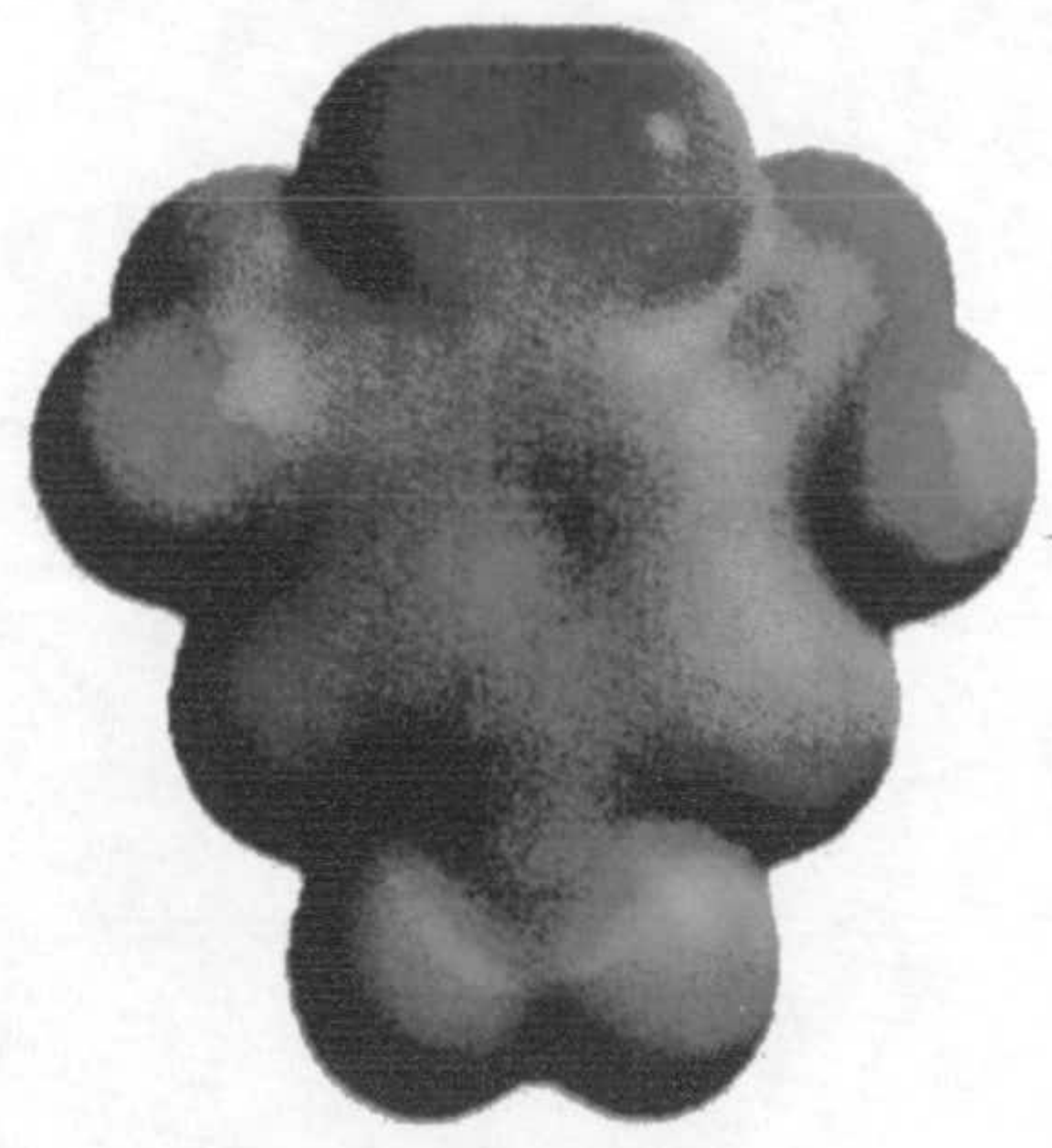
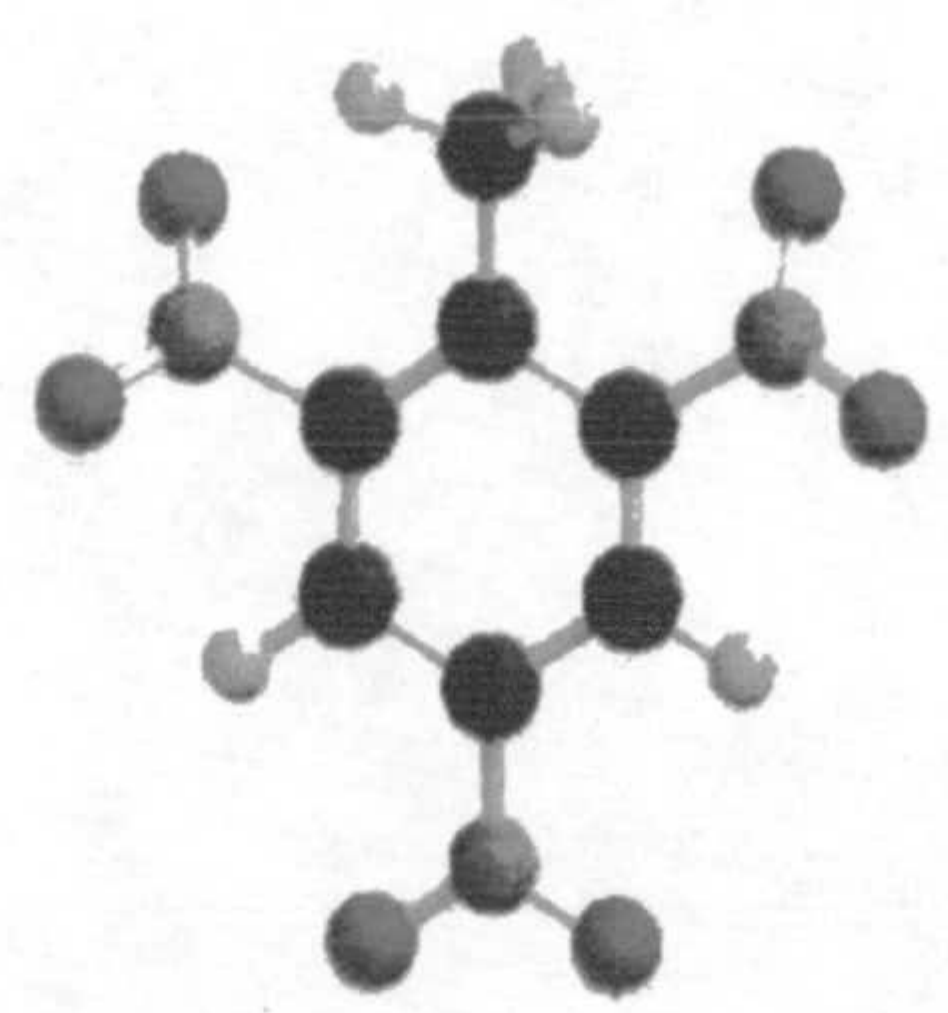
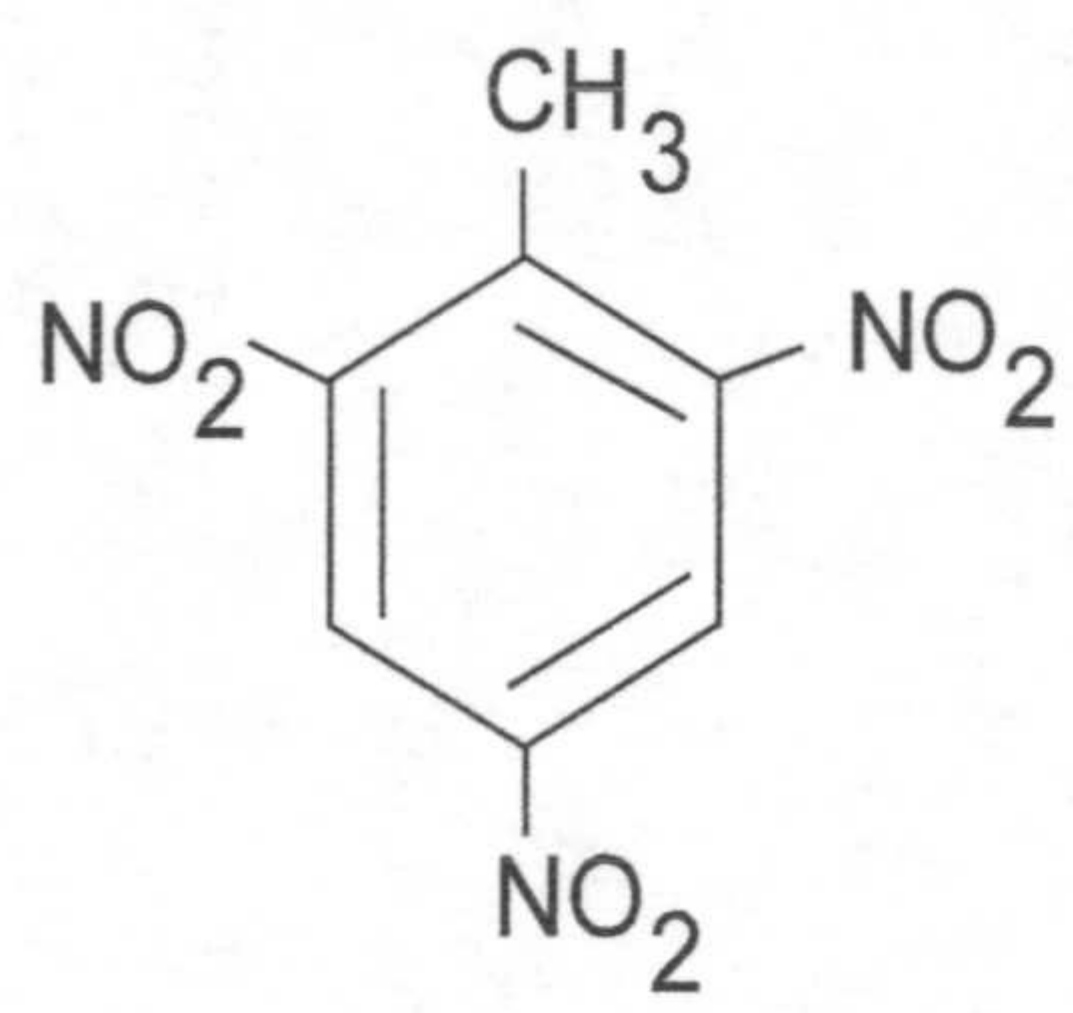


~~T. P. 24/94~~  
4169

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA  
Nº Documento 613377437  
Nº Copia 15496958

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 16/5/00  
ENTRADA NUM. 1750

# Metabolismo anaerobio del explosivo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) por bacterias del género *Pseudomonas*



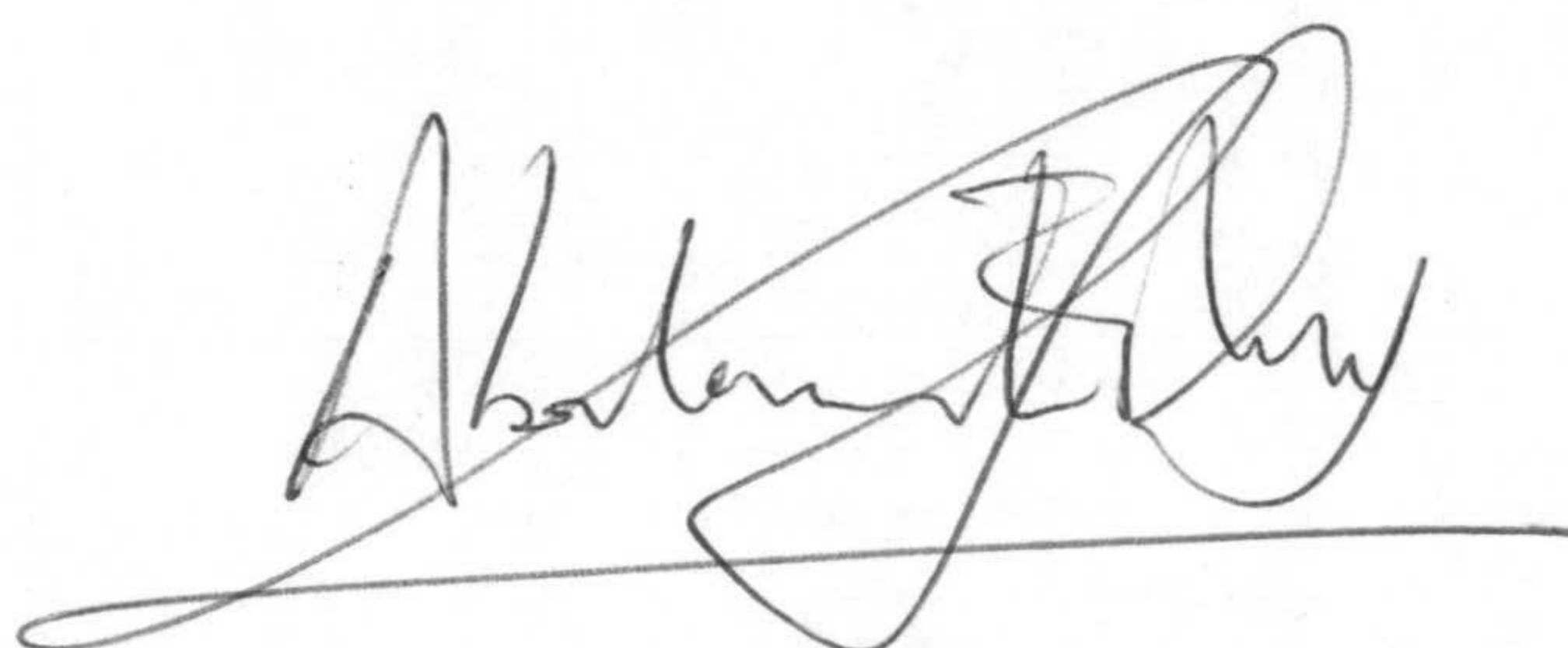
UNIVERSIDAD DE GRANADA  
9 / MAYO 2000  
COMISION DE DOCTORADO

Abraham Esteve Núñez  
UNIVERSIDAD DE GRANADA  
2000



METABOLISMO ANAEROBIO DEL EXPLOSIVO 2,4,6-TRINITROTOLUENO (TNT)  
POR BACTERIAS DEL GÉNERO *Pseudomonas*.

Memoria que presenta el licenciado  
en Bioquímica, Abraham Esteve Núñez,  
para aspirar al Título de Doctor



Fdo.: Abraham Esteve Núñez

V°B°

El director



Fdo.: Juan Luis Ramos Martín  
Doctor en Biología  
Investigador Científico del CSIC

Universidad de Granada

2000



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en la Unidad Estructural  
de Bioquímica y Biología Celular de Plantas  
de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), de Granada.



**ÍNDICE**

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Los microorganismos como instrumentos de descontaminación	4
2. El metabolismo bacteriano anaerobio de compuestos aromáticos	6
2.1 La ruta del benzoil-CoA	8
2.2 Las rutas del resorcinol y del floroglucinol	9
3. El TNT como contaminante del medio ambiente	10
3.1 La química del TNT	11
3.2 El TNT como compuesto tóxico	17
3.3 El TNT en el medio ambiente	18
4. La biodegradación del TNT por microorganismos	19
4.1 Metabolismo aerobio de TNT por bacterias	20
4.2 El metabolismo anaerobio bacteriano de TNT.	29
4.3 El metabolismo fúngico del TNT	35
4.4 Aplicaciones en la biorrecuperación de ambientes contaminados en TNT	39
<b>OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
1. Cepas bacterianas y su conservación	55
2. Medios y condiciones de cultivos	56
2.1 Medios de cultivo	56
2.2 Condiciones de los cultivos.	58
2.2.1 Cultivos en medios sólidos.	58
2.2.2 Cultivos semisólidos anóxicos	58
2.2.3 Cultivos líquidos aerobios	59
2.2.4 Cultivos líquidos en anaerobiosis	59
3. Microscopía electrónica de transmisión	60
3. Plásmidos	61
4. Aislamiento de ADN plasmídico	65
4.1 Método de la lisis alcalina (preparación a pequeña escala)	65
4.2. Método "QUIApreps"	66
5. Aislamiento de ADN total	66
6. Transferencia de plásmidos por conjugación	67



7. Técnicas comunes de manipulación de ADN	67
7.1. Restrición de ADN	67
7.2 Electroforesis de ADN	68
7.3. Recuperación de fragmentos de ADN de los geles de agarosa	69
7.4. Transformación de células de <i>E. coli</i>	69
7.5. Secuenciación de ADN	69
7.6. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termo- rresistente (“PCR”)	69
7.7. Transferencia de ADN a membrana e hibridación (“Southern blotting”)	72
7.8 Ligación de ADN	72
7.9 Tratamiento y análisis de secuencias	73
8. Métodos analíticos	74
8.1. Determinación de nitrito	74
8.2 Determinación de glucosa	74
8.3 Determinación de amonio	75
8.4 Determinación de proteína	75
8.4.1 Determinación de proteína por el método de Bradford	75
8.4.2 Determinación de proteína por el método de Lowry	75
8.5. Determinación del contenido de nitrógeno en biomasa bacteriana	76
9. Análisis de intermedios metabólicos en la degradación de TNT	76
9.1 Síntesis orgánica de algunos intermedios de la ruta	76
9.2 Extracción de compuestos aromáticos de cultivos bacterianos	78
9.3 Técnicas de análisis cromatográfico y espectroscópico	79
9.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	79
9.3.2 Cromatografía de gases y Espectrometría de Masas	82
9.3.4 Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( <sup>1</sup> H-RMN)	83
10. Preparación de extractos libres de células	83
11. Medida de actividades enzimáticas	83
11.1 Ensayo de la actividad nitrito reductasa en <i>Pseudomonas</i> sp.JLR11	83
11.1.1 Ensayos <i>in vitro</i> con extractos libres de células	84
11.1.2 Ensayos de detección de la actividad en geles nativos	



de proteínas	84
11.3 Ensayos de detección de la actividad hidroxilamina reductasa en geles nativos de proteínas	85
11.2 Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad nitroreductasa en extractos libres de células de <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	85
12. Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA)	86
12.1 Separación electroforética en condiciones desnaturalizantes (EGPA-SDS)	86
12.2 Separación electroforética en condiciones no desnaturalizantes (EGPA-nativo)	87
13 Ensayos de mineralización de $^{14}\text{C}$ -TNT	88
13.1 Síntesis de $^{14}\text{C}$ -TNT	88
13.2. Ensayo de mineralización de $^{14}\text{C}$ -TNT	89
13.3 Distribución del $^{14}\text{C}$ en el cultivo bacteriano	90
14. Medidas de translocación de protones	90
15. Preparación de vesículas	92
16. Medida de fosforilación oxidativa	93
<b>RESULTADOS</b>	<b>95</b>
<b>CAPÍTULO I Aislamiento y caracterización de una bacteria capaz de utilizar 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como única fuente de nitrógeno en condiciones anóxicas</b>	<b>97</b>
1. Aislamiento de una bacteria capaz de utilizar 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como única fuente de nitrógeno en condiciones anóxicas	99
2. Caracterización de la cepa JLR11	100
2.1 Identificación taxonómica de la cepa JLR11 como perteneciente al género <i>Pseudomonas</i>	100
2.2 Ensayos de resistencia/sensibilidad a diferentes antibióticos	100
2.3 Ultraestructura de <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	102
2.4 Perfil de sustratos de <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	104
2.4.1 Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11 con distintas fuentes de nitrógeno inorgánico	104



2.4.2 Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11 con distintos compuestos nitroaromáticos como fuente de nitrógeno	105
2.4.3 Crecimiento de <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11 con distintas fuentes de carbono	107
3. <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11 tolera elevadas cargas de TNT	107
4. Optimización y caracterización del metabolismo de TNT por <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	108
4.1 Ensayos de degradación microaerobia de TNT por <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	109
4.2 Ensayos de degradación anaerobia de TNT por <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	110
4.3 Balance de nitrógeno en el metabolismo de TNT por <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	113
4.4 Ensayos sobre el metabolismo anaerobio de <sup>14</sup> C-TNT	115
<b>CAPÍTULO II. Elucidación de la ruta catabólica anaerobia del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) por <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11</b>	<b>117</b>
1. Análisis de los metabolitos acumulados en el sobrenadante de cultivo anaerobios	119
1.2 Análisis de los metabolitos extraídos de sobrenadantes mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a un detector Diodo Array (DAD)	120
1.3 Análisis de los metabolitos extraídos de sobrenadantes de cultivos mediante Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (EIMS)	126
1.4 Análisis de metabolitos extraídos de sobrenadantes de cultivos por Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( <sup>1</sup> H-RMN)	136
2. Determinación de actividades enzimáticas en extractos libres de células de <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	137
2.1 Determinación de la actividad nitroreductasa de TNT	138
2.2. Determinación de la actividad nitrito reductasa en extractos libres de células	141
3. Obtención y caracterización de un mutante de <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11 incapaz de usar TNT como fuente de nitrógeno.	145
3.1 Obtención del mutante P12E2 de <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11 incapaz de usar	
3.2 TNT como fuente de nitrógeno.	145



---

3.2 Caracterización fisiológica del mutante P12E2	146
3.3 Clonación y secuenciación de la región de ADN adyacente a la inserción del <i>miniTn5</i> -telurito	153
<b>CAPITULO III. Respiración de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) en condiciones anóxicas por <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11</b>	<b>159</b>
1. Ensayos fisiológicos con TNT como aceptor final de electrones	161
3. Translocación <i>in situ</i> de protones en células cultivadas con TNT como aceptor de electrones en condiciones anóxicas	163
4. Síntesis <i>in vitro</i> de ATP acoplada a la reducción de TNT en vesículas de <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	167
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>171</b>
1. El aislamiento y la caracterización de <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	173
2. <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11 degrada eficazmente TNT en condiciones anaerobias	177
3. Elucidación de la ruta catabólica anaerobia de TNT por <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	178
4. El metabolismo del nitrito en la degradación de TNT por <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	185
5. Respiración de TNT en <i>Pseudomonas</i> sp. JLR11	189
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>197</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>201</b>



## Introducción



Uno de los rasgos característicos de la sociedad moderna es la gran producción de compuestos de síntesis. Muchos de estos compuestos son xenobióticos, y presentan estructuras o substituyentes que no se encuentran en los productos naturales por lo que resultan difíciles de degradar y/o son tóxicos para el medio ambiente.

Durante muchos años la solución para el tratamiento de residuos tóxicos consistía en almacenar el material en vertederos dotados con recubrimientos geosintéticos y sistemas de drenaje y contención para evitar filtraciones a las aguas subterráneas. La separación de los materiales tóxicos y su transporte, así como la disminución de espacio disponible, constituyen los principales inconvenientes del uso de vertederos destinados a almacenar este tipo de compuestos. En la actualidad, existe un rechazo público respecto a la utilización de este tipo de instalaciones a largo plazo. La posibilidad de que se den unas condiciones de almacenaje insuficientes y de que se produzca una posible lixiviación al suelo o a las aguas subterráneas, ha incrementado el nivel de inquietud pública. La incineración soluciona el problema del espacio en los vertederos pero en la combustión de residuos se generan gases que pueden ser extremadamente tóxicos, con el consiguiente peligro de contaminación atmosférica.

En los procesos naturales de degradación, son los microorganismos los responsables de eliminar el material orgánico, incorporándolo a sus propias estructuras vitales (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y mineralizándolos al convertirlos en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Estos mismos principios son aplicables a la degradación de compuestos tóxicos y recalcitrantes por parte de bacterias y hongos.



## **1. Los microorganismos como instrumentos de descontaminación**

Los microorganismos tienen un amplio repertorio de recursos metabólicos que les permiten degradar un amplio espectro de contaminantes orgánicos y que ha sido descrito frecuentemente en la literatura científica (Gibson, 1984; Abramowicz, 1990; Chandry y Chapalamadugin, 1991; Cerniglia, 1992; Knackmuss, 1996).

La biorrecuperación es el tratamiento por el que ambientes naturales (suelos, acuíferos, etc.) son descontaminados mediante el uso de microorganismos. La aplicación de técnicas de biorrecuperación se considera, cada vez más, como una forma de descontaminación en ambientes naturales, debido a las ventajas prácticas y económicas que ofrece su utilización (Tabla 1). Se han descrito numerosos casos que documentan la biorrecuperación de aguas subterráneas y suelos afectados por diversos contaminantes ambientales (Suflita *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1997; Kaufman y Kemer, 1997; Meckenstock *et al.*, 1999).

**Tabla 1. Comparación de distintos métodos de tratamiento de zonas contaminadas.**

<b>Tipo de tratamiento</b>	<b>Coste por metro cúbico (\$)</b>	<b>Tiempo necesario (meses)</b>	<b>Factores adicionales</b>	<b>Cuestiones de seguridad</b>
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

<sup>a</sup> Tabla adaptada de Levin y Gealt, (1997).



Las agencias de Protección Medioambiental también han contribuido, por su parte, al crecimiento continuado de tecnología de biorrecuperación; especialmente debido al tratamiento que se realizó con éxito, en las playas de Prince Williams Sond (Alaska) contaminadas por el derrame del petrolero Exxon Valdez en los años 80s (Pritchard, 1997).

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

Todas estas estructuras aromáticas resultan ser muy estables (Aihura, 1992), por lo que los microorganismos deben recurrir a un mecanismo que disminuya la energía de resonancia del anillo; esto permite su apertura y poder utilizar 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  $O_2$  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.*, 2000) o plasmídica (Ramos y Timmis, 1987; Harayama y Timmis, 1989).

El crecimiento de estos microorganismos, así como el desarrollo de sus actividades metabólicas específicas sobre los contaminantes, depende de la disponibilidad de oxígeno. Aunque, normalmente, su presencia no es limitante en los niveles superiores en la columna de agua, de ambientes marinos y de agua dulce, la disponibilidad de oxígeno en suelos, sedimentos y acuíferos, a menudo, sí es un factor limitante (Atlas, 1997). Cuando los contaminantes llegan al nivel freático y han contaminado los acuíferos, la disponibilidad de oxígeno es el principal problema de la biorecuperación. La solubilidad del oxígeno en el agua es baja y la demanda de oxígeno para la degradación de hidrocarburos es 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. 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).

En el contexto de esta memoria de tesis doctoral, se hace necesario prestar una especial atención al metabolismo bacteriano anaerobio de compuestos aromáticos.

## **2. El metabolismo bacteriano anaerobio de compuestos aromáticos**

La mayoría de las reacciones con implicaciones energéticas en los seres vivos son reacciones redox, en las que un sustrato es oxidado y otro es reducido. Los organismos aerobios heterótrofos utilizan un compuesto orgánico como donador de electrones y al



oxígeno molecular como aceptor. Muchas bacterias son capaces de vivir en condiciones anóxicas oxidando la materia orgánica que les rodea al utilizar, como aceptores de electrones, sustratos orgánicos o inorgánicos que abundan en la naturaleza: nitrato, nitrito, sulfato, óxidos de manganeso, óxidos de hierro, ácidos húmicos, dióxido de carbono.

La importancia de la biodegradación anaerobia de la biomasa en el ciclo global de la materia orgánica es difícil de estimar, ya que los productos reducidos del metabolismo anaerobio ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{SH}_2$  y  $\text{CH}_4$ ) son reoxidados por otros microorganismos presentes en su lugar de formación. Pero teniendo en cuenta que los tractos digestivos de todos los animales son casi completamente anóxicos, se podría asumir que entre el 20 y el 40% de la biomasa mundial total podría ser degradada a través de procesos anaerobios (Schink, *et al.*, 1992).

Las primeras evidencias sobre el metabolismo anaerobio de compuestos aromáticos por bacterias fueron presentadas por Tarvin y Buswell (1936); pero no sería hasta los 60s cuando apareciesen los primeros estudios bioquímicos de mecanismos enzimáticos sobre anillos aromáticos, sin intervención de oxígeno (Hegeman, 1967; Guyer y Hegeman, 1969). La aparición de técnicas microbiológicas que permitieran mejorar las condiciones de aislamiento y cultivo de estas bacterias contribuyó de forma decisiva al desarrollo del descubrimiento de microorganismos con nuevas capacidades catabólicas (Hungate, 1969).

La degradación de compuestos aromáticos en ausencia de oxígeno requiere de un metabolismo bioquímico diferente del utilizado por los aerobios y los mecanismos implicados han sido ampliamente revisados (Schink *et al.*, 1992; Harwood *et al.*, 1997; Heider y Fuchs, 1997).



Las bacterias anaerobias tienen que recurrir a un metabolismo reductivo para la degradación de compuestos aromáticos. Se conocen tres diferentes rutas que difieren en los intermediarios aromáticos previos a la reacción de desaromatización y que son independientes del aceptor final de electrones que utilice

### **2.1 La ruta del benzoil-CoA.**

Diversos compuestos aromáticos con distintos grupos funcionales son metabolizados a través de esta ruta. Los grupos del anillo son eliminados hasta obtener la molécula de benzoil-CoA, el intermediario clave en la degradación anaerobia de compuestos aromáticos (Figura 1). La presencia del grupo acetil-CoA activa el anillo permitiendo la reducción de los dobles enlaces por parte de una benzoil-CoA reductasa (Boll y Fuchs, 1995); con ella se obtiene, finalmente, una estructura abierta lineal que es metabolizada hasta acetil-CoA y CO<sub>2</sub>. La enzimología de los procesos de reducción del anillo y los genes implicados han sido revisados recientemente (Heider *et al.*, 1998, Breese *et al.*, 1998).



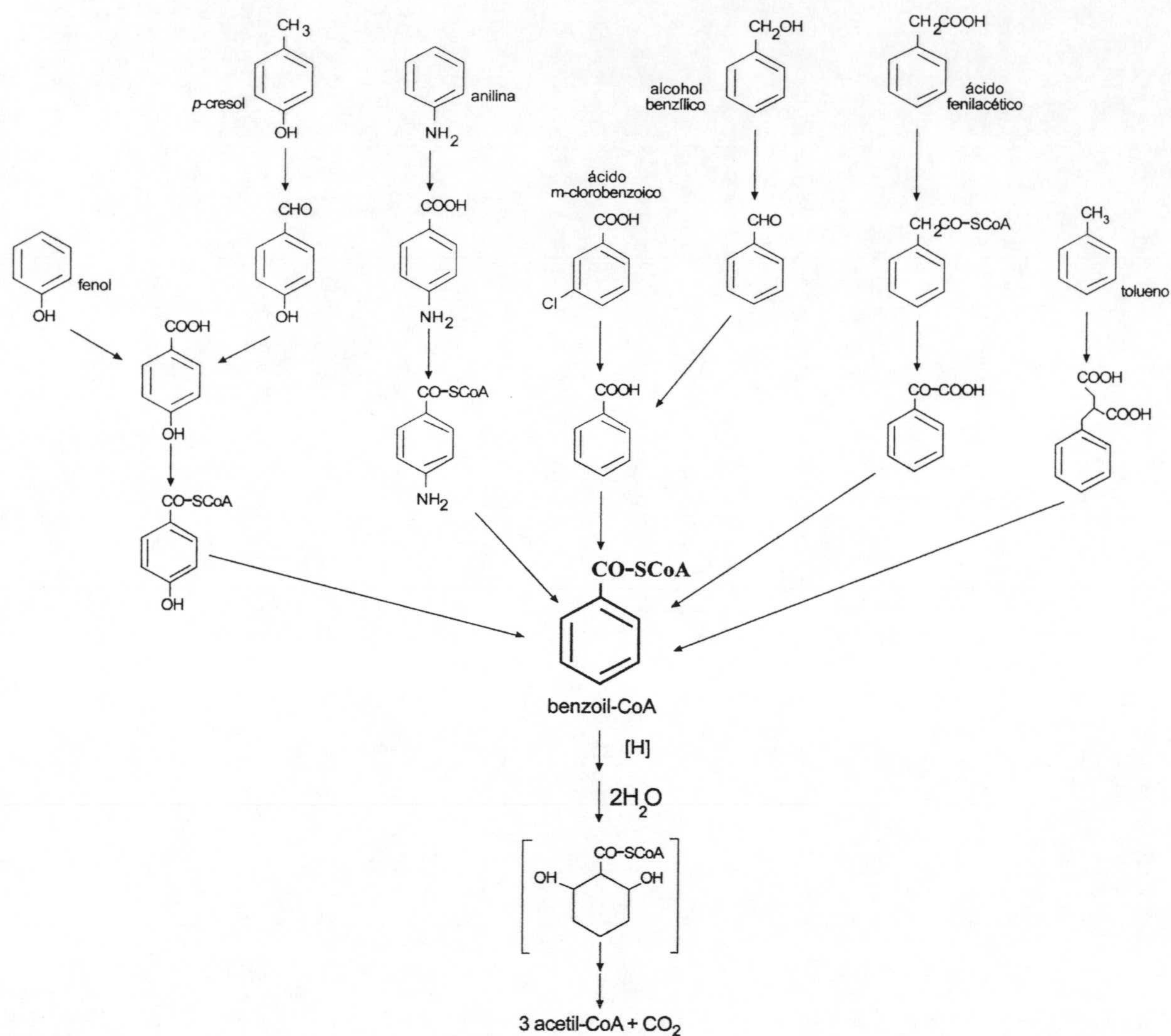


Figura 1 Mecanismos para la degradación anaerobia de distintos compuestos aromáticos vía benzoil-CoA.

## 2.1 Las ruta del resorcinol y del floroglucinol

El floroglucinol y el resorcinol no necesitan activación para ser reducidos a compuesto no aromáticos (Figura 2). Estos aromáticos hidroxilados, pueden ser reducidos hasta acetato y butirato sin requerir un aceptor de electrones externo; esto hace que puedan



ser utilizados, incluso, por organismos fermentativos estrictos como *Pelobacter* y *Clostridium sp.* (Tschech y Schink, 1985; Kluge *et al.*, 1990; Brune y Schink, 1992).

El resorcinol también puede sufrir una ruptura hidrolítica, que sólo se ha descrito en bacterias denitrificantes (Gorny *et al.*, 1992).

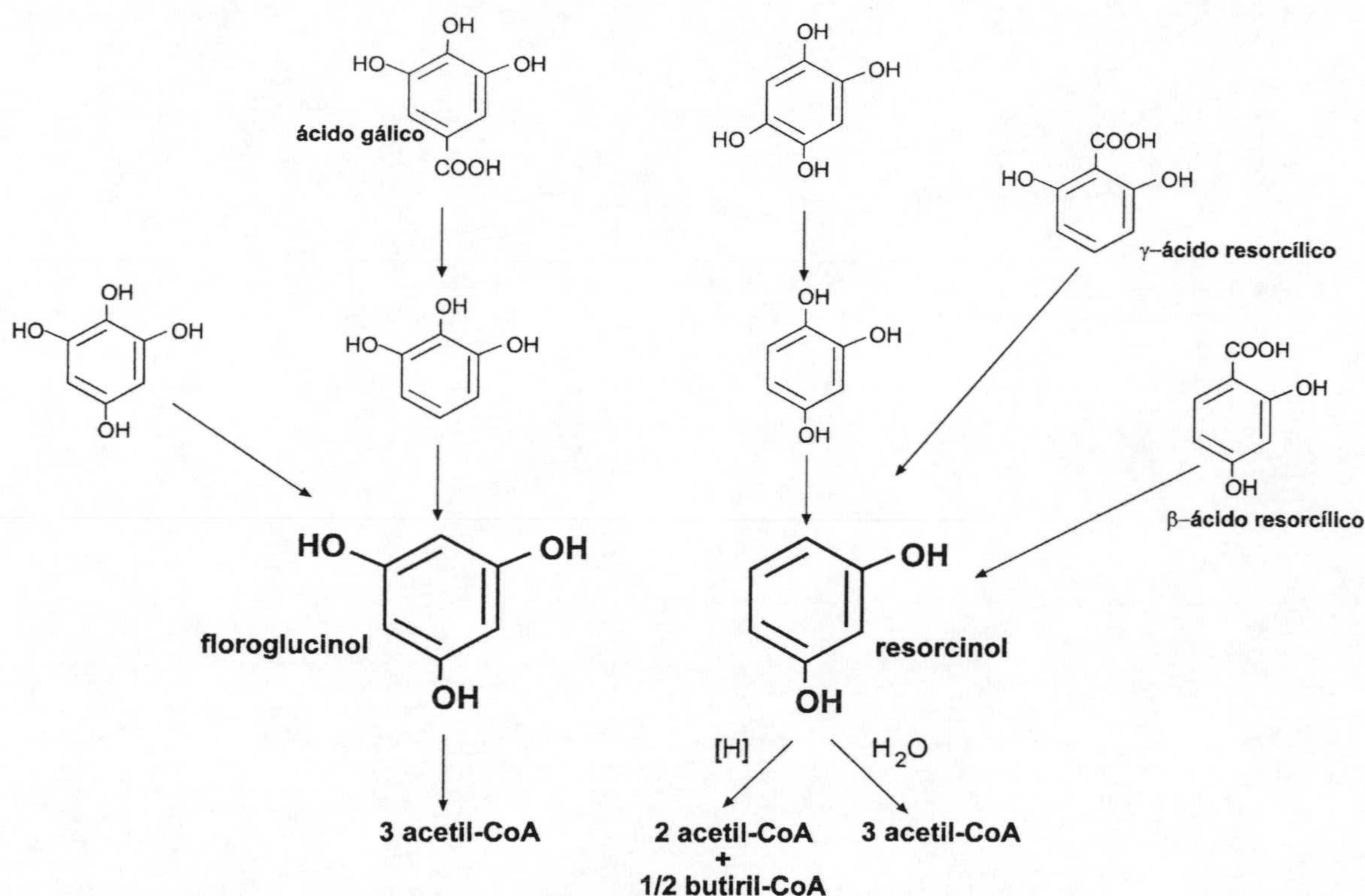


Figura 2. Mecanismos de degradación anaerobia de compuestos aromáticos vía floroglucinol y resorcinol.

### 3. El TNT como contaminante del medio ambiente.

Los compuestos nitroaromáticos son importantes en la industria química se emplean para fabricar productos de consumo (Hartert, 1985). Estos compuestos vienen representados por, al menos, cuatro grupos de productos químicos. El mayor de estos grupos corresponde al de los poliuretanos, que se fabrican a partir de 2,4-y 2,6-dinitrotolueno. El segundo grupo



son los energéticos y peligrosos como el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT). Los compuestos nitroaromáticos se utilizan también, en grandes cantidades, como pesticidas y herbicidas (dinoseb) en la industria agrícola, y como fármacos.

El TNT constituye el explosivo más ampliamente utilizado tanto en uso militar como civil. Los residuos generados en la producción de TNT y su almacenaje suponen un problema ambiental al acumularse en suelos y aguas subterráneas. Tanto la toxicidad como en el comportamiento del TNT en suelo (adsorción, transporte) muestra una relación directa con las propiedades químicas del compuesto. Así pues, un conocimiento de su estructura química se hace necesario para entender y prever su reactividad, tanto en ambientes abióticos como en organismos vivos.

### **3.1 La química del TNT.**

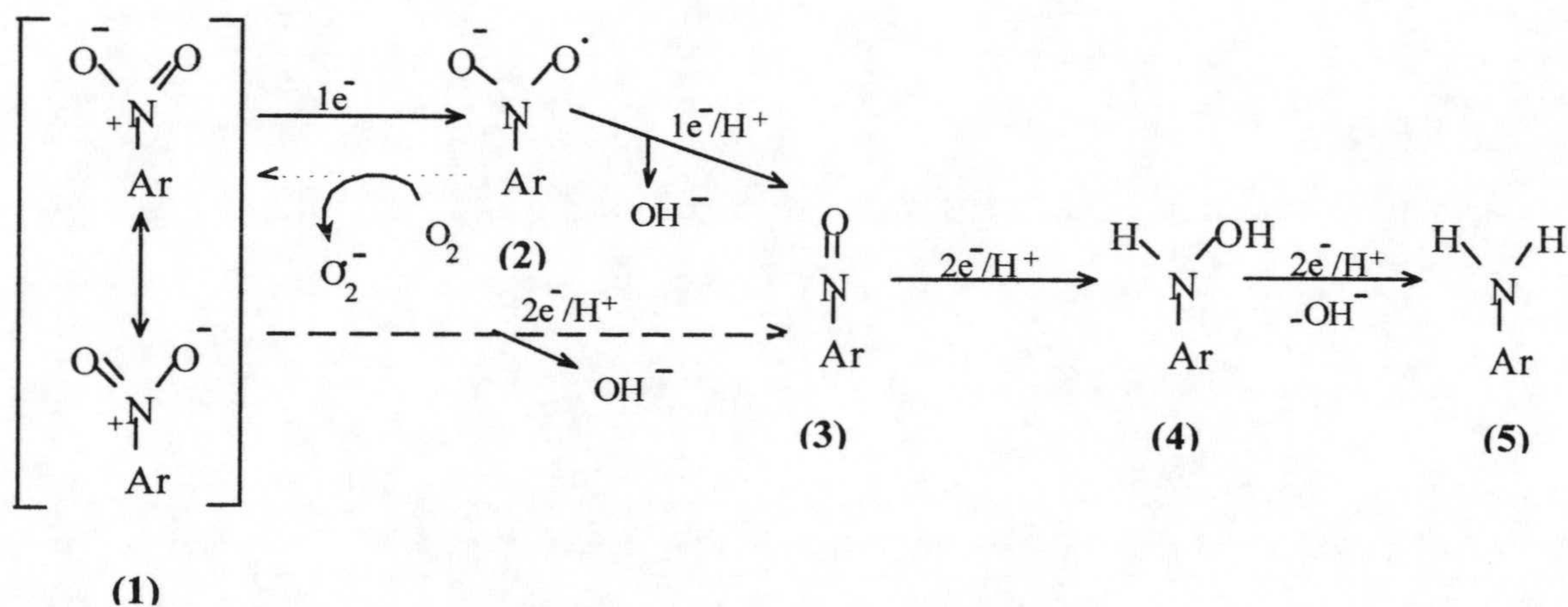
El 2,4,6-trinitrotolueno muestra una estructura aromática tipo benzilo sustituida simétricamente con tres grupos nitro. La electronegatividad de los grupos nitro ejerce una atracción sobre los electrones  $\pi$  del anillo aromático, confiriendo a éste cierto carácter electrófilo. Esto será fundamental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

La reducción del grupo nitro puede producirse mediante la transferencia de  $2e^-$  que daría lugar a los intermedios nitroso ( $\text{Ar-NO}$ ), hidroxilamina ( $\text{Ar-NHOH}$ ) y amino ( $\text{Ar-NH}_2$ ) como se muestra en la figura 4. Las enzimas nitroreductasas capaces de catalizar esta reacción suelen requerir piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones y se denominan “insensibles a oxígeno” o de tipo I (Bryant et al., 1981; Bryant y DeLuca, 1991; Bryant y DeLuca, 1991a; Blasco y Castillo, 1993; Zenno *et al.*, 1996; Zenno et al., 1996a y Goodwin *et al.*, 1998).



**Figura 4. Mecanismos de reducción del grupo nitro en compuestos nitroaromáticos ( $\text{ArNO}_2$ ).** 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).



También se han descrito enzimas con otras actividades, que son capaces de reducir compuestos nitroaromáticos; entre ellas destacan la aldehído oxidasa (Wolpart *et al.*, 1973), la citocromo b5 reductasa (Mason y Holtzmann, 1975) y enzimas tipo diaforasas (Kato *et al.*, 1969).

Los grupos nitro también pueden ser reducidos mediante transferencias de  $1e^-$  a través de un radical nitroanión (Figura 4). Este radical podría reaccionar con oxígeno para producir un radical superóxido, y formar el nitroaromático original a través de un ciclo fútil. Las enzimas que catalizan estas reacciones se denominan nitroreductasas “sensibles a oxígeno” o de tipo II, y se pueden encontrar en bacterias del género *Clostridium* (Angermaier y Simon, 1983) y en enterobacterias como *E. coli* (Peterson *et al.*, 1979).

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 Gillete, 1963) o la ferredoxina (Lind-Marck y Muller, 1976).

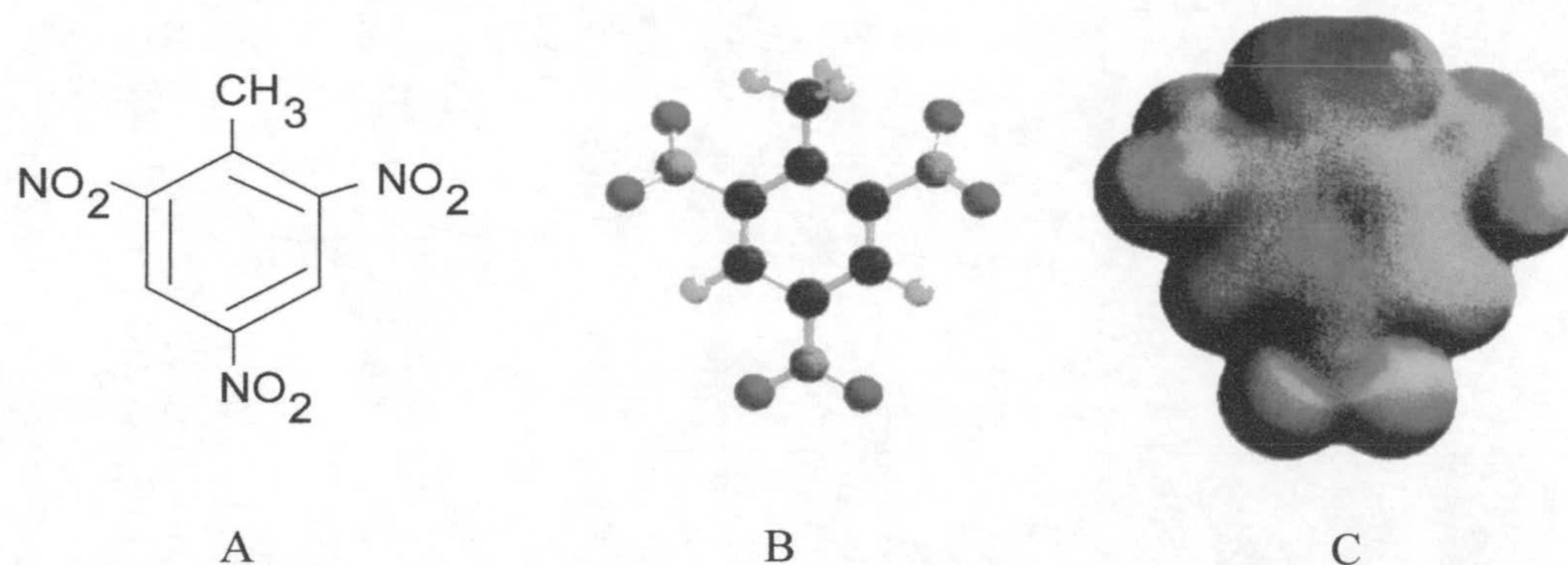
La reducción abiótica del grupo nitro a amino es un fenómeno observado en suelo, sedimentos y acuíferos (Haderlein y Schwarzenbach, 1995). Este tipo de reacciones son posibles, en ambientes naturales, por la abundancia de materia orgánica y de especies de hierro y azufre reducidas que actúan como posibles 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 (Rügge *et al.*, 1998; Hofstetter *et al.*, 1999 y Hofstetter, 1999a).

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



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. 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.*, 1995).

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 5).



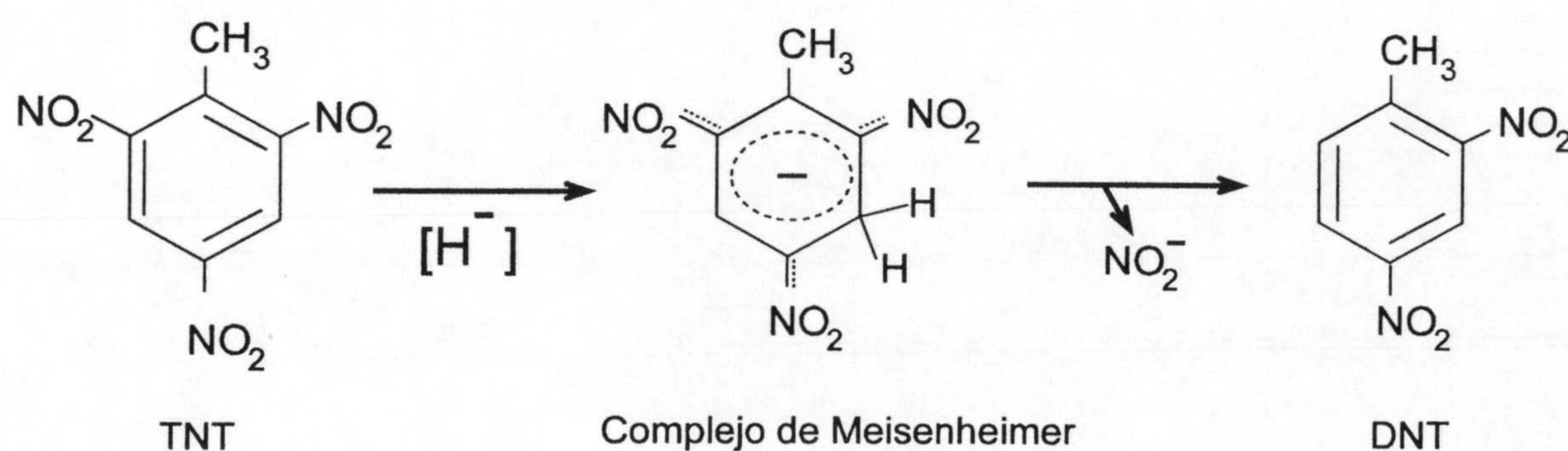
**Figura 5** Distintas representaciones de la molécula de TNT. La representación A, corresponde a la estructura tipo *Kekulé* para el compuesto; en la B, el TNT se representa mediante un modelo de esferas, apareciendo los átomos de carbono (esferas negras), hidrógeno (esferas grises), nitrógeno (esferas 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



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 de Barrows *et al.*, 1996).

La reducción del grupo nitro de compuestos aromáticos ( $\text{Ar-NO}_2$ ) 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 ( $\text{NO}_2^-$ ) 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  $\text{ArNO}_2$  presente mayor similitud con el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) que con el nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). Las analogías entre la reducción de estas especies resultan de interés y fueron revisadas por Averill (1995).

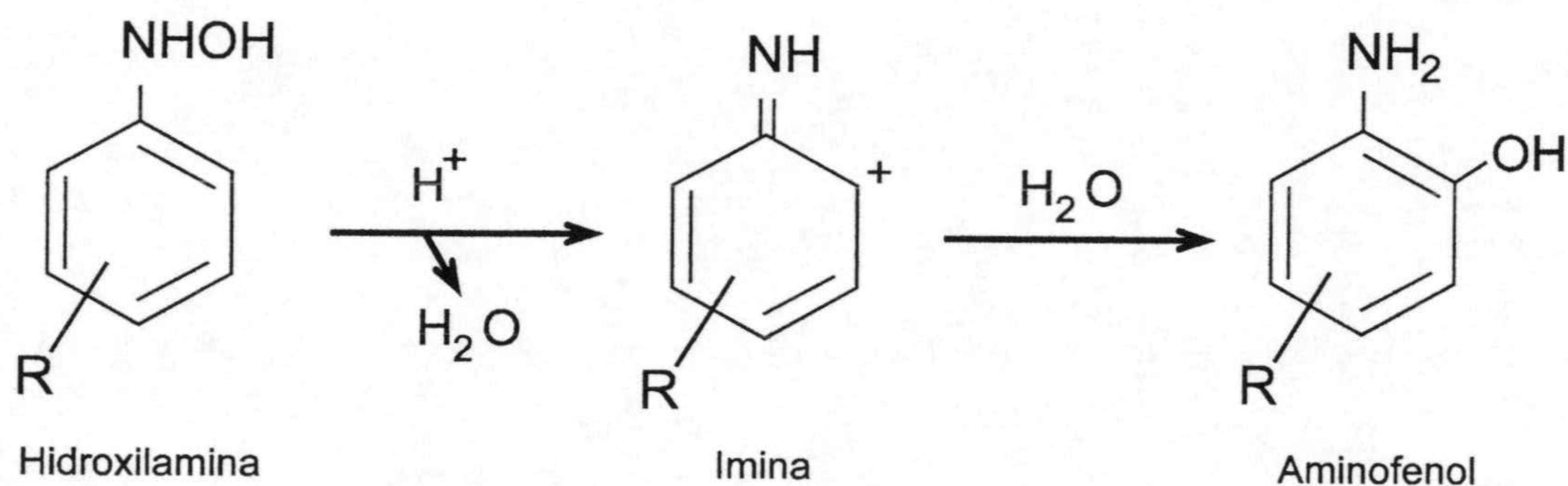
La deficiencia electrónica del anillo aromático del TNT hace posible el ataque nucleófilo al anillo que daría lugar a estructuras no aromáticas del tipo de los complejos de Meisenheimer (Kaplan y Siedle, 1971). Estos compuestos presentan una intensa coloración roja-anaranjada en solución, y una carga negativa deslocalizada sobre el anillo y los grupos nitro (Figura 6). Sucesivos ataques de  $\text{H}^-$  sobre la molécula podría generar complejos dihidruros de TNT (Vorbeck *et al.*, 1998).





**Figura 6. 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).

El reagrupamiento de Bamberger consiste en un mecanismo por el que una hidroxilamina de arilo sufre la ruptura del enlace N-OH, para convertirse en un compuesto fenólico tras la adición de una molécula de  $H_2O$  (Figura 7). En el caso del TNT, Hughes y colaboradores (1998) han descrito un reagrupamiento de este tipo en extractos libres de células; esta reacción se tratará dentro del apartado 4.2. de esta *Introducción*.



**Figura 7. Mecanismo propuesto para el reagrupamiento de Bamberger en hidroxilaminas.** Las hidroxilaminas de arilo son bases orgánicas débiles, produciéndose una competencia entre la protonación del hidroxilo o del nitrógeno que origina la ruptura del enlace N-O. La eliminación de una molécula de agua lleva la formación de un ion nitrenio que rápidamente retira electrones del anillo para formar una estructura tipo imina, y dejar al anillo con una carga positiva deslocalizada. De esta forma, se hace posible un ataque nucleófilo que, en caso del agua, daría lugar al derivado aminofenol.



### 3.2 El TNT como compuesto tóxico

Los efectos tóxicos y mutagénicos del TNT sobre microorganismos (Spangord *et al.*, 1995; Honeycutt *et al.*, 1996; Vaatanen *et al.*, 1997.), algas (Won *et al.*, 1976) y organismos superiores (Johnson *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 1997) están bien documentados en la literatura científica. Aunque los nitroaromáticos pueden por si mismo producir mutagénesis en el ADN (Spangord *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. En los procesos de reducción de los grupos nitros por transferencia de  $1e^-$ , se generan radicales superóxido que dañan el ADN. Se ha descrito la formación de aductos entre hidroxilaminas esterificadas y la guanina (Heflich *et al.*, 1985).

En mamíferos se ha demostrado la reducción de la oxihemoglobina por parte de la hidroxilaminadinitrotolueno 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 (Kiese y Tager, 1976; Liu *et al.*, 1995; Bakhtiar *et al.*, 1997). 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. La reducción de grupos nitro en organismos



superiores podría llevarse a cabo a través de la microflora bacteriana del tracto gastrointestinal (Zachariah y Juchan, 1974; Raffi *et al.*, 1991).

### **3.3 El TNT en el medio ambiente**

El nitroaromático TNT junto a otros subproductos de su síntesis (dinitro- y mononitrotoluenos) están presentes en suelos y aguas subterráneas cercanas a instalaciones militares o civiles donde se hayan realizado actividades de producción, almacenaje y procesamiento que hayan generado grandes volúmenes de aguas residuales contaminadas con el explosivo (Palazzo y Legget, 1986).

Los estudios del comportamiento del TNT en suelo, en cuanto a procesos de retención y transformación se refiere, resultan fundamentales para poder predecir el alcance de la contaminación y elegir el método de descontaminación más apropiado.

Las investigaciones sobre el transporte y movilidad del TNT en suelos sugiere que no existe una adsorción irreversible por parte del nitroaromático (Xue *et al.*, 1995; Selim *et al.*, 1995), siendo éste susceptible de ser arrastrado por el agua de precipitación y alcanzar las aguas subterráneas contaminándolas (Pereira *et al.*, 1979; Pennintong y Patrick, 1990; Preib *et al.*, 1996)).

Se ha descrito la adsorción de TNT a las arcillas del suelo (Pennington y Patrick, 1990 #163; Xue *et al.*, 1995; Selim *et al.*, 1995 #27) y parece ser que la naturaleza electronegativa de los grupos nitro es la que hace posible la formación de complejos entre los oxígenos de la superficie de siloxanos de la arcilla y los nitroaromáticos (Weissmahr *et al.*, 1997; Weissmahr *et al.*, 1999).



El problema del TNT en suelo se encuentra asociado al comportamiento de sus derivados reducidos (hidroxilamina- y aminas aromáticas), producidos tanto por el metabolismo bacteriano como por agentes abióticos (Rügge *et al.*, 1998; Hofstetter *et al.*, 1999; Hofstetter, 1999a), recogidos en el apartado 3.1 de esta *Introducción*. Estos compuestos reducidos son los responsables de dar un tono rosáceo-anaranjado a las aguas contaminadas con TNT (Mabey *et al.*, 1983), que se designan como *aguas rojas* “pink-red water”. En lagunas donde desembocan aguas subterráneas o residuales contaminadas con TNT, es habitual la observación de esta coloración.

En el suelo se ha observado una unión entre los productos de reducción del TNT y la fracción mineral (Daun *et al.*, 1998; Hofstetter *et al.*, 1999) y orgánica del suelo (Bruns-Nagel *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Dawel *et al.*, 1997; Daun *et al.*, 1998; Drzyzga *et al.*, 1998, 1999). La unión de compuestos nitroaromáticos a los ácidos húmicos y a la humina se incrementa al aumentar el número de grupos amino en la molécula. En el caso del triaminotolueno se produce una unión irreversible, de manera que ni siquiera un disolvente orgánico o condiciones de hidrólisis ácidas o básicas, llegan a desorber estos compuestos reducidos del material orgánico, y por tanto no resultan biodisponibles para los seres vivos (Achtnich *et al.*, 1998, 1999a).

La unión covalente entre estos metabolitos y la materia orgánica ha sido estudiada mediante espectroscopía de RMN-<sup>15</sup>N (Knicker *et al.*, 1999; Achtnich *et al.*, 1999a), y se han detectado enlaces tipo amida e imina con los ácidos húmicos y la fracción humina sililada.

#### **4. La biodegradación del TNT por microorganismos.**



Los nitroaromáticos, y en concreto el TNT, son considerados compuestos xenobióticos recalcitrantes. A pesar de ello, se han descrito varios microorganismos que individualmente o a través de consorcios, han sido capaces de metabolizar e incluso mineralizar este tipo de compuestos. En la naturaleza existen compuestos nitroaromáticos, como el cloramfenicol, lo que explica por que los microorganismos presentan mecanismos naturales para actuar sobre el grupo nitro con anterioridad a que la acción del hombre produjera vetidos (O'Brien y Morris, 1971).

Recientemente se han realizado diversas revisiones bibliográficas dedicadas tanto a dar una visión general del metabolismo microbiano de compuestos nitroarómicos (Kaplan, 1989; Higson, 1992; Walker y Kaplan, 1992; Gorontzy *et al.*, 1993 Marvin-Sikkema y de Bont, 1994; Crawford, 1995; Spain, 1995; Osmon y Kausmeier, 1998;), como a tratar en exclusividad el metabolismo del TNT (Lewis *et al.*, 1997; Esteve-Núñez y Ramos, 2000).

#### **4.1 Metabolismo aerobio de TNT por bacterias**

Aunque el metabolismo oxigenolítico de compuestos nitroaromáticos se ha demostrado en varios géneros bacterianos, éste se ha limitado a compuestos mononitro- (Haigler *et al.*, 1993; Hanne *et al.*, 1993; Nishino y Spain, 1993; Rhys *et al.*, 1993; Haigler *et al.*, 1994; Roldan *et al.*, 1998; Spies *et al.*, 1998) y dinitroaromáticos (Hess *et al.*, 1990; Spangord *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 (Johnson *et al.*, 1994; Spangord *et al.*, 1995; Honeycutt *et al.*, 1996 Brooks *et al.*, 1997), y no ser metabolizados por la mayoría de los microorganismos que los producen.

Tan sólo en algunas ocasiones se han documentado microorganismos capaces de utilizar al explosivo como fuente de carbono o nitrógeno, e incluso menos frecuentes son los casos de mineralización descritos (ver Tabla 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 sí mismos, o por otros microorganismos. Las distintas reacciones se ilustran, al final de este apartado, en la figura 8.

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

Microorganismo	Metabolismo	Referencia
<i>Pseudomonas sp.</i> IIBx	Primera evidencia de mineralización de <sup>14</sup> C-TNT	Traxler <i>et al.</i> , 1974
<i>Pseudomonas sp.</i> 1-2wt	Primera evidencia de mineralización de <sup>14</sup> 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



## Introducción

---

<i>Pseudomonas sp.</i>	TNT como fuente de nitrógeno. Transformación de TNT en ADNTs	Jones <i>et al.</i> , 1996
<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 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 y Spain, 1997
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Una flavoproteína oxidoreductasa, dependiente de NADPH, cataliza la transformación de TNT en NHOH-DNT, H-TNT y 2H-TNT	Knoke <i>et al.</i> , 1999
<i>Mycobacterium vaccae</i>	50% de la radioactividad de <sup>14</sup> 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, 1998
<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
<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>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 fue obtenida por Traxler (1974), aunque la cepa de *Pseudomonas sp.*, que utilizó en sus experimentos, obtuvo niveles muy



bajos de mineralización (0,25%) del explosivo. Estos bajos niveles fueron atribuidos a la fijación heterotrófica de CO<sub>2</sub> 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 y Ramos, 1996). Este tipo de complejos ha sido descrito por otros autores por participar en el metabolismo bacteriano de polinitroaromáticos (Knackmuss *et al.*, 1995 ; French *et al.*, 1998; Vorbeck *et al.*, 1998). Lenke y colaboradores (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 #337); pero resultados más recientes (Vorbeck *et al.*, 1998), muestran que, a diferencia del complejo H<sup>-</sup>-ácido pícrico, el complejo H<sup>-</sup>-TNT no soportó eliminación de nitrito ni rearomatización en condiciones fisiológicas. 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<sup>-</sup>-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, es mineralizado (Spangord *et al.*, 1991; Haigler *et al.*, 1994). 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 procedente de una cepa de *Enterobacter cloacae*. La enzima utilizaba TNT como sustrato, reduciéndolo hasta el complejo de Meisenheimer H<sup>-</sup>-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 constituye 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. Recientemente, se ha descrito una aplicación biotecnológica ha sido descrita (Bruce *et al.*, 1999) que será tratada con mayor profundidad en el apartado 4.4 de esta *Introducción*.

Otros autores también han mostrado reacciones de denitración de TNT (Martin *et al.*, 1997) con cepas de *Pseudomonas savastanoi* capaces 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.

Recientemente se ha propuesto un nuevo mecanismo (Kalafut *et al.*, 1998) 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  $^{14}\text{C}$ -TNT (50%) se incorporó a la fracción de lípidos polares de la célula, lo que supuso la apertura del anillo. El proceso de ruptura del anillo en esta cepa es desconocido. 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.

La reducción de grupos nitro a amino se ha descrito como una reacción ampliamente extendida en bacterias; la reducción parcial de nitroaromáticos a derivados hidroxilamina ha sido identificada como una reacción clave en muchas rutas catabólicas (Groenewegen y de Bont, 1992; Nishino y Spain, 1993; Schenzle *et al.*, 1997). 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. Dos bacterias, aisladas por su capacidad de utilizar TNT como fuente de nitrógeno, fueron utilizadas 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-hidroxilaminadinitrotolueno 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. 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.

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 (Naumova *et al.*, 1988; Alvarez *et al.*, 1995; Gilcrease y Murphy, 1995).

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. 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.







#### 4.2 El metabolismo anaerobio bacteriano de TNT

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 han sido estudiados 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, fue recogida por McCormick y colaboradores (1976), al mostrar que suspensiones celulares y extractos libres de células de *Veionella alkalescens* podían reducir TNT hasta triaminotolueno (TAT), utilizando H<sub>2</sub> como donador de electrones.

En la última década, la mayoría de las publicaciones han mostrado la reducción a TAT como el proceso clave del metabolismo anaerobio de TNT (Funk *et al.*, 1993; Preuss *et al.*, 1993; Ederer *et al.*, 1997; Drzyzga *et al.*, 1998). El potencial redox tan negativo que requiere esta reacción, hace que la formación de la poliamina aromática no sea posible en condiciones aerobias. Los principales mecanismos de transformación de TNT en condiciones anóxicas se recogen, al final de este apartado, en la Figura 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 3.



**Table 3. 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> , 1973
<i>Clostridium pasteariann</i>	Reducción de TNT a TAT	McCormick <i>et al.</i> , 1973
<i>Desulfovibrio sp.</i> cepa B	TNT como fuente de nitrógeno; tolueno como intermedio	Boopathy y Kulpa, 1992
<i>Desulfovibrio sp.</i>	TNT como única fuente de nitrógeno; reducción de TNT a TAT	Preuss <i>et al.</i> , 1993
<i>Desulfovibrio sp.</i>	Transformación de TNT en TAT y DANT. El 42% de la radioactividad del <sup>14</sup> 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 via 4-ADNT y 2,4-DANT.	Shin y Crawford, 1997
<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>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

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 fueron aplicados en un proceso de biorecuperación *ex situ* de suelo contaminado con TNT, que será tratado más ampliamente en el apartado 4.4 de esta *Introducción*.

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.

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. La transformación de TNT y sus amino derivados por *Clostridium acetobutylicum* fue estudiada por Khan y colaboradores (1997), quienes sugirieron que la fase metabólica (acidogénica) en la que se encontraba la cepa, afectaba a la velocidad y extensión de la reducción.

Los estudios de Ederer y colaboradores (1997) demostraron que la capacidad para reducir TNT en condiciones anóxicas es un fenómeno general entre los *Clostridium*, ya que las cepas aisladas del bioreactor alimentado con explosivos no mostraron una transformación superior a la ejercida por cepas de colecciones de cultivo que no habían sido expuestas con anterioridad al explosivo. Los autores propusieron que las rutas degradadoras de TNT no están codificadas por genes inducibles sino asociadas a funciones metabólicas expresadas constitutivamente en las cepas de *Clostridium*.

Enterobacterias (*E. coli* y *Salmonella thymimurium*) y Lactobacilli (*L. acidophilus*, *L. casei* y *L. lactis*), no expuestas a TNT, fueron ensayadas por su capacidad reductora del nitroaromático. Por el contrario, ninguna fue capaz de reducir diaminonitrotolueno (DANT) a TAT, si bien incubaciones de *L. casei* en medio rico mostraron la eliminación del DANT sin detectarse productos de reducción. Esto sirvió a los autores para sugerir la existencia de



rutas degradadoras alternativas que no implicaran la reducción hasta TAT (Ederer *et al.*, 1997).

El género *Desulfovibrio* ha sido ampliamente estudiado 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) por Snell y Schink (1991). 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 fue capaz de catalizar la reducción completa de TNT a TAT, en ausencia de agentes reductores. Los autores sugirieron que la reducción de DANT constituía el paso limitante del proceso global. El estudio supone una aproximación bioquímica a las enzimas que catalizan la reducción de TNT. 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 es conocida la inhibición que el CO ejerce sobre esta enzima.

Drzyzga y colaboradores (1998) realizaron ensayos de biotransformación de <sup>14</sup>C-TNT por cepas de *Desulfovibrio sp.*; el explosivo no resultó mineralizado, pero el 42% de la radioactividad inicial se encontró asociada al material celular. Los metabolitos TAT y DANT fueron detectados en los medios de ensayo.



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 es dependiente del pH del medio; así, en condiciones ácidas, (pH<1) el TAT es desaminado y convertido en productos de estructura desconocida (Preuss *et al.*, 1995). Ésto hace que la transformación biológica de TAT sólo sea posible en condiciones de pH próximas a la neutralidad.

Recientemente ha sido 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 suproducto que impedía la mineralización del nitroaromático.

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 fue detectada en extractos libres de células de una cepa de *Clostridium* incubados en condiciones anóxicas. Aunque este mecanismo ya ha sido 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.

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 y Kulpa, 1993), mientras que la microflora de sedimentos acuáticos mostró mejores niveles de eliminación del explosivo en condiciones metanogénicas (Krummholz *et al.*, 1997).

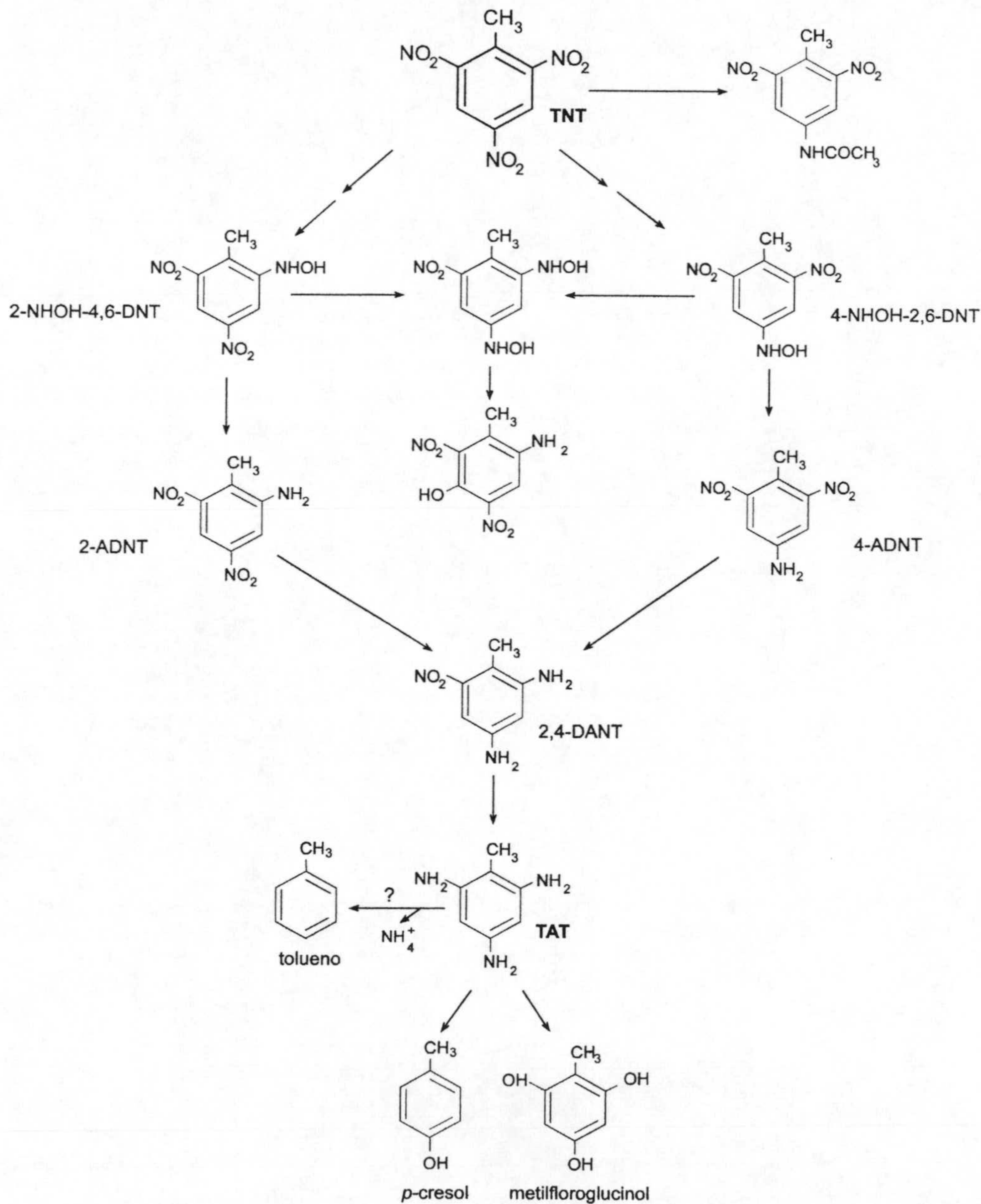


Figura 9 Mecanismos propuestos para el metabolismo anaerobio bacteriano de TNT.



### 4.3 El metabolismo fúngico del TNT

El uso de hongos para la biodegradación de TNT ha generado un interés notable en la última década. Ha sido el hongo de la madera *Phanerochaete chrysosporium* el que ha sido objeto de un estudio mas amplio, aunque recientemente otros géneros han sido descritos por su habilidad en la transformación de TNT.

El interés del hongo de la madera se debe a su capacidad para degradar un amplio grupo de compuestos tóxicos y persistentes en el medio ambiente, que incluyen al explosivo TNT, bajo condiciones de limitación de nitrógeno (Bumpus y Takarko, 1994; Fernando *et al.*, 1990).

En condiciones de limitación de nutrientes (carbono, nitrógeno o azufre), el hongo secreta una serie de enzimas y factores que constituyen el “sistema de degradación de lignina”. Este sistema contiene las enzimas responsables para la conversión de los compuestos xenobióticos en dióxido de carbono. Entre los componentes del sistema se encuentra la peroxidasa de hidrógeno (LiP), la peroxidasa de manganeso (MnP), oxidasas, reductasas, peroxidasas de hidrógeno (Stahl y Aust, 1995).

Al igual que en otros microorganismos, los primeros pasos en la degradación fúngica de nitroaromáticos como el TNT, consisten en la reducción de los grupos nitro (Parrish 1977). Los micelios de *P.chrysosporium* reducen al TNT hasta una mezcla de aminodinitrotoluenos (ADNTs) y 4-hidroxilamina-2-6-dinitrotolueno. En condiciones ligninolíticas (limitación de nutrientes) se produce una degradación de estos compuestos que puede llevar a la mineralización del nitroaromático, por el contrario en condiciones no ligninolíticas los metabolitos ADNTs son lentamente reducidos a DANTs y se detecta la



acumulación de azoxitetranitrotoluenos. Pasti-Grisby y colaboradores (1996) sugirieron que la degradación de estos últimos compuestos era posible, ya que la reducción de compuestos tipos azoxi a tipo azo resulta químicamente factible, y la mineralización de colorantes con enlaces tipo azo habían sido descritos en este hongo con anterioridad.

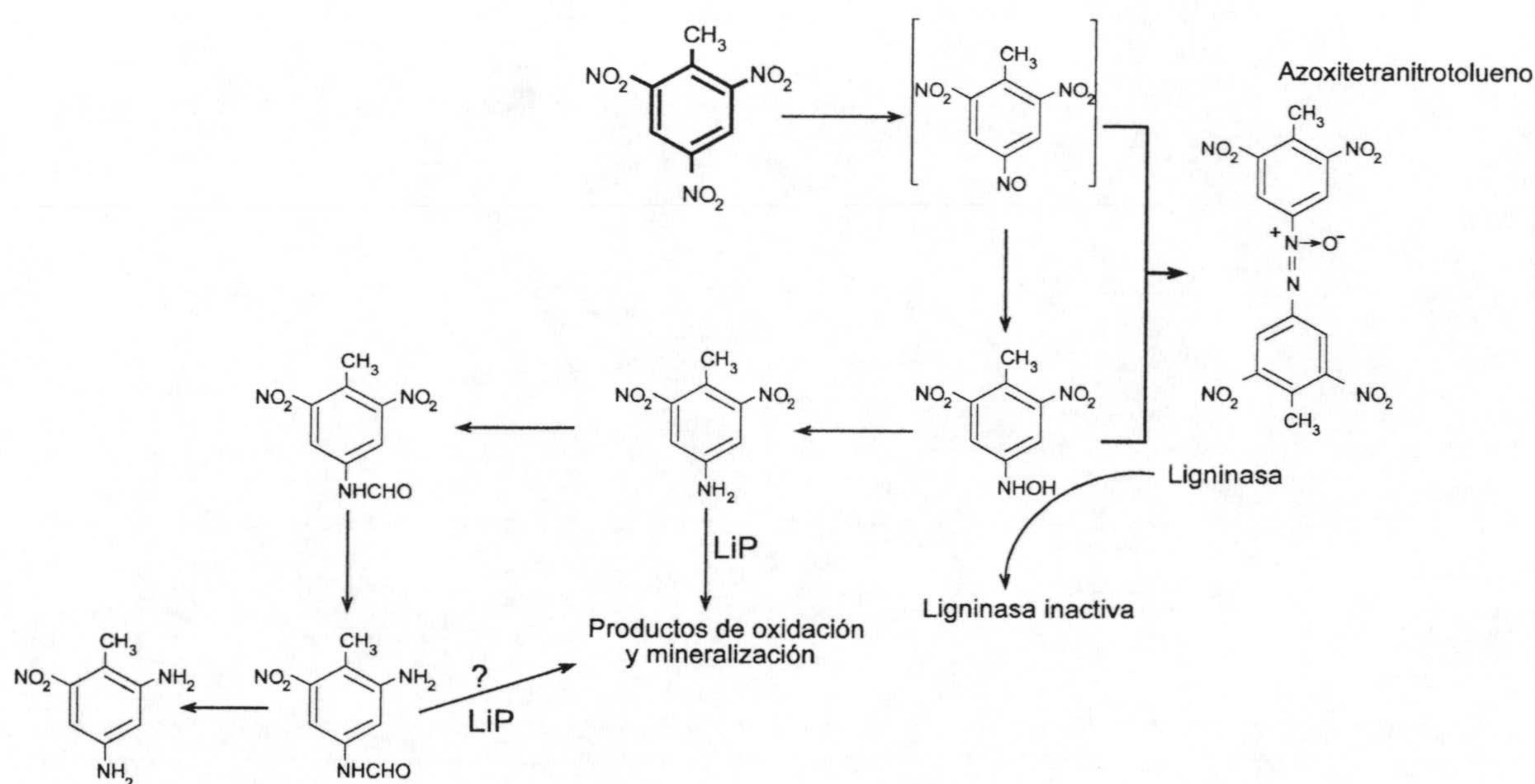
Stahl y Aust (1993) presentaron evidencias de la reducción de TNT por un sistema redox ubicado en la membrana plasmática de *P. chrysosporium*. La actividad requirió la integridad del micelio y fue inhibida por agentes que afectaban al potencial redox de la membrana plasmática. La reducción podría estar acoplada a un sistema de exportación de protones, utilizado por el hongo para mantener un pH extracelular alrededor de 4,5.

Por el contrario, Rieble y colaboradores (1995) describieron en *P. chrysosporium*, una actividad TNT reductasa asociada a membrana que requirió NADPH como donador de electrones y una atmósfera anóxica. El potencial redox de la membrana no resultó esencial para esta actividad, ya que se determinó tras solubilizar la proteína de la membrana mediante detergentes. También se detectó una tercera actividad TNT reductasa, dependiente de NADH o NADPH, en la fracción citoplasmática (Michael y Gottschalk, 1995).

La mineralización de TNT es un fenómeno que requiere condiciones ligninolíticas, lo que implica que las peroxidasas de lignina (LiP) o las de manganeso (MnP) degradan los metabolitos reducidos, formados por los sistemas de reducción de TNT. El mecanismo por el que el hongo mineraliza el nitroaromático es desconocido, aunque existen datos preliminares que sugieren que el 2-amino-4-formamida-6-nitrotolueno puede estar implicado en el proceso; este compuesto, generado a partir de 4-ADNT, fue degradado totalmente por el hongo en condiciones ligninolíticas, pero persistió en condiciones no ligninolíticas.



El hidroxilaminodinitrotolueno, uno de los productos de la reducción del TNT, inhibe la actividad alcohol veratril oxidasa de la lignina peroxidasa del hongo (Michels y Gottschalk, 1994 #90; Bumpus y Takarko, 1994). Esta actividad protege a la lignina peroxidasa de la inactivación por  $H_2O_2$  lo que explica porque la presencia del derivado hidroxilamina limita la mineralización del TNT respecto a la mineralización de ADNT (Stahl y Aust, 1995). Esto hace que el diseño de técnicas de biorecuperación para suelos contaminados con TNT, basados en el uso de *P.chrysosporium*, requieran condiciones en las que estos derivados hidroxilamina no sean acumulados.



**Figura 10. Mecanismo de degradación fúngica de TNT.** Las reacciones de reducción de los grupos nitro tienen lugar en la membrana del hongo, mientras que la acción de la peroxidasa de lignina (LiP) lo hace en el fluido extracelular.



Los resultados sobre la tolerancia de *P.chryso sporium* a TNT (Spiker *et al.*, 1992) indicaron que el crecimiento del hongo se ve inhibido a concentraciones del explosivo por encima de 20 ppm. La alta sensibilidad al nitroaromático, no hace de este hongo un buen candidato para tratamientos de suelo contaminados con TNT, que suelen mostrar concentraciones del explosivo en torno a 12.000 ppm.

Se ha descrito la degradación de TNT por peroxidasas dependientes de manganeso (MnP) de varias especies de hongos de la madera. Scheibner y Ofrichter (1998) mostraron cómo extractos de MnP del basidiomiceto *Nematoloma frowardii* y del basidiomiceto de la basura *Stropharia rugosoannulata* fueron capaces de mineralizar una mezcla de productos de reducción de  $^{14}\text{C}$ -TNT y  $^{14}\text{C}$ -2-ADNT (Scheibner *et al.*, 1997a). Recientemente Van Aken y colaboradores (1999) utilizaron una preparación concentrada de MnP del hongo *Phlebia radiata* para transformar completamente TNT y 2-ADNT, y mineralizar, respectivamente, el 22% y el 76% de estos compuestos. Con estos ensayos enzimáticos la mineralización ocurrió de forma más rápida a la obtenida mediante cultivos de *P. chryso sporium*, ya que el sistema enzimático mostró mucha mayor actividad que los fluidos extracelulares ligninolíticos clásicos.

Se han descrito otras especies de hongos por su capacidad de tolerar altas concentraciones de TNT (Bayman y Radkar, 1997). *Cladosporium resinae* y *Cunninghamella echinulata* var. *elegans* transformaron completamente el TNT en productos de reducción, principalmente azoxitetranitrotoluenos. Aunque estos hongos convirtieron cantidades considerables de  $^{14}\text{C}$ -TNT en metabolitos polares (no extraíbles por disolventes orgánicos) no se detectó mineralización. Los autores sugirieron la aplicación de un tratamiento en dos pasos, en el que el TNT podría ser inicialmente reducido a ADNT por



hongos del suelo, como *C. resinae*, y posteriormente mineralizados por *P. chryso sporium*. Este procedimiento podría incrementar la mineralización del explosivo y proteger al *P. chryso sporium* del carácter tóxico de la hidroxilamina.

Además del *P. chryso sporium*, otros hongos basidiomicetos fueron ensayados por su capacidad de metabolizar y mineralizar TNT (Scheibner *et al.*, 1997b; van Aken *et al.*, 1997). Se encontró una significativa mineralización por parte de *Clitocybula duse nii* TMB12 (42%) y *Stropharia rugosa-anulata* DSM11372 (36%). Micomicetos (deuteromicetos, ascomicetos y zigomicetos) acumularon concentraciones mayores de ADNTs de las que lo hicieron los basidiomicetos; si bien, se mostraron incapaces de mineralizar <sup>14</sup>C-TNT de forma significativa.

Estos resultados sugieren el importante papel de los sistemas ligninolíticos en los procesos de mineralización, ya que tan solo los hongos de la madera y la basura fueron efectivos a la hora de mineralizar el explosivo. Desgraciadamente las enzimas peroxidasas sólo se expresan en condiciones restrictivas, lo que puede dificultar su uso en ensayos de campo con suelo contaminado por TNT (Field *et al.*, 1993). Otra desventaja es que el ambiente natural de estos hongos es la madera más que el suelo, por lo que podrían tener problemas de competencia con la microflora nativa del suelo (Bayman y Radkar, 1997).

#### **4.4 Aplicaciones en la biorrecuperación de ambientes contaminados en TNT**

Durante décadas, la producción y el procesamiento de TNT en las plantas de explosivos han generado como resultado una intensa contaminación del suelo por el nitroaromático.



El tratamiento tradicional más utilizado para la eliminación del explosivo ha sido la incineración; pero este método resulta caro debido a los costes generados por la excavación del terreno, el transporte y la energía para producir la combustión, además de la emisión de gases tóxicos (NO) a la atmósfera. Otros tratamientos físico-químicos aplicables en aguas residuales contaminadas con TNT incluyen la oxidación por aire húmedo (Hao *et al.*, 1993), la reducción química (Larson *et al.*, 1996; Emmrich, 1999), la descomposición térmica (Oxley *et al.*, 1995), la degradación fotocatalítica (Schmelling *et al.*, 1996), la descarga electrohidráulica (Willberg *et al.*, 1996) y la ozonólisis (Stockinger *et al.*, 1995; Lang *et al.*, 1998; Stockinger *et al.*, 1998)).

Distintas tecnologías biológicas han sido desarrolladas para la biorrecuperación de suelos contaminados con el explosivo TNT. Las principales son: el uso de reactores de agitación (soil slurry), el compost y los tratamientos *in situ*. 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).

En estudios básicos, mediante ensayos en microcosmos, Bradley y Chapellet (1995) estudiaron los factores que afectaban a la mineralización microbiana de TNT en suelos contaminados con el explosivo. Concluyeron que la humedad del suelo es fundamental, y que alteraciones que favoreciesen la sequedad del suelo, influían negativamente en la biodegradación del nitroaromático, contribuyendo a sus persistencia. Las condiciones de aerobiosis o anaerobiosis estrictas no favorecieron la mineralización, mientras que una atmósfera microaerobia resultó ser la óptima. Otros ensayos de microcosmos con suelos contaminados con TNT inoculados con *P. chrysosporium* mostraron la degradación del



TNT hasta niveles no detectables (Stahl y Aust, 1995), o su conversión (20%) hasta CO<sub>2</sub> (Fernando *et al.*, 1990 #223).

La tecnología de reactores de agitación consiste en el uso de reactores que contienen una mezcla de suelo y agua, a la que se adicionan cosustratos y nutrientes. Estos sistemas están diseñados para optimizar la transferencia de masa de los nutrientes mediante agitación mecánica o aireación. Los trabajos en que se ha utilizado esta tecnología para el tratamiento de suelos contaminados con TNT, describen condiciones de anaerobiosis para evitar reacciones de polimerización que se producirían en presencia de oxígeno; en ocasiones el tratamiento anóxico se acompañó de otro aerobio posterior. El metabolismo de TNT en condiciones anóxicas requirió la adición de un cosustrato adicional (almidón, glucosa, sacarosa, melazas) con dos objetivos fundamentales: una, el actuar como donadores de electrones en la reducción del grupo nitro; la otra, la eliminación de oxígeno del medio, al ser éste consumido por microorganismos aerobios.

Existen dos aproximaciones al tratamiento de suelos contaminados con TNT con estos reactores, uno busca la mineralización del explosivo como objetivo principal (*Funk et al.*, 1995; *Boopathy et al.*, 1998) mientras que la otra se basa en la unión irreversible de los metabolitos de TNT en la matriz del suelo (*Rieger y Knackumss*, 1995; *Drzyzga et al.*, 1998; *Lenke et al.*, 1998).

El método de Funk y colaboradores (1993, 1995) 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 aeróbicamente. 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 (Sembres *et al.*, 1997 #137). El proceso biodegradativo fue efectivo y requirió la adición de almidón. procedente de desechos de patata, 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 #40) 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.

Boopathy y colaboradores (1998) realizaron un ensayo de laboratorio con un reactor agitado, con suelo, en el que se generó un perfil de concentración de oxígeno que convirtió al reactor en un sistema mixto aerobio/anaerobio. El TNT fue eliminado en cultivos estanco durante las primeras dos semanas, aunque los metabolitos de reducción persistieron, siendo necesario operar en semicontinuo durante un periodo de tres meses. La degradación del explosivo se demostró por la mineralización del  $^{14}\text{C}$ -TNT (23%) y la localización del 27% de la radioactividad asociada a material celular precipitable por ácido tricloroacético.



La tecnología del reactor de lodo también se ha utilizado con otro objetivo, el de potenciar la fijación anaerobia de compuestos xenobióticos en la matriz orgánica del suelo a través de actividades microbianas de reducción (Rieger y Knackmuss, 1995). Los ensayos de laboratorio han mostrado una completa eliminación de TNT y la incorporación de la radioactividad de  $^{14}\text{C}$ -TNT a la matriz del suelo tras un tratamiento anaerobio/aerobio en dos pasos: 84% por Drzyzga y colaboradores (1998) y 99% por Lenke y colaboradores (1998).

La naturaleza de las uniones entre los metabolitos del TNT y la fracción orgánica del suelo se describieron en el apartado 3.3 de esta *Introducción*.

Esta inmovilización inducida biológicamente ha sido ensayada a escala técnica (Lenke *et al.*, 1998) en un reactor Terranox, con 18 m<sup>3</sup> de suelo contaminado con explosivos mezclando 10 m<sup>3</sup> de agua suplida con sacarosa y cloruro amónico. El proceso llevó a la eliminación completa de TNT, DNT y RDX en treinta semanas, de forma más lenta a la mostrada en los ensayos de laboratorio; los autores sugirieron que la causa podría ser la menor temperatura y transferencia de masa al aplicar una agitación menos intensa. Los resultados de la evaluación ecotoxicológica del sobrenadante del medio tras la incubación anaerobia todavía mostró efectos tóxicos, haciéndose necesario el posterior tratamiento aerobio para eliminar totalmente la toxicidad en suelo.



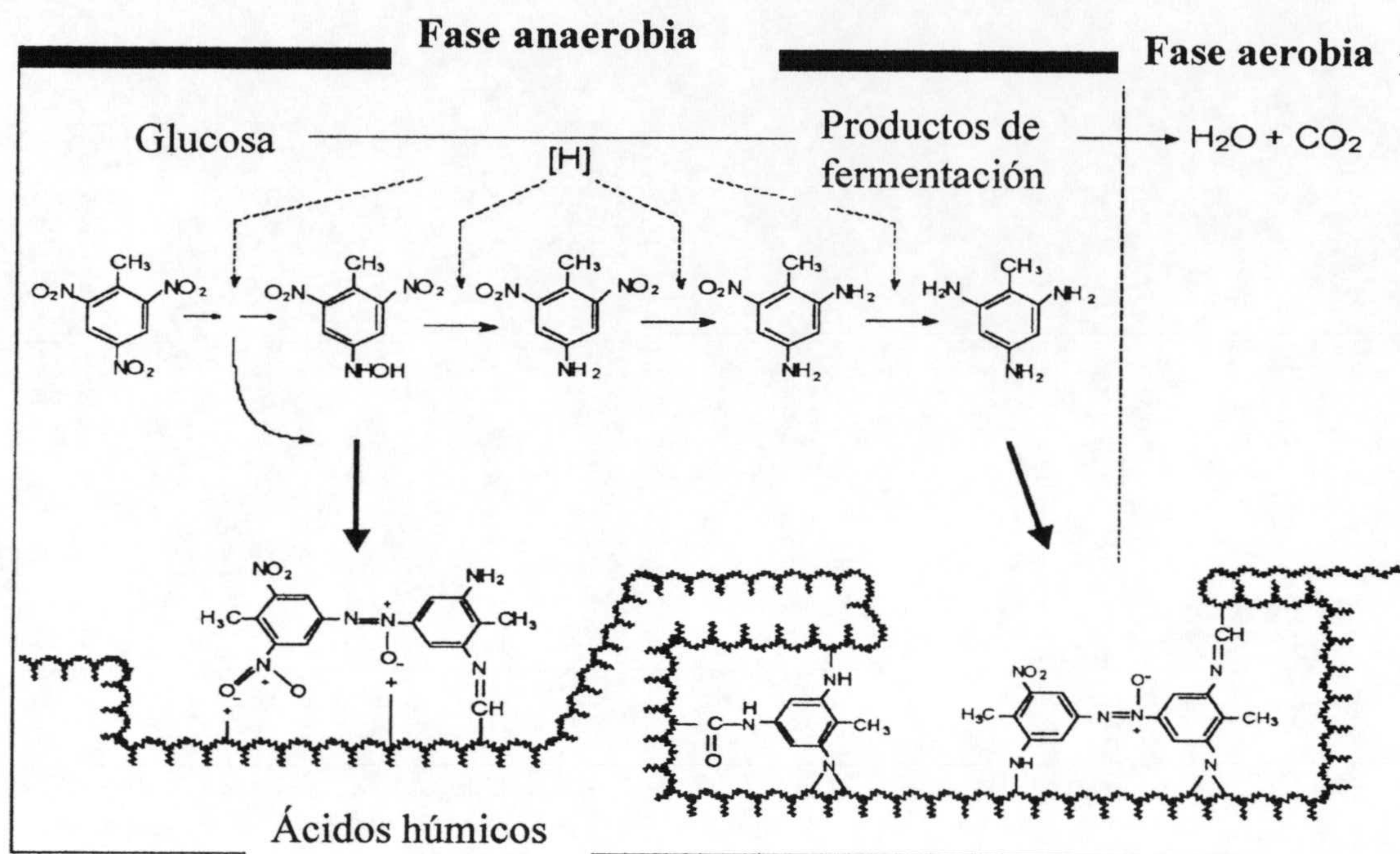


Figura 11 Mecanismo propuesto para la adsorción química de los metabolitos de reducción de TNT a los ácidos húmicos durante un tratamiento anaerobio/aerobio. Se observa la formación de aminas secundarias y terciarias, así como enlaces tipo imina entre los metabolitos reducidos y las cadenas carbonadas de la fracción orgánica del suelo (ácidos húmicos). El exceso de carbono, generado en los procesos de fermentación, es mineralizado por los microorganismos aerobios en la segunda fase del tratamiento. Figura adaptada de Achtnich y colaboradores (1999).

El compost está considerado como una tecnología factible para la biorecuperación de suelos contaminados con explosivos. Las aplicaciones desarrolladas indican que el TNT puede ser eliminado (Kaplan y Kaplan, 1982; Williams *et al.*, 1992; Pennintong *et al.*, 1995; Breitung *et al.*, 1996; Bruns-Nagel *et al.*, 1998). En esta tecnología, el suelo debe mezclarse con agentes espesantes, generalmente subproductos agrícolas inertes (virutas de madera, cascaras de arroz, alfalfa, paja) y se mantiene a una humedad entre el 50-60%. En estas condiciones, el explosivo fue reducido a amino- y diaminonitrotolueno durante una fase anóxica, mientras que una fase aerobia posterior eliminó la mayor parte de los



productos de transformación que pudieran haberse unido covalentemente a la matriz de suelo, en un proceso dependiente de oxígeno (Bruns-Nagel *et al.*, 1998). El compost tras el tratamiento se comportó igual que el correspondiente a suelo no contaminado respecto a ensayos de toxicidad con monocitos humanos (Bruns-Nagel *et al.*, 1999). Resultados similares fueron presentados por Tan y colaboradores (1992), al registrar una marcada reducción de la mutagenicidad asociada al suelo tras someter un suelo contaminado a un tratamiento de compostaje. Las mayores críticas al uso de esta técnica estriban en los largos tiempos de incubación requeridos, así como el coste del montaje y el mantenimiento del sistema.

Los tratamientos terrestres (*land farming*) suponen una tecnología de biorecuperación *in situ*, en el que el propio suelo es mezclado con nutrientes y se le proporciona humedad, mezclándolo periódicamente para airearlo mediante maquinaria habitual en las técnicas agrícolas. Widrig y colaboradores (1997) desarrollaron esta metodología sobre suelos contaminados con TNT, utilizando melazas como sustrato y hierba triturada para mejorar la consistencia del suelo. La degradación del explosivo se demostró por mineralización de  $^{14}\text{C}$ -TNT y la presencia de radioactividad asociada al material celular precipitable por TCA. Los resultados de estos estudios desarrollados en el laboratorio resultan prometedores en la transferencia del proceso al medio natural. Esta tecnología permite tratar directamente la zona contaminada, mediante un equipo de uso convencional en las técnicas agrícolas. Debido a la solubilidad del TNT en agua, se requiere un control hidráulico del agua de filtración en el diseño de este tipo de operaciones *in situ*.

Otras experiencias de biorecuperación *in situ* de suelos contaminados con TNT, se están desarrollando, principalmente en USA, por compañías privadas. Así, métodos como



Xeronem<sup>TM</sup> (Moser *et al.*, 1999) y Daramend<sup>®</sup> (Ferguson *et al.*, 1999) han sido utilizados en experiencias piloto y pronto se ensayarán a campo abierto.

El uso de plantas con la finalidad de eliminar contaminantes (*fitoremediación*) parece ser otra alternativa al tratamiento *in situ* de suelos contaminados con explosivos. Investigaciones recientes recogen ensayos con gran variedad de especies vegetales: *Cyperus esculentus* (Palazzo y Leggett, 1986), *Catharanthus roseus* (Bhadra *et al.*, 1999), *Phaseolus vulgaris* (Harvey *et al.*, 1990), especies acuáticas o de humedales (Hughes *et al.*, 1997; Vyerford *et al.*, 1997) y chopos (Thompson *et al.*, 1998). En la mayoría de estos estudios, la transformación del TNT por las plantas se vio acompañada por la aparición de sus derivados ADNTs. Se conoce poco sobre el metabolismo catalítico de las plantas más allá de estos compuestos reducidos. Algunas plantas parecen secuestrar o integrar los metabolitos del TNT formando conjugados en su biomasa. Estos conjugados se encuentran compartimentalizados en organelas del tipo de las vacuolas. Los productos de reducción de TNT parecen estar involucrados en estos procesos de conjugación mediante los que la planta detoxifica el TNT (Bhadra *et al.*, 1999).

La combinación planta-bacteria está siendo desarrollada (Siciliano *et al.*, 1999) utilizando cepas de *Pseudomonas* capaces de transformar TNT en sus derivados ADNTs y DANTs. La inoculación de la hierba *Bromus erectus* con dicha cepa, incrementó la población microbiana asociada a la rizosfera, implicada en el metabolismo de nitroaromáticos, y condujo a un aumento de la reducción de TNT en suelo.

Recientemente se han descrito plantas transgénicas que expresaban enzimas bacterianas para la degradación de TNT (French *et al.*, 1998) y se detectó la actividad enzimática en tejidos de hoja y raíz. Las plantas transgénicas, que expresaban la enzima



degradadora del explosivo, fueron capaces de germinar y crecer en presencia de concentraciones del nitroaromático que resultaron inhibitorias para las plantas silvestres. Se requerirán más ensayos para determinar si estas plantas transgénicas son capaces de potenciar la degradación de TNT.



## Objetivos



En un trabajo anterior, Duque y colaboradores (1993), aislaron una cepa de *Pseudomonas* sp., denominada clon A, capaz de utilizar el explosivo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como fuente de nitrógeno en condiciones aerobias. El metabolismo reductivo este microorganismo sobre el grupo nitro del TNT, generó los intermediarios nitroso e hidroxilamina; estos compuestos reaccionan entre sí, en presencia de oxígeno, para formar azoxinitrotoluenos de naturaleza recalcitrante. Estos compuestos tóxicos no se formaron en ausencia de oxígeno (Haïdour y Ramos, 1996). Dada la amplia distribución de la actividad nitroreductasa en los microorganismos (ver *Introducción*) se consideró que el tratamiento biológico eficiente de este nitroaromático requeriría condiciones de anoxia que evitaran la formación de estos subproductos.

El trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral se desarrolló para lograr la degradación de TNT a través de un metabolismo bacteriano anaerobio. Los objetivos concretos de este trabajo fueron:

1. El aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de utilizar TNT como única fuente de nitrógeno.
2. Determinación de las condiciones óptimas para la eliminación de TNT en biorreactores operando en condiciones estanco.
3. Elucidación de la ruta catabólica del TNT en condiciones anóxicas.
4. Estudio de aspectos energéticos en el metabolismo anaerobio de TNT: el posible papel del nitroaromático como aceptor final de electrones.



## **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 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 1. Estirpes bacterianas**

Estirpe	Genotipo/Características	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>supE44 hsdS20 (r<sub>r</sub><sup>-</sup>m<sub>r</sub><sup>-</sup>) recA13 ara-14proA2 lacY1 galK2 rpsL20 (Sm<sup>R</sup>) xyl-5 mtl-1</i>	Boyer y Roulland-Dussoix (1969)
CC118	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD</i> $\Delta$ <i>lacX74 galE galK phoA20 thi1 rpsE (Sp<sup>R</sup>) rpoB (Rif<sup>R</sup>) argE recA1</i>	Manoil y Beckwith (1985)
CC118 $\lambda$ pir	C118 lisogenizada con el fago $\lambda$ pir	Herrero <i>et al.</i> (1990)
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\Delta$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>)recA1 endA1 gyrA96 (Nal<sup>R</sup>) thi1 relA1</i>	Hanahan (1983)
<i>Pseudomonas sp.</i>		
JLR11	Utiliza TNT como única fuente de nitrógeno en anaerobiosis	Esteve-Núñez y Ramos (1998)
JLR11-P12E2	Mutante de la cepa JLR11 incapaz de utilizar TNT como fuente de nitrógeno; obtenido por inserción cromosómica de un miniTn5-Tel.	Esteve-Núñez <i>et al.</i> , 1999



## 2. Medios y condiciones de cultivos

### 2.1 Medios de cultivo.

Como medio rico para el crecimiento de *E. 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 <sub>2</sub> 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 <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (1M)	1 ml
Citrato férrico amónico 6‰(p/v)	1 ml
H <sub>2</sub> 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 esta solución fue la siguiente:

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

La solución goodies se esterilizó por filtración a través de filtros estériles de acetato de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poro y su composición fue:



HBO <sub>3</sub> .....	300 mg
ZnCl <sub>2</sub> .....	50 mg
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O .....	30 mg
CoCl <sub>2</sub> .....	200 mg
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O .....	10 mg
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O .....	20 mg
NaMoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O .....	30 mg
H <sub>2</sub> 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.

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

**Compuestos aromáticos:** las soluciones de benzoato, 4-hidroxibenzoato, 4-hidroxifenilacético y 3-nitrobenzoato 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. Los aromáticos de naturaleza líquida como tolueno y 3-nitrotolueno se suministraron en fase gaseosa introduciendo una varilla hueca de vidrio en forma de U, que contenía el aromático, dentro del matraz de cultivo. Éste se selló con parafina para obtener una atmósfera saturada en el aromático correspondiente. En los casos de cultivos en placa, la varilla de menor tamaño, se rellenó con un papel de filtro saturado en el compuesto de interés y se depositó sobre la tapa de una placa de Petri invertida, que fue sellada convenientemente con parafina.

Las fuentes de nitrógeno de naturaleza inorgánica que se utilizaron fueron las sales nitrato potásico, nitrito potásico y cloruro amónico, con las que se prepararon



disoluciones madre a una concentración 1M que se autoclavarón. Debido a la baja solubilidad en agua de algunos de los nitroarómicos que se utilizarón como fuente de nitrógeno, estos 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 nitroarómicos, 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 Unión Española de Explosivos.

## **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-N<sub>2</sub> para crear una atmósfera anóxica. El cambio de color del indicador de O<sub>2</sub> (Merck, ref.1.15112) situado en el interior de la jarra, confirmó la anoxia de ésta.

### **2.2.2 Cultivos semisólidos anóxicos.**

Para estos ensayos se utilizarón tubos de vidrio (10x16 mm) que se llenaron con 10 ml de medio que contenía agar a una concentración final de 0,1% (p/v). Se adicionó ácido ascórbico (0,25 g/l) al medio, para consumir el oxígeno residual, autoclavándose entonces sólo 15 minutos a 120°C. Una vez autoclavado el medio, se llevó a ebullición



para eliminar los gases disueltos, se dejó enfriar a temperatura ambiente, y por último se inoculó con un asa de picadura. El tubo se selló con un septum, a través del cual y mediante una aguja se gaseó el espacio libre con N<sub>2</sub>. Los tubos se incubaron invertidos, en una estufa a 30°C, para evitar la condensación de vapor de agua.

### **2.2.3 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 y 200 rpm en un agitador orbital Adolf Kühner ISF-4-V.

### **2.2.4 Cultivos líquidos en anaerobiosis.**

Cuando la bacteria se cultivó en matraces Erlenmeyer, estos se sellaron con un septum de goma esteril 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1N al medio de cultivo. La agitación se llevó a cabo por un sistema rotacional de paletas.

En ocasiones se requirieron ensayos de menor volumen recurriéndose entonces a biorreactores de 100 ml de volumen cuya temperatura se mantuvo constante mediante la circulación de agua a través de una camisa conectada a un baño termostatizado, la agitación en estos caso se consiguió mediante una barrita magnética controlada por un agitador magnético.

Ambos tipos de biorreactores se esterilizaron con medio autoclavándose durante 20 minutos a 120°C y a 1 atmósfera de presión. 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 N<sub>2</sub> que, a través de un filtro esteril, saturó el medio en este gas. Tras varios ciclos de vacío-N<sub>2</sub>, se cerraron todas las salidas del reactor excepto una a la que se conectó un globo de N<sub>2</sub> creándose una sobrepresión que impidió la entrada de O<sub>2</sub> del exterior.

### **2.3 Antibióticos y sales metálicas**

Los antibióticos se prepararon en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> 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 (µg/ml): ampicilina, 100; cloramfenicol, 30; estreptomina, 50; gentamicina, 10 (para *E.coli*) y 100 (para *Pseudomonas* sp.JLR11); kanamicina, 25; rifampicina, 10 y tetraciclina, 10. Para los ensayos de resistencia/sensibilidad a antibióticos, éstos se suministraron en forma de disco (bioMérieux), en las siguientes cantidades (µg/disco): ácido nalidíxico, 30; piperacilina, 100; rifampicina, 30; tetraciclina, 30 y vancomicina, 30.

Se prepararon soluciones acuosas de telurito potásico (Tel) 1000 veces concentradas, y se utilizaron a distintas concentraciones (µg/ml): 30 para *Pseudomonas* sp. JLR11, y 5 para *E.coli* DH5α.

### **3. Microscopía electrónica de transmisión**

Células cultivadas en medio LB hasta la fase de crecimiento deseada se recogieron por centrifugación y se fijaron con una mezcla de formaldehído al 1% (v/v) y glutaraldehído al 2% (v/v) en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 durante 2 horas a 4°C. Posteriormente, se lavaron con este mismo tampón y se fijaron con tetróxido de osmio al 2% (v/v) y ferrocianuro potásico al 1,5% (v/v) durante 1 hora. Las muestras se lavaron nuevamente con el tampón anterior y se contrastaron en bloque con acetato de uranilo al



1% (v/v) durante 1 hora, se deshidrataron en un gradiente de etanol y se sometieron a un tratamiento con óxido de propileno. A continuación se infiltraron durante una hora en óxido de propileno más resina (proporción 1:1) y se dejaron en resina pura durante 12 horas. Después, se polimerizaron en una estufa a 60°C durante 12 horas y finalmente los bloques se cortaron en secciones ultrafinas de aproximadamente 500 Å, que se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss modelo EM902, a un voltaje de aceleración de 80 kV. Tanto el procesamiento como la observación de las muestras se realizaron en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

### 3. Plásmidos

En la Tabla 2 se muestran los plásmidos utilizados en este trabajo junto con sus características más relevantes.

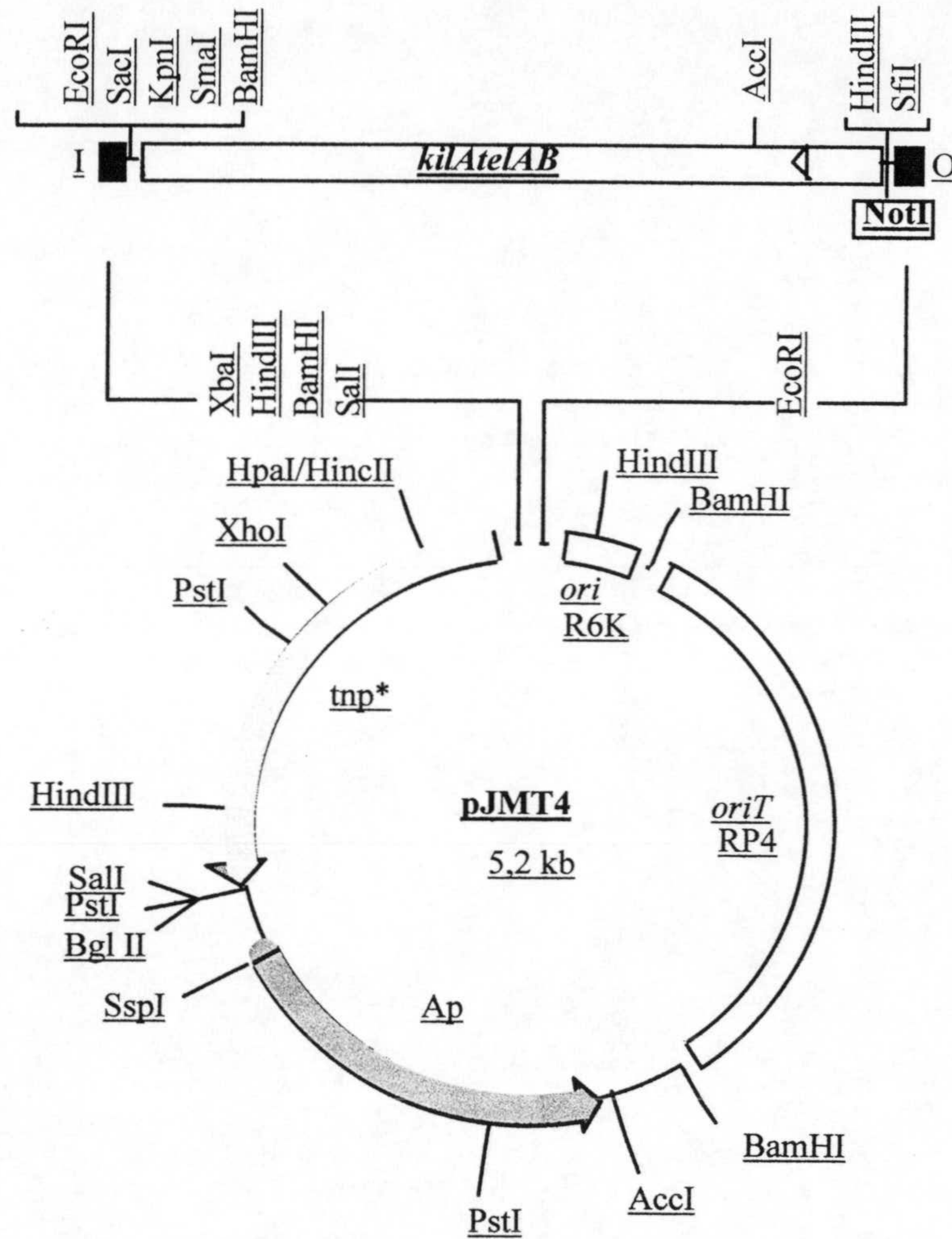
**Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo**

Plásmido	Características	Referencia
pJMT4	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; <i>ori</i> TRP4, mini-Tn5 Tel	Sánchez-Romero <i>et al.</i> (1998)
pJB3Tc	Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> ; <i>ori</i> V RK2, <i>trfA</i> , <i>ori</i> TRK2, $\alpha$ -complementación	Blatny <i>et al.</i> (1997)
pRK600	Cm <sup>R</sup> ; <i>ori</i> ColE1, <i>mob</i> RK2, <i>tra</i> RK2	Kessler <i>et al.</i> (1992)



**pJMT4:** plásmido de la serie pUT que lleva un transposón mini-Tn5telurito (Sánchez-Romero, 1997) (Fig.12). El sistema donador empleado para todos los transposones mini-Tn5 se basa en el plásmido pUT (Herrero *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  $\pi$ ), el origen de transferencia, *oriT*, del plásmido RP4 (es transferible si se aportan las funciones de movilización en *trans*) y lleva el gen de la  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a una gran variedad de antibióticos  $\beta$ -lactámicos incluyendo piperacilina. pUT lleva además el gen que codifica la transposasa de IS50<sub>R</sub>, 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.

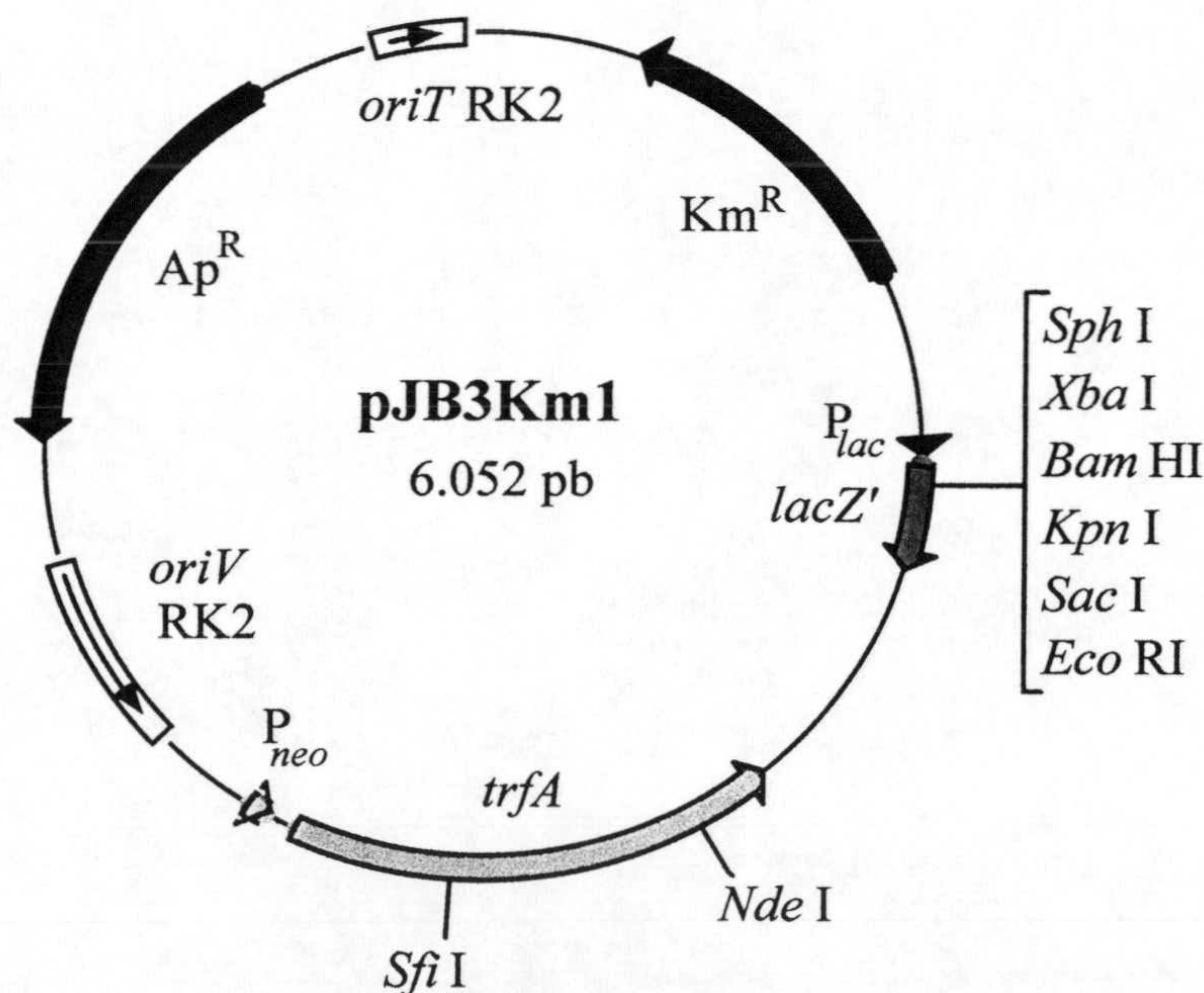




**Figura 12. Plásmido pJMT4.** Se indica los genes que confieren resistencia a ampicilina (*Ap*) y telurito (*kilAtelAB*), así como el gen que codifica a la transposasa (*tnp\**). Los extremos I y O del mini-Tn5 se indican por recuadros sombreados. Se muestra la localización del origen de replicación (*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.



**pJB3Tc:** plásmido de 6.052 pb, derivado de pRK2, que confiere resistencia a tetraciclina y a kanamicina en un amplio espectro de huéspedes (Fig. 13). Posee un sitio de clonación múltiple (SCM) y la región *lac* de pUC19 que permite la complementación  $\alpha$  en cepas de *E. coli* portadoras de la delección *lacZ*  $\Delta$ M15. Su número de copias en *E. coli* es de 5 a 7 por cromosoma. Además, posee el gen *trfA* que codifica una proteína esencial para la iniciación de la replicación a partir del *oriV* de RK2. Se sabe que ciertas mutaciones puntuales en este gen producen un aumento del número de copias del plásmido en la célula (Blatny *et al.*, 1999). Este plásmido posee el origen de transferencia de RK2, lo cual permite su movilización en presencia de plásmidos auxiliares que aportan las funciones de movilización en *trans*.





**Figura 13. Plásmido pJB3Tc.** Los sitios de restricción localizados en el SCM son únicos y están dentro del gen *lacZ'*. También se muestra la localización del origen de replicación (*oriVRK2*), del origen de transferencia (*oriTRK2*), de los genes de resistencia a tetraciclina y a kanamicina, y del gen *trfA* que se expresa desde el promotor constitutivo  $P_{neo}$ . Las flechas indican el sentido de la replicación, de la transferencia o de la transcripción de los genes.

**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.

#### 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 y colaboradores (1992) con modificaciones (Silvia Marqués, comunicación personal). Las células de 1,5 ml de cultivo se recogieron por centrifugación a 12.000g durante 5 minutos y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de GTE, incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200  $\mu$ 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 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 12.000g 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  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, centrifugándose después a 12.000g 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-Na<sub>2</sub>; 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 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 H<sub>2</sub>O 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**

Para la preparación de ADN total se utilizó una modificación del método descrito por Kado y Liu (1981). Las células se cultivaron con agitación durante 10-14 horas en medio LB, recogiendo 0,5-1 ml del cultivo por centrifugación a 17.000g durante 1 min. Después de eliminar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 400 µl de una solución que contenía EDTA 25 mM, sacarosa 20% (p/v) y Tris-HCl 25 mM pH 8,0; incubándose a 4°C durante 5 min. A continuación, se añadieron 200 µl de una solución con SDS 2% (p/v) y NaOH 0,3 N, y la suspensión se mezcló por inversión hasta conseguir la totalidad de las lisis. Posteriormente, se añadieron 0,6 ml de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M y el contenido del tubo se volvió a mezclar. Tras centrifugar la mezcla a 17.000g durante 10 minutos, el ADN se extrajo con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico



(25:24:1). La extracción se repitió tres veces. Finalmente, el ADN de la fase acuosa se precipitó añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se concentró por centrifugación a 17.000g durante 15 minutos. El sedimento se lavó con 1 ml de etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 17.000g durante 1 minuto. El precipitado de ADN se secó a 37°C y se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

## 6. Transferencia de plásmidos por conjugación

La movilización de plásmidos no autotransferibles (*mob*<sup>+</sup>, *tra*<sup>-</sup>) 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 desea movilizar), la cepa de *Pseudomonas* receptora y la cepa auxiliar *E. coli* HB101(pRK600). Los transconjugantes de *Pseudomonas* sp. 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* sp. 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.

## 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 µg 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 µl completados con H<sub>2</sub>O. 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 *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa (0,8% p/v) preparados en tampón TAE. A cada 5 µl de muestras de ADN se añadió 1 µl de tampón de carga. La mezcla se depositó en un pocillo del gel, sumergido en una cubeta con 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 µg/ml) durante 15 minutos y, después de lavar con agua, se expusieron 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 *HindIII* y *BstEII*.

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-Na<sub>2</sub> 0,5M. pH8 (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. Transformación de células de *E. coli***

El método utilizado para la preparación de células competentes de *E. coli* y su ulterior transformación fue el descrito por Inoue *et al.* (1990), con el cuál se obtuvieron frecuencias de transformación superiores a  $1 \times 10^8$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN de pBR322. Cuando se recurrió a la electroporación, se siguió el método descrito por Enderle and Farwel, 1998.

### **7.5. 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.

### **7.6. 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/ $\mu$ l para el ADN cromosómico o 10 pg/ $\mu$ l para el ADN plasmídico), cebadores (0,5  $\mu$ M cada uno), tampón de reacción (KCl, 50 mM; MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM; Tris-HCl, 10 mM pH 9,0), dNTPs (100  $\mu$ M cada uno) y ADN polimerasa *Taq* (Pharmacia Biotech, ref. 27-0799-02) (0,025 U/ $\mu$ l). Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: tras una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, se realizaron 33 ciclos en las siguientes condiciones: 94°C, 10 seg; T<sub>h</sub>°C, 10 seg; 72°C, 1 min, y finalmente se realizó una extensión a 72°C durante 10 min. La temperatura de hibridación (T<sub>h</sub>) se varió en función de los cebadores utilizados. Cuando la reacción estándar no resultó satisfactoria se combinaron distintas modificaciones, como cambiar la concentración de MgCl<sub>2</sub> (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.

El ADN flanqueado a inserciones de transposones se amplificó mediante PCR a partir de cebadores degenerados. En esta técnica, la región de ADN adyacente a la inserción, se enriquece tras dos rondas de amplificación utilizando cebadores específicos, complementarios a la secuencia del extremo del transposón, y cebadores degenerados que hibriden con el ADN cromosómico. En la primera ronda de amplificación se utiliza un cebador específico del transposón utilizado y otro, denominado ARB1, de secuencia degenerada (ver Tabla 3). Esta reacción se hizo en 100  $\mu$ l de volumen y los componentes



de la mezcla son idénticos a los anteriormente citados para las reacciones estandar de amplificación, excepto por la adición de 1 mM de MgSO<sub>4</sub>. 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 es idéntica a la del extremo 5' de ARB1 (ver Tabla 3); 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.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de amplicación de ADN se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN.**

Nombre	Secuencia (5'-3')
ARB1	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(AGCTAGCTAGCTAGTCAGT CAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAT)
ARB2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Tel1	GTTCACGCTTTGTTCTTCCATTC
TelA	GATACACCCTCGCGGTGGGTTAATTG



---

Tel2	CAGAGCATAAGCGGCAAGAGA
TelB	AACCGGCTTTGTTGGGCTG
Cohe	CCTTAAGCCATGGATTGGGTGGGGTTCAGAG
Universal	GTTGTAAAACGACGGCCAGTG
Reverso	CAGGAAACAGCTATGACCATG

---

### **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 *et al.* (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 Ligación de ADN**

Para la ligación de moléculas de ADN se partió de fragmentos lineales obtenidos por digestión con enzimas de restricción en sitios compatibles para la ligación. Estas moléculas se mezclaron en una proporción vector:inserto de 1:3. La reacción se llevó a cabo añadiendo 0,1 volúmenes de tampón de ligación (Boehringer Mannheim, ref. 1243292)) y 1 unidad de ligasa del fago T4 (Boehringer Mannheim, ref. 481220) en un volumen final de 10-15  $\mu$ l completado con H<sub>2</sub>O. La mezcla de reacción se incubó a 8-12°C durante 12-24 horas.



### **7.9 Tratamiento y análisis de secuencias**

Para el tratamiento y análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos (determinación de las fases de lectura abierta, de los sitios de restricción, uso de codones, perfiles de hidropatía, composición de aminoácidos, etc.) se emplearon los programas informáticos DNA Strider v.1.1 (Marck, 1988) y SeqEd v 1.03 (Applied Biosystems, Inc., 1992).

Para el diseño y análisis de oligonucleótidos (para secuenciación y PCR) se utilizaron los programas informáticos OLIGO v.4.05 (W.Rychlik, National Biosciences, Inc., 1992) y Amplify v.2.52 $\beta$  (B. Engels, University of Wisconsin, 1996). Para la estimación de la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos se usó el programa "Tm determination" (Breslauer *et al.*, 1986), disponible en Internet (Tabla 4), el cual considera para en sus calculos tanto la composición de bases, como la secuencia del oligonucleótido.

La comparación de nuevas secuencias, de nucleótidos y aminoácidos, con las distintas bases de datos, se realizó con la ayuda de los programas BLAST (Altschul *et al.*, 1990) disponible en el servidor de Internet del NCBI, y FASTA3 (Pearson y Lipman, 1988) disponible en el servidor de Internet del EMBL-EBI (Tabla 4). El alineamiento de secuencias peptídicas se realizó con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) disponible en el servidor de Internet del PBIL (Tabla 4). Con todos estos programas se usaron las opciones estándar. Los alineamientos obtenidos se trataron con el programa MacBoxShade v. 2.01 (M.D.Baron, Mercurio MDEF, 1997) que, además de generar secuencias consenso para los alineamientos, permite colorear o dar sombreado a los aminoácidos en función de su identidad o similitud.

**Tabla 4. Direcciones de Internet.**



---

<b>Programa</b>	<b>Dirección</b>
Tm determination	<a href="http://alces.med.umn.edu/rawtm.html">http://alces.med.umn.edu/rawtm.html</a>
BLAST	<a href="http://ulrec3.unil.ch/software/WUBLAST-form.html">http://ulrec3.unil.ch/software/WUBLAST-form.html</a>
FASTA3	<a href="http://www.ebi.ac.uk/fasta3/">http://www.ebi.ac.uk/fasta3/</a>
TMpred	<a href="http://www.isrec.isb-sib.ch/software/TMPRED_form.html">http://www.isrec.isb-sib.ch/software/TMPRED_form.html</a>
Clustal W	<a href="http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html">http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_clustalw.html</a>

---

## **8. Métodos analíticos**

### **8.1. 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 rojizo, que se detectó por su absorbancia a 540 nm. Se utilizaron soluciones patrón de nitrito sódico entre 1 y 100  $\mu$ M, obteniéndose la concentración de nitrito por interpolación gráfica de la representación  $A_{540}$  frente a las concentraciones de las soluciones patrón.

### **8.2 Determinación de glucosa**

La glucosa presente en las muestras se determinó enzimáticamente mediante la utilización de un kit comercial suministrado por Boehringer Mannheim. La reacción comienza con la acción de la hexokinasa fosforilando a la glucosa mediante ATP para formar glucosa-6-fosfato. Este compuesto es oxidado por la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa a ácido 6-fosfo-glucónico, con la correspondiente reducción de  $\text{NADP}^+$  a



NADPH; la producción de este último es estequiométrica a la glucosa presente en la muestra. La reacción se siguió en un espectrofotómetro a 340 nm

### **8.3 Determinación de amonio**

El amonio se determinó por el método de fenol-hipoclorito descrito por Solorzano (1969). En las determinaciones se utilizó una alícuota del medio de cultivo libre de células, a la que se añadía:  $H_2O_d$  hasta un volumen de 4,1 ml; 0,2 ml de fenol al 10% (p/v) en etanol absoluto; 0,2 ml de nitroprusiato sódico al 0,5% (p/v), y 0,5 ml de solución oxidante. La mezcla se agitó y, tras incubarla dos horas en oscuridad, se determinó espectrofotométricamente (620 nm) la formación de un complejo coloreado. La solución oxidante se preparó inmediatamente antes de usarla y contenía: 16 g de citrato sódico y 0,8 g de NaOH en 80 ml de  $H_2O_d$  (solución alcalina, estable durante al menos 1 mes), 4 ml de hipoclorito sódico comercial y  $H_2O_d$  hasta 100 ml.

### **8.4 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 (1951).

#### **8.4.1 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  $\mu$ l de la muestra se añadieron 200  $\mu$ l 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.

#### **8.4.2 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 *et al.* (1951) basado en la reacción de Folin que resultó compatible con soluciones alcalinas.

### **8.5. Determinación del contenido de nitrógeno en biomasa bacteriana.**

Las células de un cultivo bacteriano se recogieron por centrifugación a 5.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Tras lavar el sedimento celular con medio mínimo M8, la suspensión se centrifugó de nuevo dejándose secar el sedimento a 50°C hasta alcanzar un peso constante. Se permitió que alcanzara de nuevo la temperatura ambiente en un desecador para evitar la captación de agua y se estableció su peso exacto.

El análisis del porcentaje en nitrógeno de la muestra fue realizado por M. Dolores Mingorance en el Departamento de Ciencias de la Tierra y Química Ambiental de la Estación Experimental del Zaidín. Para ello, el material celular seco se digirió en presencia de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un horno de microondas (Maxidigest mx 4350, Prolabo). El nitrógeno orgánico se convirtió así en su totalidad en sulfato de amonio, cuyo contenido en nitrógeno se determinó mediante un analizador elemental automático (Technicon autoanalyzer II system, Bran and Luebbe) según el método descrito por Krom, 1980.

## **9. Análisis de intermedios metabólicos en la degradación de TNT.**

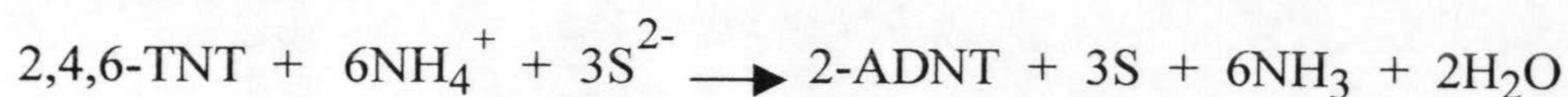
### **9.1 Síntesis orgánica de algunos intermedios de la ruta.**

Algunos productos descritos en la bibliografía como intermedios en la biodegradación del TNT tuvieron que ser obtenidos por síntesis al no estar disponibles en el mercado como patrones comerciales.

**4-amino-2,6-dinitrotolueno (4ADNT):** Se redujo el grupo nitro del TNT en posición *para* utilizando S(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> al 20% como agente reductor. Fueron necesarios 3 moles de sulfuro por cada mol de TNT. El medio de reacción se mantuvo a 45°C en agitación y en atmósfera de N<sub>2</sub> para evitar la formación de azoxidímeros a partir de intermedios nitroso e hidroxilamina, generados en el proceso reductivo. El seguimiento de la reacción se hizo

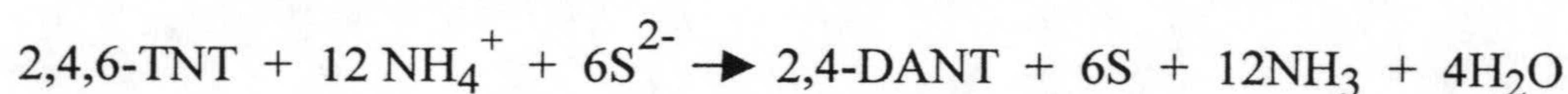


mediante HPLC analítico y se consideró ésta finalizada cuando la totalidad de TNT se convirtió en 4ADNT.



Para retirar el azufre formado se filtró el producto de la reacción y se evaporó a vacío el metanol. El producto de color rojizo se analizó por  $^1\text{H}$ -RMN, obteniéndose un patrón de desplazamiento que coincidía con el publicado por Nielsen *et al.* (1979) para el 4ADNT.

**2,4-diamino-6-nitrotolueno (2,4ADNT):** Se llevó a cabo una reducción de los grupos nitro en posiciones *orto* y *para* con  $\text{S}(\text{NH}_4)_2$  como agente reductor. Las condiciones de la reacción fueron las descritas para la síntesis del 4ADNT pero utilizando sulfuro amónico en exceso para conseguir reducir la molécula hasta el producto deseado.



El producto sintetizado mostró las mismas señales espectroscópicas que las descritas por Nielsen *et al.* (1979) para el 2,4DANT.

**4-hidroxilamina-2,6-dinitrotolueno (4-NHOH-DNT):** Para la obtención del derivado hidroxilamina se siguió el método de síntesis descrito por Bauer *et al.* (1944) para la síntesis del ácido 4-hidroxilamino-benzóico. En este caso se evitó el uso de NaOH y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  por carecer el TNT de grupos ácidos. A 50 ml de una solución de 8 mM de TNT en MeOH se adicionaron 5 ml de una solución 530 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Tras mantener la mezcla de reacción en agitación y atmósfera de  $\text{N}_2$  se adicionaron 57 mg de Zn en polvo, manteniéndose la reacción a temperatura ambiente. Tras 20 minutos de reacción el análisis por HPLC mostró que un 75% del TNT inicial se había reducido hasta un producto que coelúa con la hidroxilamina del TNT descrita por Estrella Duque (1995). Para evitar que el grupo hidroxilamina siguiera reduciéndose hasta el amino



correspondiente, se paró la reacción. El producto de la reacción se filtró y se evaporó el disolvente para recuperar un sólido amarillo. El análisis por  $^1\text{H}$ -RMN confirmó la presencia de un producto mayoritario cuyos desplazamientos químicos resultaban coincidentes con los obtenidos por Bauer *et al.* (1944) para la 4-NHOH-2,6-DNT.

**1,3,5-Trinitrobenzeno (TNB):** Para su síntesis se siguió un proceso similar al descrito para la síntesis de TNT en el apartado 13.1 de *Materiales y Métodos*. A 100 mg de 1,3-dinitrobenzeno se añadió un volumen de mezcla sulfónitrica y el medio de reacción se mantuvo a 105°C durante 4 horas. La nitración se paró por adición cuidadosa de la mezcla de reacción sobre 3 ml de agua desionizada helada, precipitando un sólido amarillo que fue extraído tras la adición de 3 ml de acetato de etilo. Esta operación se repitió tres veces, retirando la fase orgánica (superior) tras cada extracción. El disolvente fue evaporado a vacío en un evaporador rotatorio (Bucchni), obteniéndose un sólido amarillo cuyo análisis por CG-EIMS proporcionó un patrón de fragmentación coherente con el propuesto para la molécula de TNB.

## **9.2 Extracción de compuestos aromáticos de cultivos bacterianos**

Para la extracción de los metabolitos aromáticos se utilizaron dos técnicas distintas: la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida. En todos los casos los cultivos bacterianos se centrifugaron a 5.000g durante 5 minutos para retirar las células, y los sobrenadates se extrajeron para recuperar los productos.

**Extracción líquido-líquido:** 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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y el disolvente se evaporó a vacío mediante un evaporador rotatorio.

**Extracción en fase sólida:** Un cartucho de relleno OASIS (Waters) se acondicionó lavándolo con MeOH y  $\text{H}_2\text{O}$  según la descripción del suministrador. Los volúmenes fueron: 1 ml para cartuchos de 30 mg de relleno y 5 ml para 500 mg de relleno. El medio de cultivo libre de células se hizo pasar por el cartucho utilizando una bomba de vacío que permitía el control del flujo. Los compuestos no aromáticos de alta polaridad, debilmente retenidos en el cartucho, se eluyeron con el paso de 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Los compuestos aromáticos de interés fueron eluidos pasando entre 2 y 5 ml de MeOH. Los productos obtenidos se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$ , tras evaporar el disolvente con una corriente de  $\text{N}_2$ , hasta que se analizaron.

**9.3 Técnicas de análisis cromatográfico y espectroscópico.** El análisis de los intermediarios en la degradación de TNT se realizó mediante técnicas cromatograficas (HPLC y GC) seguidas de análisis espectroscópicos (EIMS y  $^1\text{H}$ -RMN).

#### **9.3.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).**

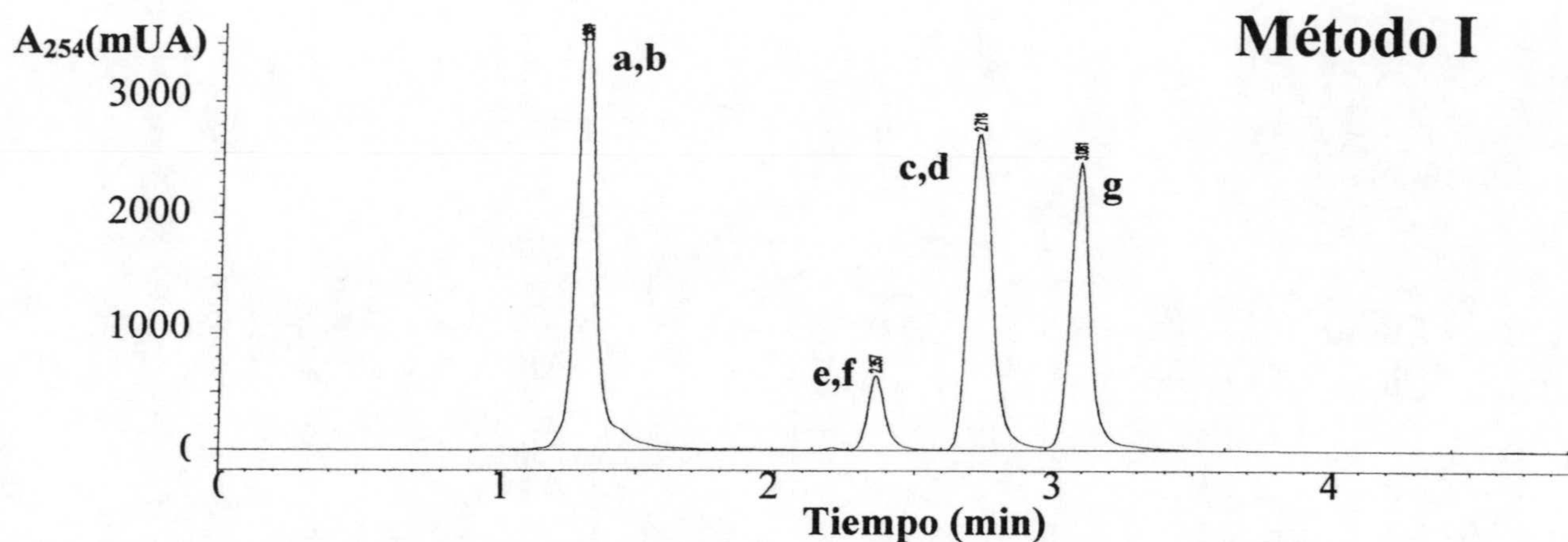
Tanto los sobrenadantes de los cultivos como los productos extraídos fueron analizados por HPLC (HP-1050 acoplado a un inyector automático), utilizando un detector de Diodo-Array (DAD, HP-1050). La detección de los compuestos aromáticos se hizo a 254 nm y los diferentes picos fueron barridos entre 200 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 purificación de algunos de los intermediarios se llevó a cabo mediante HPLC a través de una columna semipreparativa



Nucleosil C18; 250 x 8 mm (Scharlau). Las fases móviles utilizadas tuvieron la misma composición que las de las separaciones analíticas descritas a continuación. El flujo de la fase móvil se adaptó a las dimensiones de esta columna mediante la siguiente ecuación:

La distinta polaridad de los intermediarios metabólicos requirió más de un método para sus completa separación cromatográfica.

**Método I:** Es un método cromatográfico rápido que permitió seguir la conversión de TNT en ADNTs y DANNTs, no permitiendo la separación de aromáticos más polares que portaban grupos carboxilo e hidroxilo (figura 14). La fase móvil (ACN:H<sub>2</sub>O, 65:35) se pasó en modo isocrático a través de una columna C18 a un flujo de 0,7 ml/min.

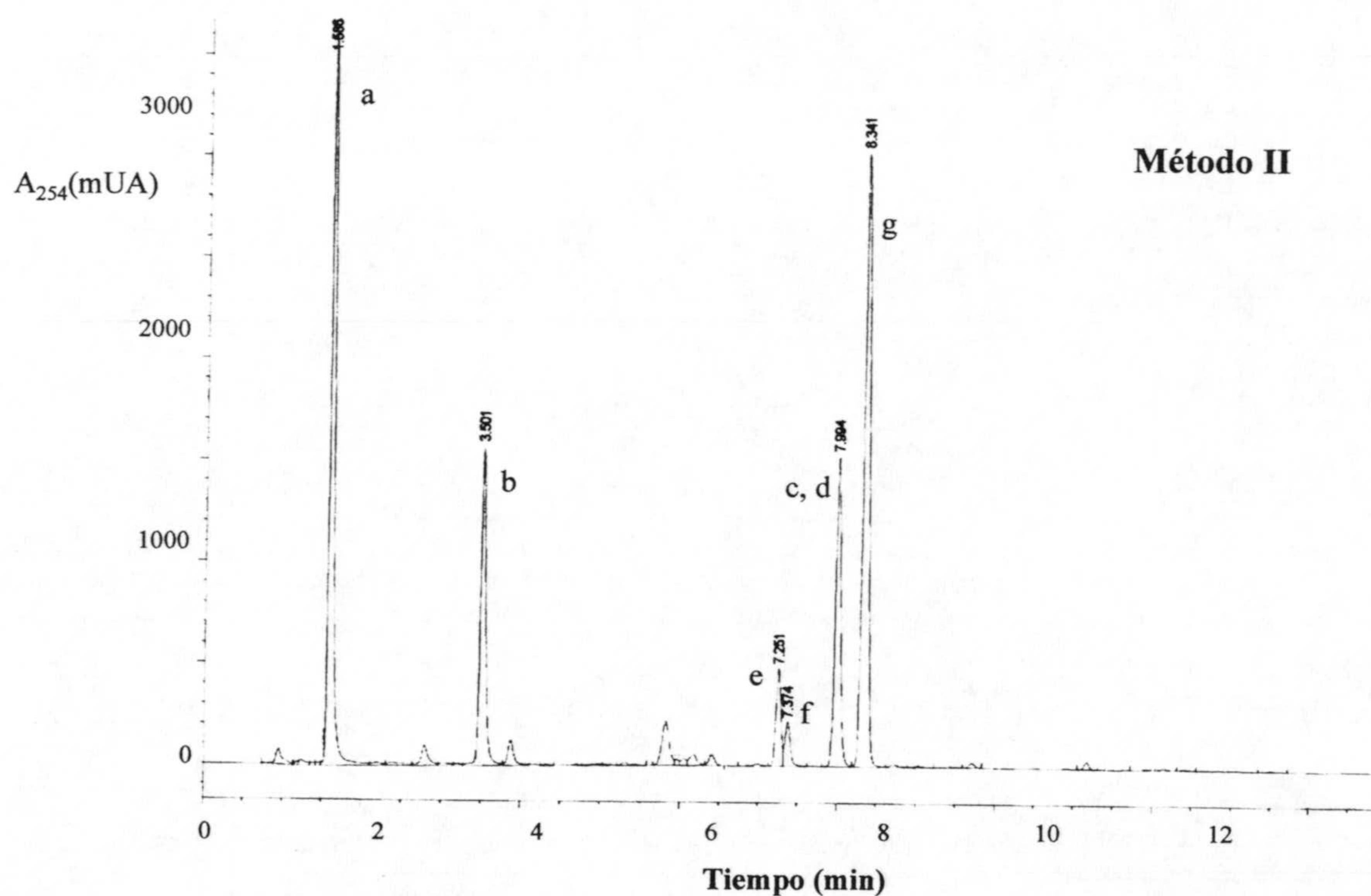


**Figura 14.** Separación cromatográfica de compuestos aromáticos por el método I. Se analizaron los siguientes compuestos: a, ácido benzoico; b, ácido 4-hidroxibenzoico; c, trinitrotolueno; d, 2,4-dinitrotolueno; e, 2-amino-2,6-dinitrotolueno; f, 4-amino-2,6-dinitrotolueno; g, 2-nitrotolueno. Las condiciones del análisis fueron las descritas en el texto.

**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 H<sub>2</sub>O (1% AcOH) y ACN. La



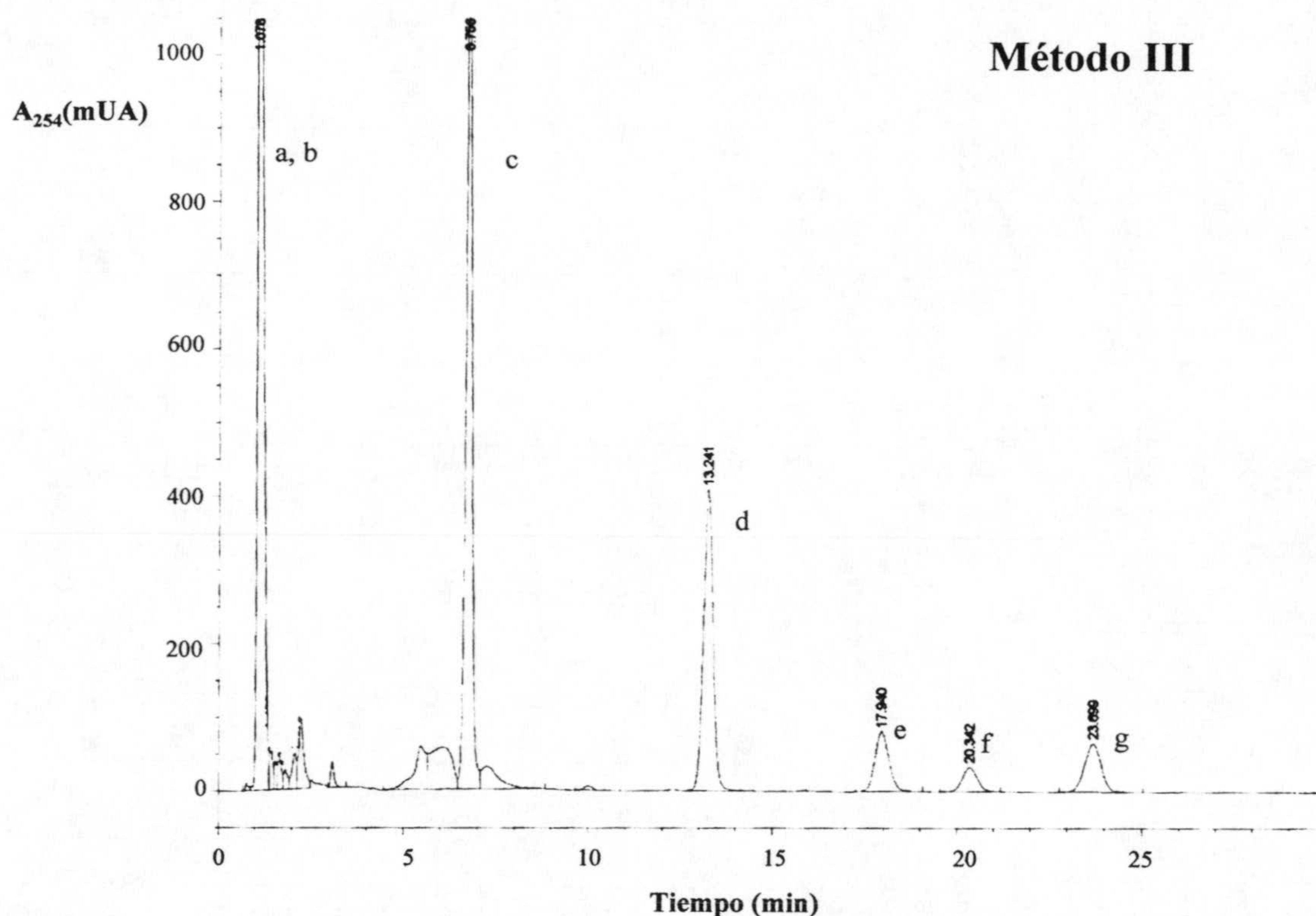
composición inicial fue de 25% en ACN, manteniéndose así durante los primeros 2 minutos. La composición cambio hasta 100% de ACN en 18 minutos; se mantuvo así durante 2 minutos, para finalmente volver, en 3 minutos, a la composición original de la fase móvil. El método (Figura 15) mostró una buena resolución en fases estacionarias de fase reversa C18, especialmente en la columna Ultracarb C18; 250 x 4.6 mm (Phenomenex).



**Figura 15. Separación cromatográfica de aromáticos por el método II.** Se analizaron los siguientes compuestos: a, ácido benzoico; b, ácido 4-hidroxibenzoico; c, trinitrotolueno; d, 2,4-dinitrotolueno; e, 2-amino-2,6-dinitrotolueno; f, 4-amino-2,6-dinitrotolueno; g, 2-nitrotolueno. Las condiciones del análisis fueron las descritas en el texto.



**Método III:** Este método separó todos los isómeros mononitrotoluenos y dinitrotoluenos así como los ADNTs (Figura 16). No resultó útil para la separación de compuestos polares con grupos carboxilo e hidroxilo. La fase móvil consistió en isopropanol:H<sub>2</sub>O (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 $\mu$  C8; 150 x 4,6 mm (Waters).



**Figura 16. Separación cromatográfica de aromáticos por el método III.** Se analizaron los siguientes compuestos: a, ácido benzoico; b, ácido 4-hidroxibenzoico; c, trinitrotolueno; d, 2,4-dinitrotolueno; e, 2-amino-2,6-dinitrotolueno; f, 4-amino-2,6-dinitrotolueno; g, 2-nitrotolueno. Las condiciones del análisis fueron las descritas en el texto.

### 9.3.2 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 de 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.

#### **9.3.4 Resonancia Magnética Nuclear de Protón (<sup>1</sup>H-RMN).**

Los productos extraídos, totalmente libres de agua, se disolvieron en acetona deuterada y se procedió a su análisis mediante <sup>1</sup>H-RMN a través de los servicios técnicos de la Universidad de Granada. Los espectrómetros utilizados fueron los modelos BRUKER ARX400 (400 MHz) y BRUKER AM300 (300 MHz), utilizándose como estándar interno Tetrametilsilano (TMS).

#### **10. Preparación de extractos libres de células.**

El cultivo bacteriano se recogió por centrifugación a 4°C y 5.000g durante 20 minutos. Las células se lavaron con tampón fosfato 20 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 ultrasonidos utilizando un sonicador (Braun Biotech modelo Labsonic 2000) conectado a una sonda tipo aguja. La muestra se mantuvo en un baño de agua e hielo mientras se dieron pulsos de 75W durante 15 segundos, a intervalos de 1 minuto, hasta que se obtuvo un extracto transparente. Las células sin romper y los grandes fragmentos celulares se descartaron por centrifugación a 5.000g durante 45 minutos. El sobrenadante constituyó el extracto libre de células.

#### **11. Medida de actividades enzimáticas.**

##### **11.1 Ensayo de la actividad nitrito reductasa en *Pseudomonas* sp.JLR11**



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

#### **11.1.1 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 proteína/ml). Tras seguir durante unos minutos la oxidación basal de NADH, se añadió  $\text{NaNO}_2$  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.

#### **11.1.2 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 desnaturizantes. El protocolo de este tipo de electroforesis se describe en el apartado 12.2 de esta sección. 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).

### **11.3 Ensayos de detección de la actividad hidroxilamina reductasa en geles nativos de proteínas**

El método de detección fue idéntico al descrito en el apartado 11.1.2 para la detección de la actividad nitrito reductasa en geles nativos. En esta ocasión se utilizó como sustrato de la enzima una solución de clorhidrato de hidroxilamina, 1 M, en TrisHCl 50 mM pH 7,5, siendo 50 mM la concentración del sustrato en la mezcla de incubación. La aparición de bandas acromáticas sobre el fondo azul del gel marcó el final de la reacción y la fijación de ésta siguió el mismo proceso que en el descrito para la actividad nitrito reductasa.

### **11.2 Ensayo *in vitro* de la actividad nitroreductasa en extractos libres de células de *Pseudomonas sp.* JLR11**

El ensayo se llevó a cabo en cubetas de 1 ml, conteniendo la mezcla de reacción tampón fosfato 100 mM pH7,2; NADH 0,3 mM y una muestra de extracto (2-3mg proteína/ml). Tras seguir durante unos minutos la oxidación basal de NADH, se añadieron 5 ml de TNT (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 NADH en presencia y ausencia de TNT. 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  $\mu$ mol de NADH por minuto.

## **12. 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.

### **12.1 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 5.

**Tabla 5. Composición de los geles empleados en la EGPA-SDS.**

	<b>Gel concentrador<sup>a</sup></b>	<b>Gel separador<sup>a</sup></b>
<b>Acrilamida/Bisacrilamida<sup>b</sup> 29:1 (p/v)</b>	0,8 ml	8,3 ml
<b>Tris-HCl 1,5 M pH 8,8</b>	-	5 ml
<b>Tris-HCl 1 M pH 6,8</b>	0,750 ml	-
<b>SDS 20% (p/v)</b>	0,06 ml	0,2 ml
<b>N,N,N',N'Tetraetilendiamina (TEMED)</b>	0.006 ml	0,01 ml



Persulfato amónico <sup>c</sup> 10%(p/v)	0,06 ml	0,1 ml
H <sub>2</sub> O	4,39 ml	6,4 ml

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

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

<sup>c</sup> 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)

## 12.2 Separación electroforética en condiciones no desnaturalizantes (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.

### **13 Ensayos de mineralización de $^{14}\text{C}$ -TNT.**

#### **13.1 Síntesis de $^{14}\text{C}$ -TNT.**

En la obtención de  $^{14}\text{C}$ -TNT se siguió fundamentalmente el proceso de síntesis descrito por Michels *et al.*, (1994), por el que se obtiene el producto radioactivo tras sucesivas nitraciones de  $^{14}\text{C}$ -tolueno.

A 50  $\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$ -tolueno, marcado uniformemente en el anillo (SIGMA ref. 31,435-8), se le añadieron 120  $\mu\text{l}$  de tolueno sin marcar. Este volumen se adicionó en la misma ampolla que contenía el compuesto marcado y que se mantuvo en todo momento en hielo para evitar pérdidas, debidas a la naturaleza volátil del aromático. Mediante una pipeta Pasteur, la mezcla  $^{12}\text{C}$ -tolueno/ $^{14}\text{C}$ -tolueno se pasó a un tubo de borosilicato (12 x 7,5 mm; Corning, ref. 99445-12) a 4°C en el que se llevó a cabo la reacción de nitración; que se inició con la adición, sobre el tolueno, de la mezcla sulfonítrica-I (150  $\mu\text{l}$   $\text{HNO}_3$  y 230  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98%) con la ayuda de una jeringa Hamilton. La mezcla de reacción se agitó con cuidado y se mantuvo en incubación durante cuatro horas a temperatura ambiente. Entonces, los tubos de reacción se transfirieron a un termobloque a 60°C, y se añadió un volumen de mezcla sulfonítrica-II (150  $\mu\text{l}$   $\text{HNO}_3$ , 300  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98% y 470  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -65% $\text{SO}_3$  fumante). Tras la adición de la mezcla, la temperatura del



termobloque se elevó hasta 85°C y se mantuvo así durante una hora. En un tercer paso de nitración se añadió otro volumen de mezcla sulfonítrica-II, se elevó la temperatura a 105°C manteniéndose la incubación durante cuatro horas. La adición de la mezclas sulfonítricas y la operación de mezclado de los reactivos debe hacerse con una leve agitación debido al peligro de quemaduras ocasionadas por la corrosión y las altas temperaturas de los ácidos utilizados. La nitración se paró por adición cuidadosa de la mezcla de reacción sobre 3 ml de agua desionizada mantenida en un baño de hielo. La bajada de temperatura hizo que precipitara un sólido amarillento. Se procedió entonces a extraer el producto de la reacción mediante la adición de 3 ml de acetato de etilo. Se repitió esta operación tres veces retirando la fase orgánica (superior) tras cada extracción. El disolvente se eliminó a vacío, mediante un evaporador rotatorio, recuperándose 250 mg de un sólido amarillo. Se disolvió una pequeña cantidad en MeOH y se procedió a analizarlo por CG-EIMS revelando la presencia de un producto mayoritario (93% área total del cromatograma), y cuyo espectro de masas coincidía con el obtenido para el 2,4,6-trinitrotolueno. La reacción de nitración mostró un rendimiento del 91%. Un  $\mu\text{g}$  del  $^{14}\text{C}$ -TNT sintetizado generó una radioactividad de 500 desintegraciones/minuto (cpm), en las condiciones standard de detección de radioactividad utilizadas en nuestro laboratorio, mediante una detector de radiaciones Packard 1500 TRI-CARB.

### **13.2. Ensayo de mineralización de $^{14}\text{C}$ -TNT.**

Los ensayos de mineralización de  $^{14}\text{C}$ -TNT por cultivos bacterianos se realizaron en reactores de 100 ml descritos en el apartado 2.2.4 de la sección *Materiales y Métodos*. La bacteria se cultivó, en condiciones anóxicas, en medio mínimo M8 con la fuente de carbono indicada en cada caso. El  $^{14}\text{C}$ -TNT se añadió al reactor disuelto en MeOH para obtener 50.000 cpm/ml cultivo. Una vez estabilizado el sistema se procedió a inocular el



medio a través de una de las entradas del reactor. La atmósfera anóxica se consiguió mediante una corriente de nitrógeno que, a través de un filtro esteril, saturó el medio en este gas. La salida de gases del reactor se mantuvo conectada a una solución 10 N de NaOH para retener el CO<sub>2</sub> desprendido por el metabolismo bacteriano. Al término del experimento, los niveles de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> en la solución se determinaron en el detector de radiaciones, tras diluir la solución alcalina con líquido de centelleo en una proporción 1:1.

### **13.3 Distribución del <sup>14</sup>C en el cultivo bacteriano.**

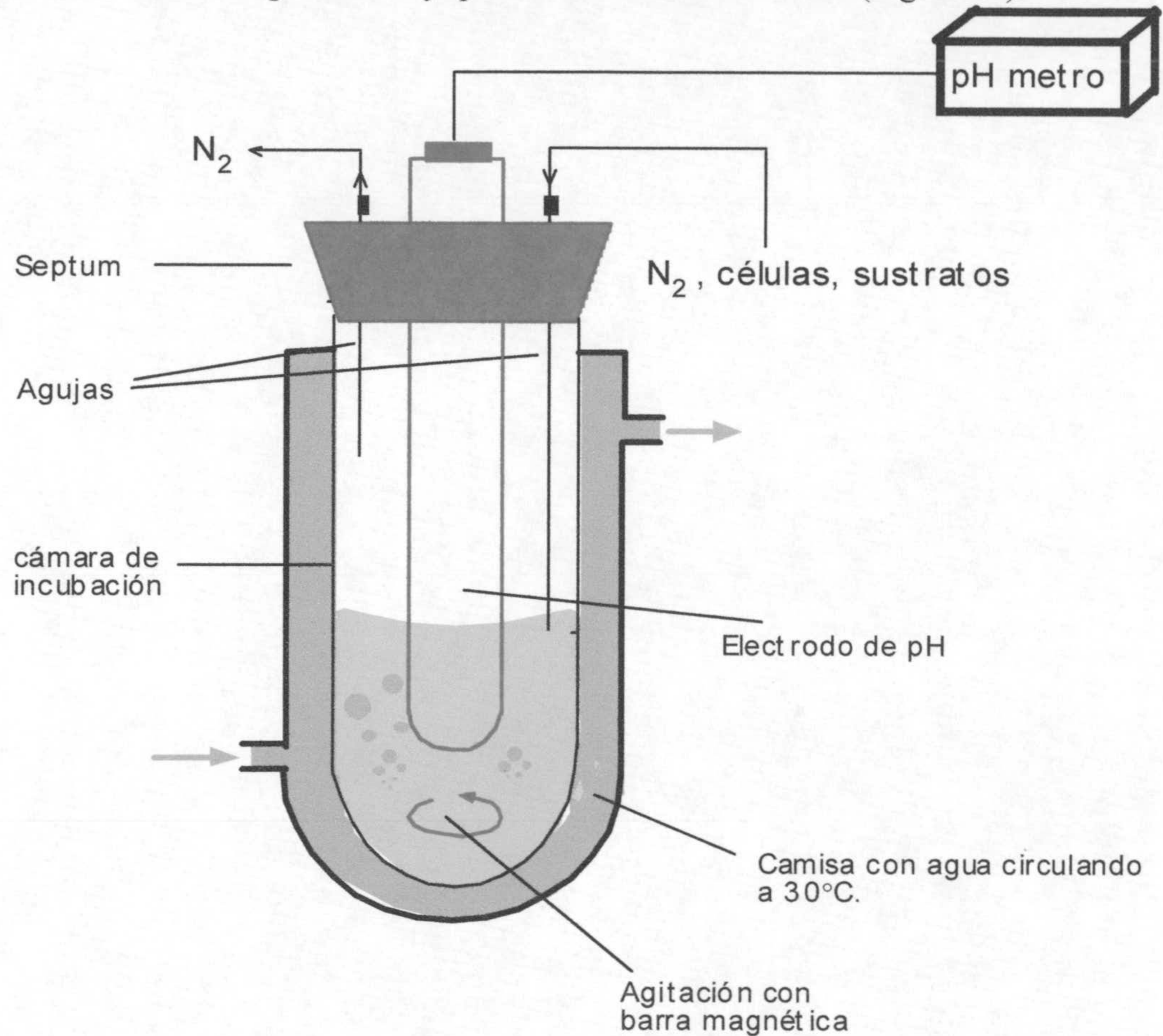
Periódicamente se tomó una muestra de 1 ml del cultivo para determinar la incorporación de radioactividad a material celular así como la transformación de <sup>14</sup>C-TNT en otros <sup>14</sup>C-metabolitos. Para ello se centrifugaron las muestras de cultivo y se determinó la radioactividad asociada al sobrenadante. El sedimento se lavó en tampón fosfato 40 mM pH 7 y finalmente se incubó en frío durante 20 minutos, en una solución de ácido tricloroacético al 10% (v/v). Tras centrifugar, se recogió el sedimento y se determinó su contenido en radioactividad utilizando el contador de centelleo. El sobrenadante del cultivo se analizó por cromatografía líquida (HPLC) preparativa para determinar la radioactividad asociada a los productos del metabolismo bacteriano del <sup>14</sup>C-TNT; utilizándose, para ello, el Método II según se describe en el apartado 9.3.1 de *Materiales y Métodos*. Los productos eluidos se recogieron en fracciones de 1 minuto (2,5 ml) mediante un colector de fracciones (Foxi Jr.). El contenido de radioactividad en las fracciones se determinó en el detector de radiaciones.

### **14. Medidas de translocación de protones.**

Los cambios de pH en el medio extracelular de suspensiones celulares anóxicas se determinaron mediante un electrodo combinado (Crison, Ref. 5202) conectado a un



pHmetro (Crison, 2001). La suspensión se mantuvo en el interior de un cámara de incubación que denominamos *respirómetro* y que fue diseñado a tal efecto (Figura 17).



**Figura 17 Diseño del *respirómetro*.** La cámara de incubación consistió en un tubo de vidrio (de 10 cm de longitud y 2 cm de diámetro) que permitió alojar un electrodo de pH, para determinar los cambios en la concentración de protones del medio extracelular. La cámara de incubación se mantuvo cerrada mediante un septum de goma atravesado por el electrodo. Dos agujas de distinta longitud atravesaron el septum, la más larga (10 cm) se utilizó como vía de entrada de soluciones líquidas (medio de incubación, células, sustratos) y de N<sub>2</sub>. A través de la aguja más corta (5 cm) accedió el N<sub>2</sub> al exterior del sistema, permitiendo así una circulación del gas de manera continua que impidió el contacto del oxígeno con la suspensión celular. Las suspensiones que se adicionaron al sistema se hicieron anóxicas con anterioridad mediante ciclos de vacío/N<sub>2</sub>. La cámara de incubación se termostatóizó mediante una camisa por la que circuló agua a 30°C. El sistema se mantuvo en agitación mediante una barra magnética de pequeño tamaño y un agitador magnético.



Los ensayos se realizaron en una solución de 5 ml de una solución 250 mM de sorbitol que resultó ser el volumen mínimo necesario para cubrir la membrana del electrodo y poder obtener medidas repetitivas. El medio se mantuvo en agitación a 30°C y bajo atmósfera de N<sub>2</sub> hasta la estabilización del pH. Entonces, las células se adicionaron al sistema a través de la aguja de mayor longitud hasta conseguir que la turbidez final de las suspensión bacteriana fuese de 0.4 (DO<sub>660</sub>) Tras esperar unos segundos en los que se homogeneizó el sistema, se tomaron medidas de los valores que indicaba el pHmetro con una periodicidad que varió entre los 15 y 30 segundos dependiendo del ensayo. Una vez se estabilizó la acidificación del medio debido a la respiración endógena), se adicionaron 2 ml de una solución anóxica de sorbitol que contenía el aceptor de electrones propio de cada experimento. Entonces, se siguieron los cambios de pH del medio a lo largo del tiempo.

#### **15. Preparación de vesículas.**

Los cultivos de *Pseudomonas sp.* JLR11, en fase exponencial tardía, se recogieron por centrifugación (4°C y 5.000g), y se lavaron con tampón anóxico Tris-HCl 20 mM, pH 7,3. Se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones, resuspendiéndose el sedimento final en un volumen del tampón anterior no superior a 5 ml. Las células se rompieron pasando la suspensión a través de una prensa de French a una presión de 1000 psi, las suspensiones procedentes de células cultivadas en presencia de TNT requirieron entre 8 y 10 pases por la prensa, mientras que fueron suficientes 2 pases para romper las células cultivadas en ausencia del nitroaromático. Las células enteras se descartaron por centrifugación a 5.000g durante 20 minutos. El extracto libre de células se centrifugó a 90.000g durante 60 minutos en una ultracentrífuga (Beckmann 5CR), y el sedimento, tras disolverse en 1 ml del mismo tampón, constituyó la fracción de membrana. Las

UNIVERSIDAD DE GRANADA

9 / MAYO 2000

COMISION DE DOCTORADO



membranas en suspensión dieron lugar, de manera espontanea, a vesículas que se guardaron a 4°C en un vial sellado bajo atmósfera de nitrógeno.

### 16. Medida de fosforilación oxidativa.

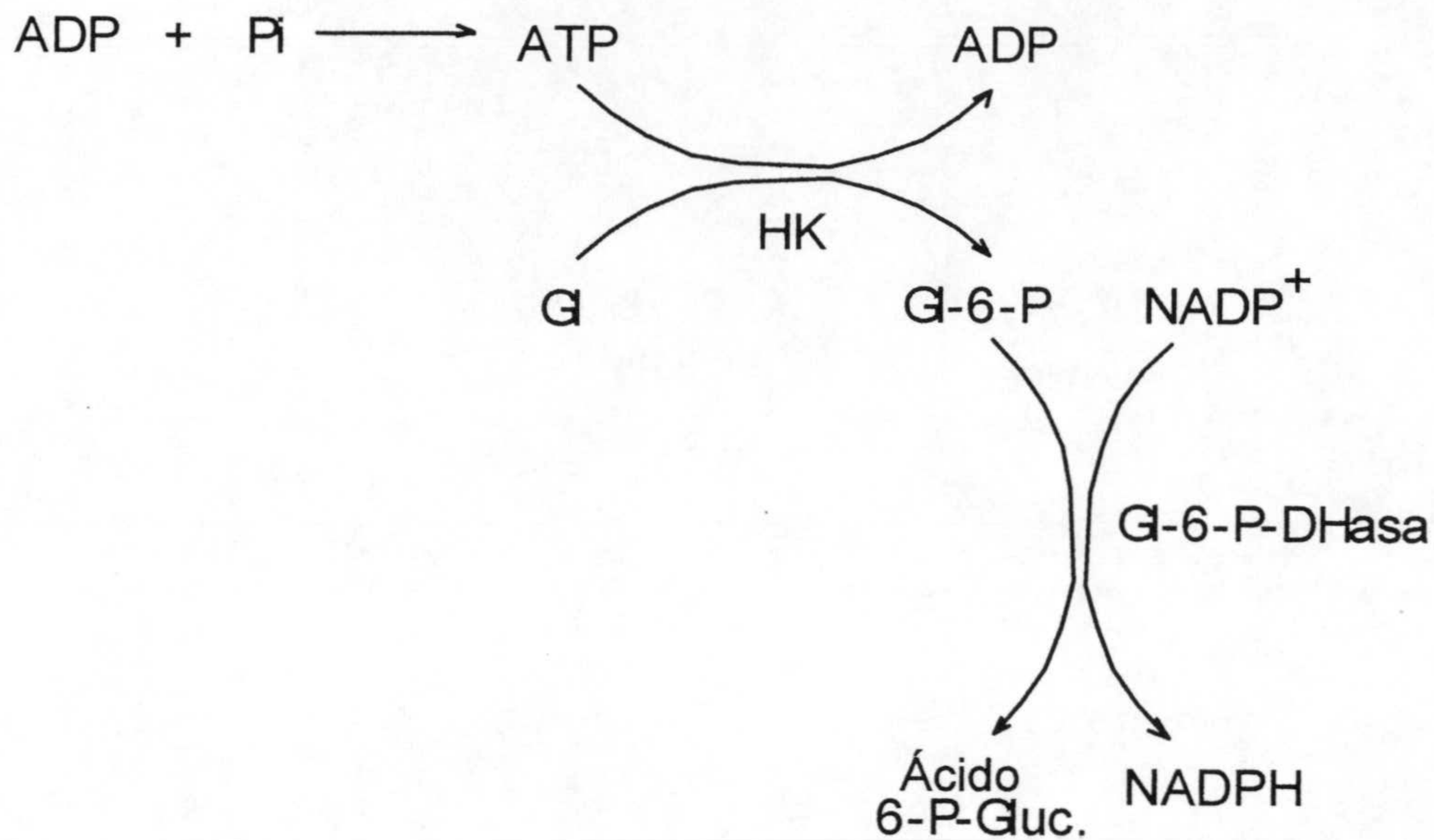
La producción de ATP *in vitro* con vesículas de *Pseudomonas sp.* JLR11 se determinó mediante el método descrito por Peck (1966), modificándolo para evitar el uso de fósforo radioactivo. En el momento del ensayo se preparó 1 ml de mezcla de reacción (40x) que se guardó en hielo en un vial anóxico sellado. La composición de la mezcla fue la siguiente:

Componente de la mezcla	Concentración en la mezcla de reacción
Cl <sub>2</sub> Mg	15 mM
ADP	0,5 mM
Glucosa	10 mM
NADP <sup>+</sup>	0,5 mM
HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM
Tris-HCl pH7,4 saturado en TNT	50 mM
Hexokinasa	2U
Glucosa-6-P-deshidrogenasa	1U

La reacción se llevó a cabo en un vial de 5 ml sellado con un septum de butilo . El vial se hizo anóxico mediante sucesivos ciclos de vacío/N<sub>2</sub> y a través del septum se adicionó, mediante una jeringa, un volumen de 3,75 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 saturado en TNT. El vial se incubó a 30°C. Mediante una aguja se adicionaron 150 µl de la mezcla de reacción concentrada y 100 µl de las suspensión de vesículas. El curso de la reacción se siguió retirando 900 l de muestra mediante una jeringa, para evitar romper la atmósfera anóxica, y la reacción se detuvo transfiriendo la muestra a un baño de hielo y centrifugando en una microfuga a 10.000g durante 3 minutos para retirar los restos de vesículas. La concentración de ATP se determinó espectrofotométricamente a 340 nm en



una reacción acoplada (ilustrada en la Figura 18) en la que la producción de NADPH es equimolar con la concentración de ATP de la solución.



**Figura 18. Reacción enzimática acoplada para la determinación de ATP.** La reacción implica que la hexokinasa (HK) fosforila a la glucosa mediante el ATP, generado por las vesículas en respuesta a un aceptor final de electrones, dando lugar a Glucosa-6-fosfato (G6P). Este compuesto es oxidado por la Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G-6-P-DHasa) ácido 6-fosfogluónico, con la correspondiente reducción de NADP<sup>+</sup> a NADPH que se detectó a 340 nm. Los compuestos y enzimas fueron abreviados en la figura como sigue: G, glucosa; Pi, ortofostato; G-6-P, glucosa-6-fosfato; Ácido 6-P-Gl, ácido 6-fosfogluónico; HK, hexokinasa; G-6-P-DHasa, Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa.



## **Resultados**



## **Capítulo I**

**Aislamiento y caracterización de una bacteria  
capaz de utilizar 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como  
única fuente de nitrógeno en condiciones anóxicas**



**1. Aislamiento de una bacteria capaz de utilizar 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como única fuente de nitrógeno en condiciones anóxicas.**

Con anterioridad al inicio de esta Tesis Doctoral, se había aislado en el grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín, un microorganismo capaz de utilizar el explosivo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como única fuente de nitrógeno en condiciones anóxicas. La cepa se aisló de las plantas de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Granada. El enriquecimiento, previo al aislamiento, se llevó a cabo mezclando volúmenes iguales del agua procedente de la planta y de medio mínimo M8. Este medio se saturó en TNT y se suplió con glucosa, 0,1% (p/v). El cultivo se realizó en matraces Erlenmeyer sellados con septum de goma y gaseados con argón para desplazar el oxígeno y hacer el medio anóxico, tal y como se describe en la sección 2.2.4 de *Materiales y Métodos*. Tras dos semanas de incubación a 30°C, la suspensión se diluyó 100 veces en medio mínimo saturado en TNT y con glucosa al 0,1% (p/v). La suspensión se incubó de nuevo, con agitación, a 30°C y en condiciones anóxicas hasta que se detectó turbidez. En ese momento se realizaron diluciones seriadas del cultivo que se sembraron en placas de Petri con medio mínimo M8, que contenía TNT como única fuente de carbono y nitrógeno, o TNT y glucosa a las concentraciones utilizadas en el enriquecimiento. Las placas se incubaron a 30°C bajo atmósfera de argón en una jarra de anaerobiosis. Tras 72 horas, no se detectó colonia alguna en los enriquecimientos sembrados en medios sin glucosa, mientras que en las placas que contenían TNT y glucosa se detectó un solo tipo de colonia que se denominó JLR11.



## 2. Caracterización de la cepa JLR11

### 2.1 Identificación taxonómica de la cepa JLR11 como perteneciente al género *Pseudomonas*.

La cepa JLR11 se cultivó en medio rico LB y para su identificación taxonómica se sometió a tinción de Gram, a los ensayos metabólicos disponibles en el paquete comercial API y al análisis de la composición fosfolipídica de su membrana (ver *Materiales y Métodos*). Estos estudios revelaron que la cepa denominada JLR11 era una bacteria gram-negativa anaerobia facultativa, perteneciente al género *Pseudomonas*. Los test realizados no permitieron asignar la cepa a ninguna de las especies del género, por lo que de manera genérica se denominó *Pseudomonas sp.* JLR11

### 2.2 Ensayos de resistencia/sensibilidad a diferentes antibióticos.

Se ensayó la resistencia o sensibilidad de *Pseudomonas sp.* JLR11 a una serie de antibióticos suministrados en disco (ver *Materiales y Métodos*), tanto en medio LB como en medio mínimo M8 con TNT y glucosa, 0,1%(p/v). El patrón de resistencia/sensibilidad se muestra en la Tabla 1. Convendría señalar el distinto comportamiento del microorganismo en los dos medios de ensayo. En la mayoría de casos en que apareció sensibilidad a algún antibiótico no existían halos completos, encontrándose dentro de la zona de inhibición colonias tolerantes al antibiótico, excepto en el caso de la eritromicina en LB en que no aparecieron esas colonias resistentes. Los antibióticos tetraciclina, piperacilina, neomicina y nalidíxico inhibieron el crecimiento en medio LB; sin embargo en medio mínimo M9 con TNT y glucosa, sólo la tetraciclina y el ácido nalidíxico inhibieron el crecimiento de la cepa. Cuando el antibiótico se suministró de forma



homogénea en placas de medio mínimo M9 con TNT, el crecimiento de la bacteria no resultó inhibido a concentraciones de kanamicina (50 µg/ml) y tetraciclina (40 µg/ml).

**Tabla 1. Patrón de resistencia/sensibilidad de la cepa *Pseudomonas* sp. JLR11 a distintos antibióticos**

Antibiótico <sup>a</sup>	Diámetro del halo inhibición <sup>b</sup>	
	LB	M8+TNT
Tetraciclina, 30	11	30
Kanamicina, 30	0	0
Cloramfenicol, 30	0	0
Piperacilina, 100	16	0
Estreptomicina, 10	11	0
Rifampicina, 30	0	0
Eritromicina, 15	0	0
Neomicina, 30	12	0
Ac. Nalidíxico, 30	10	20
Ampicilina, 10	0	0
Valinomicina, ..	0	0

<sup>a</sup> Los antibióticos aparecen seguidos de un número que corresponde a la cantidad de antibiótico por disco en microgramos.

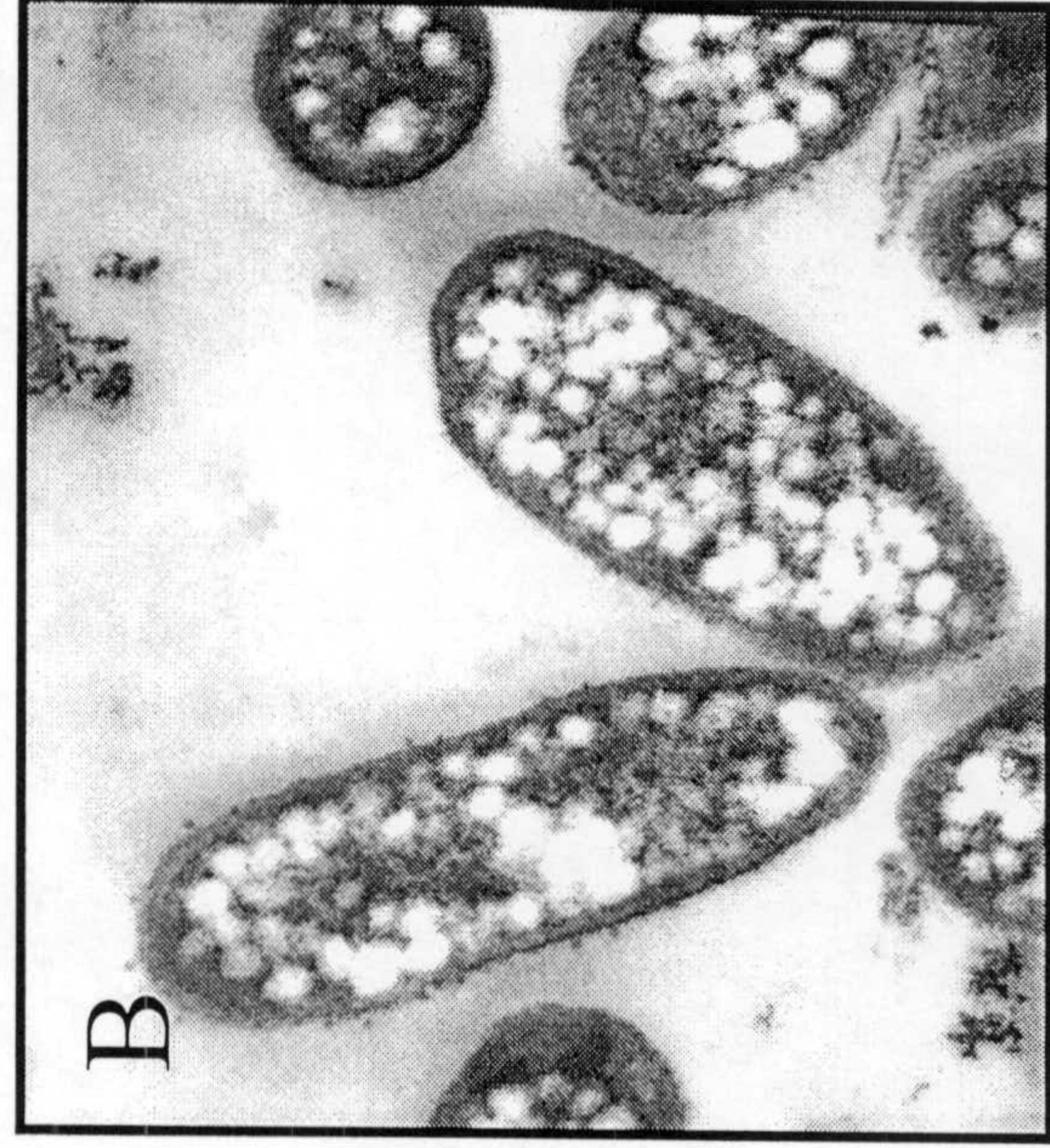
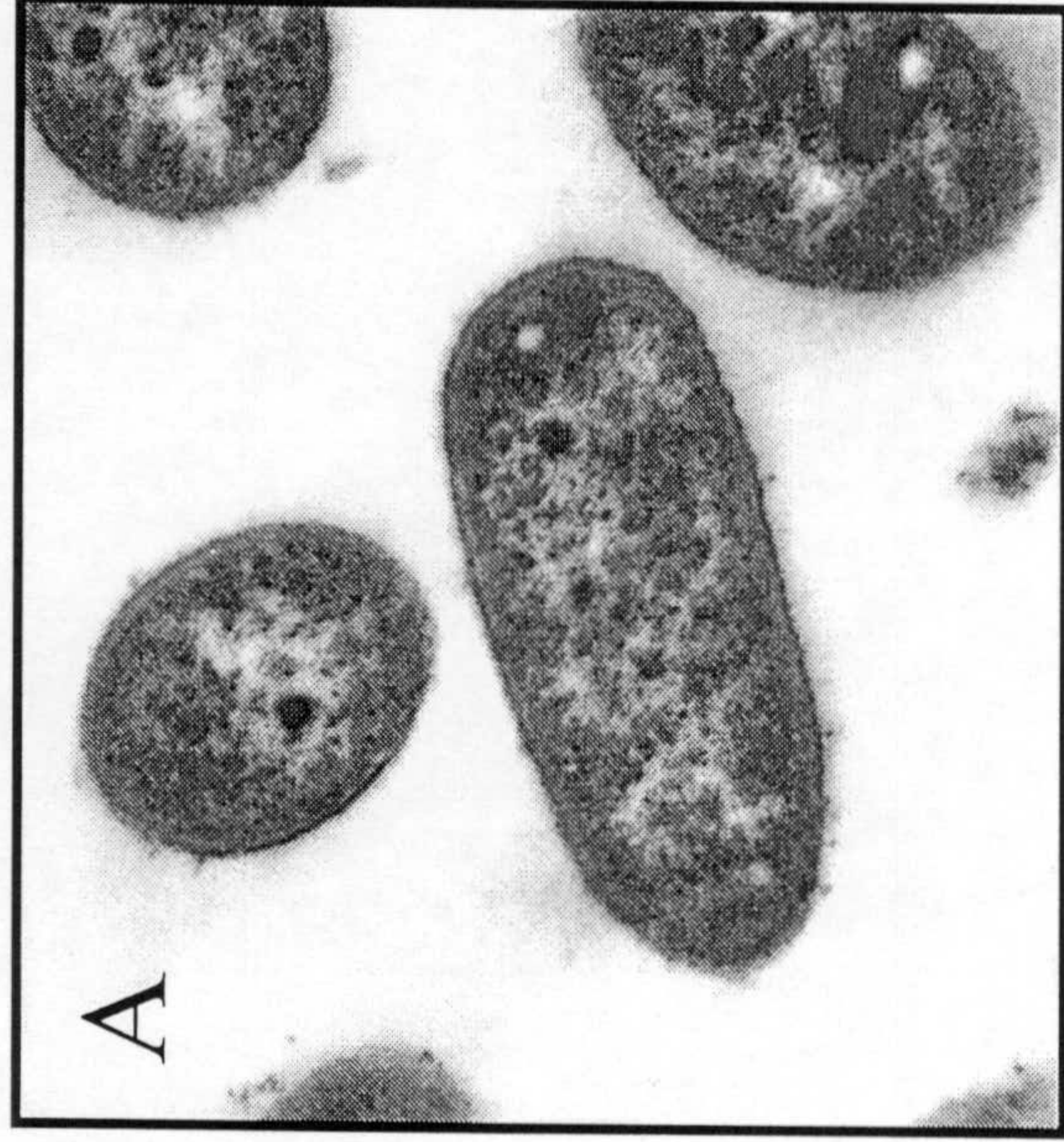
<sup>b</sup> El halo de inhibición se expresa en milímetros. En los casos de sensibilidad a un determinado antibiótico este valor incluye el diámetro del propio disco de antibiótico, mientras que en los casos de resistencia la ausencia de halo se expresa como 0.



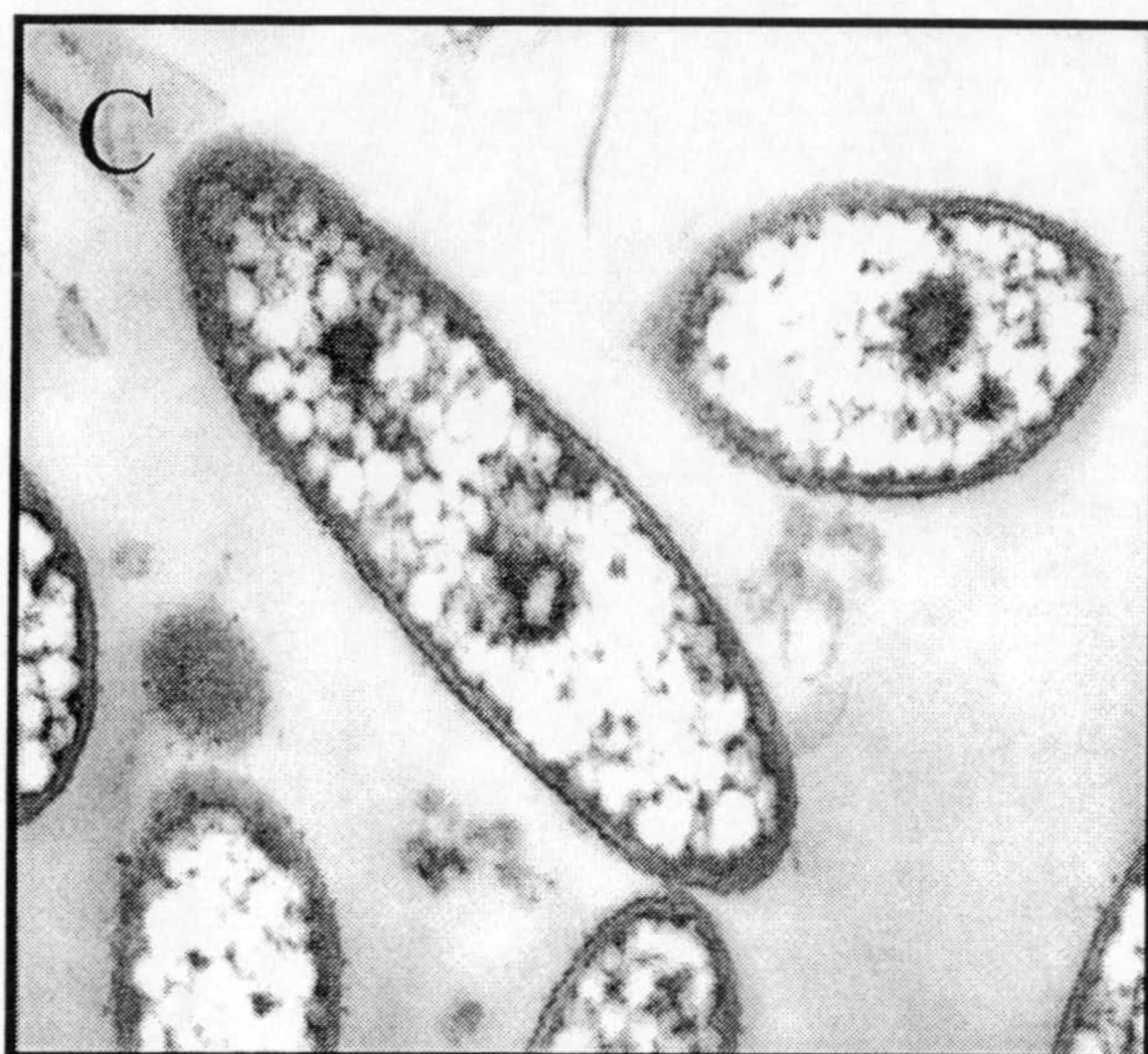
### 2.3 Ultraestructura de *Pseudomonas* sp. JLR11

Mediante microscopía electrónica de transmisión, se analizó la ultraestructura de *Pseudomonas* sp. JLR11 en distintos medios de crecimiento. Las células se cultivaron en medio mínimo M8, en presencia o ausencia de TNT, y se recogieron en la fase exponencial y estacionaria. A continuación, las muestras se prepararon como se indicó en el apartado 3 de la sección *Materiales y Métodos*, y se observaron al microscopio electrónico de transmisión. Independientemente de la fase de crecimiento, la cepa mostró la morfología bacilar característica de las pseudomonadaceas. Las células cultivadas con amonio como fuente de nitrógeno, mostraron un citoplasma homogéneo (figura 19A). Sin embargo, las células cultivadas con TNT como única fuente de nitrógeno (figura 19B) mostraron una acumulación de gránulos con la apariencia típica descrita para los gránulos de material de reserva del tipo de los poli- $\beta$ -hidroxialcanoatos; polímeros que la célula suele acumular en respuesta a una limitación en nitrógeno u otros nutrientes esenciales. La acumulación de estos gránulos se incrementó drásticamente durante la fase estacionaria del cultivo, llegando a ocupar la casi totalidad del citoplasma bacteriano (figura 19C). La naturaleza química de estos polímeros no ha sido determinada.









**Figura 19.** Microscopía electrónica de transmisión de células de *Pseudomonas* sp. JLR11. Las células de *Pseudomonas* sp. JLR11 se cultivaron aerobíamente en medio mínimo líquido con 0,5% (p/v) de glucosa como fuente de carbono y TNT o 20 mM de amonio como fuente de nitrógeno. Las micrografías (30.000x) corresponden a células recogidas en exponencial cultivadas con: amonio (A) o con TNT (B) como fuente de nitrógeno, así como a células recogidas en fase estacionaria cultivadas con TNT como fuente de nitrógeno (C).

#### **2.4 Perfil de sustratos de *Pseudomonas* sp. JLR11**

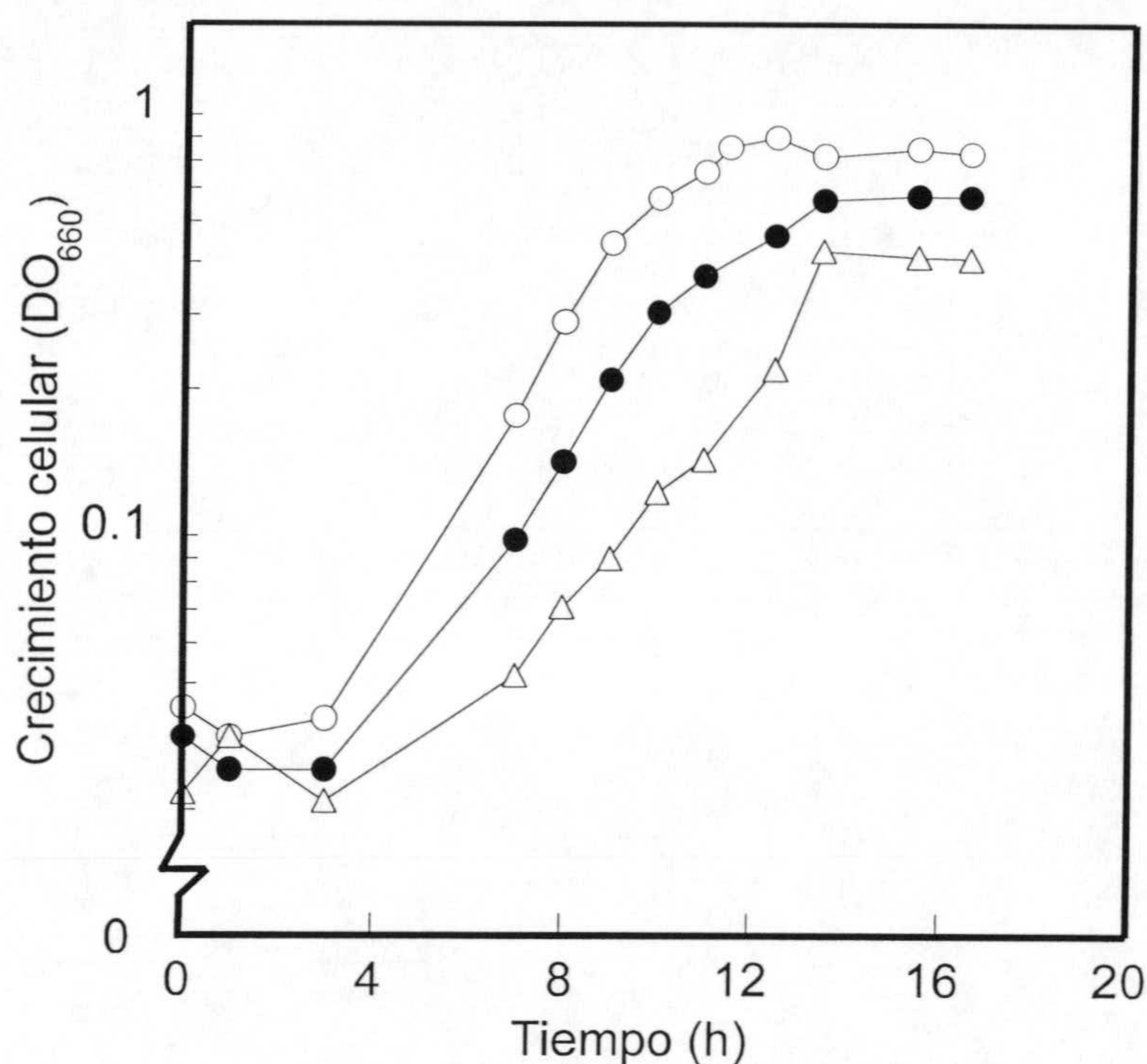
El carácter facultativo de la cepa JLR11 le confiere la propiedad de mantener un metabolismo, tanto aerobio como anaerobio, dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno en las condiciones de cultivo. Con la intención de conocer qué tipo de sustratos podía utilizar la cepa para su crecimiento, se ensayaron distintas fuentes de nitrógeno y carbono.

##### **2.4.1 Crecimiento de *Pseudomonas* sp. JLR11 con distintas fuentes de nitrógeno inorgánico.**

En estos ensayos se utilizó, como fuente de carbono, sacarosa (5 g/l) y se ensayó el crecimiento de la cepa en medio mínimo M8 al que se adicionó 2-20 mM de amonio, 2-20 mM de nitrato o 2 mM de nitrito, como únicas fuentes de nitrógeno (figura 20). En



condiciones aerobias estos compuestos fueron utilizados eficientemente por *Pseudomonas sp.* JLR11. En condiciones anóxicas el nitrato permitió el crecimiento, lo que supone la eficiente reducción de nitrito a amonio.



**Figura 20. Crecimiento de JLR11 en aerobiosis a partir de distintas fuentes de nitrógeno.** La bacteria se cultivó en medios mínimos suplidos con 0,5% de sacarosa (p/v), como fuente de carbono, y 2 mM de las siguientes fuentes de nitrógeno inorgánico: amonio (círculos abiertos), nitrato (círculos cerrados) y nitrito (triángulos abiertos). El crecimiento celular se siguió determinando la turbidez del cultivo.

#### 2.4.2 Crecimiento de *Pseudomonas sp.* JLR11 con distintas compuestos nitroaromáticos como fuente de nitrógeno.

Aunque *Pseudomonas sp.* JLR11 fue aislada por utilizar eficientemente el TNT como fuente de nitrógeno en ausencia de oxígeno, también es capaz de metabolizarlo en condiciones aerobias. Asimismo, otros compuestos nitroaromáticos también permitieron el crecimiento de la cepa. Los ensayos se realizaron en medio mínimo M8 con sacarosa al



0,5%(p/v) como fuente de carbono. La Tabla 2 muestra que las mejores fuentes de nitrógeno fueron el TNT (aerobiosis y anaerobiosis) y 2NT (aerobiosis). También se observó crecimiento, aunque en menor medida, a partir de los dinitrotoluenos 2,4-DNT y 2,6-DNT (aerobiosis y anaerobiosis) y 2NT (anaerobiosis). Los mononitroaromáticos 3NT y 4NT, así como el 2,3-DNT no fueron utilizados como fuente de nitrógeno por esta cepa.

Estos mismos ensayos se realizaron en presencia de 20 mM de nitrato como fuente de nitrógeno adicional observándose, como era de esperar, que los cultivos alcanzaban mayor turbidez.

**Tabla 2. Compuestos nitroaromáticos como fuente de nitrógeno para el crecimiento de *Pseudomonas sp.* JLR11.**

Nitroaromático	Aerobiosis <sup>a</sup>	Anaerobiosis <sup>a</sup>
2-NT <sup>b</sup>	+	+
3-NT <sup>b</sup>	-	-
4-NT <sup>c</sup>	-	-
2,3-DNT <sup>c</sup>	-	-
2,4-DNT <sup>c</sup>	+	+
2,6-DNT <sup>c</sup>	+	+
TNT <sup>c</sup>	++	++

<sup>a</sup> El crecimiento se siguió midiendo la turbidez de los cultivos. El símbolo + representa DO<sub>660</sub> superiores a 0,1; ++ para DO<sub>660</sub> superiores a 0,3 y - para ausencia de crecimiento. La turbidez inicial de los cultivos fue de 0,01 unidades a 660 nm.

<sup>b</sup> Estos nitroaromáticos son de naturaleza líquida y se suministraron en fase gaseosa.

<sup>c</sup> Estos compuestos se suministraron en forma de cristales (25 mg) a los medios de cultivo (30 ml) para obtener una sobresaturación del compuesto en el medio.



### 2.4.3 Crecimiento de *Pseudomonas* sp. JLR11 con distintas fuentes de carbono.

Ninguno de los nitroaromáticos ensayados en el apartado anterior fue capaz de actuar como una única fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento del microorganismo. *Pseudomonas* sp. JLR11 requiere compuestos carbonados adicionales que actúen como cosustrato en el metabolismo del TNT. Compuestos de distinta naturaleza química (aromáticos, azúcares, ácidos mono- y dicarboxílicos y alcoholes) se ensayaron a una concentración de 20 mM de carbono en medio mínimo M8 con TNT como única fuente de carbono en anaerobiosis. Se observó que glucosa, sacarosa, galactosa, citrato, succinato, acetato, glicerol, benzoato y *p*-hidroxibenzoato soportaron el crecimiento de la bacteria; mientras que este microorganismo fue incapaz de crecer a expensas de tolueno, *m*-cresol, *p*-cresol, fumarato, ácido maleico como única fuente de carbono.

### 3. *Pseudomonas* sp. JLR11 tolera elevadas cargas de TNT.

La solubilidad de TNT en medio acuoso no supera 500  $\mu$ M, pero concentraciones mucho menores son suficiente para ejercer toxicidad en los microorganismos eucariotas y procariotas. Para comprobar como afectaba al crecimiento de *Pseudomonas* sp. JLR11 la presencia en el medio de cantidades sobresaturantes del nitroaromático se realizó el siguiente ensayo. El medio se saturó con TNT y se añadieron cantidades crecientes de cristales determinándose la turbidez de los cultivos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21, en la que se observa que el aumento de turbidez fue proporcional a la cantidad de TNT del medio de cultivo. Este comportamiento se puso de manifiesto con independencia de la concentración de oxígeno en el medio. Estos resultados indican que la cepa JLR11 puede tolerar altas concentraciones de TNT en el medio de cultivo.



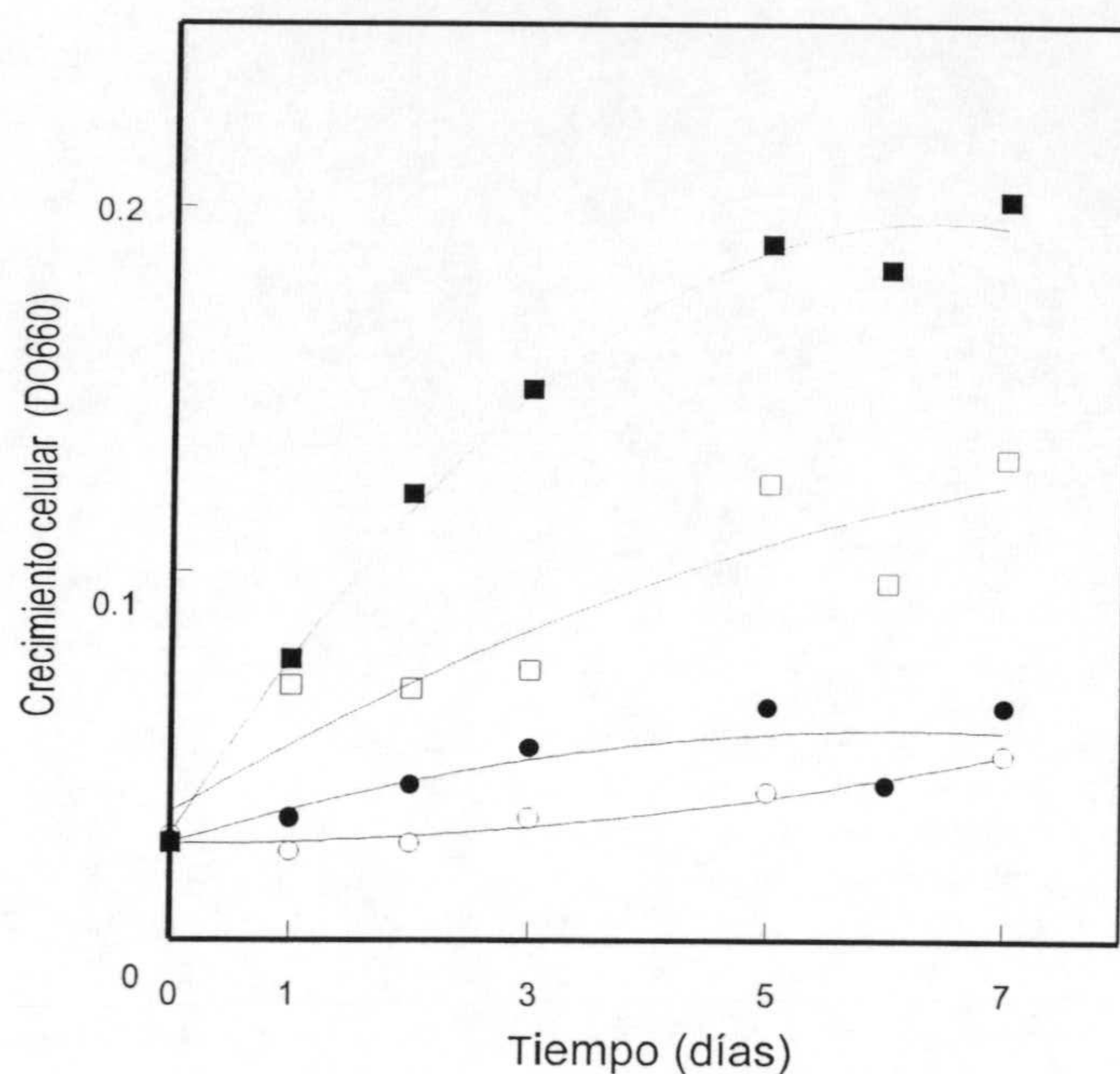


Figura 21 Efecto de la carga de TNT en el crecimiento anaerobio de *Pseudomonas sp. JLR11*. Medio mínimo M8 (30 ml) con glucosa al 0,5%(p/v) se saturó en TNT (círculos abiertos) y se añadieron cantidades crecientes de TNT: 5 mg (círculos cerrados), 25 mg (cuadrados abiertos) y 50 mg (cuadrados cerrados). El crecimiento en condiciones anóxicas se siguió con determinaciones diarias de la turbidez del cultivo.

#### 4. Optimización y caracterización del metabolismo de TNT por *Pseudomonas sp. JLR11*.

En este apartado se profundiza en el proceso biotecnológico por el que *Pseudomonas sp. JLR11* metaboliza el explosivo TNT en condiciones anóxicas. Esta serie de ensayos se llevó a cabo en bioreactores de 2 litros de volumen operando en condiciones estanco. Los ensayos se realizaron en colaboración con la doctora Estrella Duque, y se ensayaron distintos valores de pH (entre 5 y 9), temperatura (entre 20 y 35°C) y agitación (entre 200 y 1000 rpm). El resultado de este estudio permitió determinar los



parámetros de operación del reactor que proporcionaban un crecimiento óptimo de la cepa y una mejor eliminación del compuesto nitroaromático. Estas condiciones fueron : temperatura, 28-30 °C , agitación >200 rpm y pH entre 6,5 y 7.5. Los experimentos descritos a continuación tuvieron en cuenta estos parámetros y se llevaron a cabo a 30 °C de temperatura, pH 7 y 600 rpm de agitación. El sistema se operó tanto en condiciones microaerobias como anóxicas. En el primer caso se permitió que el microorganismo consumiera el oxígeno residual del medio, permaneciendo el sistema cerrado durante todo el proceso. Cuando el reactor operó en condiciones anóxicas se siguió el procedimiento descrito en la sección *Materiales y Métodos*.

#### **4.1 Ensayos de degradación microaerobia de TNT por *Pseudomonas* sp. JLR11.**

La bacteria se cultivó, en un reactor de 2 litros, en medio mínimo M8 con 300  $\mu\text{M}$  de TNT, y 0,5% (p/v) de glucosa como fuente de carbono. El cultivo se inició con  $10^5$  UFC/ml, alcanzando el estado estacionario en  $10^7$  UFC/ml a las 24 horas, con un tiempo de generación de 3,7 h. Por el contrario la turbidez del cultivo no se estacionó hasta las 135 horas alcanzando una  $\text{DO}_{660}$  de 0,3 (Figura 22).

Los niveles de nitrito en el medio de cultivo no sobrepasaron la concentración de 5  $\mu\text{M}$  y los de amonio la de 1-2  $\mu\text{M}$ . El consumo de glucosa fue de aproximadamente el 30% de la cantidad inicial, lo que puso de manifiesto que esta fuente de carbono se encontraba en exceso en el medio de cultivo. El consumo máximo de TNT fue de 0,240 mg TNT(día mg proteína)<sup>-1</sup>. El reactor se mantuvo operando durante 10 días, al término de los cuales se encontró 35  $\mu\text{M}$  de TNT sin transformar.

El análisis por HPLC del sobrenadante del cultivo reveló la presencia de azoxinitrotoluenos (ver Figura 23), lo que indicó que la concentración residual de oxígeno



en el medio de cultivo fue suficiente para permitir la formación de estos compuestos. Así pues, condiciones de anoxia más estrictas fueron necesarias para impedir la formación de estos compuestos altamente recalcitrantes.

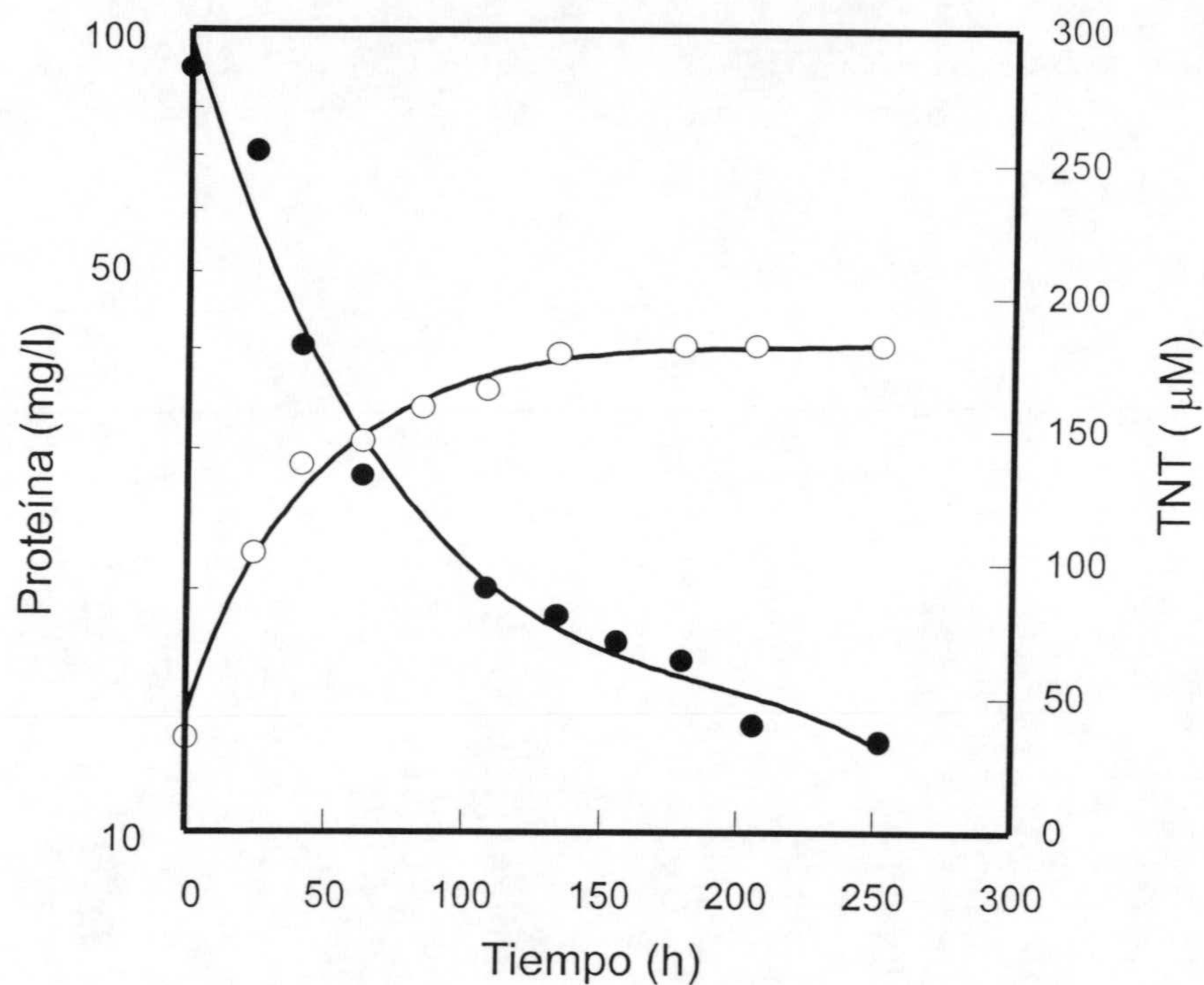


Figura 22 Eliminación de TNT en condiciones microaerobias por *Pseudomonas sp. JLR11*. El ensayo se realizó en un reactor de 2 litros de volumen con 0,5% (p/v) como fuente de carbono y TNT como única fuente de nitrógeno. El crecimiento se siguió determinando la proteína celular (círculos abiertos). La concentración de TNT (círculos cerrados) se estimó analizando por HPLC los sobrenadantes de los cultivos.

### 3.2 Ensayos de degradación anaerobia de TNT por *Pseudomonas sp. JLR11*.

Se siguió el crecimiento de JLR11 en medio mínimo M8 con 0,1% (p/v) de glucosa y 250 μM de TNT como única fuente de nitrógeno en condiciones anóxicas. La



ausencia de azoxinitrotoluenos durante todo el proceso se utilizó como confirmación del carácter anaerobio del sistema, como se muestra en la figura 23.

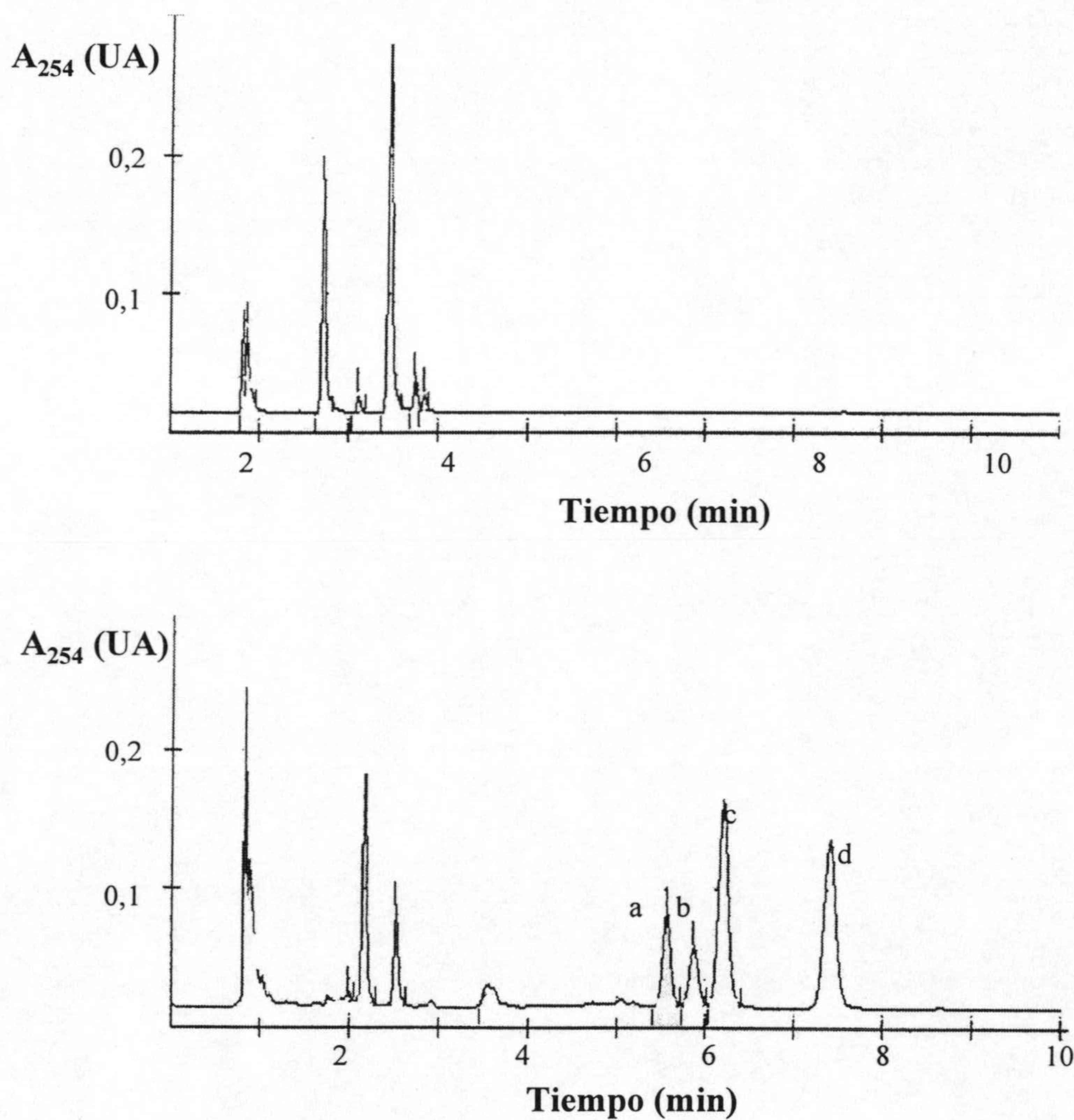


Figura 23. Analisis por HPLC de sobrenadantes de cultivos aerobios y anaerobios de *Pseudomonas sp.* JLR11. Los análisis se realizaron mediante el método I descrito en *Materiales y Métodos*. El cromatograma A corresponde al análisis de los metabolitos generados en el metabolismo anaerobio de TNT. En el cromatograma B se muestra el análisis de los metabolitos



generados en condiciones aerobias. Los productos designados como a,b,c y d corresponden a distintos isómeros de azoxitetranitrotoluenos.

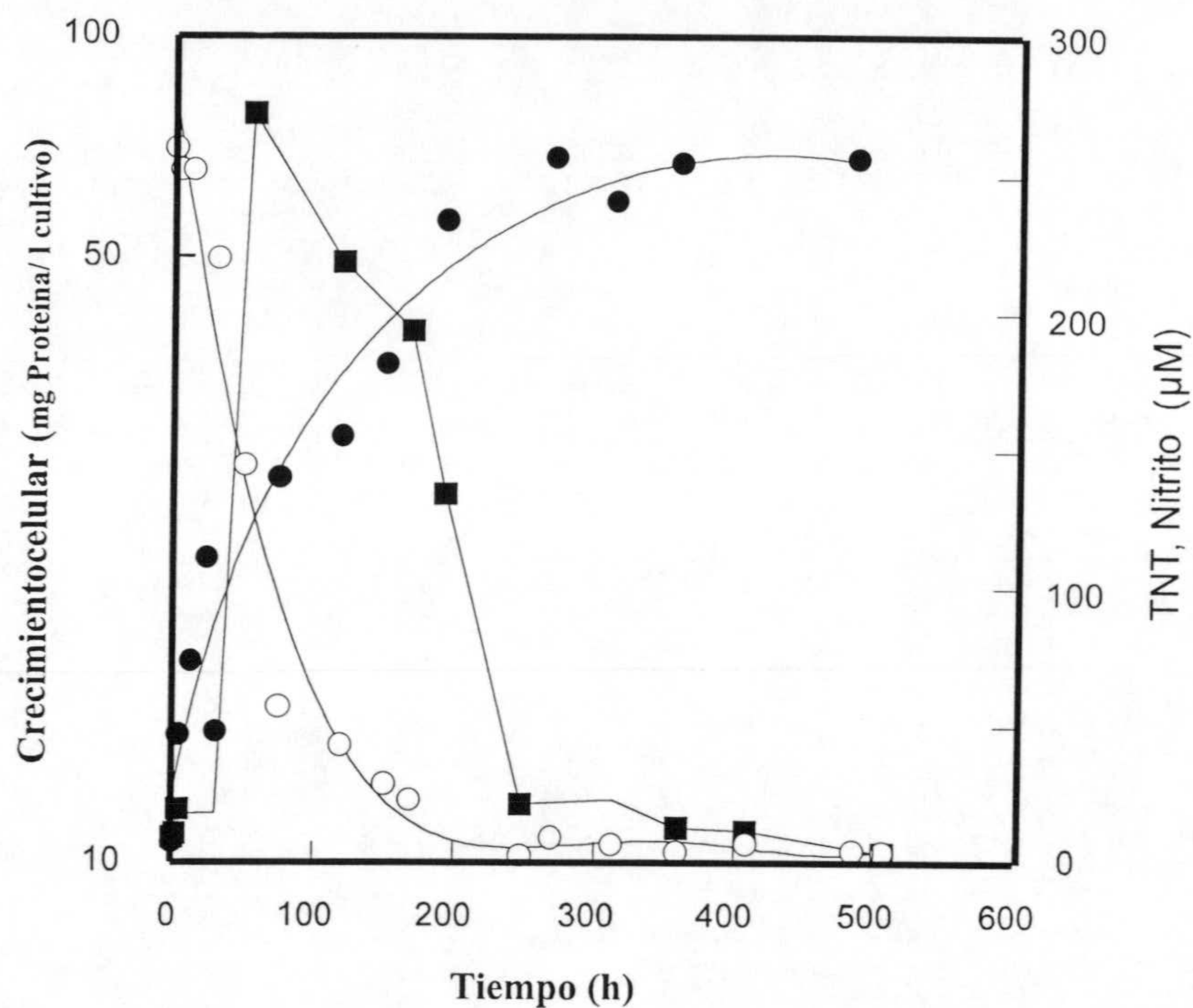
El cultivo se inició con  $10^5$  UFC/ml alcanzando valores cercanos a  $10^8$  UFC/ml a las 120 horas, con un tiempo de generación de 2.3 horas. El crecimiento, en términos de proteína celular, se mantuvo hasta alcanzar el estado estacionario en valores en torno a 70 mg proteína/l cultivo a las 300 horas de cultivo (Figura 24).

El consumo máximo de TNT fue de  $0,6 \mu\text{mol TNT (día mg proteína)}^{-1}$ . La eliminación fue del 90% en los primeros siete días; quedando únicamente un 1% de la concentración inicial al final del ensayo.

El consumo de glucosa fue de  $9 \mu\text{mol glucosa (día mg proteína)}^{-1}$ ; tras 21 días de cultivo el 60% de la glucosa no fue metabolizada. Se ensayaron concentraciones de glucosa inferiores, 0,05%(p/v), observándose que este descenso no afectó significativamente al consumo de TNT que pasó a ser de  $0,5 \mu\text{mol TNT (día mg proteína)}^{-1}$ .



La concentración de nitrito se mantuvo en torno a 10  $\mu\text{M}$  en las primeras horas del cultivo; a partir de las 50 horas se produjo un progresivo aumento, alcanzando los 200  $\mu\text{M}$ , para luego descender hasta valores inferiores a 10  $\mu\text{M}$  después de 200 horas de cultivo. (Figura 24).



**Figura 24.** Eliminación de TNT en condiciones anóxicas por *Pseudomonas sp.* JLR11. El ensayo se llevó a cabo en un reactor de 2 litros operando en condiciones anóxicas con TNT como única fuente de nitrógeno y 0,1% (p/v) de glucosa como fuente de carbono. Se determinaron los cambios en la concentración de TNT (círculos abiertos) y nitrito (cuadrados cerrados) en el sobrenadante del caldo de cultivo. El crecimiento de la cepa se representa como incremento en la proteína celular (círculos cerrados).

#### 4.3 Balance de nitrógeno en el metabolismo de TNT por *Pseudomonas sp.* JLR11.

*Pseudomonas sp.* JLR11 utiliza eficientemente el TNT como fuente de nitrógeno en condiciones anóxicas. Para conocer que porcentaje del nitrógeno del explosivo era

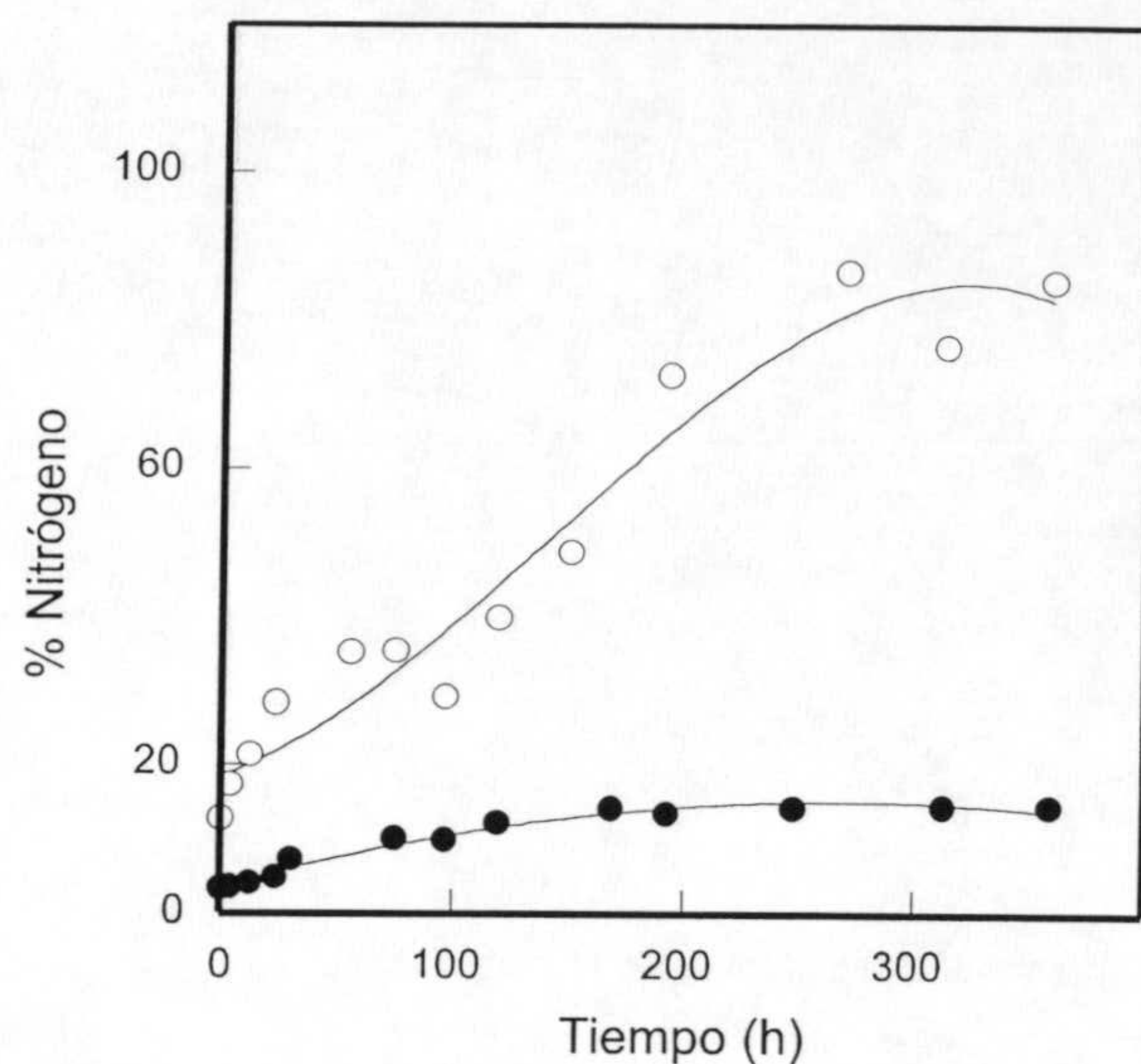


asimilado como nitrógeno orgánico, se efectuó un balance analizando la proteína celular producida a partir de 250  $\mu$ M de TNT. Considerando que en el ensayo descrito tuvo lugar un incremento neto de proteína celular de 70 mg/l cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria y teniendo en cuenta que el contenido de nitrógeno en las proteínas es del orden del 15%, ello implica una incorporación de 10,5 mg nitrógeno/l el cual procedía del TNT. Dado que el contenido inicial en forma de TNT era de 12,4 mg/l, ello significa que aproximadamente el 85% del nitrógeno del TNT se incorporó a proteína celular tras el tratamiento biológico.

Similar porcentaje de incorporación se encontró cuando se determinó el contenido de nitrógeno en biomasa de *Pseudomonas sp.* JLR11 generada tras utilizar TNT como fuente de nitrógeno. La determinación del contenido de nitrógeno en biomasa se determinó a partir de 150 mg de peso seco/l cultivo, como se describe en la sección *Materiales y Métodos*. Los resultados mostraron un 7,15% de contenido en nitrógeno lo que supone 10,7 mg nitrógeno/l cultivo.

Tras el tratamiento en el reactor, un 15% del nitrógeno inicial no se incorpora a biomasa, encontrándose formando parte de productos de reducción de TNT, principalmente aminas aromáticas que se acumularon en el medio de cultivo como se muestra en la Figura 25.





**Figura 25** Distribución porcentual del nitrógeno del TNT que es transformado por *Pseudomonas sp. JLR11*. La bacteria se cultivó en un reactor de 2 litros bajo condiciones anóxicas con 0,1% (p/v) de glucosa y TNT, 250  $\mu$ M. El nitrógeno en forma de TNT con que se inicia el cultivo se consideró el 100% del nitrógeno total. Su conversión en proteína celular (círculos abiertos) o en aminas aromáticas (círculos cerrados) se representa como porcentaje del nitrógeno total.

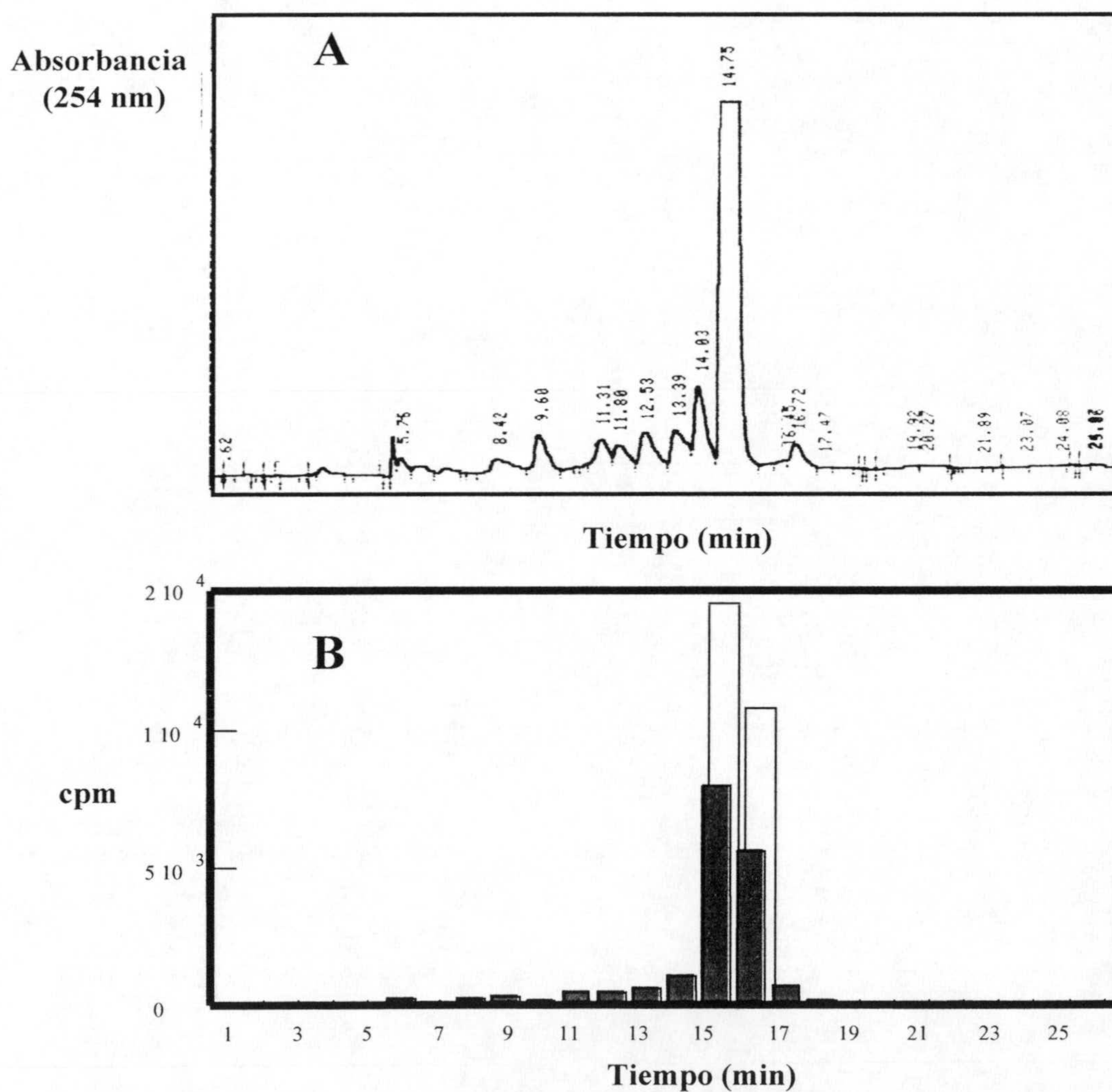
### 3.4 Ensayos sobre el metabolismo anaerobio de $^{14}\text{C}$ -TNT.

Con el objeto de elucidar si en el metabolismo anaerobio de TNT se produce la ruptura del anillo aromático, se diseñaron una serie de experimentos basados en el uso de  $^{14}\text{C}$ -TNT que permitiera detectar la mineralización del carbono del anillo o su incorporación a material celular.

Los ensayos de mineralización de  $^{14}\text{C}$ -TNT se realizaron en anaerobiosis como se describe en *Materiales y Métodos*. En cultivos anóxicos de *Pseudomonas sp. JLR11* en medio mínimo con 0,1 % de glucosa y  $^{14}\text{C}$ -TNT como única fuente de nitrógeno, tan solo se detectó un 1 % de la radioactividad inicial en forma de  $^{14}\text{CO}_2$ , en la solución de NaOH destinada a retener el  $\text{CO}_2$  producido. El 15% del TNT transformado se detectó en el



sobrenadante de los cultivos en forma de aminas aromáticas y otros metabolitos, como se muestra en la figura 26 El 46 % de la radioactividad inicial se encontró asociado al material celular precipitable por ácido tricloroacético al 10%. Un 38 % de la radioactividad inicial no se detectó al final del proceso pudiendo atribuirse a la formación de compuestos orgánicos volátiles que no quedarían retenidos en la trampa para CO<sub>2</sub>.





**Figura 26.** Los metabolitos aromáticos originados por el metabolismo de *Pseudomonas sp. JLR11* sobre TNT. El sobrenadante de un cultivo anóxico de *Pseudomonas sp. JLR11*, en medio mínimo con 0,1% de glucosa y  $^{14}\text{C}$ -TNT como única fuente de nitrógeno, se analizó mediante HPLC preparativo utilizando el método II descrito en *Materiales y Métodos*. Se recogieron los volúmenes eluidos cada minuto durante todo el proceso cromatográfico y su contenido en  $^{14}\text{C}$  se determinó en un contador de centelleo como se describe en *Materiales y Métodos* (Panel B).



## Capítulo II

Elucidación de la ruta catabólica anaerobia del  
2,4,6-trinitrotolueno (TNT) por *Pseudomonas* sp. JLR11



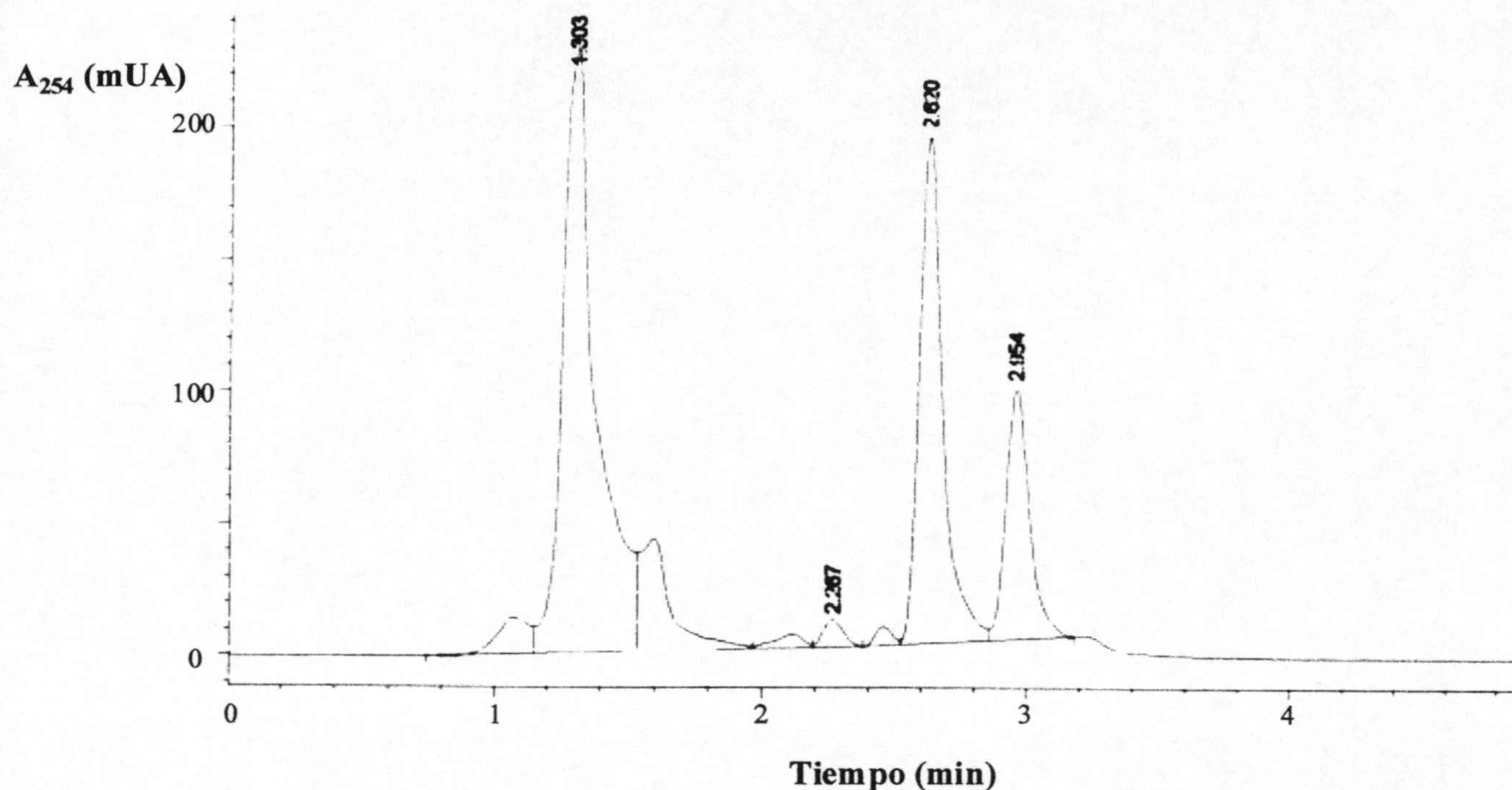
## ELUCIDACIÓN DEL MECANISMO DE DEGRADACIÓN ANAEROBIA DE TNT POR *Pseudomonas sp.* JLR11.

El estudio de la ruta catabólica de TNT se abordó desde varios enfoques: el análisis de los metabolitos acumulados en los sobrenadantes de los cultivos mediante técnicas cromatográficas y espectrales; la determinación *in vitro* de actividades enzimáticas, y el aislamiento de mutantes, generados por inserciones con un mini-transposón, incapaces de asimilar TNT.

### 1. Análisis de los metabolitos acumulados en el sobrenadante de cultivos anaerobios.

*Pseudomonas sp.* JLR11 se cultivó en reactores de 2 litros con TNT como única fuente de nitrógeno en condiciones anóxicas. Los cultivos se recogieron al finalizar el proceso de eliminación de TNT y los sobrenadantes libres de células constituyeron la fuente de los metabolitos. El análisis por HPLC de un sobrenadante de cultivo presentó el aspecto que muestra la Figura 27. Es de destacar la presencia de tres picos mayoritarios con tiempos de retención 1,3; 2,6 y 2,95 minutos. El pico de 2,95 correspondió al TNT; el pico de 2,60 representó hasta el 10-15% del TNT inicial y correspondió a aminodinitrotoluenos (ADNTs).. A un tiempo de retención de 1,3 minutos se acumularon una serie de compuestos de mayor polaridad que las aminas y que coeluyeron en este método de separación (método I).





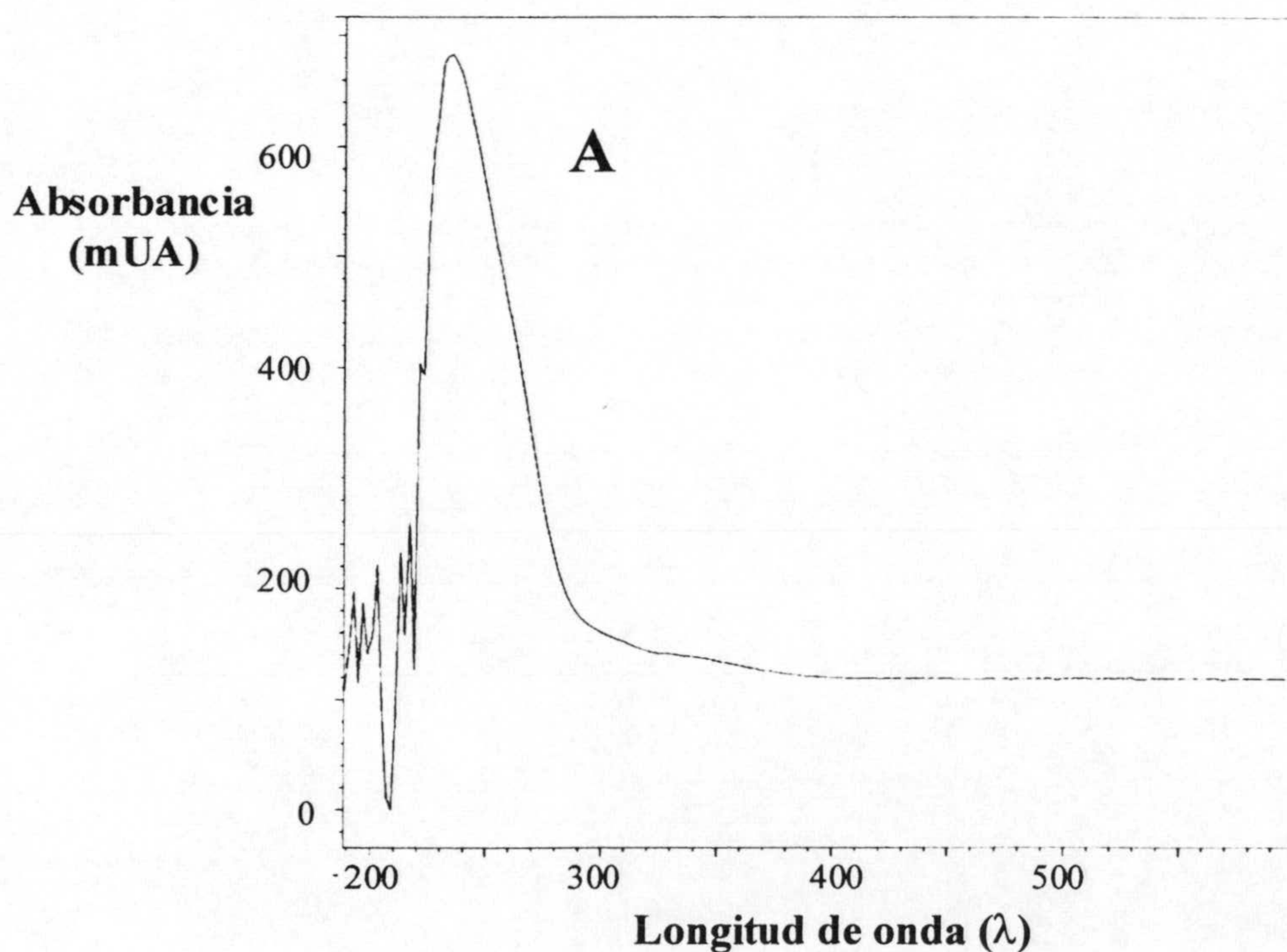
**Figura 27. Cromatograma de HPLC del sobrenadante de un medio de cultivo de *Pseudomonas* sp. JLR11.** El análisis se realizó como se describió en *Materiales y Métodos* utilizando el Método I. El cromatograma corresponde a una muestra sobrenadante de un cultivo anóxico de *Pseudomonas* sp. JLR11 con TNT como única fuente de nitrógeno. Los picos detectados a los distintos tiempos de retención corresponden a: TNT (2,9 min); ADNTs (2,6 min); 3,5-dinitroanilina (2,2 min) y coelución de compuestos polares (1,3 min).

**1.2 Análisis de los metabolitos extraídos de sobrenadantes mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a un detector Diodo Array (DAD).** Mediante extracción en fase sólida (SPE, ver sección *Materiales y Métodos*), se extrajeron los metabolitos del medio acuoso para obtener suficiente material; el cual se analizó mediante distintas técnicas cromatográficas y espectroscópicas, que permitieron su determinación estructural

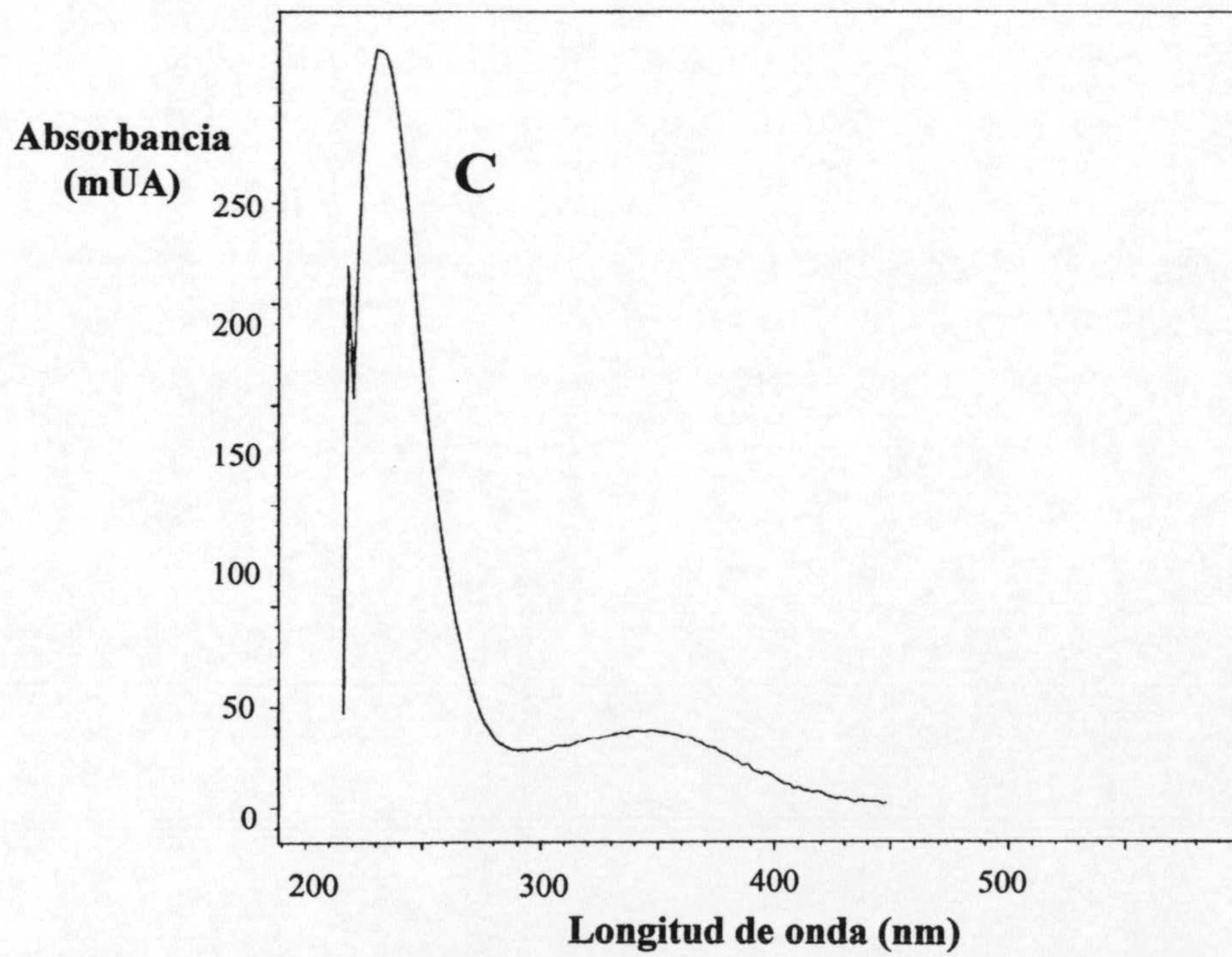
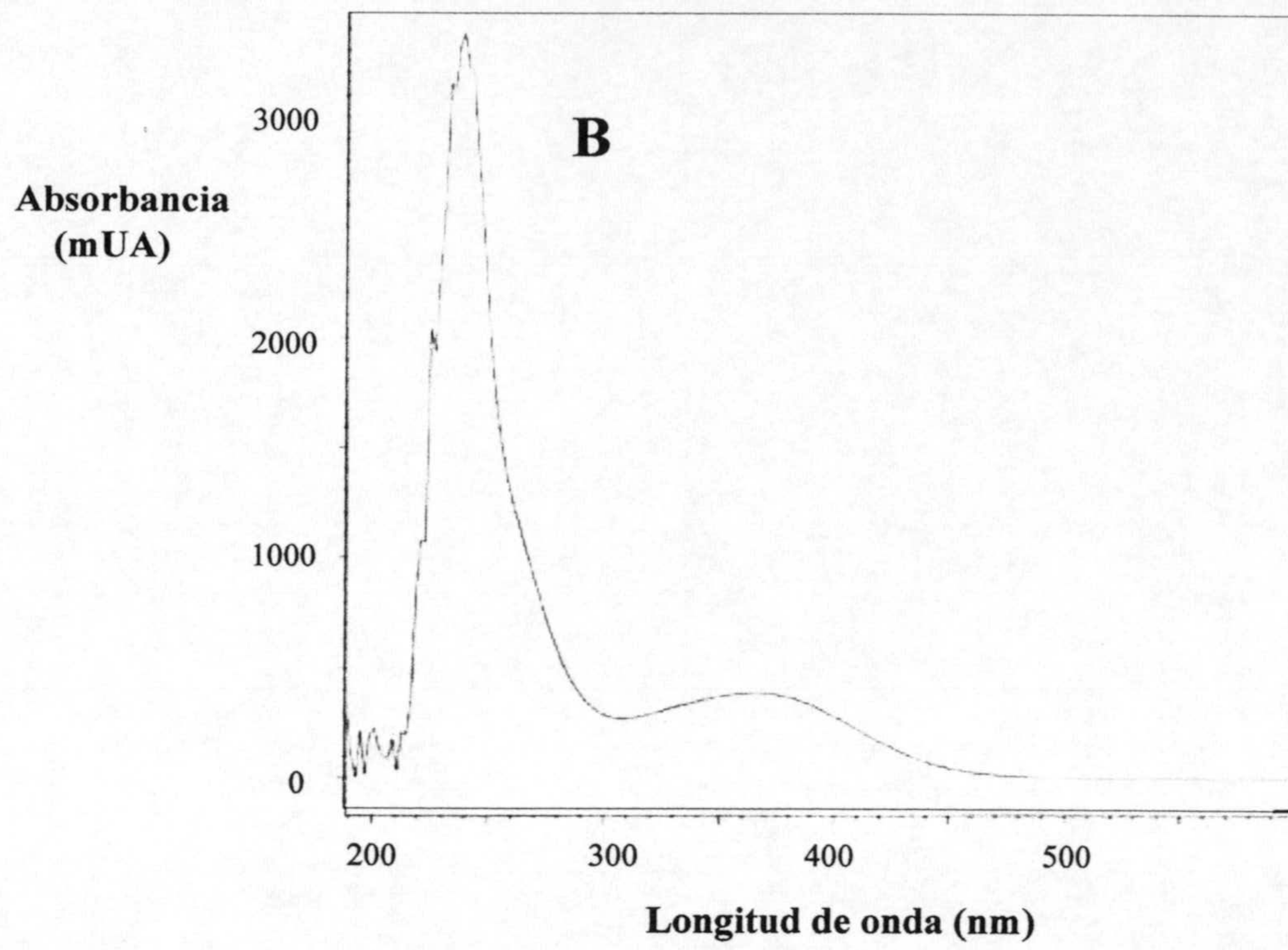


La distinta naturaleza polar de los metabolitos, acumulados en los sobrenadantes de los cultivos con TNT, hizo que fuera necesario más de un método cromatográfico para lograr una separación eficiente; estos métodos se describieron en la sección *Materiales y Métodos*. El método II separó TNT, aminas aromáticas derivadas del explosivo y compuestos con grupos funcionales de mayor polaridad, no separándose los mono- ni los dinitrotoluenos que coeluyeron con el pico del TNT. El método III resolvió bien estos últimos compuestos nitro- y aminoaromáticos, aunque los compuestos más polares coeluyeron en en el primer minuto del cromatograma.

Mediante un detector de diodos (DAD), acoplado al HPLC, se obtuvo el espectro UV de los distintos picos de los cromatogramas (Figura 28), permitiendo así la identificación de productos mediante la comparación de sus tiempos de retención y sus espectros UV con los de patrones comerciales o sintetizados especialmente para estos análisis, como se describió en *Materiales y Métodos*.









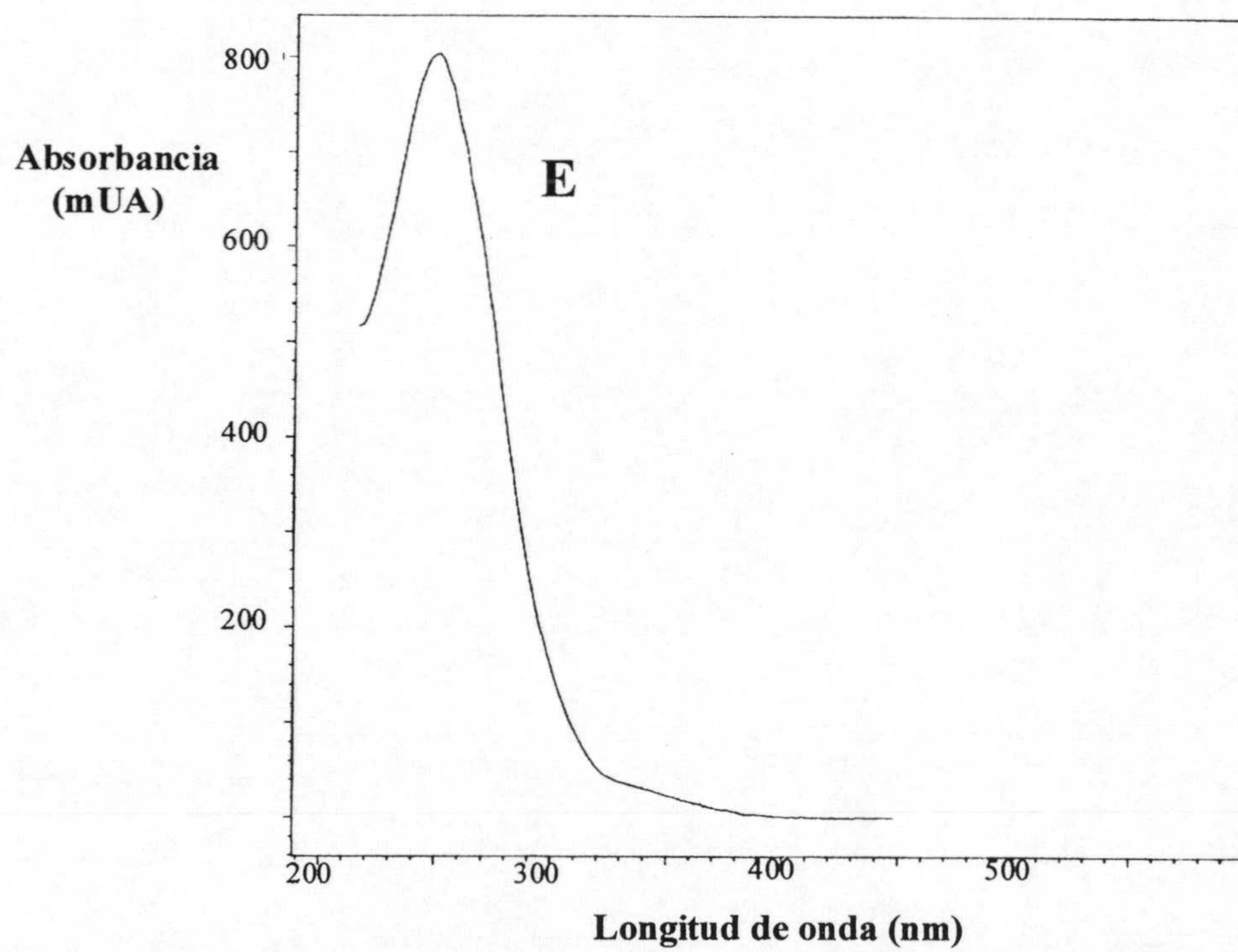
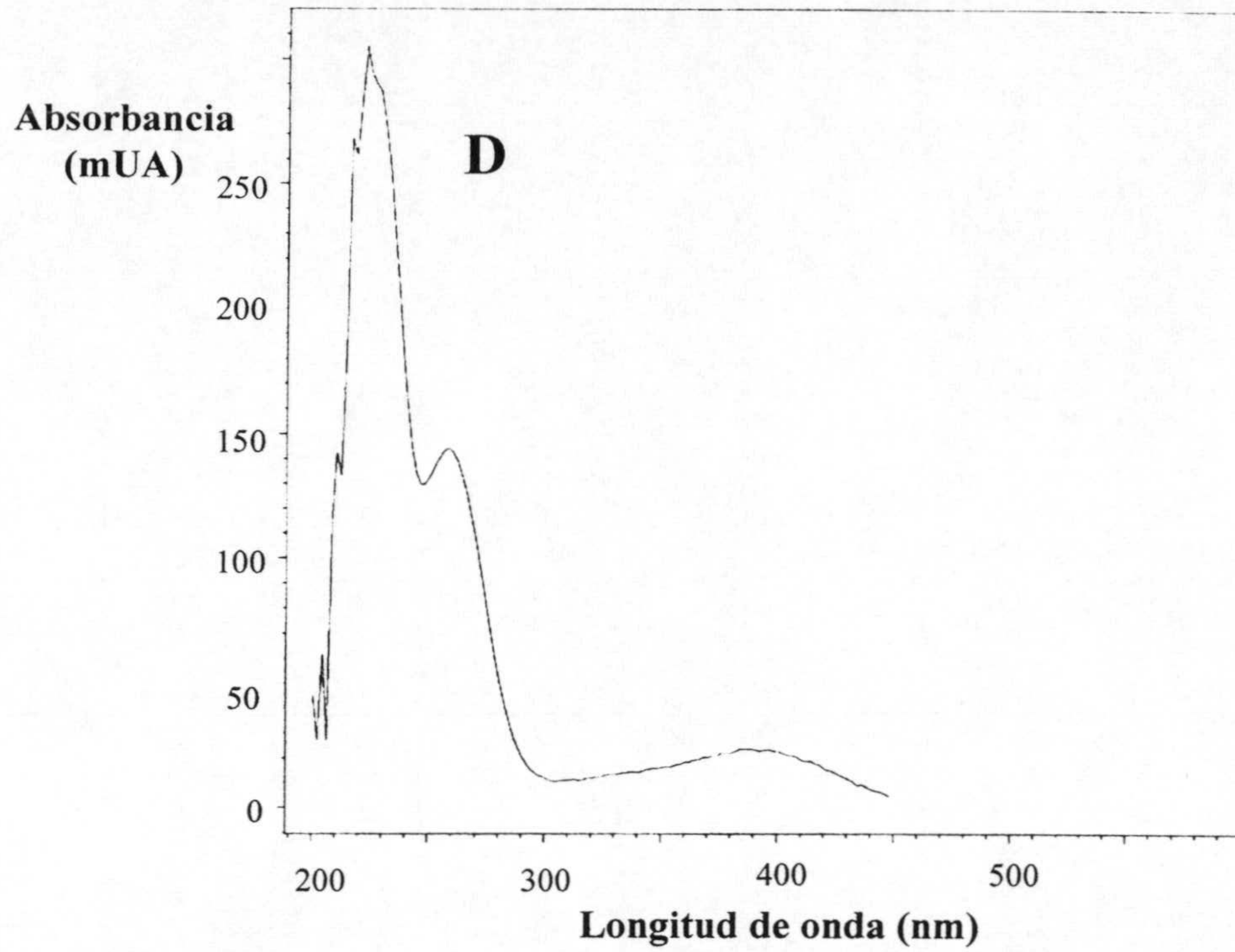
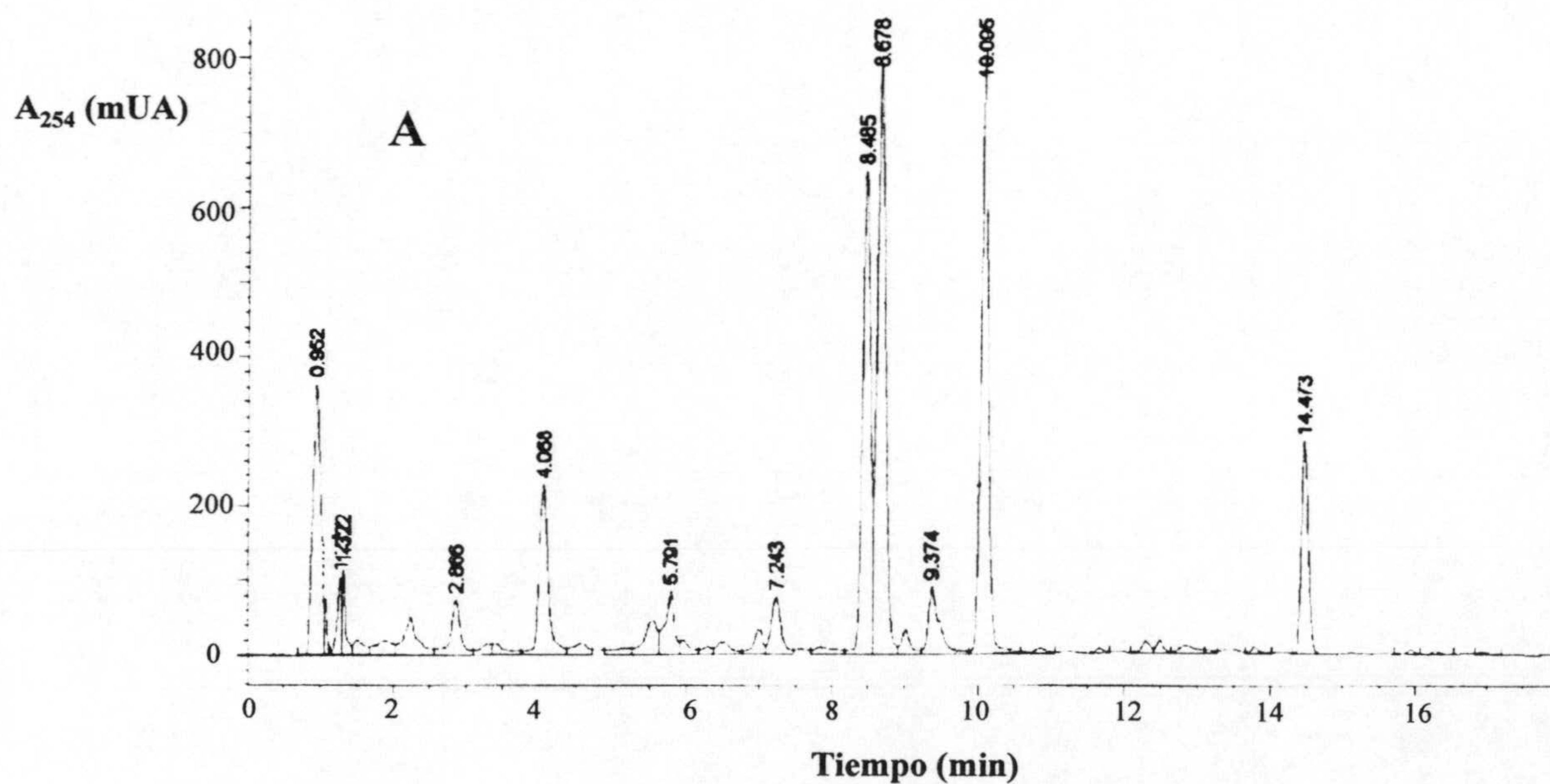


Figura 28. Espectros de absorción de los patrones analizados por HPLC. Los espectros mostrados corresponden al máximo de absorción de cada pico del cromatograma. Se barrió una zona de longitudes

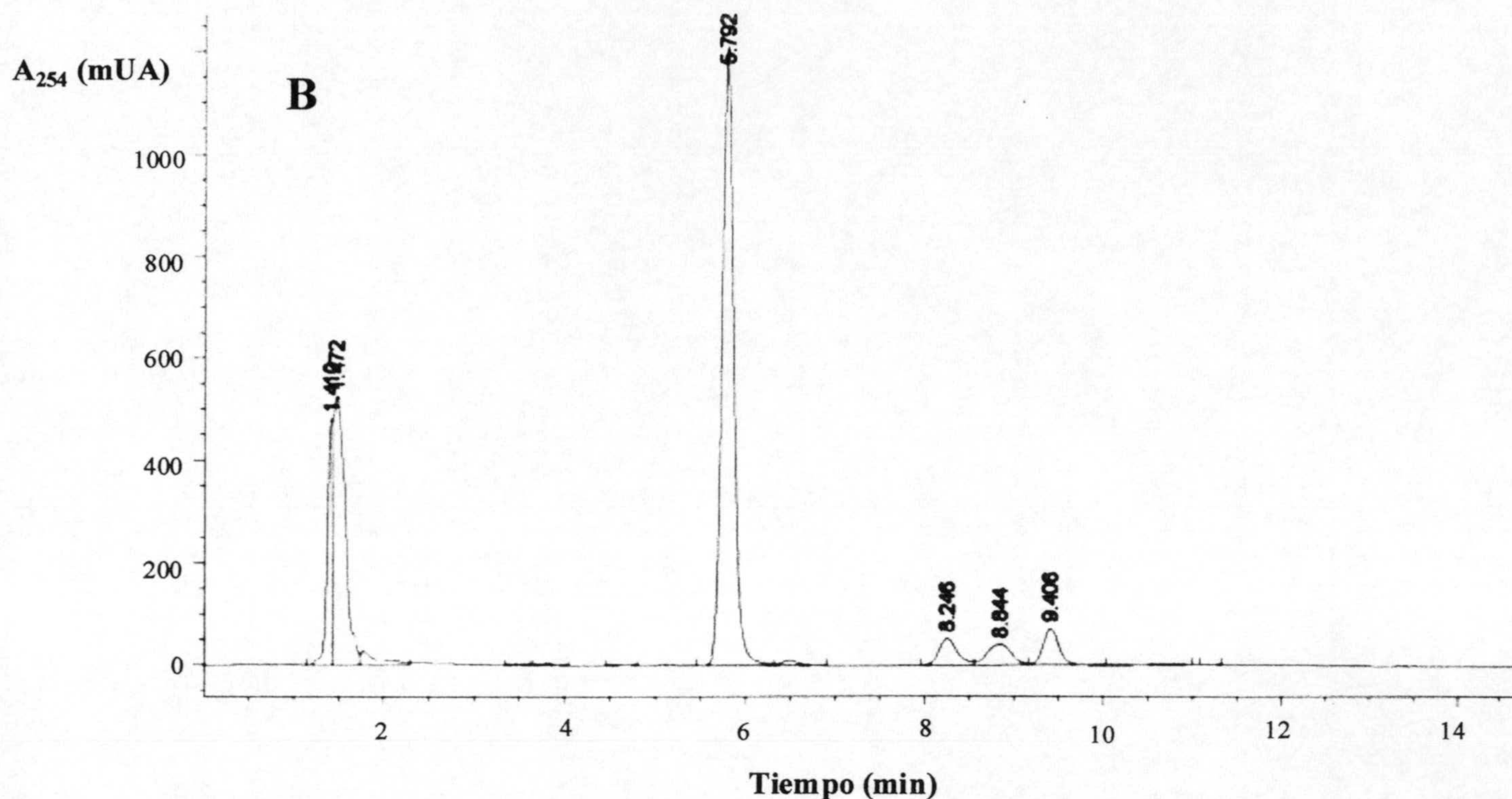


de onda entre 200 y 600 nm. En la figura se muestran los espectros correspondientes a aquellos compuestos que fueron detectados en el análisis de los sobrenadantes: TNT (A); 4-aminodinitrotolueno (B); 4-hidroxilaminadinitrotolueno (C); 3,5-dinitroanilina (D); 2,4-dinitrotolueno (E).

Los metabolitos extraídos y disueltos en MeOH se analizaron por HPLC-DAD, utilizando los métodos descritos anteriormente. Los cromatogramas obtenidos (Figura 29) mostraron una serie de picos cuyos tiempos de retención y espectros UV, comparados con los de patrones disponibles o recogidos en la bibliografía (Bouvier y Oehrle, 1995), revelaron la presencia de los siguientes compuestos: 2,4,6-trinitrotolueno, 2-amino-4,6-dinitrotolueno; 4-amino-2,6-dinitrotolueno; 4-hidroxilamina-2,6-dinitrotolueno; 3,5-dinitroanilina; 2,4-dinitrotolueno; 2,6-dinitrotolueno; 2,4-dinitrotolueno; 2,6-dinitrotolueno.







**Figura 29** Cromatogramas de HPLC correspondientes a extracciones de sobrenadantes de cultivos de *Pseudomonas sp. JLR11* en medios con TNT. Los análisis de HPLC se realizaron como se describió en *Materiales y Métodos* utilizando los métodos II (cromatograma A) y el método III (cromatograma B). La misma muestra fue analizada por ambos métodos y correspondió al sobrenadante de un cultivo anóxico de *Pseudomonas sp. JLR11* con TNT como fuente de nitrógeno. Los picos detectados a los distintos tiempos de retención corresponden a: Cromatograma A: TNT (10,0 min); 4-NHOH-2,6-ADNT (8,5 min); 4-ADNT (8,6 min); 3,5-dinitroanilina (7,2 min); 2-ADNT (9,4 min). Cromatograma B: TNT (5,7 min); 2,4-DNT; (8,2 min); 2,6-DNT (8,8 min); 4-ADNT (9,4 min); coelución de compuestos polares (1,4 min).



### 1.3 Análisis de los metabolitos extraídos de sobrenadantes de cultivos mediante Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (EIMS).

Los sobrenadantes de cultivos, sometidos a extracción en fase sólida, se analizaron por cromatografía de gases y los productos separados se fragmentaron por ionización química para analizar su patrón de fragmentación en un espectrómetro de masas, como se describió en *Materiales y Métodos*. El análisis de los distintos picos de los cromatogramas permitió la identificación de, al menos, nueve productos por comparación con espectros de patrones disponibles o recogidos en publicaciones y bases de datos especializadas como la nbs75k (Hewlett Packard). De otros cuatro productos se pudo deducir su posible estructura a partir del perfil de fragmentación de sus espectros.

**Producto 1:** El fragmento de mayor tamaño es 210, originado tras la pérdida por parte del ión molecular de un OH ( $M^+ - 17$ ), en lo que es una escisión típica debida a la presencia de un grupo nitro en *orto* a un metilo aromático. Esta fragmentación se denomina *efecto orto* y aparece con frecuencia en este tipo de compuestos. El tiempo de retención de este compuesto coincidió con el de 2,4,6-trinitrotolueno, y su espectro de masas presentó una similitud del 98% con el estándar.

**Productos 2 y 3:** Son isómeros que presentan un ión molecular de 197 propio de aminodinitrotoluenos. El espectro de masas del producto 2 presentó las mismas fragmentaciones mostradas por Duque (1995) para el 2-amino-4,6-dinitrotolueno; el espectro del producto 3 mostró una similitud del 98% con el 4-amino-2,6-dinitrotolueno de síntesis (ver *Materiales y Métodos*). El patrón de ruptura de estos compuestos, tan sólo se diferencia en el fragmento de 163 que corresponde a un *efecto orto* que tiene lugar en la molécula de 2-amino-4,6-dinitrotolueno y que desaparece al producirse un doble *efecto orto* en la molécula de 4-amino-2,6-dinitrotolueno.



**Productos 4 y 5:** Son isómeros de ión molecular 167 correspondiente a diaminonitrotoluenos. El producto 4 presenta un espectro de masas con una similitud del 97% con el del 2,4-diamino-6-nitrotolueno sintetizado (ver *Materiales y Métodos*); el producto 5 mostró un espectro con una similitud del 96% con el estándar comercial. Los espectros de estos compuestos son diferenciables entre sí por el efecto *orto* que tiene lugar en el 2,4-DANT (producto 4) y que desaparece en el 2,6-DANT (producto 5), al reducirse los grupos nitro en las posiciones *orto* al metilo. La presencia de estos productos en las extracciones fue mucho menor que la del resto de metabolitos, y se encontraron en concentraciones traza.

**Productos 6 y 7:** El producto 6 presentó un ión molecular de 183; su patrón de ruptura mostró una similitud del 99% con el del estándar comercial de la 3,5-dinitroanilina, y sus tiempos de retención coincidieron. El espectro del producto 7 mostró un ión molecular de 213 y su espectro de masas presentó una similitud del 95% con el del 1,3,5-trinitrobenzeno sintetizado (ver *Materiales y Métodos*). Convendría resaltar que la pérdida del grupo metilo por parte del sustrato original, TNT, podría dar lugar a estos productos. En la sección *Discusión* se analizará en detalle este mecanismo.

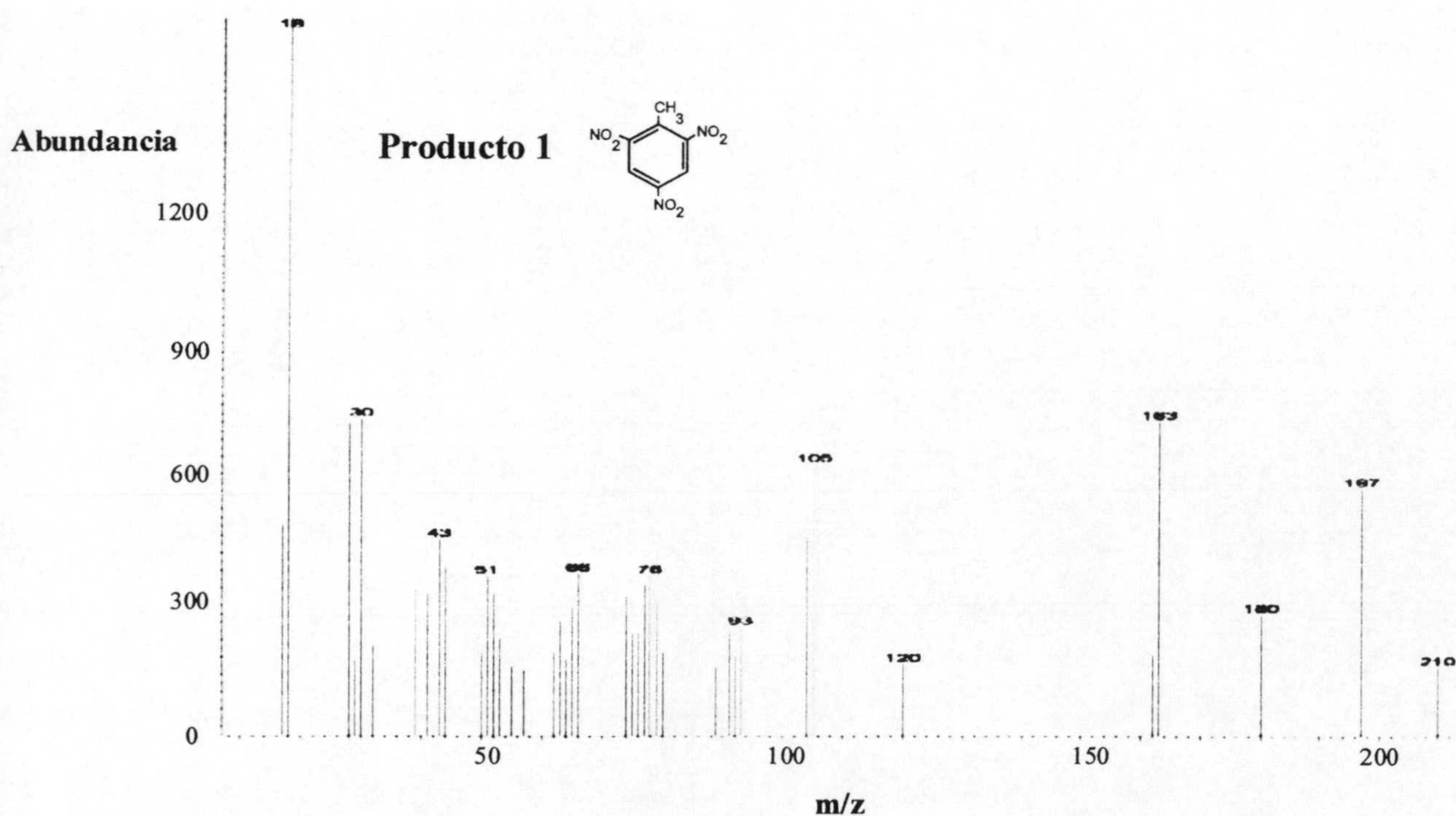
**Productos 8 y 9:** Ambos correspondieron a aromáticos hidroxilados. El producto 8 mostró un ion molecular de 122 y su espectro de masas presentó una similitud del 95% con el espectro del 4-hidroxibenzaldehído. El espectro del producto 9 mostró una similitud del 97% con el del ácido benzoico de la base de datos de Hewlett-Packard.

**Producto 10 y 11:** Presentaron iones moleculares de 241 y 211 respectivamente. A partir de sus patrones de fragmentación, deducimos que podían corresponder al 2,4,6-trinitrobenzaldehído (producto 10) y al 4-amino-2,6-dinitrobenzaldehído (producto 11). No dispusimos de estándares comerciales de estos últimos productos.

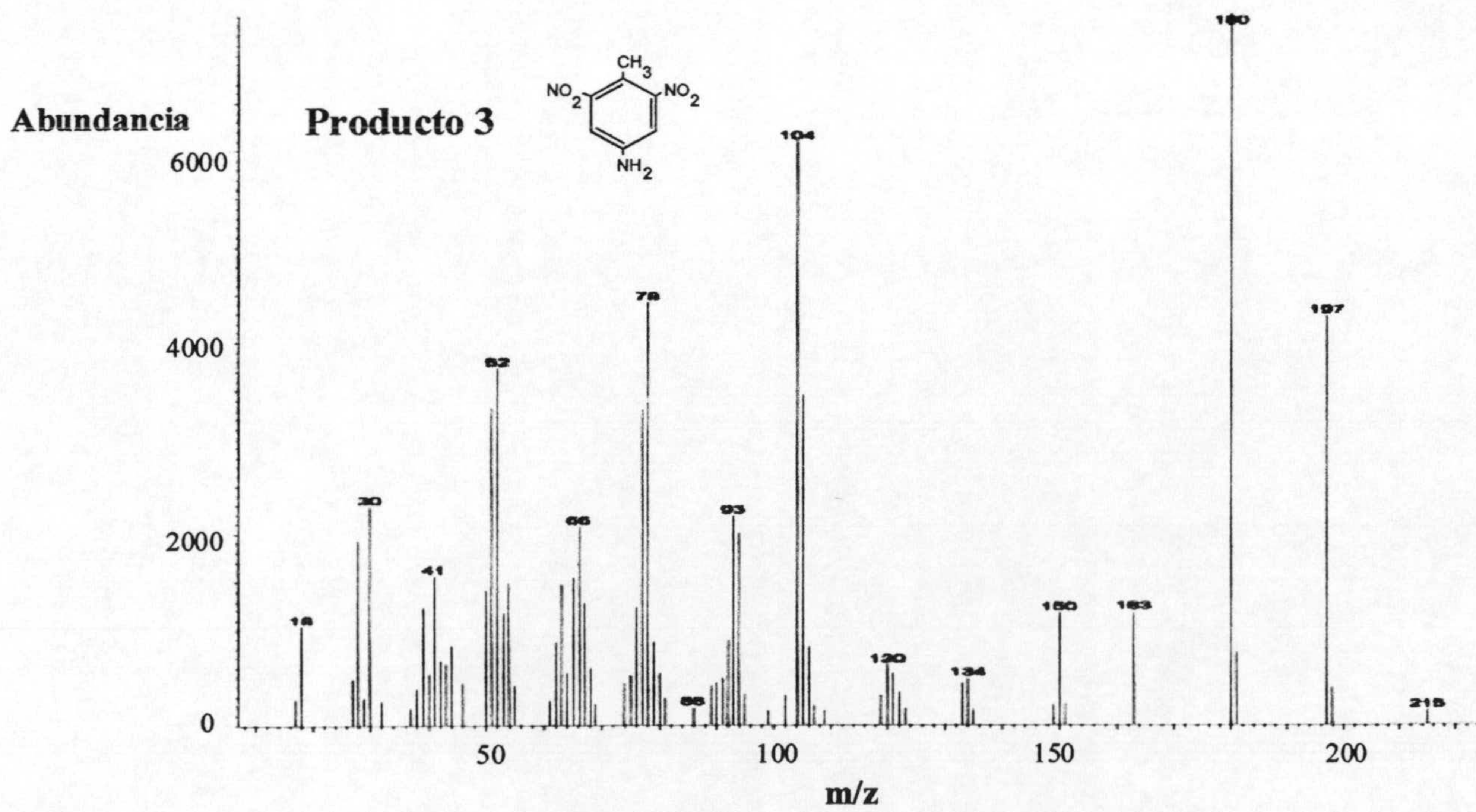
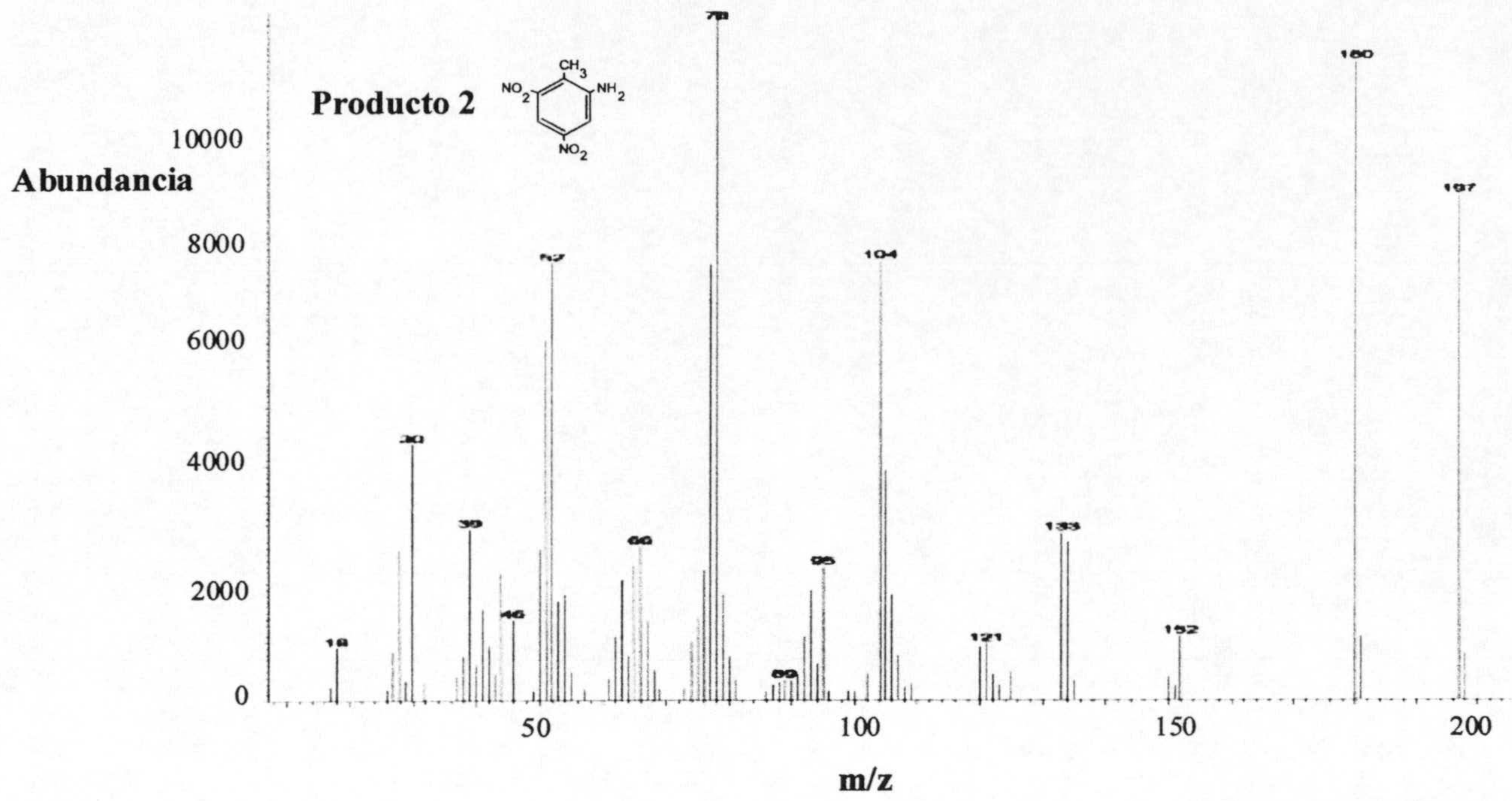


**Producto 12 y 13:** el producto 12 se obtuvo en análisis de una extracción ácida realizada con HCl. El espectro de masas del compuesto mostró un solapamiento de un 99% con el del derivado clorado ácido 2,4-diclorobenzoico. Extracciones ácidas de soluciones acuosas del ácido 2,4-dihidroxibenzoico se analizaron por GC-MS, detectándose en ellas al producto 13, cuyo espectro de masas solapó con el del 2,4-diclorobenzoico en un 99%. En medio ácido el ion cloruro podría llevar a cabo una sustitución nucleófila sobre el OH del anillo aromático formándose el derivado clorado correspondiente. Concluimos que la detección del ácido 2,4-di-cloro-benzoico responde a la presencia original de ácido 2,4-dihidroxibenzoico en los sobrenadantes de los cultivos.

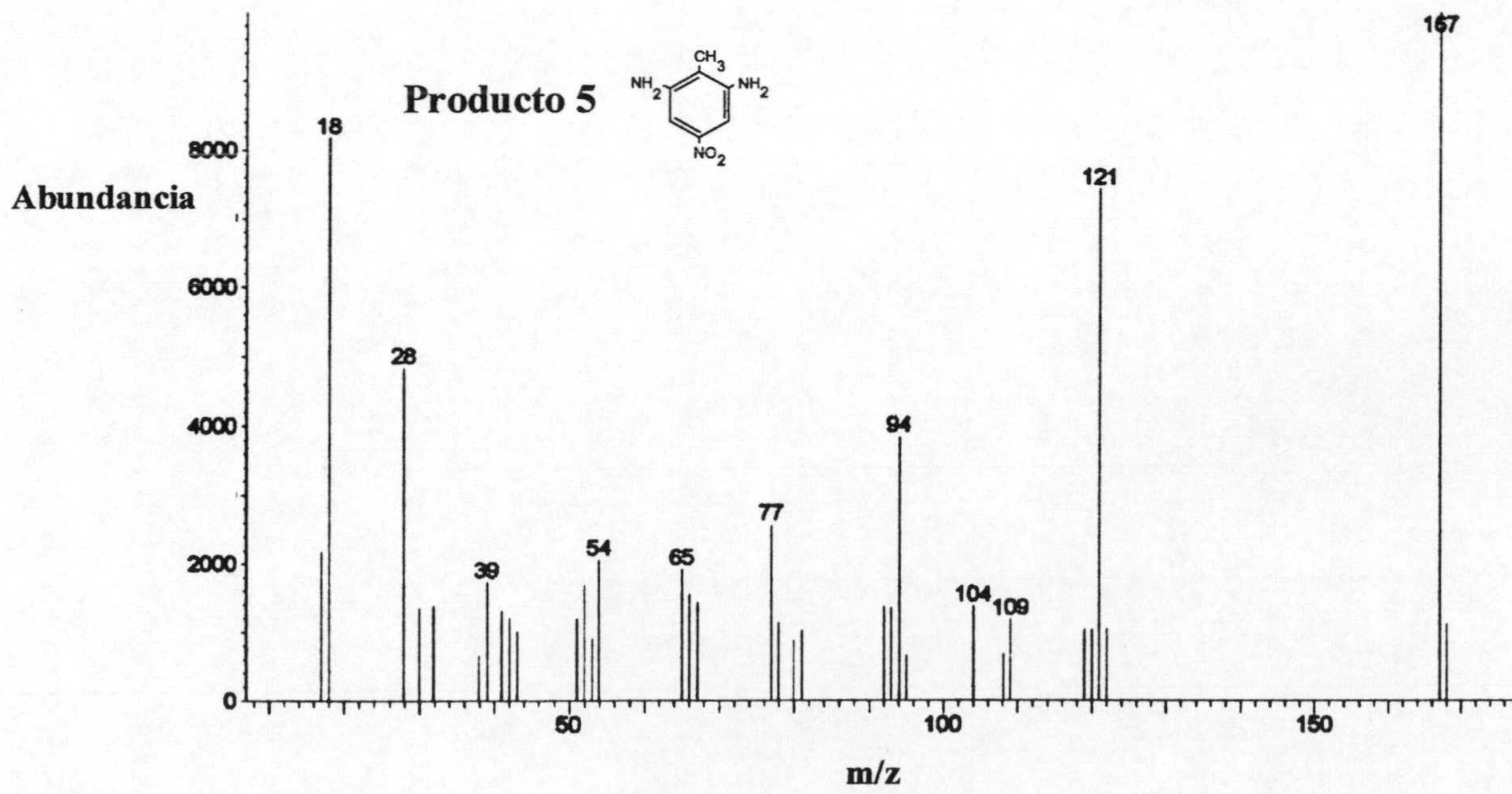
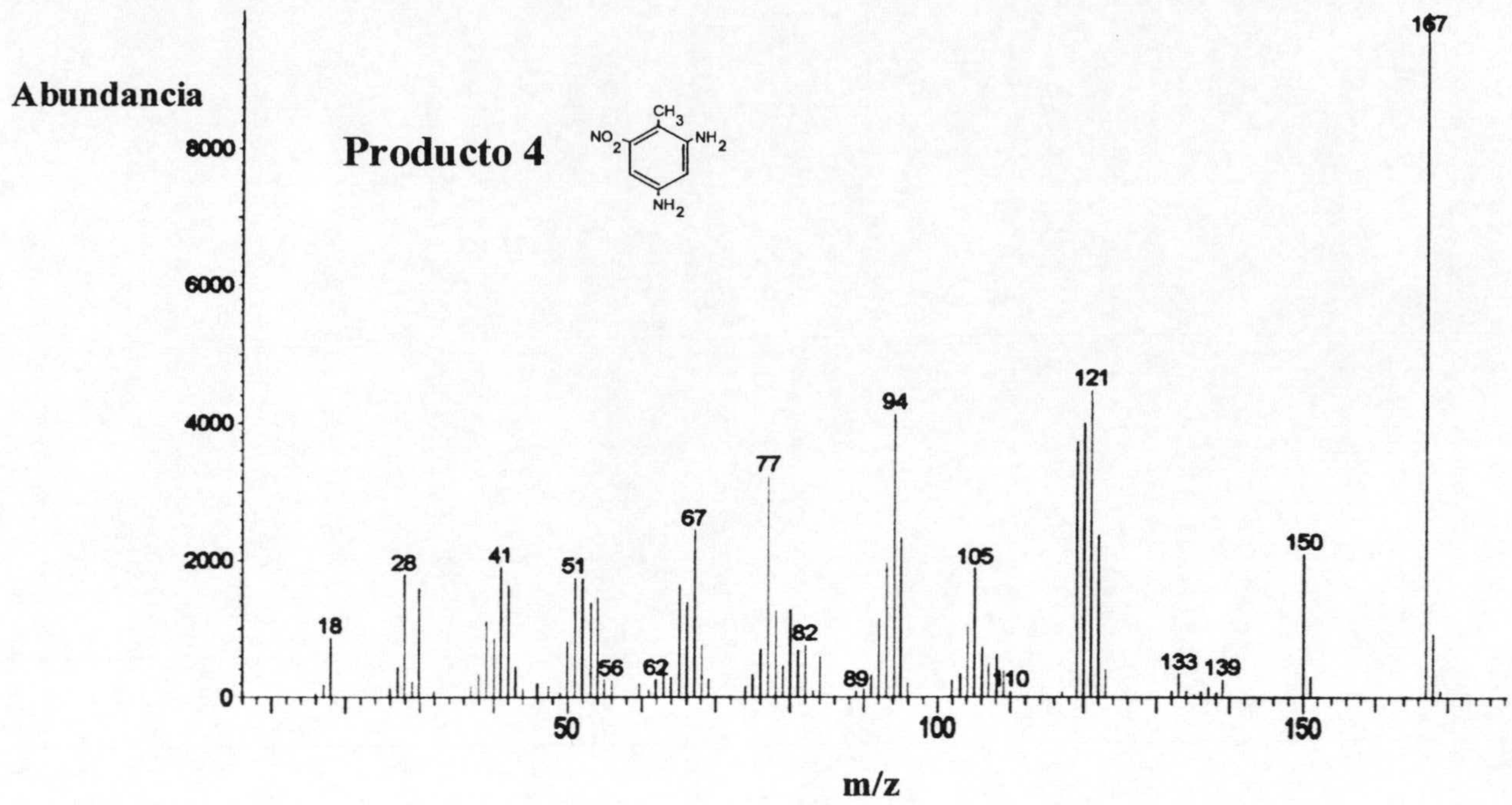
**Producto 14:** Este compuesto mostró un patrón de fragmentación que presentó una elevada similitud (85%), con los espectros de diversos isómeros del ácido nitrohidroxibenzoico recogidos en la base de datos nbs75k de Hewlett-Packard. Posteriores análisis por RMN-1H (ver apartado 1.3 de este *Capítulo II*) revelaron que se trataba del ácido 2-nitro-4-hidroxibenzoico. Su espectro de masas no estaba incluido en la base de datos anteriormente mencionada, por lo que no disponemos valores de similitud entre espectros.



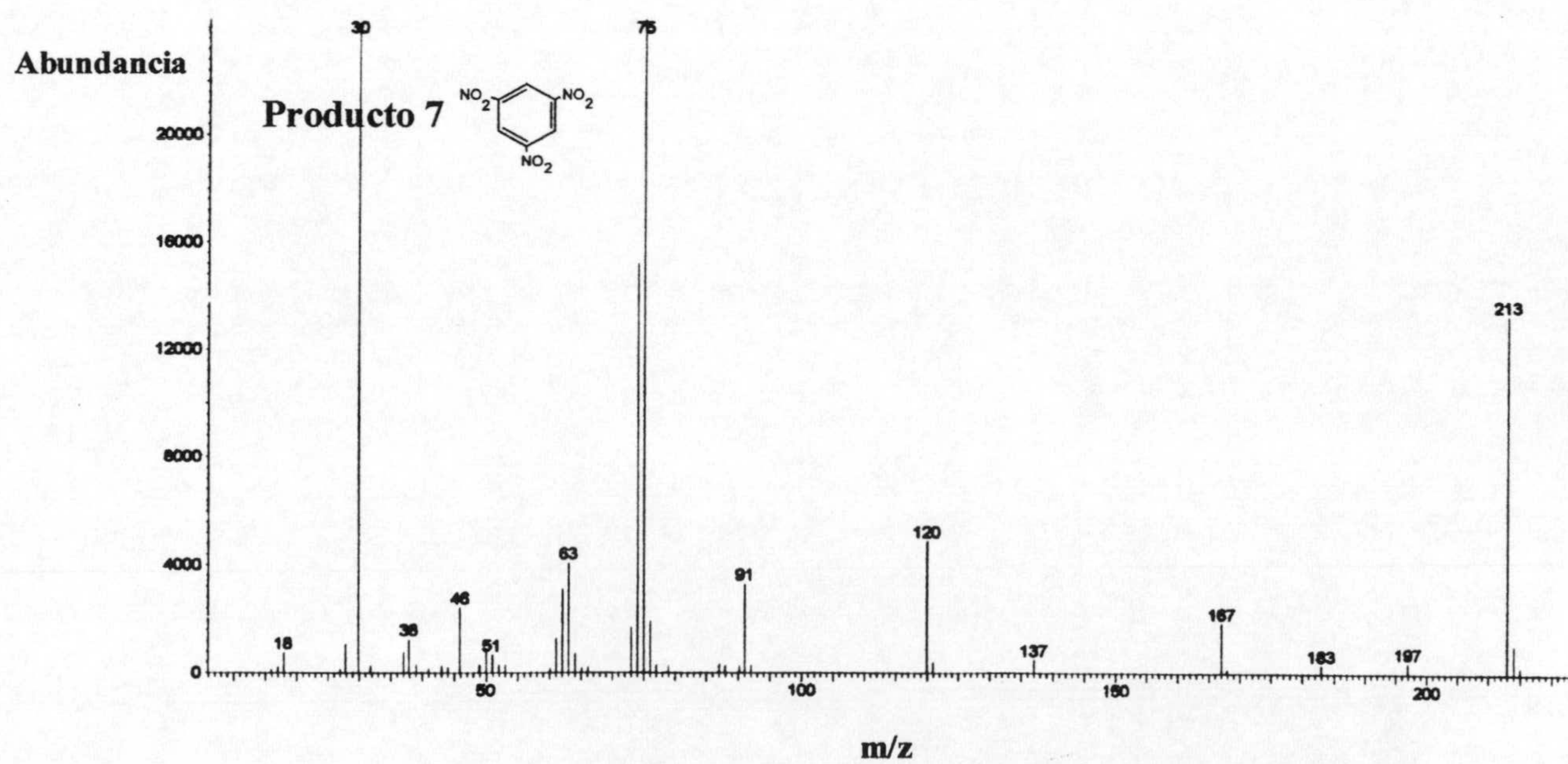
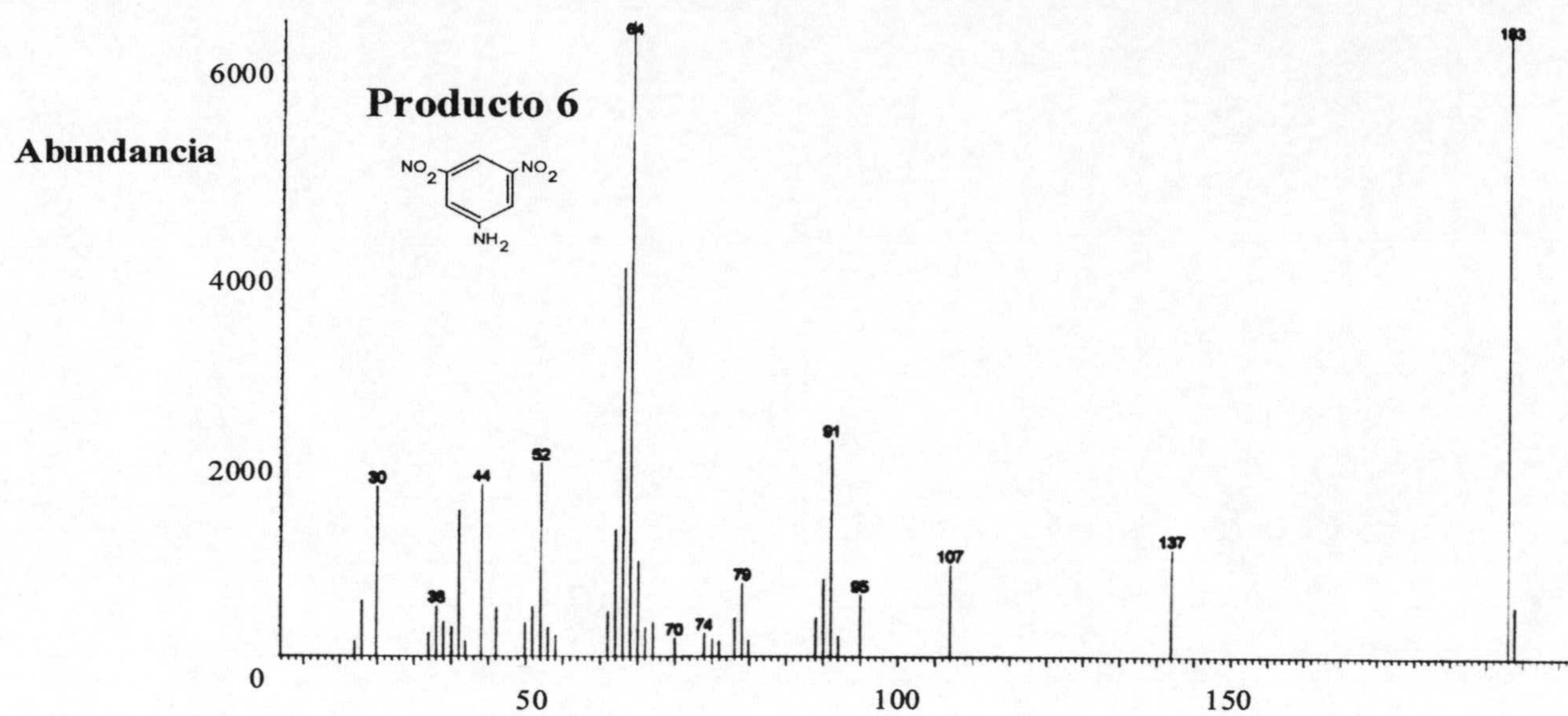




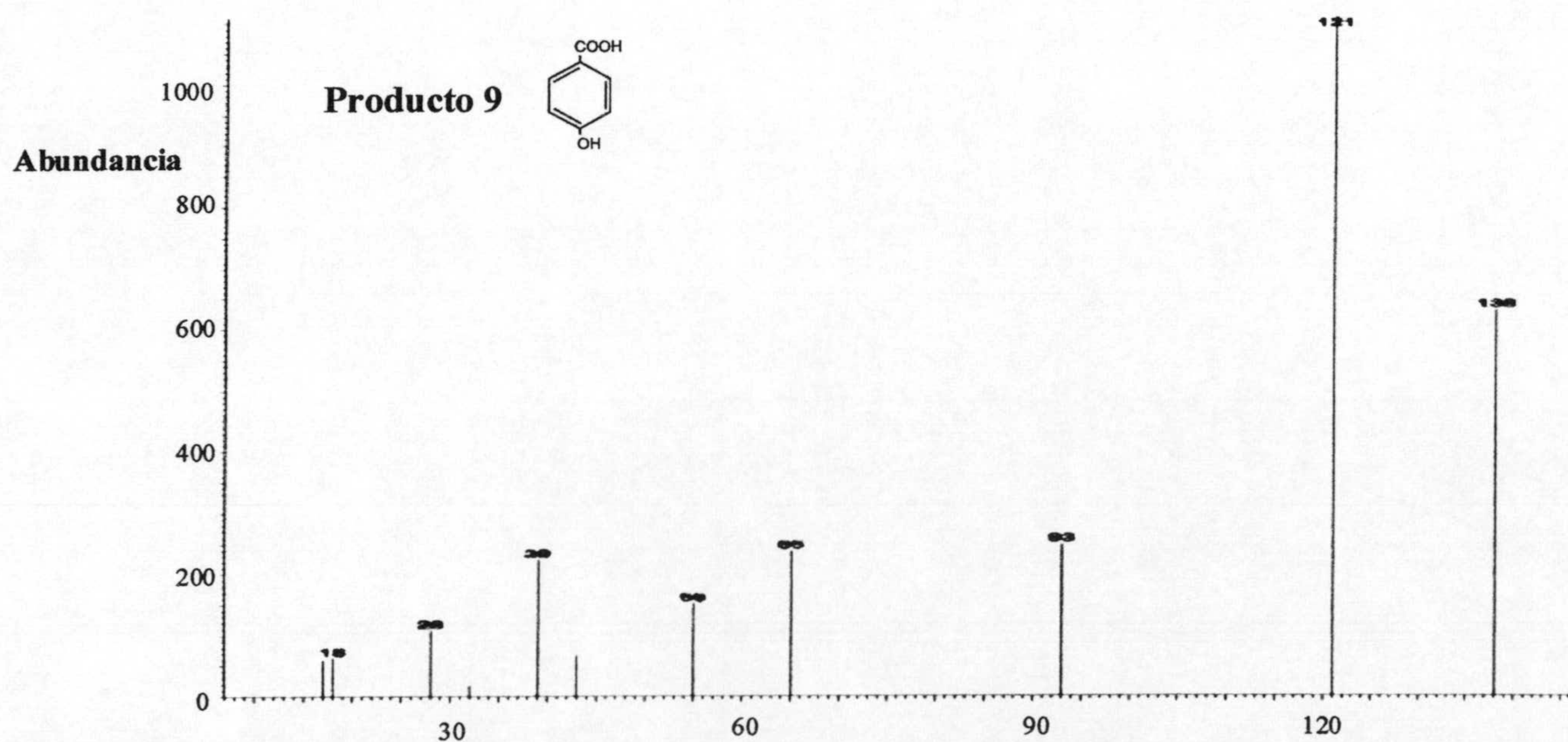
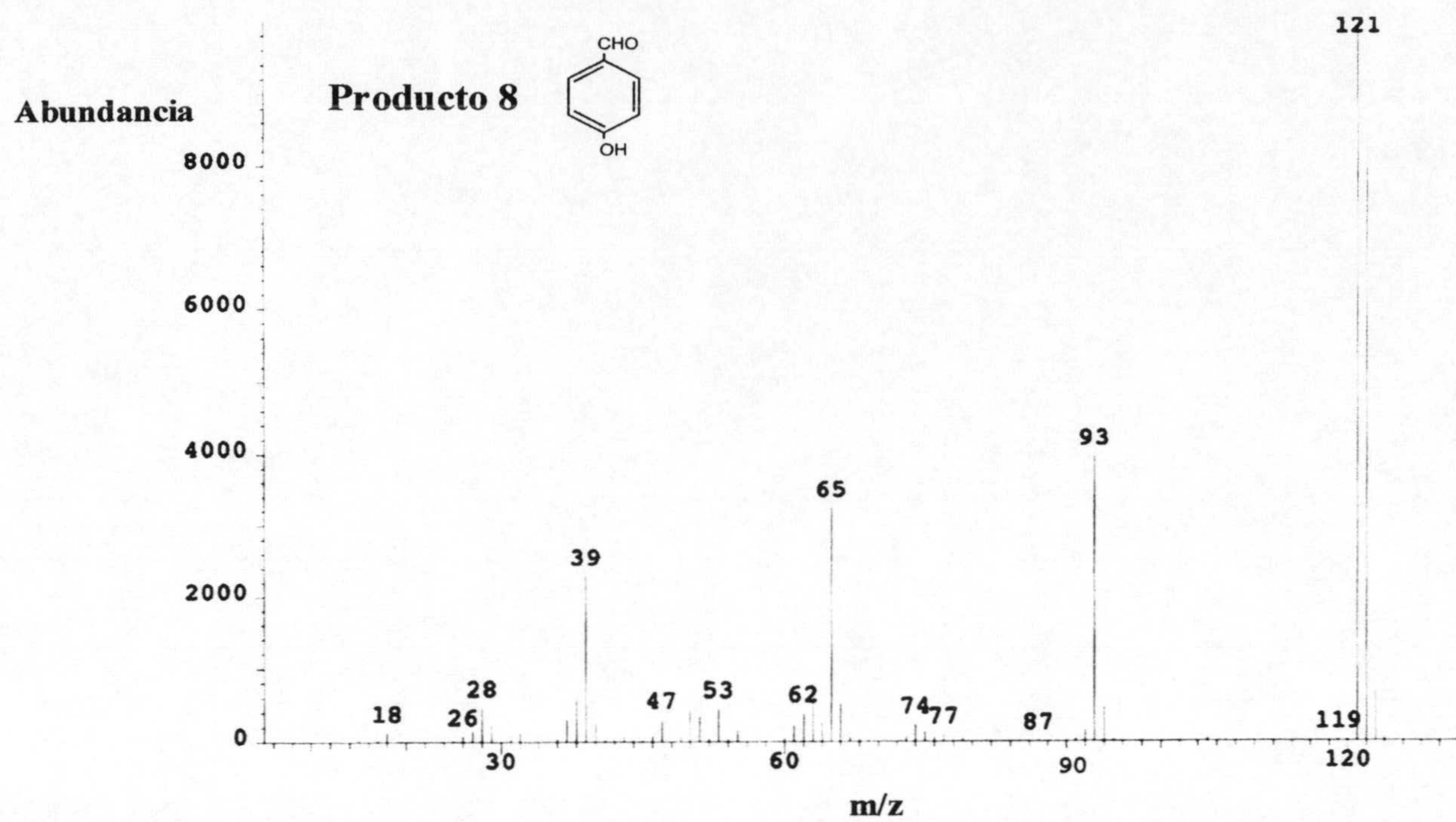




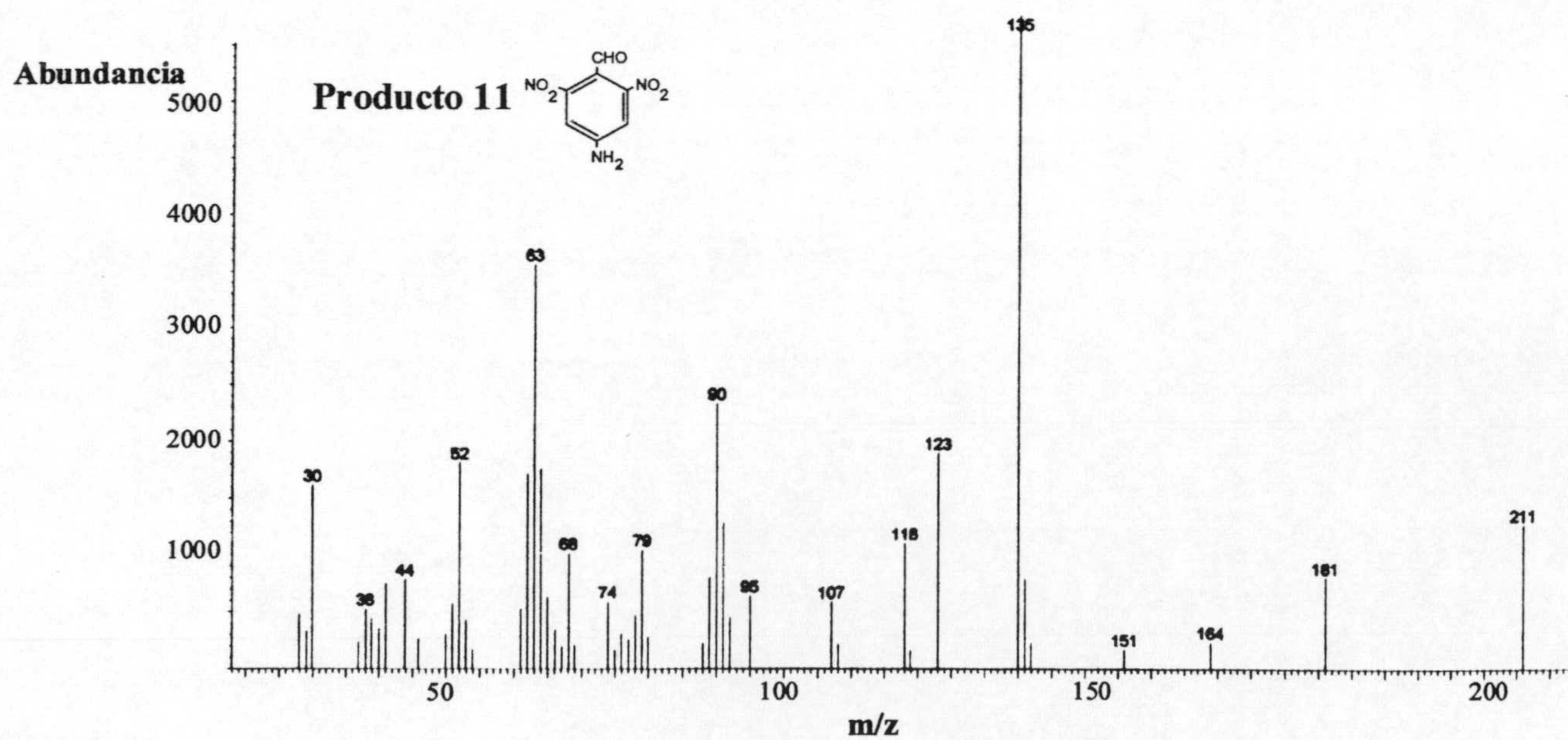
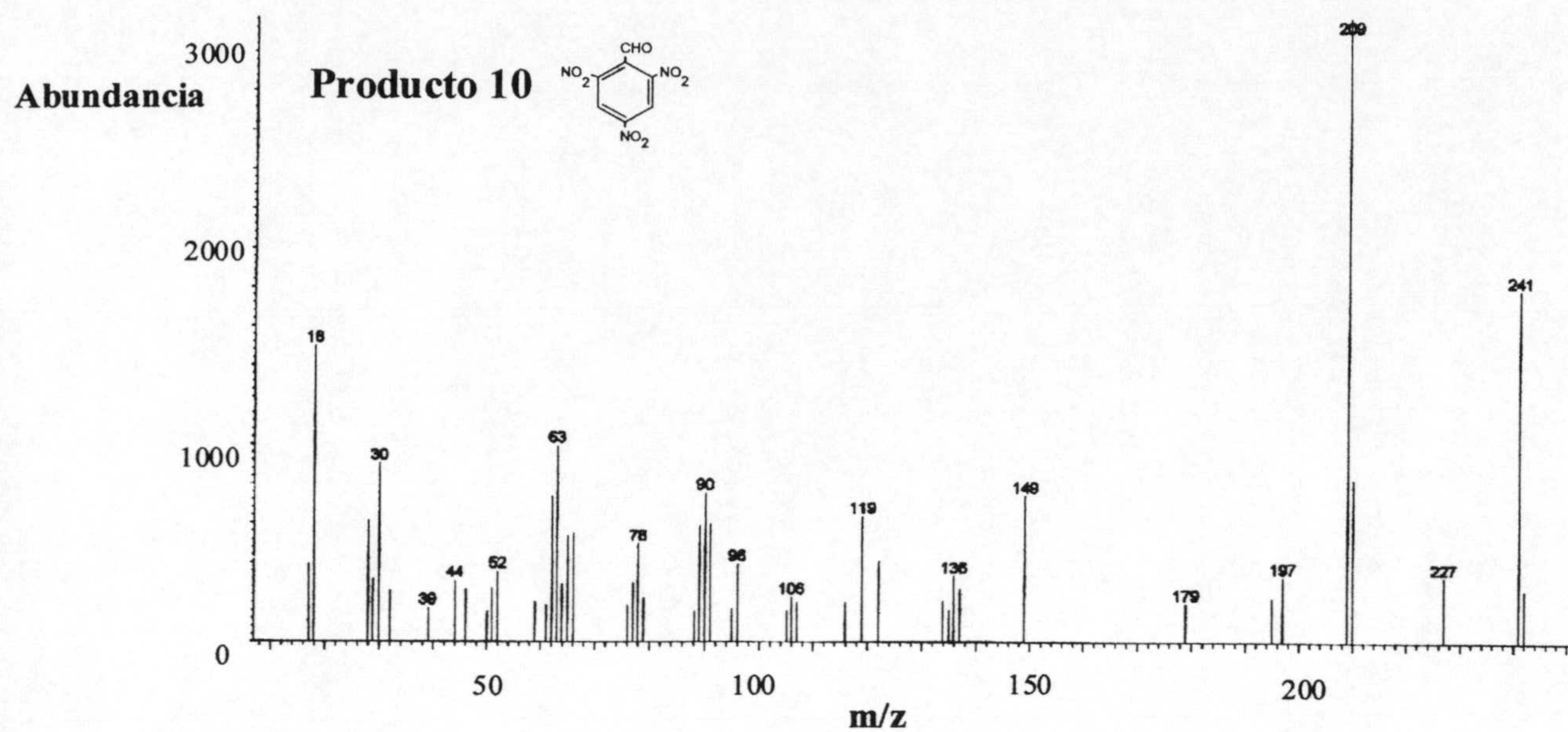




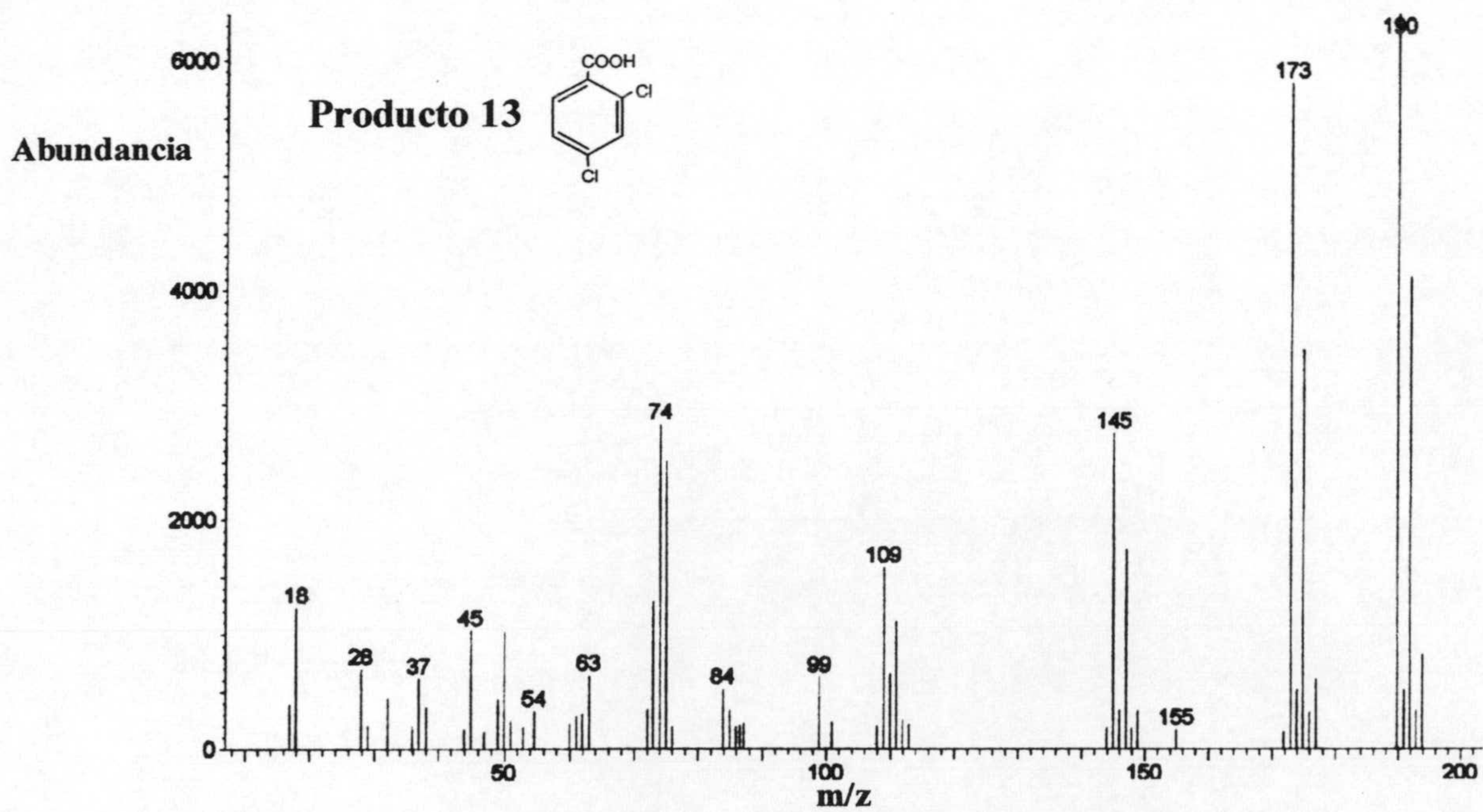
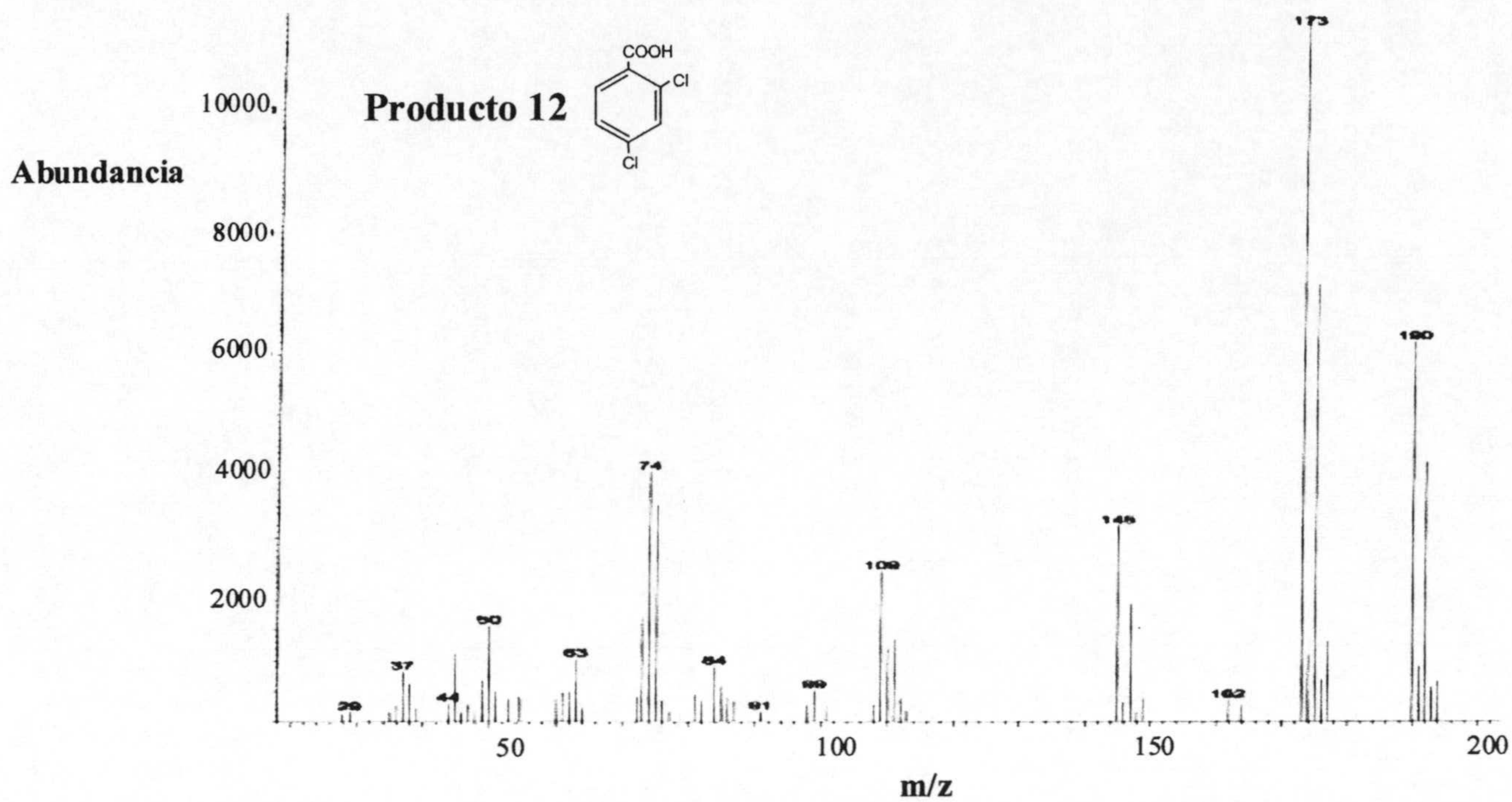




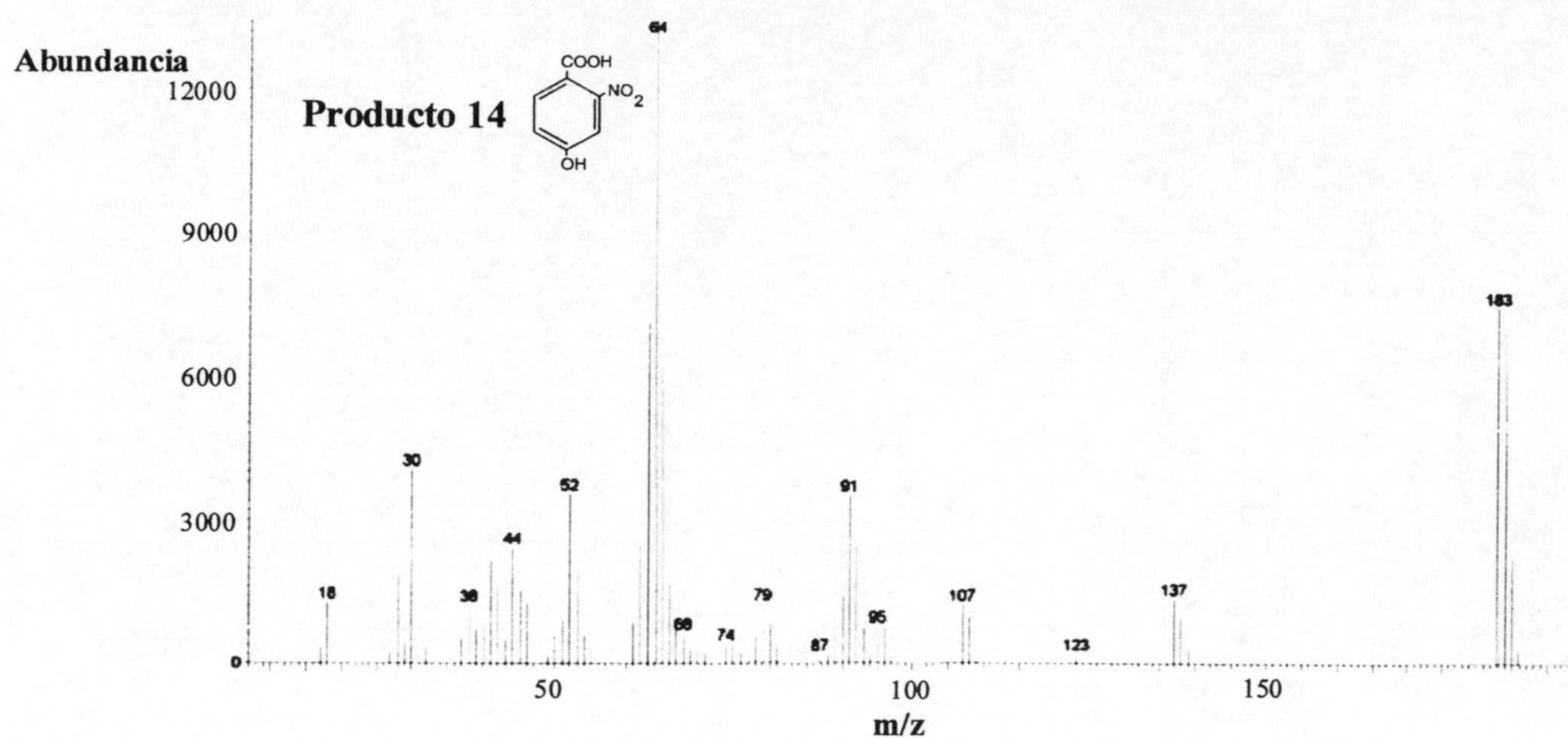












**Figura 30. Espectros de masas de los productos analizados por cromatografía de gases (CG).** Los espectros corresponden a compuestos aromáticos extraídos de sobrenadantes de cultivos de *Pseudomonas* sp. JLR11, en condiciones anóxicas con TNT como fuente de nitrógeno. Las condiciones del análisis por cromatografía de gases se describieron en la sección Materiales y Métodos. Los espectros corresponden a los siguientes productos: trinitrotolueno (producto 1); 2-amino-4,6-dinitrotolueno (producto 2); 4-amino-2,6-dinitrotolueno (producto 3); 2,4-diamino-6-nitrotolueno (producto 4); 2,6-diamino-4-nitrotolueno (producto 5); 3,5-dinitroanilina (producto 6); 1,3,5-trinitrobenzeno (producto 7); 4-hidroxibenzaldehído (producto 10); 4-amino-2,6-dinitrobenzaldehído (producto 11); ácido 2,4-diclorobenzoico (producto 12); producto generado en la extracción ácida del ácido 2,4-dihidroxibenzoico (producto 13) y ácido 2-nitro-4-hidroxibenzoico (producto 14).



#### 1.4 Análisis de metabolitos extraídos de sobrenadantes de cultivos por Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H}$ -RMN).

La cantidad de muestra necesaria para los análisis de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) requirió la purificación de algunos de los metabolitos extraídos de los sobrenadantes mediante el uso de cromatografía líquida preparativa de alta resolución (HPLC) como se describió en *Materiales y Métodos*.

El análisis de las muestras disueltas en acetona deuterada llevó a los resultados mostrados en la tabla I.1.4, donde aparecen los desplazamientos de cada señal y sus constantes de acoplamiento. Los productos recibieron la misma denominación tanto en el análisis de  $^1\text{H}$ -RMN como en el de GC-MS descrito en el apartado 1.2 de este capítulo; así, el denominado producto 1 analizado por ambas técnicas correspondería al TNT. Los productos 2 y 3 correspondieron a los dos isómeros, *orto* y *para*, del aminodinitrotolueno; sus desplazamientos químicos coincidieron con los del 4ADNT sintetizado en este trabajo y con los publicados por Nielsen y colaboradores (1979). El producto 6 presentó desplazamientos químicos idénticos al patrón de 3,5-dinitroanilina. El producto 14 presentó desplazamientos coherentes con la del ácido 2-nitro-4-hidroxibenzoico, la estructura propuesta para el compuesto. Observese el aumento que sufren las constantes de resonancia (de 2 a más de 8.4Hz) por la existencia de dos hidrógenos vecinales en el anillo aromático.



Tabla I.1.4. Datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN de metabolitos<sup>a</sup> extraídos de sobrenadantes de cultivos.

$^1\text{H}$ -RMN	Producto 1	Producto 2	Producto 3	Producto 6	Producto 14
H-2				7,88 d (2.02Hz)	
H-3	9.1 s	7,67 s (2.02 Hz)	7,66 s		7,62 d (2.05Hz)
H-4				8.07 dd(2.02;2.02Hz)	
H-5	9.1 s	7,78 s (2.02 Hz)	7,66 s		7,49 dd(2.02Hz;8.44H )
H-6				7,88 d (2.02Hz)	7,60 d (8.44Hz)

<sup>a</sup> Los productos 1, 2, 3, 6 y 14 fueron identificados como el 2,4,6-trinitrotolueno; el 2-amino-4,6-dinitrotolueno; el 4-amino-2,6-dinitrotolueno; la 3,5-dinitroanilina y el ácido 2-nitro-4-hidroxibenzoico, respectivamente. Los desplazamientos químicos se han expresado en ppm relativas a TMS y las constantes de acoplamiento J, se expresaron en Hz. Las multiplicidades de las señales se abreviaron como sigue: singlete (s), doblete (d) y doblete (dd).

## 2. Determinación de actividades enzimáticas en extractos libres de células de *Pseudomonas sp.* JLR11

Para obtener información sobre el metabolismo del TNT se recurrió al ensayo de actividades enzimáticas en extractos libres de células de *Pseudomonas sp.* JLR11 que fueron cultivadas en presencia de TNT, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. La detección de nitrito y de compuestos aromáticos con grupos amino en los sobrenadantes de los medios de cultivo, nos hizo determinar las actividades nitroreductasa y nitrito reductasa.



## 2.1 Determinación de la actividad nitroreductasa de TNT.

Los extractos libres de células se obtuvieron como se describió en la sección *Materiales y Métodos*, donde también se recogieron las condiciones del ensayo. La actividad nitroreductasa *in vitro* se estimó utilizando NADH como donador de electrones. En ausencia de TNT, se observó una oxidación de NADH por parte de los extractos, dicha oxidación fue más de 10 veces mayor en presencia del nitroaromático. La actividad nitroreductasa se ensayó en extractos celulares de cultivos anaerobios de *Pseudomonas sp.* JLR11 y los resultados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Determinación in vitro de la actividad nitroreductasa de TNT por extractos libres de células de *Pseudomonas sp.* JLR11**

Actividad Específica (U/mg prot.)		
Sustrato	Células cultivadas con TNT	Células cultivadas sin TNT
sin TNT	4,0	2,0
con TNT	41,25	20

Las células de *Pseudomonas sp.* JLR11 se cultivaron en anaerobiosis, en medio mínimo M8 con 0,1% (p/v) de glucosa como fuente de carbono y TNT como fuente de nitrógeno. Para el ensayo con células cultivadas en ausencia del TNT, este se reemplazó por 10 mM de nitrato. Las condiciones del ensayo se describieron en la sección *Materiales y Métodos*.

Los extractos se sometieron a un fraccionamiento subcelular como se describe en la sección *Materiales y Métodos* para identificar la localización de la actividad nitroreductasa. Como se muestra en la tabla 2, la distribución de la actividad nitroreductasa es diferente en función de las condiciones de cultivo de las células



utilizadas par la obtención de los extractos celulares. Cuando *Pseudomonas sp.* JLR11 se cultivó en condiciones anóxicas, el 80% de la actividad reductasa de grupos nitro se detectó en la fracción membrana. Esta actividad nitroreductasa ligada a la fracción membrana se abordará con más profundidad en el *capítulo III* de esta tesis doctoral.

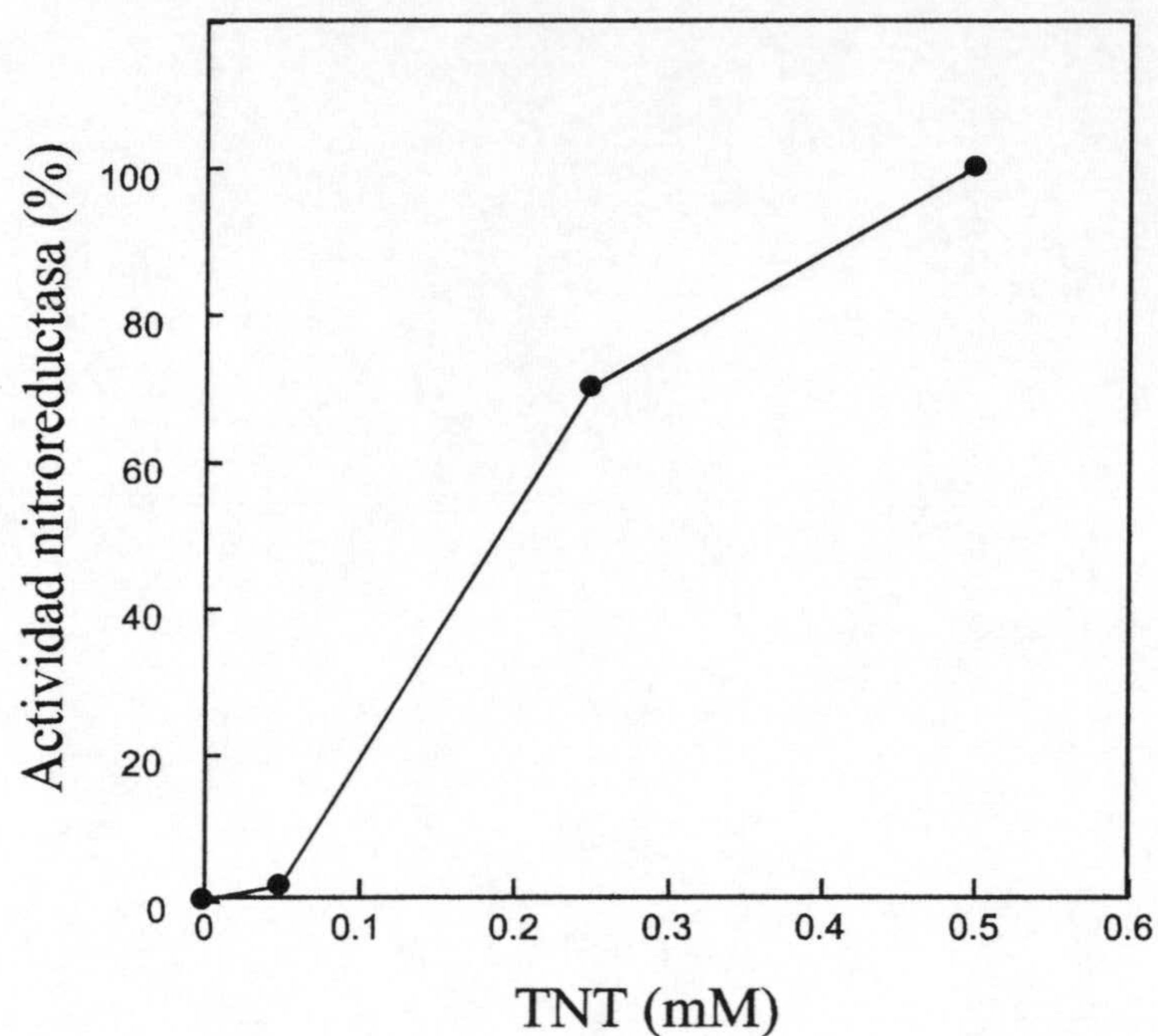
**Tabla 2. Distribución de la actividad nitroreductasa de TNT en extractos libres de células de *Pseudomonas sp.* JLR11.**

Fracción	Actividad Específica (U/mg)	Actividad volumétrica (%)
Extracto total	41,25	100
Fracción membrana	57,2	75
Fracción soluble	23,7	25

Las células fueron cultivadas en los mismos medios descritos en el pie de la tabla 1. El fraccionamiento del extracto se hizo a 90.000 g, constituyendo el sedimento la fracción membrana y el sobrenadante la soluble. La fracción membrana se resuspendió en el mismo volumen inicial que tenía el extracto para permitir la comparación del porcentaje de actividad total en las distintas fracciones y que se muestra como Actividad Volumétrica. Las condiciones del ensayo se describen en el apartado 11.2 de la sección *Materiales y Métodos*.

Se ensayó la dependencia de la actividad nitroreductasa con la concentración de TNT, siendo ésta óptima a 0.5 mM (Fig.31). No se ensayaron concentraciones superiores de TNT por constituir este valor el límite del producto de solubilidad en soluciones acuosas.

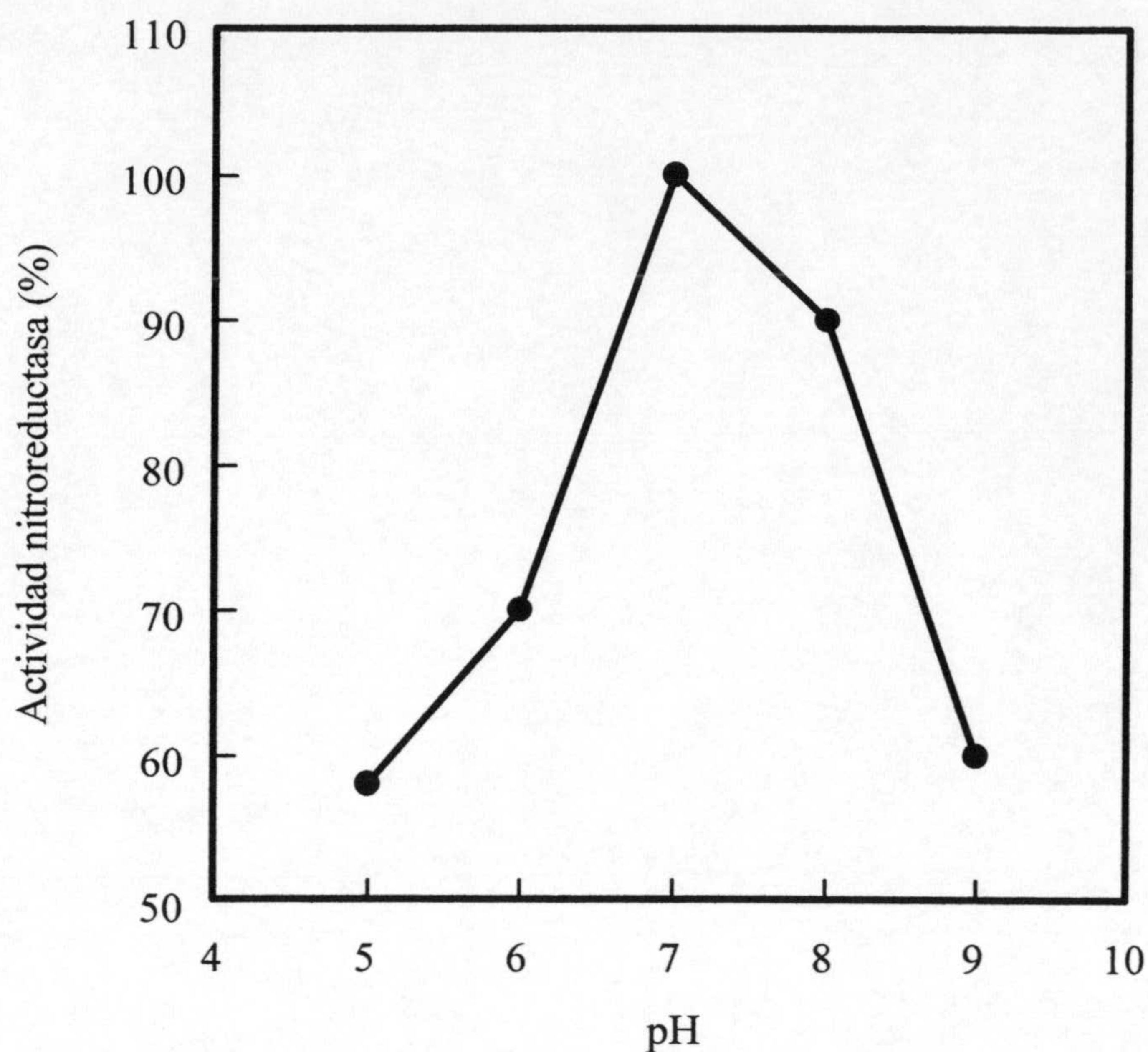




**Figura 31. Efecto de la concentración de TNT sobre la actividad nitroreductasa en extractos libres de células.** Los ensayos se realizaron como se describió en el apartado 11.1.1 de la sección *Materiales y Métodos*, y se utilizaron concentraciones de 1 mg proteína/ml en la mezcla de reacción. El TNT se adicionó a partir de una solución 100 mM en MeOH, para obtener las concentraciones ensayadas.

La dependencia de la actividad nitroreductasa con el pH se muestra en la figura 32, resultando ser óptima a pH 7.





**Figura 32.** Efecto del pH sobre la actividad nitroreductasa de TNT en extractos libres de células. Los ensayos se realizaron como se describió en la sección *Materiales y Métodos* y se utilizó 1 mg proteína/ml en la mezcla de reacción.

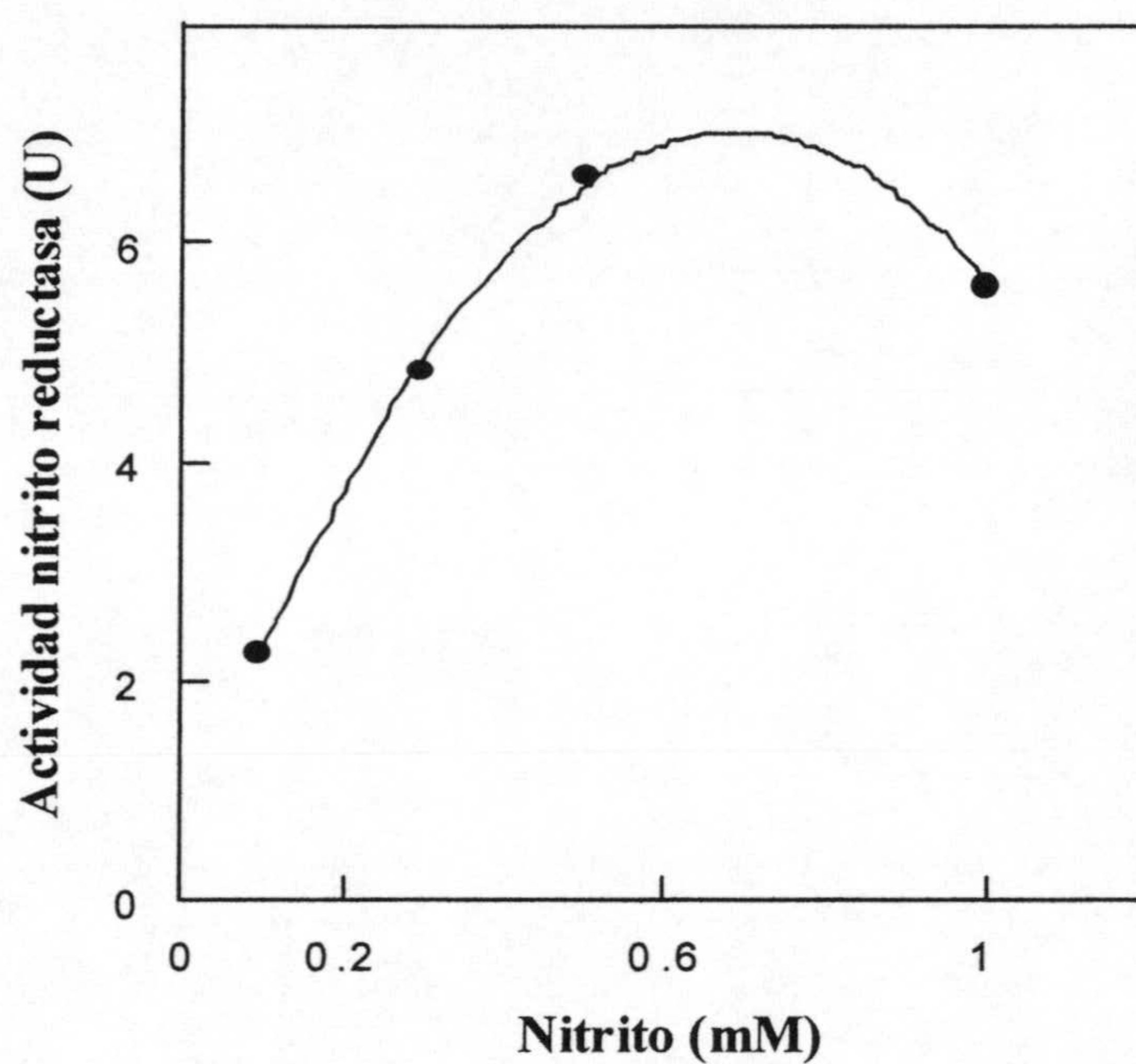
La mezcla de reacción se analizó por HPLC para identificar los productos de la reducción del TNT. Los cromatogramas mostraron la aparición de compuestos cuyo tiempo de retención y espectro UV coincidían con el de la 4-hidroxilamina-2,6-dinitrotolueno y el 4-amino-2,6-dinitrotolueno.

## 2.2. Determinación de la actividad nitrito reductasa en extractos libres de células.

El ensayo para la determinación de la actividad nitrito reductasa, se optimizó como se describe en *Materiales y Métodos*, en extractos libres de células de *Pseudomonas sp.* JLR11 cultivadas en condiciones aerobias, en medio mínimo con 10 mM de nitrato como fuente de nitrógeno. En las figuras 33 y 34 se muestra como la

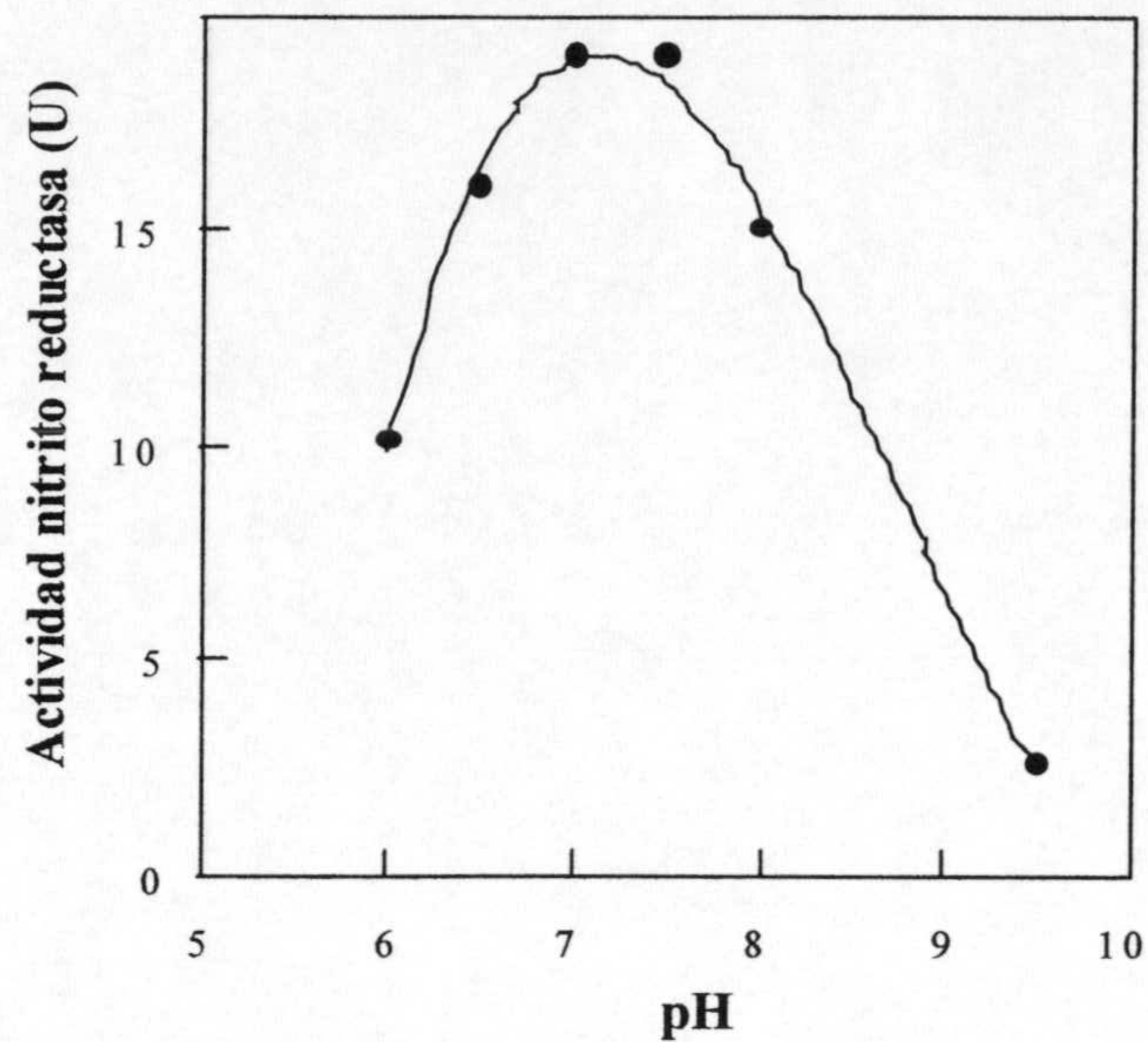


actividad máxima se detectó a una concentración de 0,5 mM de nitrito, lo que supone una  $K_m$  de 0,18 mM. La actividad optima se consiguió a pH 7-7,2. La adición de  $NAD^+$ , necesario para la detección de la actividad en otros microorganismos (Neubauer y Gotz, 1996; Piñar, G., 1998), inhibió en un 40% la actividad nitrito reductasa de *Pseudomonas sp.* JLR11.



**Figura 33.** Efecto de la concentración de nitrito en la actividad nitrito reductasa. Las células se cultivaron en condiciones aerobias, en medio mínimo M8 con 0,5% de glucosa y 10 mM de nitrato. La preparación de los extractos y las condiciones del ensayo se describen en la sección *Materiales y Métodos*.





**Figura 34 Efecto del pH en la actividad nitrato reductasa.** Las condiciones del cultivo fueron las descritas al pie de la figura II.2.2a. Las condiciones del ensayo se describen en la sección *Materiales y Métodos*.

Se realizó un fraccionamiento subcelular, centrifugando los extractos celulares a 90.000g, para determinar la localización de la actividad nitrato reductasa, encontrándose un 90% de ésta en la fracción soluble como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3 Distribución de la actividad nitrato reductasa en extractos libres de células.**

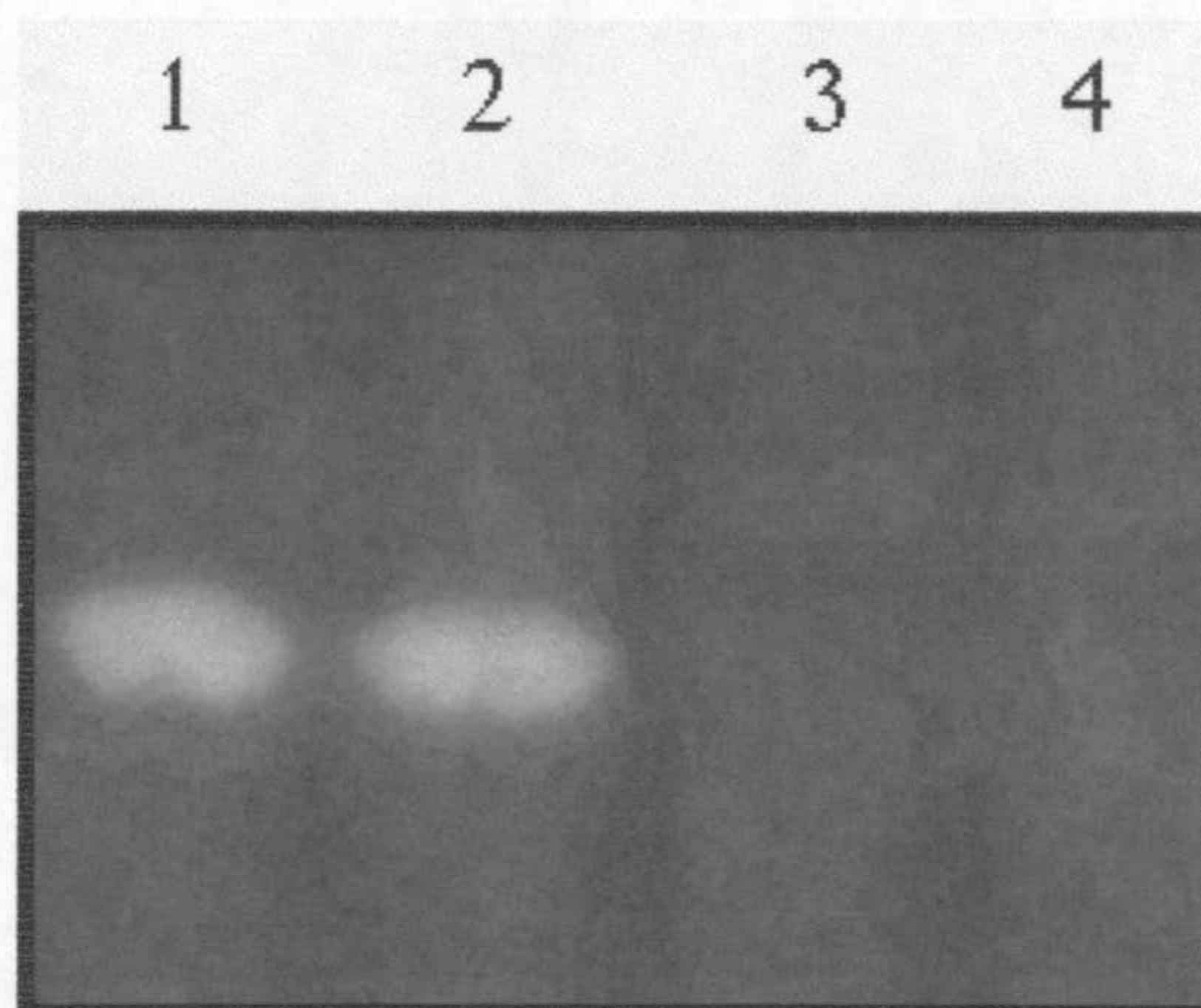
Fracción	Actividad (U)	Actividad Específica (U/mg)	Actividad volum. (%)
Extracto total	23,5	39	100
Periplasma	0,6	-	-
Fracción citoplasm.	19,2	36	90
Fracción membrana	3,3	3	10

Las células de *Pseudomonas* sp. JLR11 se cultivaron, en condiciones aerobias, en medio mínimo M8 con 0,5% (p/v) de glucosa y 10 mM de nitrato como fuente de nitrógeno. La preparación de los extractos y las condiciones del ensayo se describieron en el apartado 1.1 de la sección *Materiales y Métodos*.

La actividad nitrato reductasa se determinó en geles nativos libres en los que se separaron polipéptidos de la fracción citoplasmática como se describe en la sección



La actividad nitrito reductasa se determinó en geles nativos libres en los que se separaron polipéptidos de la fracción citoplasmática como se describe en la sección 11.1.2 de *Materiales y Métodos*. En la figura 35 se muestra el gel nativo en el que la banda acromática correspondería al polipéptido con actividad nitrito reductasa.



**Figura 35. Ensayo de actividad nitrito reductasa en un gel nativo.** En el gel de poliacrilamida se separaron por electroforesis los polipéptidos de la fracción citoplasmática de células cultivadas en anaerobiosis con TNT (calle 1) y con nitrato (calle 2) como fuentes de nitrógeno. La tinción en ausencia de nitrito se muestra en las calles 3 (células cultivadas en TNT) y 4 (células cultivadas en nitrato). Se separaron 100  $\mu\text{g}$  de proteína por calle. Las condiciones de la electroforesis y la técnica de tinción del gel para la detección de la actividad se describieron en la sección 11.1.2 de *Materiales y Métodos*.



### **3. Obtención y caracterización de un mutante de *Pseudomonas* sp. JLR11 incapaz de usar TNT como fuente de nitrógeno.**

El estudio de la ruta catabólica de TNT por *Pseudomonas* sp. JLR11, se abordó mediante la búsqueda de mutantes incapaces de utilizar el nitroaromático como fuente de nitrógeno; con el objeto de caracterizarlos desde el punto de vista fisiológico y bioquímico, así como clonar y secuenciar el ADN responsable de su fenotipo.

#### **3.1 Obtención del mutante P12E2 de *Pseudomonas* sp. JLR11 incapaz de usar TNT como fuente de nitrógeno.**

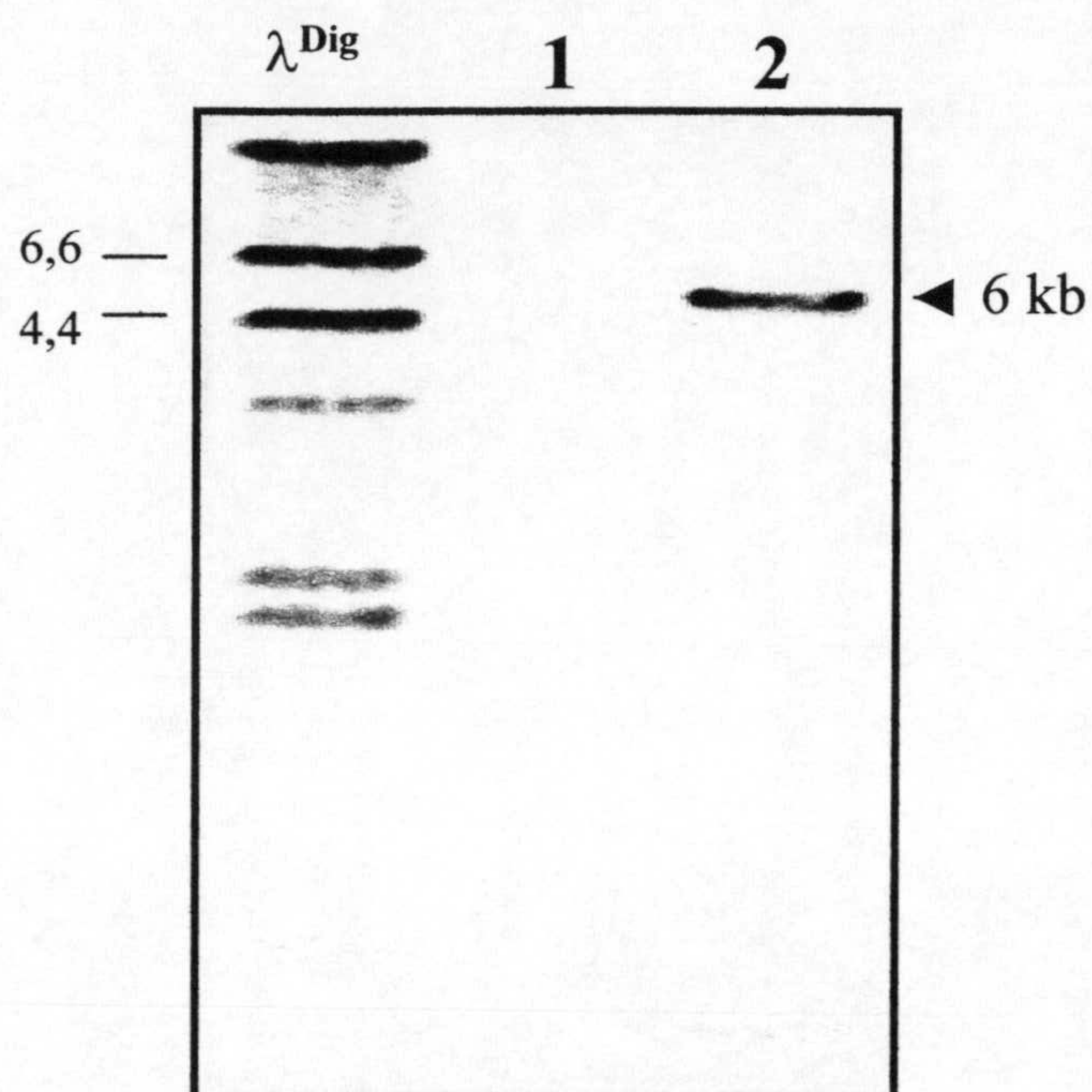
*Pseudomonas* sp. JLR11 se mutagenizó mediante la inserción cromosómica al azar del transposón miniTn5-telurito. Este elemento móvil está contenido en el plásmido pJMT4 (ver Figura 12), y se transfirió a la cepa silvestre por conjugación triparental como se describió en el apartado 6 de la sección *Materiales y Métodos*.

Las bacterias transconjugantes se seleccionaron en placas de medio mínimo con 0,5% (p/v) de glucosa, 10 mM de amonio, 30 µg/ml de telurito potásico y 25 µg/ml de kanamicina. Las colonias mostraron una coloración negra, probablemente debido a la acumulación de telurio metálico (Sánchez-Romero, 1997). Posteriormente, se hicieron réplicas en placas de medio mínimo con 0,5% (p/v) de glucosa y TNT como única fuente de nitrógeno para estudiar su capacidad para crecer en este medio. De las dos mil bacterias transconjugantes que se analizaron, tan sólo una fue incapaz de crecer en dicho medio, por lo que se seleccionó para su posterior caracterización, denominándola *Pseudomonas* sp. P12E2.

La inserción del mini-Tn5-telurito en el cromosoma se verificó mediante hibridación entre el ADN cromosómico, transferido a una membrana de nailon, y un sonda de ADN del operón *kilAtelAB* marcada con digoxigenina. Las condiciones de



transferencia del ADN e hibridación se describieron en el apartado 7.7 de la sección *Materiales y Métodos*. La inserción cromosómica del mini-Tn5-telurito se muestra en la figura 36.



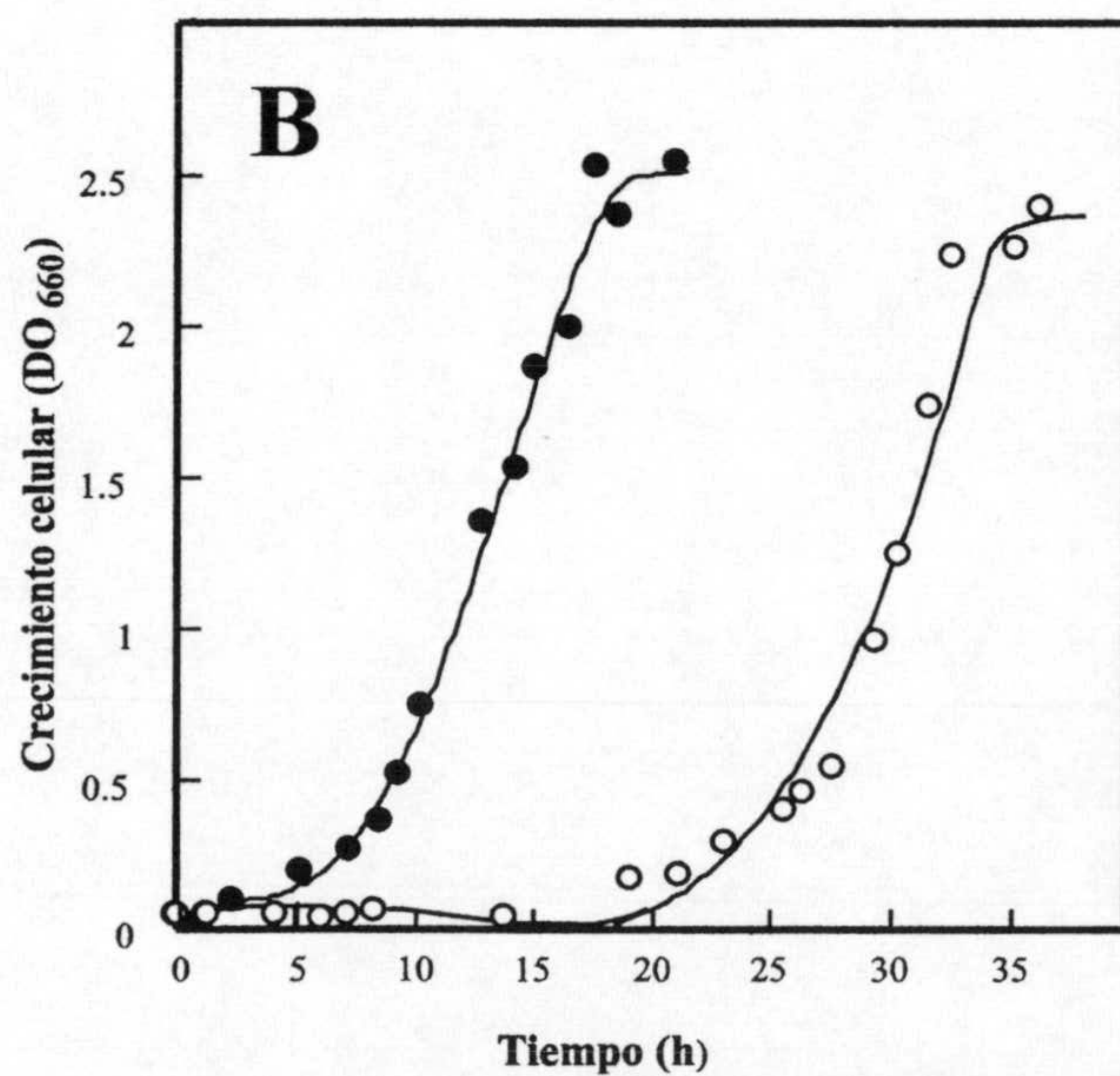
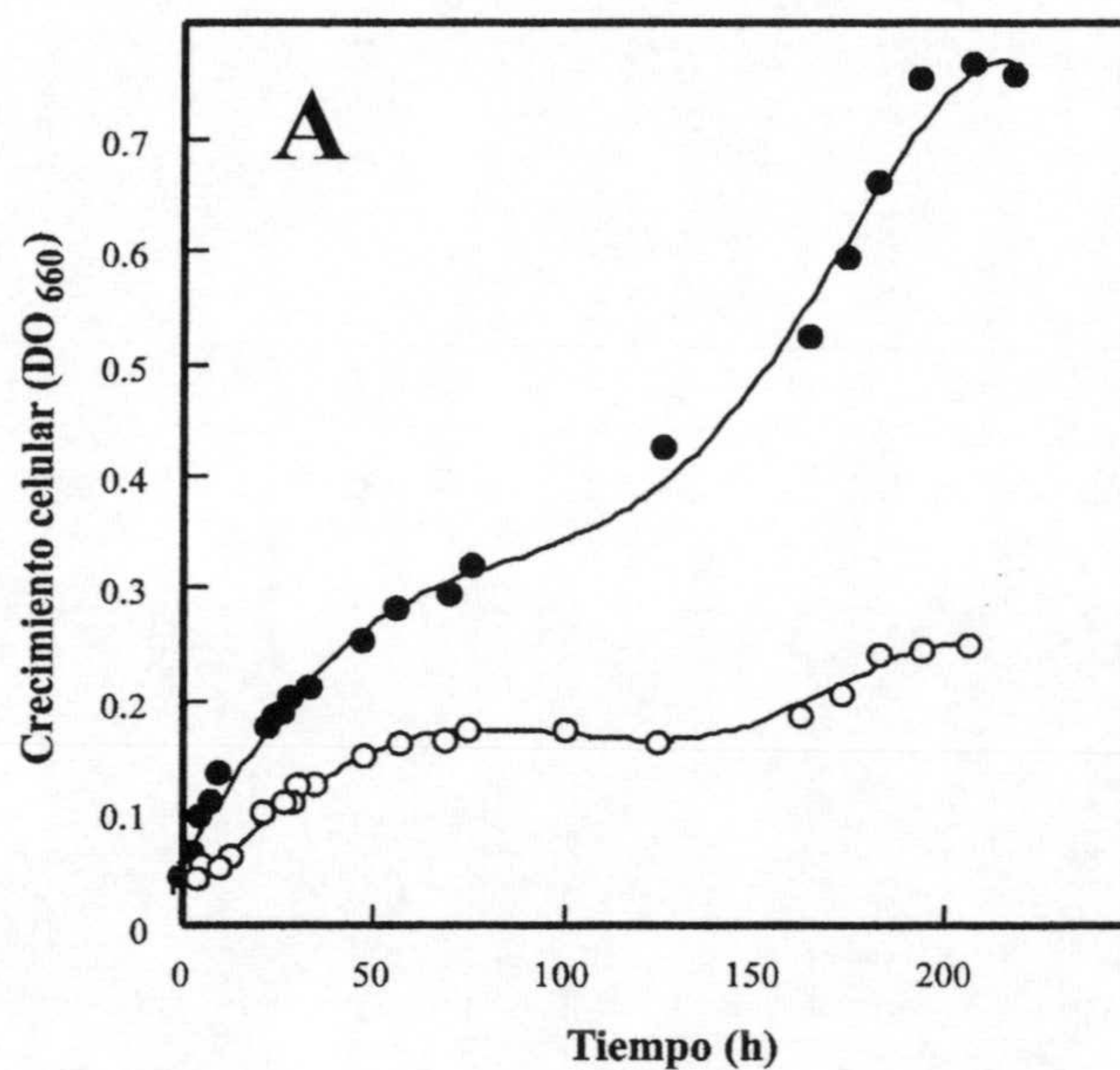
**Figura 36. Análisis por hibridación de la inserción del miniTn5-telurito en el cromosoma de *Pseudomonas sp.* JLR11.** El ADN total aislado de las cepas *Pseudomonas sp.* JLR11 (calle 1) y *Pseudomonas sp.* P12E2 (calle 2), se digirió con *SaII*, que no presentaba dianas de corte dentro del miniTn5-telurito; y se analizó por hibridación usando como sonda el fragmento *SfiI* del operón *kilAtelAB*. La sonda hibridó con un fragmento de 6 kb (calle 2) que incluía el operón *kilAtelAB* completo (3 kb) y 3 kb del ADN de *Pseudomonas sp.* P12E2 adyacente al minitransposón. La sonda no hibridó con el ADN de la cepa silvestre (calle 1). En el margen izquierdo se muestra el patrón de marcadores de peso molecular ( $\lambda$  *HindIII*) marcado con digoxigenina.

### 3.2 Caracterización fisiológica del mutante P12E2

El crecimiento aerobio, del mutante P12E2 se ensayó en medio líquido con 0,5% (p/v) de glucosa y TNT como única fuente de nitrógeno. Las células se precultivaron en medio mínimo con 0,5% de glucosa y 10 mM de amonio y se utilizaron como preinóculo tras diluirlas 1:100 en el medio de cultivo. El mutante fue incapaz de crecer



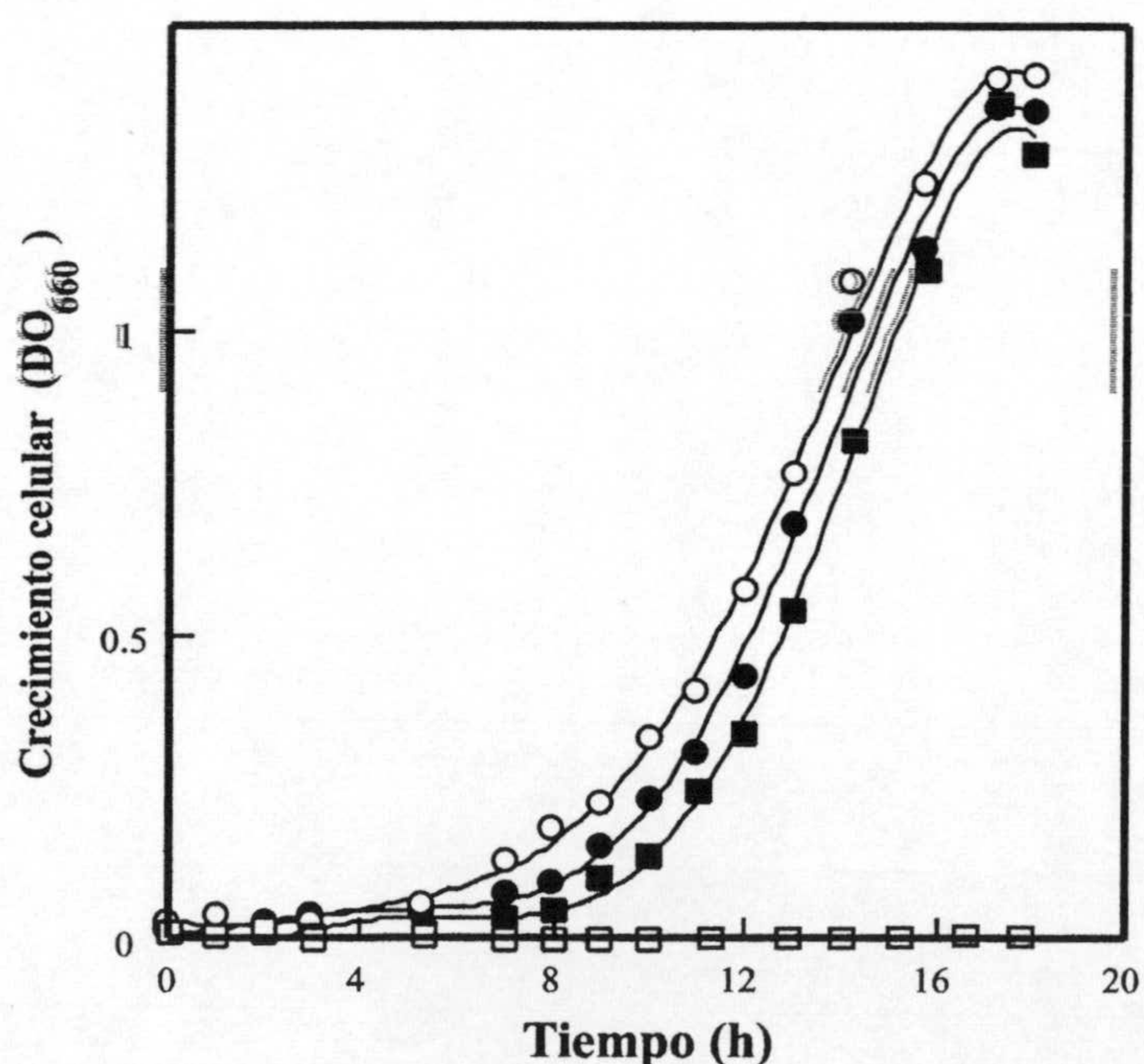
en estas condiciones (Figura 37), si bien, mostró un comportamiento similar al de la cepa silvestre cuando el medio se suplió con amonio; aunque, en este caso, la cepa mutante presentó una fase de latencia de unas 20 horas en contraste con las apenas 5 horas de la cepa silvestre. El tiempo de generación de ambas cepas en fase exponencial fue de 5 horas.





↑ **Figura 37** Crecimiento aerobio de *Pseudomonas sp.* JLR11 y del mutante P12E2 en cultivos en medio líquido con TNT. La cepa silvestre *Pseudomonas sp.* JLR11 (círculos cerrados) y la mutante P12E2 (círculos abiertos), se cultivaron en medio mínimo con 0,5% (p/v) de glucosa y TNT como única fuente de nitrógeno (Panel A), y en este mismo medio con 10 mM de amonio (Panel B). El crecimiento de las cepas se determinó midiendo la turbidez de los cultivos. Ambas cepas fueron precultivadas en medio mínimo con 0,5% (p/v) de glucosa y 10 mM de amonio.

También se ensayó el crecimiento de la cepa silvestre y mutante con una fuente de nitrógeno inorgánico como nitrito (Figura 38). Las células se precultivaron en medio mínimo con 0,5% de glucosa y 10 mM de amonio y se utilizaron como preinóculo tras diluirlas 1:100 en el medio de cultivo. Se encontró un comportamiento similar al mostrado en medio mínimo con TNT. Cuando los medios fueron suplidos con amonio, el mutante no mostró una fase de latencia diez veces menor que la presentada en el medio con TNT.



**Figura 38.** Crecimiento aerobio de *Pseudomonas sp.* JLR11 y del mutante P12E2 en cultivos en medio líquido con nitrito. La cepa silvestre *Pseudomonas sp.* JLR11 (círculos cerrados) y la mutante P12E2 (círculos abiertos), se cultivaron en medio mínimo con 0,5% (p/v) de glucosa y 2 mM de nitrito



como única fuente de nitrógeno. A este mismo medio se añadió 10 mM de amonio, entonces el crecimiento de la cepa silvestre se representó por cuadrados cerrados, y el de la mutante con cuadrados abiertos. El crecimiento de las cepas se determinó como el incremento de la turbidez de los cultivos.

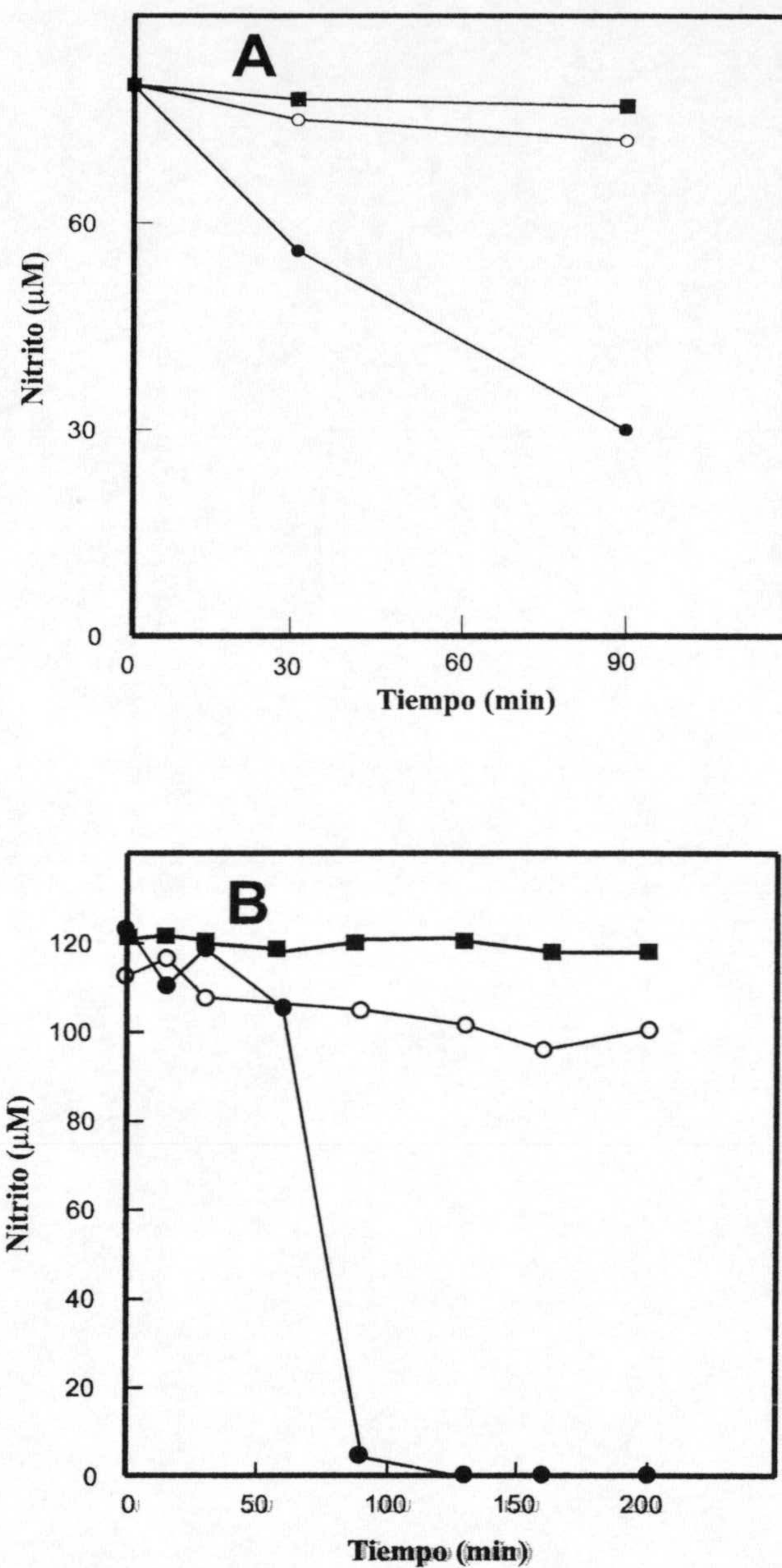
Aunque el mutante se seleccionó por su incapacidad para crecer en condiciones aerobias a partir de TNT, tampoco fue capaz de utilizar este nitroaromático en anerobiosis; así mismo, presentó el mismo fenotipo en cuanto al metabolismo de nitrito en ausencia de oxígeno.

A pHs en torno a 7, el ion nitrito accede al interior celular sin necesidad de transportador alguno. A este pH la desaparición de nitrito en el medio extracelular se considera debida a la reducción de nitrito por parte de la célula; así, incubaciones de suspensiones celulares en medios con nitrito, se pueden utilizar para determinar actividad nitrito reductasa *in situ*.

Ensayos con suspensiones celulares de la cepa silvestre, cultivadas en TNT e incubadas en medios con nitrito, mostraron un consumo inmediato del mismo que no se produjo en suspensiones de la cepa mutante (Figura 39A).

Suspensiones celulares de bacteria, cultivadas en medio sin TNT, se incubaron en medio con nitrito. En estas condiciones, se observó que en la cepa silvestre, el sistema de reducción de nitrito se indujo tras 1 hora de incubación; mientras que en la mutante no se produjo consumo alguno de nitrito a lo largo de todo el ensayo (Figura 39B).

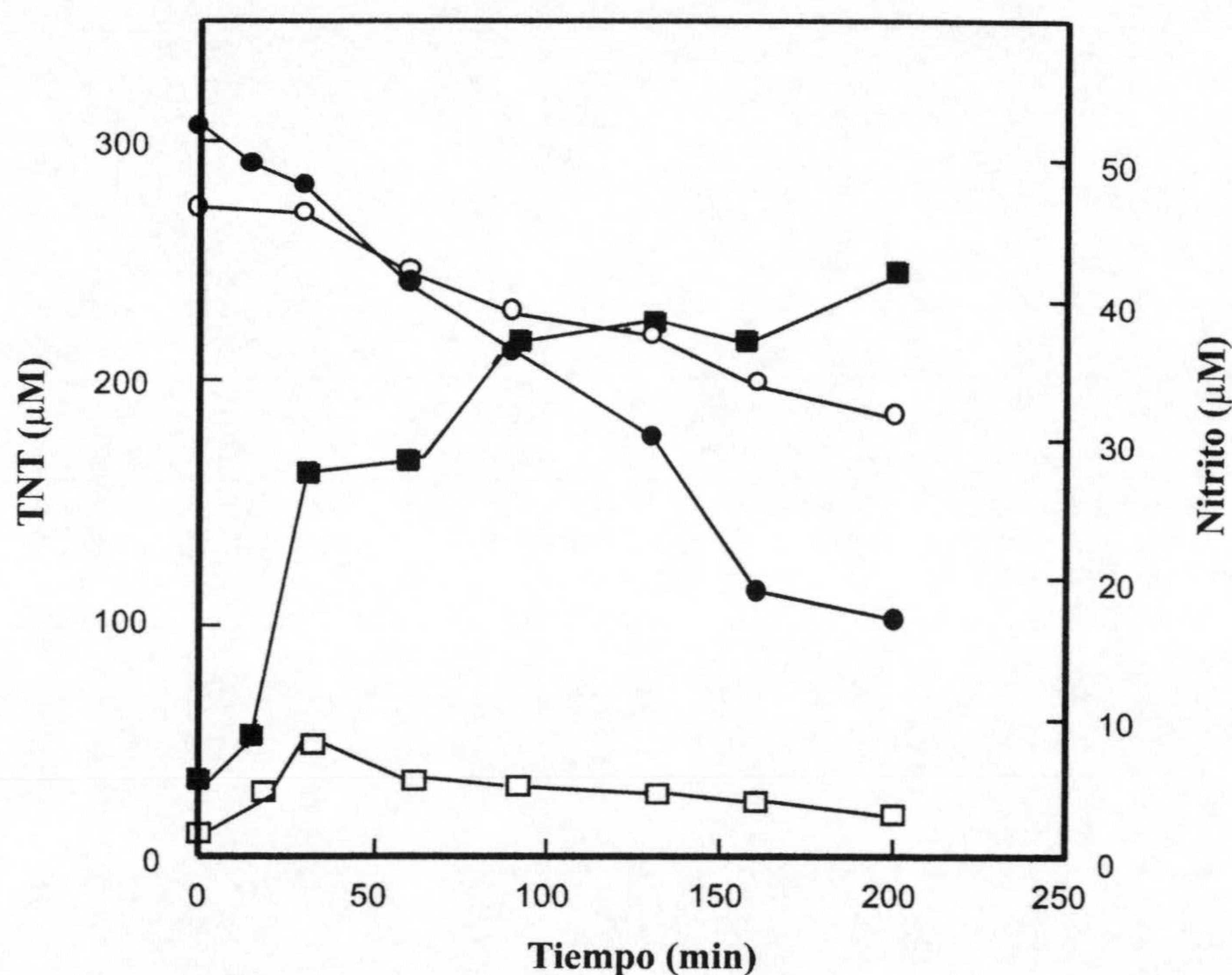




**Figura 39. Reducción de nitrito *in vivo* por suspensiones celulares de *Pseudomonas sp.* JLR11 y del mutante P12E2.** Se ensayó la capacidad para reducir nitrito por parte de la cepa silvestre y la mutante. En el panel A se muestran ensayos realizados con células cultivadas, en condiciones anaerobias, en un medio inductor de la actividad nitrito reductasa (medio mínimo con 0,1% (p/v) de glucosa; 0,5 mM de TNT y 0,5 mM de amonio); mientras que en el panel B, se muestra la reducción de nitrito por células que se han cultivado en un medio (LB) en el que la nitrito reductasa no se encuentra inducida. Los ensayos se realizaron incubando a 30°C suspensiones celulares ( $DO_{660}=2$ ) de la cepa silvestre y de la cepa mutante en medio mínimo con nitrito y 10 mM de succinato. La concentración de nitrito se determinó tanto en el caso de la cepa silvestre (círculos cerrados) como en el de la mutante (círculos abiertos); como control (cuadrados cerrados) se utilizaron células de *Pseudomonas sp.* JLR11 inactivadas por incubación a 100°C durante 5 minutos.



La liberación de nitrito a partir de la molécula de TNT se detectó al ensayar suspensiones celulares de las cepas silvestre y mutante en un medio con TNT. El nitrito se acumuló en el caso del mutante, incapaz de utilizarlo; por el contrario, esta acumulación no se detectó en las incubaciones con la cepa silvestre, que fue capaz de eliminar el nitrito originado a partir de TNT (Figura 40).

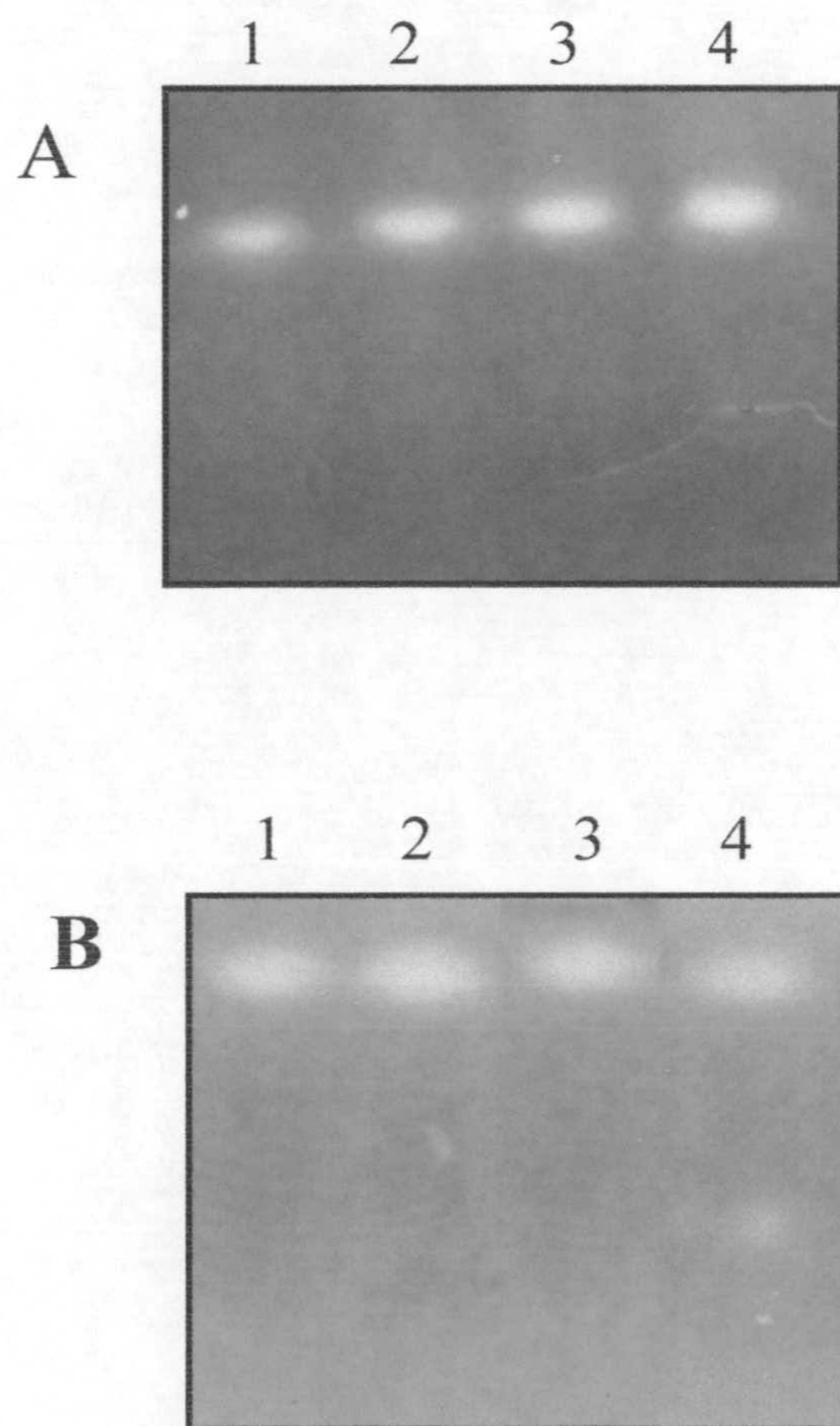


**Figura 40. Liberación de nitrito en el metabolismo de TNT por *Pseudomonas sp.* JRL11.** Células de *Pseudomonas sp.* JLR11 y de P12E2 se cultivaron en LB, se recogieron en fase exponencial y tras lavarlas en medio mínimo, se prepararon suspensiones celulares con una  $DO_{660}$  de 2. Suspensiones de la cepa silvestre y mutante P12E2, se incubaron a 30°C en medio mínimo con 10 mM de succinato, como fuente de energía, y 0,3 mM de TNT. El análisis por HPLC de los sobrenadantes de estas suspensiones celulares mostró la transformación de TNT tanto por la cepa silvestre (círculos abiertos), como por la mutante (círculos cerrados). Así mismo, se determinó la concentración de nitrito en los medios ensayados con la cepa silvestre (cuadrados abiertos) y con la mutante P12E2 (cuadrados cerrados).

Se utilizaron células de las cepas silvestre y mutante, cultivadas en medio mínimo con TNT y nitrito como fuentes de nitrógeno, para ensayar la actividad nitrito reductasa en geles nativos. Como se ha descrito anteriormente, la cepa mutante P12E2



no se mostró capaz de efectuar una reducción *in vivo* de nitrito; pero sin embargo, la actividad nitrito reductasa resultó ser funcional al analizarla en geles nativos de proteínas, con metilviológeno como donador artificial de electrones (Figura 41A). La técnica de electroforesis y la detección de la actividad se realizó como se describe en el apartado 11.2 de la sección *Materiales y Métodos*. Así mismo se detectó *in vitro* la actividad hidroxilamina reductasa, tanto en la cepa silvestre como en la mutante, mediante la técnica anteriormente descrita (Figura 41B).



**Figura 41. Ensayos de actividad nitrito e hidroxilamina reductasa en geles nativos.** En geles de poliacrilamida se separaron por electroforesis polipéptidos de la fracción citoplasmática de células, de la cepa silvestre y mutante, cultivadas en anaerobiosis con TNT o nitrato como fuente de nitrógeno. En el panel A se muestra la actividad nitrito reductasa y en el B la hidroxilamina reductasa. La distribución de



calles fue la siguiente: calle 1, cepa silvestre cultivada en TNT; calle 2, cepa silvestre cultivada en nitrato; calle 3, cepa mutante cultivada en TNT; y calle 4, cepa mutante cultivada en nitrato. Las condiciones de la electroforesis y la técnica de tinción en gel para la detección de la actividad se describe en la sección 11.12 de *Materiales y Métodos*.

### 3.3 Clonación y secuenciación de la región de ADN adyacente a la inserción del *miniTn5*-telurito.

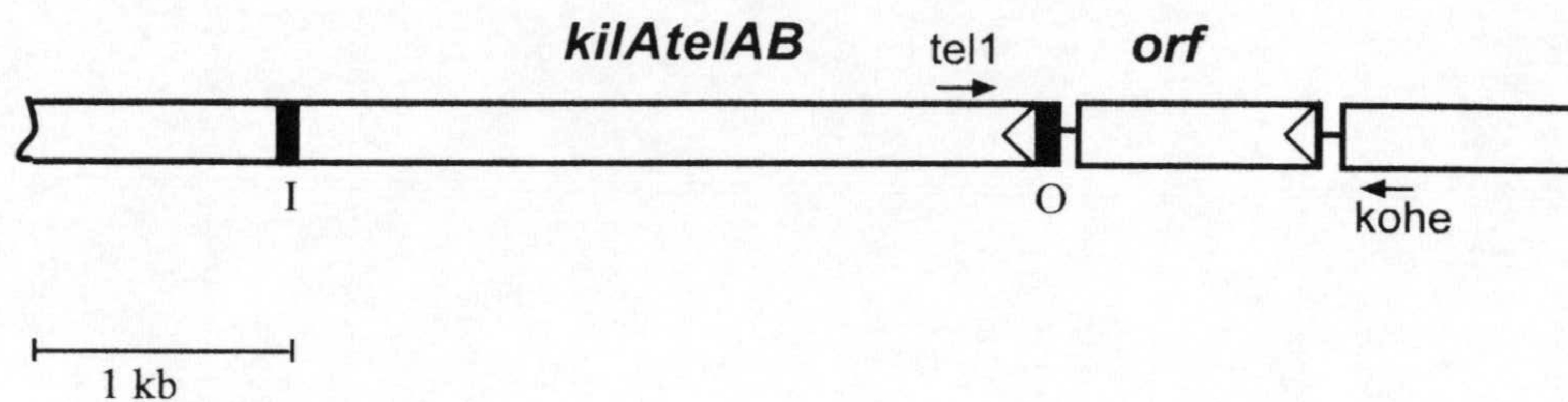
El ADN cromosómico adyacente al *miniTn5*-telurito se amplificó mediante la técnica de “PCR con cebadores degenerados” descrita en el apartado 7.6 de la sección *Materiales y Métodos*. Se diseñaron cebadores en los dos extremos de la inserción, a partir de la secuencia del operón *kilAtelAB*. Estos cebadores se denominaron tel1 y telA para el extremo O del *miniTn5*, y tel2 y telB para el extremo I. La secuencia de estos cebadores, junto con la de los degenerados utilizados en la técnica, se muestra en el apartado 3.6 de la sección *Materiales y Métodos*.

Mediante esta técnica se amplificaron fragmentos de 0,5 y 0,6 kb adyacentes, respectivamente, a los extremos I y O del *miniTn5*. La secuenciación de estos fragmentos presentó una identidad del 98% con la secuencia de ADN de *Pseudomonas putida* KT2440 localizada en la base de datos TIGR. El análisis de la región de ADN, que presentó homología con el fragmento de 0,6 kb (extremo O), reveló la presencia de un marco de lectura abierto (*orf*), mientras que la región adyacente al extremo I no pertenecía a ninguna *orf*.

Para comprobar la presencia de dicho marco de lectura abierta en el genoma de *Pseudomonas sp.* JLR11, se procedió a amplificarlo mediante PCR. Para ello se diseñó un cebador, denominado Cohe, a partir de la secuencia de ADN en *Pseudomonas putida* 2440. La reacción de amplificación sobre el cromosoma de la cepa P12E2, mediante los cebadores tel1 y Cohe, originó el fragmento esperado de 1,3 kb (Figura 42). Dicho



fragmento se aisló del gel de agarosa y se secuenció, resultando que la *orf* codificaba una proteína de 334 aminoácidos (Figura 43).



**Figura 42. Localización de la inserción del miniTn5-telurito en el cromosoma de *Pseudomonas sp. P12E2*.** En la figura se muestra la localización de la ORF corriente arriba de la inserción del minitransposón. Los extremos de éste se señalan como I y O. Se muestra la localización de los cebadores *tel1* y *Cohe*, utilizados para la amplificación del ADN adyacente al extremo O del miniTn5. El sentido de la transcripción de los genes se indica con triángulos.

1/1

gga ccc gcc ATG ACC CAG ACC AAC CGC CGC TTC CTG CTT GCC AAA CGC CCG GTC GGC GCC  
G P A M T Q T N R R F L L A K R P V G A

61/21

GTG CGC CGT GAC GAC TTC AGC TTC GAG ACC GTA CCC GCC GAA CAA CCC GGC GAA GGC CAG  
V R R D D F S F E T V P A E Q P G E G Q

121/41

GTA CTG GTG CGC AAC CTG TAC CTG TCG CTG GAC CCG GCC ATG CGC GGC TGG ATG AAC GAA  
V L V R N L Y L S L D P A M R G W M N E

181/61

GGC AAG TCC TAC ATC CCG CCC GTG GCC CTG GGC CAG GTA ATG CGT GCG CTG GGT GTA GGT  
G K S Y I P P V A L G Q V M R A L G V G

241/81

GAA GTG GTT GCC TCC AAT CAC CCC GGC TAC CAG CCC GGC GAC CAT GTG AGC GGC GCC CTC  
E V V A S N H P G Y Q P G D H V S G A L



301/101

GGT GTG CAG GAC TAC TTC ACC GGC GAG CCC CAG GGC CTG CAC AAG ATC GAC CCC AAG CTG  
G V Q D Y F T G E P Q G L H K I D P K L

361/121

GCC CCC CTG CCC CGT TAC CTG TCA GCC TTG GGC ATG ACC GGC ATG ACC GCC TAC TTC GCC  
A P L P R Y L S A L G M T G M T A Y F A

421/141

CTG CTG GAG GTT GGC CAA CCC AAA GCT GGC GAC ACC GTG GTC ATT TCC GGC GCG GCC GGT  
L L E V G Q P K A G D T V V I S G A A G

481/161

GCG GTG GGC AGC ATT GTC GGG CAG ATT GCC AAG ATC AAA GGC TGC CGC GTG GTC GGC ATT  
A V G S I V G Q I A K I K G C R V V G I

541/181

GCC GGC GGT GCC GAG AAG TGC CAG TAC CTG AAG GAC GAG CTG GGC TTT GAC GGC GTG ATC  
A G G A E K C Q Y L K D E L G F D G V I

601/201

GAC TAC AAG GCC GAA GAC GTG CTG GCC GGC CTG AAG CGC GAA TGC CCC AAA GGC GTG GAC  
D Y K A E D V L A G L K R E C P K G V D

661/221

GTG TAC TTC GAC AAC GTG GGC GGC GAT ATC CTC GAT GCC GTG CTG ACG CGC ATC AAC TTC  
V Y F D N V G G D I L D A V L T R I N F

721/241

AAG GCA CGC ATT GTG ATT TGC GGC GCG ATC AGC CAG TAC AAC AAC AAA GAA GCG GTG AAA  
K A R I V I C G A I S Q Y N N K E A V K

781/261

GGC CCG GCC AAC TAC CTG TCG CTG CTG GTG AAC CGC GCG CGC ATG GAA GGT TTT GTG GTG  
G P A N Y L S L L V N R A R M E G F V V

841/281

ATG GAT TAC ACC AAG GAC TAC GGC AAG GCC GCG CAG GAA ATT GCC GGC TGG TTG GCC AAT



M D Y T K D Y G K A A Q E I A G W L A N

901/301

GGT CAG GTG AAG AGC AAA GAG GAT GTG GTG GAA GGG CTG GAA ACC TTC CCG GAG ACC TTG

G Q V K S K E D V V E G L E T F P E T L

961/321

TTG AAG CTG TTC AGC GGG GAG AAT TTT GGC AAG TTG GTG TTG AAG GTT TAA ACG CCC CTG

L K L F S G E N F G K L V L K V \*\*\*

1021

**CA**cctg tct ctt gat cag atc tgt tga cga ggg ata gaa agt tta gct aaa ctt ctt cca

1081

tcg aaa agc aat taa ccc acc gcg agg gtg tat cga atg gaa gaa caa agc gtg aac

**Figura II.3.8** Secuencia de la región de ADN donde se insertó el minitransposón miniTn5-telurito en *Pseudomonas sp.* P12E2, y traducción de la misma. Se muestra la secuencia de ADN de la ORF adyacente al miniTn5, junto con sus secuencias de aminoácidos correspondientes (cada aminoácido se indica debajo de primera base del codón que lo codifica). El codón de inicio de la ORF se indica en negrita y el símbolo “\*\*\*” indica un codón de terminación. En minúsculas se muestra la secuencia del miniTn5.

Al comparar la ORF con las secuencias de las bases de datos, se encontró que presentaba similitud con diversas proteínas con función oxidoreductasa. El resultado de la comparación de la secuencia de aminoácido de este polipéptido con las secuencias de las distintas bases de datos (Abril 2000) se muestra en la tabla 3.



**Tabla 3. Proteínas con las que la ORF de *Pseudomonas sp.* JLR11 presenta similitud.**

Nombre de la proteína y microorganismo de origen	aa <sup>a</sup>	% identidad (solapamiento) <sup>b</sup>	Nº acceso	Referencia <sup>c</sup>
YfmJ <i>Bacillus subtilis</i>	339	45% (152)	D86417	Yamamoto <i>et al.</i> , 1997
Oxidoreductasa putativa <i>E.coli</i>	376	43% (145)	AE000242	Sin pub.
Oxidoreductasa putativa <i>E.coli</i>	353	43% (145)	D90785	Blattner <i>et al.</i> , 1997
Oxidoreductasa putativa <i>Streptomyces coelicolor</i>	364	44% (148)	AL133423	Sin pub.

<sup>a</sup>Número de aminoácidos de la proteína.

<sup>b</sup> Se indica el porcentaje de residuos idénticos encontrados en el fragmento de solapamiento. En el cómputo global del número de aminoácidos comprendidos en la región de solapamiento (indicado entre paréntesis).

<sup>c</sup> "Sin pub." Indica que dicha secuencia se encuentra depositada en la base de datos pero que no existe ningún artículo publicado sobre ella hasta la fecha del análisis (Abril, 2000).



## Capítulo III

Respiración de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) en condiciones  
anóxicas por *Pseudomonas* sp. JLR11



### 1 Ensayos fisiológicos con TNT como aceptor final de electrones.

Con objeto de comprobar si la molécula de TNT podría estar implicada en procesos respiratorios, se determinó el crecimiento de *Pseudomonas sp.* JLR11 en presencia de 10 mM de acetato, un cosustrato no fermentativo. La oxidación de acetato en ausencia de oxígeno requiere un aceptor de electrones, un papel que sólo el TNT podía desempeñar en esta serie de ensayos. La adición de 5 mM de amonio al medio liberó a la molécula de TNT de ser fuente de nitrógeno, por lo que la bacteria podía utilizar el nitroaromático preferentemente como aceptor de electrones, obteniéndose un mayor crecimiento del microorganismo como se muestra en la tabla III.1.1.

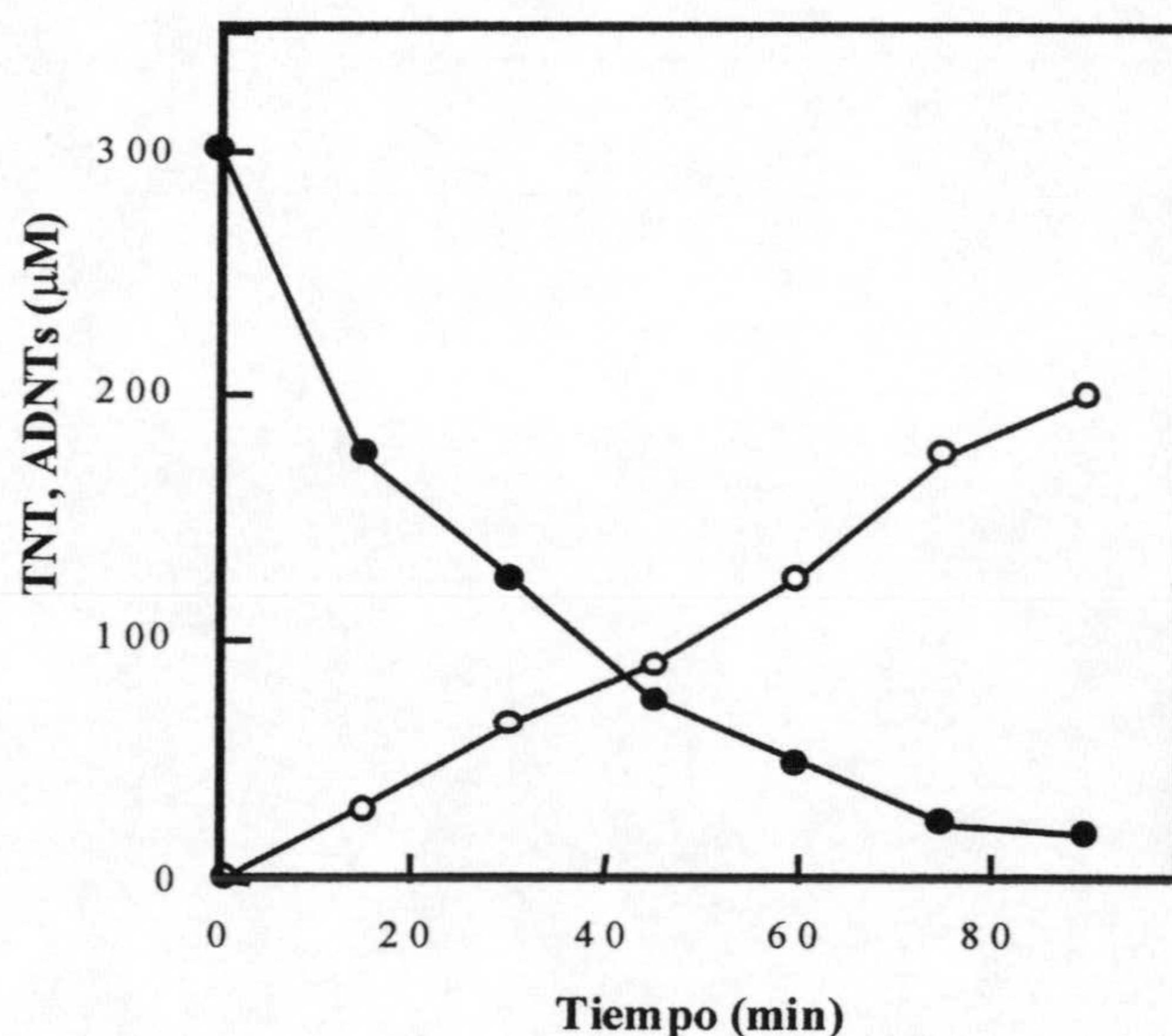
**Tabla III.1 Crecimiento de *Pseudomonas sp.* JLR11 en condiciones anóxicas con TNT como aceptor final de electrones**

Sustrato		Turbidez	
Amonio	TNT	Inicial	Final
-	+	0.02	0.32
+	-	0.02	0.02
+	+	0.02	0.45

La bacteria se precultivó en medio mínimo M9 con glucosa al 0,1 % (p/v) como fuente de carbono, en condiciones aerobias. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron en medio mínimo M8 y se diluyeron en medio mínimo anóxico con acetato 10 mM. Este medio se suplió con amonio 5 mM, TNT (1 g TNT en lascas / l cultivo) o ambos. A través de los cultivos se pasó un corriente de nitrógeno hasta saturarlo en este gas. Tras 72 horas de incubación a 30 °C se determinó el crecimiento celular midiendo la turbidez de los cultivos.



Cuando la bacteria se cultivó en condiciones anóxicas con acetato, amonio y TNT como aceptor final de electrones, el explosivo fue transformado fundamentalmente a través de la reducción de sus grupos nitro a amino. Esto se confirmó con ensayos en los que suspensiones de células, cultivadas en las condiciones anteriormente descritas, se incubaron en solución con TNT. La transformación de TNT en compuestos reducidos se muestra en la figura 44.



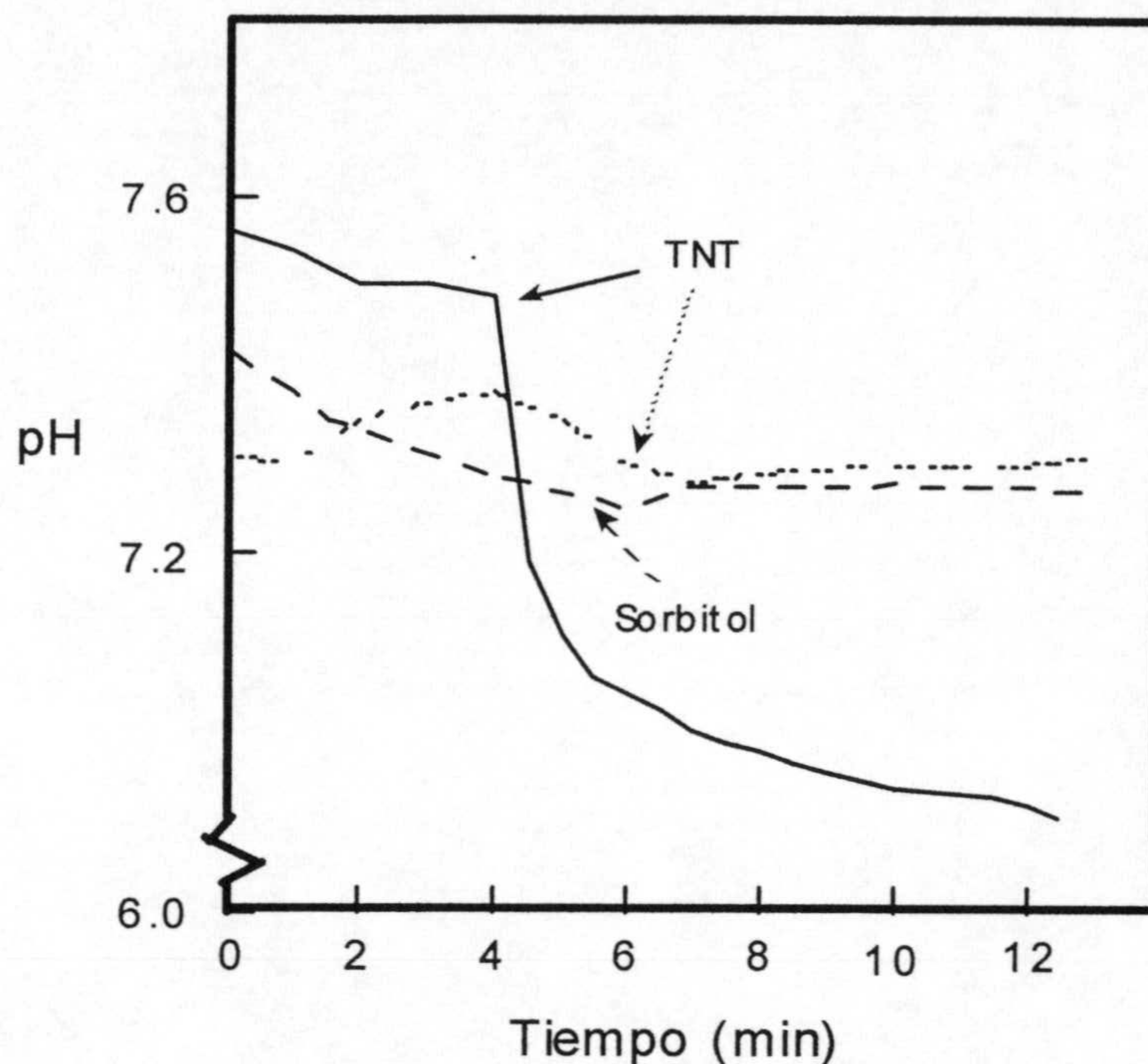
**Figura 44. Reducción de TNT por una suspensión celular de *Pseudomonas* sp. JLR11.** Las células se cultivaron en condiciones anóxicas con TNT como aceptor de electrones, acetato, 10 mM y amonio, 5 mM. El ensayo se realizó en condiciones anóxicas como se describe en la sección *Materiales y Métodos*. El consumo de TNT (círculos abiertos) y la aparición de productos de reducción, ADNTs (círculos cerrados) se detectaron por HPLC-DAD.



## 2. Translocación *in situ* de protones en células cultivadas con TNT como aceptor de electrones en condiciones anóxicas.

*Pseudomonas* sp. JLR11 se cultivó en reactores de 100 ml, termostatizados a 30°C bajo atmósfera de nitrógeno y en medio mínimo M8 saturado en TNT con 10 mM de acetato y 5 mM de amonio. Las células se recogieron en fase exponencial, se lavaron y se resuspendieron en una solución anóxica 250 mM de sorbitol a 4°C que se almacenó en viales sellados hasta su uso. La suspensión celular se dividió en dos alícuotas, una se calentó a 100°C durante 5 minutos y se utilizó como control de células inactivas; la otra no se trató y se utilizó para los ensayos como muestra con células activas. Los ensayos de translocación de protones dependientes de un determinado compuesto se hicieron como se describió en el apartado 14 de la sección *Materiales y Métodos* con la ayuda de un *respirómetro* diseñado con este propósito. Una alícuota de la suspensión celular anóxica se adicionó a la solución de sorbitol del respirómetro para obtener una turbidez a 660 nm de 0.4; tras homogeneizar la suspensión se siguió la variación del pH del medio extracelular hasta la estabilización de la respiración endógena. En ese momento se adicionaron 2 ml de sorbitol saturado en TNT, quedando la concentración final del nitroaromático en 150  $\mu$ M. El pHmetro marcó un brusco descenso en el primer minuto equivalente a la extrusión de 70 nmoles de protones en la suspensión de ensayo. La bajada del pH se mantuvo, aunque de manera menos acusada, hasta que las medidas terminaron por estabilizarse. Cuando en las mismas condiciones descritas se adicionó una solución de sorbitol sin TNT a la suspensión celular, estabilizada en su respiración endógena, no se observó descenso alguno del pH. El control de células inactivadas tampoco mostró extrusión alguna de protones, si bien en este caso ni siquiera se detectó respiración endógena. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 45.





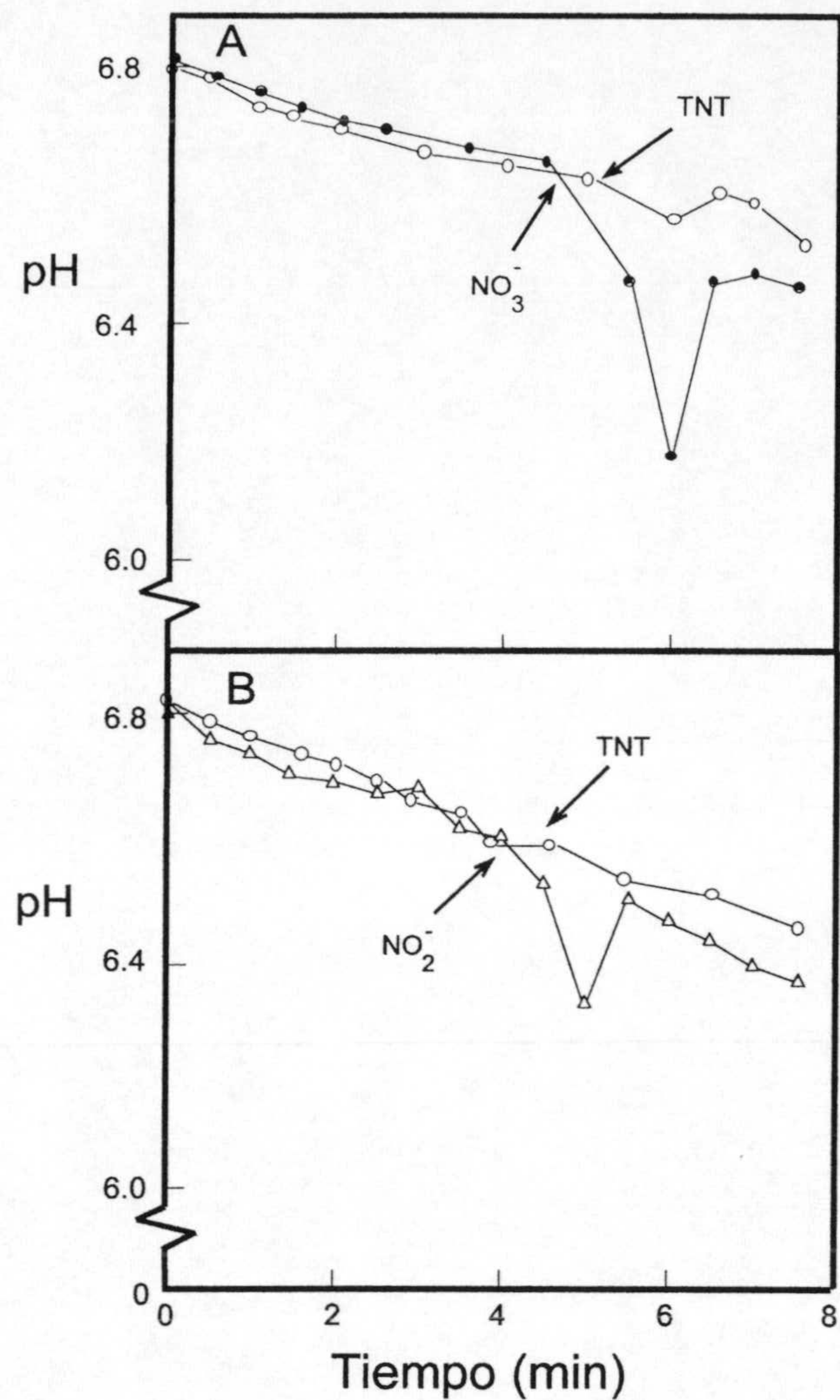
**Figura 45.** Translocación de protones por *Pseudomonas* sp. JLR11 dependiente de TNT en condiciones anóxicas. Las condiciones de cultivo y ensayo se han descrito en el texto. Las variaciones en el pH se registraron a través de un pHmetro como se describió en la sección *Materiales y Métodos*. Los medios ensayados fueron: células activas en 150 μM de TNT en sorbitol (línea continua), células activas en sorbitol (línea discontinua) y células inactivadas (incubación de 5 minutos en un termobloque a 100°C) en 150 μM de TNT en sorbitol (línea punteada).

Para comprobar la especificidad del sistema de extrusión de protones, se ensayó la respuesta de las células en presencia de otros aceptores de electrones, mostrándose los resultados obtenidos en la figura 46. Para ello, la bacteria se cultivó en reactores de 100



ml en condiciones anóxicas con acetato, amonio y como aceptor de electrones se ensayó TNT, 0,5 mM; nitrato, 2 mM y nitrito, 2 mM. Las células se recogieron en la fase exponencial de crecimiento y se procesaron como se describió en experimentos anteriores para determinar la extrusión de protones. Los ensayos de respiración con las células cultivadas con nitrato como aceptor de electrones, se llevaron a cabo en presencia de 150  $\mu$ M de TNT ó nitrato. Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.2.2A y se observó que con nitrato, la bajada del pH extracelular fue mucho más pronunciada que la producida en respuesta a TNT, que fue casi inapreciable. Con células cultivadas con 2 mM de nitrito, como aceptor de electrones, se observó una translocación de protones en respuesta a la adición de nitrito pero no de TNT. De la misma forma, suspensiones de células de *Pseudomonas* sp. JLR11 cultivadas con TNT como aceptor de electrones fueron incapaces de translocar protones en incubaciones con nitrito. Estos resultados sugieren la existencia de distintas enzimas como donadores finales de electrones en las cadenas respiratorias que permiten el uso de nitrato, nitrito y TNT como aceptor final de electrones.





**Figura 46. Translocación *in situ* de protones en condiciones anóxicas en respuesta a distintos aceptores de electrones.** Células de *Pseudomonas* sp. JLR11 se cultivaron en anaerobiosis con acetato, 10 mM; amonio, 5 mM y 2 M de nitrato (panel A) y nitrito (panel B). La acidificación del medio extracelular se determinó en un *respirómetro* como se describió en el apartado 14 de la sección *Materiales y Métodos*. En el panel A, se representa los cambios de pH de una solución de sorbitol con concentración 150  $\mu\text{M}$  de nitrato (círculo cerrado) o TNT (círculo abierto). En el panel B, se muestran ensayos a concentraciones 150  $\mu\text{M}$  de nitrito (triángulo abierto) o TNT (círculo abierto) con células cultivadas con nitrito como aceptor de electrones.



### 3. Síntesis *in vitro* de ATP acoplada a la reducción de TNT en vesículas de *Pseudomonas* sp. JLR11

Para comprobar si la translocación de protones, detectada en el apartado anterior estaba acoplada a la síntesis de ATP, se diseñaron ensayos *in vitro* con vesículas de membranas preparadas partir de células de *Pseudomonas* sp. JLR11. Las bacterias se cultivaron en reactores de 2 litros en condiciones anóxicas con acetato, 10 mM; amonio, 5 mM y TNT como aceptor de electrones. La preparación de las vesículas se realizó como se describió en el apartado 15 de la sección *Materiales y Métodos*. Los ensayos de fosforilación *in vitro* (descritos en el apartado 16 de *Materiales y Métodos*) mostraron que las vesículas catalizaron la reducción de TNT con H<sub>2</sub> como donador de electrones y acoplado a este sistema de oxido-reducción se produjo la síntesis de ATP (450 nmoles/mg proteína). Como control se utilizó una alícuota de vesículas incubadas 100°C durante 5 minutos, en este caso no se observó reacción de fosforilación. Se realizaron ensayos *in vitro* en ausencia de TNT, encontrándose que la fosforilación fue del orden del 15% del detectado en presencia del nitroaromático. No se observó síntesis alguna de ATP cuando la preparación de membranas fue incubada con gramicidina, un desacoplante de la fosforilación oxidativa, con anterioridad a la adición de TNT. Si a la mezcla de reacción no se le proporcionaba ADP, la presencia de ATP fue indetectable. Los resultados de estos ensayos se presentan en la Tabla 3.1.



Tabla 3.1 Fosforilación acoplada a la oxidación de H<sub>2</sub> y reducción de TNT *in vitro*.

Mezcla de reacción <sup>a</sup>	ATP (nmol/mg proteína)
completa	450
sin ADP	0
sin TNT	60
Sin H <sub>2</sub> <sup>b</sup>	45
membranas inactivadas a 100°C	4
con gramicidina <sup>c</sup>	0

<sup>a</sup> La mezcla de reacción fue la descrita en el apartado 16 de la sección *Materiales y Métodos* y se incubó con 100 µg proteína/ml a 30°C bajo atmosfera de H<sub>2</sub>.

<sup>b</sup> La atmósfera de H<sub>2</sub> fue sustituida por N<sub>2</sub>.

<sup>c</sup> Las membranas se incubaron con 2 ml de la mezcla de reacción a la que se adicionó gramicidina (4 µl de una solución 50 mM en MeOH).

Como muestra la figura 47, la síntesis *in vitro* de ATP por las vesículas fue proporcional a la cantidad de proteína utilizada en el ensayo, obteniéndose una actividad específica de 270 y 252 nmoles ATP/mg proteína para ensayos con 200 y 400 µg proteína/ml respectivamente, lo que prueba la naturaleza enzimática del fenómeno.

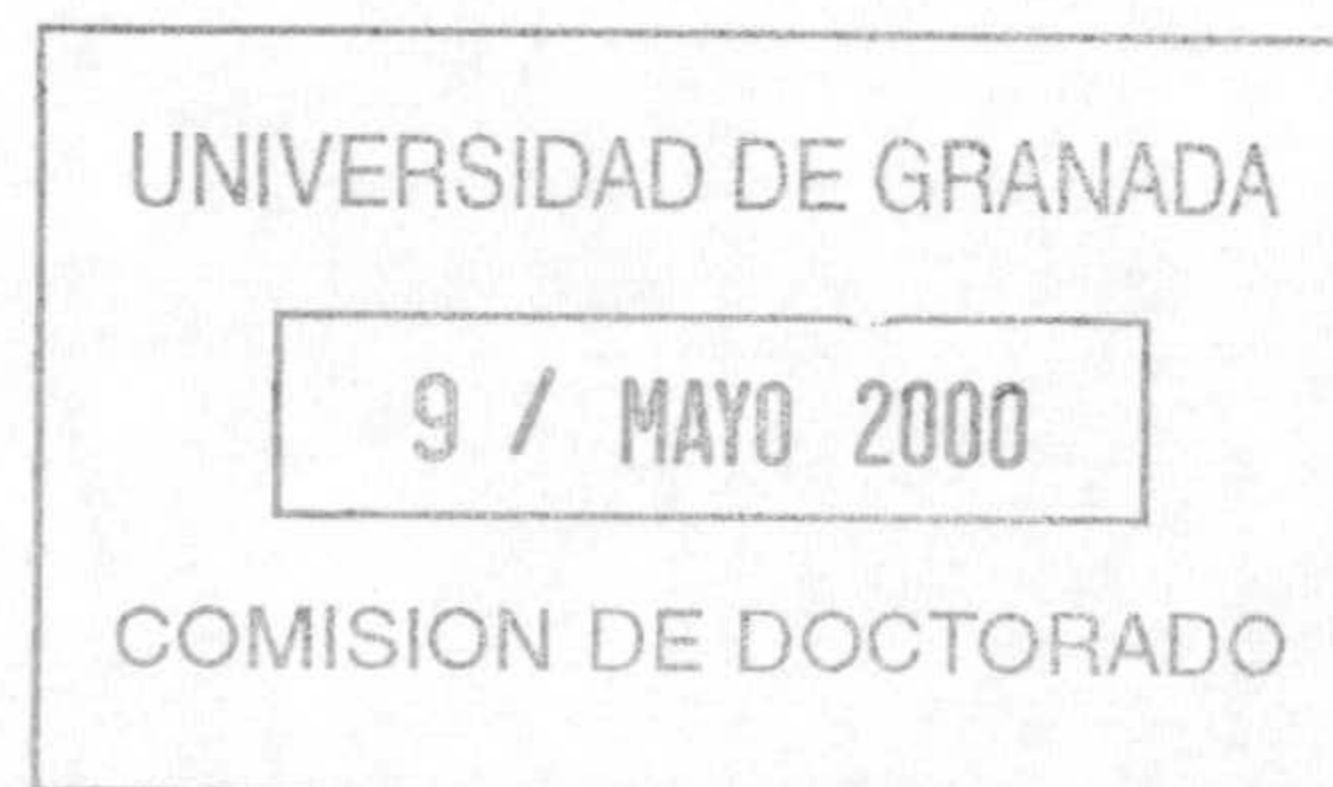
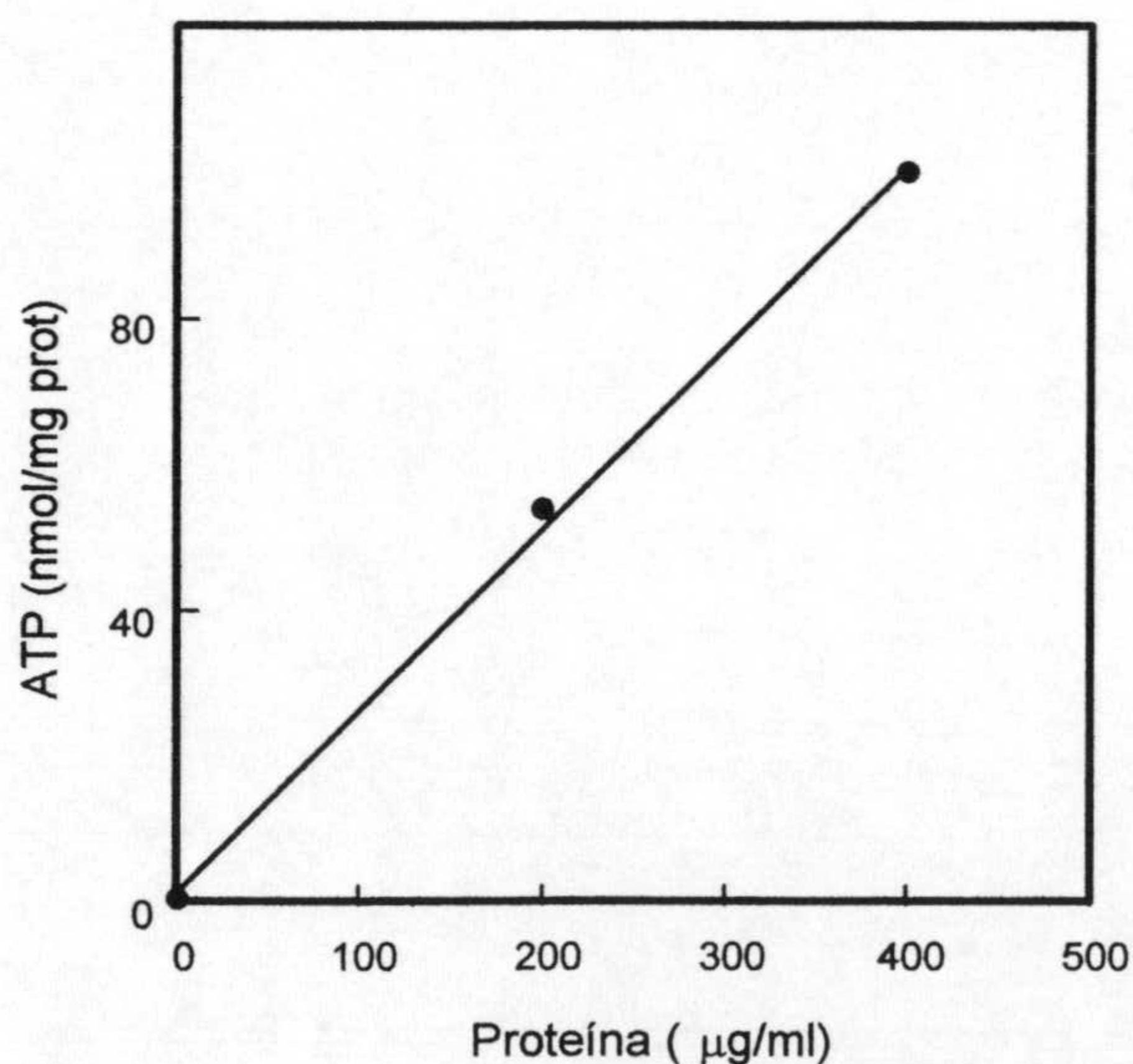


Figura 47. Relación entre la síntesis de ATP y la cantidad de proteína. Se ensayaron suspensiones de vesículas con tres cantidades de proteína 0, 200 400 µg proteína/ml.



Para comprobar la especificidad del sistema se ensayó la actividad fosforilante de vesículas, obtenidas de células cultivadas con TNT como aceptor de electrones, con otros aceptores (nitrato, nitrito). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.2, observándose una síntesis preferencial de ATP *in vitro* cuando se ensayó la actividad fosforilante con el sistema H<sub>2</sub>-TNT respecto al acoplamiento con otros sistemas.

**Tabla 3.2 Actividad fosforilante acoplada a distintos sistemas de oxido-reducción.**

Sistema donador-aceptor de e <sup>-</sup>	Síntesis de ATP (%)
H <sub>2</sub> -TNT	100
H <sub>2</sub> -Nitrato	10
H <sub>2</sub> -Nitrito	39

Las condiciones fueron las descritas en el pie de la tabla 3.1, excepto las concentraciones de nitrato y nitrito que fueron de 0,5 mM.



## Discusión



El TNT es el contaminante nitroaromático más extendido en ambientes naturales. En la *Introducción* de esta tesis, se hace referencia a su toxicidad y al problema ambiental que supone su presencia en suelos y aguas subterráneas.

Su peculiar estructura química hace que su metabolismo sea diferente al de otros compuestos nitroaromáticos; la investigación sobre los mecanismos de degradación anaerobia de TNT permitió dos enfoques, uno el de aplicar tratamientos biológicos para solucionar problemas ambientales reales (aguas residuales, acuíferos y suelos contaminados); y otro, el de profundizar en los procesos metabólicos que permiten a las bacterias anaerobias convertir a este compuesto tóxico y mutagénico en un buen sustrato de crecimiento. A continuación, se analizarán los resultados experimentales obtenidos, tratando aclarar, en lo posible, los mecanismos bioquímicos utilizados por *Pseudomonas sp.* JLR11 para degradar, en condiciones anaerobias, el explosivo TNT.

### **I. El aislamiento y la caracterización de *Pseudomonas sp.* JLR11**

En nuestro grupo de trabajo se han aislado, desde hace más de diez años, microorganismos atendiendo a sus capacidades degradadoras sobre diversos contaminantes orgánicos (tolueno, nitroaromáticos, nitroglicoles, aromáticos con grupos metoxilo, etc.), e inorgánicos (nitrato y nitrito). Las fuentes naturales de las que se han aislado estos microorganismos han sido diversas y no siempre mostraban la presencia de los contaminantes que se deseaba degradar. Así, bacterias capaces de degradar TNT y nitrato fueron aisladas de áreas contaminadas con estos compuestos (Duque *et al.*, 1993; Ramos *et al.*, 1996; Piñar, G. 1998). Así, en el caso del TNT, Duque y colaboradores (1993) aislaron una cepa del género *Pseudomonas* de suelos de una



fábrica de producción de explosivos en Burgos, con un historial de vertidos accidentales de las aguas de lavado de los tanques de producción de TNT. Por el contrario, a partir de otros ambientes que aparentemente no entraron en contacto con contaminantes, se aislaron bacterias, no sólo capaces de degradar compuestos como tolueno (Ramos *et al.*, 1995; Huertas *et al.*, 1999), acrilonitrilo (Vilchez *et al.*, 1997) o nitrotoluenos, sino que presentaban mecanismos efectivos para tolerar altas concentraciones de estos compuestos (Ramos *et al.*, 1997; Segura *et al.*, 1999). El propio microorganismo objeto de estudio en esta Tesis, fue aislado por el Dr. Ramos de una planta de tratamiento de aguas residuales. El hecho de que se puedan aislar microorganismos, con ciertas capacidades metabólicas sobre xenobióticos, de nichos que no han sido expuestos al contaminante, da muestra de la versatilidad metabólica existente entre las bacterias; sin necesidad de contradecir a aquellos que opinan que las capacidades degradadoras de los microorganismos son “potenciadas” por la presencia de xenobióticos. Aunque no cabe duda que la capacidad de utilizar un xenobiótico como nutriente en un nicho limitado en nutriente, representaría una ventaja selectiva para la colonización de ambientes contaminados.

El estudio de la degradación de TNT en condiciones anaerobias, requería el aislamiento de un microorganismo capaz de ser cultivable y de metabolizar el nitroaromático en ausencia de oxígeno. El trabajo con microorganismos anaerobios presenta dificultades en cuanto a su manejo en el laboratorio; algunos de ellos son anaerobios estrictos y requieren condiciones de anoxia absoluta, al ejercer el oxígeno un efecto tóxico. Otro grupo de microorganismos, denominados anaerobios facultativos, pueden realizar tanto una respiración aerobia, como adaptarse a ambientes anóxicos mediante procesos fermentativos, respiraciones anaerobias o fotorrespiraciones



anoxigénicas. Los procesos de respiración anaerobia se discutirán en detalle en el apartado 5 de esta *Discusión*.

Nuestro objetivo en el aislamiento del microorganismo se centró en buscar anaerobios facultativos, capaces de ser cultivados con facilidad con las técnicas microbiológicas estándar, y de metabolizar TNT, de forma efectiva, en una atmósfera anóxica. Así, la muestra, de la planta de tratamiento de aguas residuales, no se tomó en condiciones anóxicas, si bien se recurrió a una atmósfera de argón para el aislamiento de bacterias capaces de crecer a partir de TNT como única fuente de nitrógeno. De este proceso se aisló una bacteria del género *Pseudomonas* a la que se denominó JLR11.

En el aislamiento no se detectó ninguna bacteria capaz de crecer a expensas de TNT como única fuente de carbono y nitrógeno; este hecho se recoge en la bibliografía de nitroaromáticos (Esteve-Núñez *et al.*, 2000), en la que no aparece descrita ninguna bacteria capaz de ello, en condiciones aerobias ni anaerobias. La razón parece residir en la estructura química del TNT. Como se recoge en la sección *Introducción*, los grupos nitro presentan un carácter electronegativo que, junto a su disposición simétrica en el TNT, confieren al anillo aromático cierto carácter electrófilo; esto impide el ataque de las oxigenasas, las enzimas responsables de abrir el anillo aromático a través de hidroxilaciones que tienen al oxígeno como sustrato.

Los microorganismos tienen que recurrir a mecanismos reductivos para atacar la molécula de TNT; esto requiere la presencia de un cosustrato que actúe como donador de electrones, tanto en el metabolismo aerobio (Duque *et al.*, 1993; Vorbeck *et al.*, 1994, 1998), como en el anaerobio (Boopathy y Kulpa, 1992; Funk *et al.*, 1993; Preub *et al.*, 1993).

A nuestro juicio, otra razón que puede impedir el uso de TNT como única fuente de carbono y nitrógeno es la razón carbono/nitrógeno (C/N) de la molécula; mientras



que en la mayoría de los microorganismos la razón C/N suele ser de 10, en la molécula de TNT es 2,3. Sin embargo, otros nitroaromáticos como los nitrotoluenos, presentan razones C/N de 7 y sí pueden ser degradados, sin necesidad de cosustratos, por diversos microorganismos (Haigler *et al.*, 1993; Delgado *et al.*, 1994). Además en el caso del TNT, se ha calculado (Preub y Rieger, 1995) que para permitir un crecimiento anaerobio medible en términos de turbidez se requiere, al menos, una concentración de 6 mM (1,36g/l); es decir, una concentración que supera en tres órdenes de magnitud la solubilidad de TNT en agua (100 mg/l).

Por las razones anteriormente citadas, el metabolismo de TNT por bacterias es un proceso cometabólico, que requiere de una fuente adicional de carbono que actúe como donador de electrones, e induzca a las bacterias a degradar el compuesto para satisfacer los requerimientos anabólicos de nitrógeno.

La baja solubilidad del TNT da lugar a que, con la adición del cosustrato, el microorganismo se encuentre limitado en nitrógeno. Esto se pone de manifiesto al observar al microscopio electrónico células de *Pseudomonas sp.* JLR11, cultivadas con TNT, en las que se detectó la acumulación de cuerpos electrodensos con la apariencia típica de gránulos de material de reserva del tipo de los poli- $\beta$ -hidroxialcanoatos (ver Figura I.1b,c). Estos polímeros se suelen acumular en la célula como respuesta a una limitación en nitrógeno u otro nutriente esencial y, en el caso de *Pseudomonas sp.* JLR11, desaparecen cuando las células se cultivan con 10 mM de amonio (ver Figura I.1a). La naturaleza química de estos polímeros se desconoce, aunque parece probable que se haya sintetizado a partir del cosustrato suministrado (glucosa, acetato), aunque no se descarta que tenga su origen en el carbono del anillo aromático del TNT.



## 2. *Pseudomonas* sp. JLR11 degrada eficazmente TNT en condiciones anaerobias.

Como se mencionó al comienzo de esta *Discusión*, uno de las principales fuentes de contaminación con TNT son las aguas residuales generadas en las industrias de producción del explosivo. Uno de los principales objetivos fue comprobar si era viable lograr la degradación significativa de TNT por parte de *Pseudomonas* sp. JLR11, con glucosa como cosustrato. Los estudios metabólicos encaminados a la optimización del proceso se desarrollaron en biorreactores de 2 litros de volumen, en los que parámetros como la temperatura, el pH y la agitación fueron controlados durante todo el tratamiento biológico.

Con este tipo de reactores, operando en estanco, las condiciones óptimas fueron (30°C, pH 7 y 600 rpm). En estas condiciones se obtuvo un consumo de 0,6  $\mu$ mol TNT por día y mg de proteína celular; lo que llevó a una eliminación del 90% del TNT en los primeros siete días, quedando únicamente un 1% tras 20 días de tratamiento (ver Figura 24).

Al término del tratamiento biológico, el análisis del sobrenadante del cultivo por HPLC reveló la ausencia de azoxinitrotoluenos (ver Figura 23), demostrando que las condiciones de anoxia son necesarias para evitar la formación *in vivo* de este tipo de compuestos, como había sido sugerido por Haïdour y Ramos (1996).

Con la degradación de TNT se acumularon, en el sobrenadante de los cultivos, aminas aromáticas procedentes del metabolismo reductivo del TNT, que suponían entre un 10 y un 15% de la concentración de TNT inicial. El origen de estas aminas aromáticas y su significado fisiológico se describe más detalladamente en el apartado 5 de esta *Discusión*.

El balance de nitrógeno realizado sobre el proceso de degradación de TNT mostró como el 85% del nitrógeno del nitroaromático fue incorporado como nitrógeno



orgánico en las células, lo que representó una eficiente conversión del contaminante en material celular. Hasta la fecha, éste constituye el primer balance de nitrógeno del TNT en un tratamiento biológico; esto fue posible al no requerirse la adición de fuentes de nitrógeno adicionales (amonio, extracto de levadura).

En el proceso de degradación de TNT, *Pseudomonas sp.* JLR11 alcanza niveles de crecimiento bajos; los cultivos en reactores, en escasas ocasiones, superaron valores de turbidez de 0,3 (DO<sub>660</sub>). Este crecimiento limitado no debe interpretarse como una limitación en la eficiencia del metabolismo del nitroaromático, sino que responde al diferente rendimiento energético que el metabolismo anaerobio presenta respecto al aerobio. El rendimiento en la producción de ATP en aerobiosis a partir de glucosa es mayor que en ausencia de oxígeno; esto hace que un microorganismo anaerobio tenga que consumir mayores cantidades de sustrato para obtener la energía necesaria para desarrollar sus actividades vitales y producir biomasa. A esto hay que añadir la baja solubilidad del TNT que limita la disponibilidad de nitrógeno. Esta limitación en la producción de biomasa representa, sin embargo, una ventaja añadida, en los tratamientos biológicos de TNT. La elevada producción de biomasa generada en los tratamientos biológicos aerobios crea problemas medioambientales, a la vez que agrava económicamente el proceso. Esta biomasa debe ser separada, al final del proceso, mediante floculantes y posteriormente eliminada.

### **3. Elucidación de la ruta catabólica anaerobia de TNT por *Pseudomonas sp.* JLR11**

Una vez quedó demostrada la degradación de TNT por parte de *Pseudomonas sp.* JLR11, se abordó el estudio de la ruta catabólica que dicha cepa utilizaba para metabolizar el nitroaromático.

La primera estrategia que se siguió fue el análisis de los compuestos aromáticos, generados en el metabolismo del TNT, que se acumulaban en los sobrenadantes de los



cultivos anaerobios. Los primeros análisis por HPLC, revelaron la presencia de compuestos aromáticos de muy diferente polaridad. Esto era previsible por el número y la naturaleza química de los sustituyentes en el anillo aromático del TNT (ver La química del TNT en la sección *Introducción*). Así, la reducción de los grupos nitro a intermediarios hidroxilamina o amina, daría lugar a múltiples isómeros; la oxidación del grupo metilo produciría los derivados del alcohol bencílico, benzaldehído y ácido benzoico, incrementando el número de posibles productos de mayor polaridad que la molécula original. Esto hizo que se requiriera más de un método de HPLC para la separación de todos los metabolitos (ver figura 29).

La caracterización de los distintos metabolitos, mediante GC-EIMS y RMN-<sup>1</sup>H, requirió extraerlos de los sobrenadantes de los cultivos. Estas extracciones se hicieron mediante extracciones líquido-líquido o en fase sólida. Si bien el primer método resultó eficaz, el uso de disolventes con este propósito está desaconsejado por los grandes volúmenes que se requieren. Las agencias medioambientales recomiendan, cuando sea posible, el uso de la extracción en fase sólida, técnica en la que se utiliza un volumen de disolvente 1000 veces menor, reduciendo el impacto ambiental producido por el uso abusivo de estos compuestos. En nuestro caso, el uso del relleno OASIS, resultó eficiente en la extracción de metabolitos con distinta polaridad. En el análisis de compuestos generados por el metabolismo anaerobio, la extracción en fase sólida ofrece la ventaja de permitir extracciones de estos compuestos en una atmósfera libre de oxígeno (campana de anaerobiosis), evitando así la descomposición de metabolitos sensibles al oxígeno.

Caracterización de los metabolitos aromáticos generados en la degradación anaerobia del TNT por *Pseudomonas sp.* JLR11, sugirió la presencia de un mecanismo diferente al descrito hasta este momento y que se recoge ampliamente en el apartado 4.2



de la *Introducción*. El triaminotolueno (TAT), postulado como el metabolito clave en la degradación anaerobia de TNT (Funk *et al.*, 1993; Preub *et al.*, 1993; Ederer *et al.* 1997), no se detectó en ningún momento en cultivos de *Pseudomonas sp.* JLR11, ni en suspensiones celulares incubadas con TNT.

Recientemente, el papel del TAT ha sido cuestionado por Hawari y colaboradores (1998), quienes consideran a este compuesto más un subproducto que un metabolito productivo para la célula. El hecho de que exista cierta controversia sobre la forma en la que el nitrógeno del TAT es liberado (Funk *et al.*, 1993; Preub *et al.*, 1993 y Rieger, 1995), deja abierta la posibilidad de que existan otros mecanismos a través de los cuales las bacterias anaerobias puedan utilizar la molécula de TNT como fuente de nitrógeno.

La acumulación transitoria de nitrito (ver Figura 24) en el metabolismo anaerobio de TNT por *Pseudomonas sp.* JLR11, sugiere que la asimilación del nitrógeno del TNT en esta cepa parece tener lugar a través de la eliminación de los grupos nitro en forma de nitrito.

La detección *in vivo* (ver figura 39a) e *in vitro* (ver figura 41a) de la actividad nitrito reductasa en células cultivadas en TNT, confirmó el posible papel del nitrito como intermedio en la conversión del nitrógeno del TNT en nitrógeno celular. El metabolismo del nitrito por *Pseudomonas sp.* JLR11 se tratará en detalle en el apartado 4 de esta *Discusión*.

Se desconoce el mecanismo por el que los grupos nitro son liberados de la molécula de TNT en condiciones anaerobias. En presencia de oxígeno, este mecanismo ocurre a través de la formación de un complejo de Meisenheimer (Vorbeck *et al.*, 1994; Haïdour y Ramos, 1996; French *et al.*, 1998). Este complejo tiende a perder un grupo nitro, en forma de nitrito, para estabilizarse y recobrar su carácter aromático

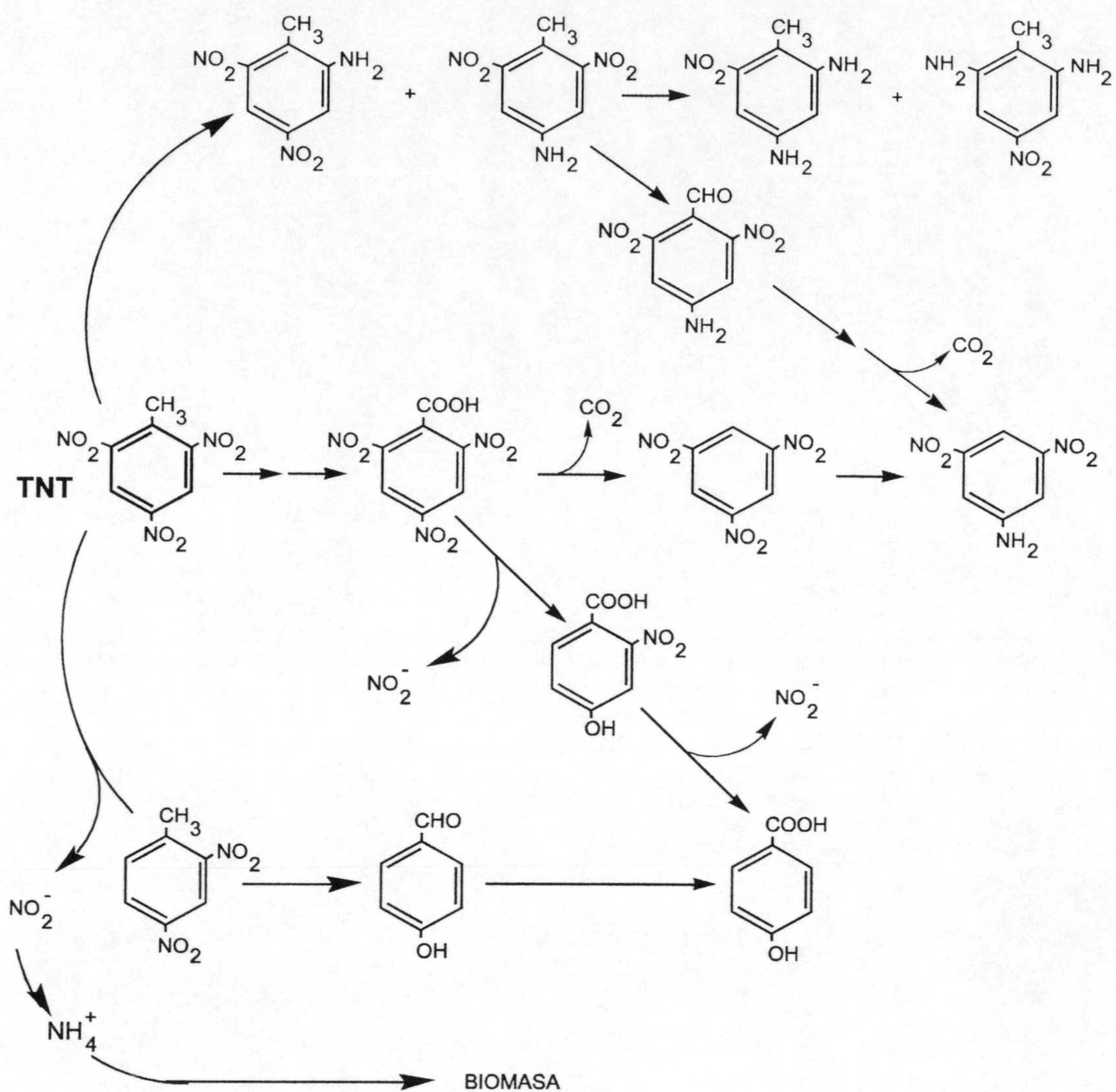


dinitrotolueno (ver figura 6) como La formación de este tipo de complejos requiere un mecanismo reductivo sobre la molécula de TNT, pudiendo producirse la reacción en ausencia de oxígeno (Haïdour y Ramos, 1996). Esto haría posible la participación de estos complejos de Meisenheimer en el metabolismo anaerobio de TNT, sin embargo en este trabajo no se han obtenido datos que lo apoyen.

Entre los metabolitos detectados, se encuentran aromáticos hidroxilados en posiciones ocupadas por grupos nitro en la molécula de TNT. Esto sugiere que se pueden producir sustituciones nucleófilas, en las que el grupo nitro fuera sustituido por un hidroxilo. Otra posibilidad es que dichas hidroxilaciones se produjeran directamente sobre el anillo, tras la eliminación reductiva de los grupos nitro, a través de los mencionados complejos de Meisenheimer, pero este tipo de reacción no se ha descrito en el metabolismo del TNT. Con independencia del mecanismo molecular de eliminación del grupo nitro, y basándonos en el conjunto de metabolitos caracterizados proponemos la ruta catabólica ilustrada en la figura 48.

La ruta presenta dos ramas principales. En una de ellas se producen aminas aromáticas, tras la reducción de los grupos nitro, las cuales se acumulan en el medio de cultivo. La producción anaerobia de estos compuestos se tratará en detalle en el apartado 5 de esta *Discusión*. La otra rama de la ruta corresponde al metabolismo productivo mediante el que la bacteria utiliza el nitrógeno del TNT. La presencia de compuestos como el *p*-hidroxibenzaldehído y el ácido *p*-hidroxibenzoico evidencian la capacidad de la bacteria para eliminar la totalidad de los grupos nitro del TNT, transformándolo en compuestos menos recalcitrantes.





**Figura 48. Ruta metabólica propuesta para la degradación anaerobia de TNT por *Pseudomonas sp. 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- $^1\text{H}$ .

La oxidación de la cadena lateral metilo podría ocurrir con anterioridad a la eliminación de los grupos nitro, ya que se detectó el 4-amino-2,6-dinitrobenzaldehído y el trinitrobenzaldehído. Estos compuestos podrían ser oxidados, hasta los



correspondientes derivados del ácido benzoico, y posteriormente descarboxilados para formar trinitrotolueno y 3,5-dinitroanilina, compuestos que son detectados en los sobrenadantes de los cultivos. El papel fisiológico, si existe, de esta decarboxilación se desconoce; no obstante conviene señalar que la decarboxilación del ácido benzoico en anaerobiosis se ha relacionado con la formación de ATP (Gallert y Winter, 1994).

A excepción de las aminas aromáticas (4-ADNT y 2-ADNT), el resto de los compuestos no se acumula de una forma significativa, requiriéndose su extracción del medio acuoso para poder detectarlos, indicando que en los medios de cultivo estuvieron presentes en concentraciones bajas. Es decir, tras el proceso de degradación de TNT, en los sobrenadantes de los cultivos tan sólo se detectaron compuestos aromáticos que supondrían el 15% del nitroaromático original. Esto sugería que *Pseudomonas sp.* JLR11, al menos, hubiera sido capaz de abrir el anillo aromático tras la eliminación de los grupo nitro. El análisis del espectro de absorbancia de cromatogramas de HPLC no detectó la acumulación apreciable de compuestos lineales en los medios de cultivo, tras la eliminación de TNT, por lo que podría haber tenido lugar incorporación de parte del esqueleto carbonado del anillo en material celular. Con el objeto de comprobar si en el proceso de degradación del nitroaromático se producía la mineralización del anillo aromático, se recurrió al uso de  $^{14}\text{C}$ -TNT. Los experimentos de degradación en reactores mostraron que tan sólo un 1% de  $^{14}\text{C}$ -TNT fue detectado como  $^{14}\text{CO}_2$ , mientras que un 45% se encontró asociado al material celular precipitable por ácido tricloroacético; y el 15% permaneció en los sobrenadantes de los cultivos principalmente en forma de aminas aromáticas. (ver Figura 26). El resto del  $^{14}\text{C}$ , no se recogió cuantitativamente y podría estar asociado a compuestos volátiles, desplazados por la corriente de nitrógeno que pasaba a través del reactor, que no quedarían retenidos en la disolución de NaOH que actuaba como trampa para el  $\text{CO}_2$ . Esta producción de volátiles ha sido ya propuesta



por Crawford (1995) al encontrar una distribución similar de la radioactividad en la degradación anaerobia de  $^{14}\text{C}$ -TNT por una cepa de *Clostridium*. Sin embargo, ni Crawford ni en este trabajo se han obtenido evidencias concluyentes para esta hipótesis, siendo un área en la que se investiga actualmente en el grupo de Granada.

El escaso nivel de  $^{14}\text{CO}_2$  detectado tras el metabolismo de  $^{14}\text{C}$ -TNT por *Pseudomonas* sp. JRL11, no contradice el que se produzca la degradación del anillo aromático. Vanderberg y colaboradores (1995) describieron una cepa de *Mycobacterium vaccae* capaz de metabolizar TNT en presencia de propano como fuente de carbono y energía; aunque no se detectó la mineralización del nitroaromático, el 50% de la radioactividad asociada al anillo de  $^{14}\text{C}$ -TNT se incorporó a la fracción de lípidos polares de la célula, lo que indicó la apertura del anillo aromático, y la incorporación de éste en material celular. En un reciente estudio se ha descrito una situación opuesta como es la mineralización de 1,4-dioxano en presencia de THF por un consorcio microbiano sin caracterizar. En este caso, cerca del 86% del  $^{14}\text{C}$ -dioxano apareció como  $^{14}\text{CO}_2$ , sin que tuviera lugar incorporación significativa del sustrato en material celular. Quedan, por tanto, abiertas nuevas rutas en la eliminación de contaminantes en anaerobiosis

Si bien son necesarios más experimentos para asegurar la incorporación del carbono del TNT al material celular, el hecho de que *Pseudomonas* sp. JLR11 sea capaz de utilizar en anaerobiosis el ácido p-hidroxibenzoico como fuente de carbono, hace que la degradación completa del TNT sea factible. Este compuesto hidroxiaromático es uno de los compuestos detectados en el metabolismo anaerobio de TNT, y en la célula es transformado en benzoil-CoA, el metabolito clave en la degradación anaerobia de compuestos aromáticos (ver apartado 2.1 de la *Introducción*)

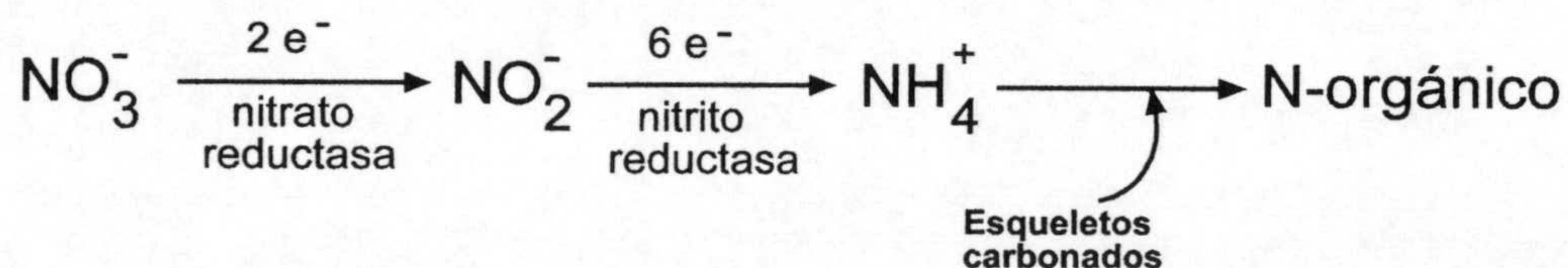


#### 4. El metabolismo del nitrito en la degradación de TNT por *Pseudomonas* sp. JLR11

Los análisis de los sobrenadantes de cultivos de *Pseudomonas* sp. JLR11 con TNT como fuente de nitrógeno, detectaron la acumulación transitoria de nitrito.

El metabolismo asimilatorio de nitrito en bacterias está asociado al del nitrato, y los genes implicados así como su regulación son conocidos en diversos géneros bacterianos.

En términos generales, el nitrato es utilizado como fuente de nitrógeno a través de la reducción de nitrato a nitrito con una transferencia de 2 electrones mediado por la nitrato reductasa asimilatoria, y una posterior reducción de nitrito a amonio en una reacción en la que la nitrito reductasa asimilatoria transfiere 6 electrones (Guerrero *et al.*, 1981). Posteriormente, el amonio es incorporado al metabolismo central de las bacterias mediante la glutamato sintetasa o la glutamina sintetasa/glutamato sintasa, que generan ácido glutámico y glutamina, respectivamente; estos aminoácidos son precursores directos de proteínas, además de actuar como donadores de grupos amino y amido a todos los precursores nitrogenados de macromoléculas celulares (Merrick y Edwards, 1995). La ruta asimilatoria puede esquematizarse de la siguiente forma:



La síntesis de las enzimas asimilatorias de nitrato es independiente de la disponibilidad de oxígeno, por lo que pueden ser utilizadas por bacterias tanto en aerobiosis (Nakano *et al.*, 1995; Ogawa *et al.*, 1995) como en anaerobiosis (Piñar,



1998). Su síntesis se encuentra inducida por la limitación de amonio a través de la proteína NTRC (Bender y Friedrich, 1990; Moreno-Vivián *et al.*, 1999), y por la presencia de nitrato o nitrito a través de la proteína NASR (Goldman *et al.*, 1994), que actúa como un antiterminador de la transcripción.

*Pseudomonas sp.* JLR11 fue capaz de utilizar nitrato y, por tanto nitrito, como fuente de nitrógeno tanto en condiciones aerobias como anaerobias. El ensayo para determinar la actividad nitrito reductasa *in vitro* se optimizó utilizando NADH y metilviológeno como donadores artificiales de electrones. Esta actividad se detectó en geles nativos en los que se habían separado proteínas de células cultivadas con TNT como única fuente de nitrógeno. La banda de la proteína que mostró actividad, comigró con la nitrito reductasa de células cultivadas en nitrito (ver Figura 35). Esto representó la primera prueba bioquímica de que el metabolismo de nitrito se encuentra asociado a la degradación anaerobia de TNT. La actividad nitrito reductasa se detectó igualmente en cultivos aerobios de *Pseudomonas sp.* JLR11 en medios con nitrito o TNT, lo que sugiere la presencia de un mismo mecanismo que resulta funcional con independencia de la presencia o ausencia de oxígeno. La prueba definitiva sobre el papel del nitrito en el metabolismo del TNT, se estableció mediante la obtención de mutantes por inserción al azar de miniTn5-telurito. Este minitransposón, diseñado por Sanchez-Romero y de Lorenzo (1998), resultó de gran utilidad ya que *Pseudomonas sp.* JLR11 se mostró resistente a los antibióticos usuales (ver Tabla I.1) para los marcadores de los miniTn5 (de Lorenzo y Timmis, 1994). El miniTn5-telurito contiene el operón *kilAtelAB*, que confiere resistencia a telurito potásico.

La selección de mutantes con esta inserción se hizo en presencia de oxígeno, por la facilidad para crecer las bacterias y dado que el metabolismo del nitrógeno del TNT parecía ser independiente de la presencia de oxígeno. Se encontró un transconjugante



incapaz de crecer con TNT o nitrito como fuentes de nitrógeno. Esta ausencia de crecimiento se detectó tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (ver Figura 37). Se descartó un posible efecto de sensibilidad a TNT o nitrito, ya que el uso de una fuente de nitrógeno adicional, como amonio, permitía el crecimiento de la cepa mutante, si bien se detectó una fase de latencia respecto a la cepa silvestre.

Ensayos *in vivo* e *in vitro* con el mutante aportaron información sobre el metabolismo del nitrito en la degradación del TNT. A diferencia de la cepa silvestre, las suspensiones celulares de la cepa mutante, cultivada en anaerobiosis con TNT fueron incapaces de reducir nitrito (ver Figura 39A). Suspensiones de células cultivadas, en medios donde la reducción de nitrito no se encontraba inducida (ver Figura 39B), se incubaron en medios con nitrito y se observó cómo la cepa silvestre tardaba 1 hora en comenzar a reducir nitrito, mientras que la cepa mutante no llegó a hacerlo tras 3 horas de incubación.

Ensayos con suspensiones celulares incubadas en medios con TNT mostraron la acumulación progresiva de nitrito hasta alcanzar una concentración de 40  $\mu\text{M}$  en las incubaciones con la cepa mutante, mientras que, en el caso de la cepa silvestre, se detectó una acumulación de nitrito 10 veces menor (ver Figura 40). Estos ensayos prueban cómo *Pseudomonas* sp. JLR11 elimina los grupos nitros del TNT en forma de nitrito, que es reducido por la cepa silvestre pero que se acumula en el caso de la cepa mutante al ser incapaz de reducirlo y utilizarlo como fuente de nitrógeno.

Los resultados anteriores sugerían que, en el mutante P12E2, la inserción del miniTn5 hubiera interrumpido genes implicados en el metabolismo del nitrito, y por tanto no se produciría la reducción de nitrito a amonio, impidiendo el crecimiento de la bacteria. Una mutación en la nitrito reductasa fue descartada, al detectarse la actividad



nitrito reductasa en geles nativos, tras analizar las proteínas de la fracción soluble de la cepa mutante cultivada en presencia de TNT o nitrito (ver Figura 41A).

La actividad hidroxilamina reductasa por parte de la enzima nitrito reductasa había sido detectada por Vega y colaboradores (1990). Para comprobar si la nitrito reductasa del mutante P12E2 seguía siendo funcional en esta actividad, se recurrió al ensayo en geles nativos. Estos mostraron la presencia de esta actividad en una proteína que comigraba con la nitrito reductasa (ver Figura 41B).

Este conjunto de resultados indicaron que la nitrito reductasa se mostró funcional en experimentos *in vitro*, con metilviológeno como donador artificial de electrones, pero que no fue capaz de ejercer *in vivo* la reducción de nitrato a amonio.

La secuencia del ADN, adyacente a la inserción del miniTn5, mostró que el gen de la nitrito reductasa no se encontraba afectado, pero se detectó una ORF, localizada 9 bases aguas arriba de la inserción del miniTn5, cuya secuencia aminoacídica presentaba un 45% de identidad con proteínas con actividad oxido-reductasa. (ver Figura 43). Aunque el minitransposón no haya interrumpido la secuencia, la estrecha distancia (9 bases) entre éste y la ORF puede producir algún efecto a nivel de transcripción o traducción que haga perder la función a la proteína. Atendiendo a la actividad oxido-reductasa, predecible por su secuencia de aminoácidos, presentamos como hipótesis que esta ORF intervenga de una manera indirecta en la reducción de nitrito. Es posible que participe transfiriendo electrones a la nitrito reductasa permitiendo que desarrolle su actividad *in vivo*. En nuestros ensayos *in vitro* sería el metilviológeno el que, con su bajo potencial redox, desempeñaba el papel de la ORF, haciendo posible detectar la actividad tanto en la cepa silvestre como en la mutante. El posible mecanismo se muestra en la Figura 49.



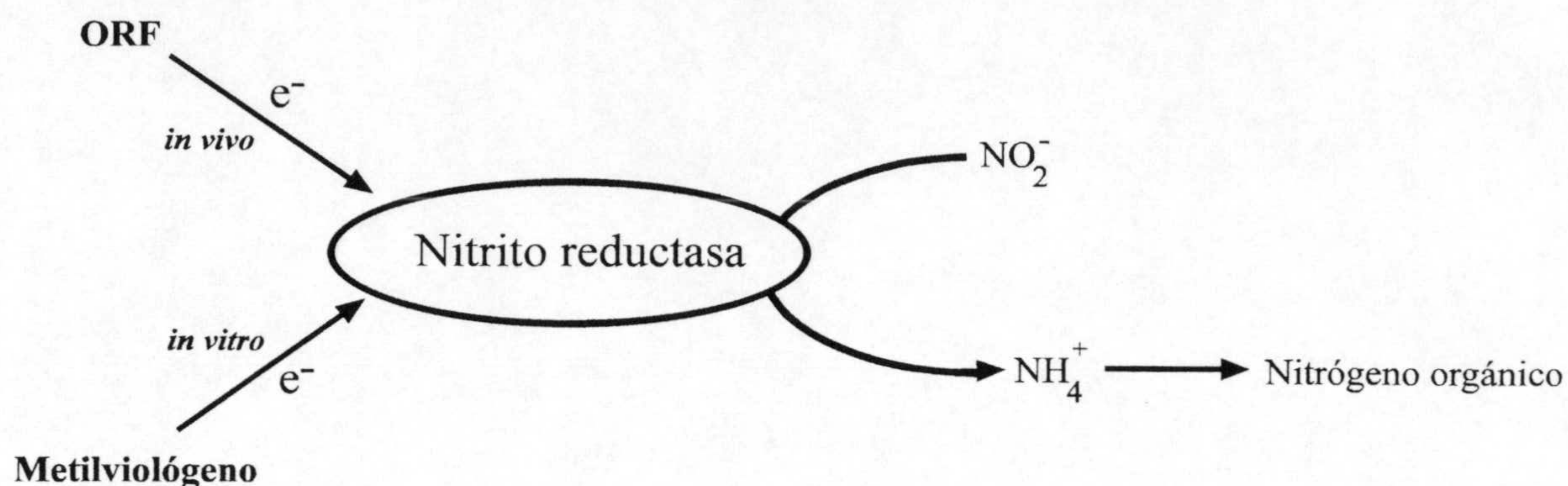


Figura 49. Mecanismo propuesto para la reducción de nitrito *in vivo* e *in vitro* por parte de *Pseudomonas* sp. JLR11

### 5. Respiración de TNT en *Pseudomonas* sp. JLR11

Los sistemas respiratorios celulares permiten la oxidación de una amplia gama de sustratos orgánicos (NADH, succinato, lactato), transfiriendo electrones a diversos aceptores (oxígeno, nitrato, dimetilsulfóxido). Las proteínas asociadas a membrana resultan fundamentales en el acoplamiento redox de estos procesos para generar un gradiente electroquímico (fuerza proton motriz) a través de la membrana citoplasmática. Esta fuerza proton motriz es utilizada por otras proteínas de membrana para realizar funciones de transporte, de movilidad de flagelos y de síntesis de ATP.

Estos principios energéticos son los mismos para los microorganismos aerobios y para algunos anaerobios, y no difieren demasiado de los principios que rigen el fundamento de las mitocondrias en eucariotas (Gennis y Stewart, 1996).

Los microorganismos anaerobios son capaces de vivir en condiciones anóxicas y utilizar sustratos orgánicos e inorgánicos como aceptores de electrones. Los procesos anóxicos de conservación de energía en los que el transporte de electrones se acopla a la síntesis de ATP, se denominan respiraciones anaerobias. Existen otros procesos redox



anóxicos de conservación de energía, denominados fermentaciones, en los que la síntesis de ATP se produce mediante fosforilación a nivel de sustrato y no mediante acoplamiento respiratorio. Mientras que las reacciones de fermentación tienen lugar en el citoplasma, las de respiración se dan en la membrana.

Los procesos respiratorios tienen un control termodinámico, siendo más eficientes cuanto más negativa sea la variación de energía libre del proceso ( $\Delta G$ ). Esta magnitud depende del potencial redox de la especie que actúe como aceptor de electrones, como se muestra en la ecuación:

$$\Delta G = -n F \Delta E_h$$

$n$  = número de electrones

$F$  = constante de Faraday

$\Delta E_h$  = potencial redox

Así, potenciales redox positivos dan lugar a valores de  $\Delta G$  negativos, lo que se traduce en un mejor acoplamiento con la síntesis de ATP. Las respiraciones anaerobias pueden clasificarse en dos grupos: aquellas cuyos aceptores de electrones tienen potenciales positivos (nitrato, nitrito, ion férrico, fumarato, dimetil sulfóxido, óxidos de nitrógeno), y las que tienen aceptores con potenciales negativos (azufre, sulfato, carbonato); las primeras pueden tener llevarse a cabo en anaerobios facultativos como *Pseudomonas*, mientras que las segundas se encuentran tan solo en bacterias anaerobias estrictas. En la Tabla 5.1 se muestran los valores del potencial redox de distintos pares de compuestos que pueden actuar como aceptores de electrones en las membranas de bacterias.

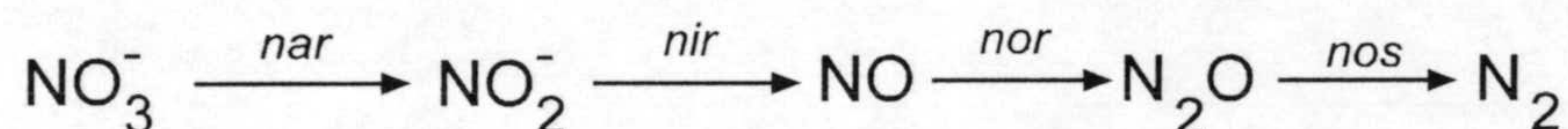


Tabla IV.5.1 Potenciales redox standard a pH 7 de varios aceptores de electrones

Aceptor de electrones	Potencial Redox (V)
O <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O	+ 0,82
Fe <sub>3</sub> <sup>+</sup> /Fe <sub>2</sub> <sup>+</sup>	+ 0,77
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+ 0,43
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO	+ 0,35
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	+ 0,34
DMSO/DMS <sup>a</sup>	+ 0,16
HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /HS <sup>-</sup>	- 0,12
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /CH <sub>4</sub>	- 0,41

<sup>a</sup> DMSO, dimetilsulfóxido; DMS, dimetilsulfuro

El nitrato es, sin duda, el aceptor de electrones mejor estudiado en bacterias Gram negativa como *Pseudomonas*, *Thauera*, *Alcaligenes*, *Paracoccus*, *Hyphomicrobium* y *Thiobacillus*, y en Gram positiva como algunas especies de *Bacillus*. La respiración de nitrato o desnitrificación consiste en la reducción secuencial de nitrato, vía óxidos de nitrógeno, hasta N<sub>2</sub> (Zumft, 1992). El siguiente esquema describe las reacciones sucesivas que tienen lugar, así como la terminología recomendada para el sistema de genes que intervienen en cada paso de la reacción.



La síntesis de las enzimas respiratorias de nitrato es independiente de la disponibilidad de amonio en el medio; y se encuentra inducida, en condiciones anaerobias, a través del regulador Fnr (Zumft, 1997, Vollack *et al.*, 1999) y por la presencia de nitrato o nitrito mediante las proteínas reguladoras Narl y Narp (Schröder



*et al.*, 1992; Stewart, 1994). Adicionalmente, el nitrato reprime la síntesis de la nitrito reductasa respiratoria, y este control se encuentra mediado por la proteína NARL.

La respiración de nitrato no es un mecanismo exclusivo del mundo anaerobio, ya que se han descrito también respiraciones aeróbicas de nitrato; sobre todo en microorganismos facultativos de ambientes sometidos a continuos cambios en la presión de oxígeno (Sabaty *et al.*, 1994).

La similitud entre la estructura química del grupo nitro y el nitrato (ver *Introducción*), y la acumulación de aminodinitrotoluenos en cultivos anóxicos de *Pseudomonas sp.* JLR11 en TNT, nos hizo pensar en la posibilidad de que el TNT pudiera actuar como aceptor final de electrones en la membrana de la bacteria, desempeñando un papel similar al del nitrato en la desnitrificación.

Para comprobar si esto era posible, se cultivó la bacteria, en anaerobiosis, en medio mínimo con TNT y con un cosustrato no fermentativo como el acetato. En este medio la oxidación del acetato requería la presencia de un aceptor de electrones, y el TNT era el único compuesto del medio capaz actuar como tal. La adición de amonio al medio liberó a la molécula de TNT de servir de fuente de nitrógeno, quedando solo destinada a actuar como aceptor de electrones. Ensayos con suspensiones de células, cultivadas en este medio, mostraron la reducción de TNT en 4-amino-2,6-dinitrotolueno (ver figura 44).

Si *Pseudomonas sp.* JLR11 era realmente capaz de respirar TNT, entonces la reducción del grupo nitro a amino en la membrana debía estar acoplada a un fenómeno de translocación de protones al medio extracelular. Esta acidificación del medio se comprobó, en ensayos *in situ*, con células cultivadas en condiciones de respiración de TNT (ver figura 45). Además, se encontró que células cultivadas con nitrato o nitrito como aceptores de electrones no eran capaces de dar lugar a la translocación de



protones cuando se incubaban en medios con TNT (ver figura 46); este hecho indicaba que el sistema de respiración de TNT podía tener cierta especificidad respecto al aceptor de electrones.

En los procesos respiratorios, la translocación de protones al medio extracelular genera un potencial electroquímico de protones, que se acopla a la síntesis de ATP con la ATP sintetasa de la membrana (Junge, W. 1999). Este mecanismo es reproducible *in vitro*, mediante la obtención de vesículas membranosas que presenten intactos los elementos requeridos en la respiración: capacidad de reducir al aceptor de electrones, en presencia del donador adecuado, de generar el gradiente de protones y finalmente de acoplar éste a la síntesis de ATP.

La ruptura de bacterias mediante la prensa de French permite la obtención de la fracción membrana que, de un modo natural, tiende a formar vesículas. Éstas se utilizaron para realizar ensayos *in vitro* de síntesis de ATP acoplada a la reducción de TNT. Como donador de electrones artificial se utilizó H<sub>2</sub>. El sistema se encontró acoplado a la extrusión de protones y a la síntesis de ATP, del que se obtuvo hasta 450 nmol ATP/mg proteína (ver Tabla III.3.1). Con estos resultados presentamos un modelo de respiración *in vivo* de TNT que se ilustra en la 50.

Los sistemas respiratorios están constituidos por módulos (Gennis y Stewart, 1996), lo que supone una ventaja para la célula al permitirle responder a cambios ambientales con las mínimas alteraciones en los integrantes de la membrana. Los resultados encontrados en *Pseudomonas sp.* en cuanto a translocación de protones y síntesis de ATP, sugieren cierta especificidad en uno de estos módulos, probablemente en el responsable de la actividad catalítica de reducción de TNT.



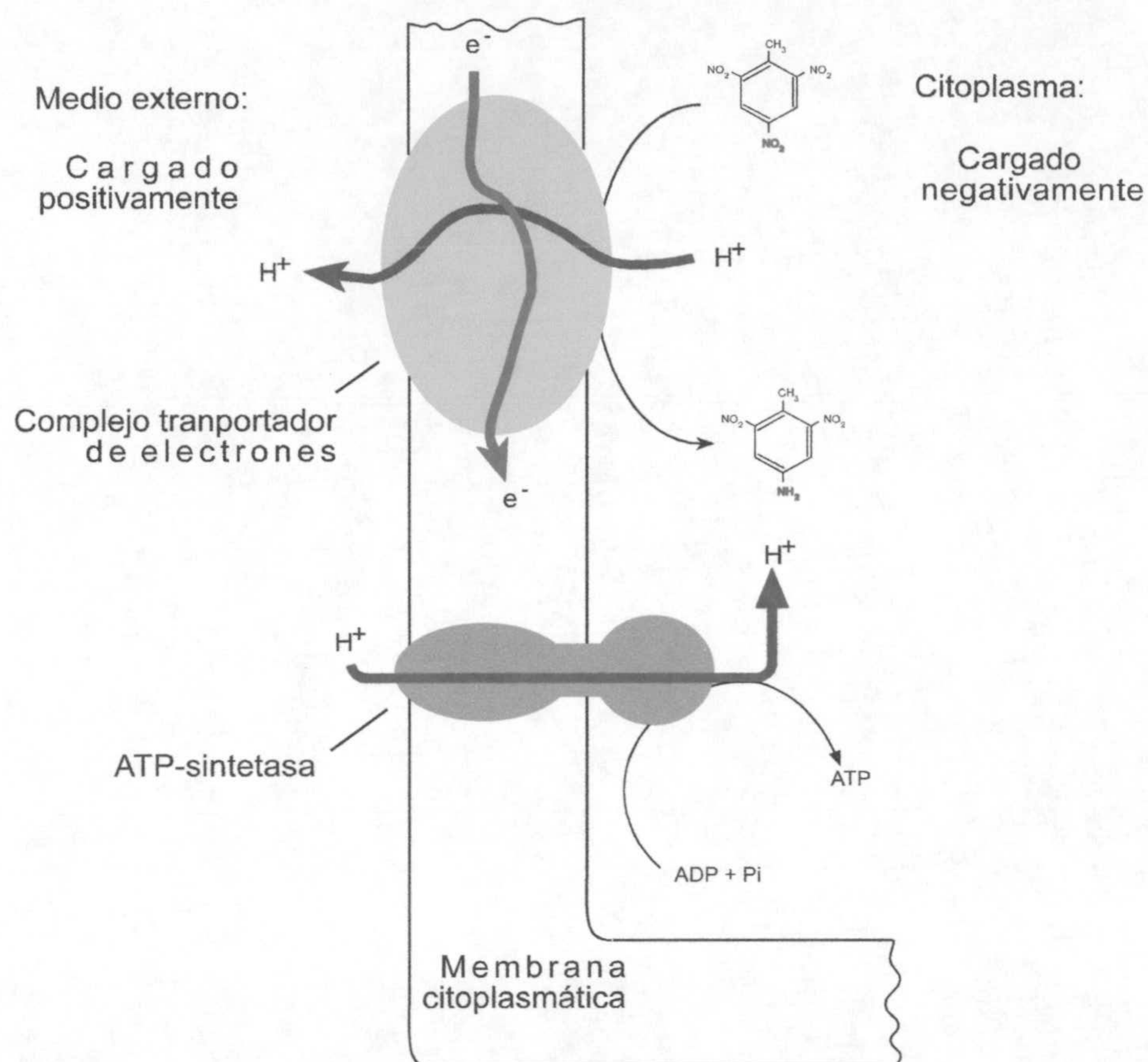


Figura 50. Mecanismo de fosforilación acoplada al transporte de electrones en *Pseudomonas* sp. JLR11, cultivadas en condiciones anóxicas con TNT como aceptor final de electrones.

El hecho de que el TNT pueda actuar como aceptor de electrones en el metabolismo anaerobio de *Pseudomonas* sp. JLR11, le confiere una ventaja selectiva, al permitirle no sólo sobrevivir en ambientes anóxicos, como sedimentos o aguas subterráneas, sino también, ejercer de forma activa sus capacidades degradadoras en ambientes, pobres en oxígeno, contaminados con TNT.

Como consecuencia de los estudios desarrollados en esta Tesis Doctoral, se han abierto en el grupo dos líneas de investigación. Una supondría una aproximación molecular al metabolismo anaerobio del TNT, en la que se pretende aislar y caracterizar los genes implicados en dicho proceso, así como los mecanismos de regulación génica



que tengan lugar; por otro lado y en colaboración con la Unión Española de Explosivos (UEE) y La Marañosa, se están diseñando ensayos de campo destinados al tratamientos biológico, con *Pseudomonas* sp. JLR11, de suelos y aguas contaminadas con el explosivo TNT.



## Conclusiones



Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las conclusiones que se resumen a continuación:

1. La cepa *Pseudomonas* sp. JLR11, aislada de la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Granada, es capaz de utilizar eficientemente el explosivo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como única fuente de nitrógeno en condiciones anóxicas.
2. El metabolismo de TNT requiere de un cosustrato adicional que actúe como donador de electrones. Distintos compuestos carbonados (glucosa, sacarosa, acetato, citrato, benzoato) son capaces de desempeñar este papel.
3. En el metabolismo de TNT por *Pseudomonas* sp. JLR11, no se detectó acumulación de azoxinitrotoluenos en condiciones anóxicas.
4. Las condiciones óptimas de eliminación de TNT en un reactor de 2 litros (Braun-Biotech) mantenido en condiciones de anerobiosis, y operando en condiciones estanco, fueron: agitación  $600 \pm 100$  rpm, temperatura  $30 \pm 2$  °C y pH  $7 \pm 0,5$ .
5. El 85% del nitrógeno del TNT se incorpora como material celular tras ser metabolizado en anaerobiosis por *Pseudomonas* sp. JLR11. La asimilación del nitrógeno del TNT por *Pseudomonas* sp. JLR11 en condiciones de anaerobiosis tiene lugar a través de la eliminación de los grupos nitro en forma de nitrito, el cual es posteriormente reducido a amonio por la nitrito reductasa. Un mutante de *Pseudomonas* sp. JLR11, obtenido por inserción de un *miniTn5*-tel, y seleccionado por su incapacidad



para utilizar TNT como fuente de nitrógeno, se mostró también incapaz de utilizar nitrito.

6. La incorporación del carbono del anillo aromático del TNT al material celular es posible. para ello nos basamos en:

a) la desaparición de compuestos aromáticos de los medios de cultivo tras el proceso de eliminación anaerobio de TNT

b) la detección del 45% de radioactividad del  $^{14}\text{C}$ -TNT asociado a material celular precipitable por ácido tricloroacético.

c) la mineralización del 1% del  $^{14}\text{C}$ -TNT como  $^{14}\text{CO}_2$ .

d) el eficiente metabolismo anaerobio de *p*-hidroxibenzoato, uno de los metabolitos detectados en la degradación de TNT, en medios en los que actúa como cosustrato metabólico del nitroaromático.

7. *Pseudomonas* sp. JLR11 es capaz de utilizar TNT como aceptor final de electrones en la membrana. La reducción de sus grupos nitro se encuentra acoplada a una translocación de protones hacia el exterior de la célula; esto genera un gradiente electroquímico que dirige la síntesis de ATP en las membranas. Este proceso respiratorio propuesto parece ser, al menos en parte, específico de TNT.



## Bibliografía



- Abramowicz, D.A.** 1990. Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**:241-249.
- Achtnich, C., E. Fernandes, J-M. Bollag, H-J. Knackmuss, y H. Lenke.** 1999. Covalent binding of reduced metabolites of <sup>15</sup>N-TNT to soil organic matter during a bioremediation process analyzed by <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. *Environ.Sci.technol.* **33**:4448-4456.
- Achtnich, C., P. Pfortner, M. G. Weller, R. Niessner, H. Lenke, y H-J. Knackmuss.** 1999. Reductive transformation of bound Trinitrophenyl residues and free TNT during a bioremediation process analyzed by immunoassay. *Environ.Sci.technol.* **33**:3421-3426.
- Agrawal, A. y P. G. Tratnyek.** 1996. Reduction of Nitro aromatic compounds by Zero-valent iron metal. *Environ.Sci.technol.* **30**:153-160.
- Aihara, J.** 1992 Why aromatic compounds are stable. *Sci. Am.* **266**:62-68.
- Albrechtsen, H-J. y T. H. Christensen.** 1994. Evidence for microbial iron reduction in a Landfill Leachate-polluted aquifer (Vejen, Denmark). *Applied Environmental Microbiology* **60**:3920-3925.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Alvarez, M.A., C. L. Kitts, J. L. Botsford, y P. J. Unkefer.** 1995. *Pseudomonas aeruginosa* strain MA01 aerobically metabolizes the aminodinitrotoluenes produced by 2,4,6-trinitrotoluene nitro group reduction. *Can.J.Microbiol.* **41**:984-991.
- An, D., D. T. Gibson, y J. C. Spain.** 1994. Oxidative release of nitrite from 2NT by a three component enzyme system from *Pseudomonas* sp. strain JS42. *J.Bacteriol.* **176**:7462-7467.
- Angermaier, L. y H. Simon,** 1983. On nitroaryl reductase activities in several *Clostridia*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* **364**:1653-63
- Atlas, R. M.** Bioestimulación para mejorar la biorrecuperación microbiana. En: *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos.* Eds. Levin y Gealt. Mc Graw Hill. 1997. pp 21-40.
- Averill,** 1995 En J.C. Spain (ed.), *Biodegradation of nitroaromatics compounds,* Plenum Press, New York
- Bae, B., R. L. Autenrieth, y J. S. Bonner.** 1996. Aerobic biotransformation and mineralization of 2,4,6-Trinitrotoluene, ,
- Bakhtiar, R. Y K. H. Leung.** 1997. Covalent binding of 2,4,6-trinitrotoluene to human hemoglobin. Evidence for protein adducts probed by electrospray ionization mass spectrometry *Rapid Commun Mass Spectrom* **11**:1935-1937
- Barrows, S.E., C. J. Cramer, D. G. Truhlar, M. S. Elovitz, y E. J. Weber.** 1996. Factors controlling regioselectivity in the reduction of polynitroaromatics in aqueous solution. *Environ.Sci.technol.* **30**:3028-3038.



- Bart, J.C., L. L. Judd, K. E. Hoffman, A. M. Wilkins, y A. W. Kusterbeck.** 1997. Application of a portable immunosensor to detect the explosives TNT and RDX in groundwater samples. *Environ.Sci.technol.* **31**:1505-1511.
- Barton, L.L., J. Legall, J. M. Odon, y H. D. Jr. Peck.** 1983. Energy coupling to nitrite respiration in the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *J.Bacteriol.* **153**:867-871.
- Bauer, H. y S. M. Rosenthal.** 1944. 4-Hydroxylaminobenzenesulfonamide, its acetyl derivatives and diazotacion reaction. **66**:611-614.
- Bayman, P. y G. V. Radkar.** 1997. Transformation and tolerance of TNT(2,4,6-trinitrotoluene) by fungi. *International Biodeterioration&Biodegradation* **39**:45-53.
- Beller, H.R. y A. M. Spormann.** 1997. Anaerobic activation of toluene and o-xilene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J.Bacteriol.* **179**:670-676.
- Bender, R. A. y B. Friedrich.** 1990. Regulation of assimilatory nitrate reductase formation in *Klebsiella aerogenes* W70. *J. Bacteriol.* **172**: 7256-7259.
- Bhadra, R., R. J. Spangord, D. G. Wayment, J. B. Hughes, y J. V. Shanks.** 1999. Characterization of oxidation products of TNT metabolism in aquatic phytoremediation systems of *Myriophyllum aquaticum*. *Environ.Sci.technol.* **33**:3354-3361.
- Bhadra, R., D. G. Wayment, J. B. Hughes, y J. V. Shanks.** 1999. Confirmation of conjugation processes during TNT metabolism by axenic plant roots. *Environ.Sci.technol.* **33**:446-452.
- Blasco, R. y F. Castillo.** 1993. Characterization of a Nitrophenol Reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Applied Environmental Microbiology* **59**:1774-1778.
- Blattner F.R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, F. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau y Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474.
- Blatny, J. M., t. Braustaset, H. C. Winther-Larsen, K. Haugan y S. Valla.** 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:370-379.
- Blehert, D.S., B. G. Fox, y G. H. Chambliss.** 1999. Cloning and sequence analysis of two *Pseudomonas* flavoprotein xenobiotic reductases. *J.Bacteriol.* **181**:6254-6263.
- Blehert, D.S., K. L. Knoke, B. G. Fox, y G. H. Chambliss.** 1997. Regioselectivity of Nitroglycerin Denitration by flavoprotein nitroester reductases purified from two *Pseudomonas* species. *J.Bacteriol.* **179**:6912-6920.
- Boenisch, C.W., T. Track, D. Schenk, y R. Oberhänsli.** 1996. Sorptionsverhalten von 2,4,6-trinitrotoluol und 1,3-dinitro-benzol an unterschiedlichen bodenmodellsubstanzen. *Grundwasser* **63-68**.
- Boll, M. y G. Fuchs.** 1995. Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism, *Eur. J. Biochem.* **234**:921-933.



- Boll, M., S. S. P. Albracht, y G. Fuchs.** 1997. Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. A study of adenosinetriphosphate activity, ATP stoichiometry of the reaction and EPR properties of the enzyme. *Eur.J.Biochem.* **244**:840-851.
- Bolliger, C., P. Höhener, D. Hunkeler, K. Häberli, y J. Zeyer.** 1999. Intrinsic bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer and assessment of mineralization based on stable carbon isotopes. *Biodegradation* **10**:201-217.
- Boopathy, R., M. Gurgas, J. Ullian, y J. F. Manning.** 1998. Metabolism of explosive compounds by sulfate-reducing bacteria. *Curr.mic* **37**:127-131.
- Boopathy, R. y C. F. Kulpa.** 1992. Trinitrotoluene as a sole nitrogen source for a sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio* sp.(B strain) isolated from an anaerobic digester. *Curr.mic* **25**:235-241.
- Boopathy, R. y C. F. Kulpa.** 1994. Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by a *Methanococcus* sp. (strain B) isolated from a lake sediment. *Canadian Journal of Microbiology.* **40**:273-278.
- Boopathy, R., J. Manning, y C. F. Kulpa.** 1998. A laboratory study of the bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil using aerobic/anoxic soil slurry reactor. *Water Environment Research* **70**:80-86.
- Boopathy, R., M. Wilson, y C. F. Kulpa.** 1993. Anaerobic removal of 2,4,6-TNT under different electron accepting conditions: laboratory study. *Water Environment Research* **65**:271-275.
- Bouvier, E.S.P. y S. A. Oehrle.** 1995. Analysis and identification of nitroaromatic and nitramine explosives in water using HPLC and Photodiode-array detection. *LC-GC* **13**:
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:284-289.
- Bradley, P.M. y F. H. Chapelle.** 1995. Factors affecting microbial 2,4,6-TNT mineralization in contaminated soil. *Environ.Sci.technol.* **29**:802-806.
- Breese, K., M. Boll, J. Alt-Mörbe, H. Schägger, y G. Fuchs.** 1998. Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*. *Eur.J.Biochem.* **256**:148-154.
- Breitung, J.** 1996. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soils by two different aerated compost systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 795-800.
- Breslauer, K. J., R. Frank, H. Blocker y L. A. Marky.** 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3746-3750.
- Brooks, L. R.** 1997. Mutagenicity of HPLC-fractionated urinary metabolites from 2,4,6-trinitrotoluene-treated Fischer 344 rats. *Environ. Mol. Mutagen.* **30**: 298-302.
- Bruhn, C., H. Lenke, y H. J. Knackmuss.** 1987. Nitrosubstituted aromatic compounds as nitrogen source for bacteria. *Applied Environmental Microbiology* **53**:208-210.



- Brune, A. y B. Schink.** 1992. Phloroglucinol pathway in the strictly anaerobic *Pelobacter acidigallici*: fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. *Arch Microbiol* **157**:417-424.
- Bruns-Nagel, D., J. Bretung, E. von Löw, K. Steinbach, T. Borontzy, M. Kahl, K. Blotevogel y D. Gemsa.** 1996. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene in aerobic soil columns. *Applied Environmental Microbiology* **62**:2651-26562.
- Bruns-Nagel, D., O. Drzyzga, K. Steinbach, C. Schmidt, E. von Löw, T. Gorontzy, Blotevogel y Gemsa.** 1998. Anaerobic/Aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. *Environ.Sci.technol.* **32**:1676-1679.
- Bruns-Nagel, D., S. Scheffer, B. Casper, H. Garn, O. Drzyzga, E. von Löw, y D. Gemsa.** 1999. Effect of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites on human monocytes. *Environ.Sci.technol.* **33**:2566-2570.
- Bryant, C., L. Hubbard, y W. D. McElroy.** 1991. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the Nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*. *JBC* **266**:4126-4130.
- Bryant, C. and DeLuca, M.** 1991. Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H Nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *JBC* **266**:4119-4125.
- Bryant, D.W., D. R. McCalla, M. Leelsma, y P. Laneuville.** 1981. Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. *Can.J.Microbiol.* **27**:81-86.
- Bumpus, J.A. y M. Tatarko.** 1994. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: Identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidase. *Curr.mic* **28**:185-190.
- Böck, A. y G. Sawers.** 1999. Fermentation, p.262-282. In *Escherichia coli* and *Salmonella Thymipurium*. *Celular and Molecular Biology*,
- Carpenter, D.F., N. G. McCormick, J. H. Cornell, y A. Kaplan.** 1978. Microbial Transformation of <sup>14</sup>C-labeled 2,4,6-TNT in an activated-sludge system. *Applied Environmental Microbiology* **35**:949-954.
- Carter, J.P., Y. H. Hsiao, S. Spiro, y D. J. Richarson.** 1995. Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. *Applied Environmental Microbiology* **61**:2852-2858.
- Cerniglia, C. E.** 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*
- Chandry, R. G. y S. Chapalamaduqui.** 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* **55**:59-79.
- Channon, H.J., G. T. Mills, y R. T. Williams.** 1944. The metabolism of 2:4:6-trinitrotoluene ( $\alpha$ -T.N.T.). 70-85.
- Crawford, R.L.** 1993. Biotreatment of nitroaromatic compounds. *TIBTECH* **11**:411-412.
- Crawford, R.L.** 1995. The microbiology and treatment of nitroaromatic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* **6**:329-336.



- Crawford, R.L.** 1995 En J.C. Spain (ed.), Biodegradation of nitroaromatics compounds, Plenum Press, New York.
- Darrach, M.R., A. Chutjian, y G. A. Plett.** 1998. Trace explosives signatures from world war II unexploded undersea ordnance. *Environ.Sci.technol.* **32**:1354-1358.
- Daun, G., H. Lenke, M. Reuss, y H-J. Knackmuss.** 1998. Biological treatment of TNT-contaminated soil.1.Anaerobic cometabolic reduction and interaction of TNT and metabolites with soil components. *Environ.Sci.technol.* **32**:1956-1963.
- Dawel, G., M. Kastner, J. Michels, W. Poppitz, W. Günther, y W. Fritsche.** 1997. Structure of a Laccase-mediated product of coupling of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to guaiacol, a model for coupling of 2,4,6-trinitrotoluene metabolites to a humic organic soil matrix. *Applied Environmental Microbiology* **63**:2560-2565.
- Delgado et al.,** 1994 Genetic evidence for activation of the positive transcriptional regulator XylR, a member of the NtrC family of regulators, by effector binding. *J. Biol. Chem.* **269**:8059-8062.
- De Lorenzo, V. y K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* **235**:386-405
- De Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, y K. Timmis.** 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.
- Dimroth, P. y B. Schink.** 1998. Energy conservation in the decarboxylation of dicarboxylic acids by fermenting bacteria. *Arch.Microbiol.* **170**:69-77.
- Drzyzga, O., D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K-H. Blotevogel, D. Gemsa y E. von Low.** 1998. Incorporation of <sup>14</sup>C-labeled 2,4,6-Trinitrotoluene metabolites into different soil fractions after anaerobic and anaerobic-aerobic treatment of soil/molasses mixtures. *Environ.Sci.technol.* **32**:3529-3535.
- Drzyzga, O., D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K-H. Blotevogel y D. Gemsa.** 1998. Mass balance studies with <sup>14</sup>C-labeled 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) mediated by an anerobic *Desulfovibrio* Species and an aerobic *Serratia* species. *Curr.mic* **37**:380-386.
- Duque, E.** 1994. Comportamiento en microcosmos agrícolas de microorganismos manipulados genéticamente. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Duque, E., A. Haïdour, F. Godoy, y J. L. Ramos.** 1993. Construction of a *Pseudomonas* Hybrid Strain that mineralizes 2,4,6-Trinitrotoluene. *J.Bacteriol.* **175**:2278-2283.
- Ederer, M.M., T. A. Lewis, y R. L. Crawford.** 1997. 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transformation by *clostridia* isolated from a munition-fed bioreactor: comparison with non-adapted bacteria. *Journal of industrial microbiology&Biotechnology* **18**:82-88.
- Elovitz, M.S. y E. J. Weber.** 1999. Sediment-mediated reduction of 2,4,6-trinitrotoluene and fate of the resulting aromatic (poly)amines. *Environ.Sci.technol.* **33**:2617-2625.
- Emmrich, M.** 1999. Kinetics of the alkaline hydrolysis of 2,4,6-Trinitrotoluene in aqueous solution and highly contaminated soils. *Environ.Sci.technol.* **33**:3802-3805.



- Enderle, P. J. y M. A. Farwell.** 1998. Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques*. **25**:954-956.
- Esteve-Núñez A. y Ramos J. L.** 2000. Microbial metabolism of TNT. Enviado a revision.
- Evans, W.C.** 1977. Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. *Nature* **270**:17-22.
- Ferguson, R.** 1999. Pilot-Scale Bioremediation of soils containing TNT at the former Raritan Arsenal using sequential strong reducing conditions and aerobic degradation. Second International Symposium on Biodegradation of Nitroaromatic compounds and explosives, Leesburg, Virginia, USA.
- Fernando, T., J. A. Bumpus, y S. D. Aust.** 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6-Trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology* **56**:1666-1671.
- Fiorella, P.D. y J. C. Spain.** 1997. Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS52. *Applied Environmental Microbiology* **63**:2007-2015.
- French, C.E., S. J. Hosser, G. J. Davies, S. Nicklin, y N. C. Bruce.** 1999. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. *Nature biotechnology* **17**:491-494.
- French, C.E., S. Nicklin, y N. Bruce.** 1995. Sequence and properties of pentaerythritol tetranitrate reductase from *Enterobacter cloacae* PB2. *J.Bacteriol.*
- French, C.E., S. Nicklin, y N. C. Bruce.** 1998. Aerobic degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by Pentaerythritol tetranitrate reductase. *Applied Environmental Microbiology* **64**:2864-2868.
- Fuller, M.E. y Jr. Manning.** 1997. Aerobic Gram-positive and Gram-negative Bacteria exhibit differential sensitivity to and transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene(TNT). *Curr.mic* **35**:77-83.
- Funk, S.B., D. J. Roberts, D. L. Crawford, y R. L. Crawford.** 1993. Initial-phase optimization for bioremediation of munition compound-contaminated soils. *Applied Environmental Microbiology* **59**:2171-2177.
- Gallert, C. y J. Winter.** 1994. Anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate: reductive dehydroxylation of 4-hydroxybenzoyl-CoA and ATP formation during 4-hydroxybenzoate decarboxylation by the phenol-metabolizing bacteria of a stable, strictly anaerobic consortium. *Applied Microbiology Biotechnology* **42**:408-414.
- Gennis, R.B. y V. Stewart.** 1996. Respiration, p.217-261. In *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. *Celular and Molecular Biology*,
- Gibson, D. T.** 1984. *Microbial degradation of Organic compounds*. New York: Marcel Decker.
- Gilcrease, C.P. y V. G. Murphy.** 1996. Bioconversion of 2,4-Diamino-6-Nitrotoluene to a Novel Metabolite under anoxic and aerobic conditions. *Applied Environmental Microbiology* **61**:4209-4214.



- Glaus, M.A., C. G. Heijman, R. P. Schwarzenbach, y J. Zeyer. 1992. Reduction of nitroaromatic compounds mediated by *Streptomyces* sp. Exudates. Applied Environmental Microbiology **58**:1945-1951.
- Goldman, B. S., J. T. Lin, y W. Stewart. 1994. Identification and structure of the *nasR* gene encoding a nitrate- and nitrite-responsive positive regulator of *nasFEDCBA* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5AI. J.Bacteriol. **176** : 5077-5085.
- Goodwin, A., D. Kersulyte, G. Sisson, S. J. O. Veldhuyzen van Zanten, D. E. Berg, y P. S. Hoffman. 1998. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. Molecular Microbiology **28**:383-393.
- Gorny, N., G. Wahl, A. Brune y B. Schink. 1992. A strictly anaerobic nitrate-reducing bacterium growing with resorcinol and other aromatic compounds. Arch. Microbiol. **158**: 48-53.
- Gorontzy, T., O. Drzyzga, M. W. Kahl, D. Bruns-Nagel, J. Breitung, E. von Löw, y K. -H. Blotevogel. 1994. Microbial Degradation of Explosives and related compounds. Critical Review in Microbiology **20**:265-284.
- Gorontzy, T., J. Küver, y K. Blotevogel. 1993. Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. J.Gen.Microbiol. **139**:1331-1336.
- Groenewegen, P. E. J. y J. M. A. de Bont, 1992. Degradation of 4-nitrobenzoate via 4-hydroxylaminoenzoate and 3,4-dihydroxybenzoate in *Comamonas acidovorans* NBA-10. Arch. Microbiol **158**:381-386.
- Guest, J.R. 1995. The Leeuwenhoek Lecture, 1995. Adaptation to life without oxygen. Phil.Trans.R.Soc.Lond. **350**:189-202.
- Guerrero, M.G., J. M. Vega y M. Losada. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. **32**:169-204.
- Guyer, M. y G. Hegeman. 1969. J. Bacteriol. **99**:906-907.
- Haderlein, S. B. y Schwarzenbach, R. P. 1995. Environmental processes influencing the rate of abiotic reduction of nitroaromatic Compounds in the subsurface. En J.C. Spain (ed.), Biodegradation of nitroaromatics compounds, Plenum Press, New York
- Haigler, B. E. y J.C. Spain. 1993. Biodegradation of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain 4NT. Appl. Environ. Microbiol. **59**:2239-2343.
- Haigler, B.E., W. H. Wallace, y J. C. Spain. 1994. Biodegradation of 2-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JS42. Applied Environmental Microbiology **60**:3466-3469.
- Hanne, L. F., L. L. Kirk, S. M. Appel, A. D. Narayan y K. K. Bains. 1993. Degradation and induction specificity in actinomycetes that degrade p-nitrophenol. Appl. Environ. Microbiol. **59**:3505-3508.
- Harayama S. y K. N. Timmis, 1989. Catabolism of aromatics hydrocarbons by bacteria. P. 99-156. Sigel H. y A. Sigel (ed.). En: Degradation of environmental pollutants by microorganism and their metalloenzymes. Marcel Dekker Inc, New York.



**Hartter, D.R.** 1985. The use and importance of nitroaromatic compounds in the chemical industry, pp.1-14. In D. E. Rickert (de.) Chemical Institute of Toxicology Series: Toxicity of Nitroaromatic Compounds, Hemisphere Publishing, Washington, D. C.

**Harvey, S.D., R. J. Fellows, D. A. Cataldo, y R. M. Bean.** 1990. Analysis of 2,4,6-trinitrotoluene and its transformation products in soils and plant tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **518**:361-374.

**Harwood, C.S. y J. Gibson.** 1997. Shedding Light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes? *J.Bacteriol.* **179**:301-309.

**Hawari, J., A. Halasz, L. Paquet, E. Zhou, B. Spencer, G. Ampleman, y S. Thiboutot.** 1998. Characterization of metabolites in the biotransformacion of 2,4,6-trinitrotoluene with anaerobic sludge: Role of triaminotoluene. *Applied Environmental Microbiology* **64**:2200-2206.

**Haïdour, A. y J. L. Ramos.** 1996. Identification of products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene ad 2,6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. *Environ.Sci.technol.*

**Hegeman GD** 1967. The metabolism of *p*-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris* and its regulation *Arch. Microbiol.* 1967. **59**: 143-148.

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

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

**Herrero, M., V. de Lorenzo y K. N. Timmis.** 1990. Transposons vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:6557-6567.

**Higson, F.K.** 1992. Microbial degradation of nitroaromatic compounds, p.1-19. In *Advances in applied microbiology* (volume 37), Academic Press,

**Hofstetter, T. B.** 1999. Reduction of Polynitroaromatic compunds by reduced iron species. Coupling biogeochemical Processes with pollutant transformation. PhD Dissertation.

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

**Honeycutt, M. E.** 1996. Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **35**: 282-287.

**Huertas, M. J.** 1999. Supervivencia en suelos de bacterias del género *Pseudomonas* que degradan y metabolizan disolventes orgánicos. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada.



- Hughes, J.B., J. Shanks, M. Vanderford, J. Lauritzen, y R. Bhadra.** 1997. Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures. *Environ.Sci.technol.* **31**:266-271.
- Hughes, J.B., C. Wang, K. Yesland, A. Richardson, R. Bhadra, G. Bennet, y F. Rudolph.** 1998. Bamberger rearrangement during TNT metabolism by *Clostridium acetobutylicum*. *Environ.Sci.technol.* **32**:494-500.
- Hughes, J.B., C. Y. Wang, y C. Zhang.** 1999. Anaerobic biotransformation of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene by *Clostridium acetobutylicum*: a pathway through dihydroxylamino intermediates. *Environ.Sci.technol.* **33**:1065-1070.
- Hungate, R. E.** En: *Methods in Microbiology*: Norris, J.R. y D. W. Ribbons (eds). New York: Academic Press. 1969; Vol. 3B. pp-117-132.
- Inoue, H., H. Nojima y H. Okayama.** 1990. A *Pseudomonas* that thrives in high concentration of toluene. *Nature (London)* **338**:264-266.
- Jones, A.M., C. W. Greer, G. Ampleman, S. Thiboutot, J. Lavigne, y J. Hawari.** 1996. Biodegradability of selected Highly energetic Pollutants under aerobic conditions. *Bioremediation of Recalcitrant Organics*
- Johnson, L. R.** Phototoxicity. 3. Comparative toxicity of trinitrotoluene and aminodinitrotoluenes to *Daphnia Magna*, *Dugesia dorotocephala*, and sheep erythrocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **27**: 34-39.
- Junge, W.** 1999. ATP synthase and other motor proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **96**:4735-4737.
- Kaake, R.H., D. L. Crawford, y R. L. Crawford.** 1995. Biodegradation of the nitroaromatic herbicide dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol) under reducing conditions. *Biodegradation* **6**:329-337.
- Kado, C. I. y S.-T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**:1365-1373.
- Kalafut, T., M. E. Wales, V. K. Rastogi, R. P. Naumova, S. K. Zaripova, y J. R. Wild.** 1998. Biotransformation patterns of 2,4,6-Trinitrotoluene by aerobic bacteria. *Curr.mic* **36**:45-54.
- Kaplan, D.L.** 1989. Biotransformation pathways os Hazardous Energetic Organo-Nitro compounds, p.157-181. In D. Kamely, A. Chakrabarty, and G. Omenn (ed.), *Biotechnology and biodegradation, Advances in Applied Biotechnology*, Portfolio Publishing Co., Houston.
- Kaplan, D.L.** 1992. Biological degradation of explosives and chemical agents . *Current Opinion in Biotechnology* **3**:253-260.
- Kaplan, D.L. y A. M. Kaplan.** 1982. Thermophilic biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene under simulated composting conditions. *Applied Environmental Microbiology* **44**:757-760.
- Kaplan, LL.A. y A. R. Siedle.** 1971. Studies in Boron Hydrides. IV. Stable Hydride Meisenheimer Adducts. *J.Org.Chem.* **36**:937-939.
- Kaufman, A.K. y C.C. Kreuger,** " Biotratamiento aplicado a suelos contaminados con Ftalatos: reconocimiento y superación de retos técnicos. En: *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. Eds. Levin y Gealt. McGraw Hill 1997. pp 211-220.



- Khan, T.A., R. Bhadra, y J. Hughes.** 1997. Anaerobic transformation of 2,4,6-TNT and related nitroaromatic compounds by *Clostridium acetobutylicum*. Journal of industrial microbiology&Biotechnology **18**:198-203.
- Kiese M. y K. Tager.** 1976. The fate of phenylhydroxylamine in human red cells Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. **292**:59-66
- Kluge, C., A. Tschsch y G. Fuchs.** 1990. Anaerobic metabolism of resorcylic acids (m-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting ad 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., D. Bruns-Nagel, O. Drzyzga, E. von Löw, y K. Steinbach.** 1999. Characterization of <sup>15</sup>N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state <sup>15</sup>N NMR Spectroscopy. 1.Determination and optimization of relevant NMR Spectroscopy parameters. Environ.Sci.technol. **33**:343-349.
- Krom, M. D.** 1980. Analyst. **105**:305-316.
- Krumholz, L.R., W. W. Clarkson, G. G. Wilber, y J. M. Suflita.** 1997. Transformations of TNT and related aminotoluenes in groundwater aquifer slurries under different electron-accepting conditions. Journal of industrial microbiology&Biotechnology **18**:161-169.
- Laemli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) **227**:680-685.
- Lang, P.S., W-K. Ching, D. M. Willberg, y M. R. Hoffmann.** 1998. Oxidative degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by ozone in an electrohydraulic discharge reactor. Environ.Sci.technol. **32**:3142-3148.
- Larson, R.A., P. L. Miller, y T. O. Crowley.** 1996. Borohydride photoreduction of nitroaromatic compounds related to military ordnance constituents. Environ.Sci.technol. **30**:1192-1197.
- Lenke, H. y H-J. Knackmuss.** 1992. Initial hydrogenation during catabolism of picric acid by *Rhodococcus erythropolis* HL 24-2. Applied Environmental Microbiology **58**:2933-2937.
- Lenke, H., J. Warrelmann, G. Daun, K. Hund, U. Sieglén, y H-J. Knackmuss.** 1998. Biological treatment of TNT-contaminated soil. 2. Biologically induced immobilization of the contaminants and full-scale application. Environ.Sci.technol. **32**:1964-1971.
- Levin, M. A. y M. A. Gealt,** Visión general del biotratamiento y su futuro. En: Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Eds. Levin y Gealt. Mc Graw Hill. 1997. pp-1-19.
- Lewis, T.A., M. M. Ederer, R. L. Crawford, y D. L. Crawford.** 1997. Microbial transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene. Journal of industrial microbiology&Biotechnology **18**:89-96.



- Lewis, T.A., S. Goszczynski, R. L. Crawford, R. A. Korus, y W. Admassu.** 1996. Products of anaerobic 2,4,6-trinitrotoluene(tnt) transformation by *Clostridium bifermentans*. Applied Environmental Microbiology **62**:4669-4674.
- Li, A.Z., K. A. Marx, J. Walker, y D. L. Kaplan.** 1997. Trinitrotoluene and metabolites binding to humic acid. Environ.Sci.technol. **31**:584-589.
- Liu, Y. Y.** 1995. Monitoring human risk and exposure to trinitrotoluene (TNT) using haemoglobin adducts as biomarkers. Toxicol. Lett. **77**: 281-287.
- Lowry, D. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, J. R. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**:265-275.
- Marck, C.** 1988. "DNA Strider": a "C" program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. Nucleic Acids Res. **16**:1829-1836.
- Martin, J.L., S. D. Comfort, P. J. Shea, T. A. Kokjohn, y R. A. Drijber.** 1997. Denitration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastanoi*. Can.J.Microbiol. **43**:447-455.
- Marvin-Sikkema, F.D. y J. A. M Bont de.** 1994. Degradation of nitroaromatic compounds by microorganisms. Applied Microbiology Biotechnology **42**:49-507.
- Mason, R. P. y J. L. Holtzmann,** 1975. The role of catalytic superoxide formation in the O<sub>2</sub> inhibition of nitroreductase. Biochem Biophys Res Commun **67**:1267-74.
- McCormick, N.G., F. E. Feeherry, y H. S. Levinson.** 1976. Microbial transformation of 2,4,6-TNT and other Nitroaromatic compounds. Applied Environmental Microbiology **31**:949-958.
- Meckenstock, R.U., B. Morasch, R. Warthmann, B. Schink, E. Annweiler, W. Michaelis, y H. H. Richnow.** 1999. <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. Environmental Microbiology **1**:409-414.
- Merrick, M. J. y R. A. Edwards.** 1995. Nitrogen control in bacteria. Microbiol. Rev, **59**:604-622.
- Michels, J. y G. Gottschalk.** 1994. Inhibition of the lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium by Hydroxylamino-dinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2,4,6-TNT. Applied Environmental Microbiology **60**:187-194.
- Michels J. y Gottschalk,** 1995. En J.C. Spain (ed.), Biodegradation of nitroaromatics compounds. Plenum Press, New York.
- Miller, V. L. Y J. J. Mekalanos.** 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.
- Mondecar, M., J. Bender, J. Ross, W. George, y J. Preslan.** 1997. Removal of 2,4,6-TNT from contaminated water with microbial mats. Applied Biotechnology for site Remediation **342-345**.
- Montpas, S., J. Samson, E. Langlois, J. Lei, Y. Piche, y R. Chêvenert.** 1997. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Serratia marcescens*. Biotechnology Letters **19**:291-294.



- Moreno-Vivian, C., P. Cabello, M. Martínez-Luque, R. Blasco, y F. Castillo.** 1999. Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *J.Bacteriol.* **181**:6573-6584.
- Moser, G. P., Gray, N. C. C. y D. J. Gannon.** 1999. The Xeronem™ Bioremediation process for degrading nitroaromatics. Second International Symposium on Biodegradation of Nitroaromatic compounds and explosives, Leesburg, Virginia, USA.
- Mosqueda, G.** 2000. Tolerancia y degradación de tolueno por *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Nakano, M. M., F. Yang, P. Hardin, y P. Zuber.** 1995. Nitrogen regulation of *nasA* and the *nasB* operon, which encode genes required for nitrate assimilation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:573-579.
- Naumova, R. P., S. Selivanovskaia y I. E. Cherepneva.** 1988. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene during oxygen and nitrate respiration in *Pseudomonas fluorescens*. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **24**:493-8
- Naumova, R.P., S. Yu. Selivanovskaya, y I. E. Cherepneva.** 1989. Conversion of 2,4,6-TNT under conditions of oxygen and nitrate respiration of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl.Biochem.Microbiol.* **24**:409-413.
- Nay, M.W., Jr. Clifford, W. Randall, y P. H. King.** 1974. Biological treatability of trinitrotoluene manufacturing wastewater. *Jour.Water Poll.Control Fed.* **46**:485-497.
- Neubauer, H. y F. Götz.** 1996. Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *J.Bacteriol.* **178**:2005-2009.
- Neubauer, H., I. Pantel, y F. Götz.** 1998. Nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*: regulatory mechanisms and the involvement of NirR. MS
- Nielsen, A.T., R. A. Henry, W. P. Norris, R. L. Atkins, D. W. Moore, y A. H. Leipe.** 1979. Synthetic routes to aminodinitrotoluenes. *J.Org.Chem.* **44**:2449-2504.
- Nishino, S.F. y J. C. Spain.** 1993. Degradation of Nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Applied Environmental Microbiology* **59**:2520-2525.
- Ogawa, K. Y., E. Akagawa, K. Yamane, Z. W. Sun, M. LaCelle, P. Zuber, y M.M. Nakano.** 1995. The *nasB* operon and *nasA* gene are required for nitrate/nitrite assimilation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **177**:1409:1413.
- Oh y Kim.** 1998. Degradation of explosive 2,4,6-trinitrotoluene by s-triazine degrading bacterium isolated from contaminated soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **61**: 702-708.
- Osmon, J.L. y R. E. Klausmeier.** 1998. The microbial degradation of explosives. unknown 247-252.
- Palazzo, A.J. y D. C. Leggett.** 1986. Effect and disposition of TNT in a terrestrial plant. *J.Environ.Qual.* **15**:49-52.
- Parrish, F.W.** 1977. Fungal transformation of 2,4-dinitrotoluene (TNT) and 2,4,6-trinitrotoluene. *Applied and Environmental Microbiology* **34**:232-233.



**Pasti-Grigsby, M.B., T. A. Lewis, D. L. Crawford, y R. L. Crawford.** 1996. Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) by *Actinomycetes* isolated from TNT-contaminated and uncontaminated environments. *Applied Environmental Microbiology* **62**:1120-1123.

**Pearson, W. R. y D. J. Lipman.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2444-2448

**Peck, H. D., Jr.** 1966. Phosphorylation coupled with electron transfer in extracts of the sulfate-reducing bacterium, *Desulfovibrio gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**: 112-118.

**Pennington, J., C. A. Hayes, K. F. Myers, M. Ochman, D. Gunnison, D. R. Felt, y E. F. McCormick.** 1995. Fate of 2,4,6-trinitrotoluene in a stimulated compost system. *Chemosphere* **30**:429-438.

**Pennington, J.C. y W. H. Jr. Patrick.** 1990. Adsorption and desorption of 2,4,6-Trinitrotoluene by soils. *J. Environ. Qual.* **19**:559-567.

**Pereira, W.E., D. L. Short, D. B. Manigold, y P. K. Roscio.** 1979. Isolation and characterization of TNT and its metabolites in groundwater by Gas chromatograph-Mass Spectrometer-computer techniques. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **21**:554-562.

**Peterson, F.J., R. P. Mason, J. Hovsepian, y J. L. Holtzman.** 1979. Oxygen-sensitive and -insensitive Nitroreduction by *Escherichia coli* and Rat hepatic microsomes. *JBC* **254**:4009-4014.

**Piñar, G.** 1998. Eliminación biológica de altas concentraciones de nitrato en efluentes de fabricación de explosivos. Tesis Doctoral, Universidad de Granada.

**Preib, A., K. Levsen, E. Humpfer, y M. Spraul.** 1996. Application of high-field proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) spectroscopy for the analysis of explosives and related compounds in groundwater samples -a comparison with the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. *J. Anal. Chem.* **356**:445-451.

**Preub, A. y P. G. Rieger.** 1995. Anaerobic transformation of 2,4,6-TNT and other nitroaromatic compounds, J.C. Spain (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds*, Plenum Press, New York.

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

**Pritchard, P. M.** Cuestiones reglamentarias y de eficacia en la biorrecuperación de los derrames de petróleo: experiencias con el derrame del Exxon Valdez en Alaska. En: *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. Eds. Levin y Gealt. Mc Graw Hill. 1997. pp 273-312

**Rafii, F., W. Franklin, R. H. Heflich, y C. Cerniglia.** 1991. Reduction of nitroaromatic compounds by anaerobic bacteria isolated from the human gastrointestinal tract. *Applied Environmental Microbiology* **57**:962-968.

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



- Ramos, J. L., E. Duque, M-J. Huertas, y A. Haïdour. 1995. Isolation and Expansion of the catabolic Potential of a *Pseudomonas putida* Strain able to grow in the presence of High Concentrations of Aromatic Hydrocarbons. *J.Bacteriol.* **177**:3911-3916.
- Ramos, J. L., E. Duque, J. J. Rodriguez-Herva, P. Godoy, A. Haïdour, F. Reyes, y A. Fernández-Barrero. 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *JBC* **272**:3887-3890.
- Ramos, J. L., A. Haïdour, A. Delgado, E. Duque, M. D. Fandila, M. Gil, y G. Piñar. 1995. Potential of toluene-degrading systems for the construction of hybrid pathways for nitrotoluene metabolism, p.53-67. En J.C. Spain (ed.), *Biodegradation of nitroaromatics compounds*, Plenum Press, New York.
- Ramos, J. L., A. Haïdour, E. Duque, G. Piñar, V. Calvo, y J. M. Oliva. 1996. Metabolism of nitrate esters by a consortium of two bacteria. *Nature biotechnology* **14**:320-322.
- Ramos J. L. y Timmis, K. 1987. Experimental Evaluation of Catabolic Pathways of Bacteria, *Microbiol Sci.* **4**: 228-237.
- Regan, K.M. y R. L. Crawford. 1994. Characterization of *clostridium bifermentans* and its biotransformation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) and 1,3,5-Triaza-1,3,5-trinitrociclohexano(RDX). *Biotechnology Letters* **16**:1081-1086.
- Rhys-Williams, W., S. C. Taylor, y P. A. Williams. 1993. A novel pathway for the catabolism of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas*. *J.Gen.Microbiol.* **139**:1967-1972.
- Rieble, S., D. K. Joshi, y M. Gold. 1994. Aromatic Nitroreductase from the basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*. *B&B.RC* **205**:298-304.
- Rieger, P. y H. J. Knackmuss. 1995. Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-TNT and related nitroaromatic compounds in contaminated soil. En J.C. Spain (ed.), *Biodegradation of nitroaromatics compounds*. Plenum Press, New York ,
- Roberts, D.J., F. Ahmad, y S. Pendharkar. 1996. Optimization of an aerobic polishing stage to complete the anaerobic treatment of munitions-contaminated soils. *Environ.Sci.technol.* **30**:2021-2026.
- Roberts, D.J., R.H. Kaake, S. B. Funk, D.L. Crawford y R. L. Crawford Biorrecuperación anaerobia a escala real de suelos cotaminados con DINOSEB. En: *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. Eds. Levin y Gealt. Mc Graw Hill. 1997. pp-221-247.
- Roldan, M.D., R. Blasco, F. J. Caballero, y F. Castillo. 1998. Degradation of p-nitrophenol by the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Arch Microbiol* **169**:36-42.
- Rügge, K., T. B. Hofstetter, S. B. Haderlein, P. L. Bjerg, S. Knudsen, C. Zraunig, H. Mosbaek, y T. H. Christensen. 1998. Characterization of predominant reductants in an anaerobic leachate-contaminated aquifer by nitroaromatic probe compounds. *Environ.Sci.technol.* **32**:23-31.
- Sabaty, M., J. Gagnon, A. Verméglio. 1994. Induction by nitrate of cytoplasmic and periplasmic proteins in the photodenitrifier *Rhodobacter sphaeroides* forma sp. *denitrificans* under anaerobic or aerobic condition. *Arch. Microbiol.* **162**: 335-343.



- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez-Romero, J. M.** 1997. Desarrollo de herramientas moleculares para el análisis genético y la generación de nuevos fenotipos en *Pseudomonas*. Memoria de Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Schackmann, A. y R. Müller.** 1991. Reduction of nitroaromatic compounds by different *Pseudomonas* species under aerobic conditions. Applied Microbiology Biotechnology 809-813.
- Scheibner, K., M. Hofrichter, A.** 1998
- Scheibner, K., M. Hofrichter, A. Herre, J. Michels, y W. Fritsche.** 1997. Screening for fungi intensely mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. Applied Microbiology Biotechnology 47:452-457.
- Scheibner et al.,** 1997a. Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. Biotechnol. Lett. 19: 835-839.
- Schink, B., A. Brune, y S. Schnell.** 1992. Anaerobic degradation of aromatic compounds, p.221-242. In Günther Winkelmann (ed.), Microbial Degradation of Natural Products, VCH, Weinheim.
- Schmelling, D.C., K. A. Gray, y P. V. Kamat.** 1996. Role of reduction in the photocatalytic degradation of TNT. Environ.Sci.technol. 30:2547-2555.
- Schnell, S. y B. Schinck.** 1991. Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoil-CoA in *Desulfobacterium anilini*. Arch Microbiol 155:183-190.
- Schröder, I., S. Darie, R. P. Gunsalus.** 1993. Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (narGHJI) operon by NarL and FNR requires integration host factor. J. Biol. Chem. 268:771-774.
- Selim, H.M., S. K. Xue, y I. K. Iskandar.** 1995. Transport of 2,4,6-Trinitrotoluene and Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine in soils. Soil Science 160:328-339.
- Sembries, S. y R. L. Crawford.** 1997. Production of *Clostridium bifermentans* spores as inoculum for bioremediation of nitroaromatic contaminants. Applied Environmental Microbiology 63:2100-2104.
- Sheremata, T.W., S. Thiboutot, G. Ampleman, L. Paquet, A. Halasz, y J. Hawari.** 1999. Fate of 2,4,6-Trinitrotoluene and its metabolites in natural and model soil systems. Environ.Sci.technol. 33:4002-4008.
- Shin, C.Y. y D. L. Crawford.** 1998. Biodegradation of Trinitrotoluene (TNT) by a strain of *Clostridium bifermentans*, p.57. In ,
- Schink, B., A. Brune y S. Schnell,** Anaerobic metabolism of aromatic compounds. En: Microbial degradation of natural products. Weinheim Eds. Günther Winkelmann. 1992. pp.221-242.
- Shriver-Lake, L.C., B. L. Donner, y F. S. Ligler.** 1997. On-site detection of TNT with a portable fiber optic biosensor. Environ.Sci.technol. 31:837-841.
- Siciliano, S. D. y C. W. Greer.** Plant-bacterial combinations to phytoremediate soil contaminated with high concentrations of 2,4,6-trinitrotoluene. Second International Symposium on Biodegradation of Nitroaromatic compounds and explosives, Leesburg, Virginia, USA.



- Sitzmann, M.E.** 1974. Chemical reduction of 2,4,6-TNT-Initial products. *Journal of Chemical and Engineering Data* **19**:179-181.
- Smock, L.A., D. L. Stoneburner, y J. R. Clark.** 1976. The toxic effects of trinitrotoluene (TNT) and its primary degradation products on two species of algae and the fathead minnow. *Water research* **10**:537.
- Snell, F. D. y C. T. Snell,** 1949. En: *Colorimetric Methods of Analysis*; Van Nostrand Co.: New York, Vol.3, pp 804-805.
- Solorzano, L.** 1969. *Limnol. Oceanogr.* **14**: 799-801.
- Spain, J.C.** 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Ann.Rev.Microbiol.* **49**:523-555.
- Spain, J.** Biodegradation of nitroaromatics compounds, Plenum Press, New York. 1995
- Spanggord, R.J., K. E. Mortelmans, A. F. Griffin, y V. F. Simmon.** 1982. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and structure-activity relationships of wastewater components emanating from the manufacture of trinitrotoluene. *Environ.Mutagenesis* **4**:163-179.
- Spanggord, R.J., J. C Spain,, S. F. Nishino, y K. E. Mortelmans.** 1991. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. *Applied Environmental Microbiology* **57**:3200-3205.
- Spanggord, R. J., K. R. Stewart y E. S. Riccio.** 1995. Mutagenicity of tetranitroazoxytoluenes: a preliminary screening in *Salmonella typhimurium* strains TA100 and TA100NR *Mutat Res.***335**:207-11
- Spieß, T., F. Desiere, P. Fischer, J. C. Spain, H-M. Knackmuss, y H. Lenke.** 1998. A new 4-nitrotoluene degradation pathway in a *Mycobacterium* strain. *Applied Environmental Microbiology* **64**:446-452.
- Spiker, J.K., D. L. Crawford, y R. L. Crawford.** 1992. Influence of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) concentration on the degradation of TNT in explosive-contaminated soils by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology* **58**:3199-3202.
- Stahl, J.D y S. D. Aust.** 1993. Plasma membrane dependent reduction of 2,4,6-TNT by *Phanerochaete Chrysosporium*. *B&B.RC* **192**:471-476.
- Stahl, J.D y S. D. Aust,** 1995 En J.C. Spain (ed.), *Biodegradation of nitroaromatics compounds*. Plenum Press, New York ,
- Stewart, V.** 1994. Regulation of nitrate and nitrite reductase synthesis in enterobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **66**:37-45.
- Stockinger et al.,** 1995.
- Stockinger, H., E. Heinzle, y O. M. Kut.** 1998. Removal of chloro and nitro aromatic wastewater pollutants by ozonation and biotreatment. *Environ.Sci.technol.* **29**:2016-2022.
- Stolpmann, H., H. Lenke, J. Warrelmann, E. Heuermann, A. Fruechtnicht, G. Daun, y H-J. Knackmuss.** 1999. Bioremediation of TNT-contaminated soil by the TERRANOX system, p.283-288. In *Biological unit processes for Hazardous waste treatment*,



- Stolz, J.F. y R. S. Oremland.** 1999. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiology Reviews* **23**:615-627.
- Styles, J.A, y M. F. Cross.** 1983. Activity of 2,4,6-TNT in an *in vitro* mammalian gene mutation assay. *Cancer Letters* **20**:103-108.
- Suen, W., B. E. Haigler, y J. C. Spain.** 1996. 2,4-Dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT: Similarity to Naphthalene Dioxygenase. *J.Bacteriol.* **178**:4926-4934.
- Suflita, et al.,** 1988. Anaerobic biotransformation of pollutant chemicals in aquifers. *J. Ind. Microbiol.* **3**: 179-194.
- Tan, E.L., C. H. Ho, W. H. Griest, y R. L. Tyndall.** 1992. Mutagenicity of trinitrotoluene and its metabolites formed during composting. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **36**:165-175.
- Tarvin, D. y A. M. Buswell.** 1934 *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 1751-1755
- Taylor, R.P.** 1970. Novel Meisenheimer Complexes: the preparation of Tetramethylammonium 1,1-Dihydro-2,4,6-trinitrocyclohexadienate. *Chemical communications* 1463-1463.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680
- Thompson, P.L, L. A. Ramer, y J. L. Schnoor.** 1998. Uptake and transformation of TNT by hybrid poplar trees. *Environ.Sci.technol.* **32**:975-980.
- Traxler, R.W., E. Wood, y J. M. Delaney.** 1974. Bacterial degradation of alpha-TNT. *Dev.Ind.Microbiol.* **16**:71-76.
- Tschech, A. y B. Schink.** 1985. Fermentative degradation of resorcinol and resorcylic acids (*m*-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and in a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* **155**:68-74.
- Tschech, A. y B. Schink.** 1988. Methanogenic Degradation of Anthranilate (2-aminobenzoate). *System.Appl.Microbiol.* **11**:9-12.
- Vaatanen, A. R.** 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.
- Van Aken, B., K. Skubusz, H. Naveau y S. N. Agathos** 1997. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biotechnol. Lett.* **19**: 813-817.
- Van Aken, B., M. Hofrichter, K. Scheibner, A. I. Hatakka, H. Naveau, y S. N. Agathos.** 1999. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biodegradation* **10**:83-91.
- VanderLoop, S.L., M. T. Suidan, M. A. Moteleb, y S. W. Maloney.** 1996. Two-Stage Biotransformation of 2,4,6-Trinitrotoluene,



- Vanderberg, L.A., J. J. Perry, y P. J. Unkefer.** 1995. Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Micobacterium vaccae*. Applied Microbiology Biotechnology **43**:937-945.
- Vanderford, M., J. V. Shanks, y J. B. Hughes.** 1997. Phytotransformation of trinitrotoluene (TNT) and distribution of metabolic products in *Myriophyllum aquaticum*. Biotechnology Letters **3**:277-280.
- Vilchez, S., A. Esteve-Núñez y J.L. Ramos.** 1997. Biodegradation of nitriles and 2,4,6-trinitrotoluene (TNT): two main contaminants in industrial effluents. Vth Congress of *Pseudomonas*. Madrid, España.
- Vollack, K-U., K. Härtig y W.G. Zumft.** 1999. Multiple transcription factors of the FNR family in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*: characterization of four fnr-like genes, regulatory responses and cognate metabolic processes. Molecular Microbiology. **31**:1681-694.
- Vorbeck, C., H. Lenke, P. Fischer, y H-J. Knackmuss.** 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., H. Lenke, P. Fischer, J. C. Spain, y H. J. Knackmuss.** 1998. Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. Applied Environmental Microbiology **64**:246-252.
- Walker, J.E. y D. L. Kaplan.** 1992. Biological degradation of explosives and chemical agents. Biodegradation **3**:369-385.
- Weissmahr, K.W., S. B. Haderlein, y R. P. Schwarzenbach.** 1997. *In situ* spectroscopic investigations of adsorption mechanisms of nitroaromatic compounds at clay minerals. Environ.Sci.technol. **31**:240-247.
- Weissmahr, K.W., S. B. Haderlein, y R. P. Schwarzenbach.** 1998. Complex formation of soil minerals with nitroaromatic explosives and other p-Acceptors. Soil Sci.Soc.Am.J. **62**:369-378.
- Weissmahr, K.W., M. Hildenbrand, R. P. Schwarzenbach, y S. B. Haderlein.** 1999. Laboratory and field scale evaluation of geochemical controls on groundwater transport of nitroaromatic ammunition residues. Environ.Sci.technol. **33**:2593-2600.
- Widrig, D.L., R. Boopathy, y J. F. Jr. Manning.** 1997. Bioremediation of TNT-contaminated soil: a laboratory study. Environ.Toxicol.Chem. **16**:1141-1148.
- Willberg, D.M., P. S. Lang, R. H. Höchemer, A. Kratel, y M. R. Hoffmann.** 1996. Degradation of 4-chlorophenol, 3,4-dichloroaniline and 2,4,6-trinitrotoluene in an electrohydraulic discharge reactor. Environ.Sci.technol. **30**:2526-2534.
- Won, W.D., L. H. Disalvo, y J. NG.** 1976. Toxicity and Mutagenicity of 2,4,6-TNT and its microbial metabolites. Applied Environmental Microbiology **31**:576-580.
- Won, W.D., R. J. Heckly, D. J. Glover, y J. C. Hoffsommer.** 1974. Metabolic disposition of 2,4,6-trinitrotoluene. Applied Microbiology **27**:513-516.



- Xingguo, Y., B. Qikun, y Z. Xiang.** 1999. Study on the treatment of wastewater containig NG, DNT and TNT by biological treatment. 1042-1047.
- Xue, S.K., I. K. Iskandar, y H. M. Selim.** 1995. Adsorption-Desorption of 2,4,6-Trinitrotoluene and Hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine in soils. *Soil Science* **160**:317-327.
- Yamamoto H., S. Uchiyama , F. A. Nugroho y J. Sekiguchi.** 1997. Cloning and sequencing of a 35.7 kb in the 70 degree-73 degree region of the *Bacillus subtilis* genome reveal genes for a new two-component system, three spore germination proteins, an iron uptake system and a general stress response protein. *Gene* **194**:191-199.
- Yamashina, I., S. Shikata, y F. Egami.** 1953. Enzymatic Reduction of Aromatic Nitro,Nitroso and Hydroxyl amino Compounds. **27**:44-45.
- Yinon, J.** 1987. Mass Spectral Fragmentation Pathways in 2,4,6-Trinitroaromatic compounds. *Organic Mass Spectrometry* **22**:501-505.
- Zachariah, P.K. y M. R. Juchau.** 1974. The role of gut flora in the reduction of aromatic nitro-groups. *Drug metabolism and disposition* **2**:74-78.
- Zenno, S., H. Koike, A. N. Kumar, R. Jarayaman, M. Tanokura, y K. Saigo.** 1996. Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* Major Nitroreductase Exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* Flavin Oxidoreductase. *Applied Environmental Microbiology* **178**:4508-4514.
- Zenno, S., H. Koike, M. Tanokura, y K. Saigo.** 1996a. Conversion of NfsB, a Minor *Escherichia coli* Nitroreductase, to a Flavin Reductase Similar in Biochemical Properties to FRase I, the Major Flavin Reductase in *Vibrio fischeri*, by a Single Amino Acid Substitution. *Applied Environmental Microbiology* **178**:4731-4733.
- Zumft, W. G.** 1992. The denitrifying prokaryotes, P:554-582. En: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, y K-H. Schleifer (ed. ) *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, application.* 2nd ed. Springer-Verlag. New York.
- Zumft, W. G.** 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 533-616.