> (datos sin publicar)
pJMT4	Ap ^R , Km ^R ; <i>ori</i> TRP4, mini-Tn5 Tel, <i>ori</i> R6K.	(Sanchez-Romero, <i>et al.</i> , 1998)
pLAFR3	Tc ^R , cos, <i>ori</i> V RK2, <i>ori</i> TRK2, β -complementación.	(Staskawicz, <i>et al.</i> , 1987)
pMRSAC.1	Sm ^R , Ap ^R ; <i>ori</i> R6K, <i>ori</i> TRP4, <i>ori</i> ColE1, <i>sac</i> BR.	Este trabajo
pRK600	Cm ^R ; <i>ori</i> ColE1, <i>mob</i> RK2, <i>tra</i> RK2.	(Kessler, <i>et al.</i> , 1992)
pUC18/pUC19	Ap ^R ; <i>ori</i> ColE1, <i>rop</i> -, β complementación.	(Norrande, <i>et al.</i> , 1983)

pCHESI β KmGm: plásmido derivado del pCHESI β Km (Llamas, *et al.*, 2003) de 6674 pb. Contienen el origen de replicación *ori*T de RP4 lo que permite transferirlo a otras bacterias cuando se aportan funciones de movilización en *trans*. Contiene el interosón β -Km del plásmido pHP45 β Km insertado en el sitio *Hind*III del sitio de clonación múltiple (MCS) y el gen de resistencia a gentamicina proveniente del plásmido pMS255 en el sitio *Bam*HI. Permite la generación de mutantes en bacterias gram negativas en las que no se repliquen los plásmidos con origen de replicación *ori*ColE1 (ver sección 9.2 de *Materiales y métodos* y Fig. 2.4.).

pJMT4: plásmido de la serie pUT que lleva un transposón mini-Tn5telurito (Sanchez-Romero, *et al.*, 1998) (Fig. 2.1.). El sistema donador empleado para todos los transposones mini-Tn5 se basa en el plásmido pUT (de Lorenzo, *et al.*, 1990), un derivado del plásmido suicida pGP704 (Miller y Mekalanos, 1988). Este plásmido tiene el origen de replicación del plásmido R6K (dependiente de la proteína β), el origen de transferencia, *ori*T, del plásmido RP4 (es transferible si se

aportan las funciones de movilización en *trans*) y lleva el gen de la β -lactamasa que confiere resistencia a una gran variedad de antibióticos β -lactámicos incluyendo piperacilina. pUT lleva además el gen que codifica la transposasa de IS50R, necesaria para la transposición de los elementos mini-Tn5. Durante la transposición, la transposasa corta el ADN diana dejando una duplicación directa de 19 pb a cada lado de los extremos del mini-Tn5. Estos elementos transponibles, poseen como característica común un gen marcador seleccionable y un sitio de restricción único, *NotI* o *SfiI*, que facilita la clonación de ADN heterólogo para su posterior inserción en el cromosoma o en otro replicón de la bacteria elegida. Por otra parte, el gen que codifica la transposasa se encuentra fuera de los extremos del minitransposón y, por tanto, no se moviliza con éste durante la transposición. Como resultado, las inserciones resultantes son muy estables. Además, como la transposasa actúa preferentemente en *cis*, incluso si la célula huésped adquiriese con posterioridad, o ya portase, un transposón natural del mismo tipo, éste no estimularía una nueva transposición del elemento mini-Tn5 insertado.

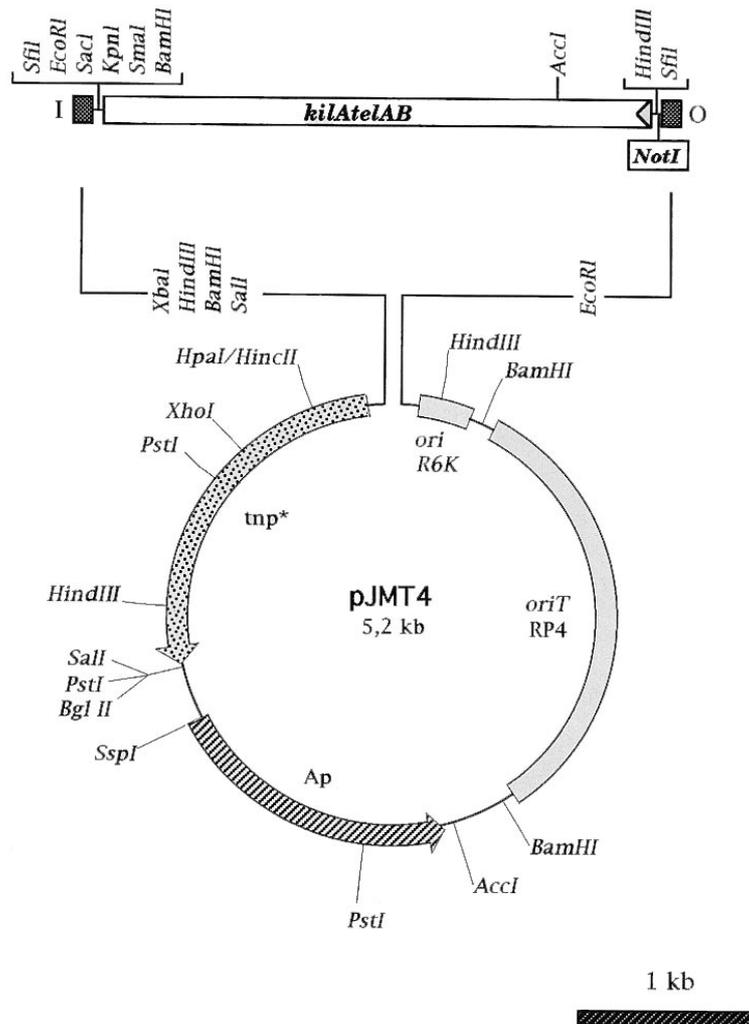


Figura 2.1. Plásmido pJMT4. Se indican los genes que confieren resistencia a ampicilina (Ap) y telurito (*kilAtelAB*), así como el gen que codifica a la transposasa (*tnp**). Los extremos I y O del mini-Tn5 se indican por recuadros sombreados. Se muestra la localización del origen de replicación (*ori* R6K) y el origen de transferencia (*oriT* RP4). El sitio *NotI* recuadrado es único tanto en el mini-transposón como en la construcción final y puede utilizarse como sitio de clonación. Las flechas indican el sentido de la replicación, de la transferencia o de la transcripción de los genes.

pLAFR3: cósmido derivado de pLAFR1 (Friedman, *et al.*, 1982) que posee el fragmento *HaeII* de 454 pb de pUC8 (Vieira y Messing, 1982) conteniendo el MCS y las regiones *lac* que permiten la β -complementación (Fig. 2.2). Posee los sitios *cos* del fago lambda necesarios para el empaquetamiento de ADN dentro de la cápsida de dicho fago. Sólo los cósmidos recombinantes con un tamaño total entre 36 y 51 kb son susceptibles de ser empaquetados *in vitro*. Este plásmido se utilizó para construir genotecas de *P. putida* (ver sección 8 de *Materiales y métodos*.)

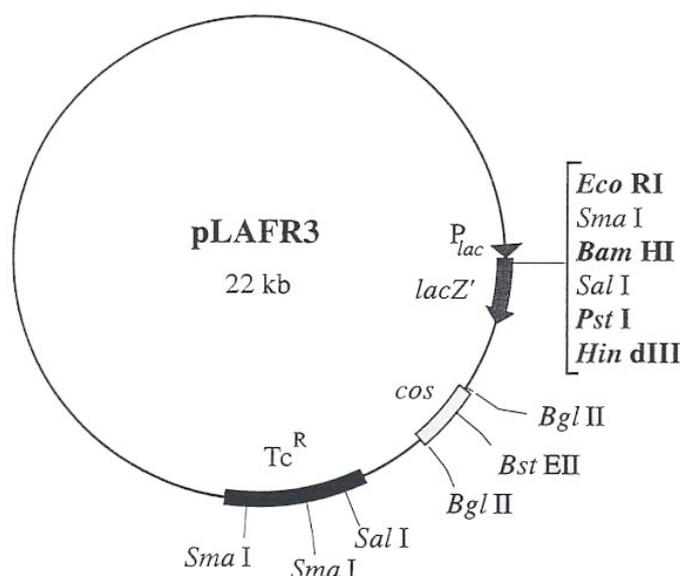


Figura 2.2. Cósmido pLAFR3. En el mapa se muestran los sitios de restricción más relevantes. En negrita se indican los sitios del MCS que son únicos en el plásmido. Se muestra además la posición del gen de resistencia a tetraciclina y de los sitios *cos*. También se indica la posición el gen *lacZ'* que se encuentra bajo el control del promotor P_{lac} (el sentido de la transcripción viene indicado por la flecha).

pMRSAC.1 (ver Figura 2.3.) Derivado del plásmido pMRS101 [Sarker y Cornelis, 1996} al que se le ha eliminado el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina mediante restricción con el enzima *Apa*I y religación. Este plásmido se utilizó para la generación de mutantes tal y como se describe en la sección 9.1 de *Materiales y métodos*. Las mutagénesis con este plásmido se basan en las diseñadas para el pKNG101 (Kaniga, *et al.*, 1991), siendo un plásmido suicida que permite la selección positiva de eventos de recombinación doble en bacterias gram negativas. Presenta el origen de transferencia de RK2, lo que permite transferirlo a otras bacterias. Posee los genes de resistencia a estreptomicina *strAB* que sirven como marcador de selección de la integración del vector en el cromosoma de la célula huésped. Porta los genes *sacBR* de *Bacillus subtilis* como marcador contra-seleccionable, lo que permite distinguir la escisión del vector del cromosoma. Estos genes codifican una levano-sacarasa que cataliza la hidrólisis de sacarosa así como la síntesis de levanos que, en bacterias gram negativas, se acumulan en el periplasma y producen la muerte celular cuando la concentración de sacarosa es mayor o igual al 5% (p/v). Como ventaja del plásmido pMRS101 sobre el pKNG101, es la presencia de un origen de replicación *ori*ColE1, no replicable en

Pseudomonas, que permite un número de copias mayor, y por tanto mayor flexibilidad a la hora de clonar fragmentos de ADN en el plásmido.

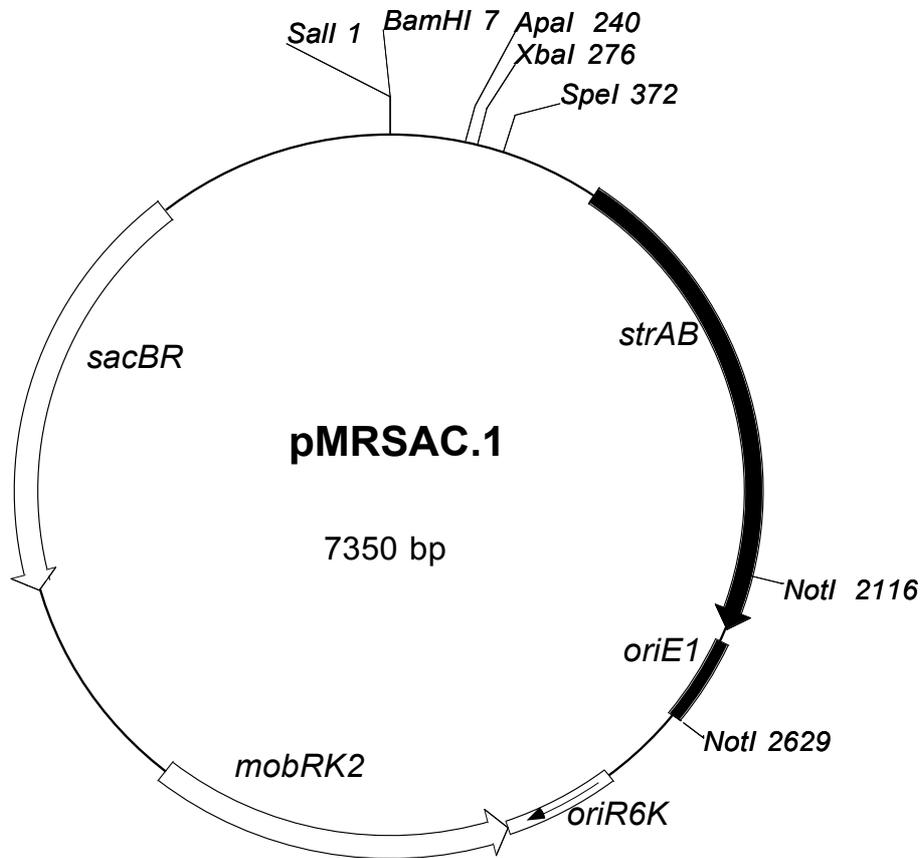


Figura 2.3. Esquema del plásmido pMRSAC.1 donde se muestran los sitios de restricción más destacables, así como la localización de los genes de resistencia a estreptomicina (*strAB*), los que codifican la sacarasa (*sacBR*), así como el origen de transferencia *mobRK2* y los de replicación *oriE1* y *oriR6K*.

pRK600: plásmido auxiliar que aporta en *trans* las funciones necesarias para la movilización de plásmidos *mob⁺ tra⁻*. Este plásmido posee el origen de replicación de ColE1 y por tanto no se puede replicar en bacterias del género *Pseudomonas*. Confiere resistencia a cloramfenicol.

pUC18/pUC19: vectores de clonación de 2.686 pb que combinan fragmentos de pBR322 y de vectores de serie M13mp. Carecen del gen *rop* implicado en el control del número de copias de los plásmidos que contienen el origen de replicación de ColE1, y como consecuencia, presenta un alto número de copias (más de 700 por célula). Confieren resistencia a ampicilina, y poseen un MCS dentro de la región que codifica el péptido β de LacZ. Esto posibilita una fácil

selección de los plásmidos recombinantes en cepas que permitan β -complementación, es decir, aquellas portadoras de la delección *lacZ*×M15 (por ejemplo JM109, DH5 β , etc.). Aquellos clones que porten un plásmido con inserto, formarán colonias de color blanco (en contraposición al color azul de los clones sin inserto) en medio sólido suplido con ampicilina y con 25×g/ml del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal). Si el plásmido se transforma en una cepa *lacI*⁺, es necesario añadir además, 130×M de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

Tabla 2.3. Plásmidos de nueva creación utilizados en este trabajo

Plásmido	Características	Referencia/fuente
pNAJ	pUC19 que porta un fragmento de 1043 pb que contienen el gen <i>pnrA</i> amplificado por PCR como un fragmento <i>XbaI-BamHI</i> .	Este trabajo
pNAJTel	Derivado del pNAJ con el gen <i>pnrA</i> con una delección de 11 pb por corte con <i>NruI</i> . En este sitio se ligó un fragmento de 3,5 kb extraído como fragmento <i>HindIII</i> de pJMT4 que contiene los genes de resistencia a telurito y tratado con el enzima Klenow para generar extremos romos.	Este trabajo
pNBj	pUC19 que porta un fragmento de 1046 pb que contienen el gen <i>pnrB</i> amplificado por PCR como un fragmento <i>XbaI-BamHI</i> .	Este trabajo
pAC.1	pCHESI β KmGm que porta un fragmento interno del gen <i>nasB</i> de 1117 pb amplificado por PCR como un fragmento <i>EcoRI-KpnI</i> .	Este trabajo

pMRSAC.1 <i>pnrA</i> ::Tel	pMRSAC.1 al que se ha insertado un fragmento SalI de 4,1 Kb del plásmido pNAJTel que contiene la construcción <i>pnrA</i> ::Tel.	Este trabajo
----------------------------	--	--------------

4. Aislamiento de ADN plasmídico

Para el aislamiento de ADN plasmídico se utilizaron distintos métodos según el grado de pureza requerido en su uso posterior. En todos los casos, la cepa bacteriana portadora del plásmido de interés se cultivó con agitación durante 10-14 horas a su temperatura óptima en medio LB suplido con los antibióticos correspondientes.

4.1 Método de la lisis alcalina (preparación a pequeña escala)

Para el aislamiento de plásmidos a pequeña escala se utilizó el método de la lisis alcalina de Sambrook *et al.* (1992) con modificaciones (Silvia Marqués, comunicación personal). Las células de 1,5 ml de cultivo se recogieron por centrifugación a 12.000 x *g* durante 5 minutos y se resuspendieron en 100 μ l de GTE, incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200 μ l de solución de lisis, se agitó el tubo por inversión y se incubó en hielo durante 5 minutos. La suspensión lisada se neutralizó con acetato sódico 3M pH 4,8 y, tras agitar el tubo por inversión, se incubó durante 5 minutos en hielo. Los restos celulares, proteínas y el ADN cromosómico se eliminaron por centrifugación a 12.000 x *g* durante 30 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se le añadió 1 ml de etanol absoluto frío para precipitar el ADN. La mezcla se incubó a -20°C durante 30 minutos, centrifugándose después a 12.000 x *g* durante 5 minutos. El sedimento de ADN se secó al vacío y se resuspendió en 50 ml de agua. La composición de las soluciones empleadas en este procedimiento fue la siguiente:

GTE: Glucosa, 50 mM; Tris-HCl, 25 mM; EDTA-Na₂; 10 mM. La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

Solución de lisis: SDS 1% (p/v) y NaOH 0,2 N. Esta solución se preparó a partir de soluciones madre de SDS al 10% y 2N de NaOH.

Tampón acetato sódico 3M pH 4,8: A 60 ml de una solución de acetato sódico 5 M, se le añadieron 11,5 ml de ácido acético glacial y H₂O hasta 100 ml. Cuando fue necesario, el pH se ajustó a 4,8 con ácido acético glacial. La solución se esterilizó por autoclavado y se conservó a 4 °C.

4.2. Método “QUIApreps”

Para la obtención de ADN plasmídico de alta pureza, de uso posterior en reacciones de secuenciación y/o clonación, se utilizó el sistema comercial “QUIAprep-spin Plasmid Kit” (QUIAGEN, Ref. 27104) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5. Aislamiento de ADN total

La extracción de ADN total se llevó a cabo por distintos métodos según el grado de pureza y la cantidad requerida.

Para la extracción para procesos de análisis de ADN cromosómico o secuenciación se usó el sistema comercial “Aqua Pure Genomic DNA Isolation Kit” (Bio-Rad, Ref. 732-6340).

Para la construcción de la genoteca de *Pseudomonas putida* JLR11 (ver la sección 8 de *Materiales y métodos*) se usó un protocolo descrito por Robertson y colaboradores (1984) con modificaciones. Volúmenes de 10 ml de cultivo en LB de la cepa incubados durante toda la noche se recogieron por centrifugación a 1500 x g durante 15 minutos y se lavaron una vez en 25 ml de TES. Las células se resuspendieron en 10 ml de TES y se lisaron añadiendo 1,6-2 ml de SDS al 10% (p/v) e incubando a 37°C durante 10 minutos. A los lisados se les añadió sucesivamente 1,2 ml de acetato sódico 3 M pH 4,8 y 10 ml de isopropanol y se mezcló suavemente. El ADN se recogió con ayuda de una varilla de plástico con punta curvada y, tras drenar, se disolvió en 3-5 ml de 0,1 x SSC. Para digerir las proteínas, se añadieron 500 µg/ml de proteinasa K (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1373200) y se incubó a 55°C durante dos horas. Los restos de proteínas se eliminaron mediante extracciones sucesivas con volúmenes iguales de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y una final de cloroformo. A la fase acuosa conteniendo el ADN se le añadió 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y 2

volúmenes de etanol 98%. El ADN precipitado se recogió con una varilla de plástico y se resuspendió en 550 μ l de 0,1% de TESL. La muestra se trató con ARNasa a 37°C 30 minutos para eliminar el ARN contaminante. Se eliminó la ARNasa mediante fenolización y posterior precipitación con acetato sódico 3 M y etanol absoluto. La muestra se resuspendió en 300 μ l de 0,1% de TESL.

TES: Tris 10 mM; EDTA 100 mM y NaCl 150 mM, pH 8,0.

SSC: Citrato sódico 0,015 mM y NaCl 0,15 N

TESL: Tris 10 mM; EDTA 1 mM y NaCl 1,5 mM, pH 8,0.

6. Transferencia de plásmidos.

6.1. Por conjugación.

La movilización de plásmidos no autotransferibles (*mob*⁺, *tra*) a cepas de *Pseudomonas*, se realizó mediante conjugación “tripartita” (de Lorenzo y Timmis, 1994) en la que participaron la cepa de *E. coli* donadora (portadora del plásmido que se desee movilizar), la cepa de *Pseudomonas* receptora y la cepa auxiliar *E. coli* HB101(pRK600). Los transconjugantes de *Pseudomonas putida* se seleccionaron en medio mínimo que contenía los nutrientes y los antibióticos adecuados para la selección del receptor del plásmido transferido. Simultáneamente, para calcular el número de células receptoras de *Pseudomonas putida* presentes en dicha mezcla, se sembraron diluciones seriadas de la mezcla de conjugación en el medio anterior sin antibiótico. La frecuencia de transconjugantes se expresó como el número de transconjugantes en relación al número de receptores.

6.2. Por transformación mediante choque térmico.

El método utilizado para la preparación de células competentes de *E. coli* y su transformación fue descrito por (Inoue, *et al.*, 1990). Con este método se obtuvieron frecuencias de transformación de aproximadamente 1×10^8 transformantes/ μ g de ADN de pBR322.

6.3. Por electroporación.

La electroporación de plásmidos en células de *E. coli* y *P. putida* se realizó según (Enderle y Farwell, 1998). Para ello se partió de un cultivo en medio LB sólido de células incubadas a 30 ó 37°C durante 10-14 horas y que no se hubiera almacenado a 4°C o temperaturas inferiores. De este cultivo se recogieron 3 mg

de células, evitando arrastrar el medio de cultivo, y se resuspendieron en 0,5 ml de H₂O_d estéril. Las células se lavaron 2 veces con 0,5 ml de H₂O_d estéril y se concentraron por centrifugación a 17000 x g durante 1 min, tras lo que se resuspendieron en 40 \times l de H₂O_d estéril. Las células se mantuvieron en hielo hasta el momento del pulso eléctrico. Entre 5 y 15 ng de ADN plasmídico sin sales, se mezclaron con las células ya preparadas. La mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm de distancia entre los electrodos (Bio-Rad, ref. 165-2086) previamente enfriada en hielo, y se sometió a un pulso eléctrico de 2,5-3 kV en un electroporador (MicroPulser Electroporation Apparatus, Bio-Rad, 165-2100). Después del pulso las células se recogieron inmediatamente añadiendo 1 ml de LB líquido, y la mezcla se incubó durante 1 hora a 30 ó 37°C, tras lo que se sembraron diluciones de la misma en medios sólidos selectivos para obtener transformantes.

7. Técnicas comunes de manipulación de ADN.

7.1. Restricción de ADN.

Las reacciones de digestión de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima fijadas por el fabricante. Las reacciones contenían habitualmente 0,5-5 μ g de ADN; 0,1 volúmenes del tampón de restricción suministrado, diez veces concentrado, por la casa comercial; 0,5-5 unidades del enzima de restricción, en volúmenes finales de 10-40 μ l completados con H₂O_d. Las digestiones se incubaron a la temperatura que indicaba el fabricante durante un tiempo entre 2 y 12 horas, dependiendo de la naturaleza del ADN de la muestra.

7.2 Electroforesis de ADN.

La electroforesis de ADN se llevó a cabo según Sambrook y colaboradores. (1989), utilizando geles de agarosa preparados en tampón TAE. La separación se realizó por electroforesis horizontal a un voltaje de 5-10 V/cm. Para visualizar el ADN en los geles, éstos se tiñeron por inmersión en una solución de bromuro de etidio (10 \times g/ml) y posterior exposición a luz ultravioleta (254 nm) en un transiluminador. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por

interpolación en curvas logarítmicas del tamaño de cada fragmento frente a su movilidad relativa, utilizando como patrón los fragmentos de ADN del fago lambda digerido con las enzimas *Hind*III y *Bst*EII o bien los suministrados comercialmente VIII (Roche Molecular Biochemicals ref. 1336045) y X (Roche Molecular Biochemicals ref. 1498037).

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

Tampón de carga: glicerol (30% v/v), azul de bromofenol (0,3% p/v) y azul de xilencianol (0,3% p/v).

Tampón TAE: Tris-Base (4,84 g/l), ácido acético glacial (1,14 ml/l), EDTA-Na₂ 0,5M, pH 8 (2 ml/l).

7.3. Recuperación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa.

Para la recuperación de fragmentos de ADN de la agarosa se utilizó el sistema comercial “QIAEX II Gel Extraction Kit” (QIAGEN, ref. 20021), siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.4. Secuenciación de ADN.

La secuenciación de ADN plasmídico y de los fragmentos de ADN amplificados por PCR se realizó utilizando un secuenciador capilar *ABI PRISM* (modelo 310). Para la preparación de las reacciones de secuenciación se usó el kit “DNA Sequencing Kit with AmpliTaq DNA polymerase” (Perkin-Elmer, ref. 402122), basado en la utilización de didesoxinucleótidos con cromóforos fluorescentes. Los oligonucleótidos empleados como cebadores en la secuenciación se sintetizaron en el Servicio de Secuenciación Automática y Síntesis de ADN del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra del CSIC en Granada. En todos los casos, se secuenciaron las dos cadenas de ADN.

7.5. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (“PCR”).

Este método se empleó para la amplificación de fragmentos de ADN del cromosoma de *Pseudomonas*, y en algunos análisis de colonias obtenidas tras la transformación de ligaciones, para encontrar de forma rápida el ADN recombinante de interés. La reacción de amplificación contenía: ADN molde (0,2 ng/μl para el ADN cromosómico o 10 pg/μl para el ADN plasmídico), cebadores

(0,5 \times M cada uno), tampón de reacción (KCl, 50 mM; Mg(OAc)₂, 1,5 mM; Tris-HCl, 10 mM pH 8,3), dNTPs (100 \times M cada uno) y ADN polimerasa *Taq* (Eppendorf[®] *Taq* DNA polymerase, Eppendorf ref. 0032 002.200) (0,025 U/ \times). Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, se realizaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 94°C, 10 seg; La temperatura de hibridación (T_h), 10 seg; 72°C, 1 min, y finalmente se realizó una extensión a 72°C durante 10 min. La temperatura de hibridación (T_h) se varió en función de los cebadores utilizados. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria se combinaron distintas modificaciones, como cambiar la concentración de MgCl₂ (incrementándola a 3 ó 4,5 mM) y/o añadir ciertos compuestos a la mezcla de reacción (por ejemplo, glicerol al 10% [v/v] o DMSO al 5% [v/v]). Ocasionalmente, el producto obtenido tras la amplificación se purificó utilizando el sistema comercial “QIAquick PCR Purification Kit” (QIAGEN, ref. 28104) para eliminar los cebadores y los dNTPs; también se recurrió a separar el ADN mediante electroforesis y recuperar el fragmento de interés como se describe en el apartado 7.3 de esta sección.

7.6. Reacción de amplificación de secuencias contiguas a transposones mediante “PCR arbitraria”.

El ADN flanqueado a inserciones de transposones se amplificó mediante PCR a partir de cebadores degenerados descritos por [Caetano-Anolles (1993)]. En esta técnica, la región de ADN adyacente a la inserción, se enriqueció tras dos rondas de amplificación. En la primera ronda se utilizó un cebador específico del transposón utilizado, en este caso el del telurito, y otro, denominado ARB1, con parte de la secuencia degenerada (ver Tabla 2.4). Esta reacción se hizo en 100 μ l de volumen y los componentes de la mezcla son idénticos a los anteriormente citados para las reacciones estándar de amplificación, excepto por la adición de 1 mM de MgSO₄. Las condiciones de esta primera ronda de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, se realizaron 6 ciclos en las siguientes condiciones: 94°C, 10 seg; 30°C, 30 seg; 72°C, 1,5 min; y

otros 30 ciclos como sigue: 94°C, 30 seg; 30°C, 45 seg; 72°C, 2 min; y finalmente se realizó una extensión a 72°C durante 10 min. La segunda ronda de amplificación se hizo utilizando el ADN amplificado en la primera ronda, diluido 1:100, como ADN molde. Los cebadores en esta segunda ronda fueron ARB2 cuya secuencia es idéntica a la del extremo 5' de ARB1 (ver Tabla 4); y un cebador complementario al extremo del transposón y con una localización más externa que la del utilizado en la primera ronda. Las condiciones de esta segunda ronda de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, se realizaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 94°C, 10 seg; 45°C, 30 seg; 72°C, 2 min; y finalmente se realizó una extensión a 72°C durante 10 min.

Tabla 2.4. Cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN por PCR arbitraria.

Nombre	Secuencia (5'-3')
ARB1	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(AGCT)(AGCT)(AGCT)(AGTC)(AGTC)(AGTC)(AGTC)(AGTC)(AGTC)GATAT
ARB2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Tel1	G TTCACGCTT TGTTCCTCCATTC
TelA	GATACACCCTCGCGGTGGGTAAATTG
Tel2	CAGAGCATAAGCGGCAAGAGA
TelB	AACCGGCTTGTGGGCTG

7.7. Transferencia de ADN a membrana e hibridación (“Southern blotting”).

El ADN previamente digerido y separado en gel de agarosa, se transfirió por capilaridad a una membrana de nailon cargada positivamente (Boehringer Mannheim, ref. 1417240) siguiendo el protocolo de transferencia alcalina descrito

por Sambrook y colaboradores (1989). El marcaje con digoxigenina de la sonda, la hibridación y la posterior detección se realizaron siguiendo las instrucciones indicadas por el sistema comercial “DIG DNA Labelling and Detection Kit” (Boehringer Mannheim, ref. 1093657). Las membranas se hibridaron y lavaron en condiciones estrictas.

7.8. Otras técnicas de manipulación de ADN.

Las reacciones de ligación, de desfosforilación, de relleno de extremos colgantes en 5' (mediante tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli.*) o de eliminación de extremos colgantes en 3' (usando la ADN polimerasa del fago T4), se realizaron siguiendo los protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989). La digestión parcial de ADN se realizó siguiendo el protocolo descrito por [Ausubel *et al.* (2002)] basado en diluciones seriadas de enzima de restricción.

En ocasiones, los productos de amplificación por PCR se clonaron directamente en los plásmidos suministrados comercialmente pGEM-T (pGEM^β-T Vector systems, Promega, ref. A3600) o pCRβ 2.1 (The original TA cloning^β Kit, Invitrogen, ref. 45-0046).

8. Preparación de genoteca de *P. putida* en cósmido.

8.1. Restricciones parciales de ADN.

El ADN cromosómico de *P. putida* JLR11 se obtuvo como se describe en la sección 5 de *Materiales y métodos* y se digirió parcialmente (ver sección 7.7 de *Materiales y métodos*) para enriquecer los fragmentos de 20-25 kb. Las restricciones se llevaron a cabo con el enzima *Pst*I, ya que la diana para este enzima se encuentra en el sitio de clonación múltiple del cósmido pLAFR3 (ver Fig. 2.2.) además de ampliamente representada en el cromosoma de *P. putida*. Las moléculas resultantes de la ligación del cósmido con los fragmentos cromosómicos, de un tamaño de 45-50 kb, eran susceptibles de empaquetarse como partículas del fago β. Tras ensayar las condiciones de restricciones parciales para encontrar las adecuadas para obtener estos fragmentos, se utilizó 0,5 ×g de ADN digeridos con 0,15 unidades de *Pst*I por ×g de ADN, en un volumen final de 20 ×l, durante 25

minutos a 37°C, tras lo cual se paró la reacción con un paso de 10 minutos a 65°C.

8.2. Empaquetamiento de cósmidos.

Unos 600 ng de ADN de fragmentos de aproximadamente 25 kb se ligaron con el cósmido pLAFR3 (en proporción 3:1) en un volumen final de 10 μ l. El resultante de esta ligación fue el sustrato usado en la reacción que se llevó a cabo con el extracto de empaquetamiento de Stratagene (Gigapack II Gold Packaging Extract, Promega ref. 200216), siguiendo el protocolo del producto. Las partículas de fagos se diluyeron hasta un volumen de 500 μ l de tampón de dilución de fagos SM y se conservaron a 4°C hasta que se usaron en la transfección. La composición del tampón SM, esterilizado en autoclave, fue: NaCl 5,8g; MgSO₄ 2g; Tris-HCl 1M pH 7,5 50 ml; Gelatina 2% (p/v).

8.3. Preparación de células transfectantes de *E. coli* HB101 y su transfección.

Un volumen de 25 ml de medio TB se inoculó con *E. coli* HB101 y se incubó durante unas 14 horas a 30°C en agitación. Las células se recogieron por centrifugación a 1500 x g a 4°C durante 15 min y se resuspendieron en 12,5 ml de MgSO₄, 10 mM estéril. Se diluyó en la misma solución hasta una DO_{660nm} de 0,5-0,7 y se conservaron a 4°C durante un máximo de 4 días.

Para la transfección, a 6 ml de la dilución anterior se añadió el empaquetado de fagos descrito en la sección anterior y se incubó a 37°C durante 15 min para que tuviera lugar la inyección del cósmido dentro de la bacteria. Tras completar el volumen hasta 30 ml con LB y 1 hora a 37°C, las células transfectantes se seleccionaron tras siembras de diluciones seriadas en medio LB sólido suplido con tetraciclina. El número de colonias portadoras de plásmidos recombinantes fue de unos 3000 clones, lo que indicando una alta frecuencia de representación del genoma de *P. putida* JLR11. La genoteca se conservó en masa mediante la recogida de todos los clones del medio sólido con 2 ml de LB que se centrifugó a 3500 x g durante 15 min y finalmente se resupendió en 16 ml de LB suplida con glicerol 40% (v/v). Alícuotas de 2 ml se conservaron congeladas a -80°C.

9. Construcción de mutantes.

Los mutantes construidos durante esta Tesis se llevaron a cabo mediante dos métodos distintos.

9.1. Mutantes generados mediante intercambio alélico.

Para la construcción de mutantes por intercambio alélico en *P. putida* se utilizó el plásmido pMRSAC.1 (ver sección 3 de *Materiales y métodos*) en el cual se clonó el gen a mutar interrumpido por un gen marcador (el operón que codifica para la resistencia a telurito *kilAtelAB*) de manera que hubiese suficiente secuencia de ADN a cada lado de dicho gen marcador. El plásmido se transfirió desde *E. coli* CC118 λ pir a *P. putida* por conjugación triparental. Se seleccionaron los transconjugantes resistentes a telurito surgidos como consecuencia de la integración del vector en el cromosoma del huésped por recombinación homóloga a través de las secuencias que flanquean al marcador. Se comprobó por PCR la presencia de la inserción, llamando cointegrado en estos clones (merodiploides). Se descartó así la posible presencia de clones espontáneos resistentes al telurito. Las cepas merodiploides no deberían de crecer en sacarosa al 10% (p/v), pero en ocasiones, las condiciones tuvieron que modificarse, bien variando la concentración de sacarosa, de NaCl en el medio, o la temperatura de crecimiento. Se seleccionaron varios merodiploides y se cultivaron por separado durante 8-10 h en LB líquido sin presión selectiva. Al cabo de este tiempo se sembraron diluciones seriadas en el medio LB con sacarosa (con las condiciones optimizadas). Parte de este cultivo se utilizó para inocular medio LB fresco, y se volvió a repetir todo el proceso. El crecimiento en ausencia de presión selectiva, permitió que pudiese ocurrir un segundo evento de recombinación que tuvo como consecuencia la pérdida de las secuencias del vector y de una de las copias del gen a mutar (bien la silvestre o la interrumpida). La posterior siembra en medio con sacarosa permitió seleccionar aquellos clones donde el cointegrado se había resuelto, y la siembra en medio con telurito permitió distinguir indiscutiblemente aquellos que habían revertido al genotipo el silvestre de aquellos que poseían la copia mutada. Estos últimos se terminaron comprobando por PCR y por hibridaciones de ADN.

9.2. Mutantes por inserción por recombinación alélica.

Para estos mutantes se utilizó el plásmido pCHESI α KmGm (ver sección 3 de *Materiales y métodos*) y el método descrito por Llamas y colaboradores (2003). En este plásmido se clonó un fragmento interno del gen a mutar, preferiblemente mayor de unas 500 pb. Este plásmido se transfirió desde *E. coli* DH5 β a *P. putida* JLR11 mediante conjugación triparental. Los transconjugantes se seleccionaron en medio selectivo para la cepa de *Pseudomonas* además de gentamicina 40 (\times g/ml). Los clones transconjugantes indicaban una inserción en el cromosoma por recombinación homóloga entre el gen a mutar y el fragmento portado por el plásmido, lo que conduce a la formación de un cointegrado. Este cointegrado posee dos copias truncadas del gen deseado, y por tanto es un clon mutante en este gen (ver Fig. 2.4). Los clones obtenidos se analizaron mediante PCR y posterior hibridación de ADN.

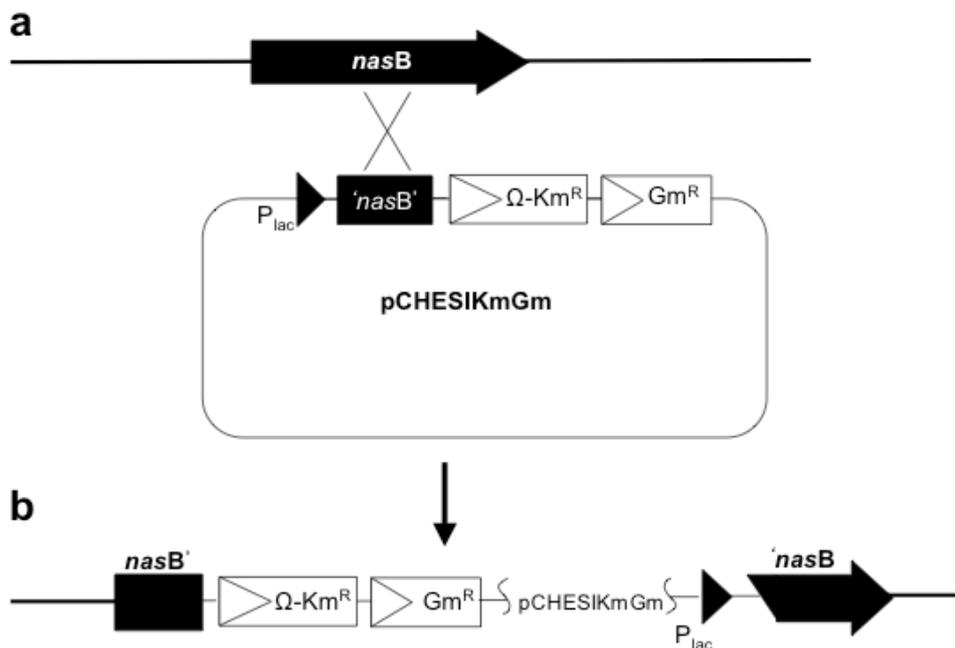


Fig. 2.4. Esquema representativo de mutagénesis por inserción mediante el plásmido pCHESI α KmGm. En este caso se ejemplifica con la mutagénesis del gen que codifica la nitrito reductasa asimilatoria de *Pseudomonas putida* JLR11, *nasB* (ver sección 2 del Capítulo I). Un fragmento interno de 1117 pb de este gen se ha clonado en el plásmido y se transfiere a *P. putida* JLR11 donde se produce el fenómeno de recombinación homóloga (a). El cointegrado resultante posee el gen *nasB* interrumpido por el plásmido y por tanto es mutante en este gen (b).

10. Técnicas comunes de manipulación de ARN.

10.1. Extracción de ARN.

El ARN total se extrajo utilizando el reactivo TRI REAGENT[®] LS (Molecular Research Center Inc., ref. TS-120). Es importante trabajar en condiciones libres de ribonucleasas que puedan degradar las muestras. Para ello se requiere trabajar con guantes durante todo el proceso, material de plástico obtenidos de bolsas recién abiertas, el material de vidrio tratado con cloroformo y soluciones tratadas con dietilpirocarbonato (DEPC), o preparadas en H₂O_d tratada con DECP (H₂O_{DEPC}). El H₂O_{DEPC} se obtiene tras esterilizar una solución de DEPC al 0,1% (v/v) en H₂O_d incubada previamente al menos durante 60 min a temperatura ambiente y en agitación.

Para la preparación de ARN se recogieron 10-12 ml de cultivos en fase de crecimiento exponencial en tubos de centrifuga enfriados previamente con nitrógeno líquido. Los sedimentos celulares obtenidos por centrifugación a 4°C se almacenaron a -80°C hasta la extracción del ARN. Para la extracción la solución TRI REAGENT[®] LS se calentó previamente a 65°C, así como los tubos de microcentrifuga donde se mezcló 1 ml de la solución anterior con los sedimentos celulares mediante agitación vigorosa. Después de 10 min a esta temperatura se centrifugó la mezcla a 13500 x g a 4°C otros 10 min. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo junto con 100 μ l de 1-bromo-3-cloropropano (BCP) (suministrado también por Molecular Research Center Inc., ref. BP-151). Tras agitación vigorosa para asegurar la mezcla, se centrifugó 15 minutos a 13500 x g y 4°C. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo teniendo mucho cuidado para no arrastrar con él la interfase. Se añadió 1 volumen de isopropanol y se dejó precipitando durante 5-10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó otros 15 min, a 13500 x g, y tras descartar el sobrenadante, se lavó con 1 ml de etanol al 70% (v/v). Se centrifugó 5 min a 13500 x g y se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar el ARN y se resuspendió en 50-100 μ l de H₂O_{DEPC}.

El ADN presente en los ácidos nucleicos extraídos se eliminó mediante tratamiento con el enzima ADNasa I de páncreas de bovino libre de ARNasas. A cada muestra se le añadió 25 μ l de una solución preparada en H₂O_{DEPC} que

contenía 20 U de inhibidor de ARNasas (“RNase-Inhibitor”, Roche Molecular Biochemicals, ref. 799025), ditioneitol (DTT) 4 mM, MgCl₂ 40 mM y 10 U de ADNasa I libre de ARNasas (Roche Molecular Biochemicals, ref. 776785). La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C. Para eliminar las proteínas presentes en las muestras, se realizó una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) y otra posterior con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). El ARN se precipitó con acetato sódico 3 M pH 4,8 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla se incubó 40 min a -80°C, seguido de una centrifugación a 15000 x g durante 15 min. El sedimento se lavó con etanol 70% (v/v) y se volvió a centrifugar durante 5 min. Tras secar el sedimento, el ARN se resuspendió en un volumen de 50-75 µl de H₂O_{DEPC}. Las muestras se almacenaron a -20°C, ó a -80°C en caso de que se quiera un almacenamiento más prolongado.

10.2. Determinación de la concentración de ARN.

La concentración de ARN se determinó midiendo la absorbancia de las mismas a 260 y 280 nm frente a una muestra de H₂O_d. La concentración de cada muestra se calculó tomando el valor de referencia el valor estándar de A₂₆₀=1 para soluciones que contienen 40 µg/ml de ARN (Ausubel, *et al.*, 2002). La relación A₂₆₀/ A₂₈₀ se utilizó para determinar el grado de pureza las preparaciones. Esta relación es igual a 2 en caso de muestras puras disueltas en TE pH 8. Valores por debajo de 1,8 se consideran una indicación de contaminación de la muestra por proteínas y/o fenol. Sin embargo, debido al pH ligeramente ácido del H₂O_{DEPC}, el valor de la relación ideal para una muestra disuelta en H₂O_d es de 1,8, siendo correcta una medida por encima de 1,6.

10.3. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR).

La transcripción reversa y la posterior reacción de amplificación del ADN_C se realizaron utilizando el sistema comercial “Titan one tube RT-PCR System” (Roche Molecular Biochemicals, ref. 1855476) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa se realizó incubando las muestras a 50°C durante 30 min. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron

las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, se realizaron 30 ciclos en las siguientes condiciones: 30 seg; 45-60°C, 30 seg; 68°C, 1 min, y finalmente se realizó una extensión a 68°C durante 10 min. La temperatura de hibridación varió en función de los cebadores utilizados. En todos los ensayos se realizaron controles negativos para detectar falsos positivos en la reacción de extensión debido a la presencia de ADN en las muestras de ARN. Como controles negativos se realizaron por un lado una reacción de transcripción reversa y amplificación sin la muestra de ARN, y por otro lado una reacción de amplificación tras un tratamiento a 94°C para inactivar el enzima transcriptasa reversa. También una reacción de PCR normal a partir de las muestras de ARN.

11. Determinación de la expresión génica por medio de amplificación en cadena a tiempo real (RT-PCR).

La variación en la expresión en distintas condiciones de algunos de los genes estudiados de *Pseudomonas putida* JLR11 se determinó mediante la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) por PCR a tiempo real.

11.1 Diseño de cebadores.

Los cebadores se diseñaron para amplificar un producto no superior a 150 pb. Se trató además de evitar la formación de estructuras secundarias y amplificaciones inespecíficas durante el uso de estos cebadores, según las recomendaciones de (Bustin, 2002). El correcto diseño de estos cebadores se analizó en la página web <http://scitools.idtdna.com/Analyzer/>. Los cebadores usados con este propósito en esta Tesis se muestran en la Tabla 2.5.

Cebador	Secuencia de 5' a 3'
PnrART52	AGCGATGTCCGAGGAGCTTGGC
pnrART3	CTGAAACCGCCTCTGCCTCG
PnrB52	GTACTGCCTTGCTGGGTGCG
pnrB3	CCCACGCTCACGCAAACCC

rRNA16SFwd	AAAGCCTGATCCAGCGAT
rRNA16SRev	GAAATTCCACCACCCTCTACC

11.2. Síntesis de ADN_C.

El ARN se extrajo tal y como se describe en la sección 10.1 de *Materiales y métodos*, y a partir de 1 \times g de cada muestra se sintetizó el ADN_C de los genes a estudiar, usando para ello la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (“AMV reverse transcriptase” Roche Molecular Biochemicals, ref. 1 495 062) y los cebadores específicos a estos genes descritos en la Tabla 5. La reacción tuvo lugar a 50°C durante 30 minutos.

Se realizaron además controles previos a la PCR en tiempo real mediante reacciones de amplificación de ADN acopladas a retrotranscripción, RT-PCR (ver sección 10.3 de *Materiales y métodos*) con las cuales se comprobó que el producto de la reacción de amplificación era el deseado y no daba lugar a amplificaciones inespecíficas. Se comprobó además que el ARN no contenía contaminaciones con ADN mediante PCR normal a partir de estas muestras.

11.3. Cuantificación de ADN_C en PCR a tiempo real.

El ADN_C se usó como molde en una reacción de amplificación en PCR a tiempo real. Este sistema permite seguir la síntesis de doble cadena de ADN mediante un lector óptico que mide la fluorescencia de compuestos, como el SYBR^β Green, presentes en la mezcla de reacción. La intensidad de fluorescencia de este compuesto es hasta 100 veces superior cuando se une a ácidos nucleicos de doble cadena. La reacción de amplificación puede ser representada, por tanto, como una curva de intensidad de emisión del fluoróforo con respecto a los ciclos de amplificación. Dicha curva tiene una tendencia exponencial, de manera que el ciclo en que el aumento en intensidad de luz entra en fase exponencial depende de la cantidad de ADN inicial (a este ciclo se denomina “ciclo de transferencia, C_T”). Así, a menor cantidad de ADN molde inicial, mayor es el número de ciclos necesarios para entrar en dicha fase exponencial.

Se puede comparar la diferencia de expresión de un gen en distintas condiciones comparando el número de ciclos requeridos para llegar al C_T de las

muestras en cada una de las condiciones. Para normalizar los resultados, se usa como control interno la amplificación del ADN_C de un gen cuya expresión sea constitutiva, como por ejemplo el usado en esta Tesis Doctoral, el ARN ribosómico 16S.

Para la PCR a tiempo real se usó en el sistema “iCycler iQ real-time PCR detection system” (Bio-Rad). Para la reacción se usó la mezcla comercial iQ β SYBR^β Green Supermix (Bio-Rad, ref. 170-882), que contiene el fluoróforo así como la polimerasa de ADN. El ADN_C y los cebadores se añadieron siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos donde se colocaron las muestras por triplicado, incluyendo además diluciones de cada muestra de ADN_C para optimizar la medida. En el caso del ARN 16S se utilizó una dilución 1/1000 del ADN_C, ya que de otra manera, la medida se saturó por la alta concentración de productos de PCR. Se añadieron además controles de mezcla de reactivo con cebadores y sin ADN_C. El programa de amplificación fue: 7 min a 95°C., seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 61°C y 20 s a 72°C. La curva de disgregación se analizó para comprobar que no se produjeron amplificaciones inespecíficas durante la reacción. Las cuantificaciones de diferencia de expresión se determinaron por el sistema estadístico descrito por (Livak y Schmittgen, 2001).

12. Métodos analíticos.

12.1. Determinación de nitrito.

La determinación de nitrito se llevó a cabo mediante el método de diazotación de (Snell y Snell, 1949). El método requirió el uso de soluciones de sulfanilamida (10g/l) preparada en HCl 2,4 N y de N-naftil-etilen-diamino (NNEDA, 200 mg/l). A 0,5 ml de muestra se adicionaron volúmenes iguales de las soluciones de sulfanilamida y NNEDA. Las muestras se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. En presencia de nitrito se formó un producto de diazotación de color rosado que se detectó por su absorbancia a 540 nm. Se utilizaron soluciones patrón de nitrito sódico entre 1 y

100 μM , obteniéndose la concentración de nitrito por interpolación gráfica de la representación A_{540} frente a las concentraciones de la soluciones patrón.

12.2 Determinación de amonio.

El amonio se determinó por el método de determinación de formación del indofenol-blue. En las determinaciones se utilizó una alícuota de 1 ml del medio de cultivo libre de células, a la que se añadía 5 μl de MgSO_4 3 mM. En agitación vigorosa, se añadió 50 μl de reactivo de hipoclorito sódico (preparado de hipoclorito sódico comercial al 5% (v/v) pH 7). Inmediatamente se añadió 60 μl de reactivo de fenol (2,5 g de NaOH y 10 g de fenol en 100 ml de H_2O_d). Tras 10 min, el producto de la reacción se pudo medir a 630 nm. Se utilizaron soluciones patrón preparadas de 1 a 200 μM de amonio para interpolar los valores obtenidos en las muestras. Todas las soluciones debieron de conservarse frescas, no pudiendo utilizarse con más de una semana desde la preparación.

12.3 Determinación de proteína.

El método de (Bradford, 1976) se utilizó para determinar el contenido proteico en extractos libres de células y en membranas. La concentración proteica en células enteras se analizó por el método de (Lowry, *et al.*, 1951).

12.3.1 Determinación de proteína por el método de Bradford.

Los reactivos para la determinación de proteína por el método de Bradford fueron suministrados por la casa comercial Bio-Rad (Bio-Rad Dye reagent concentrate, ref. 500-0006). A 800 μl de la muestra se añadieron 200 μl del colorante comercial, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia de la muestra a 595 nm. La concentración de proteína se determinó utilizando como patrón una solución de albúmina bovina.

12.3.2 Determinación de proteína por el método de Lowry

El material proteico de las células se precipitó con 5% (v/v) de ácido tricloroacético y el sedimento se resuspendió en una solución de 1 N de NaOH. El contenido de proteína se determinó por el método de Lowry y colaboradores (1951) basado en la reacción de Folin que resultó compatible con soluciones alcalinas.

12.4. Extracción de compuestos aromáticos de cultivos bacterianos

Para la extracción de los metabolitos aromáticos se utilizó la extracción líquido-líquido. En todos los casos los cultivos bacterianos se centrifugaron a $5.000 \times g$ durante 5 minutos para retirar las células, y los sobrenadantes se extrajeron para recuperar los productos.

En todos los casos se saturó la muestra en NaCl con el fin de aumentar la fuerza iónica del medio y disminuir la solubilidad de los intermediarios aromáticos en los sobrenadantes. Entonces, se llevó a cabo una primera extracción a pH 7 con acetato de etilo y una segunda tras acidificar con HCl el sobrenadante hasta pH 3. Los extractos se deshidrataron con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evaporó a vacío mediante un evaporador rotatorio.

12.5 Técnicas de análisis cromatográfico.

El análisis de los intermediarios en la degradación de TNT se realizó mediante técnicas cromatográficas (HPLC y GC).

12.5.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Tanto los sobrenadantes de los cultivos como los productos extraídos fueron analizados por HPLC (HP-1050 acoplado a un inyector automático), utilizando un detector de Diodo-Array (DAD, HP-1050). La detección de los compuestos aromáticos se hizo a 254 nm y los diferentes picos fueron barridos entre 200 y 600 nm. El análisis de los sobrenadantes se llevó a cabo en las siguientes columnas de fase reversa: Hypersil C18; 100 x 4,6 mm (Teknocroma), Novapak C18 y C8; 150 x 4,6 mm (Waters) y Ultracarb C18; 250 x 4,6 mm (Phenomenex); se ensayaron fases móviles de distinta composición hasta optimizar el proceso de separación. La distinta polaridad de los intermediarios metabólicos requirió más de un método para sus completa separación cromatográfica, estos métodos se pusieron a punto por el Dr. Esteve-Nuñez (2000a).

Método I: Es un método cromatográfico rápido que permitió seguir la conversión de TNT en ADNTs y DANTs, no permitiendo la separación de aromáticos más polares que portaban grupos carboxilo e hidroxilo. La fase móvil (ACN:H₂O, 65:35) se pasó en modo isocrático a través de una columna C18 a un flujo de 0,7 ml/min.

Método II: Este método se diseñó para permitir la separación de los compuestos polares que no resolvía el Método I, manteniendo la separación de los productos de reducción del TNT. La fase móvil consistió en un gradiente de H₂O:AcOH 99:1 (v/v) y ACN. La composición inicial fue de 25% en ACN, manteniéndose así durante los primeros 2 minutos. La composición cambió hasta 100% de ACN en 18 minutos; se mantuvo así durante 2 minutos, para finalmente volver, en 3 minutos, a la composición original de la fase móvil. El método mostró una buena resolución en fases estacionarias de fase reversa C18, especialmente en la columna Ultracarb C18; 250 x 4.6 mm (Phenomenex).

Método III: Este método separó todos los isómeros mononitrotoluenos y dinitrotoluenos así como los ADNTs. No resultó útil para la separación de compuestos polares con grupos carboxilo e hidroxilo. La fase móvil consistió en isopropanol:H₂O (18:82) en modo isocrático a un flujo de 1 ml/min. El método resultó óptimo para fases estacionarias en fase reversa C8, como la Novapak 5× C8; 150 x 4,6 mm (Waters).

12.5.2 Cromatografía de gases y Espectrometría de Masas.

Los compuestos aromáticos se sometieron a análisis por CG-EIMS utilizando un cromatografo de gases (Hewlett Packard 6890) acoplado a un espectrómetro de masas (Hewlett Packard 6890). Los metabolitos extraídos se resuspendieron en acetona o metanol antes de ser analizados. Se utilizó una columna 5% fenil-metil silicona (30 m x 0,025 m). Las condiciones del análisis fueron las siguientes: la temperatura del horno se mantuvo a 60°C durante 5 minutos; entonces se inició una rampa de temperatura (10°C/min) al término de la cual la columna alcanzó los 280°C. El detector se conectó con 3 minutos de retraso para evitar que éste se viera dañado por el disolvente.

13. Análisis del metabolismo *in vivo* mediante ensayos de células en suspensión (“Resting cell”).

En ocasiones, las capacidades fisiológicas de las cepas mutantes en comparación con la silvestre se determinaron mediante ensayos de células en suspensión. Para ello, las cepas silvestres y los mutantes isogénicos de *Pseudomonas*

putida JLR11 se cultivaron en medio M9 con glucosa al 0.5% (p/v) hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial (0,7-0,8 de DO_{660nm}). Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con tampón fosfato 50 mM pH 7 y se resuspendieron en el mismo tampón suplido con succinato 10 mM como fuente de carbono y el compuesto cuya transformación se quiso estudiar (ver en *Resultados*) a una turbidez a 660nm superior a 2. Esta suspensión celular se incubó a 30°C en agitación y de ella se extrajo una alícuota de 1 ml cada 20 min para analizar las transformaciones en el sobrenadante.

14. Preparación de extractos libres de células.

El cultivo bacteriano se recogió por centrifugación a 4°C y 5.000 x *g* durante 20 minutos. Las células se lavaron con tampón fosfato 50 mM, pH 7 y se centrifugaron de nuevo, resuspendiéndose en un volumen de tampón no superior a 5 ml. La suspensión bacteriana se lisó por medio de la prensa de French, usando a una presión de 1000 psi. Las células sin romper y los grandes fragmentos celulares se descartaron por centrifugación a 5.000 x *g* durante 45 minutos. El sobrenadante constituyó el extracto libre de células.

14.1. Preparación de extractos citoplasmáticos y de membrana.

El extracto libre de células se dividió en ocasiones en el extracto citoplasmático y el de membrana. Para ello éste se ultracentrifugó a 90.000 x *g* durante 1 hora a 4°C en un rotor TLA 100.4 (Beckman). El sobrenadante tras la centrifugación constituyó el extracto citoplasmático, mientras que el sedimento se resuspendió en un volumen igual al volumen del extracto citoplasmático, dando así el extracto de membrana.

14. Medida de actividades enzimáticas.

14.1. Ensayo de la actividad nitrito reductasa en *Pseudomonas putida* JLR11.

La actividad nitrito reductasa en células de *Pseudomonas putida* JLR11 se determinó *in vitro*, tanto en extractos libres de células, como en geles nativos de proteínas.

14.1.1. Ensayos *in vitro* con extractos libres de células

El ensayo se llevó a cabo en cubetas abiertas de 1 ml conteniendo la mezcla de reacción tampón fosfato 100 mM pH 7,2; NADH 0,3 mM y una muestra de extracto (2-3 mg de proteína/ml). Tras seguir durante unos minutos la oxidación basal de NADH, se añadió NaNO₂ para alcanzar una concentración en la mezcla de ensayo de 0,5 mM. La actividad nitrito reductasa se determinó espectrofotométricamente a 340 nm determinando la tasa de oxidación del NADH en presencia y ausencia de nitrito.

Una unidad de actividad nitrito reductasa corresponde a la oxidación de 1 nmol de NADH por minuto.

14.1.2. Ensayos de detección de la actividad en geles nativos de proteínas.

El ensayo consiste en la detección de la actividad enzimática nitrito reductasa en geles de poliacrilamida en las que la separación electroforética se realizó en condiciones no desnaturalizantes. El protocolo de este tipo de electroforesis se describe en el apartado 15.2 de *Materiales y métodos*. El ensayo de actividad nitrito reductasa en gel está basado en el uso del metilviológeno, un donador de electrones que pierde su color azul, tornándose incoloro al oxidarse. En el gel es posible detectar la actividad nitrito reductasa por la presencia de bandas acromáticas sobre un fondo azul. El ensayo comenzó con la incubación del gel en una solución de metilviológeno 5 mM en Tris-HCl 50 mM pH7,5 durante 5 minutos. Tras la incubación se añadió una solución recién preparada de hidrosulfito sódico (2 mg/ml) en Tris-HCl 50 mM pH7,5, que redujo al metilviológeno volviéndolo de color azul y que tiñó la totalidad del gel. A los 10 minutos de incubación, se añadió nitrito sódico hasta conseguir en la mezcla de incubación una concentración de 50 mM. Con la aparición de bandas acromática sobre el fondo azul, se retiró la solución que cubría el gel y se añadió otra de cloruro de trifeniltetrazolio (25 mg/ml) que reaccionó con el metilviológeno reducido formando un derivado de intenso color rojo, excepto en aquellas zonas en las se produjo la oxidación enzimática del metilviológeno en presencia de nitrito. Tras descartar la solución y lavar el gel con agua, se fijó la tinción incubando en una solución de ácido acético al 3% (v/v).

14.2. Ensayo *in vitro* de la actividad nitroreductasa en extractos libres de células de *Pseudomonas putida* JLR11.

El ensayo se llevó a cabo en cubetas de 1 ml, conteniendo la mezcla de reacción tampón fosfato 100 mM pH7,2; NADH o NADPH 0,3 mM y una muestra de extracto (2-3mg proteína/ml). Tras seguir durante unos minutos la oxidación basal de NAD(P)H, se añadieron 5 μ l de nitroaromático (100 mM en MeOH), para obtener una concentración final de 0,5 mM en la mezcla de reacción. La actividad nitroreductasa se determinó espectrofotométricamente a 340 nm determinando la tasa de oxidación del NAD(P)H en presencia y ausencia del compuesto nitroaromático. Paralelamente, la mezcla de ensayo se analizó por HPLC para identificar los productos de la reacción. Una unidad de actividad enzimática nitroreductasa corresponde a la oxidación de 1 μ mol de NAD(P)H por minuto.

15. Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA).

Para la separación electroforética de proteínas se utilizó el equipo de electroforesis vertical “Mini-PROTEAN II” (Bio-Rad Laboratories, ref. 165-2940) siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Las electroforesis se realizaron utilizando geles discontinuos de poliacrilamida de 1,5 mm de espesor, de acuerdo con el método descrito por (Laemmli, 1970). Cada gel constaba de un segmento superior concentrador y un segmento inferior separador con mayor porcentaje de poliacrilamida.

15.1. Separación electroforética en condiciones desnaturizantes (EGPA-SDS).

Para la separación de polipéptidos mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes, los geles, el tampón de electroforesis y el tampón de carga se prepararon en 0,1% (p/v) de SDS. El gel concentrador y separador se prepararon a un porcentaje de poliacrilamida de 4 y 12,5% respectivamente, su composición se describe en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6. Composición de los geles empleados en la EGPA-SDS.

	Gel concentrador ^a	Gel separador ^a
Acrilamida/Bisacrilamida^b	0,8 ml	8,3 ml
29:1 (p/v)		
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	5 ml
Tris-HCl 1 M pH 6,8	0,750 ml	-
SDS 20% (p/v)	0,06 ml	0,2 ml
N,N,N',N'Tetraetilendiamina	0.006 ml	0,01 ml
(TEMED)		
Persulfato amónico^c 10%(p/v)	0,06 ml	0,1 ml
H₂O	4,39 ml	6,4 ml

^a En la tabla se muestran los componentes utilizados en la preparación del gel concentrador (6 ml) y separador (20 ml).

^b La solución de acrilamida/bisacrilamida fue suministrada por Sigma, ref. A-3574.

^c El persulfato amónico se preparó en el momento del análisis o se guardó a -20°C

La muestra de proteína se mezcló con un volumen igual de tampón de carga y la mezcla se incubó a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. La separación electroforética se realizó a temperatura ambiente y a un amperaje constante de 20 mA.

La composición de las soluciones utilizadas en este proceso fue la siguiente:

Tampón de carga:

Tris-HCl pH 6,8	62 mM
Glicerol	10%(v/v)
SDS	1%(v/v)
2-mercaptoetanol	1%(v/v)
Azul de bromofenol	0,5%(p/v)

Tampón de electroforesis:

Tris-HCl pH 8,4.....	25 mM
Glicina.....	192 mM

SDS.....0,1%(p/v)

15.2. Separación electroforética en condiciones no desnaturizantes (EGPA-nativo).

Las condiciones de la electroforesis fueron las mismas que las descritas para el EGPA-SDS pero omitiendo el SDS y el mercaptoetanol en las soluciones utilizadas. El porcentaje de poliacrilamida de los geles se varió para hacerlos al 2,5 y 6% para el gel concentrador y separador respectivamente. La electroforesis tuvo lugar a un amperaje constante de 20 mA y a una temperatura de 4°C para evitar el calentamiento del sistema.

16. Sobreexpresión del gen *pnrA* en *E. coli* y purificación de la proteína PnrA.

El procedimiento de purificación se basó en el descrito por Zenno *et al.* (1996a). Una alícuota de 10 ml de un cultivo de 10-14 horas en LB de *E. coli* DH5 β que portaba el plásmido pNAJ (ver sección 3 de *Materiales y métodos*) se añadió a 1 litro de LB suplido con ampicilina 10 mg/l. El cultivo se incubó en agitación a 37°C durante 12 horas. Las células se recogieron por centrifugación y se preparó un extracto libre de células tal y como se describe en la sección 14 de *Materiales y métodos*. De éste se obtuvo posteriormente el extracto citoplasmático como se describió en la sección 14.1 de donde se purificó el enzima. El extracto crudo se fraccionó primero con sulfato de amonio, de donde se observó que el 90% de la actividad precipitaba entre el 30 y el 90% (p/v) de saturación. La proteína precipitada se resuspendió en tampón fosfato 50 mM pH 7 y se dializó frente al mismo tampón durante 24 horas. El extracto libre de sales se pasó a través de una columna en intercambio iónico HiPrep Q XL (Amersham Biosciences, ref. 17-5092-01) en un sistema de cromatografía ÄKTA_{FPLC} de Amersham Biosciences, previamente equilibrada con 50 mM de tampón fosfato pH 7. La columna se lavó con 200 ml del tampón inicial a un flujo de 5 ml/min y se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 1 M de KCl en una solución de tampón fosfato pH 7. Se recogieron las fracciones con picos de actividad TNT reductasa dependiente de NADPH, que eluyeron alrededor de 0,3 M de KCl. A éstas se

añadió sulfato amónico para alcanzar una concentración de 1,7 M. La mezcla resultante se cargó de nuevo en el FPLC con una columna de interacción hidrofóbica de fenil-sefarosa (Phenyl Sepharose High Performance, Amersham Biosciences, ref. 17-1082-01), previamente equilibrada con tampón fosfato 50 mM con sulfato amónico 1,7 M. La columna se lavó con 30 ml de este tampón a un flujo de 0,5 ml/min y se eluyó con un gradiente lineal de sulfato amónico en tampón fosfato de 1,7 a 0 M. Las fracciones con actividad se recogieron y se dializaron frente a tampón fosfato 50 mM pH 7. La muestra se pasó entonces por una columna de cromatografía de afinidad de “Red-sefarosa” (Red Sepharose Cl-6B, Pharmacia Biotech, ref. 17-0528-01) equilibrada con tampón fosfato 50 mM pH 7. La actividad nitroreductasa se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 3 M de NaCl a un flujo de 1 ml/min. Los picos con actividad se recogieron y se concentraron en con una membrana Centricon YM-3 (Millipore, ref. 4202). PnrA se purificó a homogeneidad finalmente en una columna de filtración en gel Superose 12 (Amersham Biosciences, ref. 17-0674-01), eluyendo con tampón fosfato 50 mM pH 7 suplido con 150 mM de NaCl a un flujo de 0,2 ml/min. La proteína PnrA se recogió, y tras eliminar las sales con columnas PD-10 (PD-10 desalting columns, Amersham Biosciences, ref. 17-0851-01) se conservó a -20°C para análisis posteriores.

Capítulo I

*Determinación de las rutas de asimilación del
nitrógeno del TNT en Pseudomonas putida*

JLR11

RESUMEN

Los resultados mostrados en este capítulo demuestran que *Pseudomonas putida* JLR11 utiliza varias vías iniciales de ataque al 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), de manera que el nitrógeno del TNT puede liberarse en forma de nitrito o de amonio. Esta propuesta se fundamenta por la observación de que un mutante *nasB*, afectado en la reducción de nitrito a amonio es capaz de crecer en TNT, aunque a menor velocidad que la cepa silvestre. El nitrógeno del TNT se incorpora en los esqueletos carbonados vía la ruta de la glutamina sintetasa (GS)-glutamato sintetasa (GOGAT), como evidencia un mutante en la GOGAT incapaz de crecer en TNT. Esta ruta le sirve además a esta cepa para asimilar el amonio producido por la reducción del nitrito/nitrato o cuando este amonio se suple a bajas concentraciones. Tres mutantes con inserciones de transposones en *ntrC*, *nasT* y *cnmA*, que codifican proteínas reguladoras, no crecen en TNT, aunque sí lo hacen en TNT pero a menor velocidad que la cepa silvestre.

Los resultados del trabajo previo del Dr. A. Esteve-Nuñez (2000) en nuestro grupo de investigación concluyeron que *Pseudomonas putida* JLR11 es capaz de metabolizar hasta el 85% del nitrógeno del explosivo 2,4,6-trinitrotolueno. En cultivos con TNT como única fuente de nitrógeno, aparecía una acumulación transitoria de nitrito en el medio de cultivo, lo que indicaba una denitración y formación de nitrito, que posteriormente se reduciría a amonio por la nitrito reductasa, como mecanismo de asimilación del nitrógeno del TNT. Una demostración inequívoca de esta hipótesis requería, sin embargo, el estudio del metabolismo del nitrógeno en *P. putida* JLR11 y la obtención de mutantes bloqueados en estas rutas asimilatorias. Estos estudios son los que se han abordado durante este capítulo de resultados.

1. Aislamiento de mutantes deficientes en el metabolismo del nitrito.

Para el estudio del metabolismo del nitrito en *Pseudomonas putida* JLR11, se realizó una mutagénesis al azar sobre el cromosoma de esta cepa, usando para ello el transposón mini-Tn5-Telurito. Los clones mutantes se seleccionaron en medio M8 con amonio 5 mM, glucosa al 0,5% (p/v) y Tel (30 \times g/ml). Se analizaron así 3600 clones resistentes a telurito obtenidos en 10 ensayos de mutagénesis independientes. Se obtuvieron 8 clones incapaces de crecer en medio sólido mínimo con nitrito 2 mM como única fuente de nitrógeno (ver Tabla 3.1.)

La mayoría de las cepas seleccionadas tampoco crecieron en TNT cuando se usó como única fuente de nitrógeno en medio sólido, aunque se pudo observó un crecimiento residual de las cepas denominadas 10.51 y 36.35. La secuencia de cada gen inactivado se identificó en cada mutante mediante la secuenciación de la zona adyacente a la inserción del mini-Tn5-Tel (ver sección 7.6 de *Materiales y métodos*).

Tabla 3.1. Mutantes de *Pseudomonas putida* JLR11 obtenidos por inserción de miniTn5-Tel y aislados por su incapacidad de crecer en nitrito.

Cepa	Crecimiento NH ₄ ⁺	Crecimiento NO ₂ ⁻	Crecimiento TNT	Gen mutado	Función
Silvestre	++	++	+		
C42	+/-	-	-	<i>gltD</i>	Glutamato sintasa, subunidad menor (GOGAT)
K12	+/-	-	-	<i>gltD</i>	Glutamato sintasa, subunidad menor (GOGAT)
M20	+/-	-	-	<i>gltD</i>	Glutamato sintasa, subunidad menor (GOGAT)
6.72	+	-	-	<i>gltB</i>	Glutamato sintasa, subunidad mayor (GOGAT)
40.58	+	-	-	<i>gltB</i>	Glutamato sintasa, subunidad mayor (GOGAT)
9.46	++	-	-	<i>ntrC</i>	Regulador global del metabolismo del N, activador transcripcional
10.51	++	-	+/-	<i>cnmA</i>	Regulador transcripcional de la familia LysR
36.35	++	-	+/-	<i>nasT</i>	Regulador del operón <i>nasABC</i>

El crecimiento de las cepas se comprobó en medio sólido mínimo con glucosa como fuente de carbono y diferentes fuentes de nitrógeno: 5mM de NH₄Cl, 2 mM de nitrito y 500 µM TNT. El crecimiento se examinó tras 48 h de incubación a 30°C. ++ significa que el tamaño de la colonia fue × 2 mm; + es para colonias 2 × × 1; ± para < 1 mm; mientras que - se usó para aquellos donde no se observó crecimiento. Se indica además el gen en donde el miniTn-5 se insertó, así como la función correspondiente a cada proteína codificada por dicho gen en la cepa silvestre.

En la Tabla 3.1. se indica la pauta de lectura abierta (ORF) afectada y qué proteína se codifica por dichos genes. En cinco de los casos, el mini-transposón se insertó en uno de los dos genes que codifican las dos subunidades de la glutamato sintasa (GOGAT). En los mutantes 6.72 y 40.48 el gen truncado era el *gltB*, que codifica la subunidad mayor de la GOGAT, encontrándose el transposón insertado en la base 961 del gen en el caso del 6.72, y en la base 2341 en el mutante 40.48. Mientras, en los mutantes C42, K12 y M20 el mini-Tn5 se insertó en la base 461 del gen *gltD*, responsable de la síntesis de la subunidad pequeña de la GOGAT. Es muy posible que estos tres mutantes sean “hermanos”, ya que se aislaron en la misma mutagénesis y presentaron la inserción en el mismo punto del gen *gltD*. Por lo tanto, se seleccionó sólo uno de ellos para estudios posteriores.

En los otros tres mutantes seleccionados, el mini-transposón había interrumpido la secuencia de genes responsables de la síntesis de proteínas reguladoras. De hecho, en la cepa 9.46, el miniTn5 se insertó en la base 378 del gen *nrnC*, que codifica el regulador global del metabolismo de asimilación del nitrógeno en un gran número de microorganismos, incluyendo la familia *Enterobacteraceae*, entre otros (He *et al.*, 1997; Labes *et al.*, 1993; Masepohl *et al.*, 2001; Merrick y Edward, 1995; Michael-Reydellet *et al.*, 1997; Reyes-Ramírez *et al.*, 2001; Studholme y Dixon, 2003; Wedel y Kustu, 1995). La cepa 36.35 resultó ser un mutante por inserción en la base 482 de un gen homólogo al *nasT* de *Azotobacter vinelandii* (Gutiérrez *et al.* 1995). La proteína codificada por este gen es un regulador transcripcional positivo del operón *nas*, que es el encargado de la asimilación de nitrato y nitrito en numerosos microorganismos. En el mutante 10.51, por otra parte, el miniTn5 se encontraba insertado en la base 729 de un gen cuyo producto presenta una alta homología con reguladores transcripcionales de la familia LysR (Henikoff *et al.*, 1988; 1990). Ya que se desconocía la función exacta de esta proteína, se decidió denominar al gen *cnmA* (del inglés, **control of nitrite metabolism gene A**).

Para confirmar que la incapacidad de crecimiento de estas cepas mutantes en nitrito o TNT se debió a la inserción del transposón miniTn5-Tel en cada uno de los genes descritos previamente, se procedió a identificar clones donde la

mutación se complementase para cada uno de los mutantes mediante la transferencia de una librería genómica de *P. putida* JLR11 preparada en cósmidos pLAFR3 (ver sección 8 de *Materiales y métodos*). La librería se transfirió en masa a los mutantes mediante conjugación tripartita, y se seleccionaron aquellos clones que recuperaron la capacidad de crecimiento en nitrito. Se extrajeron los cósmidos Tc^R de los clones complementados. La reintroducción de éstos clones en los mutantes corregía de nuevo la incapacidad de crecimiento en nitrito 2 mM y TNT 500 \times M. En todos los casos, los cósmidos que hacían recuperar el fenotipo silvestre a los mutantes portaban los genes que se habían inactivado en las cepas mutantes, tal y como se mostraba por hibridaciones “Southern blot” en los cósmidos, usando como sondas fragmentos internos de cada uno de los genes generados por PCR (ver Figura 3.1). Esto establece una relación inequívoca entre el fenotipo mutante, y su genotipo descrito.

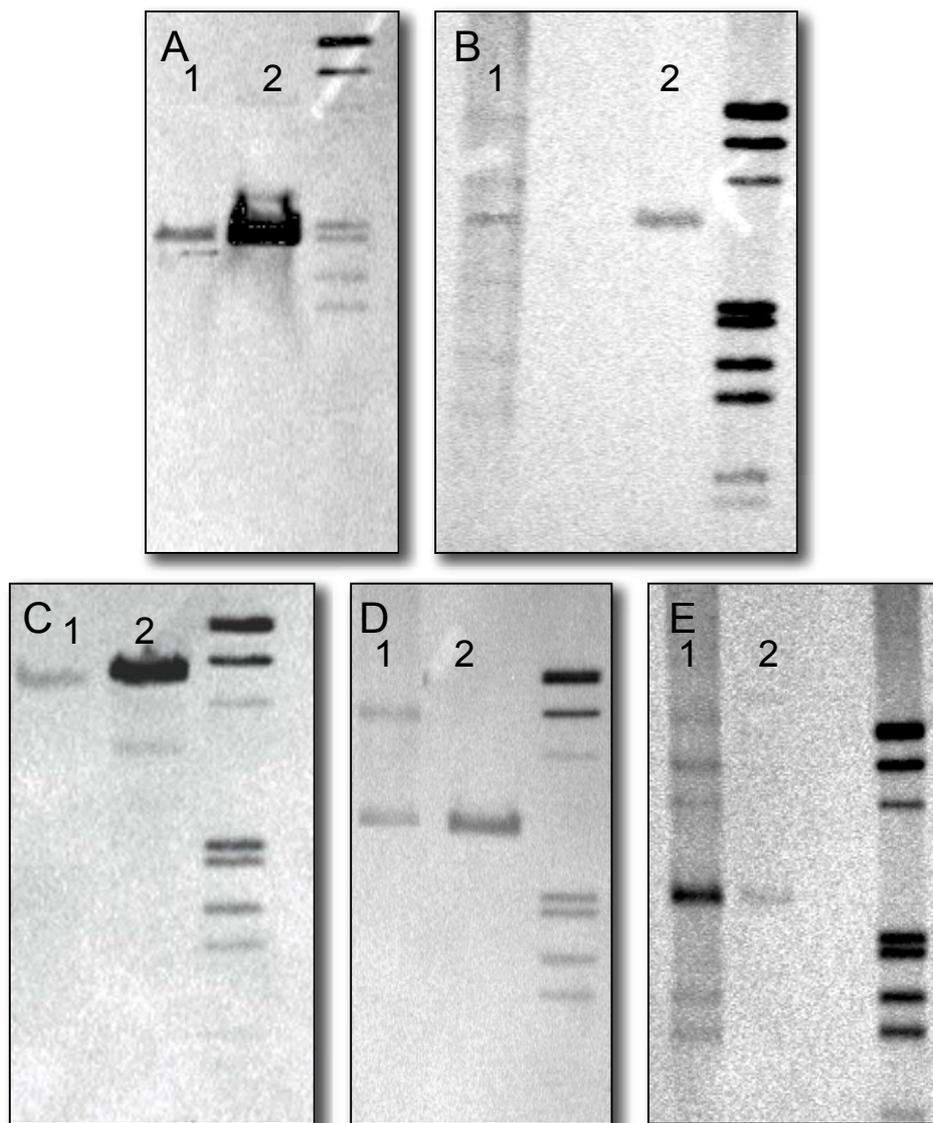


Fig. 3.1. (Página anterior) Comprobaciones por “Southern blot” de la presencia de los genes mutados en los cósmidos que complementan el fenotipo cada una de los mutantes descritos. A saber: **A.** Hibridación de la sonda específica del gen *gltD* obtenida por PCR con los cebadores *gltD52* (5'-CCGCCGTGAAGTGTTCAC -3') y *gltD3* (5'- ATCGCAGTCACCACCAG -3') contra el cromosoma de la cepa silvestre JLR11 y el cósmido pCJLgltBD ambos digeridos con el enzima de restricción *Pst*I. Este cósmido complementó los mutantes 6.72 y M20, ambos mutados en los genes *gltB* y *gltD* respectivamente, codificados en el mismo operón. **B.** Hibridación de la sonda específica del gen *nasB* obtenida por PCR con los cebadores *nas53* (5'- AAGAATTCCCTCGTGGAACGGCAGCG-3') y *nas33* (5'- AAGTACCACACTGTCCTGCACGCC -3') contra el cromosoma de la cepa silvestre JLR11 y el cósmido pCJLnasB ambos digeridos con el enzima de restricción *Pst*I. Este cósmido complementó el mutante 81 (ver sección 2 de este Capítulo para descripción de este mutante). **C.** Hibridación de la sonda específica del gen *nrnC* obtenida por PCR con los cebadores *nrnC52* (5'-CCGCCCTTCTCGATTACCTG-3') y *nrnC32* (5'-TGTGTTCACCGCATCCGC-3') contra el cromosoma de la cepa silvestre JLR11 y el cósmido pCJLnrnC ambos digeridos con el enzima de restricción *Pst*I. Este cósmido complementó el mutante 9.46. **D.** Hibridación de la sonda específica del gen *cnmA* obtenida por PCR con los cebadores *LysR5* (5'- CCTCGCTCAAGGCCGCGC-3') y *LysR3* (5'- AAGCGGATTTATCCGGG-3') contra el cromosoma de la cepa silvestre JLR11 y el cósmido pCJLcnmA ambos digeridos con el enzima de restricción *Pst*I. Este cósmido complementó el mutante 10.51. **E.** Hibridación de la sonda específica del gen *nasT* obtenida por PCR con los cebadores *nasT5* (5'- CGCCTGTTTCGACCAAGG-3') y *nasT32* (5'-TGCAGCCGCGCAGCATGG -3') contra el cromosoma de la cepa silvestre JLR11 y el cósmido pCJLnasT ambos digeridos con el enzima de restricción *Pst*I. Este cósmido complementó el mutante 36.35. En todos los casos la calle 1 corresponde al cromosoma de JLR11 y la calle 2 al cósmido utilizado en casa caso.

En la figura 3.2. se muestra la organización de los genes que se sitúan alrededor de la ORF mutada en *Pseudomonas putida* JLR11. La secuencia de nucleótidos de los genes mutados se estableció por secuenciación de la región adyacente utilizando cebadores específicos y los cósmidos como molde. Muchos de los genes representados en este esquema se identificaron por homología con los de la cepa *Pseudomonas putida* KT2440. Se puede destacar aquí que la organización de los genes de *P. putida* JLR11 es idéntica a la de *P. putida* KT2440, cuyo genoma está disponible en la base de datos (Nelson *et al.* 2002). El nivel de conservación de la secuencia a nivel de nucleótidos es superior al 98 % entre JLR11 y KT2440.

La secuencia de los genes se presenta en el Anexo I de esta Tesis Doctoral y se han depositados en la base de datos del Genbank, cuyos número de acceso son los siguientes:

Tabla3.2. Números de acceso de las secuencias depositadas en el Genbank

Gen	Número de acceso
<i>gltD</i>	AY885267
<i>gltB</i>	AY885268
<i>cnmA</i>	AY885269
<i>nasB</i>	AY885270
<i>nasT</i>	AY885271
<i>nrnC</i>	AY885272

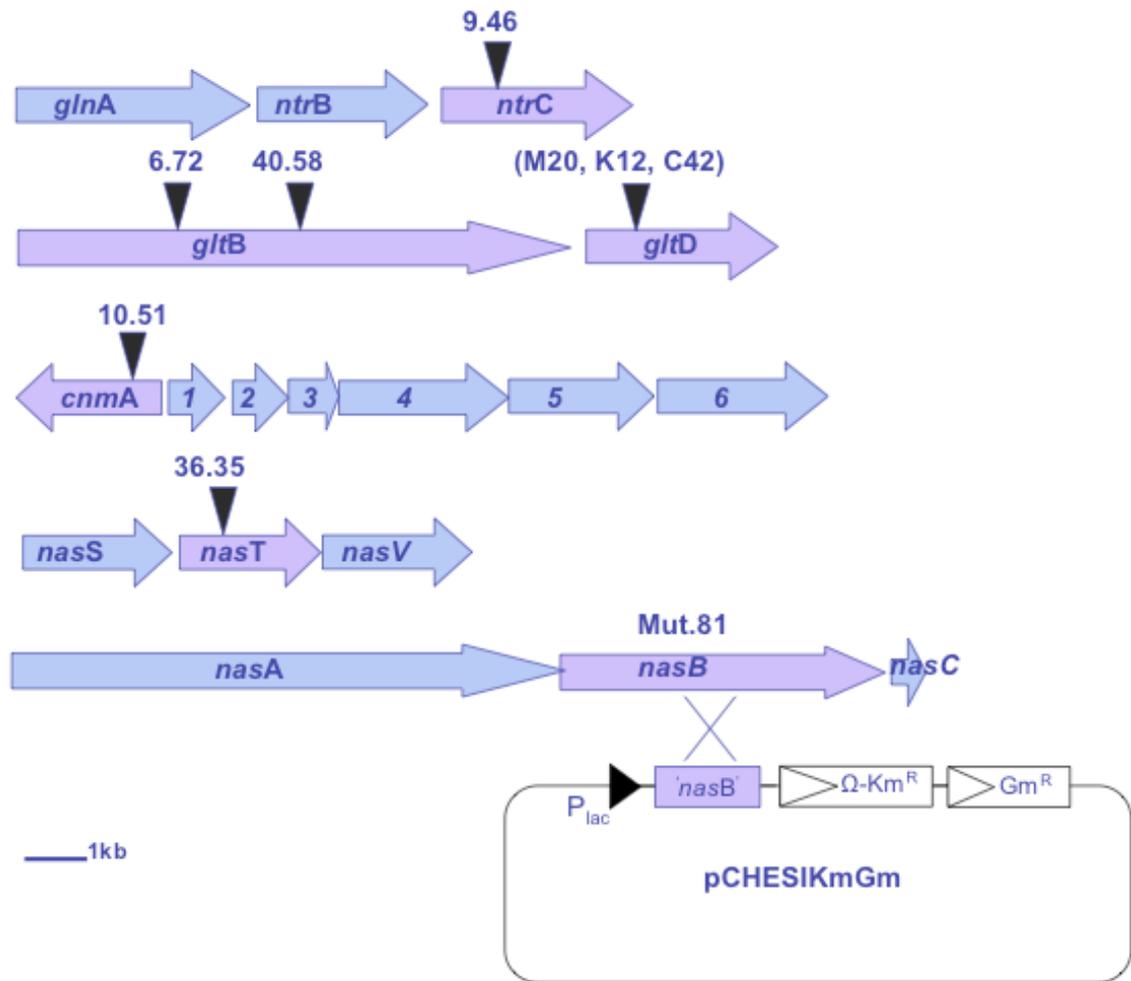
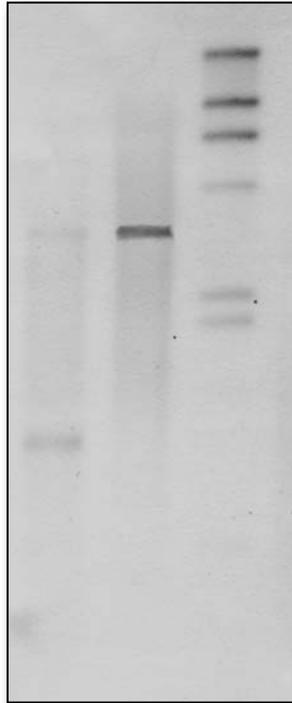


Fig. 3.2. Mapa genético indicando la posición de los mini-Tn5-Tel de los mutantes deficientes en crecimiento en nitrito o TNT. El triángulo invertido indica la posición de la inserción en cada mutante. El mutante *nasB* se generó por mutagénesis dirigida (ver sección 2 de este capítulo). No se conoce la función de los genes 1-6 que se localizan divergentes con respecto a *cnmA*. Sus homólogos de KT2440 tienen los números de accesos siguientes: 1, PP2997; 2, PP22998; 3, PP22999; 4, PP23000; 5, PP23001; 6, PP23002.

2. Mutagénesis dirigida del gen *nasB* de *P. putida* JLR11.

El proceso de mutagénesis al azar por inserción de mini-transposones no aportó un clon mutado en los genes que codifican la nitrito reductasa, la proteína que está implicada en la reducción de nitrito a amonio. Por este motivo, se decidió proceder a construir un mutante de JLR11 en el gen *nasB*, que codifica la subunidad mayor de la nitrito reductasa, mediante mutagénesis dirigida. La identificación de la secuencia del gen *nasB* de JLR11 se basó en su homólogo de KT2440, que a su vez se halló por homología través de búsqueda por comparación con el programa BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) de una nitrito reductasa ya caracterizada, la proteína NasB de *Klebsiella pneumoniae* M5a1 (Lin *et al.* 1993), contra la base de datos del genoma de la cepa KT2440. Según los extremos 5' y 3' de la secuencia de *nasB* de KT2440 se diseñaron cebadores (Nas5: 5'-ATTCTAGACGGGCAACGAGAGCGACTGG-3' y Nas3: 5'-CTTCTAGACTCGACAGTTGGGATCAGG-3') con los que se amplificó con éxito un fragmento de ADN de 2356 pb, de JLR11. La secuencia de este fragmento reveló que se había amplificado efectivamente el gen *nasB*. La organización genética del operón es igual a la de KT2440, con tres posibles genes, *nasABC* (ver Fig. 3.2.), y el nivel de conservación ronda el 99% a nivel de ADN.

Posteriormente se amplificó un fragmento central de 1117 pb del gen *nasB* usando los cebadores Nas53 (5'-AAGAATTCCTGCTGGAACGGCAGCG-3'; con un sitio de corte *EcoRI* [subrayado] que se incluyó en el extremo 5' para poder clonar el producto de la amplificación), y Nas33 (5'-AAGGTACCACACTGTCCTGCACGCC-3'; con un sitio de corte *KpnI* [subrayado] incluido en el extremo 5' para clonar el producto de la amplificación). El producto se clonó en el plásmido pCHESIβ Gm para generar el plásmido pAC.1 (ver Tabla 2.3. de *Materiales y métodos*). La mutagénesis se llevó a cabo como se describe en la sección 9.2 y en la figura 2.4. de *Materiales y métodos*. La selección del mutante se realizó en medio mínimo con amonio 5 mM, benzoato 10 mM como fuente de carbono y gentamicina 40 µg/ml. Los clones obtenidos se comprobaron por PCR, y por hibridación en "Southern blot" usando como sonda un fragmento del gen *nasB* amplificado por PCR con los cebadores nas53 y nas33 (ver Figura 3.3.).



En un análisis de crecimiento en medio sólido con nitrito, TNT, ó amonio como fuente de nitrógeno, el mutante *nasB* creció con amonio, pero no presentó crecimiento en nitrito. Sin embargo, este mutante mostraba un crecimiento lento en placas con TNT.

3. Crecimiento en medio líquido de los distintos mutantes con deficiencia en el metabolismo del nitrógeno.

Para la obtención de datos cuantitativos del comportamiento de los mutantes con diferentes fuentes de nitrógeno, se determinó la velocidad de crecimiento del silvestre y los mutantes en las siguientes fuentes de nitrógeno: 5mM NH₄Cl, 5 mM KNO₃, 2 mM NaNO₂; algunos aminoácidos; y TNT, que se añadió en cantidades por encima de su límite de solubilidad en agua (500 ×M).

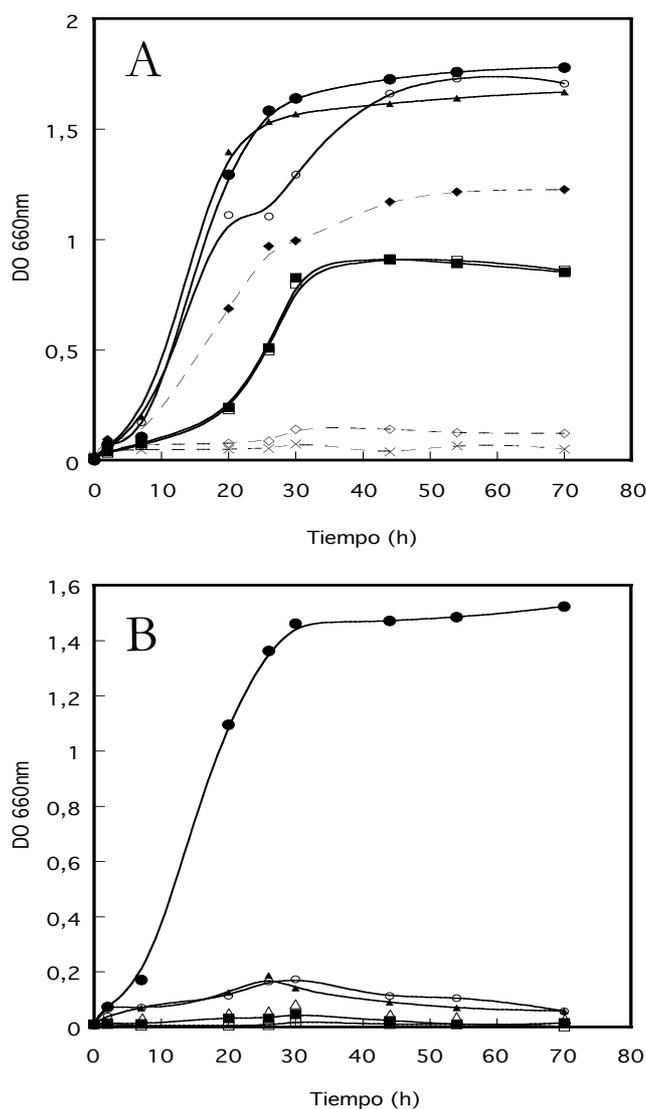


Fig. 3.4. Cuvas de crecimiento en amonio (A) y en nitrito (B) como fuentes de nitrógeno. Se utilizó glucosa 0,5% (p/v) como fuente de carbono. Símbolos: Panel A; las líneas continuas indican una concentración inicial de 5 mM de amonio, mientras que las discontinuas es de 0,8 mM. En todos los casos, los círculos cerrados (silvestre), cuadrados cerrados (mutante *gltB*), cuadrados abiertos (mutante *gltD*), triángulos cerrados (mutante *ntrC*), triángulos abiertos, (mutante *cnmA*), círculos abiertos (*nasB*). En el panel A, y línea discontinua, rombos cerrados (silvestre), rombos abiertos (mutante *gltB*), y cruces (mutante *gltD*).

Los resultados de la Fig. 3.4. muestran que en amonio, la velocidad de crecimiento fue similar entre el silvestre, los tres mutantes en los sistemas reguladores, y el mutante *nasB*, con un tiempo de generación de $2,55 \pm 0,15$ horas, y siendo la turbidez máxima que llegaron a alcanzar de 1,6-1,8 unidades de turbidez a 660 nm (Fig. 3.4.A). En cambio, los mutantes en la GOGAT exhibieron una larga fase de latencia, de unas 10-12 horas, y un crecimiento menor que el silvestre, tanto en velocidad (tiempo de duplicación de $4,5 \pm 0,3$ h) como en

turbidez, que alcanzó un máximo de 0,8 unidades. Además, los cultivos de los mutantes GOGAT en este medio presentaban una coloración pronunciada, no presente en el silvestre ni el resto de mutantes (Fig 3.5.).

Cuando la concentración de amonio se bajó de 5 mM a 0,8 mM, el silvestre y el mutante *nasB* se duplicaron a una velocidad de unas 6 horas, y los cultivos alcanzaron densidades de 0,8-1 de turbidez a 660nm (Fig 3.4.A). En cambio, no se observó crecimiento alguno en los mutantes de la GOGAT en estas condiciones de baja concentración de amonio.

Ni los mutantes de la GOGAT, ni aquellos afectados en los sistemas reguladores *ntnC*, *nasT* o *cnmA* presentaron crecimiento significativo en nitrito, así como tampoco lo hizo el mutante *nasB* (figura 3.4.B).



Fig. 3.5. Aspecto de los cultivos en medio mínimo con glucosa 0,5% (p/v) y amonio 5 mM tras tres días de crecimiento. El matraz del mutante 6.72, presentó una acusada coloración con respecto al cultivo silvestre JLR11.

El hecho de que los mutantes fuesen incapaces de crecer en nitrito se ve apoyado además por ensayos de suspensión celular (ver sección 14.1.1 de *Materiales y métodos*) en donde se observó que éstos, a diferencia del silvestre, eran incapaces de consumir el nitrito presente en el medio (Figura 3.6.).

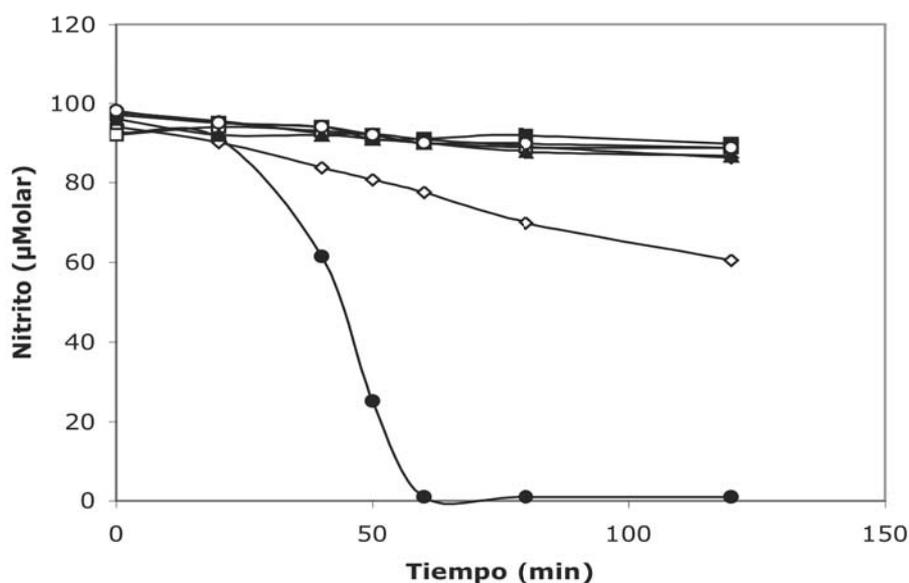


Fig. 3.6. Consumo de nitrito en ensayo de suspensión celular. Símbolos: círculos cerrados (silvestre), cuadrados cerrados (mutante *gltB*), cuadrados abiertos (mutante *gltD*), triángulos abiertos (mutante *ntrC*), círculos abiertos (mutante *nasB*), rombos cerrados (mutante *nasT*), rombos abiertos (mutante *cnmA*).

Además, en cultivos con nitrato 5 mM como fuente de nitrógeno, ningún mutante presentó crecimiento (Fig. 3.7.A), sin embargo el mutante *nasB* incluso cuando su crecimiento era imperceptible, era capaz de reducir el nitrato a nitrito, que se acumulaba hasta en 350 \times M en el sobrenadante del medio de cultivo. En cambio, esta acumulación no aparecía en los mutantes *ntrC*, *gltB*, *gltD* ó *nasT* (ver Fig. 3.7.).

Esta serie de resultados sugiere que el nitrógeno en forma de nitrato, nitrito, o amonio (aunque a bajas concentraciones) se asimila preferentemente por la ruta de la GS/GOGAT en *Pseudomonas putida* JLR11 (ver discusión).

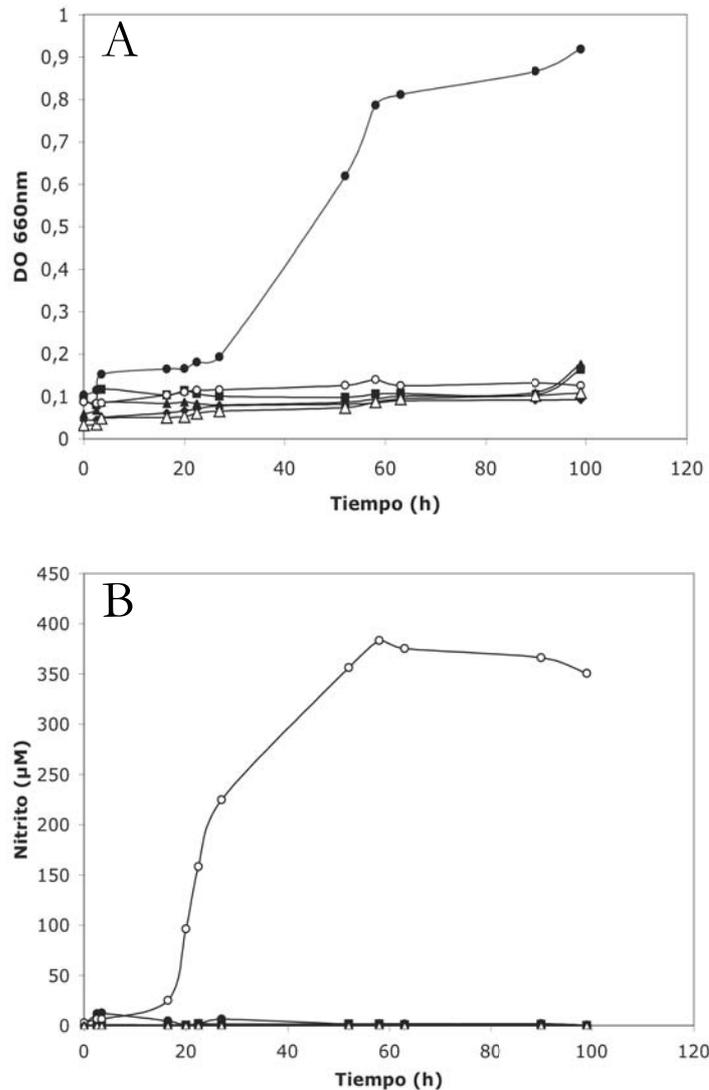


Fig. 3.7. Comportamiento de las cepas mutantes en cultivos con nitrato 5 mM como fuente de nitrógeno y glucosa 0,5% (p/v). En el panel A se presenta el crecimiento expresado en turbidez a 660 nm del cultivo. En el panel B se muestra la concentración de nitrito en el sobrenadante. Símbolos: círculos cerrados (silvestre), cuadrados cerrados (mutante *gltB*), cuadrados abiertos (mutante *gltD*), triángulos cerrados (mutante *ntrC*), triángulos abiertos (mutante *nasT*), círculos abiertos (mutante *nasB*), rombos cerrados (mutante *cnmA*).

Ya que la proteína NtrC en otros microorganismos juega un papel fundamental en el control del metabolismo, regulando la expresión de las rutas de degradación de las distintas fuentes de nitrógeno disponibles, y que este trabajo suponía la primera descripción de un mutante *ntrC* en *P. putida*, se decidió además estudiar el crecimiento de las cepas mutantes en Ala, Arg, Asn, Gln, Glu, Gly, His, Lys y Pro como única fuente de nitrógeno. Para ello las células se precultivaron en medio mínimo con amonio 10 mM y glucosa 0,5% (p/v) y se transfirieron a los

medios de cultivo con los distintos aminoácidos, suministrados en todos los casos a una concentración de 5 mM, y glucosa 0,5 % (p/v).

Los mutantes *nasB*, *cnmA* y *nasT* mostraron un crecimiento similar al silvestre en todas estas fuentes de nitrógeno (ver Tabla 3.3.), indicando que sus productos génicos tenían claramente una función específica en el metabolismo del nitrito/nitrato en *P. putida* JLR11. El mutante NtrC no creció en Gly o Lys, y su presentó un crecimiento muy limitado en His (Tabla 3.3.). Mientras, el crecimiento de los mutantes en la GOGAT se vio también afectado en Ala, Arg, Gly y Lys. No se observaron diferencias entre el silvestre y los mutantes en NtrC y GOGAT cuando se utilizó Gln o Asn como fuente de nitrógeno.

Tabla 3.3. Crecimiento de cepas mutantes con distinto aminoácidos como fuente de nitrógeno

Fuente de N	Cepas						
	Silvestre	<i>gltB</i>	<i>gltD</i>	<i>nasB</i>	<i>ntrC</i>	<i>cnmA</i>	<i>nasT</i>
Ala	++	β	β	++	++	++	++
Arg	+++	β	β	+++	+++	+++	+++
Asn	++	++	++	++	++	++	++
Gln	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Glu	++	+	+	++	+	++	++
Gly	++	β	β	++	β	++	++
His	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
Lys	+++	+	+	+++	β	+++	+++
Pro	+++	+	+	+++	++	+++	+++

El crecimiento se determinó por turbidez del cultivo a las 24 horas de incubación a 30°C. +++ se aplicó para crecimientos β 1,5 unidades de densidad óptica a 660nm; ++ para densidades ópticas entre 1,5 y 1 unidades; + para 1 a 0,3 unidades y β para menos de 0,3 unidades.

4. Crecimiento de las cepas mutantes en TNT.

Para comprobar el comportamiento de las cepas silvestre y de los distintos mutantes se realizaron curvas de crecimiento en medio mínimo con glucosa 0,5% (p/v) como fuente de carbono y TNT como única fuente de nitrógeno. Para asegurar una homogeneización de las condiciones de cultivo al máximo, así como

la máxima solubilidad y la transferencia del TNT, las curvas se realizaron en reactores de 2 L en aerobiosis. La cantidad añadida de TNT fue de 300 mg, lo cual está por encima de su límite de solubilidad (100 mg/l).

Los mutantes GOGAT se mostraron incapaces de crecer en TNT (ver Fig. 3.6.A), mientras, los clones mutantes *ntrC*, *nasT* y *nasB* crecieron en este medio, si bien su crecimiento fue a una velocidad menor que el silvestre, de aproximadamente la mitad que éste, es decir, unas 23-29 h de tiempo de duplicación, respecto a las 15 horas de la cepa silvestre.

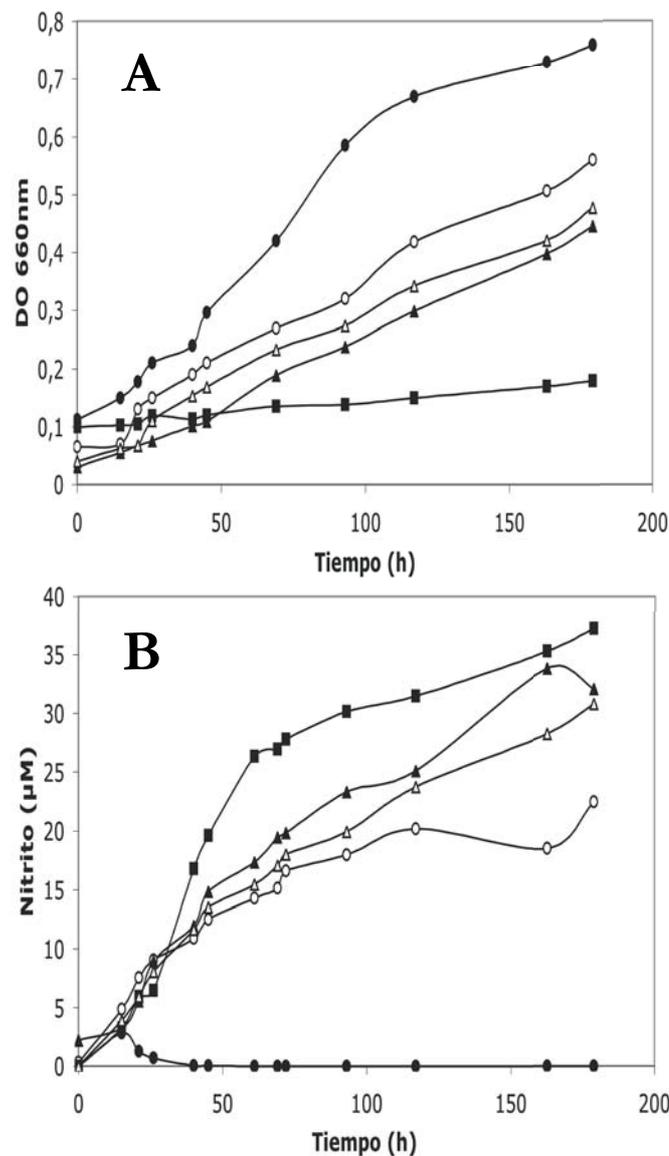


Fig. 3.6. Cultivos TNT glucosa 0,5% (p/v) en reactores aerobios de 2 L. En el panel A se muestra el crecimiento referido a densidad óptica a 660nm. En el panel B se muestra la acumulación de nitrito presente en el sobrenadante del medio de cultivo. Símbolos: círculos cerrados (silvestre), cuadrados cerrados (*gltB*); triángulos cerrados (*ntrC*); triángulos abiertos (*nasT*); círculos abiertos (*nasB*).

Las cepas mutantes mostraron una acumulación de nitrito en el medio que aumentaba a lo largo del tiempo (alrededor de 30-40 \times M) (Fig. 3.6.B). El silvestre en cambio, acumulaba nitrito en el medio a baja concentración, y de manera transitoria.

5. Determinación de la actividad nitrito reductasa.

Para confirmar que el crecimiento observado en la cepas mutantes *nasB*, *nrC* y *nasT* no se debía a una posible capacidad de reducir nitrito en estas condiciones, se analizó la actividad nitrito reductasa de estas cepas. Para ello, se partió de cultivos en medio mínimo, glucosa 0,5% (p/v) y amonio (5 mM) como fuente de nitrógeno. Una vez que los cultivos alcanzaron la fase exponencial las células se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces en tampón fosfato 50 mM pH 7 para eliminar los restos de amonio. Tras ello, las células se transfirieron a medio mínimo con glucosa y TNT, o glucosa, amonio y TNT. Tras tres horas de incubación, se recogieron las células y se prepararon los extractos tal y como se describe en la sección 14 de *Materiales y métodos*.

No se observó actividad nitrito reductasa en los extractos de células cultivadas en amonio y TNT como fuente de nitrógeno, tanto en los mutantes como en la cepa silvestre. Sin embargo, se pudo observar esta actividad en extractos libres de células del silvestre incubado en presencia de sólo TNT, siendo de 128 mU/mg de proteína, pero no en las cepa *nasB* o los genes reguladores (ver Tabla 3.4.), lo que es consistente con el resultado mostrado en la Fig. 3.4.

Tabla 3.4. Medida de actividad nitrito reductasa en extractos celulares^a

	silvestre	<i>nasB</i>	<i>nrC</i>	<i>nasT</i>
TNT	0,128	0,01	0,01	0,01
TNT amonio	0,01	0,01	0,01	0,01

La actividad se determinó como se describe en la sección 14.1 de *Materiales y métodos*. ^aLa actividad se expresa en miliunidades de actividad por miligramo de proteína. Siendo una unidad el consumo la oxidación de un nanomol de NADH por minuto.

La actividad nitrito reductasa se determinó además en geles de proteínas no desnaturizantes (ver sección 14.1.2 de *Materiales y métodos* y Fig. 3.7.). Los

resultados de los geles confirmaron los datos de las medidas *in vitro*, además de mostrar que *nasB* es el único sistema de reducción de nitrito presente en células incubadas en TNT en JLR11.

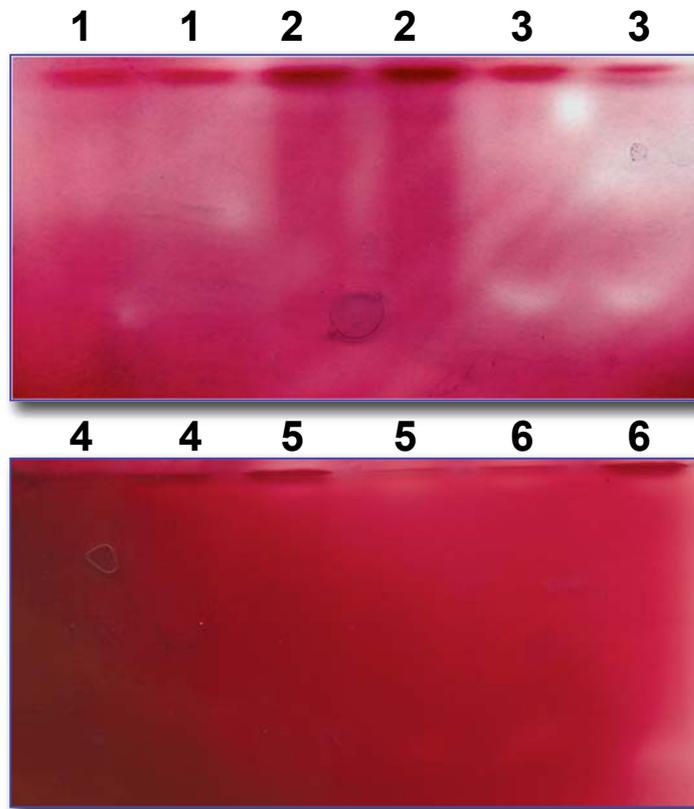


Fig 3.7. Determinación de la actividad nitrito reductasa en geles de proteínas no denaturalizantes en extractos libres de células de silvestre y mutantes incubados en TNT. Las muestras se corrieron por duplicado. 1. mutante *gltB*; 2. mutante *ntrC*; 3. silvestre; 4. mutante *nasT*; 5. mutante *nasB*; 6. mutante *cnmA*.

7. Análisis comparativos del operón de la nitrito reductasa con respecto a otras *Pseudomonadaceas*.

Debido a la similitud de secuencia entre los operones *nasABC* de JLR11 y KT2440, se puede usar la base de datos del genoma secuenciado de esta última cepa (Nelson *et al.*, 2002) para llevar a cabo un estudio comparativo de la estructura y localización de este operón con respecto a los genomas de otras *Pseudomonas* ya secuenciadas, es decir, *P. aeruginosa* PAO1 y *P. syringae* pv. tomato str. DC3000.

El operón de la nitrito reductasa en *P. putida* está compuesto por tres genes (ver Fig. 3.1. y 3.8.), *nasA*, *nasB* y *nasC*. *nasA* codifica la nitrato reductasa, mientras que los genes *nasBC* constituyen las dos subunidades de la nitrito reductasa.

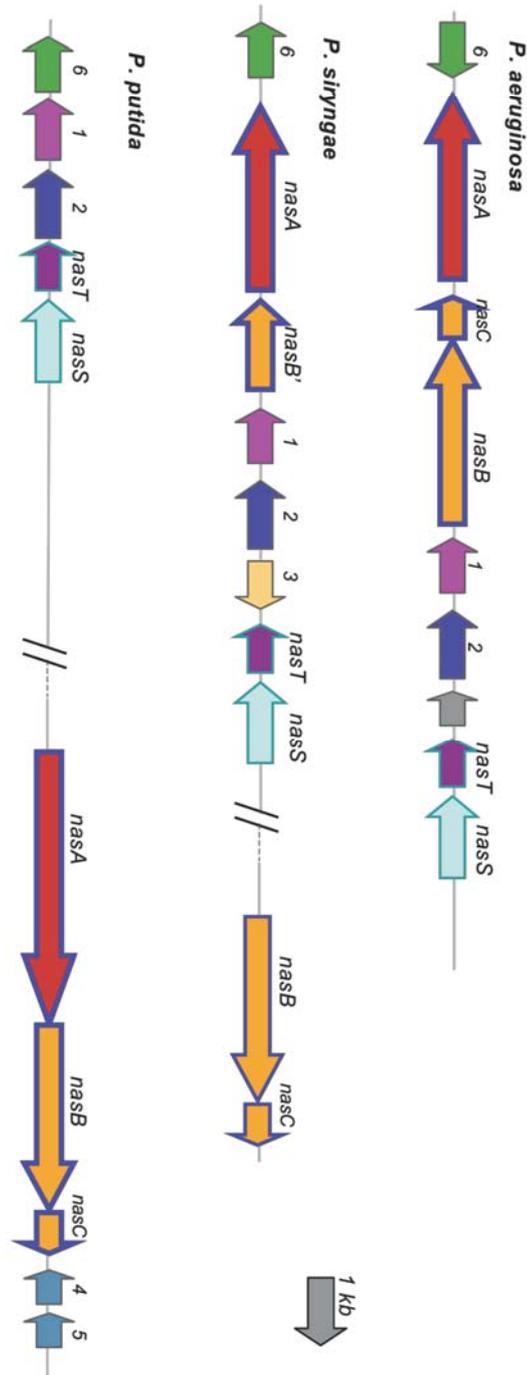


Fig. 3.8. Esquema representativo de la localización y organización de los operones *nasST* y *nasABC* en *P. putida* así como en otras especies de *Pseudomonas* cuyos genomas están secuenciados. Los genes homólogos en las tres especies están representados con el mismo color. Los genes cuya denominación corresponde a un número se han determinado por similitud con proteínas de las bases de datos mediante BlastX, a saber: 1. Serina/Treonina protein quinasa; 2. Transportador de nitrato (*nasV*); 3. Levanosucrasa; 4. Proteína de la familia 2-hidroxiácido deshidrogenasas; 5. Proteína de la familia de reductasas de cadena corta; 6. *cobA*, uroporfirina-III C-metiltransferasa. En gris aparece una proteína hipotética de función desconocida. Los cortes en la cadena indican una distancia indefinida entre un grupo de genes y otros.

Estos tres genes aparecen en *P. aeruginosa*, aunque se organizan justo al contrario, codificándose en primer lugar los genes de la nitrito reductasa. En *P. syringae* en cambio, parecen estar organizados como en *P. aeruginosa*, aunque *nasB* está truncado, y *nasC* ha desaparecido por completo en el operón. Esta bacteria sin embargo posee una copia de los genes *nasBC* en otra localización del cromosoma en lo que puede ser un operón distinto, que tan sólo codifica para la nitrito reductasa.

El operón *nasST*, que en *P. putida* está acompañado de un transportador de nitrato (*nasV*), también en *P. aeruginosa* y en *P. syringae* situado a poca distancia del operón de la nitrato y nitrito reductasa, aunque en ambos casos el gen que codifica el transportador de nitrato está separado por otra región codificante, lo que parece indicar una separación de codificación en distintos operones de los genes *nasV* y *nasST*. En cualquier caso, en los tres genomas, tras el transportador de nitrato aparece conservado otro gen que codifica una serina/treonina protein quinasa, lo que parece indicar expresión en único operón, y por tanto una participación conjunta en el metabolismo del nitrito o nitrato.

Capítulo II

*Aislamiento y caracterización bioquímica de la
nitroreductasa PnrA en P. putida JLR11*

RESUMEN

Las nitroreductasas son un grupo de proteínas que reducen numerosos nitroaromáticos con piridín nucleótidos como donadores de electrones. En este capítulo se describe la identificación de las nitroreductasas PnrA y PnrB de la cepa JLR11 de *Pseudomonas putida*. El enzima codificado por el gen *pnrA* se expresó en *Escherichia coli* y se purificó a homogeneidad. Los resultados demuestran que es una flavoproteína que usa 2 moles de NADPH para reducir un mol de TNT hasta 4-hidroxilamino-2,6-dinitrotolueno mediante un mecanismo bi-bi ping-pong. PnrA reconoce además a otros nitroaromáticos como sustratos, por ejemplo el 2,4-dinitrotolueno, 3-nitrotolueno, 3- y 4-nitrobenzoato, 3,5-dinitrobenzamida y 3,5-dinitroanilina. Sin embargo, el TNT resultó ser el mejor sustrato según la relación V_{\max}/K_m más alta. El análisis de la expresión de *pnrA* y *pnrB* mediante la cuantificación del ARN_m, aislado en distintas condiciones, indicó que el nivel de expresión de ambos genes se mantiene relativamente constante independientemente de las condiciones utilizadas para el cultivo del microorganismo, lo cual está en concordancia con los niveles relativamente constantes de actividad nitroreductasa en células creciendo cultivadas con distintas fuente de nitrógeno.

Los datos presentados en el capítulo anterior de *Resultados* indicaban que la cepa JLR11 de *Pseudomonas putida* obtenía nitrógeno del TNT tanto en forma de amonio como de nitrito. Un paso necesario para la liberación de amonio a partir de un grupo nitro es la reducción de al menos uno de los grupos nitro del TNT. Esto sugería, por tanto, que el genoma de *Pseudomonas putida* JLR11 debía poseer los genes que codifican este tipo de enzimas. Esto vendría apoyado por la observación de la acumulación de aminas aromáticas en el sobrenadante de cultivos tanto aerobios como anaerobios de la cepa JLR11 y que se producen como resultado de la reducción del TNT (Esteve-Nuñez y Ramos, 1998). Así pues, para profundizar en el estudio del metabolismo del nitrógeno del TNT, se hizo necesario identificar las nitroreductasas presentes en esta cepa. Con objeto de identificar estas actividades se decidió proceder a la identificación de la actividad en fracciones subcelulares.

1. Identificación de actividad nitroreductasa en extractos libres de células de *Pseudomonas putida* JLR11 en diferentes condiciones de cultivo.

Pseudomonas putida JLR11 se cultivó en medio mínimo con amonio 10 mM o TNT como fuente de nitrógeno, o con una mezcla de ambos al mismo tiempo, en presencia o ausencia de oxígeno. Los extractos celulares recogidos de estos cultivos mostraron actividad nitroreductasa constitutiva independientemente de las condiciones de cultivo. Dado que la actividad de reducción de TNT asociada a la membrana sólo estaba presente en células cultivadas en condiciones anaerobias en las que el TNT se utilizaba como aceptor final de electrones en una cadena respiratoria (Esteve-Nuñez, *et al.*, 2000b) se consideró que la actividad nitroreductasa mostrada bajo condiciones aeróbicas se producía principalmente por reducción citoplasmática del TNT. Para demostrar esta hipótesis, de extractos celulares de células cultivadas en amonio o en TNT, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, se realizaron fraccionamientos del citoplasma y de la membrana plasmática. Se observó que a la fracción citoplasmática se asociaba una actividad

TNT reductasa independientemente de la condiciones de cultivo utilizadas para preparar los extractos (ver Fig. 4.1.).

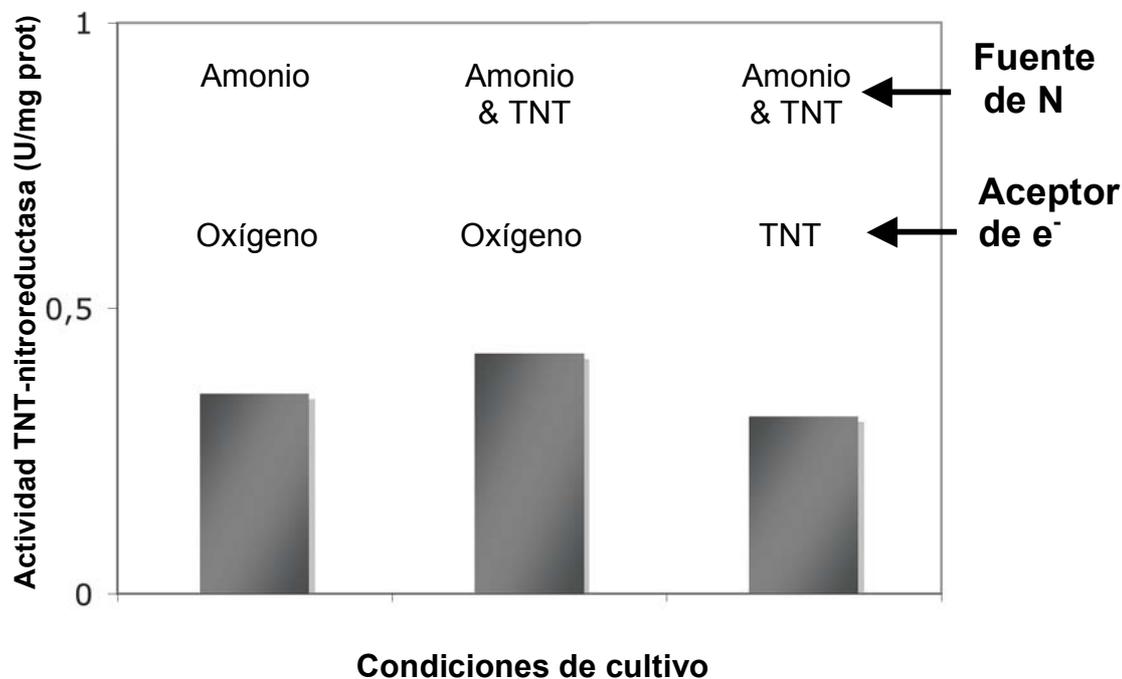


Fig. 4.1. Actividad TNT-nitroreductasa medida en extractos citoplasmáticos de células cultivadas en condiciones aerobias o anaerobias, con amonio 10 mM, o amonio 10 mM y TNT en exceso, como fuente de nitrógeno.

2. Identificación y clonación de genes de nitroreductasas en *P. putida* JLR11.

Durante el desarrollo de este proyecto se llevó a cabo la anotación del genoma de la cepa *P. putida* KT2440 y, como se ha descrito en el Capítulo I de *Resultados*, el nivel de identidad entre la secuencias de *P. putida* JLR11 y *P. putida* KT2440 ronda el 98% a nivel de nucleótidos. Se hipotetizó que la(s) nitroreductasa(s) citoplasmáticas pudiesen formar parte de una familia de proteínas nitroreductasas, del tipo I (también denominadas “insensibles a oxígeno”), designada como familia de “Nitroreductasas clásicas” (ver sección 3.1.1. de *Introducción*). Las proteínas de esta familia presentan una secuencia muy conservada en bacterias, y constituye el grupo de nitroreductasas más importante de las presentes en procariotas. Se habían descrito previamente dos nitroreductasas de *Escherichia coli* codificadas por *nfsA* y *nfsB* (Zenno, *et al.*, 1996a,

1996b). Su secuencia sirvió para hacer una búsqueda por comparación de genes similares en el genoma disponible de la cepa KT2440 [Nelson *et al.* 2002} mediante el programa BLASTP. Se identificaron así dos secuencias cuya traducción mostraba posibles pautas de lectura abiertas con alta identidad con NfsA, (30%) (ver Fig. 4.2.), y con NfsB, (identidad del 52%) (Fig. 4.3.)

NfsA :	11	HRSIRHFTDEPISEAQREAIINSARATSSSSFLQCSSIIIRITDKALREELVTLTGGQKHV
		HRS+R ++D P+ E I +A++ S+SS LQ S++ + D+ L L+G Q+HV
2440 :	171707	HRSVRAYSDLPVDEQMLSWAIAAAQSASTSSNLQAWSVLAVRDRERLARLARLSGNQRHV
NfsA :	71	AQAAEFWVFCADFNRLQIC-----PDAQLGLAEQLLLGVVDTAMMAQNALIAAESLGLG
		QA F V+ D++R ++ P A + E +GVVD A+ AQNA +A E+ GLG
2440 :	171527	EQAPLFLVWLVDWSRLRRLARTLQAPTAGIDYLESYTVGVVDAALAAQNAALAFEAQGLG
NfsA :	126	GVYIGGLRNNIEAVTKLLKLPQHVLPFLFGLCLGWP--ADNPDLKPRLPASILVHENSYP
		VYIGG+RN+ EA+++ L LP +FG+C+G P A ++KPRL S+++H Y+
2440 :	171347	IVYIGGMRNHPEAMSEELGLPNDTFAVFGMCVGHDPDPAQPAEIKPRLAQSVVLHRERYEA
NfsA :	184	LDKGAL--AQYDEQLAEYYLTRGSNNRRDTWSDH-IRRTIIKES---RPFILDYLHKQGW
		+ A+ A YD +++++ + NR +WS + R +S R + D L+ G+
2440 :	171167	TEAEAVSVAAYDRMSDFQHRQRENR--SWSSQAVERVKGADSLSGRHRLRDALNTLGF
NfsA :	238	ATR 240
		R
2440 :	170993	GLR 170985

respectivamente.

Fig. 4.2. Comparación de secuencias entre la proteína de *E. coli* NfsA con la traducción de la secuencia del genoma de *Pseudomonas putida* KT2440. En negrita aparecen los residuos aminoácidos conservados. Los residuos que no son idénticos, pero poseen las mismas características químicas aparecen como cruces. Los números referidos a la secuencia de KT2440 corresponden al de los nucleótidos del **contig X** que codifican la secuencia de aminoácidos alineada con la de la proteína NfsA.

NfsB :	1	MDIISVALKRHSTKAFDASKKLTPEQAEQIKTL LQY SPSS TNS QPWHFIVASTE EGKARV
		MD +S+A +R+++TKA+DAS+++ + + L++SPSS NSQPWHFIVA T EGKA +
2440 :	111745	MDTVSLAKRRYT TKAYDASRRIPQATVDALLEQLRH SPSSVNSQPWHFIVADTAE GKALL
NfsB :	61	AKSAAGNYVFNERKMLDASHVVFC AKTAMDDVWLKLVVD QEDADGRF ATPEAKAANDKG
		AKS A Y +N +K+LDASHV+VFC +T M + L V+DQE ADGRF +A+A ++
2440 :	111925	AKSTAEGYAYNTQKLLDASHVIVFC TRTEMTEEHLNAVLDQE AADGRFRDEQ ARAGQNS
NfsB :	121	RKFFADMHRKDLHDDAEWMAKQVY LN VGNFLLGVAALGLDAVPIEG FDAAILDAEFGLKE
		R+ + ++HR D D WM KQ YL +G LLG AA GLDA PIEGFD+ +LDAE GL+E
2440 :	112105	RRHYVNLHRFDQKDVQHWMEKQTY LALGTALLGAAAHGLDAT PIEGFDSKVLDAE ELGLRE
NfsB :	181	KGYTSLVVVPVGHHSVE DFNATLPKSRLPQNITLT 215
		+G+TS+V++ +G+ S DFNA L KSRLP + T
2440 :	112285	RGFTSVVILSLGYRSEADFNAGLN KSRLPASQVFT 112389

Fig. 4.3. Comparación de secuencias entre la proteína de *E. coli* NfsB con la traducción de la secuencia del genoma de *Pseudomonas putida* KT2440. En negrita aparecen los residuos aminoácidos conservados. Los residuos que no son idénticos, pero poseen las mismas características químicas aparecen como cruces. Los números referidos a la secuencia de KT2440 corresponden al de los nucleótidos del **contig X** que codifican la secuencia de aminoácidos alineada con la de la proteína NfsA.

A estos posibles genes se les denominó *pnrA* y *pnrB* (de *Pseudomonas NitroReductasa A y B*) respectivamente, de acuerdo con la similitud presentada con las proteínas NfsA y NfsB de *E. coli*. La secuencia de estos genes se utilizó para diseñar cebadores con los que amplificar y clonar los genes *pnrA* y *pnrB* de JLR11.

Los cebadores usados para amplificar mediante PCR el gen *pnrA* de JLR11 fueron: *pnrA5*; 5'-ATTCTAGAGTTATGAGCGTATATCTCGG-3' (diseñado con una diana de corte *XbaI* en su secuencia para poder clonarlo [subrayado] y *pnrA3*; 5'-AAGGATCCGCCACTGGAACCTTGAGTGTC-3' (diseñado con una diana de corte *BamHI* para poder clonarlo [subrayado]). Los cebadores usados para amplificar *pnrB* fueron: *pnrB5*; 5'-GCTCTAGAACAGTTCGAGGTCCGGTGAGC-3' (diseñado con una diana de corte de *XbaI* [subrayado]) y *pnrB3*; 5'-AAGGATCCTGTGGATTTCGAAATCGCTG-3' (diseñado con una diana para *BamHI* [subrayado]). Con ellos se amplificaron dos fragmentos cuyos tamaños coincidieron con los de KT2440, siendo éstos de 1043 pb, para *pnrA*, y 1046 pb para *pnrB*. Ambos productos de PCR se secuenciaron y se comprobó que la

secuencia a nivel de nucleótidos se conservaba en más del 99% con los genes de KT2440. La secuencia de ambos genes de JLR11 se depositaron en la base de datos del Genbank. Los números de acceso para estos genes son: *pnrA*; Q93AS3 y *pnrB*; Q8KRI2 (ver *Anexo I* para más información sobre la anotación de las secuencias).

Por otra parte, los productos de la amplificación se clonaron en el plásmido pUC19, generando los plásmidos pNAJ y pNBJ, que portaban los genes *pnrA* y *pnrB* respectivamente. Ambos plásmidos se transformaron en la cepa DH5 β de *E. coli* y, tras cultivar las cepas en LB, se recogieron las células con las que se prepararon extractos libres de células. Se determinó entonces la actividad nitroreductasa asociada a los genes clonados usando los siguientes sustratos: 2,4,6-trinitrotolueno, 2,4-dinitrotolueno, 4-nitrotolueno, 4-nitrobenzoato y nitrofurazona (Fig. 4.4.). Como control de actividad se utilizó un extracto de *E. coli* DH5 β que portaba el plásmido pUC19 sin inserto.

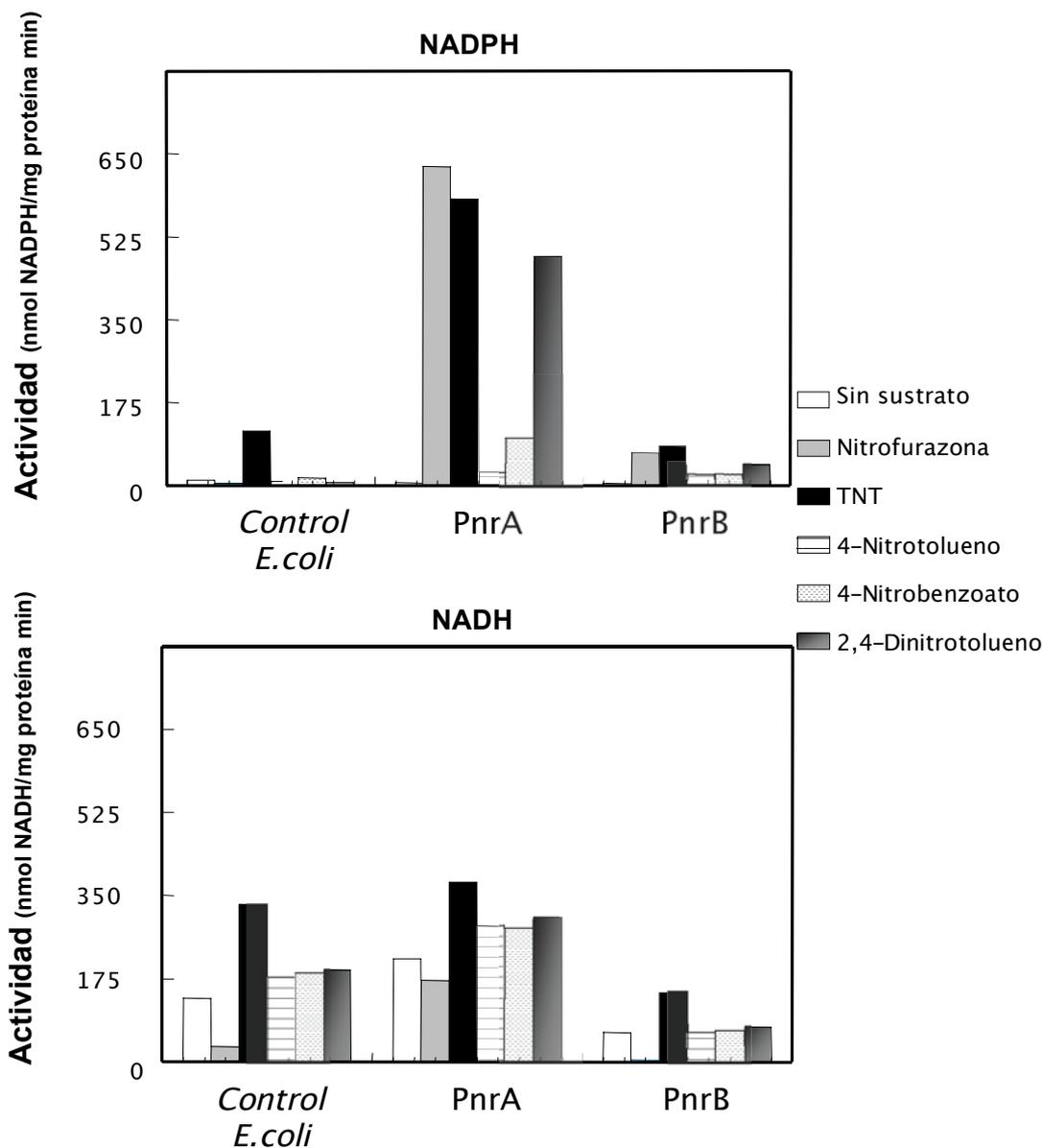


Fig. 4.4. Actividad nitroreductasa de *E. coli* portando o no los genes *pnrA* y *pnrB* de JLR11. La actividad nitroreductasa se estimó como el consumo de NADPH (panel superior) o NADH (panel inferior). Se prepararon extractos libres de células de *E. coli* DH5 β portando el plásmido pUC19 (control) o los plásmidos pNAJ (*PnrA*) ó pNBj (*PnrB*). Los sustratos utilizados fueron: Nitrofurazona, TNT, 4-nitrotolueno, 4-nitrobenzoato y 2,4-dinitrotolueno. Se ha de indicar que en ausencia de sustrato añadido se observó cierta actividad basal de oxidación de NADH ó NADPH.

Usando NADH como donador de electrones, la actividad basal de los extractos de los tres cultivos fue de alrededor de 150 nmoles de NADH consumidos por minuto y por mg de proteína. Sin embargo, los niveles de oxidación de NADH de los extractos que portaban las proteínas *PnrA* y *PnrB* con los sustratos utilizados fue ligeramente superior a los basales, sugiriendo que ni

PnrA, ni PnrB presentaban una actividad destacable con ninguno de los sustratos utilizados en este experimento.

Con NADPH como donador de electrones, en cambio, se observó actividad enzimática con la proteína PnrA, mientras que PnrB presentó muy poca actividad con respecto a los nitroaromáticos utilizados como sustratos. La actividad específica basal de *E. coli* portando pUC19 fue relativamente baja (10 nmoles de NADPH oxidados por min por mg de proteína). La nitrofurazona fue el sustrato con el que PnrA presentó mayor actividad. Sin embargo, se encontró una actividad específica TNT-nitroreductasa asociada al producto del gen *pnrA* muy alta, de más de 520 nmoles de NADPH oxidados por min y mg de proteína. En cambio, la actividad con TNT como sustrato de la proteína expresada por el gen *pnrB* no llegó a los 20 nmoles de NADPH consumidos por min por mg de proteína. Con el apoyo de esta serie de resultados se consideró que PnrA era probablemente la principal nitroreductasa citoplasmática de JLR11, y por tanto, se decidió continuar el estudio y caracterización de la proteína codificada por el gen *pnrA*.

3. Determinación de la expresión de los genes *pnrA* y *pnrB* en *Pseudomonas putida* JLR11

Los estudios de actividad enzimática llevados a cabo con la fracción citoplasmática de JLR11 indicaron que la reducción de TNT es un proceso constitutivo. Si la proteína codificada por *pnrA* es la responsable de la reducción del TNT en JLR11, la expresión del gen debería ser a su vez constitutiva. Para corroborar esta hipótesis se cultivaron células de *P. putida* JLR11 en medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno, a saber amonio 10 mM, TNT, y TNT más amonio 10 mM, cuando la turbidez del cultivo a 660 nm alcanzó 0,7 se extrajo el ARN total y se determinó la cantidad relativa de ARNm de *pnrA* y *pnrB* mediante PCR a tiempo real, tal y como se describió en la sección 11 de *Materiales y métodos*.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.1. El nivel de expresión de ambos genes fue similar, independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada para el crecimiento de la cepa.

Tabla 4.1. Expresión de los genes *pnrA* y *pnrB* medidos por PCR a tiempo real.

Fuente de nitrógeno	Nivel de expresión	
	<i>pnrA</i>	<i>pnrB</i>
Amonio	1	1
Amonio + TNT	0,96	0,79
TNT	1,26	0,64

Los valores dados son la media de tres replicas y se muestran como valores relativos a la expresión del gen en cultivos con amonio 10 mM como única fuente de nitrógeno, referido con el valor de 1. Los valores relativos de *pnrA* y *pnrB* no son equivalentes entre ellos.

4. Purificación y caracterización de las propiedades cinéticas del enzima PnrA.

El gen *pnrA* codifica una proteína de 275 aminoácidos con un peso estimado de unos 28 kDa. La proteína PnrA se purificó a homogeneidad a partir de extractos de cultivos de la cepa *E. coli* DH5 α que portaba el plásmido pNAJ. El procedimiento de purificación se describió en la sección 16 de *Materiales y métodos*. El rendimiento de la purificación de PnrA fue del orden del 36% y permitió producir una cantidad de PnrA de unos 0,05 mg por litro de cultivo, con un factor de purificación de unas 366 veces (ver Tabla 4.2.) Las Figuras 4.5. y 4.6. muestran los pasos de purificación a homogeneidad de la proteína en columna (Fig. 4.5.) y la resolución de las proteínas en geles de EGPA-SDS (Fig. 4.6.).

El peso molecular estimado de PnrA en geles de proteínas denaturalizantes en SDS-PAGE fue de 28 kDa. El peso molecular de la proteína nativa se estimó por filtración molecular en gel, y resultó ser de 57 kDa. Por tanto, PnrA es un homodímero en su conformación nativa.

Tabla 4.2. Rendimiento de purificación de la proteína PnrA expresada en *E. coli* DH5 β que portaba el plásmido pNAJ

Paso de purificación	Vol. (ml)	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg prot.)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	50	436	700	0,65	100	1
Fracccion Citoplasmática	45	483	594	0,81	110	1,25
Sulfato amónico 30-90% (dializado)	70	400	420	0,95	92	1,53
Cromatografía Hiprep XL	50	296	65	4,5	68	7,35
Fenil sefarosa	15	230	11,5	20,25	53	32,6
Red sefarosa	15	102	0,4	226,6	36	365,5

Una unidad de actividad nitroreductasa corresponde a la oxidación de 1 μ mol de NADPH por minuto.

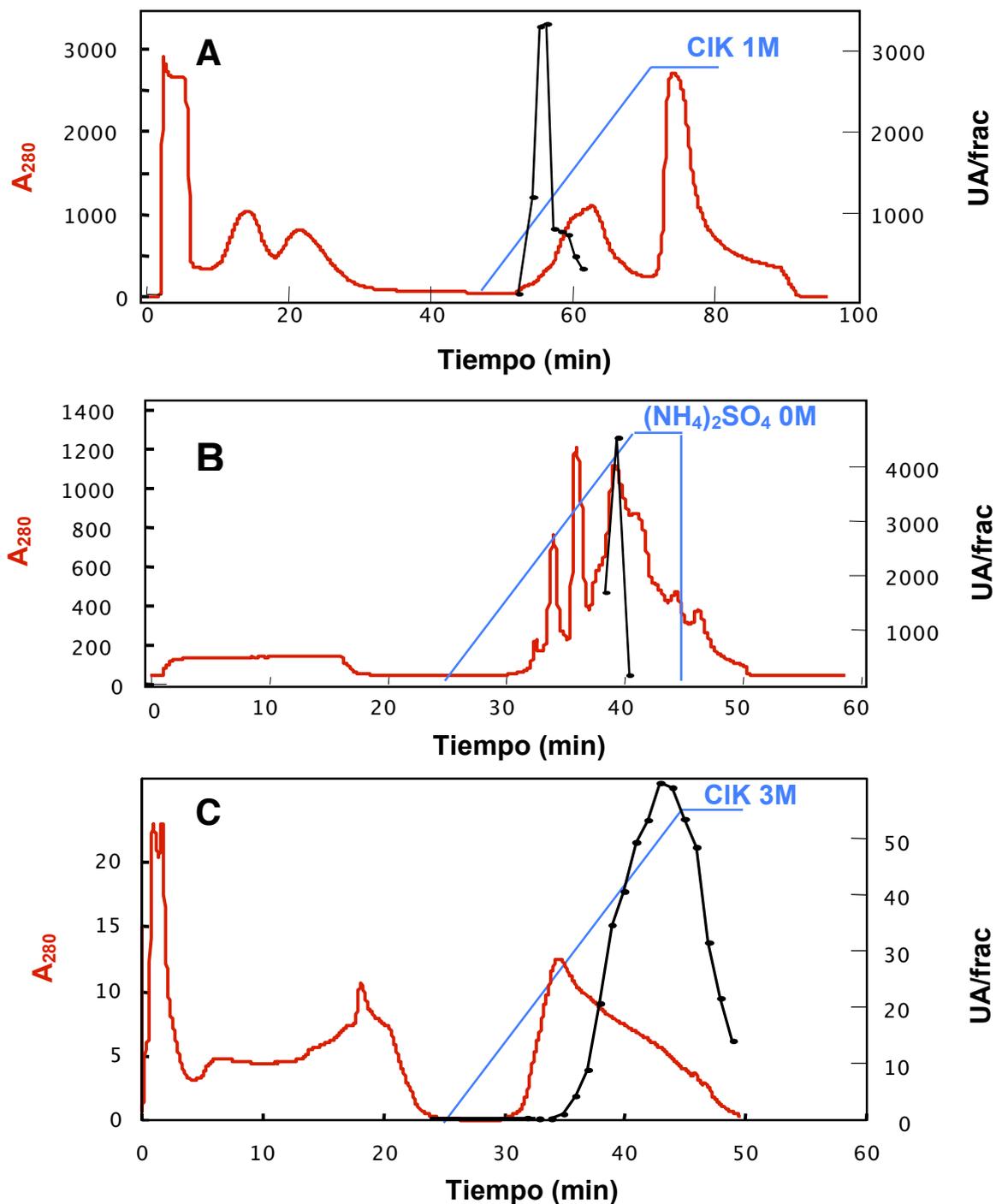


Fig. 4.5. Resultados de la cromatografía por FPLC. En rojo se indica la absorbancia a 280nm, lo que corresponde a la concentración de proteína. En azul se muestra el gradiente aplicado en cada paso de FPLC, junto con la concentración final de gradiente alcanzado. En negro se indica la actividad TNT-nitroreductasa en cada fracción (puntos negros) y que se corresponden con los valores dados en el eje Y de unidades de actividad por fracción. Las tres cromatografías son: **A**, Intercambio iónico en columna Hiprep XL; **B**, Interacción hidrofóbica en fenil sepharose; **C**, afinidad en Red Sepharose (Ver sección 14 de *Materiales y métodos* para mayor explicación).

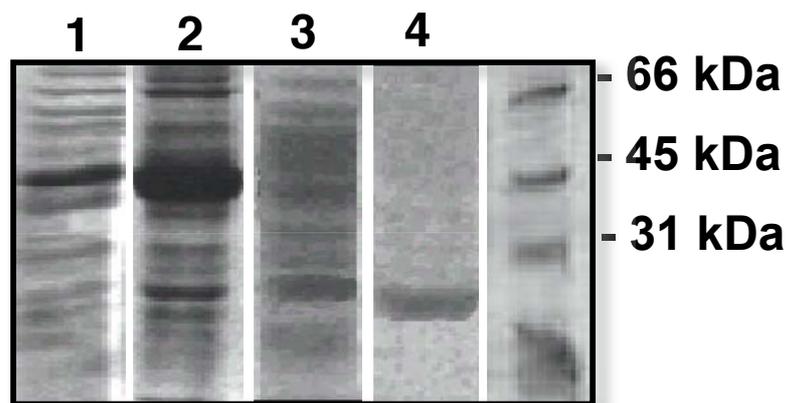


Fig. 4.6. Geles EGPA-SDS donde se observa el nivel de purificación de las fracciones con actividad TNT-reductasa tras el paso por el FPLC: **1.** Extracto crudo. **2.** Columna de intercambio iónico. **3.** Interacción hidrofóbica. **4.** Afinidad.

Las soluciones de la nitroreductasa PnrA eran de color amarillo intenso, y el espectro de la proteína era consistente con el de una flavoproteína (Fig. 4.7.). El cofactor se caracterizó por HPLC y se identificó como FMN. El espectro de la proteína mostró los picos máximos a 445, 370 y 270 nm, mientras que los picos del FMN libre fueron a 448, 375 y 224 nm.

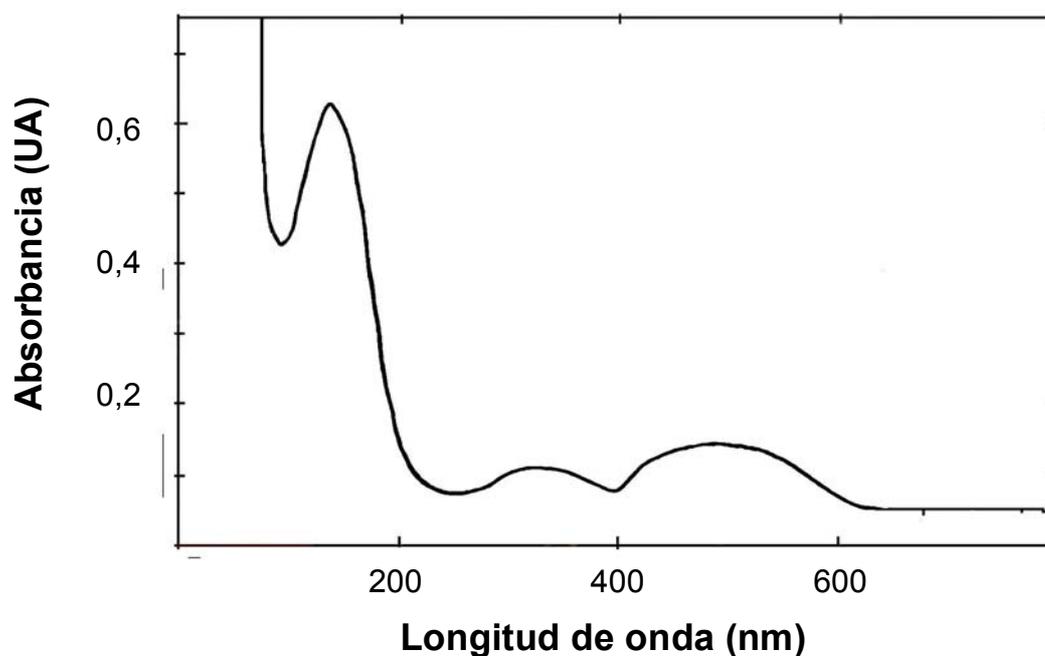


Fig. 4.7. Espectro de la proteína homogénea PnrA.

Se determinó la relación molar entre el NADPH consumido por cantidad de TNT reducido, dando una relación de 1,9 moles de NADPH por mol de TNT. Esto confirmó al 4-hidroxilamino-2,6-dinitrotolueno (4HADNT) como el producto de la reacción, que se detectó además por HPLC.

El pH óptimo de actividad del enzima PnrA fue de 7,2, aunque la reacción se observó en un intervalo de pH de 6,5 a 8,5, y una temperatura de 25°C. Por otro lado, la K_m para el NADPH fue de $20 \pm 2 \times M$.

Se determinó además los valores de V_{max} así como de K_m de PnrA para una serie de mono- y dinitrotoluenos, 2,4,6-trinitrotolueno, 3- y 4-nitrobenzoato, 3,5-dinitroanilina y 3,5-dinitrobenzamida (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Perfil de actividad de la nitroreductasa PnrA y sus constantes cinéticas

Substrato	K_m (μM)	V_{max} (U/mg)	V_{max}/K_m
2,4,6-trinitrotolueno	5	6400	1280
2,4-dinitrotolueno	4	3500	875
3,5-dinitrotolueno	10	3800	380
2,6-dinitrotolueno	500	3150	6
2-nitrotolueno	Sin actividad	Sin actividad	No aplicable
2-nitrobenzoato	Sin actividad	Sin actividad	No aplicable
3-nitrotolueno	30	700	20
3-nitrobenzoato	30	2800	90
4-nitrotolueno	Sin actividad	Sin actividad	No aplicable
4-nitrobenzoato	20	3400	170
3,5-dinitrobenzamida	7	6500	930
3,5-dinitroanilina	9	5400	600

Los valores dados corresponden a la media de 4 medidas en ensayos independientes. La desviación estándar está por debajo del 10% de los valores dados en la tabla.

El máximo valor de la relación entre V_{\max}/K_m se obtuvo con el TNT. Esto indica que, este nitroaromático es el mejor sustrato de PnrA de todos los compuestos ensayados. Los valores de V_{\max}/K_m alcanzados con el 2,4-DNT y con la 3,5-dinitrobenzamida fueron similares a los del TNT, lo que sugiere estos dos compuestos son también buenos sustratos del enzima.

En comparación con los resultados mostrados por el 2,4-DNT, los que presentó el 2,6-DNT como sustrato fueron muy exigüos. Los mononitrotoluenos y los nitrobenzoatos fueron también, en general, sustratos pobres de PnrA. Las preferencias del enzima por la reducción del grupo nitro en posición *para* concuerda con la mayor electronegatividad de los grupos nitro en esta posición, según lo descrito por Barrows *et al.* (1996).

Se realizaron también representaciones gráficas en donde se representó la velocidad de reducción del TNT con respecto a la concentración inicial de NADPH (ver Fig. 4.8.). Este gráfico mostraba líneas paralelas, lo que sugería que el modo en que PnrA llevaba a cabo su actividad catalítica era un mecanismo de tipo bi-bi ping-pong, como se ha descrito previamente para otras nitroreductasas (Bryant, *et al.*, 1991; Zenno, *et al.*, 1996a; 1996b). En este mecanismo de reducción, tanto el donador de electrones como el sustrato compiten por el centro activo, lo cual quiere decir que la entrada de uno de los elementos impide la entrada del otro. De este modo, el mecanismo consiste en una primera cesión de los electrones desde el donador NADPH hasta el FMN, reduciéndolo. Una vez oxidado, el NADP^b sale del centro activo. La flavina una vez reducida cede posteriormente los electrones al grupo nitro del sustrato.

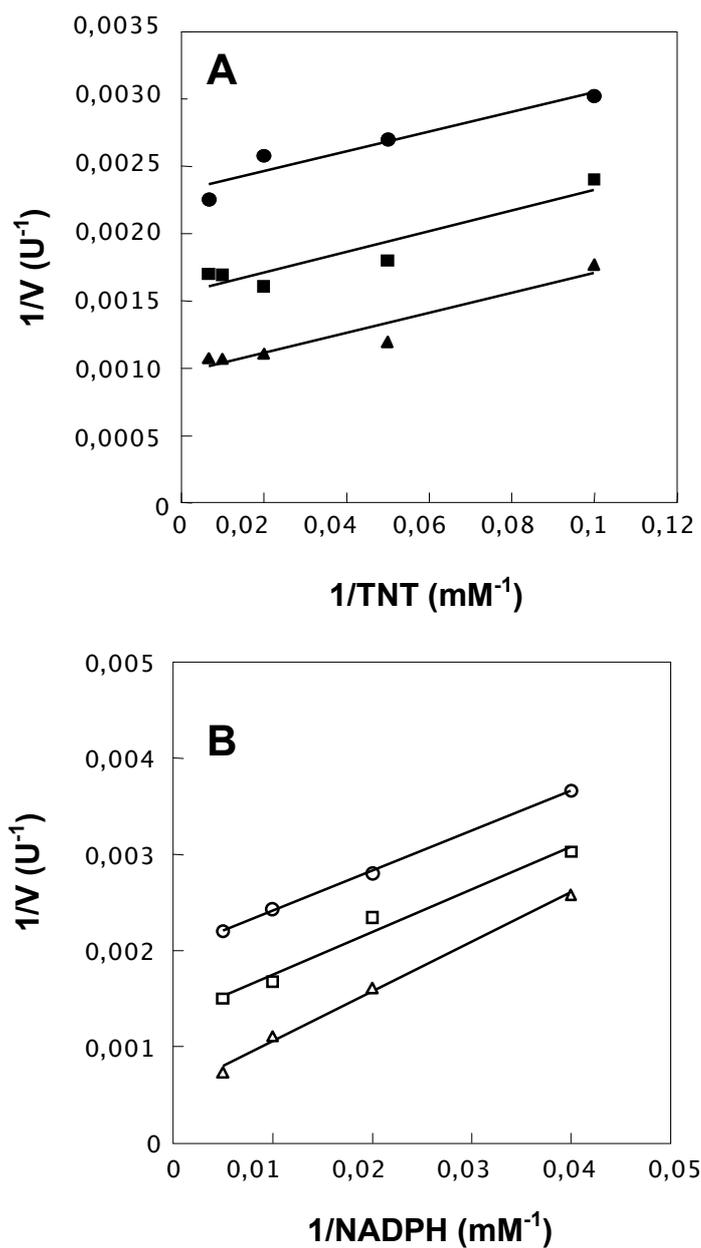


Fig. 4.8. Deducción del mecanismo de reducción de PnrA mediante la representación de gráficos doble-recíprocos en los que se determina la velocidad inicial con respecto a la concentración de TNT (A) o NADPH (B). La actividad TNT reductasa dependiente de NADPH se midió usando concentraciones constantes de NADPH (25 μM, triángulos cerrados; 50 μM, cuadrados cerrados; 100 μM, círculos cerrados) o TNT (5 μM, círculos abiertos; 10 μM, cuadrados abiertos, 50 μM, triángulos abiertos).

Capítulo III

*Implicaciones de la nitroreductasa **PnrA** en el
metabolismo del nitrógeno del TNT en
P. putida JLR11*

RESUMEN

En este capítulo se ha analizado el posible papel de la nitroreductasa PnrA en la asimilación del nitrógeno del TNT a partir de la ruta de producción de amonio. Para ello se construyó una cepa mutante en *pnrA* en *Pseudomonas putida* JLR11 mediante sustitución alélica y se comprobó su capacidad de utilización del TNT como fuente de nitrógeno. Los resultados aquí obtenidos muestran que un mutante *pnrA* crece con TNT a menor velocidad que la cepa silvestre, lo cual indica una participación activa de la nitroreductasa PnrA en la utilización del TNT. Por otro lado, el mutante en *pnrA* es capaz aún de producir 4-HADNT, aunque en cantidades un 40% inferiores a la del silvestre. Esto indica que existen más enzimas con capacidad nitroreductasa en JLR11. Además, esta cepa es capaz aún de acumular 4-ADNT en las mismas concentraciones que el silvestre, lo cual sugiere que el proceso de reducción de hidroxilamina a amina es independiente al de reducción hasta hidroxilamina llevado a cabo por enzimas nitroreductasas. Se construyó además un mutante doble en los genes *pnrA* y *nasB* para estudiar si con ello se obtenía una cepa incapaz de crecer en TNT como fuente de nitrógeno. Este doble mutante es incapaz de crecer con TNT como fuente de nitrógeno, demostrando así la existencia de dos rutas de asimilación independientes en JLR11.

La asimilación del nitrógeno del TNT en *Pseudomonas putida* JLR11 sucede, de acuerdo con los resultados presentados en el *Capítulo I* de esta Tesis Doctoral, gracias a dos rutas de eliminación de grupos nitro independientes que dan como resultado tanto nitrito como amonio. En el *Capítulo II* se identificó y caracterizó la nitroreductasa PnrA de JLR11, siendo este enzima capaz de reducir el TNT hasta 4-HADNT, y habiendo sido identificado además como una de las nitroreductasas más importante de JLR11 en cuanto a la reducción del TNT. Para estudiar el papel que ejercía PnrA en la asimilación del nitrógeno del TNT, se decidió construir y posteriormente caracterizar, una cepa de JLR11 mutante en el gen *pnrA*. Además se decidió construir una cepa mutante portando inactivados los genes *pnrA* y *nasB*, para determinar si las rutas de asimilación del TNT en *P. putida* JLR11 eran sinérgicas.

1. Construcción de las cepa mutante en *pnrA*.

La construcción del mutante de *pnrA* se realizó mediante intercambio alélico del gen silvestre por una copia truncada *pnrA::tel* mediante doble recombinación homóloga, tal y como se describió en la sección 9.1. de *Materiales y métodos*.

Para ello se partió del gen *pnrA* clonado en el plásmido pNAJ (ver *Capítulo II* para su descripción). El gen *pnrA* se interrumpió mediante inserción del operón que contiene los genes de resistencia a telurito, *kilAtelAB*, que se clonó entre las dianas *NruI* de la secuencia de *pnrA* (Genbank Q93AS3). El operón de resistencia a telurito se obtuvo previamente como un fragmento *HindIII* de 3500 pbs del plásmido pJMT4 (Sanchez-Romero, *et al.*, 98, y sección 3 de *Materiales y métodos*) y tratamiento con el enzima Klenow con el que se obtuvieron extremos romos. La inserción de *kilAtelAB* dio lugar al plásmido pNAJTel que portaba el alelo mutante de *pnrA*. La construcción *pnrA*×*kilAtelAB* se aisló como fragmento *SaI* y se subclonó en el sitio *SaI* del plásmido suicida pMRSAC.1 (ver sección 3 de *Materiales y métodos* y la Fig. 2.3), obteniéndose así el plásmido pMRSAC.1*pnrA::Tel*. La construcción se transfirió a la cepa silvestre *P. putida* JLR11 por conjugación tripartita.

Los clones recombinantes se seleccionaron en medio M9 con telurito (20 \times g/ml) y benzoato 10 mM como fuente de carbono; así se seleccionaban merodiplides en los que el plásmido pMRSAC.1*pnrA*::Tel se había insertado a través de un evento de recombinación. La doble recombinación se obtuvo tras un paso de presión selectiva por sacarosa al 10% (p/v) más telurito (20 \times g/ml) donde se eliminaron todos los clones que poseían el gen *sacB* (*sacB* confiere sensibilidad a sacarosa en este medio) codificado en el plásmido pMRSAC.1. El remplazamiento alélico y por tanto la mutación en el gen *pnrA* se confirmó por Southern blot en el clon JLR34 (ver Figura 5.1.).

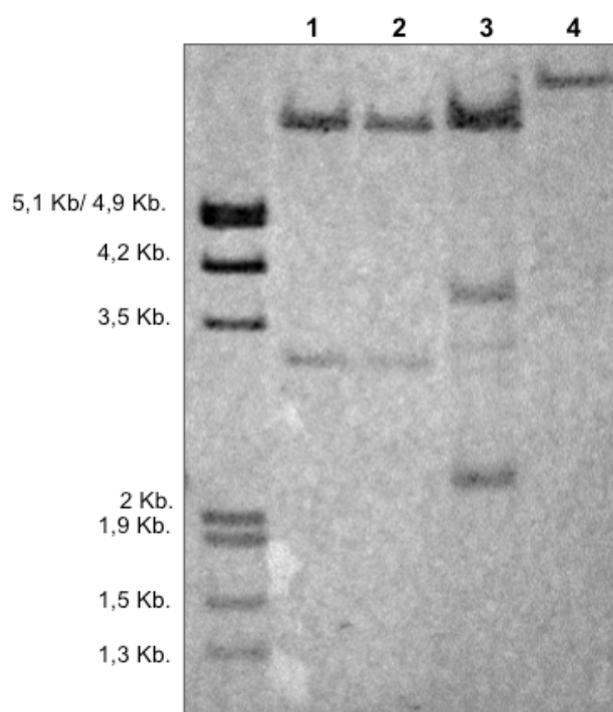


Fig. 5.1. Southern blot hibridado con una sonda específica del gen *pnrA* obtenida por amplificación por PCR con los cebadores *nfs62* (5'- caccgtgatcgcgag -3') y *nfs7* (5'- aaggatccgccactggaaccttgagtgc-3'). Las calles mostradas son: **1** y **2**, cromosomas digeridos con el enzima *SmaI* de 2 clones mutantes seleccionados tras doble recombinación; **3**, cromosoma digerido con el enzima *SmaI* de clon merodiploide obtenido tras una primera selección en donde se ha integrado el plásmido pMRSAC.1*pnrA*::Tel; **4**, cromosoma digerido con el enzima *SmaI* de la cepa silvestre JLR11.

3. Resistencia a nitrofurazona de la cepa *pnrA*.

Se ha descrito con anterioridad que la actividad de las nitroreductasas es la responsable de la toxicidad de algunos compuestos nitroaromáticos, como por ejemplo la nitrofurazona (NF) o la metronidazola. Ambos compuestos se utilizan como agentes antimicrobianos; la NF se usa en la actualidad como antibiótico de

uso tópico en el tratamiento de quemaduras y en injertos de piel (Rodgers *et al.*, 1997) y la metronidazola en el tratamiento de úlceras gastrointestinales (Goodwin, *et al.*, 1998). La letalidad de estos compuestos se ha asociado a la reducción del grupo nitro a hidroxilamino en la reacción que se representa en la Fig. 5.2. [Sarlaukas *et al* 2004; Goodwin *et al* 1998; Grove *et al* 2003}.

De esta manera en la literatura se han descrito casos donde se han podido aislar fácilmente mutantes en genes que codifican nitroreductasas debido a un incremento de la resistencia a dichos compuestos en estos clones [McCalla *et al* 1978; Whiteway *et al* 1998; Jeong *et al* 2001}, como es el caso de los genes de *E. coli*, *nfsA* y *nfsB* (cuyo nombre viene del inglés Nitrofurazone sensitive).

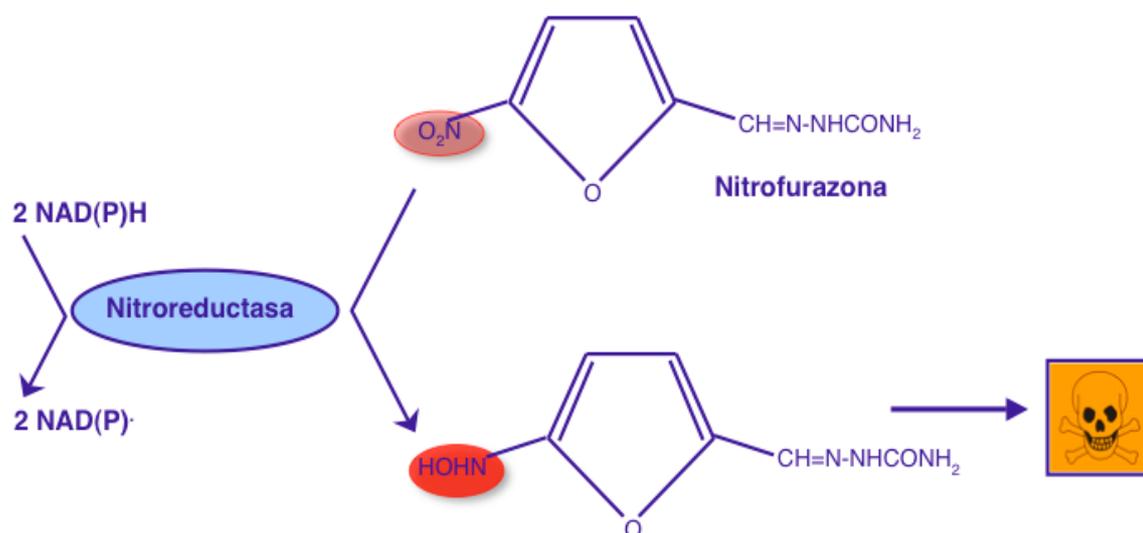


Fig. 5.2. Esquema de la reducción de la Nitrofurazona y generación del derivado tóxico.

Se analizó por tanto el comportamiento del mutante JLR34 ante la NF en placas de medio LB sólido y NF en gradiente con rango establecido entre 500 $\times g/ml$ y 0 $\times g/ml$. Las placas se prepararon tal y como se describe en la sección 2.4. de *Materiales y métodos*. Los clones silvestre y mutante JLR34 se cultivaron en LB durante 12 horas y se sembraron en las placas de gradiente mediante *top agar*. Tras incubar las placas durante 1 noche en oscuridad (para evitar la degradación de la NF) se analizaron los resultados que se muestran en la Fig. 5.3. Sorprendentemente, sólo se observó una ligera limitación del crecimiento en las

máximas concentraciones de NF aunque este efecto se observó tanto en la cepa silvestre como en la mutante. Este dato se contrastó con un control de una cepa silvestre de *Escherichia coli*, que fue incapaz de crecer en todo el gradiente de la placa. En esta última cepa estos ensayos se han descrito con anterioridad, aunque utilizando concentraciones 10 veces menores de NF, es decir, con un máximo de 50 mg/ml [McCalla *et al* 1978}. Esto indica que JLR11 tiene una gran capacidad para tolerar altas concentraciones de NF en el medio.

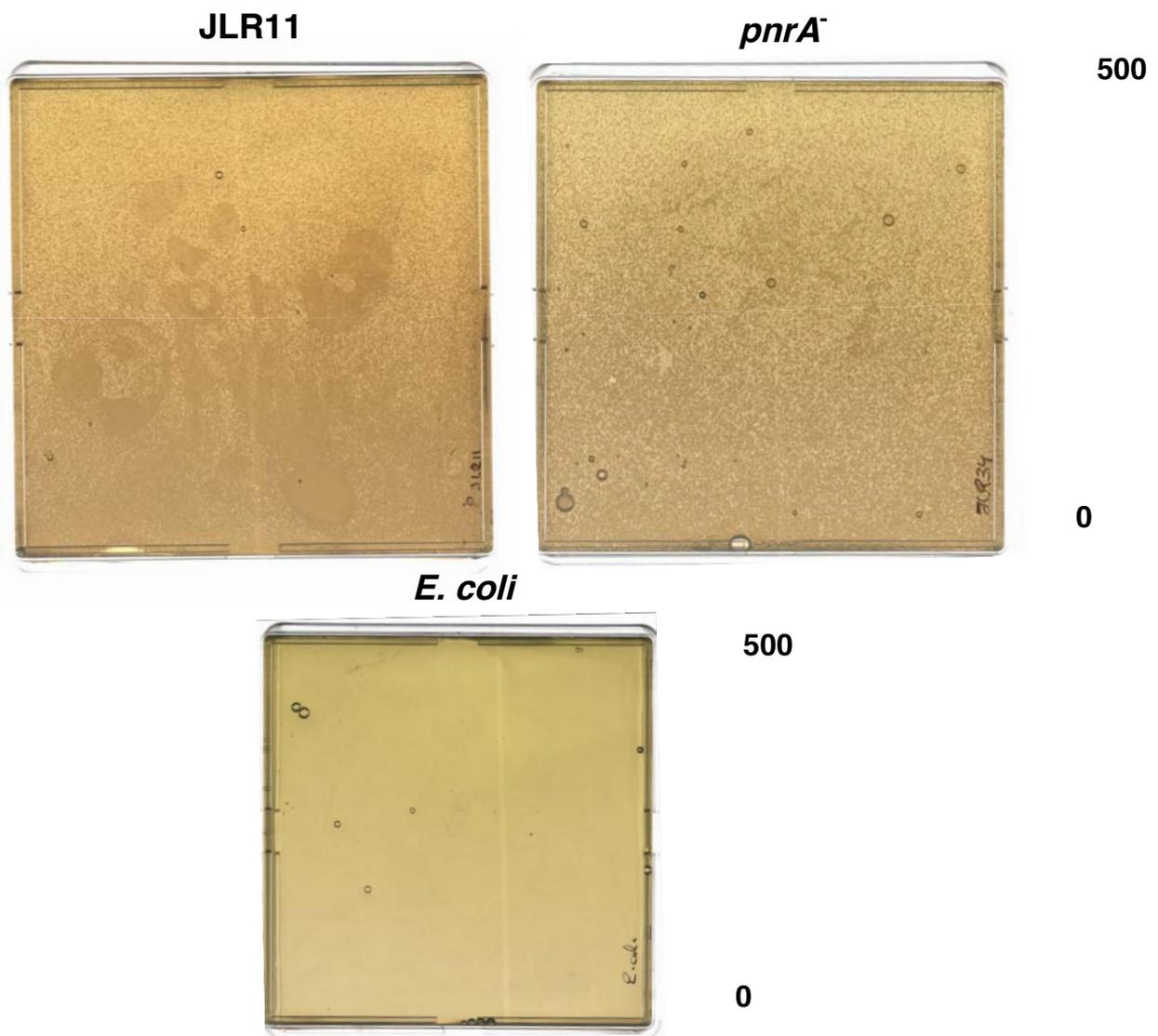


Fig. 5.3. (Página anterior). Fotografía de las placas de gradiente de NF tras una noche de incubación en oscuridad. El sentido en el que se aplicó el gradiente se observa en el diagrama lateral de las placas, con un máximo de 500 \times g/ml de NF.

3. Crecimiento en TNT.

Se analizó la capacidad de crecimiento en TNT del mutante *pnrA* en medio líquido M8 con TNT como única fuente de nitrógeno y glucosa en condiciones aerobias. El TNT se añadió por encima de su límite de solubilidad en medio acuoso para asegurar que éste se encontrase a máxima concentración (500 \times M) durante toda la curva de crecimiento y no fuese factor limitante en el crecimiento. Las cepas se precultivaron en medio M9 con glucosa 0,5 % (p/v) y TNT. Tras lavar las células con tampón fosfato 50 mM pH 7, se transfirieron al medio de cultivo sin amonio. Los resultados se muestran en la Fig. 5.4.

En el panel A de la Fig. 5.4. se observa que el crecimiento de la cepa JLR34 (*pnrA*) está limitado en comparación con el de la cepa silvestre JLR11. Esto indica que la eliminación de la nitroreductasa PnrA tiene un efecto claro y una participación destacada en cuanto al metabolismo del nitrógeno del TNT en *P. putida* JLR11.

A lo largo de la curva de crecimiento se siguió además la acumulación de productos reducidos provenientes del TNT en la cepa mutante y en el silvestre. El compuesto mayoritario obtenido fue el 4-aminodinitrotolueno (4-ADNT), cuyos datos de concentración medidos por HPLC se muestran en el panel B de la Figura 5.4. Se observa que el mutante acumula este compuesto a concentraciones similares a las acumuladas por la cepa silvestre. Esto indica, en primer lugar, que en *P. putida* JLR11 debe de haber al menos otros sistemas capaces de reducir el TNT (los sistemas alternativos que podrían estar implicados en la nitroreducción del TNT se tratará en la *Discusión* de esta Tesis Doctoral).

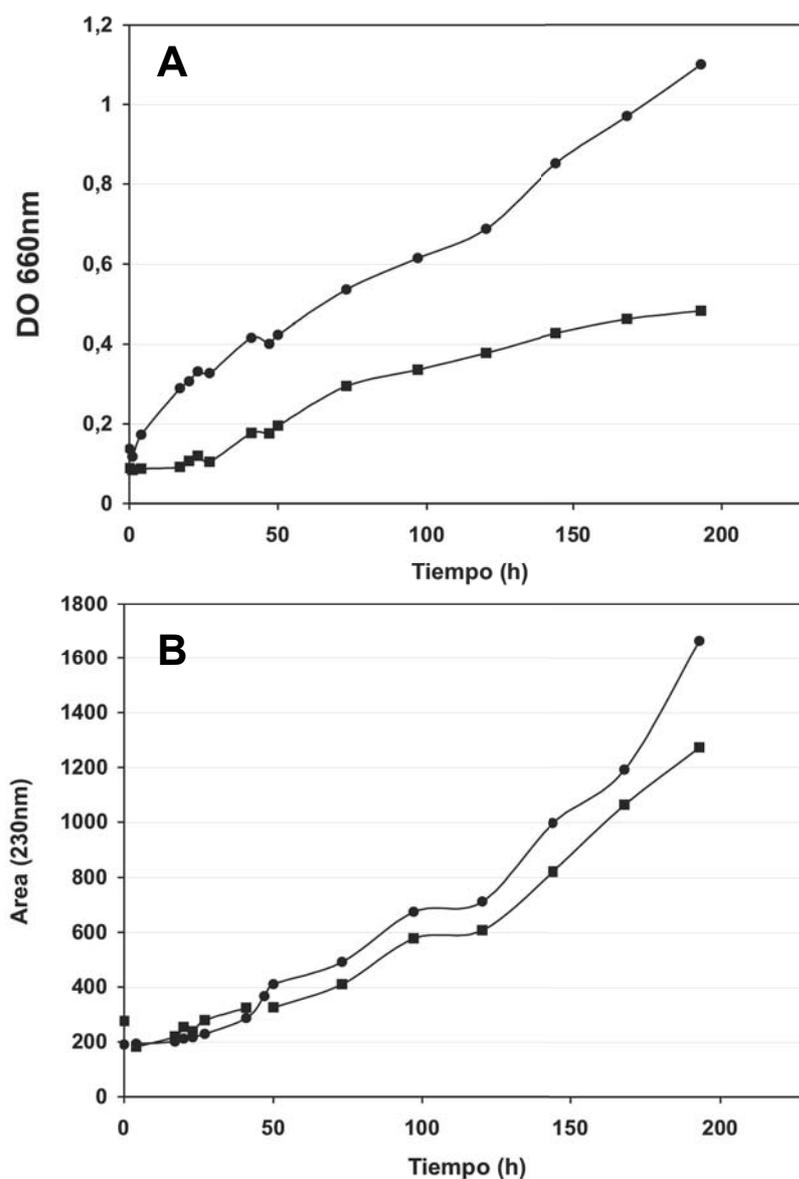


Fig. 5.4. Curvas de crecimiento en medio mínimo con TNT como única fuente de nitrógeno y glucosa 0,5 % (p/v). En el panel **A** se muestra el crecimiento en turbidez a 660 nm En el panel **B** se muestra la acumulación de 4-A-2,6-DNT medido por HPLC y expresado en Área (mUA/s) a 230 nm. Silvestre, círculos cerrados; JLR34, cuadrados cerrados.

Para estudiar el patrón de compuestos acumulados al final de la curva de crecimiento se realizaron extracciones en fase líquido-líquido y se analizó el perfil de productos por cromatografía de gases. Los resultados fueron similares a los descritos anteriormente por el Dr. A. Esteve-Nuñez (Esteve-Nuñez y Ramos, 1998), dando como compuesto acumulado mayoritario la 4-ADNT, apareciendo además derivados del tipo de los azoxynitrotoluenos como resultado de la condensación de dos moléculas parcialmente reducidas de TNT en presencia de

O₂ (Haïdour y Ramos, 1996). No se observaron diferencias significativas en cuanto al silvestre y las cepas mutantes.

Ahora bien, el producto de la reacción del enzima PnrA es el 4-HADNT, el cual no se detectó en el medio en condiciones apropiadas (probablemente debido a la inestabilidad de esta molécula). Se sabe que las enzimas nitroreductasas son capaces de reducir hasta hidroxilamino los grupos nitro, pero es muy probable que existan otras proteínas, no identificadas aún, capaces de transformar estos compuestos parcialmente reducidos hasta el producto final, es decir, el aminoderivado del nitroaromático, que es el producto que se acumula comúnmente en los sobrenadantes de cultivos de TNT en JLR11.

Es por ello que se decidió medir la producción de 4-HADNT a tiempos cortos por HPLC en extractos libres de células de la cepas silvestre y mutante tras someterlos a un pulso de TNT en cantidad limitante. Para ello se cultivaron las cepas JLR11 y JLR34 en LB hasta una turbidez a 660 nm de 0,8, se recogieron las células por centrifugación y se lavaron en tampón fosfato 50 mM pH 7. Se resuspendieron posteriormente en 5 ml del mismo tampón y se prepararon los extractos tal y como se describe en la sección 14 de *Materiales y métodos*. Para el ensayo se utilizó la fracción citoplásmica de los extractos, que se obtuvo tras hacer una separación por ultracentrifugación del extracto crudo. Para la reacción se utilizó además del extracto, TNT 100 \times M, y NADPH 350 \times M. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos en donde la reacción enzimática se paraba añadiéndole un volumen de metanol previamente enfriado en hielo e inmediatamente se midió por HPLC. Para comprobar la identidad de los picos y poder estimar concentraciones se utilizaron patrones estándar de 4-HADNT y 4-ADNT suministrados por AccuStandard (New Haven, CT, USA).

Los resultados mostrados en la Fig. 5.5. demuestran que la cepa mutante produce menos cantidad de 4-HADNT que la cepa silvestre. Los datos cinéticos obtenidos indican que la cepa silvestre produce aproximadamente 1,8 \times moles de 4-HADNT por minuto y por miligramo de proteína. Mientras, la cepa mutante en PnrA produce 1,1 \times moles de 4-HADNT por minuto y por miligramo de proteína, indicando una producción de alrededor del 40% menos en la cepa mutante. Esto confirma que una mutación *pnrA* provoca una limitación en cuanto a la reducción

del TNT en JLR11. Por otra parte, se observa una acumulación de 4-ADNT que es muy similar en ambos casos, tanto en el silvestre como en la cepa mutante, llegando a ser de un 15 % del TNT inicial. Estos datos concuerdan con los descritos por Esteve-Nuñez y Ramos, 1998, los cuales observaron esta proporción de aminas en los sobrenadantes de cultivos de TNT de JLR11 tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

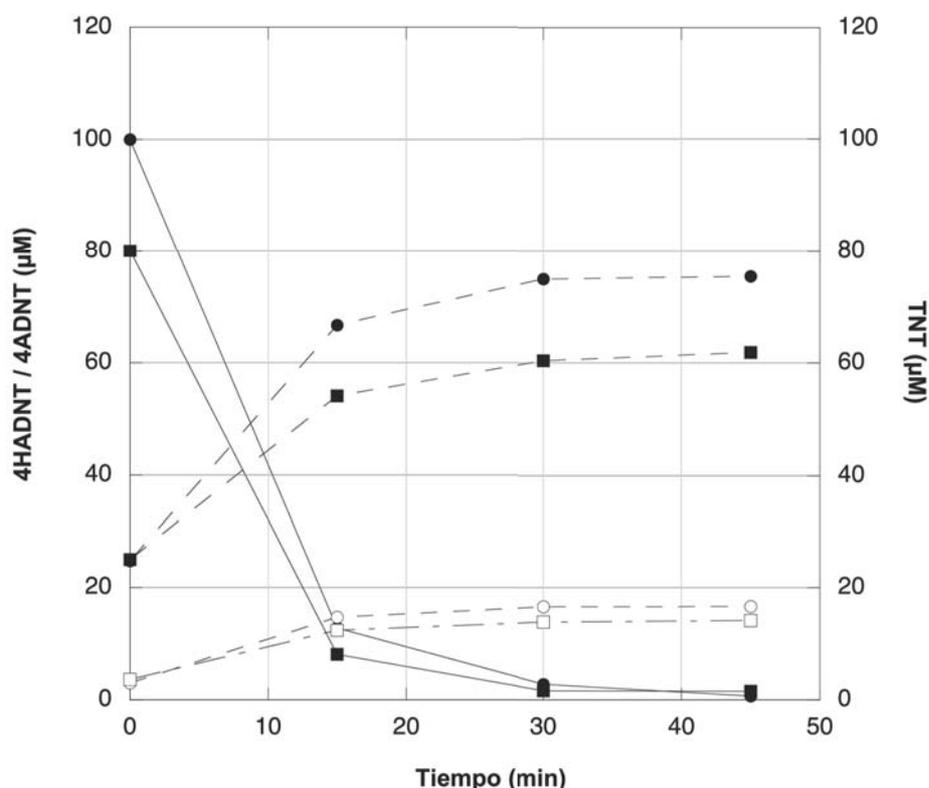


Fig. 5.5. Cinética de producción de compuestos reducidos medida en extractos citoplasmáticos de las cepas JLR11 y JLR34. En líneas continuas se representa el consumo de TNT, mientras que en líneas discontinuas se observa la producción de 4-HADNT (símbolos cerrados) y de 4-ADNT (símbolos abiertos). En círculos se representa JLR11, mientras que JLR34 se representa por cuadrados.

4. Construcción de la cepa mutante doble *nasB-pnrA*.

Los resultados mostrados en la sección anterior indicaban una participación directa de la nitroreductasa PnrA en la asimilación del TNT. Sin embargo, para ver si la ruta de asimilación en la que PnrA participaba era distinta a la de producción de nitrito se decidió hacer el mutante doble *nasB-pnrA*. Para ello se decidió utilizar la cepa JLR34 como fondo, y utilizar la construcción y estrategia

descrita en la sección 3 del *Capítulo I*, volviendo a mutar el gen *nasB*. La razón de ello fue que el mutante Mut. 81 (*nasB*) obtenido con el plásmido pAC.1 posee todo el plásmido insertado dentro del cromosoma. La utilización de un segundo plásmido podría provocar una recombinación homóloga de las secuencias repetidas en ambos vectores, entorpeciendo con ello la integración por homología con el gen *pmrA*. El mutante JLR34 tras la doble recombinación no posee restos del plásmido, y por tanto se puede volver a utilizar esta cepa para la integración de nuevos vectores en otros genes, como el caso de *nasB*.

El vector pAC.1 se transfirió a la cepa JLR34 por conjugación tripartita y se seleccionaron clones resistentes a gentamicina (40 \times g/ml) y telurito (20 \times g/ml) en medio mínimo M9 con benzoato 10 mM. Se seleccionó así un clon al que se denominó JLR5, que fue incapaz de crecer en medio mínimo con nitrito 2 mM como fuente de nitrógeno en medio sólido y el cual se comprobó que era mutante en el gen *nasB* por Southern blot (ver Fig. 5.2.).

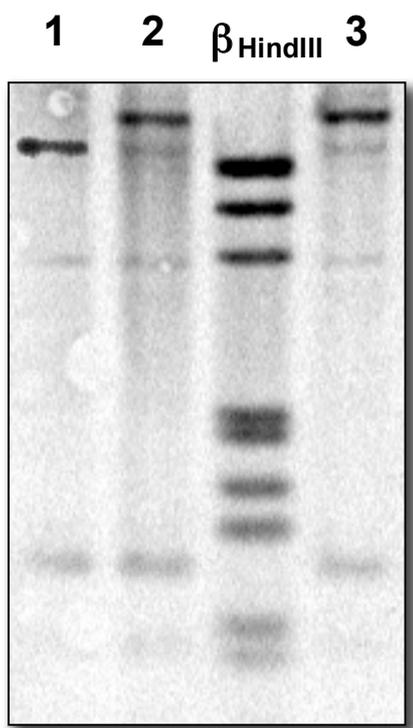


Fig. 5.6. Southern blot hibridado con sonda específica del gen *nasB* obtenida por amplificación por PCR con los cebadores *nas53* (5'- aagaattcctcgtggaacggcagcg - 3') y *nas33* (5'- aagtaccacactgtcctgcacgcc - 3'). Las calles mostradas son: **1**, cromosoma digerido con el enzima *EcoRV*; **2**, cromosoma de la cepa Mut 81 digerido con el enzima *EcoRV* utilizada como control positivo; **3**, cromosoma de la cepa JLR5 digerido con el enzima *EcoRV*. El marcador es del dig- $\beta_{HindIII}$ cuyas bandas observadas son , de mayor a menor en pares de bases: 5418; 4973; 4268; 3530; 2027; 1904; 1584; 1375; 947; 831.

5. Crecimiento en medio líquido de las cepas mutantes.

En la caracterización de la cepa JLR5 en primer lugar se decidió comprobar que la cepa *pnrA::nasB* estaba afectada en la asimilación de nitrito. Además se incluyó el mutante JLR34 en el experimento para comprobar que el mutante *pnrA* reducía el nitrito a amonio. Para ello se cultivaron los mutantes en medio líquido con nitrito 2 mM como única fuente de nitrógeno y glucosa al 0,5 % (p/v). Los resultados se muestran en la Figura 5.7., observándose una clara incapacidad del mutante doble para crecer en nitrito, mientras que la cepa JLR34 se comportaba como el silvestre en este medio.

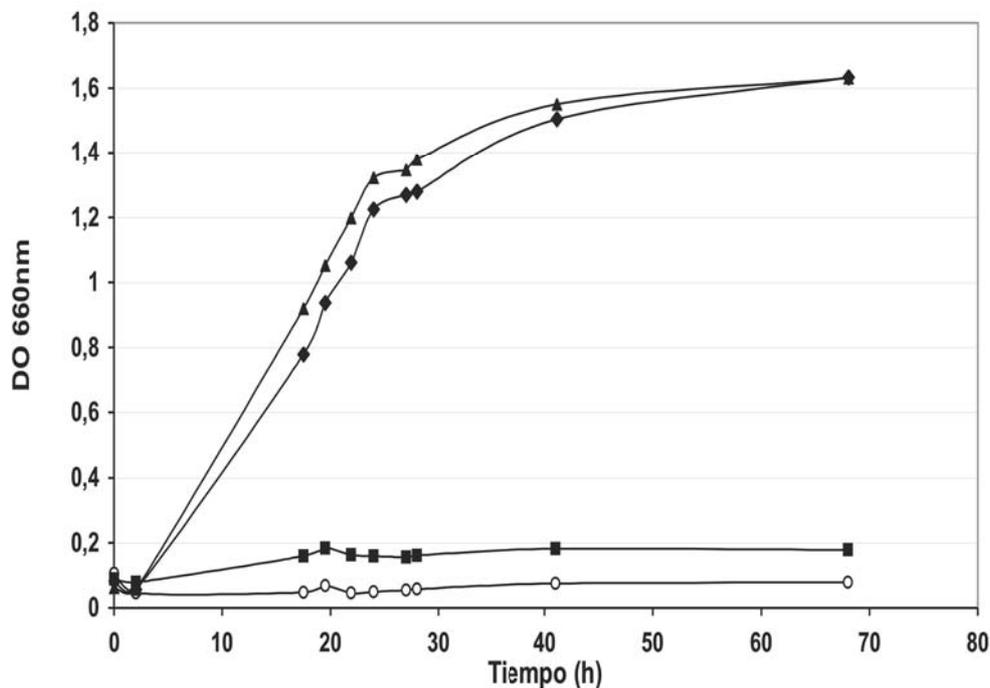


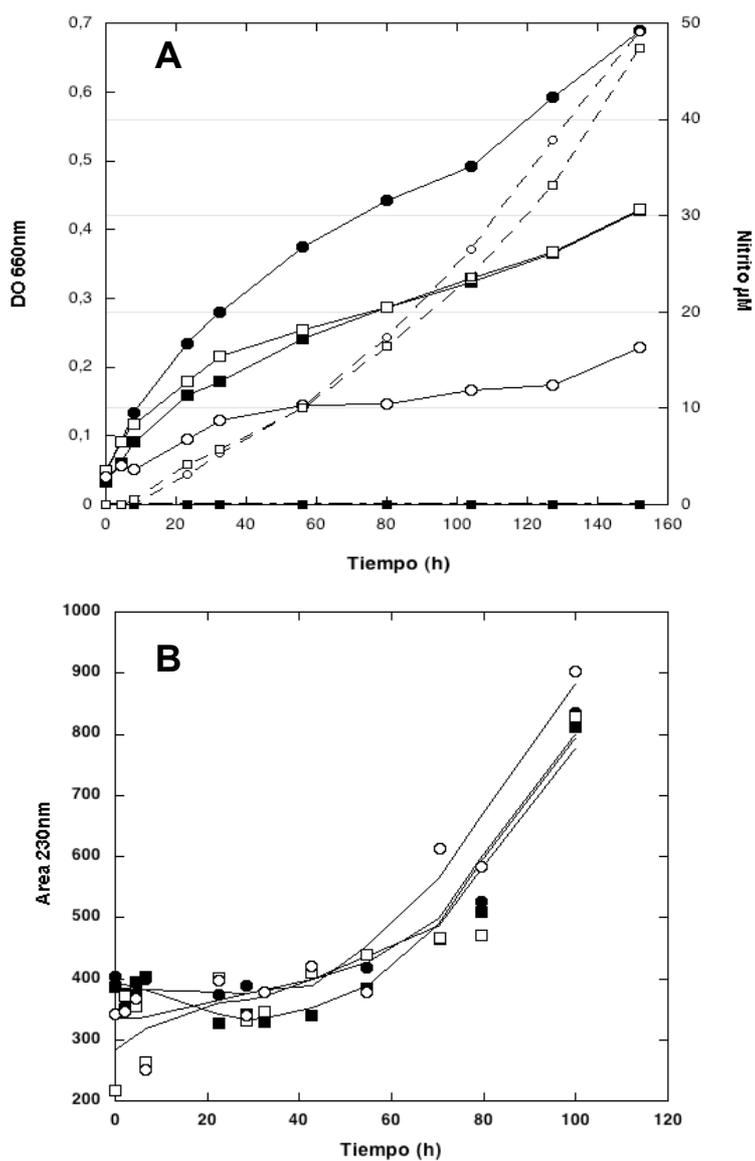
Fig. 5.7. Crecimiento de las cepas mutantes en medio líquido con nitrito 2 mM como única fuente de nitrógeno y glucosa 0,5 % (p/v). Se incluyó como control la cepa Mut 81 (*nasB*): Silvestre, rombos cerrados; JLR34, triángulos cerrados; JLR5, cuadrados cerrados; Mut 81, círculos abiertos.

Los mutantes en *pnrA* se crecieron además en medio líquido M8 con TNT como única fuente de nitrógeno y glucosa en condiciones aerobias tal y como se describió en la sección 3 para el mutante JLR34. Se incluyó además en los ensayos la cepa Mut 81 como control de crecimiento. Se analizó también la acumulación de nitrito en el medio y la producción de compuestos aromáticos reducidos derivados del TNT. Los resultados de los ensayos se muestran en la Fig. 5.8.

En el panel A de la Fig. 5.8. se observa que el crecimiento de la cepa JLR34 (*pnrA*) es similar al de la cepa Mut 81 (*nasB*). El nitrito producido se acumula de igual manera en las cepas Mut 81 y JLR5 (*pnrA-nasB*), en las cuales el paso para la reducción del nitrito está bloqueado, esto indica claramente que una mutación en el gen *pnrA* no está afectando a la denitración del TNT en forma de nitrito. Esto no sucede en la cepa silvestre ni en la JLR34 donde el nitrito no se detectó a lo largo de la curva. En el caso del doble mutante JLR5, el efecto en cuanto al crecimiento es más drástico, siendo incapaz de utilizar el TNT como fuente de

nitrógeno. Esto confirma la hipótesis de la existencia de dos rutas distintas independientes y sinérgicas para la asimilación del TNT en JLR11.

La producción de 4-ADNT se muestra en el panel B de la Figura 5.8. El resultado concuerda con el de la Fig. 5.4. En la cual la acumulación de 4-ADNT es similar a la del silvestre, también en la cepa JLR5.



Fig, 5.8. (página anterior) Curvas de crecimiento en medio mínimo con TNT como única fuente de nitrógeno y glucosa 0,5 % (p/v). En el panel **A** se muestra el crecimiento en turbidez a 660 nm (líneas continuas) además de la acumulación de nitrito (líneas discontinuas). En el panel **B** se muestra la acumulación de 4-A-2,6-DNT medido por HPLC y expresado en Área (mUA/s) a 230 nm. Silvestre, círculos cerrados; Mut 81, cuadrados abiertos; JLR34, cuadrados cerrados; JLR5, círculos abiertos.

Discusión

La estabilidad y carácter recalcitrante de la molécula del explosivo TNT se debe, sobre todo, a la particular disposición y cantidad de grupos nitro que posee como sustituyentes del anillo aromático. La electronegatividad de estos grupos impide el ataque por oxigenasas, y favorece a su vez la reducción de estos grupos a derivados hidroxilamino o amino. Durante los últimos 20 años se han realizado numerosas investigaciones sobre el metabolismo del TNT en microorganismos, de los que se pueden sacar dos conclusiones importantes: 1) la cantidad de compuestos derivados que se han aislado y/o caracterizados tras exponer el TNT a distintos sistemas biológicos indican una enorme variabilidad de posibilidades en cuanto a reacciones potenciales a llevar a cabo sobre la molécula de TNT y, 2) toda reacción catalítica clave para degradar el TNT hacia compuestos mineralizables pasa por un ataque, de una manera u otra, de los grupos nitro de forma que acaben liberándose del anillo aromático.

Se conocen cada vez más sistemas, tanto bacterianos (Esteve-Núñez y Ramos, 1998; Kim, *et al.*, 2002; Kim y Song, 2003; Martín, *et al.*, 1997; Popesku, *et al.*, 2004; Robertson y Jjemba, 2005; Tharakan y Gordon, 1999) como fúngicos (Fritsche, *et al.*, 2000; Jain, *et al.*, 2004; Kim y Song, 2000; Zaripov, *et al.*, 2002) capaces de denitrar el TNT, aunque todos ellos parecen presentar puntos sin resolver en cuanto a la manera en que se producen estas eliminación de los grupos nitro, o en cuanto a los productos surgidos de estas reacciones de denitración. *Pseudomonas putida* JLR11 es capaz de crecer, tanto bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas utilizando el explosivo TNT como única fuente de nitrógeno. La asimilación hasta material celular del 85 % del nitrógeno del TNT indican una gran capacidad de metabolizar estos grupos nitro en esta cepa. Resultados preliminares mostraban la presencia transitoria de nitrito en sobrenadantes de cultivos de JLR11 en TNT, lo que parecía indicar una utilización de los grupos nitro en forma de nitrito. La confirmación de esta hipótesis requería un estudio en mayor profundidad del metabolismo del nitrógeno del TNT en esta cepa, lo cual, en primer lugar ayudaría a entender qué funciones metabólicas están implicadas en la degradación del TNT en JLR11, y en segundo, colaboraría en el conocimiento general del metabolismo del TNT en bacterias, abriendo con ello posibilidades de investigación en otras cepas.

1. Metabolismo del nitrito del TNT.

Pseudomonas putida JLR11 presenta un crecimiento prácticamente de tipo lineal cuando utiliza TNT como fuente de N, y éste ocurre a una velocidad relativamente lenta, con un tiempo de duplicación de unas 15 horas. Un estudio previo mostró que cultivos de JLR11 en TNT acumulaban transitoriamente nitrito en los sobrenadantes (Esteve-Núñez y Ramos, 1998). Además, los datos mostrados por estos autores (Esteve-Núñez, 2000a), y corroborados en esta Tesis Doctoral indicaban una inducción de la actividad nitrito reductasa bajo estas condiciones de crecimiento. La confirmación de estos resultados requería de la comprobación del papel de la nitrito reductasa asimilatoria de JLR11 en el metabolismo del TNT. Por ello se decidió construir un mutante nulo en el gen que codifica para la nitrito reductasa asimilatoria, *nasB*.

En el capítulo I de *Resultados* se describió la construcción de este mutante que, aunque acumulaba nitrito en el medio de cultivo con TNT, era aún capaz de crecer bajo estas condiciones. Sin embargo su crecimiento fue más lento que el de la cepa silvestre siendo de alrededor de 30 horas el tiempo de duplicación del cultivo en comparación a las 15 horas del silvestre. Este mutante además no mostró actividad nitrito reductasa, y en geles nativos la cepa silvestre crecida en TNT sólo apareció una banda, la cual desapareció en el mutante *nasB*, lo que sugiere que en JLR11 no existe otra proteína con capacidad de reducir nitrito. Este resultado sugiere que JLR11 es capaz de metabolizar el TNT de dos maneras. Por un lado mediante una denitración del TNT que produce nitrito, y por otro, además de la actividad denitrasa de JLR11, esta cepa posee otro mecanismo de asimilación del nitrógeno derivado del TNT, y que dicho nitrógeno debe asimilarse por una vía distinta a la de reducción de nitrito.

Un de las líneas de investigación en nuestro grupo de investigación es el de elucidar los mecanismos por los cuales *P. putida* JLR11 es capaz de liberar nitrito del TNT. Los resultados del Dr. van Dillewijn y colaboradores demuestran la presencia de más de un enzima que cataliza la formación de complejos de Meisenheimer a partir de TNT y la liberación de nitrito como derivado de esta reacción (sin publicar).

Por otra parte, un mecanismo potencial es la reducción parcial del TNT a hidroxilamino y la subsiguiente liberación de amonio mediante mecanismos de reagrupamientos del tipo Bamberger (ver sección 5 de esta *Discusión*). La reducción hasta hidroxilamino depende de enzimas nitroreductasas que se discutirán más adelante en la sección 4 de esta *Discusión*. La utilización del nitrógeno del TNT mediante la formación de amonio a partir de hidroxilaminodinitrotolueno se ha propuesto con anterioridad por Vorbeck y colaboradores (1998) como vía alternativa a la de liberación de nitrito en cepas aisladas de zonas contaminadas con TNT capaces de crecer a expensas del nitrógeno del TNT.

A su vez, una mutagénesis al azar del cromosoma de JLR11 mediante minitransposones en busca de clones incapaces de utilizar nitrito como fuente de nitrógeno dio como resultado el aislamiento de mutantes interesantes a la hora de explicar la ruta de asimilación de los grupos nitro del TNT. Así, se pueden dividir en dos grupos los mutantes obtenidos, uno de ellos en la glutamato sintasa, también conocida como glutamina (amida): β -cetoglutarato (NADP⁺) amidotransferasa oxidoreductasa (GOGAT), y el segundo, en genes que codifican reguladores que controlan el metabolismo del nitrógeno en diversos puntos.

2. Mutantes GOGAT de *P. putida* JLR11.

La ruta glutamina sintasa/glutamato sintasa se utiliza por gran parte de los microorganismos como vía por la que se dirige la mayoría de las fuentes de nitrógeno, incluyendo nitrito y nitrato, además de cuando la bacteria crece en bajas concentraciones de amonio (Merrick y Edwards, 1995; Reitzer, 1996a, 1996b) y partir de la cual se sintetizan los compuestos nitrogenados celulares. En *E. coli* se calcula que el 85% del nitrógeno celular parte del glutamato como compuesto donador, mientras que el restante 15% lo hace a partir de la glutamina (Reitzer, 1996a). Los resultados obtenidos con los mutantes en los genes *gltB* y *gltD* indican que esta parece ser también la ruta en *P. putida* JLR11, lo cual también se apoya en previos resultados realizados con distintas cepas de *P. putida* (Eberl, *et al.*, 2000; Sonawane y Rohm, 2004). Aunque la ruta principal de asimilación del amonio en bacterias es la GS/GOGAT, este fenómeno puede darse por dos vías distintas (Reitzer, 1996a) (ver Fig. 6.1.). Por un lado, mediante la asimilación por la

glutamato deshidrogenada (GDH), en la que el amonio forma directamente glutamato a partir de 2-oxoglutarato. Esta ruta sólo se puede utilizar en concentraciones de amonio altas, ya que la K_m para el amonio de la GDH es de alrededor de 1 mM (Veronese, *et al.*, 1975). Por otra parte, la glutamina sintasa (GS) presenta mayor afinidad por el amonio, generando glutamina a partir de éste y glutamato. Esta reacción requiere ATP, por lo que energéticamente es más costosa que la primera (Helling, 1994, 1998). La glutamina, tras una transaminación con el 2-oxoglutarato forma dos moléculas de glutamato mediante el enzima glutamato sintasa (GOGAT).

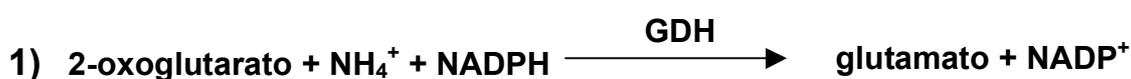


Fig. 6.1. Esquema de las dos rutas posibles de asimilación del amonio descritas en bacteria. **1.** La vía de la GDH (glutamato deshidrogenasa) utiliza NADPH como poder reductor para sintetizar glutamato. En la vía de la GS/GOGAT (Glutamina sintasa/glutamato sintasa) **2.** se requiere ATP para sintetizar glutamina a partir de glutamato y amonio. **3.** Esta glutamina sufre una transaminación con el 2-oxoglutarato para generar dos moléculas de glutamato con el consumo de NADPH.

La ruta GS/GOGAT parece ser la responsable de la asimilación del nitrógeno del TNT en JLR11, puesto que los mutantes en los genes que codifican la glutamato sintasa son incapaces de utilizar el TNT como fuente de nitrógeno. El TNT, como otros nitroaromáticos presentan una baja solubilidad en medios acuosos ($500 \times M$ para el TNT), por lo tanto, la accesibilidad en la que se encuentra el nitrógeno del TNT en un cultivo de JLR11 está siempre limitada. Esto explicaría el crecimiento lento y lineal de la cepa en este medio; incluso, en fotografías de microscopía electrónica de transmisión de la cepa JLR11 reveló que células crecidas en TNT presentan una alta concentración de gránulos de poli- β -hidroxi alcanosatos, lo que parece deberse a un crecimiento en condiciones en las que el radio entre el nitrógeno y el carbono está desbalanceado (Esteve-Núñez, 2000a). Además, las curvas de crecimiento con glucosa al 0,5% (p/v) como fuente de carbono mostraron que los mutantes GOGAT fueron incapaces de crecer en

concentraciones por debajo de 1 mM de amonio, mientras que a 5 mM estos mismos mutantes sí crecieron. Este dato indica que JLR11 posee ambas rutas de síntesis de glutamato a partir de amonio, y que en condiciones de alta concentración de amonio, la GDH puede asumir la responsabilidad de su asimilación. La GDH se identificó en *Pseudomonas aeruginosa* con anterioridad (Janssen, *et al.*, 1980) pero en *P. putida* la única confirmación hasta ahora era el posible gen que codifica la GDH que se identificó como la pauta abierta de lectura, PP2080, en la secuencia del genoma de *P. putida* KT2440 (Nelson, *et al.*, 2000).

En *E. coli*, está descrito que un mutante GOGAT, a altas concentraciones de amonio y energía no presenta defectos en el crecimiento (Helling, 1998). Sin embargo, en estas concentraciones de amonio, el crecimiento del mutante GOGAT de JLR11 fue menor que el de la cepa silvestre. Ya que la GDH está suministrando las cantidades necesarias de glutamato a la célula para promover el crecimiento, la proteína GOGAT debe estar interviniendo de algún modo en la regulación de otros procesos metabólicos. Además, la notable coloración que adquieren los cultivos de los mutantes GOGAT de JLR11 crecidos en 5 mM de amonio claramente parece estar indicando la acumulación de ciertos metabolitos que en condiciones normales no lo hacen. Esto confirma que en JLR11, un mutante GOGAT presenta un fenotipo complejo, tal y como se ha descrito anteriormente en otros sistemas (Pahel, *et al.*, 1978).

Como se ha comentado más arriba, la GOGAT juega un papel no solo de la asimilación del amonio, sino también en dirigir otras funciones relacionadas con metabolismo del nitrógeno, como en la síntesis o degradación de aminoácidos, mediante el control de las reservas de glutamato de glutamina celulares (Brenchley, *et al.*, 1973; Ernsting, *et al.*, 1993). Las diferencias entre el silvestre y mutante en cuanto a la utilización de ciertas fuentes de nitrógeno pueden explicarse así por el efecto pleiotrópico que presenta un mutante GOGAT debido al papel central que ocupa la síntesis de glutamato en el metabolismo del nitrógeno celular (Pahel, *et al.*, 1978). La necesidad del glutamato se extiende, por ejemplo, hacia la posibilidad de utilizar o no un determinado aminoácido como fuente de nitrógeno (Sonawane, *et al.*, 2003; Sonawane y Rohm, 2004), de manera que sólo utilizará

aquellos a partir de los cuales se pueda sintetizar glutamato (Reitzer, *et al.*, 1996a). Así por ejemplo, los mutantes *gltB*⁻ y *gltD*⁻ son capaces de crecer en glutamina, pero no en alanina o arginina.

Por otro lado, se sabe que la enzima GOGAT interviene de un modo que parece indirecto en la respuesta NTR (esta respuesta depende de NtrC y se explicará en la sección 3 de esta *Discusión*), de forma que un mutante en la GOGAT es incapaz de activar esta respuesta, y por tanto, toda fuente de nitrógeno cuyo metabolismo dependa de la activación por NtrC estará reprimida (Tyler, 1978), lo cual podría explicar porqué un mutante GOGAT en JLR11 utiliza mal el glutamato o la lisina, por una falta de inducción de los sistemas de transporte de estos aminoácidos los cuales podrían ser dependientes de la activación por NTR.

Existen ciertos puntos en común entre lo estudiado en Enterobacterias y *P. putida*. Por ejemplo, en esta Tesis Doctoral se observó que el mutante GOGAT no es capaz de consumir el nitrito en ensayos de resting cell, además de que no se detectó actividad nitrito reductasa, lo cual coincide con lo descrito por Eberl y colaboradores (2000), quienes observaron una inactivación de la expresión del gen de la nitrato reductasa en *P. putida* KT2442 en un fondo *gltB*⁻. Esto parece indicar que un sistema homólogo al NTR de *Enterobacteraceas* en *P. putida*, en el que estaría implicado el regulador NtrC, es también incapaz de inducirse. Es de esperar sin embargo, que existan diferencias en cuanto a la expresión de la GOGAT en ambos sistemas, o que varíe el efecto que pueda ejercer esta mutación sobre el metabolismo del nitrógeno. Así por ejemplo, dos de los reguladores descritos en *Enterobacteraceas* que activan la transcripción del operón que codifica la GOGAT, la proteína NAC, (Goss, *et al.*, 2001), y la proteína reguladora dependiente de leucina, Ltr (Ernsting, *et al.*, 1993), no se han identificado en *Pseudomonas putida*.

NAC es un activador transcripcional perteneciente a la familia LysR, y que se activa por NtrC y sigma 54. Su misión es la de promover la respuesta NTR en operones cuya regulación sea dependiente de sigma 70 (Malacuso, *et al.*, 1990; Pomposiello y Bender, 1995). Se sabe así, que en condiciones de baja concentración de nitrógeno, *E. coli* activa hasta 23 operones, de los cuales 14 se activan directamente por NtrC, y 9 a través de la proteína NAC (Gyaneshwar, *et*

al., 2005). Ltr controla la expresión de un numeroso grupo de genes, tanto activándolos o reprimiéndolos, en presencia de leucina (Ernsting, *et al.*, 1992). Aunque el sistema Ltr sí podría existir en *P. putida*, puesto que existe una posible proteína (PP5271) con alta identidad de secuencia de aminoácidos con la de *E. coli* (57,3%), no se ha identificado sin embargo, en su genoma una posible proteína cuya secuencia pueda corresponder a la proteína NAC.

Existen varias propuestas para explicar porqué un mutante GOGAT es incapaz de activar el sistema NTR aún en condiciones de “hambre de nitrógeno”. La acumulación de altas concentraciones de glutamina, que es la señal que controla la represión de NtrC a partir de P_{II}, y NtrB (ver siguiente sección de *Discusión*), podría reprimir la respuesta. Sin embargo, existe una posible contradicción, ya que, según esta hipótesis, la bacteria poseería bastante glutamina como para reprimir la respuesta NTR, pero no como para permitir el crecimiento. En *E. coli* se propuso al tercer gen del operón *gltBDF*, como un posible regulador necesario para activar la respuesta NTR que podría verse afectado por mutaciones polares (Castano, *et al.*, 1992). Sin embargo, varios trabajos posteriores han descartado esta posibilidad (Goss, *et al.*, 2001; Grassl, *et al.*, 1999), lo cual se ve apoyado por la ausencia de homología con *gltF* en búsquedas realizadas sobre el genoma de *P. putida*. Goss y colaboradores proponen a su vez que el efecto se debe no al exceso de glutamina, sino a una falta de glutamato intracelular. Los autores sostienen que, debido a la baja actividad de las enzimas glutaminasas, la concentración de glutamato se vería reducida por la actividad glutamina sintasa. Recientemente, Sonawane y colaboradores (2004) han observado la falta de expresión de la glutaminasa/asparraginasa periplásmica (PGA) de una cepa *gltB* de *P. putida* KT2440, la cual está encargada de la deaminación de la glutamina y asparragina hacia los respectivos dicarboxilatos. Esto podría apoyar la hipótesis de la acumulación de glutamina por falta de enzimas responsables de su transformación a glutamato, lo cual podría reprimir la respuesta NTR. Sin embargo, los mismos autores han observado altas acumulaciones de glutamato intracelulares, lo que parece contradecir la hipótesis de Goss y colaboradores.

Un efecto no descrito anteriormente es la acumulación de amonio en ensayos de resting cell en el mutante GOGAT. Esta acumulación de amonio

parece indicar la degradación de compuestos nitrogenados de los cuales no hay posibilidad de recuperar el amonio por la falta del enzima encargado de ello. Esta pérdida de nitrógeno celular en forma de amonio, que por un lado podría explicar el porqué un mutante GOGAT presenta poca viabilidad en medios donde no posea una fuente de nitrógeno utilizable (Eberl, *et al.*, 2001), resultó un inconveniente a la hora de poder determinar una posible acumulación de amonio proveniente del TNT en los mutantes GOGAT. Esta respuesta se parece a la observada en esta Tesis Doctoral en un ensayo en donde una suspensión celular de la cepa silvestre en ausencia de una fuente de nitrógeno, se produce una gran acumulación de amonio en el medio que sólo puede provenir del mismo material celular degradado, y que no se consume probablemente por la falta de energía necesaria para la asimilación de este amonio. Vorbeck y colaboradores (1998), que propusieron también la salida de amonio desde el TNT, no determinaron el posible amonio proveniente del TNT porque encontraron el mismo fenómeno en dos cepas celulares distintas.

3. Mutantes en sistemas de regulación.

En contraste con los genes de la GOGAT, los mutantes en los tres genes reguladores presenta un cierto crecimiento en TNT. Uno de los mutantes está afectado en el gen *ntrC* que codifica el activador transcripcional NtrC. Esta proteína actúa en asociación con la proteína sensora histidín quinasa, NtrB, como el regulador principal del metabolismo de nitrógeno en numerosos sistemas bacterianos (He, *et al.*, 1997; Labes, *et al.*, 1993; Masepohl, *et al.*, 2001; Studholme y Dixon, 2003), aunque aún no se habían descrito mutantes en este sistema en *Pseudomonadaceas*. La respuesta mediada por NtrC se denomina NTR (del inglés Nitrogen Response), y según tal y como se ha descrito en otros microorganismos, la inducción de numerosos operones implicados en la utilización de numerosas fuentes de nitrógeno alternativas al amonio, tanto inorgánicas, como el nitrito o nitrato u orgánicas, como la histidina, están bajo el control de este sistema NTR (Magasanik, 1996; Merrick y Edwards, 1995; Zimmer, *et al.*, 2000). Aunque el mecanismo de regulación ejercido por NtrB/NtrC en *Pseudomonas* sp. no se ha descrito, el descrito en *Enterobacteraceas* está muy conservado entre distintas

familias de bacterias. Además, una búsqueda biocomputacional en el genoma de *P. putida* KT2440 (Nelson, *et al.*, 2002) de los genes implicados en el sistema de regulación confirmó la presencia de éstos (ver Fig. 6.2.); el gen *glnK* (PP5234), que codifica la proteína P_{II}, conserva los residuos leucina en la posición 3 y treonina en la posición 5 de la secuencia aminoacídica que definen a las proteínas homólogas codificadas por *glnK*, además de la tirosina en posición 51 que se sabe es el sitio de uridilación de la proteína (Arcondeguy, *et al.*, 2001); el gen *glnD* (PP1589), que codifica la Uridilil transferasa (UTasa/UR), conserva el motivo nucleotidil transferasa (AVGGYGRXXLPXSDIDLL) presente en el centro activo de estas proteínas (Holm y Sander, 1995); así como la Adenil Transferasa (ATasa), codificada por el gen *glnE* (PP0340).

En general, el amonio es la fuente de nitrógeno preferida por los seres vivos, ya que puede asimilarse directamente como glutamato o glutamina con el menor gasto energético, hecho claro cuando se observa que en medio mínimo el mayor crecimiento se obtiene utilizando amonio como fuente de nitrógeno. En ambientes ricos en amonio la bacteria mantendrá reprimidos numerosos operones encargados de metabolizar fuentes de nitrógeno alternativas. La proteína P_{II} es la responsable de traducir las condiciones ambientales de nitrógeno en una repuesta de encendido o apagado de numerosos operones mediante los dos posibles modificaciones de esta proteína: unida de manera covalente a uridil monofosfato (UMP) o no, de manera que el estado de uridilación de la proteína refleja el *status* del nitrógeno intracelular. La proteína Uridil transferasa (UTasa/UR) actúa en ambos sentidos, siendo la responsable de la uridilación y desuridilación de P_{II}. Aunque P_{II} puede interactuar con tres proteínas distintas, GS, NtrB y UTasa, la interacción entre ellas dependerá del estado energético celular y de la disposición de nitrógeno y carbono. Todo ello está indicado por tres moléculas, la glutamina, el 2-oxoglutarato y el ATP. El ratio entre glutamina y 2-oxoglutarato en la célula sube en condiciones de medio rico en nitrógeno y cae en condiciones de falta de éste. Sin embargo, se sabe que, mientras para la uridilación de la P_{II} requiere 2-oxoglutarato y ATP, esta reacción se inhibe por la glutamina. La desuridilación requiere también 2-oxoglutarato y ATP, pero se estimula por la glutamina (Kamberov, *et al.*, 1994). Es por tanto la glutamina, y no el ratio entre glutamina y

2-oxoglutarato, lo que controla el sentido en que la UTasa/UR actuará sobre P_{II} (Jiang, *et al.*, 1998).

En condiciones de falta de nitrógeno (baja concentración de glutamina), la UTasa uridilará P_{II}. Bajo este estado, la proteína NtrB no interacciona con P_{II}, y ello permitirá que lleva a cabo su actividad quinasa sobre NtrC. La fosforilación de NtrC estimulará su unión a promotores dependientes de sigma 54, actuando como activador de la transcripción (Kustu, *et al.*, 1989). Por otro lado, P_{II}^{UMP} estimula al enzima adenililtransferasa (ATasa) que elimina un grupo AMP de la GS. El enzima GS desadenilado posee mucha más afinidad sobre el amonio, sirviendo así como sistema de captación rápida de cualquier incremento de la concentración de amonio que se pueda producir.

En caso de que la célula se encuentre en condiciones ricas en amonio, la glutamina estimulará la actividad desuridilasa de la UTasa/UR sobre P_{II}. En estas condiciones, la proteína P_{II} es capaz de unirse físicamente a NtrB, y ello estimulará la actividad fosfatada de esta última sobre NtrC, y con ello la inactivación de la respuesta NTR. A su vez, la adenilil transferasa actuará adenilidando a la GS, lo cual la inactivará parcialmente bajando así su afinidad sobre el amonio (Kustu, *et al.*, 1984).

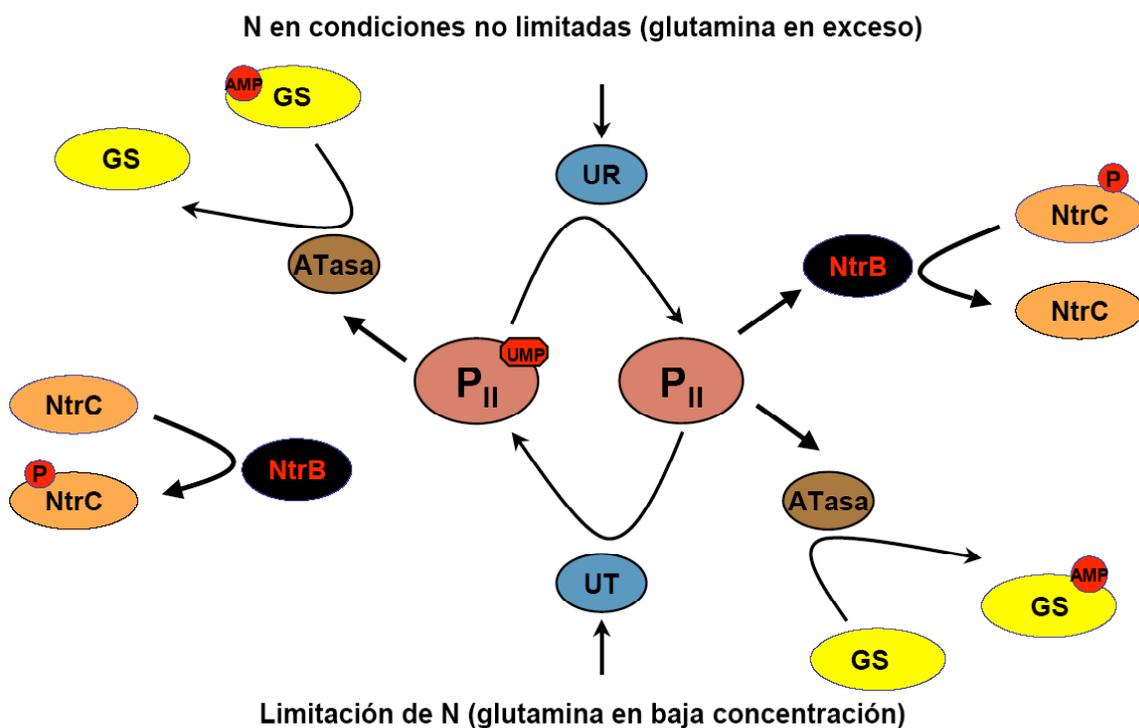


Fig. 6.2. (página anterior) Gráfico donde se propone el sistema de regulación mediado por la respuesta NTR.

El mutante NtrC está implicado en la regulación de la expresión de la nitrato reductasa en *P. putida* JLR11, ya que se obtuvo como resultado de la selección de un clon incapaz de activar el operón de los genes de la nitrato y nitrato reductasa (*nasABC*). Además, este mutante en medio con TNT como fuente de nitrógeno, presentó un crecimiento similar al mutante en *nasB*, lo cual sugiere que es incapaz de utilizar el nitrato del TNT. Estos datos se ven apoyados por los ensayos de resting cell en los que el mutante fue incapaz de asimilar el nitrato del medio.

Otro de los mutantes aislados fue en un gen que por identidad con las bases de datos se identificó como *nasT*. La proteína codificada por *nasT* se ha propuesto en *Azotobacter vinelandii* como necesaria para la inducción del operón de la nitrato/nitrato reductasa de esta cepa (Gutierrez, *et al.*, 1995) cuando el nitrato o nitrato están presentes en el medio. En contraste con el mutante en NtrC, la cepa *nasT* no exhibe limitaciones en cuanto al uso de otras fuentes de nitrógeno como la histidina u otros aminoácidos. Sin embargo, al igual que el mutante NtrC, el mutante en *NasT* creció en menor medida que el silvestre en medio con TNT, y fue incapaz de consumir el nitrato en ensayos de resting cell.

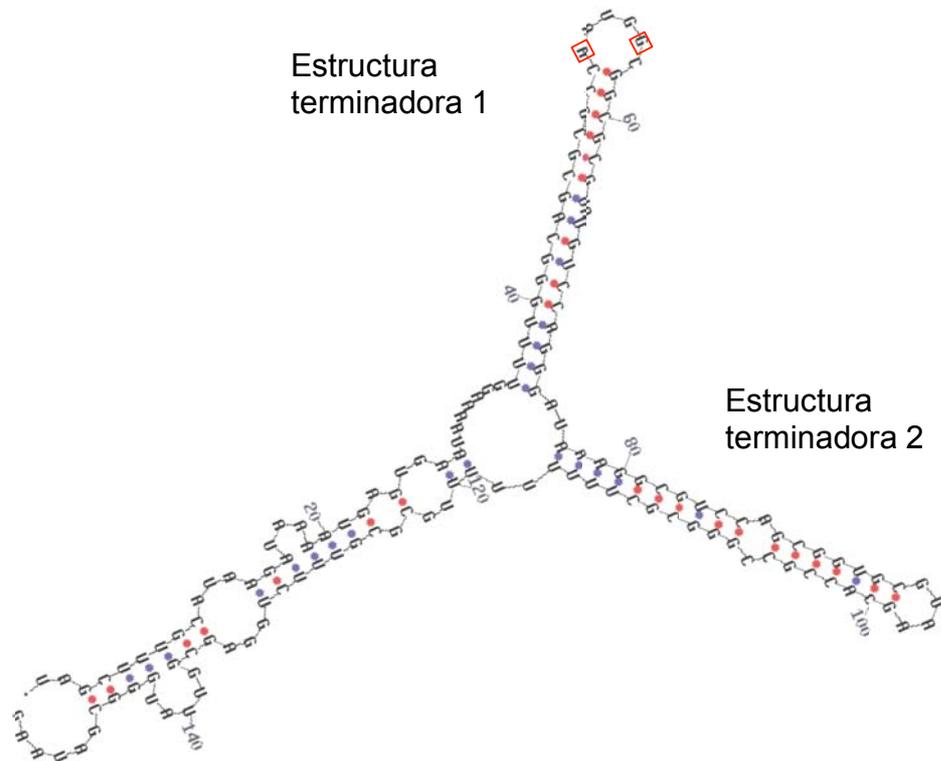
Se puede concluir por tanto que el sistema de inducción del operón *nas* requiere dos circunstancias; por un lado debe de existir limitación en las concentraciones de amonio de manera que NtrC pueda actuar como activador de la transcripción del operón *nas*. En segundo lugar, las proteínas NasS y NasT deben de reconocer la presencia de iones nitrato o nitrato en el medio para permitir la transcripción del operón mediada por NtrC. De esta manera, el sistema debe funcionar como el mediado por la proteína NasR que regula el operón *nasFEDCBA* en *Klebsiella pneumoniae* M5al (Chai y Stewart, 1998, 1999; Lin, *et al.*, 1994; Lin y Stewart, 1998; Stewart, 1994), además del operón de degradación de amoníaco de *P. aeruginosa* codificado regulado por AmiR (Wilson, *et al.*, 1996).

La proteína activadora NasT pertenece a un sistema de dos componentes, NasS y NasT, en el cual, a diferencia de otros sistemas de dos componentes

clásicos, NasT no interacciona con ADN, sino con ARN. En el extremo 5' de la secuencia transcrita de *nasF* de *K. pneumoniae* y de *amiE* de *P. aeruginosa* se han identificado dos estructuras terminadoras independientes de Rho (Chai y Stewart, 1998, 1999; Wilson, *et al.*, 1996). Así, se sabe que NasR interacciona con la primera de ellas, en la cual se ha determinado un bucle de 6 nucleótidos en el que son esenciales la adenina y la guanina colocadas en posición 1 y 4 del bucle (ver Fig. 6.3). Las posibles estructuras terminadoras del extremo 5' del gen *nasA* de *P. putida* se calcularon usando el programa disponible en la red denominado "RNAfold"

(<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/form1.cgi>). Se observó así una conformación del ARN con dos posibles estructuras terminadoras en las que en la primera de ellas se obtiene un bucle de 6 nucleótidos en los que se conservan los esenciales para el reconocimiento de la proteína antiterminadora.

A



B

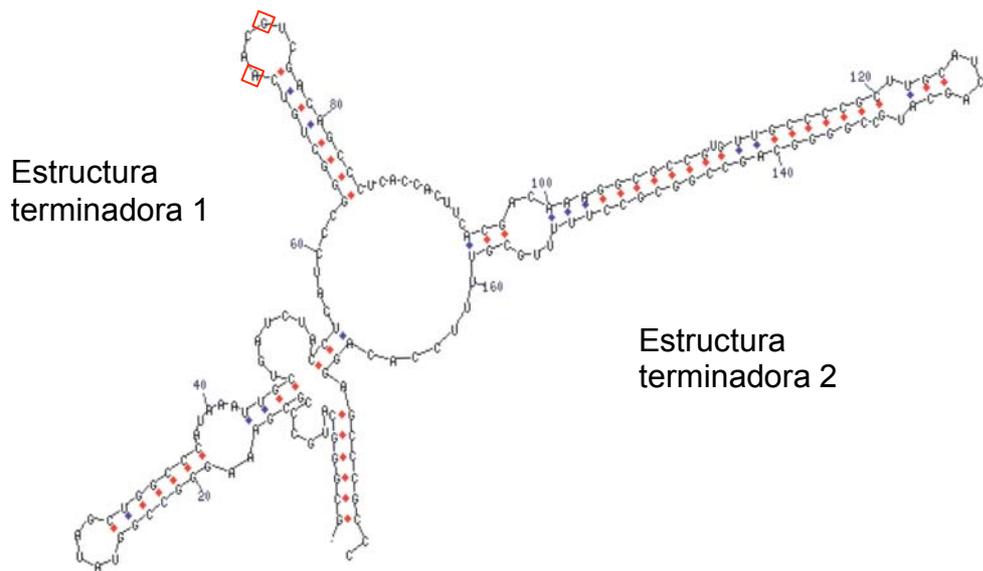


Fig. 6.3. Estructuras terminadoras del ARN mensajero de *nasF* (**A**) y la calculada para *nasA* de *P. putida* JLR11 (**B**). Los nucleótidos identificados como indispensables para la unión de la proteína antiterminadora NasR (**A**) y NasT (**B**) se han marcado en rojo.

facilitando con ello la continuación de la transcripción. Este mecanismo es similar al descrito para AmiR, el cual se controla por la proteína AmiC. En *K. pneumoniae* no se conoce una proteína que actúe como NasS, sin embargo, el tamaño de NasR con respecto al de las proteínas análogas (ver Fig. 6.4), y la falta de homología de su extremo amino con el resto, puede indicar un funcionamiento distinto al de NasS/NasT.

El sistema de dos componentes NasS y NasT se encuentra también en *P. aeruginosa* y en *P. syringae*, (ver Fig 3. X) lo que sugiere que es un mecanismo común de regulación de la asimilación de nitrito y nitrato en *Pseudomonas* sp. Es interesante observar la distribución del operón *nasABC*, el cual en *P. aeruginosa* se distribuye en orden inverso al de *P. putida*, siendo el primer gen del operón el *nasB*. Esto parece ser el resultado de una reordenación cromosómica que en *P. syringae* parece haber sucedido, aunque de manera incompleta, ya que la copia *nasB* colocada junto a *nasA* está truncada, apareciendo otra copia de *nasB* completa junto a *nasC*, que parecen expresarse independientemente de la nitrato reductasa. Existen además dos genes que podrían pertenecer al mismo operón, una proteína quinasa y un transportador de nitrato y que podrían estar bajo el control de NasS/NasT. Ambos se encuentran asociados en los tres organismos, por lo que podría deducirse que ambos participan en una función común, probablemente en el transporte de nitrato/nitrito. En ese caso, en *Pseudomonas* parece haber una tendencia a organizar los genes encargados de metabolizar nitrito o nitrato de manera similar a *Klebsiella pneumoniae*, en donde el regulador se encuentra aguas arriba de todo un operón en que se expresan los transportadores, seguidos de la nitrito reductasa, y finalmente la nitrato reductasa.

La mutación en el gen que codifica para la proteína que se denominó CnmA, representa un nuevo regulador de la familia LysR-like, implicado en el metabolismo del nitrógeno aunque su función concreta no se conoce. Los resultados obtenidos indican una participación concreta en el metabolismo del nitrito, ya que no se observó otro defecto fenotípico en este mutante, aunque su papel en concreto se desconoce. Aunque pertenezca a la misma familia de reguladores, no parece ser un análogo al sistema NAC de *Enterobacteraceas*, puesto

que no actúa como regulador global, sino más bien específico sobre el metabolismo del nitrito.

En resumen, estos resultados parecen indicar la existencia de dos modos de ataques sobre el TNT en JLR11 en donde, por un lado se liberaría nitrito y por otro amonio. En ambos casos, el nitrógeno del TNT se asimila a esqueletos carbonados por la ruta GS/GOGAT. El hecho de que un mutante *nasB* además de los afectados en funciones implicadas en la regulación de la asimilación de nitrito (NasT, CnmA y NtrC) pueden crecer en TNT como fuente de nitrógeno, pero no un mutante GOGAT, así lo indican. Una eliminación de los grupos nitro en forma de amonio indica que un primer paso debe ser la reducción del grupo nitro hasta hidroxilamino como primer paso de la ruta. Es por ello que el siguiente paso fue identificar la posible proteína encargada de llevar a cabo tal función.

4. Análisis comparativo de PnrA con otras nitroreductasas.

La nitroreductasa PnrA de *P. putida* JLR11 es una flavoproteína capaz de reducir TNT hasta 4-hidroxilamino-2,6-dinitrotolueno. Esta enzima muestra gran cantidad de similitudes y diferencias con otras reductasas de nitroaromáticos, lo que parece explicar su especificidad por nitroarenos. PnrA es un homodímero de dos subunidades de 28 KDa. En la literatura se han descrito enzimas nitroreductasas de otros microorganismos en un rango entre 55 y 60 KDa. (Bryant and De Luca, 1991; Bryant *et al.*, 1981; Zenno *et al.*, 1996a; Zenno *et al.*, 1996b). Un análisis filogenético de secuencias determina claramente la existencia de dos subgrupos distintos dentro de la familia (ver Fig. 6.5.) Una comparación de las nitroreductasas descritas deja ver una similitud importante entre dos bloques de esta proteínas. Un primer bloque lo formaría NfsA con FRP y SnrA, mientras que el otro lo constituiría el grupo formado por NfsB, NFN, NTR, RdxA, Frasel. PnrA se encuentra en el subgrupo representado por las proteína NfsA y FRP.

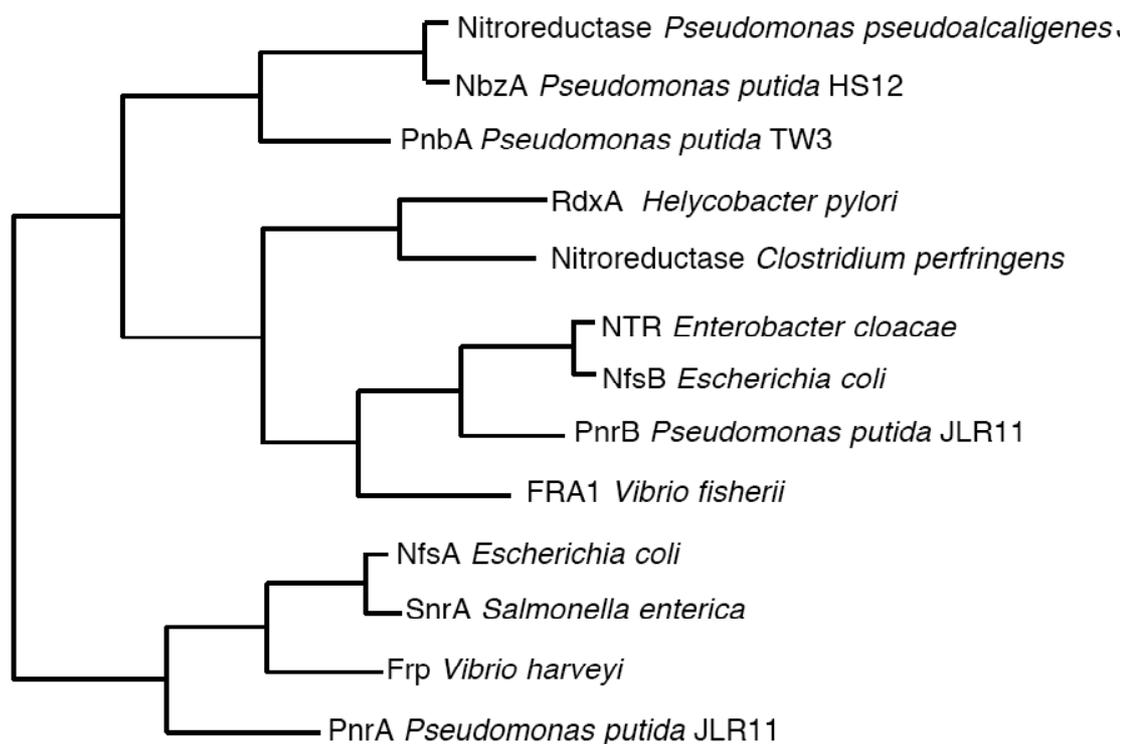


Fig. 6.5. Arbol filogenético de nitroreductasas. Las secuencias usadas son NfsA de *E. coli* (GenBank P17117), FRP de *V. harveyi* (GenBank Q56691), SnrA de *S. enterica* (AAD18027), Ntr de *E. cloacae* (Q01234), NfsB de *E. coli* (D25414), FRA1 de *V. fischerii* (P46072), RdxA de *H. pylori* (AAL55409), Nitroreductasa de *Clostridium perfringens* (NP_561099), NbzA de *P. putida* HS12 (AAK26512), Nitroreductasa de *P. pseudoalcaligenes* JS45 (AAT71308), PnbA de *Pseudomonas putida* TW3 (AAGO1450) y PnrA y PnrB de *P. putida* JLR11.

Para poder entender mejor el funcionamiento y el perfil de sustratos de PnrA se alineó esta proteína con las más similares de la familia, NfsA de *E. coli*, Frp de *V. harveyi* y SnrA de *S. enterica*. (ver Fig. 6.6.). El grado de identidad con estas proteínas de aproximadamente el 20%, mientras que la similitud es de aproximadamente el 36%. El alineamiento revela un número de residuos muy conservados en las cuatro proteínas, lo que concuerda con su actividad común. Se ha resuelto la estructura del cristal de NfsA y Frp, y ambas son proteínas homodiméricas globulares y cada subunidad posee 12 hélices- β y 5 hojas- β (Haynes, *et al.*, 2002; Kobori, *et al.*, 2001; Tanna, *et al.*, 1996) en las que el centro activo se sitúa justo en la hendidura formada entre las dos subunidades de manera que cada una de las subunidades aporta uno de los lados de éste (ver Fig. 6.7.). De su estructura se desprende que los residuos que forman parte del centro activo de estas proteínas son las regiones más conservadas entre las proteínas. Hay tres

dominios de interacción en las nitroreductasas, implicados en el reconocimiento del donador de electrones, del sustrato y del cofactor. Para unión del cofactor FMN, en NfsA se han identificado como necesarios los residuos Arg¹⁵, Ser³⁹, Gln⁶⁷, Tyr¹²⁸, Gly¹³⁰, Gly¹³¹ y Lys¹⁶⁷. El grupo isoaloxazina del FMN forma puentes de hidrógeno con los residuos Arg¹⁵ con la amida de la Gly¹³⁰ y Gly¹³¹ además de la Gln⁶⁷. Por otra parte, el grupo carboxilo de la Tyr¹²⁸ se coloca a tan solo 2.9 Å del átomo C4A del grupo pirazina del FMN. Mientras, el grupo ribitol del FMN mantiene tres puentes de hidrógeno con la Ser³⁹ y la Lys¹⁶⁷, y la carga negativa del grupo fosfato se contrarresta con la presencia de la Arg¹⁶⁹ y la His¹¹, participando también la Ser¹⁵ al crear un puente de hidrógeno con el fosfato. Todos ellos se conservan muy bien en el alineamiento entre NfsA y PnrA, lo cual está en consonancia con la identificación de FMN como el cofactor de PnrA.

Los datos de PnrA indican que esta proteína utiliza NADPH, pero no NADH como donador de electrones, lo cual parece una característica común del subgrupo de nitroreductasas en donde PnrA está englobada. Se ha analizado el papel fundamental de la Arg²⁰³ en la unión del NADPH a la proteína en NfsA (Kobori, *et al.*, 2001). Esta arginina se conserva en las proteínas de la familia excepto en PnrA, en la cual este residuo está reemplazado por una histidina. Sin embargo, se sabe que un residuo cargado positivamente, como la arginina, lisina, o histidina, están implicados en el reconocimiento del fosfato en posición 2' del NADPH mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno (Thorn, *et al.*, 1995; Wilson, *et al.*, 1992). Se puede concluir con ello que la histidina de PnrA puede llevar a cabo la función de la Arg²⁰³.

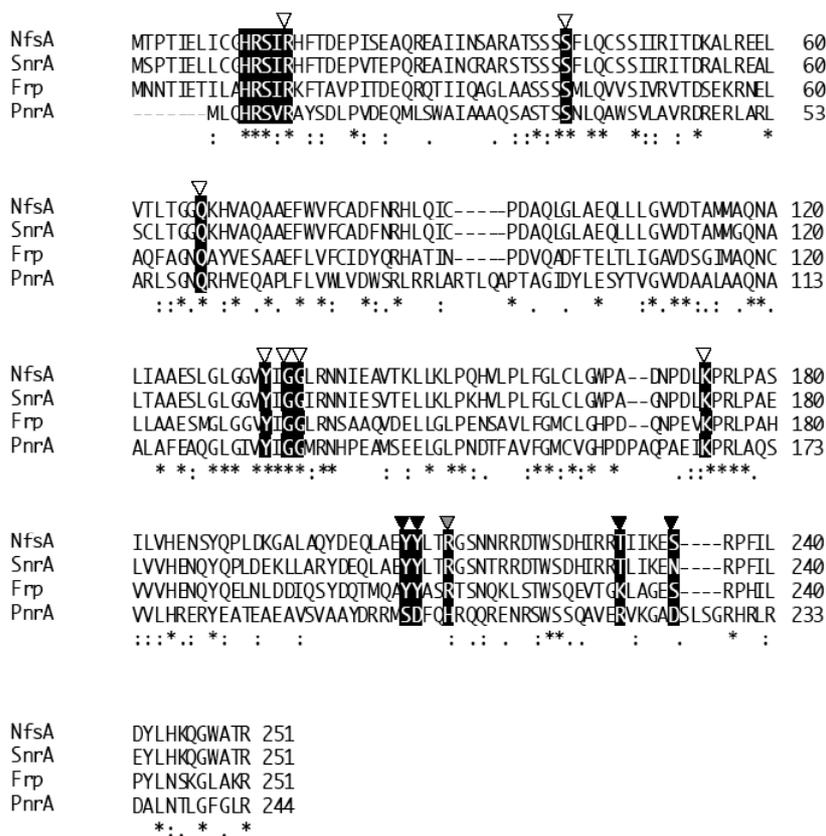


Fig. 6.6. Alineamiento realizado con el programa Clustalw. Los residuos idénticos se indican con un asterisco, los fuertemente similares con dos puntos, mientras que los ligeramente similares con un punto. Los residuos implicados en el reconocimiento del FMN están indicados con un triángulo blanco, mientras los responsables de la unión del NADPH se indican con triángulos grises y que aquellos responsables del reconocimiento del sustrato están con triángulos negros.

Una comparación de los residuos del centro activo encargados del reconocimiento y unión del sustrato nitroaromático muestra una diferencia en la conservación de los aminoácidos. En el lado derecho del centro activo de NfsA se exponen los residuos Arg¹⁵, Gln⁶⁷, Arg¹³³, Lys¹⁶⁷, Arg²²⁵, Ser³⁹ y la Ser⁴⁰. Todos estos residuos se conservan en la subfamilia. Sin embargo, el lado izquierdo del centro activo presenta marcadas diferencias en cuanto a la secuencia. En el caso de NfsA se compone de Tyr¹⁹⁹, Tyr²⁰⁰, Arg²⁰³, Thr²¹⁹, Lys²²², Ser²²⁴ y Arg²²⁵. Estos residuos varían bastante en FRP, y aún más en PnrA. Las diferencias que posee PnrA en este lado de la molécula podrían explicar la diferencia en cuanto a sustratos que posee con respecto a NfsA, como se ha visto por ejemplo con el 4-nitrobenzoato (Zenno *et al.*, 1996a).



Fig. 6.7. Estructura tridimensional de la proteína NfsA de *E. coli*. Este diseño se a realizado a partir de los estudios cristalográficos realizados en la proteína por el programa RASMOL. En color magenta se representan las hélices- β y en amarillo las hojas- β . En azul se puede ver los grupos prostéticos, además, se representa un posible sustrato en este mismo color. Se puede observar la estructura dimerica, así como la localización de los grupos prostéticos entre los surcos que dejan la subunidades.. Se obseva además la posición del sustrato, apreciándose lo estrecho del centro activo de manera que sólo puedan entrar sustratos de estructura plana, como son los anillos aromáticos.

El papel fisiológico de las nitroreductasas descritas anteriormente se desconoce en la mayoría de los casos, pero algunas de ellas no necesariamente están ligadas a la reducción de compuestos nitroaromáticos *in vivo*. Por ejemplo, las nitroreductasas descritas de en *Vibrio* intervienen de manera directa y fundamental en el proceso de bioluminiscencia que realizan estos microorganismos (Lei, *et al.*, 1994; Zenno, *et al.*, 1994). Por otra parte, la ubicuidad de estas enzimas entre bacterias podría indicar la posibilidad de una función común, como sería el control del estado redox celular. Recientemente, se ha identificado la región promotora del gen *nfsA* de *E. coli* y se ha descrito la inducción de su expresión en respuesta a un agente generador de radicales libre, el paraquat. También se sabe que este enzima participa en la respuesta frente a estrés oxidativo mediada por SoxS (Liochev, *et al.*, 1999; Paterson, *et al.*, 2002). Un análisis computacional en busca de homólogo al gen *soxS* en el genoma de *P. putida* dio un resultado negativo, pero no se puede descartar una participación de PnrA en respuesta a estrés. Sin embargo, la capacidad que tienen estas proteínas de reconocer una amplio abanico de sustratos puede haber servido de ventaja a la hora de “adaptar” los recursos enzimáticos celulares para la utilización de otros compuestos, como podrían ser los nitroaromáticos.

Este parece ser el caso de la nitroreductasa NTR de *E. cloacae* 96-3; esta cepa, que se aisló de terrenos históricamente contaminados con explosivos, es capaz de inducir la expresión de *ntr* en presencia de TNT (Bryant y DeLuca, 1991), por lo que parece indicar una función de NTR relacionada con el metabolismo de este nitroaromático en esta cepa tras una posible adaptación de las funciones de la nitroreductasa. Si bien la proteína PnrA no varía sus niveles de expresión en presencia de TNT, lo cual puede deberse a que se aisló de aguas residuales no contaminadas con TNT (Esteve-Núñez y Ramos 1998), de todos los sustratos comprobados con PnrA, el TNT presenta la mejor relación V_{max}/K_m lo que puede ser una ventaja para JLR11 a la hora de iniciar un ataque reductivo de los grupos nitro del TNT.

5. Propiedades funcionales de PnrA.

La reducción parcial de compuestos nitroaromáticos hasta los derivados hidroxilamino se ha identificado como un reacción clave en el rutas de degradación de algunos compuestos mononitroaromáticos, como el nitrobenzeno o el 4-nitrobenzoato (Groenewegen y de Bont, 1992; Nishino y Spain, 1993), en los que una nitroreductasa lleva a cabo el primer paso de la ruta (Hughes y Williams, 2001b; Somerville, *et al.*, 1995b). Los resultados obtenidos con los mutantes en funciones asociadas al metabolismo del nitrógeno en JLR11 indican claramente la formación de amonio a partir del TNT, lo cual sugiere que en esta cepa existe un mecanismo parecido al descrito para otros nitroaromáticos en el cual, la primera reacción a llevar a cabo es la reducción del grupo nitro. La identificación de PnrA como nitroreductasa de JLR11 requirió la construcción de cepas mutantes que ayudasen a elucidar si esta proteína puede estar llevando a cabo el primer paso de la ruta de asimilación del N-TNT a partir de amonio.

El mutante en el gen *pnrA* está claramente afectado en su capacidad de utilizar el TNT como fuente de nitrógeno, lo que confirma la participación de la nitroreductasa PnrA en el metabolismo productivo del TNT en *P. putida* JLR11. El análisis de los sobrenadantes de las curvas de crecimiento de la cepa mutante y de los compuestos acumulados al final de éstas mostraron la presencia del derivado reducido de TNT, el 4-ADNT y que éste se acumuló en las mismas

concentraciones que en la cepa silvestre. Esto indica que en JLR11, además de PnrA, existe al menos otro enzima capaz de reducir el TNT. Se puede descartar la posibilidad de que sea la otra nitroreductasa aislada en JLR11, PnrB, puesto que ésta no presentaba actividad con TNT. Sin embargo, en JLR11 se ha aislado una proteína homóloga a XenB de *P. fluorescens* I-C (Pak, *et al.*, 2000). Está descrito que esta proteína es capaz de llevar a cabo la formación del complejo de Meisenheimer, además de la reducción de TNT a hidroxilamino *in vivo*, y se ha confirmado que la proteína XenB de JLR11 es capaz de llevar a cabo las mismas reacciones (van Dillewijn y colaboradores, resultados sin publicar). Sin embargo, la comparación de los datos bioquímicos de las dos enzimas purificadas indican que la K_m de PnrA por el TNT es más de 10 veces superior a la de XenB, lo cual parece indicar que en la cepa silvestre PnrA puede tener preferencia por el TNT sobre XenB.

Por otra parte, el compuesto de reducción identificado en las curvas de crecimiento fue la 4-ADNT. Todas las reacciones descritas de enzimas nitroreductasas purificadas sobre compuestos nitroaromáticos han identificado el producto de la reacción como el derivado hidroxilamino, lo cual concuerda con la cinética de la reacción caracterizada en sistema bi bi ping pong en donde 2 moléculas de NAD(P)H entran para reducir el FMN, una vez oxidadas salen del centro activo para dejar paso al sustrato que se reduce por 4 electrones, produciendo la hidroxilamina. Debe de existir por tanto algún mecanismo, ya sea enzimático o abiótico, no descrito hasta ahora en ningún sistema, que transforme la hidroxilamina hasta amino. La acumulación de cantidades similares de 4-ADNT en la cepa silvestre y en la mutante se explicaría si la velocidad máxima de la catálisis del paso de hidroxilamina a amina es inferior a la de síntesis de 4-HADNT a partir del TNT por parte de la(s) enzima(s) que ejerzan esta función en la cepa mutante.

Una análisis más detallado en reacciones a tiempos cortos mediante las medidas de producción de 4-HADNT en extractos crudos de JLR11 y de la cepa mutante JLR11-*pnrA* indicaban una caída de la producción del compuesto de un 40%, y una velocidad de producción de 4-HADNT inferior en la cepa mutante. Además, el seguimiento del 4-ADNT en este experimento confirmó que la

reacción de formación de este último compuesto es independiente de la reducción de TNT a 4-HADNT, y que la cinética de producción fue igual tanto en la cepa silvestre, como en la, siendo su valor un 15% del TNT inicial. Este dato de acumulación de aminas aromáticas concuerda con lo observado anteriormente por Esteve-Núñez y Ramos (1998) en cultivos de JLR11 creciendo a expensas del TNT.

Por otra parte, la cepa mutante doble *pnrA nasB* mostró un efecto sumado de ambas mutaciones, de manera que fue incapaz de utilizar el TNT como fuente de nitrógeno. Además, la acumulación de nitrito en el sobrenadante del mutante *nasB* como en el *nasB pnrA* fue muy similar, lo que indicaba que una mutación en el gen *pnrA* no impide la denitración del TNT en forma de nitrito, y que el efecto que la mutación en *pnrA* está relacionado con otra ruta metabólica. Esto confirma la existencia de dos rutas independientes en JLR11 por las que se puede metabolizar el TNT (ver figura 6.8).

Se desconoce el mecanismo que JLR11 pueda estar llevando a cabo para liberar el amonio del TNT. La posibilidad de que el derivado del TNT hidroxilamino pudiese ser clave en la utilización del TNT como fuente de nitrógeno tras su transformación por parte de nitroreductasas fue postulada por Fiorella y Spain (1997) en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS52, pero los autores proponen una liberación de nitrito y formación de un compuesto no determinado como productos del metabolismo del hidroxilamino. En cambio, la descripción de reagrupamientos de Bamberger a partir de la molécula del TNT en bacterias abre la posibilidad de que JLR11 pueda seguir ese procedimiento (Hughes, *et al.*, 1998b). En el caso de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45, el nitrobenzeno se metaboliza en primer lugar por la nitrobenzeno reductasa (NbzA) y posteriormente una mutasa, la HabA, es la encargada de llevar a cabo la transformación hasta el aminofenol mediante reagrupamiento de Bamberger. Aunque la similitud entre la nitroreductasa NbzA y PnrA es relativamente baja, y filogenéticamente parecen bastante lejanas, se sabe que otras enzimas nitroreductasas homólogas a PnrA, como la NTR de *E. cloacae* es capaz de reproducir el primer paso dado por NbzA.

Nishino y Spain (2004) han postulado una división de las nitroreductasas entre específicas, que son aquellas caracterizadas dentro de rutas de degradación de nitroaromáticos mediante reducción parcial hasta hidroxilamino, como son la PnbA y NbzA y que filogenéticamente están relacionadas entre ellas (ver Fig. 6.5.), e inespecíficas, las cuales no tienen una función específica determinada y en donde se englobarían todas las que presentan homología con PnrA y clasificadas dentro de la familia de “nitroreductasas clásicas”, y cuya reducción de los grupos nitro, según estos autores, conlleva la producción cometabólica de derivados amino. Sin embargo, Kadiyala y colaboradores (2003) recientemente han demostrado que la proteína NTR de *E. cloacae* puede ocupar la función de la NbzA en un reconstrucción artificial de la ruta NbzA-HabA expresada en *E. coli* y llevar a cabo reducciones parciales del 2-nitrotolueno y 3-nitrotolueno con la consecuente formación de los derivados 2-amino-3-metilfenol y 2-amino-4-metilfenol, respectivamente. Los mismos autores observaron además una afinidad hasta 5 veces superior del enzima NTR sobre el TNT que el enzima NbzA. Todo ello sugiere que PnrA puede llevar a cabo una reducción productiva del TNT en JLR11 para dirigirlo hacia un complejo de Bamberger de manera que se acabe liberando amonio desde la molécula de TNT.

Por otra parte, en el caso del nitrobenzeno se sabe que la encargada de catalizar el reagrupamiento de Bamberger es un enzima de tipo mutasa; la reacción catalizada por la mutasa HabA de *P. pseudoalcaligenes* se ha determinado *in vitro* a partir del enzima purificado (He, *et al.*, 2000; Nadeau, *et al.*, 2003). Sin embargo, el reagrupamiento de Bamberger en nitroaromáticos no es una reacción exclusiva de enzimas mutasas, y se han determinado otras proteínas capaces de llevar a cabo esta reacción en TNT, como son las enzima Fe-hidrogenasa (Watrous, *et al.*, 2003) y la CO-dehidrogenasa (Huang, *et al.*, 2000) de *Clostridium*. Además, el complejo de Bamberger para el TNT se ha observado en diversos microorganismos, no sólo en *Clostridium*, sino también en hongos como *Phanerochaete chrysosporium* (Hawari, *et al.*, 1999), lo cual parece indicar que puede ser una reacción relativamente sencilla de catalizar sobre el TNT.

En la figura 6.8. se esquematiza los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral y se muestran las distintas posibilidades abiertas para el metabolismo del

nitrógeno del TNT, indicando además los enzimas más relevantes estudiados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. En la literatura se han descrito casos de utilización del TNT mediante liberación de nitrito o amonio (Esteve-Núñez, *et al.*, 2001). Sin embargo, los estudios de liberación de amonio a partir del TNT se han centrado en reducciones del TNT hasta triaminotolueno (TAT) en condiciones anaerobias, y posterior eliminación de los grupos amino. En derivados del TNT parcialmente reducidos las investigaciones realizadas se han centrado en determinar nitrito proveniente del TNT. En estas circunstancias la liberación de amonio sólo se ha propuesto como producto de la eliminación de grupos nitro por Vorbeck y colaboradores (1998), los cuales, como en el caso de esta Tesis Doctoral, no pudieron determinar la salida de este ión desde el TNT. Sin embargo, esta Tesis Doctoral representa el primer estudio del metabolismo del TNT mediante la interrupción por mutagénesis de las rutas metabólicas implicadas en el catabolismo del nitrógeno. El estudio de un mutante *nasB* en una cepa capaz de asimilar el nitrógeno del TNT saca a la luz por primera vez la existencia de dos rutas metabólicas alternativas en el mismo microorganismo para atacar la molécula del TNT, y con ello la necesidad de estudiar en profundidad una ruta alternativa a la formación de nitrito como vía principal del metabolismo del TNT.

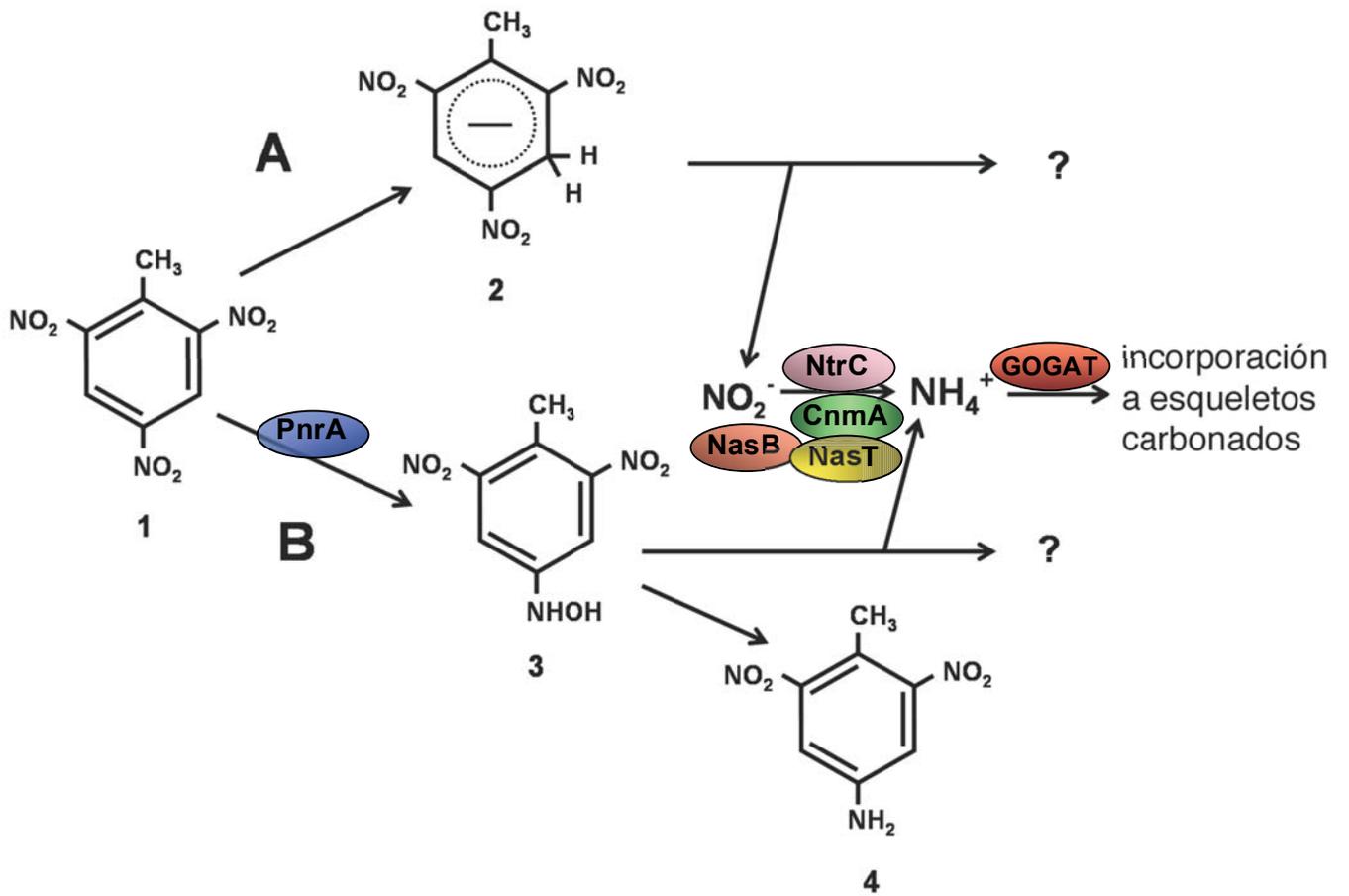


Fig. 6.8. Esquema donde se postulan las vías de asimilación de nitrógeno en *Pseudomonas putida* JLR11.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. *Pseudomonas putida* JLR11 metaboliza el nitrógeno del TNT mediante dos rutas alternativas. En una de ellas el producto de la reacción de denitración es el nitrito mientras que en la segunda el producto originado del metabolismo del grupo nitro es el amonio.
2. En *Pseudomonas putida* JLR11 el nitrógeno del TNT se asimila por la ruta de la glutamina sintasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT). La asimilación es directa, si el producto es amonio. En el caso de la liberación en forma de nitrito, éste se reduce previamente hasta amonio, mediante la nitrito reductasa asimilatoria codificada por los genes *nasBC*.
3. Los genes que codifican la nitrito reductasa asimilatoria se encuentran organizados en un operón junto al gen de la nitrato reductasa (*nasA*) en *Pseudomonas putida* JLR11. La activación de su expresión está regulada a través de circuitos intrincados. En el proceso participan tanto la proteína NtrC, encargada de detectar la deficiencia de nitrógeno, así como dos reguladores específicos del metabolismo del nitrito y nitrato: NasT, que actúa como antiterminador de la transcripción, y CnmA, cuyo mecanismo de actuación es objeto de estudio en la actualidad.
4. *Pseudomonas putida* JLR11 posee un enzima de la familia de las “nitroreductasas clásicas”, denominada PnrA, capaz de reducir el TNT hasta 4-hidroxilamino-2,6-dinitrotolueno, con el consumo de 2 moles de NADPH por mol de TNT. Esta nitroreductasa presenta un amplio perfil de sustratos, pero, la mejor relación V_{max}/K_m se da con el TNT como aceptor de electrones.
5. PnrA es clave en la asimilación del nitrógeno del TNT mediante la formación de 4-hidroxiamino-2,6-dinitrotolueno, que da lugar a la liberación de amonio del anillo del nitroareno.
6. La falta de crecimiento en TNT de un doble mutante *nasBpnrA* en *Pseudomonas putida* JLR11 demuestra que la ruta de metabolismo del

nitrógeno del TNT en la que interviene PnrA es independiente de la ruta de eliminación de grupos nitro mediante formación de nitrito.

Bibliografía

- Abril, M. A., Michan, C., Timmis, K. N. y Ramos, J. L. 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J Bacteriol* 171:6782-6790.
- Achtnich, C., Lenke, H., Klaus, U., Spittler, M. y Knackmuss, H. J. 2000. Stability of immobilized TNT derivatives in soil as a function of nitro group reduction. *Environ Sci Technol* 34:3698-3704.
- Achtnich, C., Pfortner, P., Weller, M. G., Niesser, R. y Knackmuss, H. J. 1999. Reductive transformation of bound trinitrophenyl residues and free TNT during a bioremediation process analyzed by immunoassay. *Environ. Sci. Technol.* 33:3421-3426.
- Ackerley, D. F., Gonzalez, C. F., Keyhan, M., Blake, R., 2nd y Matin, A. 2004. Mechanism of chromate reduction by the *Escherichia coli* protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environ Microbiol* 6:851-860.
- Adrian, N. R., Arnett, C. M. y Hickey, R. F. 2003. Stimulating the anaerobic biodegradation of explosives by the addition of hydrogen or electron donors that produce hydrogen. *Water Res* 37:3499-3507.
- Ahmad, D. y Hughes, J. B. 2000. Anaerobic Transformation of TNT by *Clostridium*, p. 185-212. In Spain, J. C., J.B., H. yH.-J., K. (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. Lewis Publishers, Boca Raton FL.
- Aihara, J. 1992. Why nitroaromatic are stable. *Sci. Am.* 266:62-68.
- Alvarez, M. A., Kitts, C. L., Botsford, J. L. y Unkefer, P. J. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* strain MA01 aerobically metabolizes the aminodinitrotoluenes produced by 2,4,6-trinitrotoluene nitro group reduction. *Can J Microbiol* 41:984-991.
- Amdur, M. O., Doull, J. y Klaassen, C. D. 1991. Casarett's & Doull's Toxicology, 4th ed. McGraw Hill Inc., New York.
- Angermaier, L. y Simon, H. 1983. On nitroaryl reductase activities in several Clostridia. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 364:1653-1663.
- Arcondeguy, T., Jack, R. y Merrick, M. 2001. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:80-105.f
- Atlas, R. M. 1997. Bioestimulación para mejorar la biorrecuperación microbiana, p. 21-40. In Levin y Gealt (ed.), Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Mc Graw Hill.
- Averill, B. A. 1995. Transformation of inorganic N-oxides by denitrifying bacteria: Pathways, mechanisms, and relevance to biotransformation of nitroaromatic compounds, p. 183-198. In Spain, J. C. (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds. Plenum Press, New York NY.
- Bae, B., Autenrieth, R. L. y Bonner, J. S. 1995. Aerobic biotransformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene., p. 231-238. In Hinchee, E., Hoepfel, R. E. yAnderson, D. B. (ed.), Bioremediation of recalcitrant organics. Battelle Press, Columbus, Ohio.

Bakhtiar, R., Leung, K. H., Stearns, R. A. y Hop, C. E. 1997. Evidence for a novel heme adduct generated by the in vitro reaction of 2,4,6-trinitrotoluene with human hemoglobin using electrospray ionization mass spectrometry. *J Inorg Biochem* 68:273-278.

Banerjee, H. N., Verma, M., Hou, L. H., Ashraf, M. y Dutta, S. K. 1999. Cytotoxicity of TNT and its metabolites. *Yale J Biol Med* 72:1-4.

Barna, T., Messiha, H. L., Petosa, C., Bruce, N. C., Scrutton, N. S. y Moody, P. C. 2002. Crystal structure of bacterial morphinone reductase and properties of the C191A mutant enzyme. *J Biol Chem* 277:30976-30983.

Barna, T. M., Khan, H., Bruce, N. C., Barsukov, I., Scrutton, N. S. y Moody, P. C. 2001. Crystal structure of pentaerythritol tetranitrate reductase: "flipped" binding geometries for steroid substrates in different redox states of the enzyme. *J Mol Biol* 310:433-447.

Barrows, S. E., Cramer, C. J., Truhlar, D. G., Elovitz, M. S. y Weber, E. J. 1996. Factors controlling regioselectivity in the reduction of polynitroaromatics in aqueous solution. *Environ Sci Technol* 30:3028-3038.

Betts, K. S. 1997. Native aquatic plants remove explosives. *Environ Sci Technol* 31:304.

Bhadra, R., Spangord, R. J., Wayment, D. G., Hughes, M. A. y Shanks, J. V. 1999a. Characterization of Oxidation products of TNT metabolism in aquatic phytoremediation systems of *Myriophyllum aquaticum*. *Environ Sci Technol* 33:3354-3361.

Bhadra, R., Wayment, D. G., Hughes, J. B. y Shanks, J. V. 1999b. Confirmation of conjugation processes during TNT metabolism by anoxic plant roots. *Environ Sci Technol* 33:446-452.

Bhushan, B., Halasz, A. y Hawari, J. 2004. Nitroreductase catalyzed biotransformation of CL-20. *Biochem Biophys Res Commun* 322:271-276.

Blasco, V. y Castillo, F. 1993. Characterization of a nitrophenol reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Appl. Env. Microbiol* 59:1774-1778.

Blehert, D. S., Fox, B. G. y Chambliss, G. H. 1999. Cloning and sequence analysis of two *Pseudomonas* flavoprotein xenobiotic reductases. *J Bacteriol* 181:6254-6263.

Blehert, D. S., Knoke, K. L., Fox, B. G. y Chambliss, G. H. 1997. Regioselectivity of nitroglycerin denitration by flavoprotein nitroester reductases purified from two *Pseudomonas* species. *J Bacteriol* 179:6912-6920.

Bolton, J. R. y Carter, S. R. 1993. Homogeneous photodegradation of pollutants in contaminated water: an introduction., p. 467-490. In Zepp, R. y Crosby, D. (ed.), *Aquatic and surface photochemistry*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Boopathy, R. y Kulpa, C. F. 1992. Trinitrotoluene (TNT) as a sole nitrogen source for a sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio* sp. (B strain) isolated from an anaerobic digester. *Curr Microbiol* 25:235-241.

- Boopathy, R. y Kulpa, C. F. 1994. Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by a *Methanococcus* sp. (strain B) isolated from a lake sediment. *Can J Microbiol* 40:273-278.
- Boopathy, R., Wilson, M. y Kulpa, C. F. 1993. Anaerobic removal of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) under different electron accepting conditions: laboratory study. *Water Environ Res* 65:271-275.
- Boyer, H. W. y Roulland-Dussoix, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41:459-472.
- 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.
- Breithaupt, C., Strassner, J., Breiting, U., Huber, R., Macheroux, P., Schaller, A. y Clausen, T. 2001. X-ray structure of 12-oxophytodienoate reductase 1 provides structural insight into substrate binding and specificity within the family of OYE. *Structure (Camb)* 9:419-429.
- Brenchley, J. E., Prival, M. J. y Magasanik, B. 1973. Regulation of the synthesis of enzymes responsible for glutamate formation in *Klebsiella aerogenes*. *J Biol Chem* 248:6122-6128.
- Brooks, L. R., Jacobson, R. W., Warren, S. H., Kohan, M. J., Donnelly, K. C. y George, S. E. 1997. Mutagenicity of HPLC-fractionated urinary metabolites from 2,4,6-trinitrotoluene-treated Fischer 344 rats. *Environ Mol Mutagen* 30:298-302.
- Brune, A. y Schink, B. 1992. Phloroglucinol pathway in the strict anaerobic *Pelobacter acidigallici*: fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. *Arch Microbiol* 157:417-424.
- Bruns-Nagel, D., Drzyzga, O., Steinbach, K., Schmidt, C., von Low, E., Gorontzy, T., Blotvogel, K. H. y Gemsa, D. 1998. Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. *Environ Sci Technol* 32:1676-1679.
- Bruns-Nagel, D., Scheffer, S., Casper, B., Garn, H., Drzyzga, O., von Low, E. y Gemsa, D. 1999. Effect of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites in human monocytes. *Environ Sci Technol* 33:2566-2570.
- Bruns-Nagel, D., Steinbach, K., Gemsa, D. y von Low, E. 2000. Composting (Humification) of nitroaromatic compounds, p. 357-393. In Spain, J. C., Hughes, J. B. y Knackmuss, H.-J. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*. Lewis Publishers, Boca Raton FL.
- Bryant, C. y DeLuca, M. 1991. Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* 266:4119-4125.
- Bryant, C., Hubbard, L. y McElroy, W. D. 1991. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*. *J Biol Chem* 266:4126-4130.
- Bryant, D. W., McCalla, D. R., Leeksa, M. y Laneuville, P. 1981. Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 27:853-859.

Bunce, N. J., Merica, S. G. y Lipkowski, J. 1997. Prospects for the use of electrochemical methods for the destruction of aromatic organochlorine wastes. *Chemosphere* 35:2719-2726.

Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29:23-39.

Burken, J. G., Shanks, J. V. y Thompson, P. L. 2000. Phytoremediation and plant metabolism of explosives and nitroaromatic compounds, p. 239-275. In Spain, J. C., J.B., H. yH.-J., K. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*. Lewis, Boca Raton FL.

Castano, I., Flores, N., Valle, F., Covarrubias, A. A. y Bolivar, F. 1992. *gltF*, a member of the *gltBF* operon of *Escherichia coli*, is involved in nitrogen-regulated gene expression. *Mol Microbiol* 6:2733-2741.

Cerniglia, C. E. y Somerville, C. C. 1995. Reductive metabolism of nitroaromatic and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons, p. 99-115. In Spain, J. C. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. Plenum Press, New York NY.

Chai, W. y Stewart, V. 1998. NasR, a novel RNA-binding protein, mediates nitrate-responsive transcription antitermination of the *Klebsiella oxytoca* M5al *nasF* operon leader in vitro. *J Mol Biol* 283:339-351.

Chai, W. y Stewart, V. 1999. RNA sequence requirements for NasR-mediated, nitrate-responsive transcription antitermination of the *Klebsiella oxytoca* M5al *nasF* operon leader. *J Mol Biol* 292:203-216.

Coombs, M. y Schillack, V. 1998. Determination of trinitrotoluene and metabolites in urine by means of gas-chromatography with mass detection. *Int Arch Occup Environ Health* 71 Suppl:S22-25.

Crawford, R. L. 1995a. Biodegradation of nitrated munition compounds and herbicides by obligately anaerobic bacteria, p. 87-98. In Spain, J. C. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. Plenum Press, New York, NY.

Crawford, R. L. 1995b. The microbiology and treatment of nitroaromatic compounds. *Curr Op Biotechnol* 6:329-336.

Daun, G., Lenke, H., Reuss, M. y Knackmuss, H. J. 1998. Biological treatment of TNT-contaminated soil. I. Anaerobic cometabolic reduction and interaction of TNT and metabolites with soil components. *Environ Sci Technol* 32:1956-1963.

de Bruin, W. P., Kotterman, M. J., Posthumus, M. A., Schraa, G. y Zehnder, A. J. 1992. Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethane. *Appl Environ Microbiol* 58:1996-2000.

de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. y Timmis, K. N. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* 172:6568-6572.

de Lorenzo, V. y Timmis, K. N. 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* 235:386-405.

Dodard, S. G., Renoux, A. Y., Hawari, J., Ampleman, G., Thiboutot, S. y Sunahara, G. I. 1999. Ecotoxicity characterization of dinitrotoluenes and some of their reduced metabolites. *Chemosphere* 38:2071-2079.

Drzyzga, O., Bruns-Nagel, D., Gorontzy, T., Blotevogel, K. H., Gemsa, D. y von Low, E. 1998. Mass balance studies with ¹⁴C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) mediated by an Anaerobic desulfovibrio species and an Aerobic serratia species. *Curr Microbiol* 37:380-386.

Duque, E., Haidour, A., Godoy, F. y Ramos, J. L. 1993. Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene. *J Bacteriol* 175:2278-2283.

Eberl, L., Ammendola, A., Rothballer, M. H., Givskov, M., Sternberg, C., Kilstrup, M., Schleifer, K. H. y Molin, S. 2000. Inactivation of *gltB* abolishes expression of the assimilatory nitrate reductase gene (*nasB*) in *Pseudomonas putida* KT2442. *J Bacteriol* 182:3368-3376.

Ederer, M. M., Lewis, T. A. y Crawford, R. L. 1997. 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) transformation by clostridia isolated from a munition-fed bioreactor: comparison with non-adapted bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18:82-88.

Edward, E. y Dennis, T. 1999. Federal remediation technologies roundtable: Common treatment technologies for explosives in soil sediment and sludge. [Http://www.plaia.com/matrix/section2/2_10_3.html](http://www.plaia.com/matrix/section2/2_10_3.html).

Eilers, A., Rüngeling, E., M., S. U. y Gottschalk, G. 1999. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* DSM 3375 depends on cytochrome P-450. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:75-80.

Enderle, P. J. y Farwell, M. A. 1998. Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* 25:954-956, 958.

Ernsting, B. R., Atkinson, M. R., Ninfa, A. J. y Matthews, R. G. 1992. Characterization of the regulon controlled by the leucine-responsive regulatory protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174:1109-1118.

Ernsting, B. R., Denninger, J. W., Blumenthal, R. M. y Matthews, R. G. 1993. Regulation of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*: how is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein? *J Bacteriol* 175:7160-7169.

Esteve-Núñez, A. 2000a. Metabolismo anaerobio del explosivo (TNT) por bacterias el genero *Pseudomonas*. University of Granada, Granada.

Esteve-Núñez, A., Caballero A., and Ramos J.L. 2001. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:335-352.

Esteve-Núñez, A., Luchessi G., Philipps B., Schink B., and Ramos J.L. 2000b. Respiration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JLR11. *J. Bacteriol.* 182:1352-1355.

Esteve-Núñez, A. y Ramos, J. L. 1998. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. JLR11. Environ. Sci. Technol. 32:3802-3808.

Evans, W. C. 1977. Biochemistry of bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. Nature 270:17-22.

Fiorella, P. D., and Spain J.C. 1997. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS52. Appl. Environ. Microbiol 63:2007-2015.

Fox, K. M. y Karplus, P. A. 1994. Old Yellow Enzyme at 2 Å resolution-overall structure, ligand binding, and comparison with related flavoproteins. Structure 2:1089-1105.

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. Proc Natl Acad Sci U S A 78:7458-7462.

French, C. E. y Bruce, N. C. 1995. Bacterial morphinone reductase is related to Old Yellow Enzyme. Biochem J 312 (Pt 3):671-678.

French, C. E., Nicklin, S. y Bruce, N. C. 1996. Sequence and properties of pentaerythritol tetranitrate reductase from *Enterobacter cloacae* PB2. J Bacteriol 178:6623-6627.

French, C. E., Nicklin, S. y Bruce, N. C. 1998. Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. Appl Environ Microbiol 64:2864-2868.

French, C. E., Rosser, S. J., Davies, G. J., Nicklin, S. y Bruce, N. C. 1999. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. Nat Biotechnol 17:491-494.

Friedman, A. M., Long, S. R., Brown, S. E., Buikema, W. J. y Ausubel, F. M. 1982. Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. Gene 18:289-296.

Frische, T. 2003. Ecotoxicological evaluation of in situ bioremediation of soils contaminated by the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Environ Pollut 121:103-113.

Fritsche, W., Scheibner, K., Herre, A. y Hofrichter, M. 2000. Fungal degradation of explosives: TNT and related nitroaromatic compounds, p. 213-237. In Spain, J. C., Hughes, J. B. y Knackmuss, H.-J. (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. Lewis Publishers, Boca Raton FL.

Funk, S. B., Crawford, D. L., Crawford, R. L., Mead, G. y Davis-Hooker, W. 1995. Full-scale anaerobic bioremediation of trinitrotoluene contaminated soil. Appl Biochem Biotechnol 51:625-633.

Funk, S. B., Roberts, D. J., Crawford, D. L. y Crawford, R. L. 1993. Initial-phase optimization for bioremediation of munition compound-contaminated soils. Appl Environ Microbiol 59:2171-2177.

Gilcrease, P. C. y Murphy, V. G. 1995. Bioconversion of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to a novel metabolite under anoxic and aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* 61:4209-4214.

Gong, P., Wilke, B. y Fleischmann, S. 1999. Soil-based phytotoxicity of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to terrestrial higher plants. *Arch Environ Contam Toxicol* 36:152-157.

Goodwin, A., Kersulyte, D., Sisson, G., Veldhuyzen van Zanten, S. J. O., Berg, D. E. y Hoffman, P. S. 1998. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol. Microbiol.* 28:383-393.

Gorny, N., Wahl, G., Brune, A. y Schink, B. 1992. A strictly anaerobic nitrate-reducing bacterium growing with resorcinol and other aromatic compounds. *Arch Microbiol* 158:48-53.

Gorontzy, T., Kuver, J. y Blotevogel, K. H. 1993. Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. *J Gen Microbiol* 139 Pt 6:1331-1336.

Goss, T. J., Perez-Matos, A. y Bender, R. A. 2001. Roles of glutamate synthase, *gltBD*, and *gltF* in nitrogen metabolism of *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 183:6607-6619.

Grassl, G., Bufer, B., Muller, B., Rosel, M. y Kleiner, D. 1999. Characterization of the *gltF* gene product of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 179:79-84.

Groenewegen, P. E. J. y de Bont, J. M. A. 1992. Degradation of 4-nitrobenzoate via 4-hydroxylaminobenzoate and 3,4-dihydroxybenzoate in *Comamonas acidovorans* NBA-10. *Arch. Microbiol.* 158:381-386.

Gutierrez, J. C., Ramos, F., Ortner, L. y Tortolero, M. 1995. *nasST*, two genes involved in the induction of the assimilatory nitrite-nitrate reductase operon (*nasAB*) of *Azotobacter vinelandii*. *Mol Microbiol* 18:579-591.

Gyaneshwar, P., Paliy, O., McAuliffe, J., Popham, D. L., Jordan, M. I. y Kustu, S. 2005. Sulfur and nitrogen limitation in *Escherichia coli* K-12: specific homeostatic responses. *J Bacteriol* 187:1074-1090.

Haderlein, S. B., Hofstetter, T. B. y Schwarzenbach, R. P. 2000. Subsurface chemistry of nitroaromatic compounds, p. 311-356. In Spain, J. C., Hughes, J. B. y Knackmuss, H.-J. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*. Lewis Publishers, Boca Raton FL.

Haderlein, S. B. y Schwarzenbach, R. P. 1995. Environmental processes influencing the rate of abiotic reduction of nitroaromatic compounds in the subsurface, p. 199-225. In Spain, J. C. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. Plenum Press, New York NY.

Haigler, B. E., Nishino, S. F. y Spain, J. C. 1994a. Biodegradation of 4-methyl-5-nitrocatechol by *Pseudomonas* sp. strain DNT. *J Bacteriol* 176:3433-3437.

Haigler, B. E. y Spain, J. C. 1993. Biodegradation of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain 4NT. *Appl Environ Microbiol* 59:2239-2243.

Haigler, B. E., Suen, W. C. y Spain, J. C. 1996. Purification and sequence analysis of 4-methyl-5-nitrocatechol oxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT. *J Bacteriol* 178:6019-6024.

Haigler, B. E., Wallace, W. H. y Spain, J. C. 1994b. Biodegradation of 2-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JS42. *Appl Environ Microbiol* 60:3466-3469.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.

Hanne, L. F., Kirk, L. L., Appel, S. M., Narayan, A. D. y Bains, K. K. 1993. Degradation and induction specificity in actinomycetes that degrade p-nitrophenol. *Appl Environ Microbiol* 59:3505-3508.

Hannink, N., Rosser, S. J., French, C. E., Basran, A., Murray, J. A., Nicklin, S. y Bruce, N. C. 2001. Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nat Biotechnol* 19:1168-1172.

Harayama, S., Rejik, M., Wubbolts, M., Rose, K., Leppik, R. A. y Timmis, K. N. 1989. Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. *J Bacteriol* 171:5048-5055.

Hartter, D. R. 1985. The use and importance of nitroaromatic compounds in the chemical industry., p. 1-14. In Rickert, D. E. (ed.), *Chemical institute of Toxicology Series: Toxicity of nitroaromatic compounds*. Hemisphere Publishing, Washinton, D. C.

Harwood, C. S., Burchhardt, G., Herrmann, H. y Fuchs, G. 1999. Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol Rev* 22:439-458.

Hattori, K., Hashimoto, M. y Ohashi, M. 1970. Oxypyrrolnitrin: a new antibiotic, Japan.

Hawari, J., Beaudet, S., Halasz, A., Thiboutot, S. y Ampleman, G. 2000. Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:605-618.

Hawari, J., Halasz, A., Beaudet, S., Paquet, L., Ampleman, G. y Thiboutot, S. 1999. Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene with *Phanerochaete chrysosporium* in agitated cultures at pH 4.5. *Appl Environ Microbiol* 65:2977-2986.

Hawari, J., Halasz, A., Paquet, L., Zhou, E., Spencer, B., Ampleman, G. y Thiboutot, S. 1998. Characterization of metabolites in the biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene with anaerobic sludge: role of triaminotoluene. *Appl Environ Microbiol* 64:2200-2206.

Haynes, C. A., Koder, R. L., Miller, A. F. y Rodgers, D. W. 2002. Structures of nitroreductase in three states. Effects of inhibitor binding and reduction. *J. Biol. Chem.* 277:11513-11520.

Haïdour, A. y Ramos, J. L. 1996. Identification of products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, and 2,6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. *Environ. Sci. Technol.* 30:2365-2370.

Haidour A., a. R. J. L. 1996. Identification of products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, and 2,6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Environ. Sci. Technol. 30:2365-2370.

He, L., Soupene, E. y Kustu, S. 1997. NtrC is required for control of *Klebsiella pneumoniae* NifL activity. J Bacteriol 179:7446-7455.

He, Z., Nadeau, L. J. y Spain, J. C. 2000. Characterization of hydroxylaminobenzene mutase from pNBZ139 cloned from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. A highly associated SDS-stable enzyme catalyzing an intramolecular transfer of hydroxy groups. Eur J Biochem 267:1110-1116.

Heflich, R. H., Fifer, E. K., Djuric, Z. y Beland, F. A. 1985. DNA adduct formation and mutation induction by nitropyrenes in *Salmonella* and Chinese hamster ovary cells: relationships with nitroreduction and acetylation. Environ Health Perspect 62:135-143.

Heider, J. y Fuchs, G. 1997. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. Eur J Biochem 243:577-596.

Heiss, G. y Knackmuss, H. J. 2002. Bioremediation of trinitroaromatic compounds: immobilization versus mineralization. Curr Op Microbiol 5:282-287.

Helling, R. B. 1994. Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate? J Bacteriol 176:4664-4668.

Helling, R. B. 1998. Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia coli*. J Bacteriol 180:4571-4575.

Higson, F. K. 1992. Microbial degradation of nitroaromatic compounds. Adv Appl Microbiol 37:1-19.

Ho, E. M., Chang, H. W., Kim, S. I., Kahng, H. Y. y Oh, K. H. 2004. Analysis of TNT (2,4,6-trinitrotoluene)-inducible cellular responses and stress shock proteome in *Stenotrophomonas* sp. OK-5. Curr Microbiol 49:346-352.

Hofstetter, T. B., Heijman, C. G., Haderlein, S. B., Holliger, C. y Schwarzenbach, R. P. 1999. Complete reduction of TNT and other (poly)nitroaromatic compounds under iron-reducing subsurface conditions. Environ Sci Technol 33:1479-1487.

Holm, L. y Sander, C. 1995. Evolutionary link between glycogen phosphorylase and a DNA modifying enzyme. Embo J 14:1287-1293.

Honeycutt, M. E., Jarvis, A. S. y McFarland, V. A. 1996. Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. Ecotoxicol Environ Saf 35:282-287.

Huang, S., Lindahl, P. A., Wang, C., Bennett, G. N., Rudolph, F. B. y Hughes, J. B. 2000. 2,4,6-trinitrotoluene reduction by carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. Appl Environ Microbiol 66:1474-1478.

Hughes, J. B., Wang, C., Yesland, K., Bhadra, R., Richardson, A., Bennet, G. y Rudolph, F. 1998a. Reduction of 2,4,6-trinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum* through hydroxylamino intermediates. *Environ. Toxicol. Chem.* 17.

Hughes, J. B., Wang, C., Yesland, K., Richardson, A., Bhadra, R., Bennet, G. y Rudolph, F. 1998b. Bamberger Rearrangement during TNT metabolism by *Clostridium acetobutylicum*. *Environ. Sci. Technol.* 32:494-500.

Hughes, M. A. y Williams, P. A. 2001a. Cloning and characterization of the pnb genes, encoding enzymes for 4-nitrobenzoate catabolism in *Pseudomonas putida* TW3. *J. Bacteriol* 183:1225-1232.

Hughes, M. A. y Williams, P. A. 2001b. Cloning and characterization of the pnb genes, encoding enzymes for 4-nitrobenzoate catabolism in *Pseudomonas putida* TW3. *J. Bacteriol.* 183:1225-1232.

Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.

Jain, M. R., Zinjarde, S. S., Deobagkar, D. D. y Deobagkar, D. N. 2004. 2,4,6-trinitrotoluene transformation by a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Mar Pollut Bull* 49:783-788.

Janssen, D. B., op den Camp, H. J., Leenen, P. J. y van der Drift, C. 1980. The enzymes of the ammonia assimilation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol* 124:197-203.

Jeong, J. Y., Mukhopadhyay, A. K., Akada, J. K., Dailidene, D., Hoffman, P. S. y Berg, D. E. 2001. Roles of FrxA and RdxA nitroreductases of *Helicobacter pylori* in susceptibility and resistance to metronidazole. *J. Bacteriol* 183:5155-5162.

Jiang, P., Peliska, J. A. y Ninfa, A. J. 1998. Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37:12795-12801.

Johnson, G. R., Jain, R. K. y Spain, J. C. 2000. Properties of the trihydroxytoluene oxygenase from *Burkholderia cepacia* R34: an extradiol dioxygenase from the 2,4-dinitrotoluene pathway. *Arch Microbiol* 173:86-90.

Johnson, G. R., Smets, B. F. y Spain, J. C. 2001. Oxidative transformation of aminodinitrotoluene isomers by multicomponent dioxygenases. *Appl Environ Microbiol* 67:5460-5466.

Johnson, L. R., Davenport, R., Balbach, H. y Schaeffer, D. J. 1994. Phototoxicology. 2. Near-ultraviolet light enhancement of Microtox assays of trinitrotoluene and aminodinitrotoluenes. *Ecotoxicol Environ Saf* 27:23-33.

Jones, A. M., Greer, C. W., Ampleman, G., Thiboutot, S. y Hawari, J. 1995. Biodegradation of selected highly energetic pollutants under aerobic conditions., p. 251-257. In Hincsee, E., Hoeppel, R. E. y Anderson, D. B. (ed.), *Bioremediation of recalcitrant organics*. Battelle Press, Columbus, Ohio.

Kadiyala, V., Nadeau, L. J. y Spain, J. C. 2003. Construction of *Escherichia coli* strains for conversion of nitroacetophenones to ortho-aminophenols. *Appl. Env. Microbiol* 69:6520-6526.

Kalafut, T., Wales, M. E., Rastogi, V. K., Naumova, R. P., Zaripova, S. K. y Wild, J. R. 1998. Biotransformation patterns of 2,4,6-trinitrotoluene by aerobic bacteria. *Curr Microbiol* 36:45-54.

Kamberov, E. S., Atkinson, M. R., Feng, J., Chandran, P. y Ninfa, A. J. 1994. Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation. *Cell Mol Biol Res* 40:175-191.

Kamm, J. J. y Gillette, J. R. 1963. Mechanism of stimulation of mammalian nitro reductase by flavins. *Life Sci* 4:254-260.

Kaniga, K., Delor, I. y Cornelis, G. R. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109:137-141.

Kaplan, D. L. 1989. Biotransformation pathways of hazardous energetic organo-nitro compounds., p. 157-181. In Kamely, D., Chakrabarty, A. y Omenn, G. (ed.), *Biotechnology and biodegradation, advances in applied biotechnology*. Portfolio Publishing Co, Houston.

Kaplan, L. A. y Siedle, A. R. 1971. Studies in boron hydrides. IV. Stable hydride Meisenheimer adducts. *J. Org. Chem.* 36:937-939.

Kato, R., Oshima, T. y Kakanak, A. 1969. Studies of the mechanism of nitro reduction by rat liver. *Mol Pharmacol* 5:487-498.

Kaufman, A. C. y Kreuger, C. C. 1997. Biotratamiento aplicado a suelos contaminados con Ftalatos: reconocimiento y superación de retos técnicos., p. 211-220. In Levin y Gealt (ed.), *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. Mc Graw Hill.

Khan, H., Barna, T., Harris, R. J., Bruce, N. C., Barsukov, I., Munro, A. W., Moody, P. C. y Scrutton, N. S. 2004. Atomic resolution structures and solution behavior of enzyme-substrate complexes of *Enterobacter cloacae* PB2 pentaerythritol tetranitrate reductase. Multiple conformational states and implications for the mechanism of nitroaromatic explosive degradation. *J Biol Chem* 279:30563-30572.

Khan, H., Harris, R. J., Barna, T., Craig, D. H., Bruce, N. C., Munro, A. W., Moody, P. C. y Scrutton, N. S. 2002. Kinetic and structural basis of reactivity of pentaerythritol tetranitrate reductase with NADPH, 2-cyclohexenone, nitroesters, and nitroaromatic explosives. *J Biol Chem* 277:21906-21912.

Khan, T. A., Bhadra, R. y Hughes, J. 1997. Anaerobic Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds by *Clostridium acetobutylicum*. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 18:198-203.

Kessler, B., de Lorenzo, V. y Timmis, K. N. 1992. A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* 233:293-301.

Kiese, M. y Tager, K. 1976. The fate of phenylhydroxylamine in human red cells Naunyn Schmiedebergs. *Arch Pharmacol* 292:59-66.

Kim, H. Y., Bennet, G. y Song, H. G. 2002. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Klebsiella* sp. isolated from activated sludge. *Biotechnol Lett* 24:2023-2028.

Kim, H. Y. y Song, H. G. 2000. Comparison of 2,4,6-trinitrotoluene degradation by seven strains of white rot fungi. *Curr Microbiol* 41:317-320.

Kim, H. Y. y Song, H. G. 2003. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Irpex lacteus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:150-156.

Kitts, C. L., Green, C. E., Otley, R. A., Alvarez, M. A. y Unkefer, P. J. 2000. Type I nitroreductases in soil enterobacteria reduce TNT (2,4,6-trinitrotoluene) and RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine). *Can J Microbiol* 46:278-282.

Kluge, C., Tschuch, A. y Fuchs, G. 1990. Anaerobic metabolism of resorcylic acids (m-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and in a denitrifying bacterium. *Arch Microbiol* 155:68-74.

Knackmuss, H. J. 1996. Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds. *J. Biotechnol.* 51:287-295.

Knicker, H. 2003. Incorporation of (15)N-TNT transformation products into humifying plant organic matter as revealed by one- and two-dimensional solid state NMR spectroscopy. *Sci Total Environ* 308:211-220.

Knicker, H., Achnich, C. y Lenke, H. 2001. Solid-state nitrogen-15 nuclear magnetic resonance analysis of biologically reduced 2,4,6-trinitrotoluene in a soil slurry remediation. *J Environ Qual* 30:403-410.

Kobori, T., Sasaki, H., Lee, W. C., Zenno, S., Saigo, K., Murphy, M. E. P. y Tanokura, M. 2001. Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from *Escherichia coli* that reduces nitrocompounds. *J. Biol. Chem.* 376:2816-2823.

Krumholz, L. R., Li, J., Clarkson, W. W., Wilber, G. G. y Sufita, J. M. 1997. Transformations of TNT and related aminotoluenes in groundwater aquifer slurries under different electron-accepting conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18:161-169.

Kube, M., Heider, J., Amann, J., Hufnagel, P., Kuhner, S., Beck, A., Reinhardt, R. y Rabus, R. 2004. Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol* 181:182-194.

Kumagai, Y., Wakayama, T., Lib, S., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Sun, G. y Shimojo, N. 2000. Zeta-crystallin catalyzes the reductive activation of 2,4,6-trinitrotoluene to generate reactive oxygen species: a proposed mechanism for the induction of cataracts. *FEBS Lett* 478:295-298.

Kurinenko, B. M., Iakovleva, G., Denivarova, N. A. y Abreimova Iu, V. 2003. [Specific toxic effects of 2,4,6-trinitrotoluene on *Bacillus subtilis* SK1]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 39:313-317.

Kustu, S., Hirschman, J., Burton, D., Jelesko, J. y Meeks, J. C. 1984. Covalent modification of bacterial glutamine synthetase: physiological significance. *Mol Gen Genet* 197:309-317.

Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D. y Weiss, D. 1989. Expression of σ^{54} (ntrA)-dependent genes is probably united by common mechanism. *Microbiol Rev* 53:367-376.

Kwak, Y. H., Lee, D.S., and Kim H.B. 2003. *Vibrio harvey* Nitroreductase is also a chromate reductase. *Appl. Env. Microbiol* 69:4390-4395.

Labes, M., Rastogi, V., Watson, R. y Finan, T. M. 1993. Symbiotic nitrogen fixation by a nifA deletion mutant of *Rhizobium meliloti*: the role of an unusual ntrC allele. *J Bacteriol* 175:2662-2673.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lefebvre, Y. y Pezerat, H. 1992. Production of activated species of oxygen during the chromate(VI)-ascorbate reaction: implication in carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* 5:461-463.

Lei, B., Liu, M., Huang, S. y Tu, S. C. 1994. *Vibrio harvey* NADPH-flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme. *J. Bacteriol.* 176:3552-3558.

Lenke, H., Achtnich, C. y Knackmuss, H. J. 2000. Perspectives of biodegradation of polynitroaromatic compounds, p. 91-126. In Spain, J. C., Hughes, J. B. yKnackmuss, H.-J. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*. Lewis Publishers, Boca Raton FL.

Lenke, H. y Knackmuss, H. J. 1992. Initial hydrogenation during catabolism of picric acid by *Rhodococcus erythropolis* HL 24-2. *Appl Environ Microbiol* 58:2933-2937.

Lenke, H., Warrelmann, J., Daun, G., Hund, K., Sieglén, U. y Knackmuss, H. J. 1998. Biological treatment of TNT-contaminated soil. 2. Biologically induced immobilization of the contaminants and full-scale application. *Environ Sci Technol* 32:1964-1971.

Leung, K. H., Yao, M., Stearns, R. y Chiu, S. H. 1995. Mechanism of bioactivation and covalent binding of 2,4,6-trinitrotoluene. *Chem Biol Interact* 97:37-51.

Levin, M. A. y Gealt, M. A. 1997. Visión general del biotratamiento y su futuro., p. 1-19. In Levin, M. A. yGealt, M. A. (ed.), *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. Mc Graw Hill.

Levsen, K., Musmann, E., Berger-Preiss, E., Preiss, A., Volmer, D. y Wunsch, G. 1993. Analysis of nitroaromatic and nitramines in ammunition wastewater and in aqueous samples from former ammunition plants and other military sites. *Acta Hydrochim Hydrobiolog* 21:153-156.

Lewis, T. A., Goszczynski, S., Crawford, R. L., Korus, R. A. y Admassu, W. 1996. Products of anaerobic 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transformation by *Clostridium bifermentans*. *Appl Environ Microbiol* 62:4669-4674.

Lewis, T. A., Newcombe, D. A. y Crawford, R. L. 2004. Bioremediation of soils contaminated with explosives. *J Environ Manage* 70:291-307.

Li, Z. M., Shea, P. J. y Comfort, S. D. 1998. Nitrotoluene destruction by UV-catalized Fenton oxidation. *Chemosphere* 36:1849-1865.

Lin, E. C. C., Goldman, B. S. y Stewart, V. 1994. The nasFEDCBA operon for nitrate and nitrite assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5aI. *J Bacteriol* 176:2551-2559.

Lin, J. T. y Stewart, V. 1998. Nitrate assimilation by bacteria. *Adv Microb Physiol* 39:1-30, 379.

Lindmark, D. G. y Muller, M. 1976. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother* 10:476-482.

Liochev, S. I., Hausladen, A. y Fridovich, I. 1999. Nitroreductase A is regulated as a member of the soxRS regulon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3537-3539.

Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.

Liu, J. y Magasanik, B. 1995. Activation of the dephosphorylation of nitrogen regulator I-phosphate of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177:926-931.

Llamas, M. A., Rodriguez-Herva, J. J., Hancock, R. E., Bitter, W., Tommassen, J. y Ramos, J. L. 2003. Role of *Pseudomonas putida* tol-oprL gene products in uptake of solutes through the cytoplasmic membrane. *J Bacteriol* 185:4707-4716.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Magasanik, B. 1996. Regulation of nitrogen utilization, p. 1344-1356. In Neidhart, F. C., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks, L. K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. y Umberger, H. E. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology, 2nd ed, vol. 2. ASM Press.

Malacuso, A., Best, E. A. y Bender, R. A. 1990. Role of the nac gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 172:7249-7255.

Manoil, C. y Beckwith, J. 1985. TnpA: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8129-8133.

Marozienne, A., Kliukiene, R., Sarlauskas, J. y Cenas, N. 2001. Methemoglobin formation in human erythrocytes by nitroaromatic explosives. *Z Naturforsch [C]* 56:1157-1163.

Marshall, S. J., Krause, D., Blencowe, D. K. y White, G. F. 2004. Characterization of glycerol trinitrate reductase (NerA) and the catalytic role of active-site residues. *J Bacteriol* 186:1802-1810.

- Martin, J. L., Comfort, S. D., Shea, P. J., Kokjohn, T. A. y Drijber, R. A. 1997. Denitration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastanoi*. *Can J Microbiol* 43:447-455.
- Masepohl, B., Kaiser, B., Isakovic, N., Richard, C. L., Kranz, R. G. y Klipp, W. 2001. Urea utilization in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* is regulated by the transcriptional activator NtrC. *J Bacteriol* 183:637-643.
- Mason, R. P. y Holtzmann, J. L. 1975. The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67:1267-1274.
- McCormick, N. G., Feeherry, F. E. y Levinson, H. S. 1976. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. *Appl Environ Microbiol* 31:949-958.
- Merrick, M. J. y Edwards, R. A. 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiol Rev* 59:604-622.
- Meulenberg, R. y de Bont, A. M. 1995. Microbial production of catechols from nitroaromatic compounds, p. 37-52. In Spain, J. C. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. Plenum Press, New York NY.
- Meulenberg, R., Pepi, M. y de Bont, J. A. 1996. Degradation of 3-nitrophenol by *Pseudomonas putida* B2 occurs via 1,2,4-benzenetriol. *Biodegradation* 7:303-311.
- Miller, V. L. y Mekalanos, J. J. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol* 170:2575-2583.
- Miura, K., Tomioka, Y., Suzuki, H., Yonezawa, M., Hishinuma, T. y Mizugaki, M. 1997. Molecular cloning of the nemA gene encoding N-ethylmaleimide reductase from *Escherichia coli*. *Biol Pharm Bull* 20:110-112.
- Montpas, S., Samson, J., Langlois, E., Lei, J., Piché, Y. y Chenevert, R. 1997. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Serratia marcescens*. *Biotechnol Lett* 19:291-294.
- Mosqueda, G., Ramos-Gonzalez, M. I. y Ramos, J. L. 1999. Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization. *Gene* 232:69-76.
- Nadeau, L. J., He, Z. y Spain, J. C. 2003. Bacterial conversion of hydroxylamino aromatic compounds by both lyase and mutase enzymes involves intramolecular transfer of hydroxyl groups. *Appl Environ Microbiol* 69:2786-2793.
- Naumova, R. P., Selivanovskaia, S. y Cherepneva, I. E. 1988. [Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene during oxygen and nitrate respiration in *Pseudomonas fluorescens*]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 24:493-498.
- NDCEE. 1995. NDCEE pink water treatment options: national defense center for environmental excellence pink water treatment options. Technical report. Contract No. DAAA21-93-C-0046, p. 1-42.

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., Dusterhoft, A., Tummler, B. y Fraser, C. M. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4:799-808.

Nga, D. P., Altenbuchner, J. y Heiss, G. S. 2004. NpdR, a repressor involved in 2,4,6-trinitrophenol degradation in *Rhodococcus opacus* HL PM-1. *J Bacteriol* 186:98-103.

Nishino, S. F. y Spain, J. C. 1993. Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Appl Environ Microbiol* 59:2520-2525.

Nishino, S. F. y Spain, J. C. 2004. Catabolism of nitroaromatic compounds, p. 575-608. In Ramos, J. L. (ed.), *Pseudomonas*, vol. 3. Kluwer academic/Plenum Publishers, New York.

Nishino, S. F., Spain, J. C. y He, Z. 2000. Strategies for aerobic degradation of nitroaromatic compounds by bacteria: Process discovery to field application., p. 7-61. In Spain, J. C., Hughes, J. B. yKnackmuss, H.-J. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*. Lewis publishers, Boca Raton FL.

Nokhbeh, M. R., Boroumandi, S., Pokorny, N., Koziarz, P., Paterson, E. S. and I.B. Lambert. 2002. Identification and characterization of SnrA, and inducible oxygen-insensitive nitroreductase in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TA1535. *Mutation Res.* 508:59-70.

Norrander, J., Kempe, T. y Messing, J. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26:101-106 Oh, B. T., Sarath, G. y Shea, P. J. 2001. TNT nitroreductase from *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from TNT-contaminated soil. *Soil Biol Biochem* 33:875-881.

Oh, B. T., Shea, P. J., Drijber, R. A., Vasilyeva, G. K. y Sarath, G. 2003. TNT biotransformation and detoxification by a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Biodegradation* 14:309-319.

Oh, K. y Kim, Y. 1998. Degradation of explosive 2,4,6-trinitrotoluene by s-triazine degrading bacterium isolated from contaminated soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 61:702-708.

Ohmori, T., Hagiwara, S., Ueda, A., Minoda, Y. y Yamada, K. 1978. Production of pyoluteorin and its derivatives from n-paraffin by *Pseudomonas aeruginosa* S10B2. *Agric Biol Chem* 42:2031-2036.

Orville, A. M., Manning, L., Blehert, D. S., Fox, B. G. y Chambliss, G. H. 2004a. Crystallization and preliminary analysis of xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:1289-1291.

Orville, A. M., Manning, L., Blehert, D. S., Studts, J. M., Fox, B. G. y Chambliss, G. H. 2004b. Crystallization and preliminary analysis of xenobiotic reductase A and ligand complexes from *Pseudomonas putida* II-B. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:957-961.

- Padda, R. S., Wang, C., Hughes, J. B., Kutty, R. y Bennett, G. N. 2003. Mutagenicity of nitroaromatic degradation compounds. *Environ Toxicol Chem* 22:2293-2297.
- Pahel, G., Zelenetz, A. D. y Tyler, B. M. 1978. *gltB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 133:139-148.
- Pak, J. W., Knoke, K. L., Noguera, D. R., Fox, B. G. y Chambliss, G. H. 2000. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. *Appl Environ Microbiol* 66:4742-4750.
- Parales, R. E. 2000. Molecular biology of nitroarene degradation, p. 63-89. In Spain, J. C., Hughes, J. B. y Knackmuss, H.-J. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*. Lewis Publishers, Boca Raton FL.
- Parales, R. E., Ontl, T. A. y Gibson, D. T. 1997. Cloning and sequence analysis of a catechol 2,3-dioxygenase gene from the nitrobenzene-degrading strain *Comamonas* sp JS765. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:385-391.
- Park, H.-J., Reiser, C. O. A., Kondruweit, S., Erdmann, H., Schmid, R. M. y Sprinzl, M. 1992. Purification and characterization of a NADH oxidase from the thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *Eur. J. Biochem.* 205:881-885.
- Park, H. S. y Kim, H. S. 2000. Identification and characterization of the nitrobenzene catabolic plasmids pNB1 and pNB2 in *Pseudomonas putida* HS12. *J. Bacteriol.* 182:573-580.
- Paterson, E. S., Boucher, S. E. y Lambert, I. B. 2002. Regulation of the *nfsA* gene in *Escherichia coli* by SoxS. *J. Bacteriol.* 184:51-58.
- Pennington, J. C. y Patrick, J. W. H. 1990. Adsorption and desorption of 2,4,6-trinitrotoluene by soils. *J Environ Qual* 19:559-567.
- Peres, C. M. y Agathos, S. N. 2000. Biodegradation of nitroaromatic pollutants: from pathways to remediation. *Biotechnol Annu Rev* 6:197-220.
- Peterson, F. J., Mason, R. P., Hovsepian, J. y Holtzman, J. L. 1979. Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J. Biol. Chem.* 254:4009-4014.
- Pomposiello, P. J. y Bender, R. A. 1995. Activation of the *Escherichia coli* *lacZ* promoter by the *Klebsiella aerogenes* nitrogen assimilation control protein (NAC), a LysR family transcription factor. *J Bacteriol* 177:4820-4824.
- Popesku, J. T., Singh, A., Zhao, J. S., Hawari, J. y Ward, O. P. 2003. High TNT-transforming activity by a mixed culture acclimated and maintained on crude-oil-containing media. *Can J Microbiol* 49:362-366.
- Popesku, J. T., Singh, A., Zhao, J. S., Hawari, J. y Ward, O. P. 2004. Metabolite production during transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by a mixed culture acclimated and maintained on crude oil-containing media. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:739-746.

Preuss, A., Fimpel, J. y Diekert, G. 1993. Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Arch Microbiol 159:345-353.

Preuss, A. y Rieger, P. G. 1995. Anaerobic transformation of 2,4,6-TNT and other nitroaromatic compounds, p. 69-85. In Spain, J. C. (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds. Plenum Press, New York, NY.

Pritchard, P. H. y Costa, C. F. 1991. EPA's Alaska oil spill bioremediation project. Environ Sci Technol.

Rafii, F., Franklin, W., Heflich, R. H. y Cerniglia, C. E. 1991. Reduction of nitroaromatic compounds by anaerobic bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. Appl Environ Microbiol 57:962-968.

Rafii, F., Selby, A. L., Newton, R. K. y Cerniglia, C. E. 1994. Reduction and mutagenic activation of nitroaromatic compounds by a *Mycobacterium* sp. Appl Environ Microbiol 60:4263-4267.

Ramos, J. L., Haïdour, A., Delgado, A., Duque, E., Fandila, M. D. y Piñar, G. 1995. Potential of toluene-degrading systems for the construction of hybrid pathways for nitrotoluene metabolism, p. 53-68. In Spain, J. C. (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds. Plenum Press, New York NY.

Ramos, J. L., Wasserfallen, A., Rose, K. y Timmis, K. N. 1987. Redesigning metabolic routes: manipulation of TOL plasmid pathway for catabolism of alkylbenzoates. Science 235:593-596.

Rau, J. y Stolz, A. 2003. Oxygen-insensitive nitroreductases NfsA and NfsB of *Escherichia coli* function under anaerobic conditions as lawsone-dependent Azo reductases. Appl Environ Microbiol 69:3448-3455.

Reitzer, L. J. 1996a. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, D-alanine, p. 391-407. In Neidhart, F. C., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks, L. K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. y Umbarger, H. E. (ed.), *Escherichia coli* and Salmonella. Cellular and molecular biology, 2nd ed, vol. 1. ASM Press.

Reitzer, L. J. 1996b. Sources of nitrogen and their utilization. In Neidhart, F. C., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks, L. K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. y Umbarger, H. E. (ed.), *Escherichia coli* and Salmonella. Cellular and molecular biology, 2nd ed, vol. 1. ASM Press.

Rhys-Williams, W., Taylor, S. C. y Williams, P. A. 1993. A novel pathway for the catabolism of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas*. J Gen Microbiol 139:1967-1972.

Riefler, R. G. y Smets, B. F. 2002. NAD(P)H:flavin mononucleotide oxidoreductase inactivation during 2,4,6-trinitrotoluene reduction. Appl Environ Microbiol 68:1690-1696.

Rieger, P. G. y Knackmuss, H. J. 1995. Basic Knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil, p. 1-18. In Spain, J. C. (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds. Plenum Press, New York NY.

Roberts, D. J., Kaake, R. H., Funk, S. B., Crawford, D. L. y Crawford, R. L. 1997. Biorrecuperación anaerobia a escala real de suelos contaminados con DINOSEB., p. 221-247. In Levin y Gealt (ed.), Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Mc Graw Hill.

- Robertson, B. K. y Jjemba, P. K. 2005. Enhanced bioavailability of sorbed 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by a bacterial consortium. *Chemosphere* 58:263-270.
- Robidoux, P. Y., Hawari, J., Thiboutot, S., Ampleman, G. y Sunahara, G. I. 1999. Acute toxicity of 2,4,6-trinitrotoluene in earthworm (*Eisenia andrei*). *Ecotoxicol Environ Saf* 44:311-321.
- Rodgers, J. D. y Bunce, N. J. 2001. Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives. *Water Res* 35:2101-2111.
- Roldan, M. D., Blasco, R., Caballero, F. J. y Castillo, F. 1998. Degradation of p-nitrophenol by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Arch Microbiol* 169:36-42.
- Rügge, K., Hofstetter, T. B., Haderlein, S. B., Bjerg, P. L., Knudsen, S., Zraunig, C., Mosbaek, H. y Christensen, T. H. 1998. Characterization of predominant reductants in an anaerobic leachate-contaminated aquifer by nitroaromatic probe compounds. *Environ Sci Technol* 32:23-31.
- Saito, K., Thiele, D. J., Davio, M., Lockridge, O. y Massey, V. 1991. The cloning and expression of a gene encoding Old Yellow Enzyme from *Saccharomyces carlsbergensis*. *J Biol Chem* 266:20720-20724.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sarlauskas, J., Nemeikaite-Ceniene, A., Anusevicius, Z., Miseviciene, L., Julvez, M. M., Medina, M., Gomez-Moreno, C. y Cenas, N. 2004. Flavoenzyme-catalyzed redox cycling of hydroxylamino- and amino metabolites of 2,4,6-trinitrotoluene: implications for their cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys*. 425:184-192.
- Sanchez-Romero, J. M., Diaz-Orejas, R. y De Lorenzo, V. 1998. Resistance to tellurite as a selection marker for genetic manipulations of *Pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol* 64:4040-4046.
- Savolainen, H., Tenhunen, R. y Harkonen, H. 1985. Reticulocyte haem synthesis in occupational exposure to trinitrotoluene. *Br J Ind Med* 42:354-355.
- Schackmann, A. y Muller, R. 1991. Reduction of nitroaromatic compounds by different *Pseudomonas* species under aerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*:809-813.
- Schenll, S. y Schink, B. 1992. Anaerobic degradation of 3-aminobenzoate by a newly isolated sulfate reducer and a methanogenic enrichment culture. *Arch Microbiol* 158:328-334.
- Schrader, P. S. y Hess, T. F. 2004. Coupled Abiotic-Biotic Mineralization of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) in Soil Slurry. *J Environ Qual* 33:1202-1209.
- Sembries, S. y Crawford, R. L. 1997. Production of *Clostridium bifermentans* spores as inoculum for bioremediation of nitroaromatic contaminants. *Appl Environ Microbiol* 63:2100-2104.

Sens, C., Scheidemann, P. y Werner, D. 1999. The contribution of ¹⁴C-TNT in different biochemical compartments of the monocotyledonous *Triticum aestivum*. *Environ Pollut* 104:113-119.

Shen, C. F., Hawari, J. A., Ampleman, G., Thiboutot, S. y Guiot, S. R. 2000. Origin of p-cresol in the anaerobic degradation of trinitrotoluene. *Can J Microbiol* 46:119-124.

Shim, C. Y. y Crawford, D. L. 1995. Biodegradation of trinitrotoluene by a strain of *Clostridium bifermentans*, p. 57-69. In Hinchee, E., Fredrickson, J. y Alleman, B. C. (ed.), *Bioaugmentation for site remediation*. Battelle Press, Columbus, Ohio.

Shu, C. J. y Zhulin, I. B. 2002. AN TAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* 27:3-5.

Snape, J. R., Walkley, N. A., Morby, A. P., Nicklin, S. y White, G. F. 1997. Purification, properties, and sequence of glycerol trinitrate reductase from *Agrobacterium radiobacter*. *J Bacteriol* 179:7796-7802.

Snell, F. D. y Snell, C. T. 1949. p. 804-805, *Colorimetric methods of analysis*, vol. 3. van Nostrand Co., New York.

Snellinx, Z., Nepovim, A., Taghavi, S., Vangronsveld, J., Vanek, T. y van der Lelie, D. 2002. Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. *Environ Sci Pollut Res Int* 9:48-61.

Somerville, C. C., Nishino, S. F. y Spain, J. C. 1995a. Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J Bacteriol* 177:3837-3842.

Somerville, C. C., Nishino, S. F. y Spain, J. C. 1995b. Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J. Bacteriol.* 177:3837-3842.

Sonawane, A., Kloppner, U., Hovel, S., Volker, U. y Rohm, K. H. 2003. Identification of *Pseudomonas* proteins coordinately induced by acidic amino acids and their amides: a two-dimensional electrophoresis study. *Microbiology* 149:2909-2918.

Sonawane, A. M. y Rohm, K. H. 2004. A functional *gltB* gene is essential for utilization of acidic amino acids and expression of periplasmic glutaminase/asparaginase (PGA) by *Pseudomonas putida* KT2440. *Mol Genet Genomics* 271:33-39.

Spain, J. C. 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu Rev Microbiol* 49:523-555.

Spain, J. C. 2000. p. 1-5. In Spain, J. C., Hughes, J. B. y Knackmuss, H.-J. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*. Lewis Publishers, Boca Raton FL.

Spanggord, R. J., Mortelmans, K. E., Griffin, A. F. y Simmon, V. F. 1982. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and structure-activity relationships of wastewater components emanating from the manufacture of trinitrotoluene. *Environ Mutagen* 4:163-179.

- Spangford, R. J., Spain, J. C., Nishino, S. F. y Mortelmans, K. E. 1991. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. *Appl Environ Microbiol* 57:3200-3205.
- Spangford, R. J., Stewart, K. R. y Riccio, E. S. 1995. Mutagenicity of tetranitroazoxytoluenes: a preliminary screening in *Salmonella typhimurium* strains TA100 and TA100NR. *Mutat Res* 335:207-211.
- Spies, T., Desiere, F., Fischer, P., Spain, J. C., Knackmuss, H. J. y Lenke, H. 1998. A new 4-nitrotoluene degradation pathway in a *Mycobacterium* strain. *Appl Environ Microbiol* 64:446-452.
- Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N. y Napoli, C. 1987. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* 169:5789-5794.
- Stewart, V. 1994. Regulation of nitrate and nitrite reductase synthesis in enterobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66:37-45.
- Studholme, D. J. y Dixon, R. 2003. Domain architectures of sigma54-dependent transcriptional activators. *J Bacteriol* 185:1757-1767.
- Styles, J. A. y Cross, M. F. 1983. Activity of 2,4,6-trinitrotoluene in an in vitro mammalian gene mutation assay. *Cancer Lett* 20:103-108.
- Suen, W. C., Haigler, B. E. y Spain, J. C. 1996. 2,4-Dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT: similarity to naphthalene dioxygenase. *J Bacteriol* 178:4926-4934.
- Suen, W. C. y Spain, J. C. 1993. Cloning and characterization of *Pseudomonas* sp. strain DNT genes for 2,4-dinitrotoluene degradation. *J Bacteriol* 175:1831-1837.
- Sufita, J. M., Gibson, S. A. y Beeman, R. E. 1988. Anaerobic biotransformation of pollutant chemicals in aquifers. *J Ind Microbiol* 3:179-194.
- Tadros, M. G., Crawford, A., Mateo-Sullivan, A., Zhang, C. y Hughes, J. B. 2000. Toxic effects of hydroxylamino intermediates from microbial transformation of trinitrotoluene and dinitrotoluenes on algae *Selenastrum capricornutum*. *Bull Environ Contam Toxicol* 64:579-585.
- Tan, E. L., Ho, C. H., Griest, W. H. y Tyndall, R. L. 1992. Mutagenicity of trinitrotoluene and its metabolites formed during composting. *J Toxicol Environ Health* 36:165-175.
- Tanna, J. J., Lei, B., Tu, S. C. y Kirause, K. L. 1996. Flavin reductase P: structure of a dimeric enzyme that reduces flavin. *Biochemistry* 42:13531-13539.
- Tchounwou, P. B., Wilson, B. A., Ishaque, A. B. y Schneider, J. 2001. Transcriptional activation of stress genes and cytotoxicity in human liver carcinoma cells (HepG2) exposed to 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, and 2,6-dinitrotoluene. *Environ Toxicol* 16:209-216.
- Tharakan, J. P. y Gordon, J. A. 1999. Cometabolic biotransformation of trinitrotoluene (TNT) supported by aromatic and non-aromatic cosubstrates. *Chemosphere* 38:1323-1330.

Thischler, M., Ayer, S. W. y Andersen, R. J. 1986. Nitrophenols from northeast Pacific bryozoans. *Com Biochem Physiol Ser. B.* 84:43-45.

Thorn, J. M., Barton, J. D., Dixon, N. E., Ollis, D. L. y Edwards, K. J. 1995. Crystal structure of *Escherichia coli* QOR quinone oxidoreductase complexed with NADPH. *J Mol Biol* 249:785-799.

Thorn, K. A. y Kennedy, K. R. 2002. ¹⁵N NMR investigation of the covalent binding of reduced TNT amines to soil humic acid, model compounds, and lignocellulose. *Environ Sci Technol* 36:3787-3796.

Tiukina, G. A. 1967. [Some peculiarities of the clinical aspects of trinitrotoluene cataract]. *Vestn Oftalmol* 80:43-47.

Traxler, R. W., Wood, E. y Delaney, J. M. 1974. Bacterial degradation of alpha-TNT. *Dev.Ind.Microbiol.* 16 :71-76.

Tyler, B. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Annu Rev Biochem* 47:1127-1162.

Urbanski, T. 1985. *Chemistry and Technology of Explosives*. Pergamon Press, Oxford.

USAEC, U. S. A. E. C. 1999a. Cost and design for application of biotreatment technologies for explosives contaminated soil. In aec.www.apgea.army.mil:8080/prod/usaec/et/restro/cstdsgno.html. (ed.).

USAEC, U. S. A. E. C. 1999b. Windrow composting of explosives-contaminated soil. In aec.www.apgea.army.mil:8080/prod/usaec/et/restro/windrow.html. (ed.).

Vaatanen, A. K., Ridanpaa, M., Norppa, H. y Kociba, P. 1997. Spectrum of spontaneous and 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)-induced mutations in *Salmonella typhimurium* strains with different nitroreductase and O-acetyltransferase activities. *Mutat Res* 379:185-190.

Vanderberg, L. A., Perry, J. J. y Unkefer, P. J. 1995. Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:937-945.

Veronese, F. M., Boccu, E. y Conventi, L. 1975. Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: induction, purification and properties of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 377:217-228.

Vieira, J. y Messing, J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-268.

Vila, M., Pascal-Lorber, S., Rathahao, E., Debrauwer, L., Canlet, C. y Laurent, F. 2005. Metabolism of [¹⁴C]-2,4,6-trinitrotoluene in tobacco cell suspension cultures. *Environ Sci Technol* 39:663-672.

Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P. y Knackmuss, H. J. 1994. Identification of a hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. *J Bacteriol* 176:932-934.

Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., Spain, J. C. y Knackmuss, H.-J. 1998. Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol* 64:246-252.

Walker, K. C. y Kaplan, D. L. 1992. Biological degradation of explosives and chemicals agents. *Biodegradation* 3:369-385.

Wang, C., Lyon, D. Y., Hughes, J. B. y Bennett, G. N. 2003. Role of hydroxylamine intermediates in the phytotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Myriophyllum aquaticum*. *Environ Sci Technol* 37:3595-3600.

Warburg, O. y Christian, W. 1932. Ein Zweites sauerstoffübertragenders Ferment und sein absorptionspektrum. *Naturwissenschaften* 20:688.

Watanabe, M., Jr., I. M. y Nohmi, T. 1990. Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene. *Nucl. Acids Res.* 18:1059.

Watrous, M. M., Clark, S., Kutty, R., Huang, S., Rudolph, F. B., Hughes, J. B. y Bennett, G. N. 2003. 2,4,6-trinitrotoluene reduction by an Fe-only hydrogenase in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* 69:1542-1547.

Weiss, M., Geyer, R., Gunther, T. y Kaestner, M. 2004a. Fate and stability of ¹⁴C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene in contaminated soil following microbial bioremediation processes. *Environ Toxicol Chem* 23:2049-2060.

Weiss, M., Geyer, R., Russow, R., Richnow, H. H. y Kastner, M. 2004b. Fate and metabolism of [¹⁵N]2,4,6-trinitrotoluene in soil. *Environ Toxicol Chem* 23:1852-1860.

Williams, R. E. y Bruce, N. C. 2000. The role of nitrate ester reductase enzymes in the biodegradation of explosives, p. 161-184. In Spain, J. C., J.B., H. yH.-J., K. (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*. Lewis Publishers, Boca Raton Fl.

Williams, R. E. y Bruce, N. C. 2002. 'New uses for an Old Enzyme'--the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes. *Microbiology* 148:1607-1614.

Williams, R. E., Rathbone, D. A., Scrutton, N. S. y Bruce, N. C. 2004. Biotransformation of explosives by the old yellow enzyme family of flavoproteins. *Appl Environ Microbiol* 70:3566-3574.

Wilson, D. K., Bohren, K. M., Gabbay, K. H. y Quijcho, F. A. 1992. An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science* 257:81-84.

Wilson, S. A., Wachira, S. J. M., Norman, R. A., Pearl, L. H. y Drew, R. E. 1996. Transcription antitermination regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* amidase operon. *Embo J* 15:5907-5916.

Wolper, M. K., Althams, J. R. y Johns, D. G. 1973. Nitroreductase activity of mammalian liver aldehyde oxidase. *J Pharmacol Exp Ther* 185:202-213.

Won, W. D., and L.H.N.J. Disalvo. 1976. Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environ. Microbiol* 31:576-580.

Zacariah, P. K. y Juchau, M. R. 1974. The role of gut flora in the reduction of nitro groups. *Drug Metabolism and Disposition* 2:74-78.

Zaripov, S. A., Naumov, A. V., Abdrakhmanova, J. F., Garusov, A. V. y Naumova, R. P. 2002. Models of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) initial conversion by yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 217:213-217.

Zenno, S., H., K., M., T. y K., S. 1996a. Gene cloning, purification and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties to FracI, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*. *J. Biochem.* 120:736-744.

Zenno, S., Koike, H., Kumar, A. N., Jayaraman, R., Tanokumura, M. y Saigo, K. 1996b. Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase. *J. Bacteriol.* 178:4508-4514.

Zenno, S., Saigo, K., Kanoh, H. y Inouye, S. 1994. Identification of the gene encoding the major NAD(P)H-flavin oxidoreductase of the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J. Bacteriol.* 176:3536-3543.

Zimmer, D. P., Soupene, E., Lee, H. L., Wendisch, V. F., Khodursky, A. B., Peter, B. J., Bender, R. A. y Kustu, S. 2000. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14674-14679.

Zitting, A., Szumanska, J., Nickels, J. y Savolainen, H. 1982. Acute toxic effects of trinitrotoluene on rat brain, liver and kidney: Role of radical production. *Arch Toxicol* 51:53-64.

