UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# Transformación enzimática del 2, 4, 6-Trinitrotolueno en las cepas T30A y T30B

**Karol Elizabeth Rodríguez Merchán**

Universidad Nacional de Colombia

Posgrado Interfacultades Microbiología

Bogotá, Colombia

2014

# Transformación enzimática del 2, 4, 6-Trinitrotolueno en las cepas T30A y T30B

**Karol Elizabeth Rodríguez Merchán**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias Microbiología**

Director:

Ziv Arbeli, Ph.D

Codirector:

Sonia Amparo Ospina Sánchez, Ph.D

Línea de Investigación:

Microbiología Ambiental

Universidad Nacional de Colombia

Posgrado Interfacultades Microbiología

Ciudad, Colombia

2014

*Al mejor médico del mundo quien me dio un nuevo corazón… Dios.*
*A mi mamá la luchadora valiente e incansable y mi modelo a seguir. Gracias por siempre creer en mí.*

# Agradecimientos

Al Dr. Ziv Arbeli por su paciencia, sus enseñanzas y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Fabio Roldán y a la Dra. Sonia Ospina por sus aportes y enseñanzas.

Al posgrado Interfacultades de Microbiología, a la profesora Marta Fontanilla y a Socorro Prieto por toda su ayuda y paciencia.

A mi familia por apoyarme y enseñarme a no rendirme antes las adversidades.

A Carolina Rubiano, Gina López y Luisa Bernal, por su amistad, sus valiosos aportes y su apoyo incondicional.

A todos mis compañeros de USBA, por toda su ayuda, por estar pendientes de mi y en algunos casos ser mis ángeles guardianes, muchas gracias.

A mis amigos que siempre me han acompañado de corazón.

# Resumen

Se estudio la transformación enzimática del TNT en las cepas *Stenotrophomonas* sp. T30A y *Rhizobium* sp. T30B. Con este fin, a partir de los extractos de proteínas de las cepas T30A y T30B, se evalúo la actividad TNT-reductasa, identificándose al NADPH como el donador de electrones. Esta actividad se observó principalmente en la fracción citoplasmática. Así mismo, al evaluar los extractos crudos obtenidos a partir de los cultivos en medio con y sin TNT, se determinó que las enzimas implicadas en la degradación no dependen de la presencia del explosivo para su expresión. En estos ensayos se detectó la presencia de ADNT y se observó que por cada dos mM de TNT reducido se liberaba una mMl de $NO_2^-$. Tanto en la cepa *Stenotrophomonas* sp. T30A como en *Rhizobium* sp. T30B, se identificaron proteínas homólogas a la familia de proteínas de las OYE Tipo II. Los resultados obtenidos coinciden con la ruta metabólica descrita en las OYE tipo II, en la cual se producen diarilaminas y se libera una mol $NO_2^-$, gracias a la condensación de un compuesto dihidruro-Meisenheimer y un isómero hidroxilamino dinitrotolueno.

**Palabras clave:** NADPH, TNT, "*Old Yellow Enzyme*" (OYE), enzimas.

# Abstract

The aim of this work was to study the enzymatic transformation of TNT in strains of *Stenotrophomonas* sp. T30A and *Rhizobium* sp. T30B. The TNT-reductase activity was assessed using crude extracts from the strains T30A and T30B, the NADPH was identified as an electron donor in the enzymatic reaction. This activity was mainly observed in the cytoplasmic fraction. The crude extracts from cultures in medium with and without TNT, were assessed and it was determined that the enzymes involved in the degradation do not depend on the presence of the explosive for its expression. ADNT and $NO_2^-$ were detected as byproducts of the TNT reduction. In the case of the $NO_2^-$ release, one mM of nitrite was released for two mMl of TNT reduced. In *Stenotrophomonas* sp. T30A and *Rhizobium* sp. T30B, homologous proteins were identified as members of the OYE protein family Type II. The results obtained were consistent with the metabolic pathway described for OYE Type II, where the diarylamines formation and $NO_2^-$ release occurs by condensation of a Meisenheimer TNT-dihydride complex and a hydroxylamine dinitrotoluene compounds.

**Keywords:** NADPH, TNT, "*Old Yellow Enzyme*" (OYE), enzymes.

# Contenido

**Pág.**

**Resumen** ..... **VII**

**Abstract** ..... **VIII**

**Lista de figuras** ..... **XI**

**Lista de tablas** ..... **XIII**

**Lista de símbolos y abreviaturas** ..... **XIV**

**Introducción** ..... **17**

**1. Marco Teórico** ..... **19**
1.1 Explosivos ..... 19
1.2 Tipos de explosivos: ..... 19
1.2.1 TNT (2, 4, 6-Trinitrotolueno) ..... 20
1.3 El TNT como contaminante ..... 21
1.3.1 Toxicidad ..... 22
1.4 Métodos para el tratamiento de ambientes contaminados con explosivos ..... 22
1.4.1 Tratamientos fisicoquímicos ..... 23
1.4.2 Tratamientos biológicos ..... 24
1.5 Biodegradación del TNT ..... 24
1.5.1 Nitrorreductasas ..... 28
1.5.2 Familia de proteínas de las "*Old Yellow Enzyme*" ..... 35

**2. Problema y justificación** ..... **39**

**3. Objetivos** ..... **41**
3.1 Objetivo general ..... 41
3.2 Objetivos Específicos ..... 41

**4. Materiales y Métodos** ..... **42**
4.1 Origen de las cepas ..... 42
4.2 Construcción del banco de trabajo ..... 43
4.3 Caracterización de las cepas T30A y T30B ..... 43
4.3.1 Características fenotípicas de las cepas T30A y T30B ..... 43
4.3.2 Análisis del gen 16S rRNA de las cepas T30A y T30B ..... 43
4.3.3 Curvas de crecimiento y monitoreo de la degradación de TNT ..... 45
4.4 Establecimiento de las condiciones de los ensayos enzimáticos ..... 46
4.4.1 Obtención de la biomasa microbiana ..... 46

4.4.2 Obtención de extractos crudos ....46
4.4.3 Cuantificación de TNT por HPLC....46
4.4.4 Cuantificación por Cromatografía de Gases (GC)....47
4.4.5 Cuantificación del TNT por espectrofotometría....47
4.4.6 Cuantificación de $NO_2$....48
4.5 Evaluación de las actividades Enzimáticas....49
4.5.1 Determinación de la actividad TNT-reductasa en las cepas T30A y T30B 49
4.5.2 Determinación de la actividad TNT-reductasa en los extractos citoplasmáticos y de membrana....50
4.6 Identificación de los genes putativos asociados a la degradación del TNT....50
4.6.1 Diseño de iniciadores degenerados....50
4.6.2 Amplificación por PCR usando iniciadores degenerados....51
4.6.3 Secuenciación e identificación de los genes putativos en la cepa T30A52

**5. Resultados....53**
5.1 Características de las cepas T30A y T30B....53
5.2 Actividades enzimáticas....59
5.2.1 Establecimiento de las condiciones de ensayo....59
5.2.2 Determinación de la actividad degradadora de TNT en las cepas *Stenotrophomonas* sp. T30A y *Rhizobium* sp. T30B....61
5.2.3 Determinación de la fracción celular a la cual está asociada la actividad enzimática....65
5.3 Identificación de los genes putativos asociados a la degradación del TNT....66
5.3.1 Secuenciación e identificación de los genes putativos de las en *Stenotrophomonas* sp. T30A....67

**6. Discusión....72**

**7. Conclusiones y recomendaciones....76**
7.1 Conclusiones....76
7.2 Recomendaciones....77

**A. Anexo: Composición del medio de cultivo T2....79**

**B. Anexo: Soluciones tampón o buffer....80**

**C. Anexo: Curvas de calibración....81**

**C. Anexo: Diseño iniciadores degenerados....82**

**D. Anexo: Iniciadores diseñados....85**

**E. Anexo: Amplificación productos de PCR....87**

**F. Anexo: Alineamientos múltiples secuencias OYE....89**

**G. Anexo: Cromatogramas actividades enzimáticas....90**

**Bibliografía....94**

# Lista de figuras

**Pág.**

**Figura 1-1.** Estructuras químicas de algunos nitro explosivos……..... 20

**Figura 1-2**. Biotransformación del TNT…….. 26

**Figura 1-3.** Mecanismos de liberación de nitrógeno a partir de la reducción de TNT …… 27

**Figura 1-4**. Mecanismos para la reducción de los grupos nitro por enzimas nitrorreductasas …….. 28

**Figura 1-5**. Mecanismo bi-bi ping-pong…… 29

**Figura 1-6**. Dendograma de las nitrorreductasas Tipo I…….. 33

**Figura 1-7**. Estructura tridimensional de una proteína de la familia de las OYE…….. 36

**Figura 1-8**. Formación del complejo TNT-Meisenheimer……..38

**Figura 5-1.** Dendograma basado en la secuencia de nucleótidos del gen 16S rRNA de *Stenotrophomonas* sp. T30A y las especies validadas del género *Stenotrophomonas* …….. 55

**Figura 5-2**. Dendograma basado en la secuencia de nulceótidos del gen 16S rRNA de *Rhizobium* sp. T30B y las especies validadas del género *Rhizobium* …… 56

**Figura 5-3**. Crecimiento y degradación de TNT por las cepas *Stenotrophomonas* sp. T30A *y Rhizobium* sp. T30B …… 58

**Figura 5-4**. Degradación del TNT empleando NADH a 0.33 y 0.44mM…… 60

**Figura 5-5**. Degradación del TNT empleando NADPH a 0.33 y 0.44 mM…… 60

**Figura 5-6**. Resultados de la cromatografía por GC-FID usando NADPH a 0.44 mM luego de 60 min de reacción…… 61

**Figura 5-7**. Degradación del TNT a partir de los extractos provenientes de medio con y sin TNT usando NADPH …….. 63

**Figura 5-8**.Degradación del TNT a partir de los extractos provenientes de medio con y sin TNT usando NADH…… 64

**Figura 5-9**. Actividad enzimática de las cepas T30A, T30B y el cocultivo T30 …… 65

**Figura 5-10**. Actividad enzimática en las fracciones citoplasmática y de membrana de las cepas T30A y T30B…….. 66

**Figura 5-11**. Distribución por subsistemas de la cepa *Stenotrophomonas* sp. T30A, basado en la anotación realizada por el servidor RAST…… 69

**Figura 5-12**. Dendograma de las enzimas caracterizadas pertenecientes a la familia OYE y sus homólogas en el genoma de *Stenotrophomonas* sp. T30A…… 71

# Lista de tablas

**Pág.**

**Tabla 1-1.** Propiedades fisicoquímicas del 2,4,6-Trinitrotolueno (TNT)…… 21

**Tabla 1-2.** Algunas nitrorreductasas bacterianas Tipo I…….. 31

**Tabla 1-3.** Enzimas con actividad Hidruro transferasa Tipo II…….. 38

**Tabla 5-1.** Comparación de las características fenotípicas…….. 53

**Tabla 5-2.** Descripción de las secuencias homólogas a la secuencia amplificada con los iniciadores del grupo 7 en la cepa *Rhizobium* sp. T30B……... 67

**Tabla 5-3.** Proteínas homólogas a las enzimas reportadas presentes en el genoma de *Stenotrophomonas* sp. T30A…… 70

# Lista de símbolos y abreviaturas

**ADNT:** Aminodinitrotolueno (4-amino-2,6-dinitrotolueno y 2-amino-4,6-dinitrotolueno)

**GC:** Cromatografía de gases

**HADNT:** Hidroxilamino dinitrotolueno

**HPLC**: High performance liquid chromatography

**NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido

**NADPH**: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**OYE:** Familia de enzimas de "*Old Yellow Enzyme*"

**PETN:** Pentaeritritol tetranitrato

**TNT:** 2,4,6-Trinitrotolueno

# Introducción

El 2,4,6-Trinitrotolueno (TNT) es uno de los explosivos convencionales de mayor uso en todo el mundo debido a su estabilidad y poder de detonación (Arkhavan, 2004). Éste ha sido utilizado en actividades tanto de construcción y minería, y en la fabricación de arsenal militar, alcanzando su producción más alta durante la Segunda Guerra Mundial (Steen, 2007). En Colombia, el TNT es usado principalmente en actividades mineras en los departamentos de la Guajira, César, Córdoba y Boyacá, estimándose su consumo en 210,678 toneladas para el año 2006 (https://www.indumil.gov.co, Octubre 2013).

El TNT y sus productos de transformación han demostrado ser altamente reactivos y tóxicos en varios organismos acuáticos, mamíferos, algas, plantas e invertebrados (Deneer et al., 1988). Por esta razón, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés) lo ha catalogado como un contaminante prioritario, como una sustancia mutagénica y como un posible cancerígeno (EPA, 2012). Gran parte de la contaminación se debe a su liberación accidental e intencional durante su uso, fabricación, transporte y almacenamiento, contaminando suelos y aguas, causando no solo un problema ambiental sino un gran riesgo para la salud (ATSDR 1995).

Entre los tratamientos fisicoquímicos utilizados para recuperar las zonas contaminadas, se encuentran la incineración, filtración con carbón activado y oxidación química. Sin embargo, estos tratamientos suelen ser costosos y algunas veces terminan trasladando la contaminación a otros ambientes, razón por la cual su uso es limitado. Entre las alternativas biológicas el compostaje, el tratamiento con biorreactores y biobarreras pasivas, han demostrado su eficacia en la reducción de las concentraciones de TNT (EPA 2005; CRREL 2006; ESTCP 2010).

Por lo anterior, la biorremediación ha llamado la atención como una alternativa en la remediación de ambientes contaminados. A la fecha, se han aislado diversos

microorganismos capaces de transformar el TNT tanto de manera aerobia como anaerobia.

Como parte del macroproyecto que busca el diseño de un sistema con microorganismos degradadores de TNT y tetranitrato de pentaeritritol (PETN), incorporado en un explosivo comercial; realizado en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana, se aislaron distintos microorganismos capaces de degradar TNT a partir de ambientes contaminados (Villegas, 2009). Entre éstos, el cocultivo T30 se destacó por su capacidad para degradar el 100% de TNT luego de 7 días de incubación en condiciones aerobias, por su habilidad para producir surfactantes y por su capacidad para utilizar el TNT como única fuente de nitrógeno (Ávila, 2012)

En el presente trabajo el Cocultivo T30, se encuentra compuesto por las cepas *Stenotrophomonas sp.* T30A y *Rhizobium sp.* T30B. Estos microorganismos son usualmente asociados a la rizosfera, presentan una amplia gama de actividades entre las cuales se incluyen su potencial como fijadores de nitrógeno y su capacidad para degradar compuestos xenobióticos, siendo de gran interés en los procesos de biorremediación (Binks, et al. 1995; White, et al. 1996; Antonioli, et al. 2007; Ryan, *et al*., 2009). Por lo tanto, la presente investigación se enfocó en el estudio de la transformación enzimática del TNT por las cepas T30A y T30B, como un primer paso que permita identificar las enzimas involucradas en la degradación del TNT y poder tener un mayor entendimiento de las rutas metabólicas usadas por estas cepas.

# 1. Marco Teórico

## 1.1 Explosivos

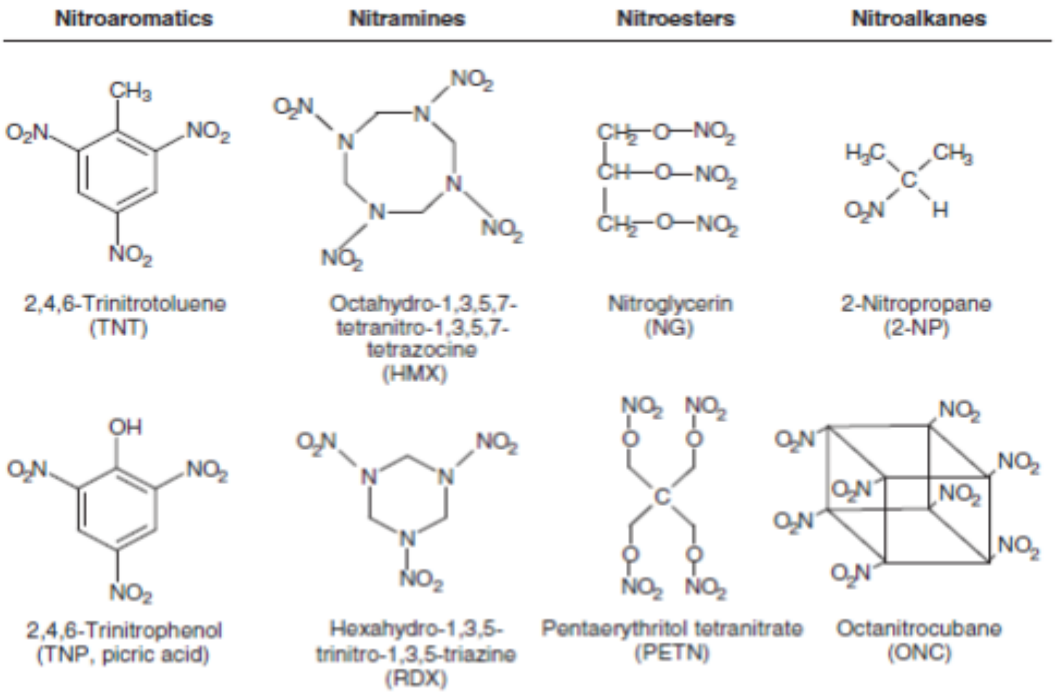
Los compuestos explosivos son sustancias químicas que bajo la influencia de un choque térmico o químico liberan grandes cantidades de energía. Una vez iniciados se descomponen rápidamente para formar un material estable junto con la liberación de calor y gases en expansión (EPA, 2002). Debido a las altas cantidades de nitrógeno y mezclas de oxígeno, durante la detonación llevan a la formación de productos gaseosos tales como dióxido de carbono, monóxido de carbono, oxígeno, nitrógeno y vapor de agua. (Arkhavan, 2004).

## 1.2 Tipos de explosivos:

Los explosivos se clasifican en dos tipos: Baja detonación y alta detonación o detonación completa. Al primer grupo pertenecen explosivos tales como la pólvora, que liberan energía a través del proceso llamado deflagración y su combustión se da a una tasa más lenta. Los explosivos de alta detonación se caracterizan por detonar a una tasa extremadamente rápida, una vez iniciados se descomponen casi instantáneamente. Dentro de este grupo se incluyen compuestos tales como el 2,4,6-Trinitrotolueno (TNT), Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX), Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina (HMX) y la nitroglicerina.

Según a las estructuras orgánicas a las cuales están unidos los grupos funcionales nitro ($NO_2^-$), los explosivos se pueden clasificar en compuestos nitroaromáticos, nitraminas (-N-$NO_2$), nitro esteres (-O-$NO_2$) y nitro alcanos (**Figura 1-1**) (Stenuit & Agathos, 2011).

**Figura 1-1.** Estructuras químicas de algunos nitro explosivos**.**




(Stenuit & Agathos, 2011)

## 1.2.1 TNT (2, 4, 6-Trinitrotolueno)

El isómero simétrico 2, 4, 6-Trinitrotolueno ($C_7H_5N_3O_6$), es un hidrocarburo aromático cristalino, producto de la nitración del tolueno, en presencia de ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrado. Sus propiedades físicas (**Tabla 1-1**) tales como un bajo punto de fusión y una baja sensibilidad, lo convierten en un compuesto química y térmicamente estable y relativamente seguro durante su manipulación (Stenuit & Agathos, 2010). Posee una estructura aromática tipo bencilo, sustituida simétricamente con tres grupos nitro y un grupo metilo, y gracias a esta localización simétrica es un compuesto poco polar, con un momento dipolar molecular de 1.37 D.

El TNT tiene una baja presión de vapor y su constante de Henry indica que tiene una baja volatilidad ($4.57 \times 1\ 0^{-7}$ atm·$m^3$/mol). El indicador de hidrofobicidad (log $K_{ow}$) es de 1.6, por lo cual el TNT puede ser móvil hacia las aguas superficiales y subterráneas (Juhasz & Naidu, 2007). El coeficiente de adsorción indica que esta molécula puede ser retenida por la materia orgánica y en presencia de arcillas en el suelo (Stenuir & Agathos, 2011).
Así mismo se caracteriza por ser altamente fotorreactivo (Lewis, e*t al.*, 1996).

**Tabla 1-1:** Propiedades fisicoquímicas del 2,4,6 trinitrotolueno (TNT). (Arkhavan, 2004).

| Propiedad | Valor |
|---|---|
| **Apariencia** | Cristales sólidos amarillo pálido a blancos |
| **Peso Molecular (g)** | 227.1 |
| **Densidad a 20°C (g/cm3)** | 1.654 |
| **Punto de fusión (°C)** | 80.8 |
| **Solubilidad en agua (mg/L, 20°C)** | 130 |
| **Energía de activación (Kcal/mol)** | 34.18 |
| **Coeficiente de partición Octanol-agua (Kow)** | 1.6 |
| **Coeficiente de adsorción carbono orgánico (Koc)** | 300 |
| **Presión de vapor a 25°C (mm Hg)** | $199 \times 10^{4}$ |
| **Gravedad específica** | 1.654 |
| **Constante Ley de Henry (atm-$m^3$/mol a 20°C)** | $4.57 \times 10^{-7}$ |

## 1.3 El TNT como contaminante

Durante el proceso de producción del TNT, se producen isómeros asimétricos (2,4,5-, 2,3,4-, 2,3,6-, 2,3,5-, y 3,4,5-TNT), que son selectivamente removidos mediante el uso de una solución de bisulfito de sodio. Las aguas residuales producto de este proceso se conocen como “aguas rojas”, éstas contienen hasta 30 compuestos nitroaromáticos distintos entre los que se encuentran aminodinitrotoluenos, dinitrotoluenos y nitrotoluenos. Estos compuestos pueden ser más o igual de móviles que el TNT y pueden terminar esparciéndose a los acuíferos y zonas adyacentes, constituyendo un riesgo para la salud y el ambiente (Stenuit & Agathos, 2010; Caballero, 2005; Snellix, et al., 2002 ).

Debido a la deficiencia electrónica del anillo aromático, el TNT es resistente a la degradación microbiana oxidativa impidiendo el ataque de las oxigenasas, que en muchos casos son las enzimas encargadas de romper la aromaticidad de la molécula (Symons & Bruce, 2006; Nyanhongo, *et al.,* 2005). En la naturaleza compuestos similares al TNT son difíciles de encontrar, por lo cual su degradabilidad es baja, convirtiéndose en compuestos ambientalmente persistentes y recalcitrantes (Stenuit & Agathos, 2011).

### 1.3.1 Toxicidad

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés), ha nombrado al TNT como sustancia peligrosa y lo ha clasificado en el grupo C, como posible carcinógeno humano (EPA). Así mismo, se ha reportado que la toxicidad en los mamíferos está asociada a los productos formados durante la reducción de los grupos nitro, gracias a las nitrorreductasas no específicas presentes en la microflora intestinal que catalizan la conversión de los grupos nitro de los compuestos nitroaromáticos a derivados nitroso e hidroxilamino (Talley, 2006). Los derivados hidroxilamino pueden interactuar con el ADN y otras biomoléculas, formando aductos a través de la esterificación con guanina, razón por la cual pueden tener efectos tóxicos y mutagénicos (Roldán, *et al.,* 2008)

La exposición humana al TNT se puede dar por inhalación, ingestión o contacto con la piel. Puede generar anemia, falla hepática, problemas en el sistema inmunológico, sistema nervioso central, dermatitis, pancitopenia, gastritis y cataratas (Toxicology Data Network. National Library of Medicine).

## 1.4 Métodos para el tratamiento de ambientes contaminados con explosivos

Existen distintos métodos para el tratamiento de los ambientes contaminados con explosivos. Estos pueden ser fisicoquímicos ó biológicos, pero su aplicación debe ser considerada sitio por sitio, puesto que cada lugar tiene características que pueden favorecer un tratamiento sobre otro (Rodgers & Bunce, 2001).

### 1.4.1 Tratamientos fisicoquímicos

- **Adsorción:** Es una tecnología de remediación comúnmente usada, que sirve para concentrar los compuestos nitroaromáticos provenientes del agua o del suelo, dentro de otro medio para su posterior tratamiento ó su disposición final. Esta tecnología no es destructiva ya que utiliza procesos de separación, los cuales incluyen resinas adsorbentes, extracción líquido-líquido, ultrafiltración, ósmosis inversa y adsorbentes no específicos, tales como el carbón activado (Maloney *et al.*, 1998)

- **Procesos de oxidación avanzada:** Es una tecnología destructiva, que utiliza agentes reactivos oxidantes tales como el peróxido de hidrógeno u ozono, con o sin la adición de un agente catalítico (luz ultravioleta). Es una tecnología efectiva para el tratamiento de aguas contaminadas con explosivos (*Spanngord* et al., 2000). Sin embargo, algunos problemas asociados con esta tecnología incluyen la formación de intermediarios químicos causados por la oxidación incompleta del compuesto original, emisiones de $NO_X$ y altos costos operacionales (Loeffler, 1998).

- **Reducción química:** Se basa en la hidrogenación de los compuestos nitroaromáticos a aminas en solución ácida. Pero este método por sí solo no es método de remediación completo porque las anilinas son tóxicas y deben ser tratadas adicionalmente. Además de ser un sistema costoso para el tratamiento de sitios contaminados, en algunos casos el catalizador se puede disolver en presencia de los explosivos (Rodgers & Bunce, 2001).

- **Incineración:** Este método se basa en el uso de altas temperaturas (>1,500°C) para la destrucción de los compuestos orgánicos. Aunque es una metodología rápida y efectiva, en algunos casos la combustión es incompleta y puede llevar a la formación de gases tóxicos y a la contaminación de otros ambientes. Así mismo, su implementación es costosa ya que requiere el uso de equipos para el transporte, la excavación y la incineración, y no se puede utilizar para la remediación de aguas (Spain*, et al.*, 2000; Esteve-Núñez*, et al.*, 2001; Kulkarni & Chaudhari, 2007).

### 1.4.2 Tratamientos biológicos

Estos tratamientos se basan en el uso de sistemas biológicos para catalizar la degradación o transformación de las moléculas recalcitrantes a compuestos menos tóxicos o inocuos (Kulkarni & Chaudhari, 2007). Entre las ventajas potenciales de estos tratamientos se incluyen su bajo costo, la facilidad de operación, la factibilidad de la biorremediación in *situ* y que se puede utilizar en la descontaminación de suelos y aguas (Rodgers & Bunce, 2001).

La biorremediación se puede dar bien sea por procesos naturales de degradación, bioestimulación y bioaumentación. En cualquiera de estos procesos, los microorganismos gracias a su versatilidad metabólica y su capacidad para adaptarse a condiciones variables en su hábitat natural, juegan un papel importante en el metabolismo de los compuestos tóxicos, a moléculas más simples o fácilmente degradables (Caballero, 2005; Kulkarni & Chaudhari, 2007).

Entre los tratamientos biológicos *in situ* más usados para la remediación de suelos contaminados con explosivos se encuentran la fitorremediación y el reactor de lodos (*Bioslurry)* (Ramos, *et al.*, 2005; Snelliz, *et al.,* 2002). En el *Bioslurrry* el suelo contaminado es excavado y colocado en un tanque que servirá como reactor, donde se mantendrán las condiciones ambientales óptimas para potenciar la degradación microbiana (Fuller, et al., 2004). En la fitorremediación, la planta extrae el TNT del suelo y lo transforma en compuestos reducidos como aminodinitrotoluenos (ADNT), diaminodinitrotoluenos (DNT) e hidroxilaminos, encontrándose en los tejidos de la planta y en mayor proporción en las raíces. Para mejorar este proceso se han clonado las enzimas capaces de degradar estos compuestos, para ser posteriormente incorporadas en plantas, incrementando de esta manera los porcentajes de remoción (Caballero, *et al.,* 2005).

## 1.5 Biodegradación del TNT

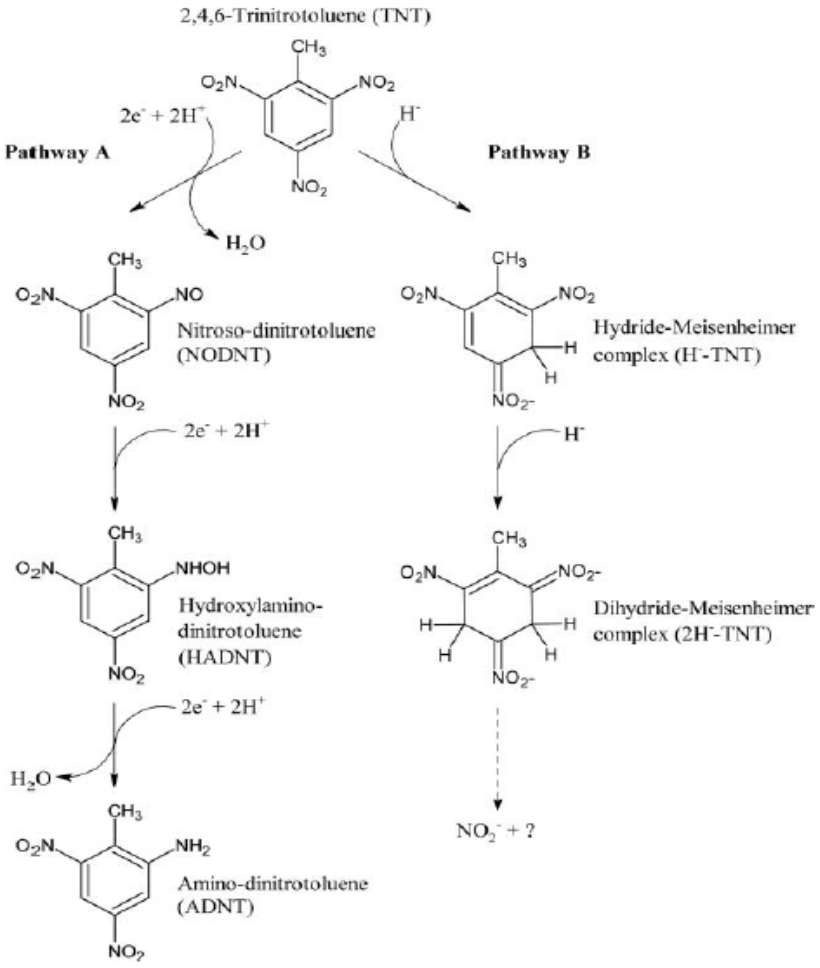
La estabilidad química de los compuestos nitroaromáticos se basa en la deslocalización de los electrones en el anillo aromático. El grupo nitro existe como un híbrido de resonancia, pues la electronegatividad del oxígeno es mayor que la del nitrógeno, lo cual origina la polarización de enlace N-O, confiriéndole una carga parcial positiva al átomo de

nitrógeno. La presencia del grupo metilo actúa como donador de electrones dentro del sistema aromático π- ē, confiriéndole un carácter electrofílico al núcleo aromático, esto sumado al estado de oxidación +III del nitrógeno, hacen que la molécula sea susceptible a la reducción y no la oxidación. (Caballero, 2005; Stenuit & Agathos, 2011).

A pesar de esta estabilidad, los microorganismos han encontrado la manera de atacar la molécula y producir intermediarios que puedan ser aprovechados (Spain, 1995). La mayoría de estas transformaciones se da por cometabolismo, el cual es un proceso no beneficioso para la célula, en contraste con la degradación beneficiosa, donde el microorganismo puede obtener carbono, nitrógeno y/o energía a partir del sustrato, por lo tanto, la degradación del contaminante depende del o los sustratos disponibles para el crecimiento en ambientes contaminados (Stenuit, *et al*., 2005)

La reducción del TNT se puede dar por dos vías reductivas: (1) Reducción del anillo aromático mediante la adición de iones hidruro ($H^-$) para generar los denominados complejos hidruro Meisenheimer, catalizado por enzimas con actividad hidruro transferasa; (2) Reducción del grupo $NO_2^-$ a derivados hidroxilamino o amino, por medio de la transferencia de pares de electrones mediado por enzimas con actividad nitrorreductasa (**Figura 1-2**) (Nyanhongo, *et al.,* 2005, Symons & Bruce, 2006, Kulkarni & Chaudhari, 2007, Roldán*, et al.*, 2008). Como producto de esta reducción se puede liberar nitrito ($NO_2^-$) o amonio ($NH_4^+$), el cual puede ser aprovechado para el crecimiento bacteriano por la vía de la glutamina-glutamato sintetasa (GS-GOGAT) (Roldán*, et al.*, 2008; Stenuit & Agathos, 2010). Estas reacciones son catalizadas por enzimas pertenecientes a la familia de las "*Old Yellow Enzyme*" (OYE) y nitrorreductasas.

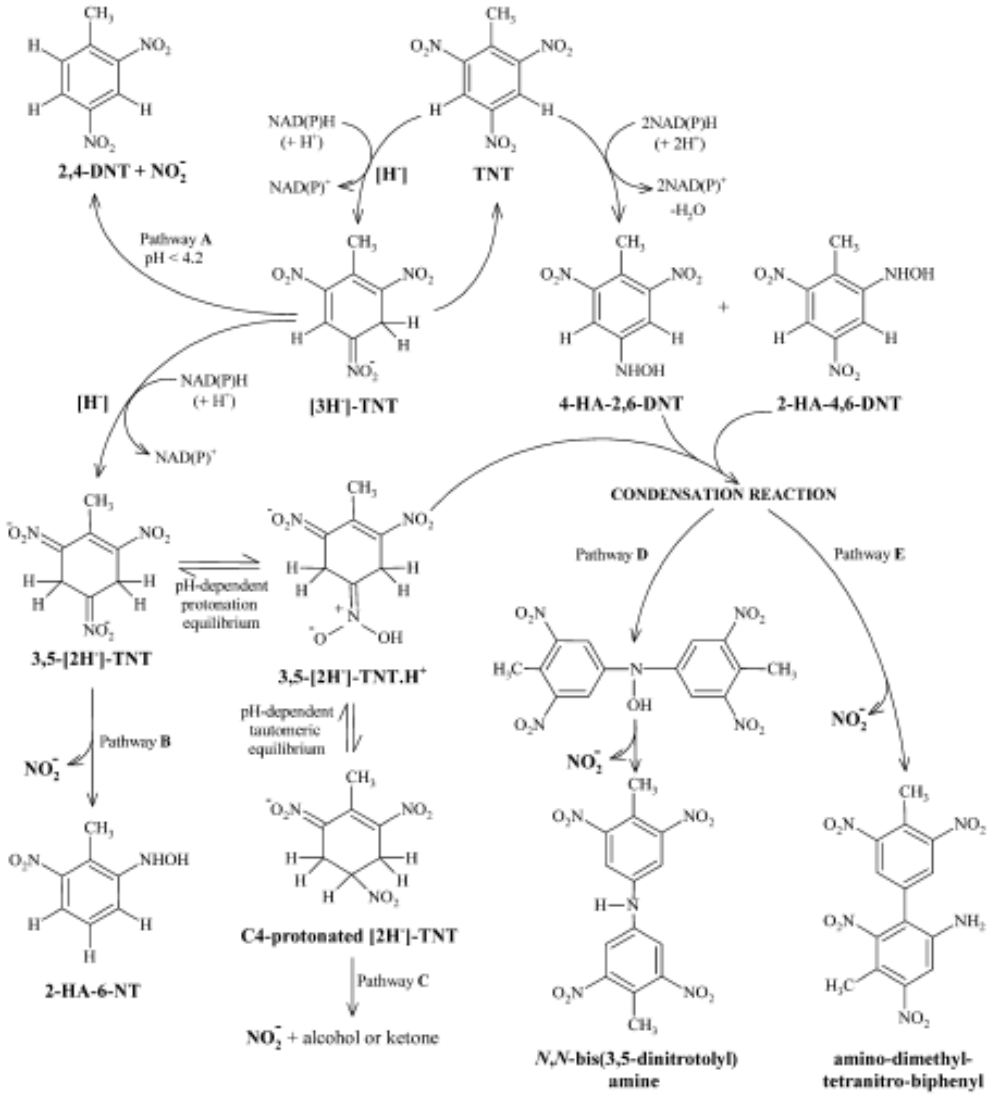
**Figura 1-2:** Biotransformación TNT. A) Reducción del grupo $NO_2^-$ B) reducción del anillo aromático. (Tomado de Symons y Bruce, 2006)




Entre los mecanismos de liberación de nitrógeno conocidos a partir de la reducción del TNT, se encuentran la condensación de los isómeros de hidroxilamino dinitrotolueno (HADNT) con los complejos dihidruro-Meisenheimer, los cuales dan lugar a la formación de diarilaminas secundarias y $NO_2^-$, como productos finales. Esta reacción es catalizada prinicipalmente por las enzimas pertenecientes a la familia de las "*Old Yellow Enzyme*" (OYE) (Dillewijn, *et al*., 2008). Otro mecanismo consiste en la reducción parcial de uno o más grupos nitro de TNT a derivados hidroxilamino, con la subsecuente liberación de $NH_4^+$, a través del reordenamiento de Bamberger (Vorbeck, *et al*., 1998). En este reordenamiento, que es catalizado por una mutasa liasa, el hidroxilamino de arilo sufre la ruptura del enlace NH–OH para convertirse en un compuesto fenólico a través de un reagrupamiento intramolecular, donde el grupo –OH derivado del hidroxilamino pasa a la

posición *ortho* del anillo aromático (**Figura 1-3**) (Vorbeck, et al., 1998; Stenuit & Agathos, 2010).

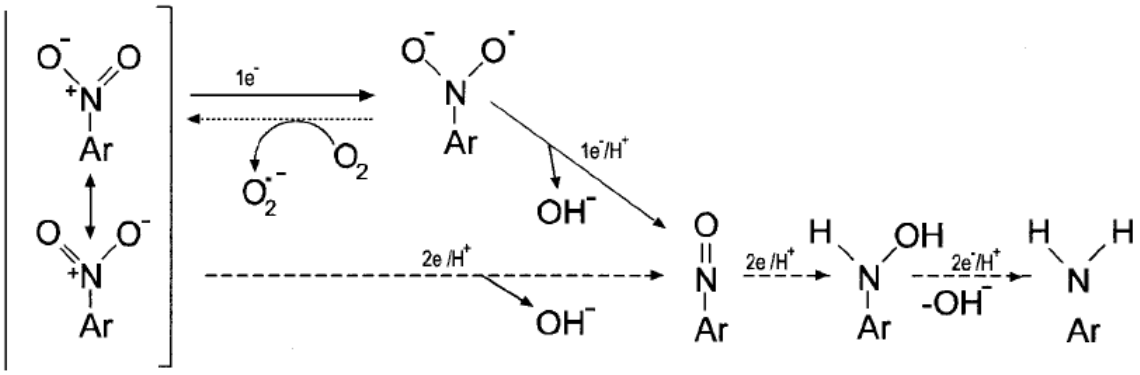
**Figura 1-3:** Mecanismos de liberación de nitrógeno a partir de la reducción del TNT (Stenuit & Agathos, 2010)



## 1.5.1 Nitrorreductasas

Los miembros de este grupo son flavoproteínas que pueden usar el NADH y/o el NADPH como donador de electrones. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y estudios bioquímicos y cinéticos han revelado que pueden catalizar reducciones en una amplia variedad de sustratos, incluyendo compuestos nitroaromáticos y nitroheterocíclicos, quinonas, flavinas y algunos iones tales como el $Fe_3^+$ y $CrO_4^{2-}$ (Roldán, *et al.,* 2008). Las nitrorreductasas se dividen en dos grandes grupos (**Figura 1-4**) en función de su capacidad para metabolizar los grupos nitro en presencia de oxígeno: Las del Tipo I (insensibles al oxígeno), y Tipo II (sensibles al oxígeno).

**Figura 1-4:** Mecanismos para la reducción de los grupos nitro por enzimas nitrorreductasas. Nitrorreductasas Tipo I (Línea punteada), Nitrorreductasas Tipo II (Línea sólida) (Tomado de Esteve-Nuñez, *et al.*, 2001).

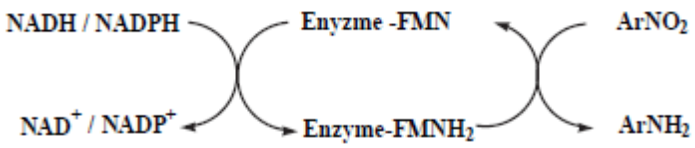



- **Nitrorreductasas Tipo I (Insensibles al oxígeno; nitrorreductasas clásicas)**

Este grupo de enzimas reducen el TNT mediante la adición secuencial de pares de electrones, dando lugar a la formación de derivados nitroso como primer intermediario, seguido de dos transferencias consecutivas de electrones, produciendo derivados hidroxilamino y aminas aromáticas (**Figura 1-4**). Algunas veces los productos nitroso e hidroxilamino que se forman como intermediarios, pueden reaccionar entre sí en presencia de oxígeno y producir azoxinitrotoluenos que son más tóxicos que el compuesto original (Caballero, 2005).

Estas enzimas presentan una amplia especificidad de sustratos y catalizan la reducción de diferentes nitrocompuestos utilizando un mecanismo bi-bi ping-pong (**Figura 1-5**). En este mecanismo tanto el donador de electrones como el sustrato compiten por el centro activo, es decir que la entrada de uno de los elementos impide la entrada del otro. Por lo tanto, consiste en una primera cesión de electrones desde el donador NADH/NADPH hasta el Flavín mononucleótido (FMN) reduciéndolo, este a su vez los electrones para reducir el grupo nitro del sustrato nitroaromático (Nyanhongo, *et al.,* 2005; Roldán, *et al.,* 2008).

**Figura 1-5.** Mecanismo bi-bi ping-pong. (Tomado de Nyanhongo, *et al.,* 2005)




La mayoría de las nitrorreductasas, por lo general son proteínas globulares homodímericas (24-30 kDa), utilizan el FMN como cofactor y presentan dominios conservados en los sitios de interacción con el donador de electrones NAD(P)H y el sustrato (Roldán, *et al.* 2008). Estas enzimas comparten un núcleo central hidrofóbico formado por cinco hebras de hojas β rodeadas por hélices α. El grupo prostético FMN se encuentra unido en bolsillos a la interfaz del dímero e interactúa con los residuos de ambos monómeros, formando puentes de hidrógeno entre una subunidad y el núcleo hidrofóbico. Este conjunto de interacciones es bien conservado en todas las nitrorreductasas e involucra residuos idénticos o similares (Koike, *et al*., 1998; Parkinson, *et al*., 2000; Kobori, *et al*., 2001; Lovering, *et a*l., 2001; Haynes, *et al*., 2002).

La amplia especificidad de sustrato de las nitrorreductasas, se puede deber a la plasticidad de la hélice que contiene el residuo Phe124, el cual es altamente conservado y muestra una elevada variabilidad en la posición para el alojamiento de sustratos de diferentes tamaños. Así mismo, este residuo junto con los residuos Tyr68, Phe70 y Tyr123, participan en la unión al sustrato y pueden variar entre nitrorreductasas,

sugiriendo que pueden desempeñar un papel en la determinación de la especificidad de sustrato de las enzimas (Lovering, *et al*., 2001; Haynes, *et al*., 2002).

Las nitrorreductasas pueden ser inhibidas por la presencia de dicumarol el cual es un inhibidor de la actividad diaforasa. Además pueden ser inhibidas por la presencia de p-hidroximercuribenzoato, ácido p-iodosobenzoico, ázida de sodio e iones $Cu^{2+}$ (Roldán, *et al.* 2008). Un ejemplo de algunas de las nitrorreductasas del Tipo I se presenta en la **tabla 1- 2.**

**Tabla 1-2:** Algunas nitroreductasas bacterianas del Tipo I

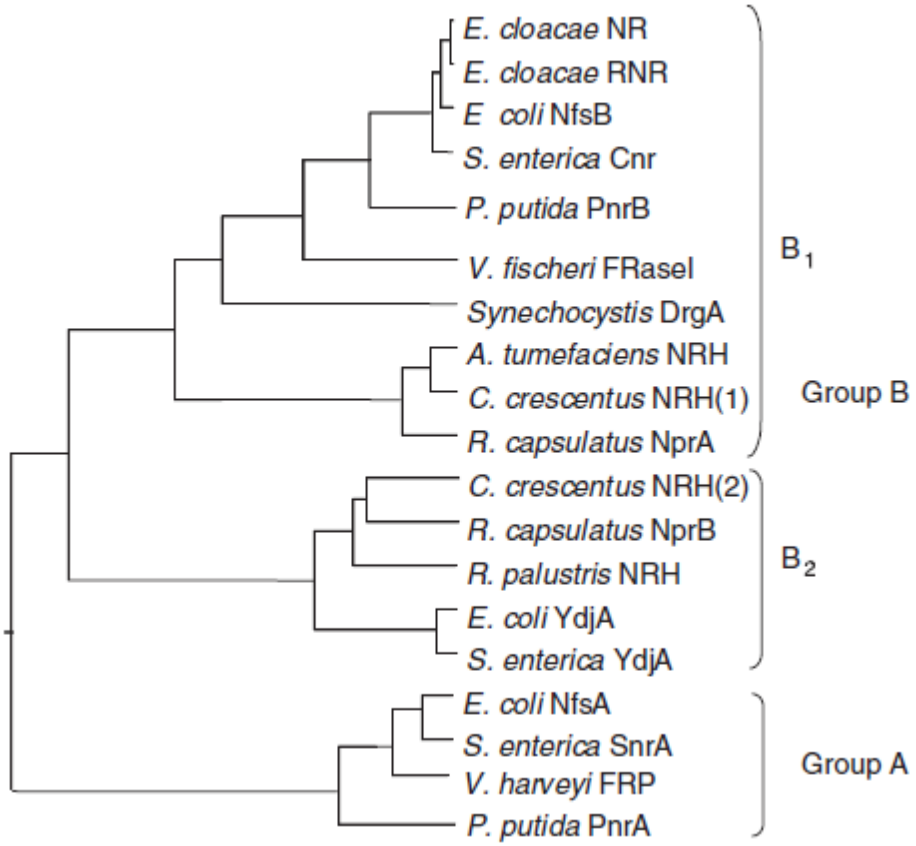
| Enzima | Organismo | Sustratos principales | Productos de la degradación de TNT | Donador de electrones | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|
| NADPH-nitrorreductasa *PnrA* | *Pseudomonas putida JLR1* | TNT, dinitrotolueno (DNT), nitrotolueno, nitrobenzoato, dinitroanilina. | 4-Hidroxiamino dinitrotolueno (HADNT) | NADPH | Caballero, *et al.,* 2005 |
| NAD(P)H-nitrorreductasa *PnrB* | *Pseudomonas putida* JLR11 *Pseudomonas sp.* HK-6 | TNT | 4-HADNT. | NADH y NADPH | Caballero, *et al.,* 2005; Hyung-Yeel, *et al*., 2007 |
| NADPH-nitroreductasa. *NfsA* | *Escherichia coli Salmonella typhimurium* | Nitrofurazonas, cromato y otros nitrocompuestos | 2-HADNT | NADPH | Bryant, et al., 1981; Yin*, et al.,* 2005 |
| NAD(P)H-nitrorreductasa *NfsB* | *Escherichia coli* | Nitrofurazonas, cromato y otros nitrocompuestos (incluyendo explosivos como el CL-20, CB1954) | 2,4-DNT | NADH y NADPH | Bryant, et al., 1981; Yin*, et al.,* 2005 |

**Tabla 1-2:** (Continuación)

| Enzima | Organismo | Sustratos principales | Productos de la degradación de TNT | Donador de electrones | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|
| NAD(P)H nitrorreductasa *NR* | *Enterobacter cloacae* | Nitrofuranos, nitrobencenos, quinonas, 2,4-dinitrotolueno y TNT | 4-HADNT y 2-HADNT | NADH y NADPH | Bryant & Deluca, 1991. |
| NAD(P)H-nitrorreductasa *NTRI* | *Klebsiella sp.C1* | TNT y 2,4-dinitrotolueno | 4-HADNT y 2-HADNT | NADH y NADPH | Kim, *et al.,* 2003; Kim & Song, 2005. Hyoun-Young, *et al.,* 2005. |
| NAD(P)H: FMN Oxidorreductasa *FRaseI* | *Vibrio fischeri* | TNT; 2,4-dinitrotolueno; 2,6-dinitrotolueno; | 2-HADNT y 4-HADNT | NADH y NADPH | Nyanhongo, *et al*, 2005 |
| NAD(P)H-Nitrorreductasa NprA | *Rhodobacter capsulatus* | 2,4-dinitrofenol; diversos compuestos nitroaromáticos. | HADNT | NADH y NADPH | Pérez-Reinado, et al., 2005. |
| NitA | *Clostridium acetobutylicum* | TNT y 2,4-dinitrotolueno | 2-HADNT y 4-HADNT | NADH | Kutty & Bennett, 2005. |
| NitB | *Clostridium acetobutylicum* | TNT y 2,4-dinitrotolueno | 2-HADNT y 4-HADNT | NADH y NADPH | Kutty & Bennett, 2005. |

Varios de los genes de las nitrorreductasas bacterianas se han identificado y el análisis filogenético de sus secuencias sugiere que las pertenecientes al Tipo I, pueden ser clasificadas dentro de dos grandes grupos (**Figura 1-6**) los cuales están representados por las nitrorreductasas de *Escherichia coli*, NfsA (Grupo A) y NfsB (Grupo B) (González-Pérez, *et al*., 2007; Roldán*, et al.,* 2008).

**Figura 1-6:** Dendograma de las nitrorreductasas Tipo I. (Tomado de Roldán*, et al.,* 2008)




Las nitrorreductasas del grupo A, son enzimas dependientes de NADPH y se conocen como Nitrorreductasas Mayores puesto que su tamaño es mayor de 26 kDa. Las nitrorreductasas del grupo B, son enzimas que pueden usar tanto en el NADH y el NADPH como donador de electrones y debido a que su tamaño es menor de 25 kDa son denominadas Ntrorreductasas menores (Roldán*, et al.,* 2008).

El grupo B de nitrorreductasas, está compuesto por el subgrupo B1, en el cual se agrupan las nitrorreductasas similares a NfsB de *E. coli* y en el subgrupo B2, las nitrorreductasas que no son tan similares a esta enzima (**Figura 1-6**). NfsB además de reducir el TNT, se ha empleado en la terapia contra el cáncer aumentando la sensibilidad de las células tumorales, mediante la producción intermediarios altamente tóxicos como el hidroxilamino (Race, *et al.,* 2005).

La versatilidad y multiplicidad de estas enzimas ha permitido probablemente la especialización de algunas nitrorreductasas en diferentes funciones metabólicas, con o sin la pérdida de la actividad reductasa. Algunas de estas enzimas se asocian a las rutas de degradación de diferentes compuestos nitroaromáticos, mientras que otras pueden estar implicadas en procesos tales como bioluminiscencia, biosíntesis de la coenzima B12, respuesta al estrés oxidativo ó equilibrio redox (Roldán, et al., 2008)

En cuanto a la expresión de estas enzimas, en el estudio realizado por Caballero, et *al.* (2005), se identificaron en *Pseudomonas putida* JLR11, dos nitrorreductasas (PnrA y PnrB) las cuales se expresaban de manera constitutiva, independientemente del grupo en el cual estuvieran clasificadas. En el caso de NfsA y NfsB de *E.coli*, se observó que su actividad era inducida. En NfsA, la actividad nitrorreductasa se producía en presencia de paraquat y se encontraba regulado por el sistema SoxRS, involucrado en la detección y respuesta al estrés oxidativo, minimizando los procesos del ciclo redox (Li & Demple, 1994; Liochev, *et al*., 1999; Paterson, *et al*., 2002). Así mismo, se observó que el gen *nfsA* es miembro del regulón *mar*, el cual hace parte del sistema MarRA, el cual controla la respuesta a diferentes antibióticos y contaminantes ambientales (Barbosa & Levy, 2000). En *E. coli* el gen *nfsA* y los genes adyacentes *rimK* y *ybjC*, constituyen un operón regulado por los genes *mar* y *sox* (Barbosa & Levy, 2000; Paterson, *et al*., 2002). De igual manera se demostró que la expresión del gen *nfsB* se da también a través de MarA, el cual se une a una caja *mar* localizada en la región promotora del gen *nfsB* (Barbosa & Levy, 2002).

Los sistemas regulatorios como MarRA y SoxRS, están posiblemente relacionados en el control de la expresión de otros genes nitorreductasa en otras bacterias. En *Rhodobacter capsulatus*, se identificaron dos cajas putativas mar/sox/rob, en la región promotora del

gen NprA y se observó que su expresión está regulada por el sistema MarRA y SoxRS (Pérez-Reinado, et al., 2005)

En *Escherichia coli,* la secuencia consenso de la caja *mar/sox/rob* se encuentra en las regiones promotoras de los distintos genes diana. Esta caja consta de una secuencia de 20 pb (ATNGCACNNWNNRYYAAAYN), algunos de los nucleótidos de esta secuencia pueden cambiar pero hay dos regiones altamente conservadas 1) GCAC y 2) YAA (Y= C ó T), las cuales parecen establecer los motivos de las proteínas regulatorias MarA, SoxS y Rob (Li & Demple, 1996).

- **Nitrorreductasas Tipo II (Sensibles al oxígeno)**

Este grupo de enzimas se caracteriza por la reducción del grupo nitro mediante la transferencia de un electrón, produciendo un radical nitro anión (Fig. 3). En presencia de oxígeno este radical puede reaccionar regenerando el compuesto aromático de partida.
Esto indica que la sensibilidad de este grupo de enzimas, es el resultado de la oxidación aeróbica del anión nitroaromático formado (Gómez, 2010). Por lo tanto, este grupo de enzimas puede reducir el grupo nitro de forma efectiva en ambientes anaeróbicos (Nyanhongo, *et al.,* 2009)

Se ha reportado que 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 los grupos nitro en grupos amino, hace que disminuya la deficiencia electrónica del anillo, dificultando así la reducción de otro grupo nitro. Por lo tanto para conseguir la reducción total de los grupos nitro presentes en el TNT y obtener triaminotolueno (TAT), se requieren potenciales redox inferiores a -200 mV, los cuales son característicos de ambientes anóxicos (Caballero, 2005; Esteve-Nuñez, *et al.,* 2001).

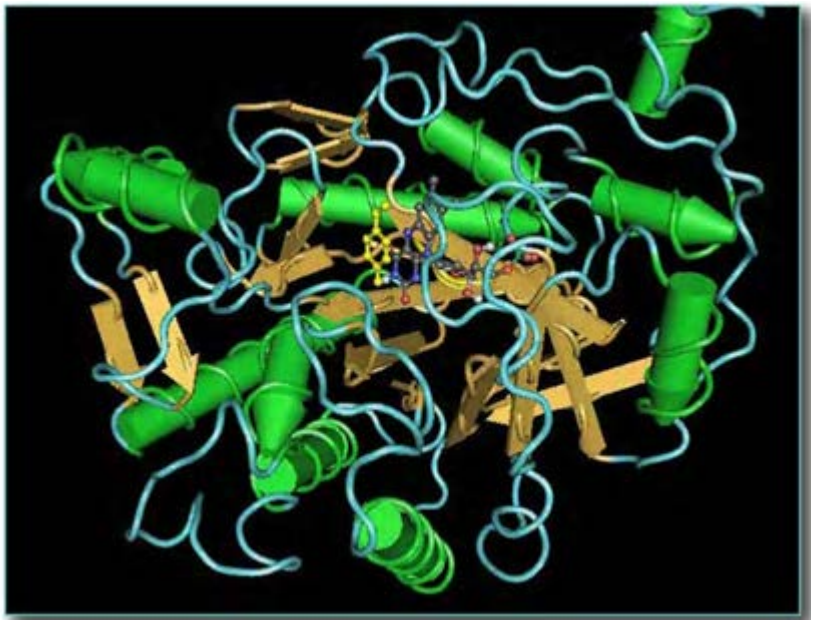
## 1.5.2 Familia de proteínas de las "*Old Yellow Enzyme*"

Esta familia de enzimas (OYE, EC 1.6.99.1) son flavoproteínas responsables por diversas transformaciones y se pueden encontrar en bacterias, levaduras, plantas y nematodos (Williams & Bruce 2002). Las OYE originalmente se aislaron de una levadura cervecera por Warburg y Christian (1932), durante los intentos para elucidar la naturaleza de las oxidaciones biológicas.

Este grupo de enzimas son homodímeros y heterodímeros de aproximadamente 45 kDa que se encuentran unidos al FMN como grupo prostético de manera no covalente (Stenuit, *et al.,* 2005; Toogood, *et al.,* 2010). En este grupo, el FMN participa en las reacciones biológicas de tipo redox sirviendo como cofactor (Stenuit, *et al.,* 2005). El reductor fisiológico de las OYE es el NADPH, mientras que los sustratos que pueden ser capaces de la reoxidación de estas enzimas son el azul de metileno, $Fe^{3+}$, quinonas, citocromo *c* y ferrocianuro (Williams & Bruce 2002; Williams, *et al*., 2004).

Las estructuras cristalográficas de algunas enzimas de este grupo han sido resueltas y se observó que todas tienen una estructura en común en forma de barril, constituida por uno o más monómeros formada por hojas β rodeadas por hélices α y un grupo prostético FMN que se une a la parte superior del barril, con una cara accesible al sustrato (**Figura1- 7**). Sin embargo, el papel fisiológico de estas enzimas no se conoce muy bien. (Caballero, 2005).

**Figura 1-7:** Estructura tridimensional de una proteína de la familia de las OYE. Las flechas indican las hojas plegadas β, y los cilindros verdes muestran las hélices α. El FMN aparece en gris junto con el sustrato amarillo (Tomado de Caballero, 2005).



Entre los miembros de esta familia se encuentran la 12-oxofitodienoato reductasa, tetranitrato pentaeritritol (PETN) reductasa, morfinona reductasa, entre otras (Dillewijn, *et al*., 2008). En el bucle que hace parte de la interfaz díméríca, los residuos 206-216, correspondientes a los motivos Tyr-Gly-Gly-Ser, son los más conservados en toda la familia, incluso en los homólogos más distantes (Williams & Bruce 2002; Williams, *et al*., 2004).

En cuanto al TNT, algunos miembros de esta familia pueden reducir los grupos nitro comportándose como una nitrorreductasas del Tipo I y en esta familia se conocen como Hidruro Transferasas Tipo I. Por otro lado, las enzimas miembro de la familia OYE clasificadas como Hidruro Transferasas Tipo II, pueden reducir tanto los grupos nitro como catalizar el ataque nucleofílico del anillo aromático del TNT, mediante la adición de iones hidruro (Dillewijn, *et al*., 2008).

- **OYE Tipo I**

Su actividad es similar a las nitrorreductasas del Tipo I, ya que pueden reducir los grupos nitro produciendo derivados hidroxilamino a partir del TNT usando el NADPH como donador de electrones. Dentro de este grupo se encuentran las nitrorreductasas XenC y XenA de *P. putida* KT2440, las cuales reducen el TNT produciendo 2-hidroxilamino-4,6-dinitrotolueno (2HADNT) (Dillewijn, *et al*., 2008).

- **OYE Tipo II**

Este grupo de enzimas pueden reducir los grupos nitro y catalizar el ataque nucleofílico del anillo aromático mediante la transferencia directa de iones hidruro, dando lugar a la formación de complejos hidruro y dihidruro-Meisenheimer (**Figura 1-8**). Estos complejos generan una solución coloreada y una carga negativa deslocalizada sobre el anillo y los grupos $NO_2^-$. Luego de la liberación espontánea de nitrito el complejo se estabiliza y recobra su carácter aromático dando lugar a la formación de diversos metabolitos desnitrados del TNT (French*, et al.*, 1998, Spain*, et al.*, 2000, Esteve-Núñez*, et al.*, 2001, Stenuit*, et al.*, 2006). Sin embargo los productos siguientes a la reducción del complejo TNT-dihidruro Meisenheimer no se conocen muy bien. En un estudio llevado a cabo por Dillewijn et al. (2008), se demostró que al condensar abióticamente este complejo junto al HADNT, se podía dar la formación de diarilaminas. En la **tabla 1-3**, se enumeran las enzimas que han mostrado tener actividad Hidruro transferasa Tipo II.

**Figura1- 8:** Formación de complejo TNT-Meisenheimer. (Tomado de Rosser, *et al.*, 2001)

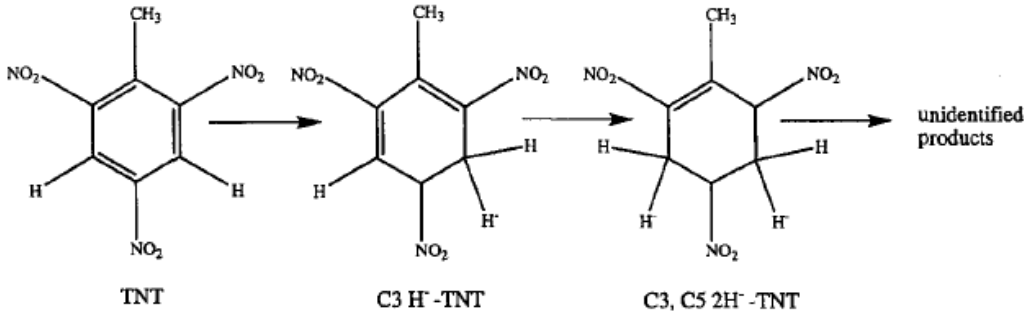



**Tabla 1-3:** Enzimas con actividad Hidruro transferasa Tipo II.

| Enzima | Organismo | Sustratos principales | Subproductos | Donador de electrones | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|
| PETN reductasa *Onr* | *Enterobacter cloacae* PB2 | PETN, GTN, TNT | Complejo hidruro Meisenheimer, HADNT | NADPH | French, *et al.,* 1996 |
| Reductasa Xenobiotica *XenB* | *Pseudomonas fluorecens* I-C | TNT y GTN | complejos hidruro y dihidruro Meisenheimer; 2-HADNT; 4-HADNT | NADPH | Pak, *et al.,* 2000. |
| N-etilmaleimida Reductasa NEM | *Escherichia coli* | TNT | complejos hidruro y dihidruro Meisenheimer; 2-HADNT; 4-HADNT | NADPH | Gónzalez-Pérez, *et al*. 2007 |
| 12-Oxifito diendoato reductasa OPR1 | *Arabidopsis thaliana* | TNT | Complejo TNT-hidruro Meisenheimer, HADNT | NADPH | Beynon, et al., 2009. |
| GTN reductasa | *Agrobacterium* | PETN, GTN | Glicerol dinitrato y mononitrato | NADH | White, et al., 1996 |

# 2. Problema y justificación

El TNT es un compuesto xenobiótico y debido a su estructura química lo convierte en un compuesto recalcitrante y persistente. Su producción, uso y liberación accidental o intencional en el ambiente, es un problema tanto a nivel ecológico, para la salud, así como un problema social.

Entre las tecnologías desarrolladas para el tratamiento de los ambientes contaminados con explosivos, las estrategias basadas en sistemas biológicos han llamado la atención como una alternativa económicamente sustentable. A la fecha se han encontrado un gran número de microorganismos capaces de degradar explosivos, sin embargo, en algunos casos la degradación puede llevar a la formación de intermediarios tales como compuestos hidroxilamino, azoxy o metabolitos diarilo, que pueden ser más tóxicos y/o más persistentes y constituir una barrera para el metabolismo eficiente del TNT.

Por lo anterior, el conocimiento de los mecanismos utilizados por los microorganismos para tolerar y transformar el TNT, identificar las rutas de degradación y las enzimas implicadas en este proceso, permite tener un mayor entendimiento sobre el comportamiento ambiental del TNT y de esta manera poder mejorar la eficiencia en los procesos de degradación, bien sea controlando las tasas de transformación, modificando las interacciones enzima sustrato o aislando estas enzimas para ponerlas en otros organismos, como en el caso de la fitorremediación.

En la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana, se han aislado microorganismos capaces de degradar explosivos a partir de ambientes contaminados con PETN y TNT, siendo este estudio el primero de su tipo en Colombia. Dentro de estos microorganismos, las cepas T30A y T30B se

destacaron por transformar el TNT en condiciones aerobias. Por lo cual, para conocer cuáles enzimas pueden estar involucradas en la reducción del TNT, los factores que pueden regular esta actividad y los genes asociados a ésta, se plantea como objetivo del presente trabajo, estudiar la transformación enzimática del 2,4,6-Trinitrotolueno en las cepas T30A y T30B.

# 3. Objetivos

## 3.1 Objetivo general

Estudiar la transformación enzimática del 2,4,6-Trinitrotolueno en las cepas T30A y T30B.

## 3.2 Objetivos Específicos

- Identificar los donadores de electrones implicados en la transformación enzimática del TNT.

- Establecer si la expresión de las enzimas asociadas a la degradación es inducida por la presencia del TNT.

- Determinar la fracción celular a la cual está asociada la actividad enzimática.

- Identificar los genes putativos asociados a la degradación del TNT en las cepas T30A y T30B.

# 4. Materiales y Métodos

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana.

**Reactivos Químicos**

El explosivo TNT (2,4,6 trinitrotolueno) empleado para realizar los ensayos de biodegradación fue proporcionado por INDUMIL. Para el análisis cromatográfico se utilizaron estándares analíticos de TNT, 4-amino-2,6-dinitrotolueno, 2-amino-4,6-dinitrotolueno, 2,6-dinitrotolueno y 2,4-dinitrotolueno (AccuStandard®; New Haven, CT) y acetonitrilo grado HPLC.

## 4.1 Origen de las cepas

Los microorganismos evaluados en el presente estudio fueron aislados de suelos contaminados con TNT y PETN [73], fueron evaluados como una sola cepa identificada como *Sphingobium* sp. T30 por Ávila (2012). Sin embargo al realizar las pruebas de pureza a los viales conservados, se observaron dos morfotipos los cuales se denominaron T30A y T30B, y su conjunto se denominó Cocultivo T30.

En el trabajo realizado por Ávila (2012), T30 se destacó por su capacidad para transformar el 100% de TNT en condiciones aerobias luego de 7 días, por su habilidad para producir surfactantes y por su capacidad para utilizar el TNT como única fuente de nitrógeno.

## 4.2 Construcción del banco de trabajo

Para la construcción del banco de trabajo las cepas se purificaron mediante siembras por agotamiento en agar nutritivo (Merck), con el fin de obtener colonias aisladas mediante siembras sucesivas hasta observar una sola morfología por cada cepa.

Las cepas una vez purificadas se cultivaron en medio mínimo denominado T2 (**Anexo A**), suplementado con fuentes de carbono (glucosa, citrato y glicerol) y 100 mg/L de TNT disuelto en acetonitrilo como fuente de nitrógeno. En este caso se observó que la presencia del acetonitrilo ejercía un efecto positivo sobre el crecimiento de los microorganismos y no afectaba su capacidad para degradar el explosivo. Cuando los microorganismos alcanzaron la mitad de la fase exponencial ($D.O_{600}$ 0.4 y 0.6), se mezclaron con el medio T2 más glicerol (40% V/V). Esta mezcla se redistribuyó en crio-viales de 2 ml. Los viales se almacenaron a -80°C y se les denominó banco de trabajo. A partir de estos viales se realizaron los cultivos para todos los ensayos en este estudio.

## 4.3 Caracterización de las cepas T30A y T30B

### 4.3.1 Características fenotípicas de las cepas T30A y T30B

Para la caracterización morfológica macro y microscópica, las cepas se cultivaron en medio T2 suplementado con explosivo (100 mg/L de TNT-acetonitrilo) y en caldo nutritivo. A partir de estos cultivos se realizaron observaciones en el microscopio (Nikon-Eclipse 50i), donde se describió la morfología, movilidad y tamaño.

A partir de cultivos no mayores a 24 h en agar nutritivo (Merck), se realizaron pruebas bioquímicas empleando el kit API® 20E (Biomériuex, Colombia). Se tomaron de 2-3 colonias de cada una de las cepas, las cuales se resuspendieron en solución salina al 0.85% (p/V). A partir de esta suspensión se inocularon los pozos siguiendo las indicaciones de la casa comercial. La placa se incubó a 30°C durante 24h.

### 4.3.2 Análisis del gen 16S rRNA de las cepas T30A y T30B

Para la extracción del ADN genómico, las cepas T30A y T30B se cultivaron en 25 ml en caldo nutritivo a 30°C durante 24h. Los cultivos se centrifugaron a 6,000 rpm por 10 min a

4°C, con el fin de concentrar la biomasa celular. Los *pellets* obtenidos se lavaron dos veces con solución salina estéril (0.85%) y se resuspendieron en 750 µL de buffer TE (Anexo B), adicionado con 15 µL de lisozima (50 mg* $ml^{-1}$, concentración inicial) incubándose durante una hora a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación, se adicionó 30 µL de dodecilsulfato sódico (SDS, por sus siglas en inglés) al 10% (v/v) y 10 µL de proteinasa K (10 mg/ml), y se incubaron a 50°C por una hora. Luego, se adicionaron 100 µL de NaCl (5M) y 100 µL de CTAB, y se incubó durante 15 min a 65°C. La extracción se realizó, adicionando a la mezcla 750 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), centrifugando durante 5 min a 13000 rpm. El sobrenadante obtenido se mezcló con 750 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 V/V) y se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm. El sobrenadante se mezcló con 1 ml de isopropanol al 70% y se dejó a -20°C durante una noche, y luego se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. Enseguida se retiró el isopropanol y el *pellet* se limpió con etanol al 70% (V/V). Éste se dejó a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. El etanol se retiró y el ADN se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se resuspendió en 50 µL de buffer TE y una vez verificada su calidad y concentración, se conservó a -20°C. (Andrews & Patel, 1996)

La concentración y calidad del ADN extraído, se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/V) diluido en buffer TAE (0.5X) (Anexo B), y se adicionó 1 µL de SYBR safe gel stain (Invitrogen), para poder visualizar el ADN en luz UV. La electroforesis se realizó en 0.5X de buffer TAE a 100V por 40 minutos y se empleó el marcador molecular Hyperladder I (Bioline).
Las imágenes del gel se capturaron usando el transiluminador GelDocTM (BioRad). Así mismo, se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm (NanoDropTM (Thermo Scientific). Se consideró de buena pureza el ADN cuando la relación A260/A280 se encontraba entre 1.8 y 2.0.

Para la amplificación del gen 16S rRNA, se usaron los iniciadores universales para Bacteria 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') y 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un volumen final de 70 µL, que contenía: Buffer clear 1X, $MgCl_2$ 1.5 mM, mezcla de dNTP's 0.2 mM, iniciadores universales 0.5 µM c/u, Taq DNA polimerasa (0.05 U) (Promega) y 4.6 µL de DNA molde. La reacción se llevó a cabo en un termociclador

(MyCyclerTM Thermal Cycler, BioRad) bajo las siguientes condiciones: Un ciclo de denaturación por 5 min a 95°C; 30 ciclos que consistían de una fase de denaturación a 94°C durante 1 minuto, una fase de anillamiento a 58°C por 40s y elongación a 72°C por 2 minutos; un ciclo de extensión final a 72°C por 5 minutos (Arbeli & Fuentes, 2007).

Para verificar los productos amplificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/V) (40 minutos a 100V) y se cuantificaron mediante comparación de la intensidad de la banda de la muestra con el marcador de peso molecular Hyperladder I. Los productos de la PCR se enviaron al Instituto de genética de la Universidad Nacional de Colombia, para ser purificados y secuenciados mediante el método de Sanger, usando los iniciadores universales para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas tenían un tamaño entre 1056 a 1062 pb, éstas se compararon usando la base de datos del proyecto ribosomal (RDP) (http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp) y el programa BLAST del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Usando el programa MEGA 5, se realizaron los alineamientos múltiples y se construyeron los dendogramas usando el método neighbor joinning con un Bootstrap de 1000 remuestreos.

### 4.3.3 Curvas de crecimiento y monitoreo de la degradación de TNT

Con el fin de establecer la degradación del TNT y el crecimiento de las cepas puras y en cocultivo, se reactivó un vial de trabajo de cada cepa en 5 ml de medio T2 suplementado con 100 mg/L de TNT-acetonitrilo y se incubó a 30°C durante 24h con agitación constante a 200 rpm. Posteriormente se transfirieron 2.5 ml de este inóculo a 25 ml de medio T2 con explosivo (100 mg/L) hasta que alcanzó una D.O.600 nm de 0.4 - 0.5. Posteriormente se escaló a 250 ml y se monitoreó durante 4 días el crecimiento microbiano, la concentración de TNT y la formación de subproductos mediante análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), como se describe en la sección 4.4.3. y el crecimiento siguiendo la D.O.600 nm, usando el espectrofotómetro Hach DR-5000.

## 4.4 Establecimiento de las condiciones de los ensayos enzimáticos

### 4.4.1 Obtención de la biomasa microbiana

A partir de un vial del banco de trabajo las cepas se reactivaron en 5 ml de medio T2 con TNT-acetonitrilo (100 mg/L) durante 24h a 30°C, con agitación constante a 200 rpm. Posteriormente los 5 mL del pre-inóculo se transfirieron a 45 mL de medio (inóculo) y se incubó hasta que alcanzó una D.O.600nm de 0.4 - 0.5, y finalmente se escaló a 450 ml (cultivo).

### 4.4.2 Obtención de extractos crudos

Cuando las cepas se encontraron a la mitad de su fase exponencial (D.O600nm 0.4 – 0.5), las células se recolectaron mediante centrifugación a 10,000 rpm/30 min/4°C. El pellet obtenido se lavó dos veces con buffer fosfato 50mM (pH 7.0) y se resuspendió en 2 ml del mismo buffer. Posteriormente, las células se congelaron y se rompieron por sonicación (Sonifier S250D – Branson) mediante pulsos de 4 segundos a una amplitud de 25%. Los restos celulares y las células que no se rompieron se removieron mediante centrifugación (13,000 rpm, 15 minutos a 4°C), (Soojhawon et al., 2005; Caballero et al., 2005) El sobrenadante obtenido se concentró utilizando las unidades de filtración para centrífuga Amicon ® Ultra – 15 (50 KDa), la fracción concentrada se denominó extracto crudo.

La concentración de proteínas extraídas se cuantificó usando el fluorometro Qubit ® el cual emplea colorantes selectivos que se tornan fluorescentes cuando se unen a las proteínas. Para las mediciones se tomaron entre 1-20 µl de muestra, cuantificando en un rango desde 0.25 µg/ml a 5 mg/ml, a partir de la curva de calibración realizada con los tres patrones que vienen con el Kit (Qubit® protein assay kit – Invitrogen).

### 4.4.3 Cuantificación de TNT por HPLC

Para cuantificar la concentración del explosivo y la formación de subproductos, a las muestras se les adicionó acetonitrilo grado HPLC (relación 1:1, acetonitrilo: muestra) y se filtraron usando filtros de nylon de 0,22 µm directamente en viales para cromatografía. Para la corrida de las muestras e utilizó el método 8330B para muestras acuosas (EPA,

2007). El volumen de inyección usado fue de 10µL, utilizando una columna Pinnacle DB C18, Restek de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 µm, con un detector de arreglo de diodos (UV 210 nm). Como fase móvil se usó acetonitrilo: agua desionizada (43:57), a un flujo de 1.5 mL/min y una temperatura de horno de 40°C.

Durante el análisis cromatográfico, para cada lote de 20 muestras, se corrieron los siguientes controles: 1) blanco reactivos (agua: acetonitrilo, 50:50), con el fin de verificar si existía algún tipo de contaminación, 2) dos estándares primarios de la curva de calibración a diferentes concentraciones para verificar la validez de la curva. Para calcular las tasas de degradación (%) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%\, degradación = \frac{Concentración\ TNT\ \text{inicial} - Concencentración\ TNT\ final}{Concentración\ TNT\ inicial}\ \text{x}\ 100$$

## 4.4.4 Cuantificación por Cromatografía de Gases (GC)

Para confirmar los resultados obtenidos por HPLC y para tratar de diferenciar los subproductos obtenidos, las muestras se corrieron por GC. La preparación de éstas fue la misma que se menciona en el apartado 4.4.4, de esta misma sección.

En este caso el volumen de inyección utilizado fue de 1 µL, usando una temperatura de puerto de 250°C. Se empleo una columna Shimadzu RDX 5 (30 m) y un detector de ionización de llama (FID), el cual se encontraba a 310°C. El programa de temperatura del horno para el análisis del explosivo fue la siguiente: 100°C durante 2 minutos; una rampa, aumentando a una tasa de 10°C por min hasta 200°C; segunda rampa, aumentando 20°C cada min hasta llegar a 280°C y una tercera rampa, aumentando 40°C por min hasta 325°C y a esta temperatura se dejó constante durante 3 min. El tiempo total de la corrida fue de 25.3 minutos.

## 4.4.5 Cuantificación del TNT por espectrofotometría

Con el fin de cuantificar el TNT de una manera rápida, que permitiera la posibilidad de trabajar volúmenes pequeños, reducir la cantidad de reactivos y reducir el costo de las pruebas, se siguió el método descrito por Oh, *et al* (2001). En este ensayo el TNT r en

presencia de NaOH 1M forma un complejo coloreado, conocido como el complejo de Janowsky el cual es visible a 447 nm con un máximo de absorción a 450 nm y estable durante 1 hora. La absorbancia a 450 nm es linealmente dependiente de la concentración de TNT.

Para esto primero se realizó un barrido espectrofotométrico entre 600 nm a 400 nm, a partir de una solución de TNT (50mM) en medio T2, a la cual se le adicionó NaOH (1M) para iniciar la reacción colorimétrica. La absorbancia máxima se observó entre 447 nm y 450 nm, escogiéndose este último como longitud de onda para las medidas cuantitativas realizadas en el equipo *Bioscreen C MBR*.

La curva de calibración de TNT se realizó en medio T2, en un rango de 5 a 100 mg/L (Vf= 150 µL), adicionando NaOH (1M) para iniciar la reacción colorimétrica, cuantificándose a 450 nm luego de 4 min de reacción. Se obtuvo una relación lineal en el rango de 5 a 90 mg/L ($R^2$=0,9941) (Anexo C). Así mismo se determinó que, ni el medio T2 ni el acetonitrilo en el cual se disuelve el TNT era interferente con la técnica.

## 4.4.6 Cuantificación de $NO_2^-$

Con el fin de conocer la concentración de nitritos liberados producto del TNT, se realizó la cuantificación de $NO_2^-$ en placas de 100 pozos para *Bioscreen*, usando el reactivo de Griess. Para esto, se realizó una curva patrón de $NO_2^-$ usando concentraciones conocidas (0.05 a 5 mg/L) de nitrito de sodio, en presencia de NADH, NADPH, buffer fosfato 50 Mm (Anexo B) y TNT (Vf= 150 µL) (Anexo C)

A esta mezcla se le adicionó ferrocianuro de potasio (0.2 mM) para detener la reacción, seguido de metasulfato de fenacina (0.5 mM), para oxidar el NAD(P)H que pudiera interferir con la formación del color al adicionar 6 µL del reactivo de Griess. Después de mezclar, la muestra se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente para asegurar la formación de un color estable y se midió la absorbancia a 540 nm (French et al., 1998; Scheideler & Ninnemann, 1986).

## 4.5 Evaluación de las actividades Enzimáticas

La evaluación enzimática se dividió en dos etapas. La primera, buscaba establecer una concentración de NADH y NADPH que permitiera ver una actividad TNT-reductasa en los extractos libres de células y mediante análisis por HPLC y cromatografía de gases (GC), poder distinguir los subproductos generados. En esta etapa se evaluó una concentración teórica (0, 44mM) y una concentración menor a la teórica (0,33 mM) de estos donadores de electrones. La concentración teórica se tomó según lo reportado por Caballero, et al. (2005), quien determinó que para reducir una mol de TNT se necesitaban 2 moles de NAD(P)H. El volumen final de la mezcla de reacción en esta etapa fue de 1 ml (n= 2).

En la segunda etapa, una vez establecidas las condiciones que permitieran ver una actividad TNT-reductasa, se cuantificó la liberación de nitritos y la reducción del TNT en los extractos crudos y en las fracciones celulares por medición colorimétrica. Los ensayos se realizaron usando el equipo *Bioscreen C MBR,* el cual es un espectrofotométro/incubadora/agitador que permite realizar mediciones en placas pequeñas de 100 pozos. El volumen final de la mezcla de reacción usado en esta etapa fue de 150 µL (n=3).

En todos los ensayos la mezcla de reacción contenía 50mM de buffer fosfato (pH 7.0), 0.22 mM de TNT y 2 mg/ml de extracto crudo. Luego de adicionar el donador de electrones, la reacción se incubó a 30 ± 2 °C durante 60 minutos. Como control se prepararon reacciones en ausencia del donador de electrones pero en presencia de extracto crudo y reacciones en presencia del extracto crudo sin el donador de electrones. Para monitorear la concentración del explosivo, se tomaron muestras por sacrificio a los 0, 15, 30 y 60 minutos de reacción. La actividad reductora de TNT se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir 1 µmol de TNT por minuto a 30°C

### 4.5.1 Determinación de la actividad TNT-reductasa en las cepas T30A y T30B

Con el fin de evaluar sí las enzimas implicadas en la transformación del TNT son inducidas por la presencia del explosivo, se cultivaron las cepas T30A y T30B de manera individual y en cocultivo en presencia del explosivo (medio T2 con TNT) y en ausencia de éste (caldo nutritivo). Cuando las cepas alcanzaron una $D.O._{600nm}$ entre 0.4 y 0.6, correspondiente a la mitad de la fase exponencial, se colectaron para obtener los

extractos crudos. Los extractos provenientes de los cultivos en medio T2 con TNT y de los cultivos obtenidos en caldo nutritivo, se utilizaron para evaluar la actividad enzimática. La mezcla de reacción para cada uno de los tratamientos contenía: 50mM de buffer fosfato (pH 7.0), 0.22mM de TNT, 2 mg/mL de extracto crudo y 0.44 mM del donador de electrones a evaluar (NAD(P)H). La cuantificación del TNT y nitritos se realizó como se mencionó en la sección 4.4.5 y 4.4.6.

### 4.5.2 Determinación de la actividad TNT-reductasa en los extractos citoplasmáticos y de membrana

Los extractos crudos provenientes de las cepas T30A y T30B, se llevaron a ultracentrifugación a 50,000 x g durante 1 hora a 4°C. El sobrenadante luego de este proceso constituyó el extracto citoplasmático y el pellet obtenido constituyo el extracto de membrana (Deive, *et al.,* 2009) El extracto citoplasmático se concentró utilizando las unidades de filtración para centrífuga Amicon ® Ultra – 15. La mezcla de reacción para cada uno de los tratamientos contenía: 50mM de buffer fosfato (pH 7.0), 0.22mM de TNT, 2 mg/mL de extracto de proteínas y 0.44 mM del donador de electrones a evaluar (NAD(P)H). La cuantificación del TNT y nitritos se realizó como se mencionó en la sección 4.4.5 y 4.4.6.

## 4.6 Identificación de los genes putativos asociados a la degradación del TNT

### 4.6.1 Diseño de iniciadores degenerados

El diseño de los iniciadores degenerados se realizó con base a lo reportado en el trabajo de Ávila (2012), en el cual según la identificación realizada T30 pertenecía al género *Sphingobium*. En ese momento no se había hecho la identificación molecular de las cepas, es por esta razón que los alineamientos y el diseño en general se basó en *Sphingobium* sp.

A partir de las secuencias de las enzimas reportadas implicadas en la reducción de TNT (Williams & Bruce 2002; Nyanhongo, et al., 2005; Barth, et al. 2007; Roldán, et al., 2008), se realizó un análisis de las regiones homólogas de éstas proteínas en los genomas reportados de *Sphingobium* sp., utilizando el algoritmo BLAST. Luego, se realizó un

alineamiento múltiple de las enzimas reportadas en la literatura contra las homólogas encontradas en los genomas de *Sphingobium* sp., mediante análisis por MUSCLE y Clustal W, utilizando la plataforma del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) y el programa MEGA 5 (Anexo C). Las regiones conservadas se convirtieron en blanco para el diseño de los iniciadores o primers. En total se obtuvieron 6 parejas de iniciadores (Anexo D).

### 4.6.2 Amplificación por PCR usando iniciadores degenerados

Con el objeto de amplificar una región conservada y específica de la familia de las OYE en las cepas T30A y T30B, se evaluaron los iniciadores que se habían diseñado para *Sphingobium* sp, a partir de las secuencias de las enzimas pertenecientes a la familia de las OYE asociadas a la reducción del TNT.

Para evaluar las parejas de iniciadores, la PCR se realizó en volumen final de reacción de 25 µl que contenía: buffer green 1X, $MgCl_2$ 2.5 mM, dNTP's 0.2mM, pareja de iniciadores 0.25 µM c/u, Taq DNA polimerasa (0.25 U) y 5µL (100 ng) de ADN molde. Esta mezcla se sometió a las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, una fase a anillamiento a 50°C por 1 minuto, elongación a 72°C por 2.5 minutos y 10 minutos a 72°C para la extensión final. Bajo estas condiciones la amplificación fue inespecífica por lo cual se optimizaron las condiciones.

Para optimizar las condiciones de la PCR se evalúo un gradiente de temperatura de alineamiento entre 55°C a 65°C, evaluándose dos concentraciones de ADN (100 – 50ng) y dos concentraciones de $MgCl_2$ (1.5 y 2.5 mM), usando el siguiente programa de corrida: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, seguido por 25 ciclos de 95°C por 1 minuto, el gradiente de temperatura (55°C – 65) por 1 minuto, elongación a 72°C por 1.10 minutos y 10 minutos a 72°C para la extensión final. Se observó la presencia de una sola banda de 1000 pb cercano al tamaño esperado, usando los iniciadores del grupo 7 (Anexo D) , usando 50 ng de ADN molde, 2.5 mM de $MgCl_2$ y una temperatura de anillamiento de 63°C. (Anexo E)

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/V) (40 minutos, 100V), usando el marcador molecular Hyperladder I (Bioline). Estos productos fueron purificados y secuenciados en el Instituto de genética de la Universidad Nacional de Colombia, mediante el método de Sanger. Las secuencias obtenidas se compararon usando el programa BLASTX del NCBI, usando la base de datos de proteínas de referencia (refseq).

### 4.6.3 Secuenciación e identificación de los genes putativos en la cepa T30A

El genoma de la cepa T30A se secuenció como una alternativa a la amplificación por iniciadores degenerados, con el fin de buscar genes putativos en esta cepa y como un genoma de referencia para futuros estudios. La secuenciación se llevó a cabo en la Universidad de Illinois usando la plataforma Illumina HiSeq2000**.**

# 5. Resultados

## 5.1 Características de las cepas T30A y T30B

A las cepas T30A y T30B, aisladas de suelos contaminados con TNT y PETN y destacadas por su capacidad para degradar TNT, se les realizó la caracterización fenotípica empleando el kit API® 20E. Entre los sustratos evaluados, la cepa T30A, a diferencia de la cepa de referencia no oxido la D-glucosa. En la cepa T30B, no se presentó oxidación de D-manitol, inositol, D-sorbitol, L-ramnosa y D-sacarosa. Las características fenotípicas de estos microorganismos y de las especies estrechamente relacionadas filogenéticamente se describen en la **Tabla 5-1**

**Tabla 5-1**: Comparación de las características fenotípicas entre *Stenotrophomonas sp.* T30A y *Rhizobium sp. T30B,* y las especies relacionadas filogenéticamente (Holmes & Roberts. 1981; Young, *et al*., 2001; Wolf, *et al*., 2002).

| **Características** | ***Stenotrophomonas sp.* T30A** | ***Stenotrophomonas rhizophila*** | ***Rhizobium sp. T30B*** | ***Rhizobium radiobacter*** |
|---|---|---|---|---|
| **Coloración de Gram** | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo |
| **Forma de la colonia** | Colonias amarillas, brillantes, redondas, margen entero, superficie lisa. | Colonias amarillas, lisas, brillantes. | Colonias blancas, redondas, opacas, convexas, viscosas. | Colonias blancas o beiges, redondas, convexas, mucilageno-sas. |

**Tabla 5-1:** (Continuación)

| Características | *Stenotrophomonas sp.* T30A | *Stenotrophomonas rhizophila* | *Rhizobium sp. T30B* | *Rhizobium radiobacter* |
|---|---|---|---|---|
| **Forma celular** | Bacilos rectos | Bacilos rectos o ligeramente curvos. | Bacilos cortos, ligeramente curvos. | Bacilos |
| **Esporas** | No | No | No | No |
| **Flagelos** | Si | Si | Si | Si |
| **Catalasa** | No | No | Si | Si |
| **L-arginina** | Si | Si | No | No |
| **L-lisina** | Si | Si | No | No |
| **L-ornitina** | No | No | No | No |
| **Citrato** | Si | Si | No | No |
| **Producción de $H_2S$** | No | No | No | No |
| **Urea** | No | No | No | Si |
| **L-triptófano** | Si | Si | Si | Si |
| **Producción de Indol** | No | No | No | No |

Con el análisis molecular del gen 16S rRNA se observó que la cepa T30A se encuentra filogenéticamente relacionada con el género *Stenotrophomonas,* siendo más cercana a la especie *Stenotrophomonas rhizophila* con un porcentaje de similitud del 99% (**Figura 5-1**). La cepa T30B está filogenéticamente relacionada con el género *Rhizobium*, con un 99% de similitud con la especie *Agrobacterium tumefaciens* (**Figura 5-2**), reclasificado como *Rhizobium radiobacter* luego de la última revisión del género (Young, et al., 2001). Con base a estos resultados la cepa T30A se denominó en este estudio como *Stenotrophomonas* sp. T30A y la cepa T30B, como *Rhizobium* sp. T30B.

**Figura 5-1**: Dendograma basado en la secuencia del gen 16S rRNA de *Stenotrophomonas* sp. T30A y las especies validadas del género *Stenotrophomonas*. Construido con el programa MEGA 5, usando el método neighbor joinning con un Bootstrap de 1000 remuestreos.

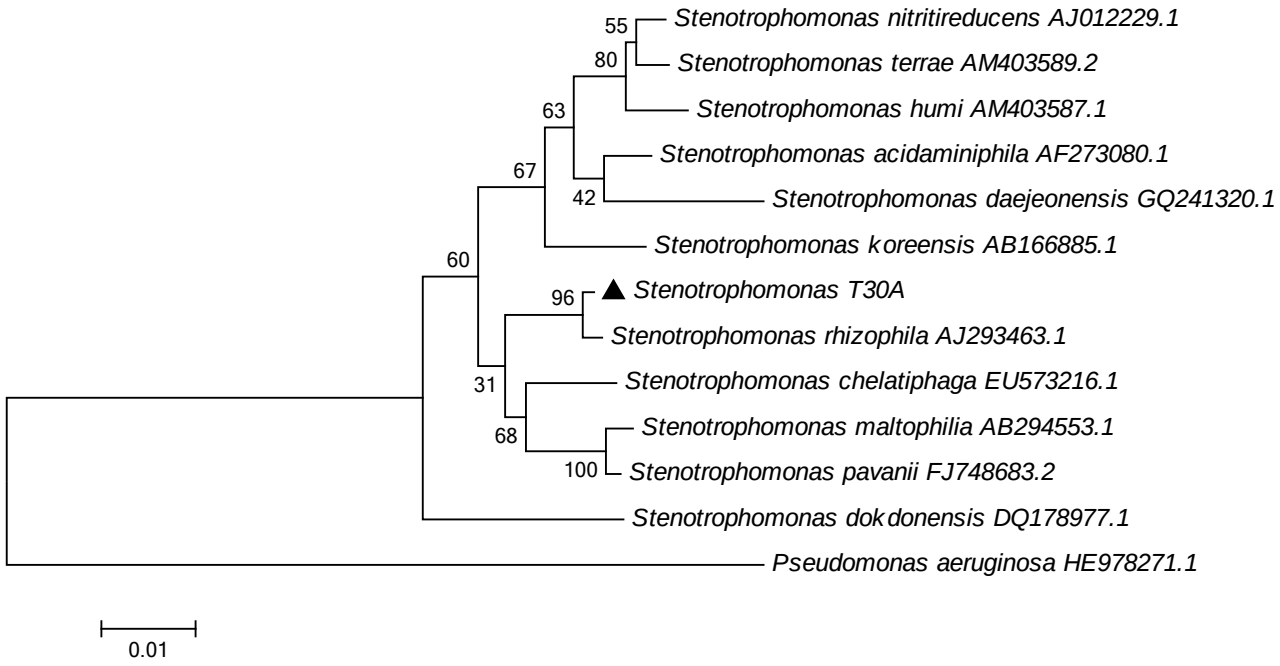
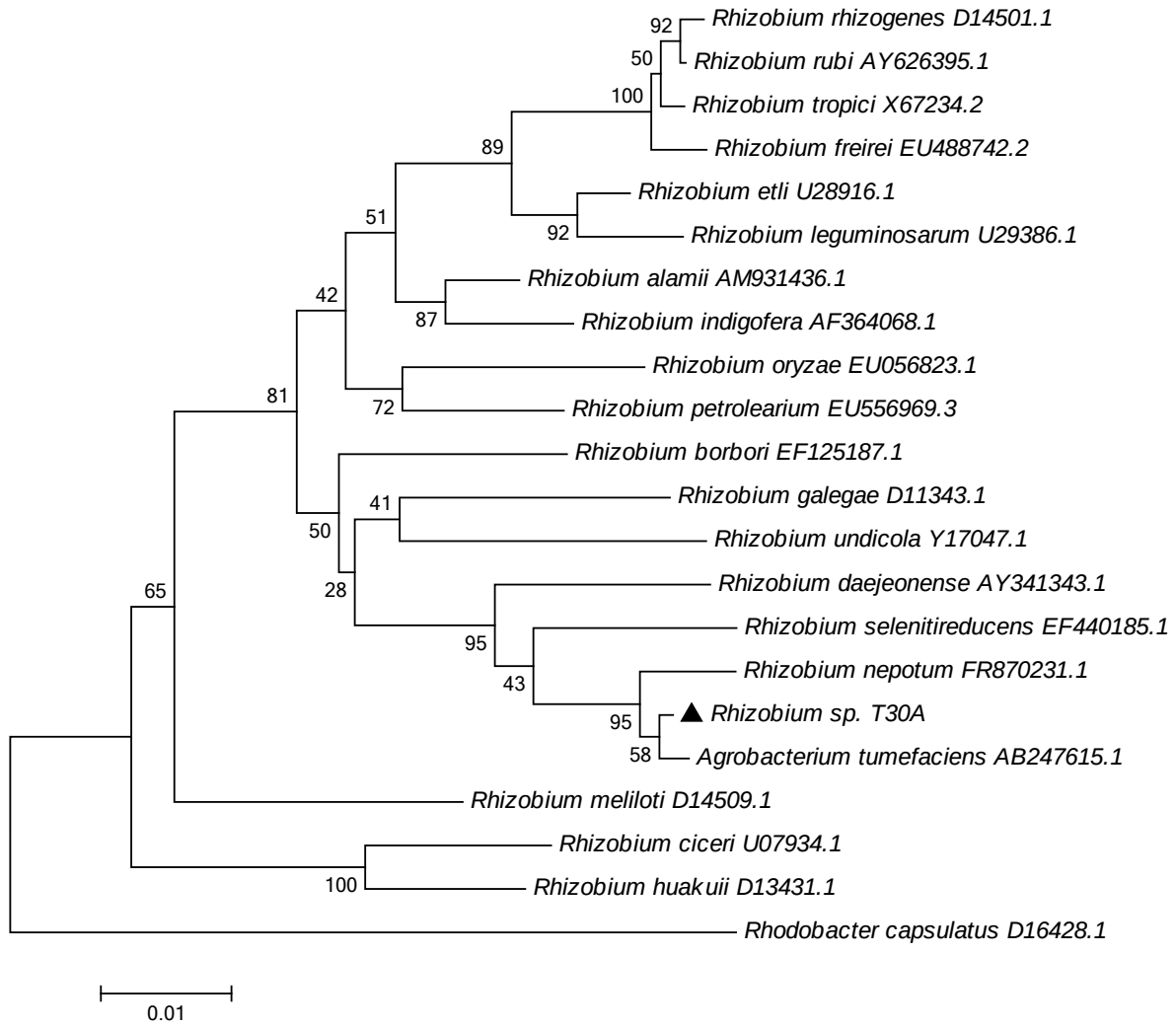


**Figura 5-2**: Dendograma basado en la secuencia del gen 16S rRNA de *Rhizobium* sp. T30B con algunas de las especies validadas del género *Rhizobium*. Construido con el programa MEGA 5, usando el método neighbor joinning con un Bootstrap de 1000 remuestreos.

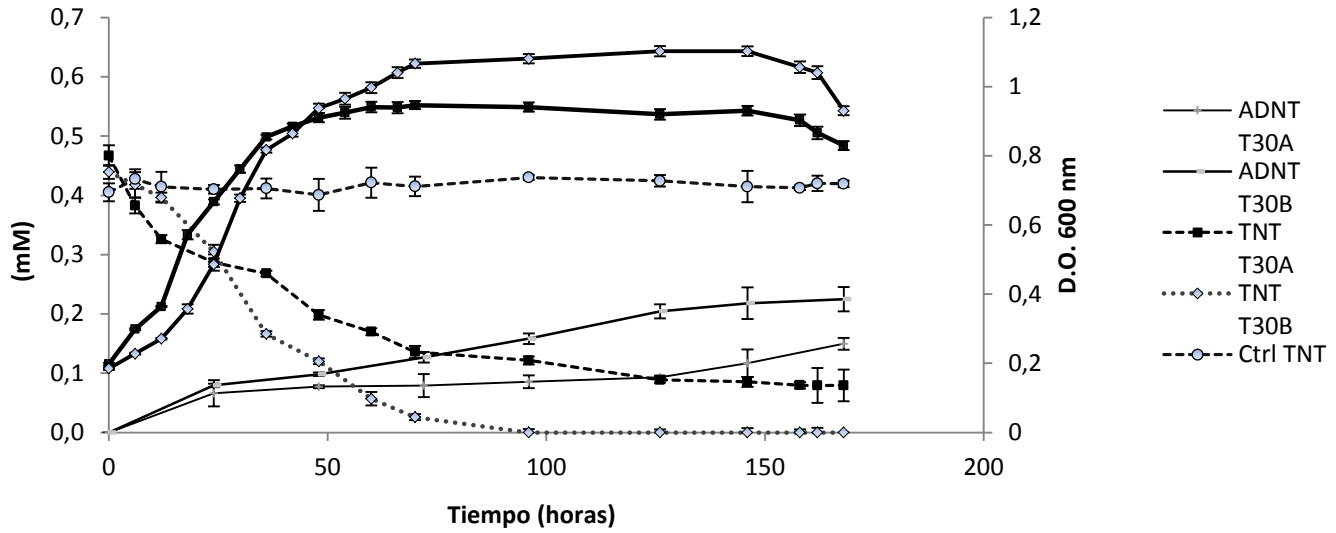



Durante el crecimiento de las bacterias en medio líquido T2 con TNT/acetonitrilo, las cepas *Stenotrophomonas* sp. T30A y *Rhizobium* sp. T30B, alcanzaron una $D.O_{600nm}$ máxima de 0.94 y 1.06, respectivamente, mientras que en cocultivo la máxima $D.O_{600nm}$ obtenida fue de 0.76. Bajo estas condiciones de cultivo, se observó una mayor D.O en las cepas puras que en cocultivo.

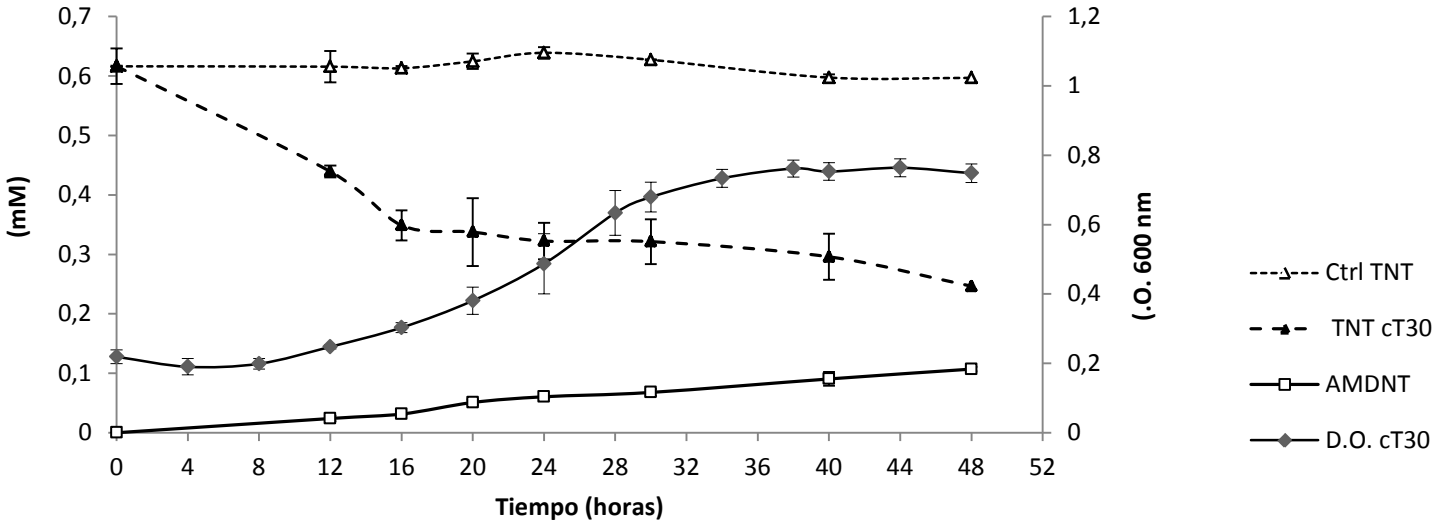
En cuanto a la degradación del TNT, se observó una reducción del 100% en la concentración de este explosivo en la cepa *Rhizobium* sp. T30B, mientras que en la cepa *Stenotrophomonas* sp. T30A se logró una reducción del 80%. La degradación en cocultivo se evalúo durante 60h y observando una reducción del 50% en la concentración del TNT. En esto tres casos, se observó que la caída más rápida en la concentración se presentó durante la fase exponencial del crecimiento. Como subproducto de la reducción del TNT se detectó la formación de aminodinitrotolueno (ADNT), tanto al evaluar las cepas de manera individual como en cocultivo, observándose una mayor acumulación de este en la cepa *Rhizobium* sp. T30B (**Figura 5-2**). En el caso de la cepa T30A, del total de TNT reducido un 38% se convirtió en ADNT, mientras que en la cepa T30B se convirtió a ADNT un 51% y en el cocultivo 55% se convirtió a ADNT.

**Figura 5-2:** Crecimiento y degradación de TNT. **A)** Cepas *Stenotrophomonas* sp. T30A y *Rhizobium* sp. T30B; **B)** Cocultivo T30. (n=3)

**A**




**B**



## 5.2 Actividades enzimáticas

### 5.2.1 Establecimiento de las condiciones de ensayo

Con el fin de establecer las concentraciones de NADH y NADPH que permitieran evidenciar una actividad degradadora de TNT, se evalúo una concentración teórica (0,44mM) y una concentración menor a la teórica (0.33 mM), usando los extractos crudos obtenidos a partir del Cocultivo T30.De las concentraciones evaluadas, la concentración teórica (0,44 mM) permitió ver una transformación del TNT en ambos donadores de electrones luego de 60 minutos de reacción.

Al usar el NADPH a una concentración de 0.33 mM el TNT se degradó en un 50% y al aumentarla a 0.44 mM se logró una degradación del 65%. Como producto de ésta actividad se detectaron bajas concentraciones de ADNT (0,054 mM) y al final de los 60 min de reacción se observó una coloración amarilla-café y la presencia de metabolitos no identificados, los cuales se pudieron apreciar mejor tras analizar las muestras por CG-FID (**Figuras 5-5 y 5-6**). Por otro lado, la degradación del TNT usando 0.33 mM y 0.44 mM de NADH fue mucho menor, alcanzando una degradación cercana al 35% al usar una concentración de 0.44 mM de NADH.En este caso no se detectaron metabolitos producto de ésta actividad frente al TNT (**Figura 5-4**). En los ensayos realizados, no hubo transformación del TNT asociado al extracto de proteínas en ausencia de NAD(P)H, ni transformación abiótica asociada a la presencia de estos donadores de electrones (Anexo G) .

En estos tratamientos, la actividad en presencia de NADPH fue mayor que en los tratamientos con NADH. En estos al evaluar el NADPH a una concentración de 0,44 mM la actividad enzimática fue de 0,54 U/mg, mientras que con NADH a la misma concentración la actividad fue de 0,293 U/mg. Al probar una concentración menor (0,33 mM) la actividad con NADPH fue de 0,43 U/mg, mientras que con NADH, no hubo actividad. Bajo las condiciones evaluadas, la actividad enzimática en los tratamientos en los cuales se uso el NADPH como donador de electrones fue dos veces mayor que los tratamientos con NADH.

**Figura 5-4**: Degradación del TNT empleando NADH a 0.33 y 0.44 mM (Control 1: TNT + NADH; Control 2: TNT + Extractos crudos) (n=3).

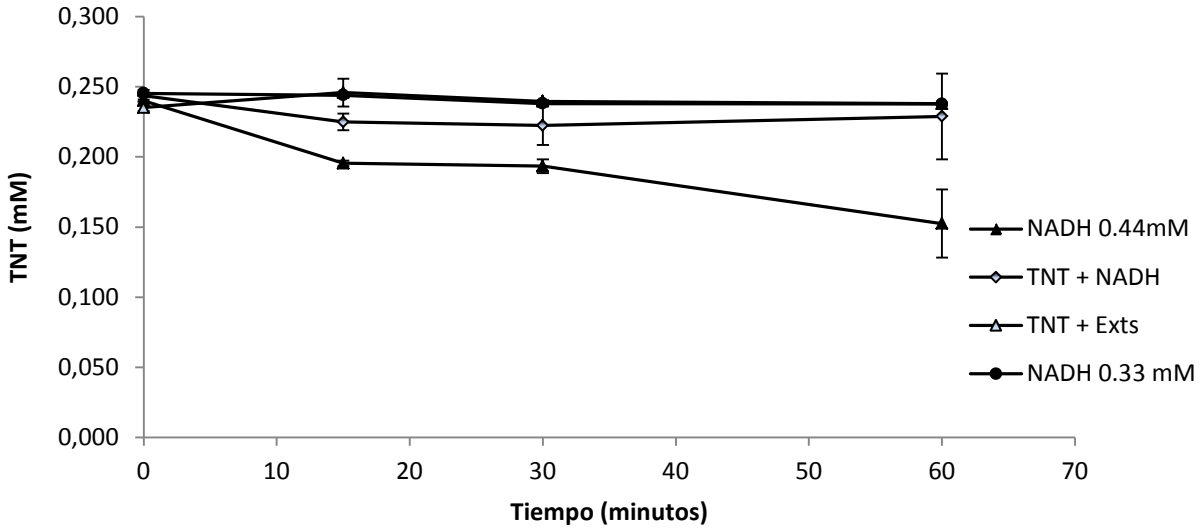



**Figura 5-5:** Degradación del TNT empleando NADPH a 0.33 y 0.44 mM. (Control 1: TNT + NADPH; Control 2: TNT + Extractos crudos) (n=3)

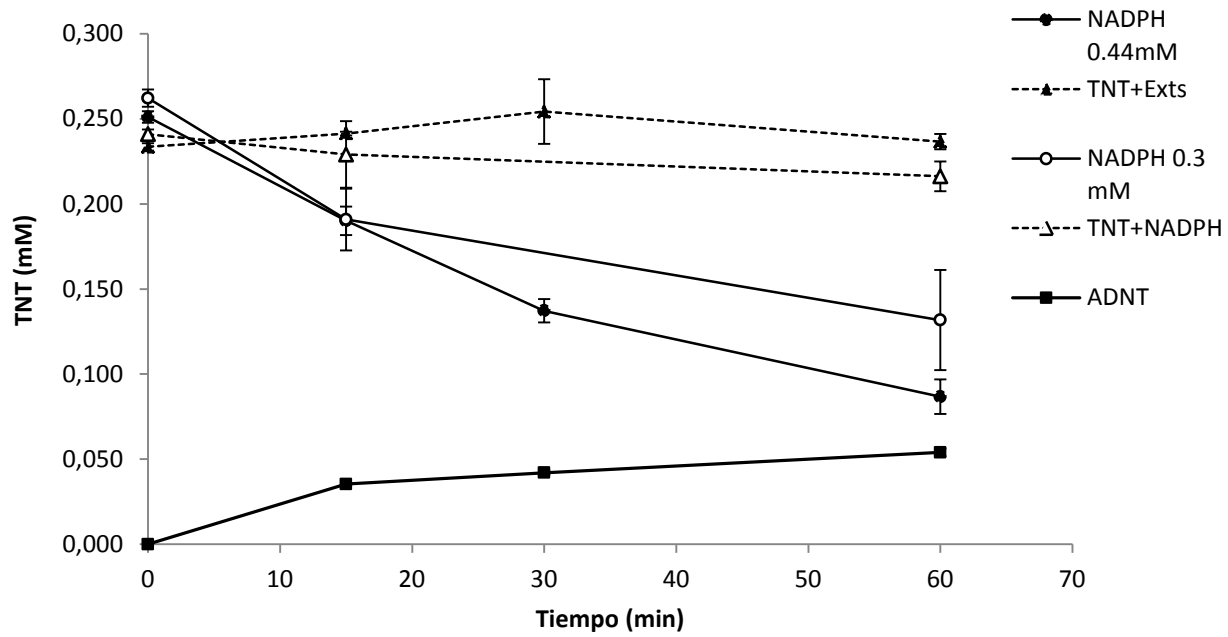
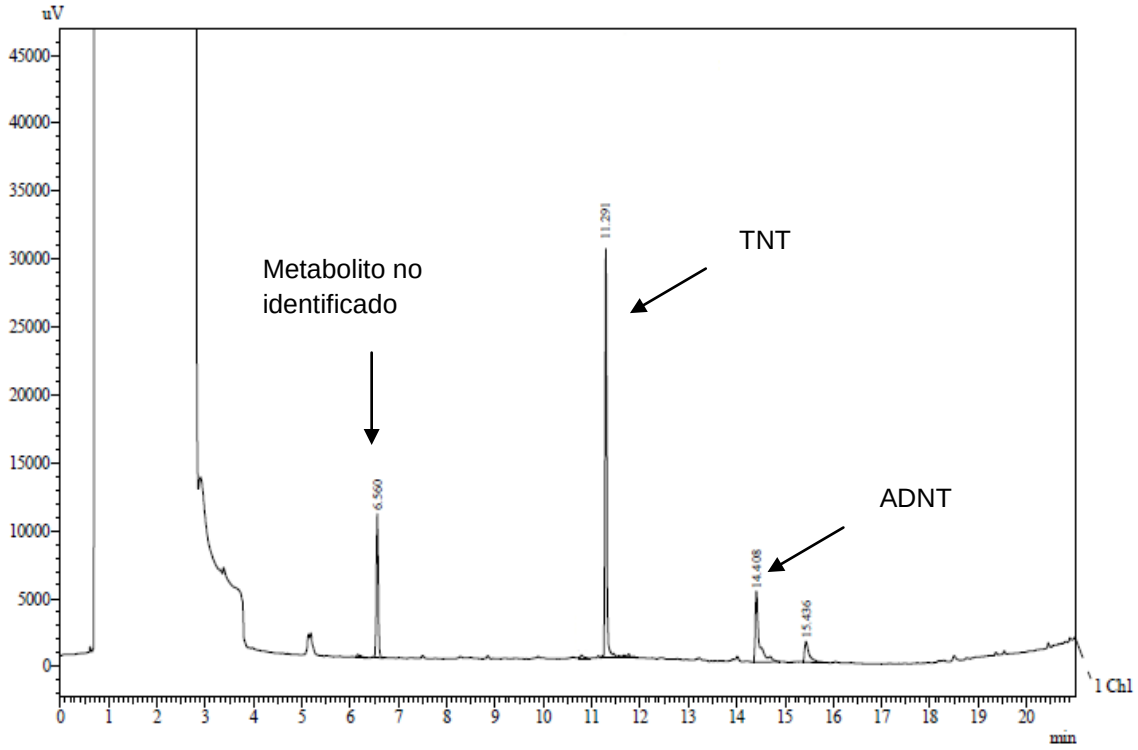


**Figura 5-6:** Resultados de la cromatografía por GC-FID usando NADPH a 0.44 mM luego de 60 min de reacción.




## 5.2.2 Determinación de la actividad degradadora de TNT en las cepas *Stenotrophomonas* sp. T30A y *Rhizobium* sp. T30B

Con el fin de establecer sí la actividad degradadora de TNT es inducida por la presencia del explosivo, los extractos crudos de las cepas *Stenotrophomonas* sp. T30A, *Rhizobium* sp. T30B y el cocultivo T30, se cultivaron en presencia del explosivo (medio T2+TNT/acetonitrilo) y en ausencia de este (caldo nutritivo). El TNT y los nitritos liberados se cuantificaron por colorimetría a 450 nm y 540 nm, respectivamente. En estos ensayos el NADH y el NADPH se emplearon a una concentración de 0.44 mM, ya que fue la concentración en la cual se observó reducción del TNT en ambos donadores de electrones.

Interesantemente, la reducción del TNT se mantuvo tanto en los extractos provenientes de cultivos en medio con y sin explosivo. En este caso al igual que en los ensayos realizados para determinar la concentración de NADH y NADPH a usar, la mayor

actividad se observó en los ensayos en los cuales se evalúo el NADPH como donador de electrones (**Figuras 5-7 y 5-9**). Los extractos de la cepa *Rhizobium* sp. T30B provenientes de los cultivos sin explosivo, presentaron la mayor actividad, observándose una reducción cercana al 50% durante los primeros 15 min de reacción. En *Stenotrophomonas* sp. T30A, esta misma reducción se logró después de 30 min y en el Cocultivo T30, se obtuvo después de 60 min de reacción. En estos ensayos la concentración de nitrito aumentó a medida que la concentración del explosivo disminuyó, liberando una mM de $NO_2$ por cada dos mM de TNT degradado (**Figura 5-7).**

En presencia de NADH la mayor degradación estuvo asociada principalmente a los extractos de la cepa *Rhizobium* sp. T30B provenientes de los cultivos no inducidos, observándose una reducción en la concentración cercana al 20%. En el Cocultivo T30 y en *Stenotrophomonas* sp. T30A, la degradación del TNT estuvo entre el 10% y 15%, tanto en los extractos cultivados en medio con y sin explosivo. En estos ensayos la liberación de nitritos fue menor a 0.05 mM, y estuvo ligada a los extractos provenientes de los cultivos no inducidos (**Figura 5-8**).

Estos resultados sugieren que la expresión de las enzimas implicadas en la degradación, presentes en las cepas *Stenotrophomonas* T30A y *Rhizobium* T30B, no dependen de la presencia del TNT. Junto a esto, se observó que el NADPH es el donador de electrones que favorece la actividad degradadora de TNT. Así mismo se evidenció que las mayores actividades estuvieron asociadas a los extractos obtenidos de los cultivos no inducidos de las cepas T30A y T30B, en presencia de NADPH (**Figura 5-9**).

**Figura 5-7:** Degradación del TNT a partir de los extractos crudos provenientes de medio con TNT (medio T2+ TNT) y medio sin TNT (caldo nutritivo), utilizando **NADPH** (0.44 Mm) como donador de electrones. (n= 3)

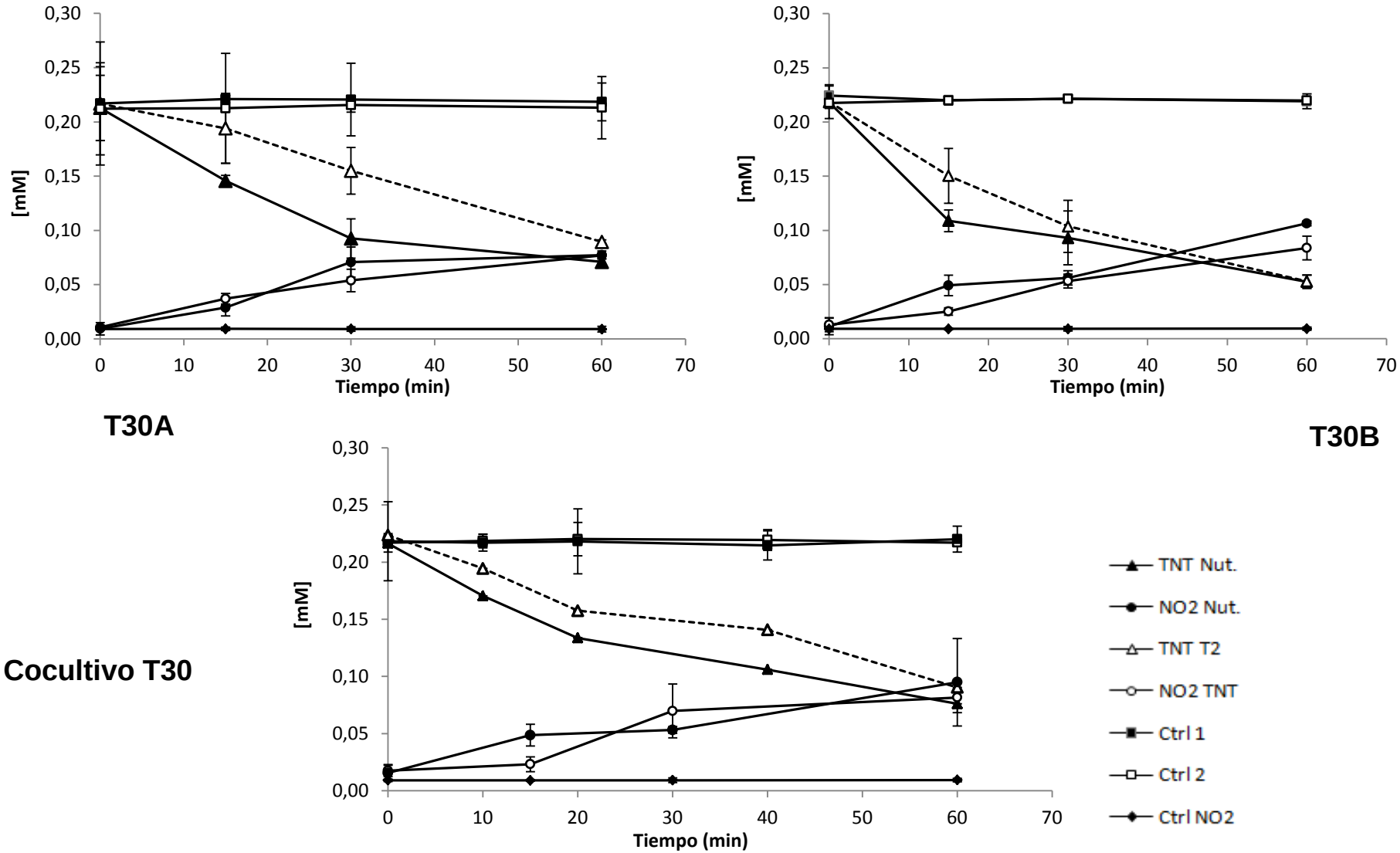


**Figura 5-8:** Degradación del TNT a partir de los extractos crudos provenientes de medio con TNT (medio T2+ TNT) y medio sin TNT (caldo nutritivo), utilizando **NADH** (0.44 Mm) como donador de electrones. (n=3)

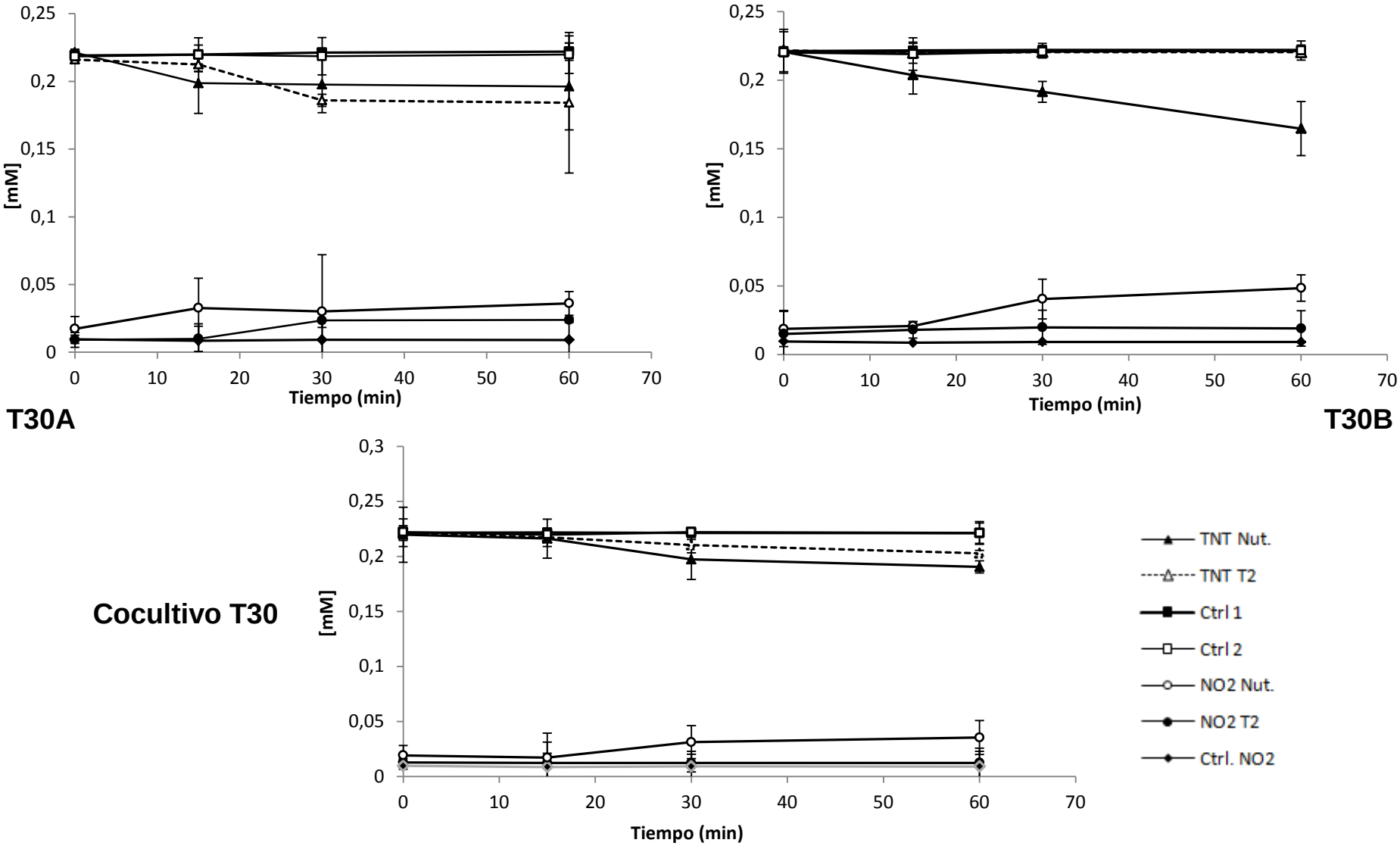
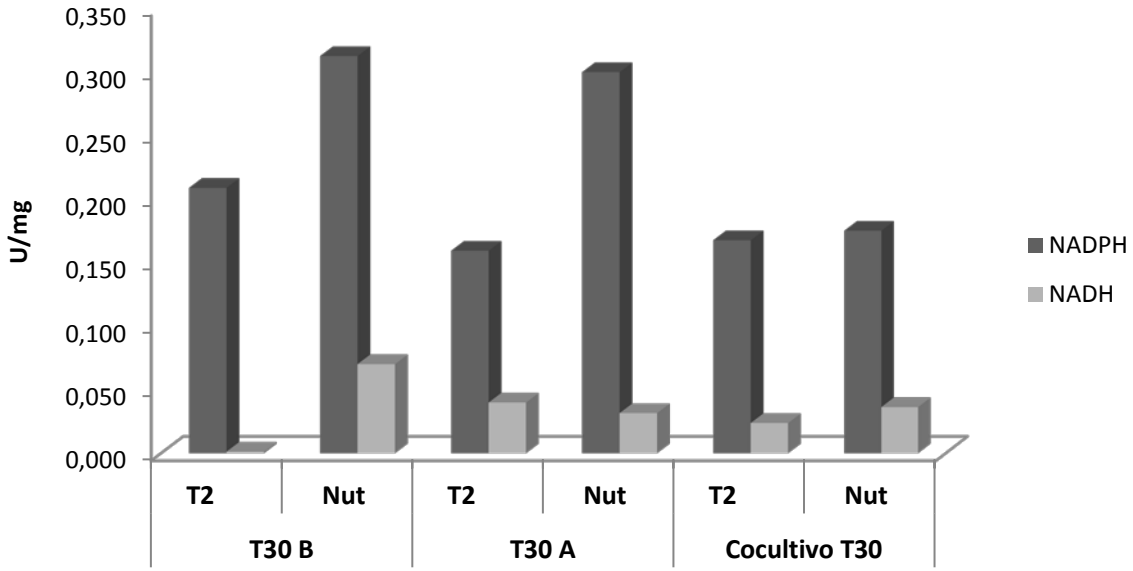


**Figura 5-9:** Actividad enzimática de las cepas **T30A, T30B y el Cocultivo T30.** Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir 1µmol de TNT por minuto a 30°C. (T2 = Medio con TNT; Nut= Medio sin TNT).

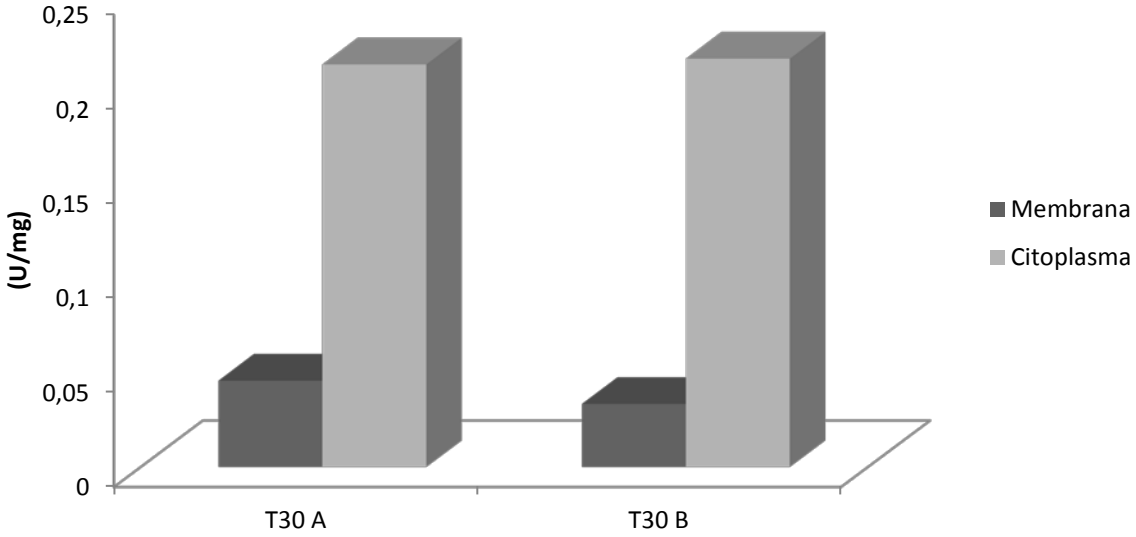



### 5.2.3 Determinación de la fracción celular a la cual está asociada la actividad enzimática

Para identificar la fracción celular a la cual está asociada la mayor actividad degradadora se evaluaron las fracciones citoplasmática y de membrana de las cepas *Stenotrophomonas* T30A y *Rhizobium* T30B. Para esta evaluación los ensayos enzimáticos se realizaron usando el NADPH como donador de electrones y dado que la actividad enzimática no depende de la presencia del TNT para su expresión, las cepas se cultivaron en medio sin el explosivo (caldo nutritivo).

Como se observa en la **Figura 5-10**, en los dos casos se detectó actividad enzimática, sin embargo, la mayor actividad se observó en la fracción citoplasmática, indicando que la actividad reductora se produce principalmente en la fracción citoplasmática.

**Figura 5-10:** Actividad enzimática en las fracciones citoplasmática y de membrana de las cepas T30A y T30B**.** Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir 1µmol de TNT por minuto a 30°C.




## 5.3 Identificación de los genes putativos asociados a la degradación del TNT

Entre las estrategias para poder identificar los genes putativos asociados a la degradación del TNT, se probaron los grupos de iniciadores que se habían diseñado a partir de la comparación del genoma de *Sphingobium* sp., contra las enzimas reportadas (Anexo D). Con este fin se optimizaron las condiciones de la PCR para así disminuir las amplificaciones inespecíficas. Entre las condiciones que se cambiaron y permitieron una mayor especificidad y la amplificación de productos del tamaño esperado fueron, la concentración del ADN molde (50 ng), el $MgCl_2$ (2.5 mM) y la temperatura de anillamiento la cual se aumentó a 63°C. Bajo estas condiciones, se probaron los iniciadores diseñados, pero de estos solo la pareja perteneciente al grupo 7 (G7F: 5'-CTCCGSCGATCCGSKCASGMAGG-3' y G7R: 5-'ATRGCGSCGMWMGGYCGC-3') logró amplificar una región de 1000 pb en la cepa *Rhizobium* sp. T30B (Anexo E). Esta pareja de iniciadores se diseñó a partir de las secuencias de las enzimas PETN reductasa (AAB_38683.1) de *Enterobacter cloacae* y oxofitodienoato (OPDA) reductasa (WP_007608434) de *Sphingobium clorophenollicum.*

El producto de PCR secuenciado se encuentra asociado a la familia de proteínas de las OYE (**Tabla 5-2**). El porcentaje de cobertura de las proteínas pertenecientes a la familia OYE fue mayor al 70%, así mismo los porcentajes de identidad fueron mayores al 40% y el párametro E-value fue menor a 2e-110. Estos resultados sugieren que la región amplificada usando los iniciadores degenerados es homóloga a la familia de proteínas de las OYE. Este resultado se confirmó al encontrar los residuos conservados Tyr-Gly-Gly-Ser, característicos de esta familia de enzimas (Anexo F)

**Tabla 5-2**: Descripción de las secuencias homólogas a la secuencia amplificada usando los iniciadores del grupo 7 en la cepa *Rhizobium* sp. T30B.

| Descripción | E-value | Identidad | Cobertura | N° Acceso |
|---|---|---|---|---|
| 1,2-oxofitodienoato reductasa | 6 e-115 | 51% | 80% | WP_007608434.1 |
| GTN reductasa | 6 e-113 | 50% | 82% | ACM27168.1 |
| N-etilmaleimida reductasa | 3 e-110 | 48% | 76% | CDI09151.1 |
| FMN oxiodreductasa | 2e-110 | 48% | 77% | YP_004279412.1 |

### 5.3.1 Secuenciación e identificación de los genes putativos de las en *Stenotrophomonas* sp. T30A

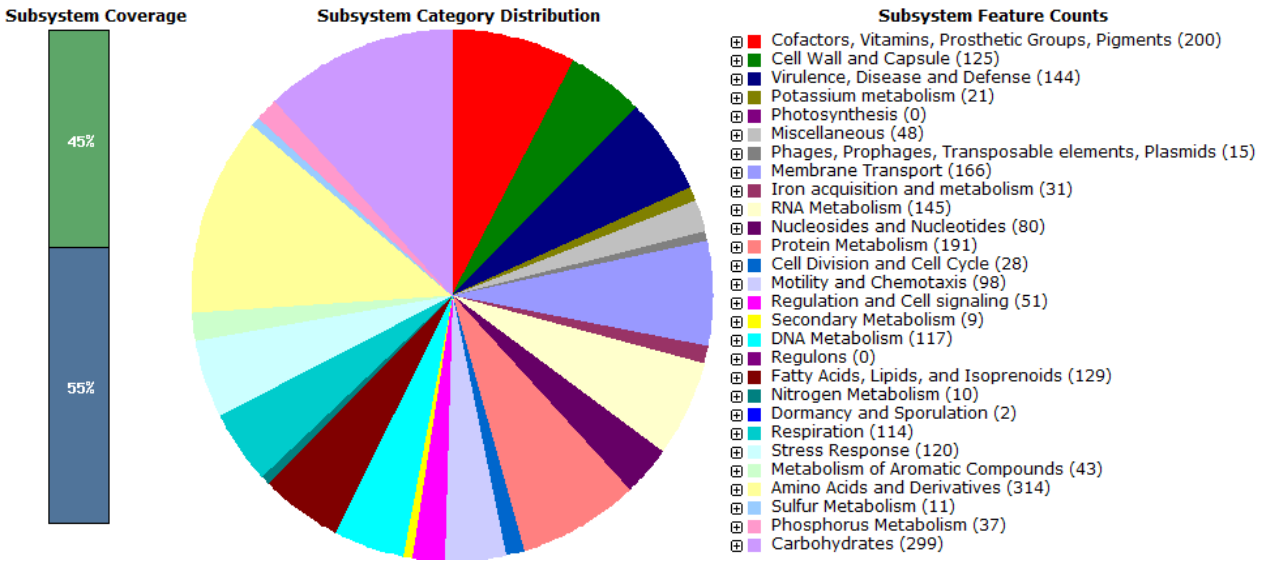
Se secuenció el genoma de *Stenotrophomonas* sp. T30A, usando la plataforma Illumina HiSeq2000, con una cobertura >45X, obteniendo 150 contigs de alta calidad, para un tamaño de 4, 466,545 pb y un total de 3,993 regiones codificantes (CDS, por sus siglas en inglés); 60 genes RNA y 46 de t-RNA.

La anotación funcional se llevo a cabo usando el servidor para la Anotación Rápida Usando Tecnología del Subsistema (RAST por sus siglas en inglés) (Aziz, *et al*., 2008). En la **figura 5-11**, se muestra la distribución por subsistemas de la cepa *Stenotrophomonas* sp. T30A. La anotación cubrió 432 subsistemas, incluyendo el 45% de

las secuencias codificantes pero dejando un 55% de la información del genoma sin clasificar dentro del subsistema, el cual es un conjunto de papeles funcionales que juntos llevan a cabo un proceso biológico especifico como una vía metabólica, parte de un complejo estructural (Ej: ribosoma), ó cualquier conjunto de roles funcionales que tengan una significancia biológica.

Del total de regiones codificantes encontradas en el genoma, solo el 63% (2,548) logró ser asociado a una función. El genoma anotado tiene 120 genes de respuesta al estrés, de ellos 12 corresponden al estrés osmótico, 70 al estrés oxidativo, 3 choque por frio, 16 choque por calor, 20 de detoxificación y 14 no clasificados. En la categoría perteneciente al metabolismo de compuestos aromáticos se encontraron 43 genes, de éstos 13 pertenecen a las vías de catabolismo periférico de compuestos aromáticos, 26 al metabolismo central de intermediarios aromáticos y 4 no clasificados. En la categoría correspondiente al metabolismo del nitrógeno se encontraron 10 genes, los cuales participan en la asimilación de amonio. En cuanto a la tolerancia a metales pesados, se identificaron 5 genes que hacen parte del operón de resistencia al mercurio, 4 genes de resistencia al cobre y 3 genes de resistencia al arsénico.

**Figura 5-11:** Distribución por subsistemas de la cepa *Stenotrophomonas* sp. T30A, basado en la anotación realizada por el servidor *RAST*.




Las secuencias de las enzimas caracterizadas sirvieron para hacer la búsqueda por comparación de genes similares en el genoma de la cepa *Stenotrophomonas* sp. T30A,

mediante el programa Psi-BLAST (Altschul, 1997). Se identificaron 5 secuencias, dentro de las cuales los mayores porcentajes de identidad se presentaron con las enzimas pertenecientes a la familia de las OYE, específicamente con las del Tipo II y una perteneciente a la súper familia Nitro FMN reductasas ó también conocidas como nitrorreductasas insensibles al oxígeno (**Tabla 5-3**).

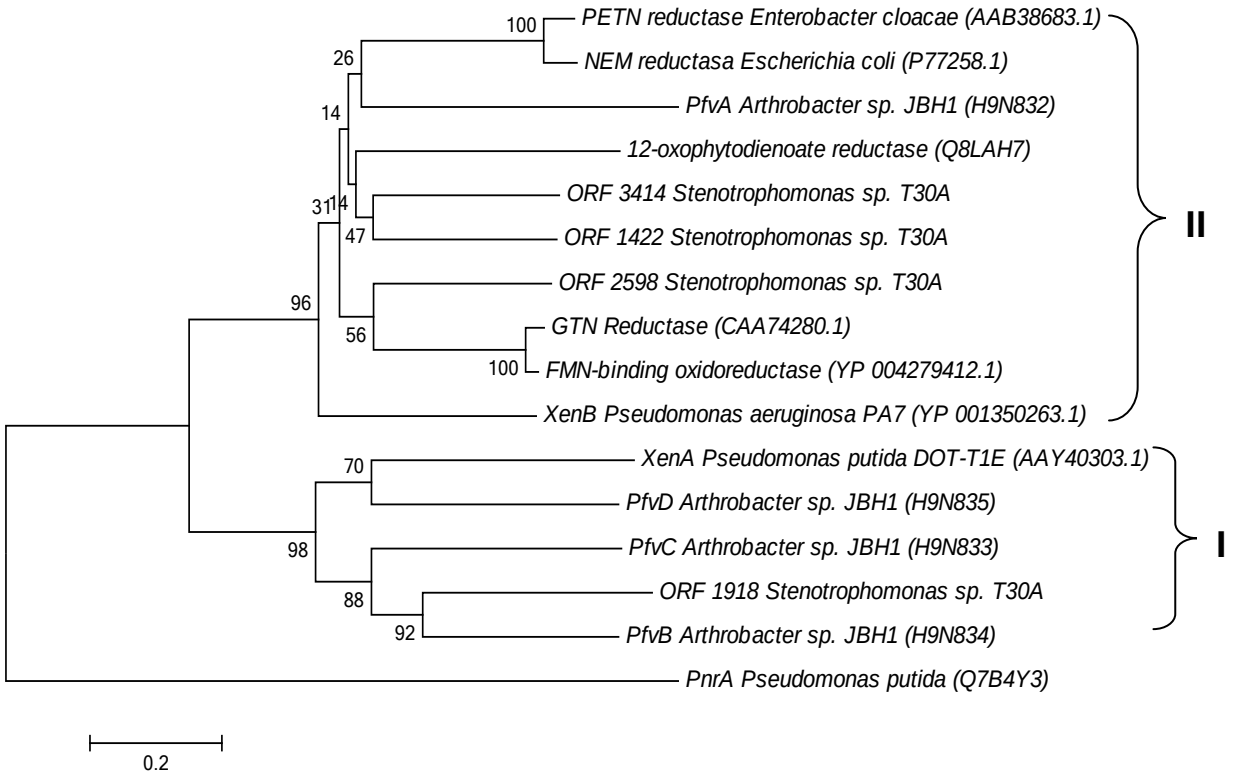
**Tabla 5-3:** Proteínas homólogas a las enzimas reportadas presentes en el genoma de *Stenotrophomonas* sp. T30A.

| ORF | Enzima de referencia | Contig | Inicio | Termina | Tamaño (nt) | E- value | % identidad | Score |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1918 | Xen A (*P. putida* DOT-T1E) | 32 | 84028 | 82880 | 1149 | 3e-69 | 41 % | 255 |
| 2598 | Xen B (*P. aeruginosa*) | 45 | 29960 | 28866 | 1095 | 1e-93 | 51% | 336 |
| 3414 | PETN reductasa (*E. cloacae*) | 69 | 1488 | 385 | 1104 | 8e-96 | 48% | 343 |
| 1827 | NAD(P)H Nitroreductasa-pnrB (*P. putida*) | 29 | 62825 | 63415 | 591 | 6e-06 | 26% | 44 |
| 1422 | NEM reductasa NemA (*E.coli*) | 24 | 90978 | 89866 | 1113 | 2e-96 | 50% | 345 |

En la **figura 5-12**, se agruparon las secuencias más cercanas a las proteínas pertenecientes a la familia de las OYE. En este dendograma se observó que los ORF's 3414, 1422 y 2598 de *Stenotrophomonas* sp. T30A, pertenecen a las OYE Tipo II, entre las cuales se encuentra la PETN reductasa, la N-etilmaleimida (NEM) reductasa y la XenB. Mientras que el ORF 1918 pertenece a las OYE Tipo I, a la cual también pertenece XenA de *P. putida* DOT-T1E.

En cuanto a la familia de las nitrorreductasas insensibles al oxígeno ó del Tipo I, se observó que el ORF 1827 de *Stenotrophomonas* T30A pertenece a esta familia y se encuentra relacionado con el grupo B, el cual se caracteriza por su capacidad para usar tanto el NADH y/o el NADPH como donador de electrones.

**Figura 5-12:** Dendograma de las enzimas caracterizadas pertenecientes a la familia OYE y sus homólogas encontradas en el genoma de *Stenotrophomonas* sp. T30B. Construido con el programa MEGA 5, usando el método neighbor joinning con un Bootstrap de 1000 remuestreos.



# 6. Discusión

Los géneros *Stenotrophomonas* y *Rhizobium* se encuentran de manera ubicua en el ambiente, siendo la rizosfera y las plantas su principal reservorio. Las especies de estos géneros son altamente adaptables a ambientes hostiles y con escasos nutrientes. Esta versatilidad metabólica les permite degradar compuestos tales como *p*-nitrofenol, 4-clorofenol, hidrocarburos aromáticos policíclicos, selenio, benceno, tolueno, etilbenceno, cromo y explosivos tales como TNT, RDX, GTN y PETN (Binks*, et al.,* 1995; White, *et al.,* 1996; Snape, *et al.,* 1997; Juhasz, *et al.,* 2000; Myung-Seok, *et al.,* 2002; Lee, *et al.,* 2002; Dungan, *et al.,* 2003; Antonioli, *et al.,* 2007; Zhang, *et al.,* 2007 ).

La identificación a nivel de especie de estos géneros bacterianos es problemática ya que sus especies son genotípicamente muy similares (95.7- 99.6% de similitud) y en la mayoría de los paneles bioquímicos usados para la identificación fenotípica no muestran actividad (Aujoulat, *et al*., 2011; Svensson-Stadler, *et al*., 2011). En el caso de la cepa T30A la secuencia del gen 16s rRNA mostró una similitud del 99% con la especie *Stenotrophomonas rhizophila,* del género *Stenotrophomonas* ubicado en la clase Gammaproteobacteria (Hauben, *et al*., 1999). La cepa T30B presentó un porcentaje de similitud del 99% con la especie *Rhizobium radiobacter,* del género *Rhizobium* de la clase Alfaproteobacteria (Willems & Collins, 1993). A pesar de la distancia filogenética existente entre estas cepas, su comportamiento frente al TNT fue muy similar.

Durante la evaluación de la actividad degradadora de TNT en los extractos crudos de estas cepas, se observó una alta actividad al usar NADPH como donador de electrones. Como producto de esta reducción se observó la liberación de una mol de $NO_2^-$ por cada dos moles de TNT reducido. Dillewjin, *et al*. (2008) reportaron un resultado similar debido a la formación de diarilaminas secundarias producto de la condensación de los complejos

dihidruro Meisenheimer con HADNT. El balance de masas de esta reacción mostró que se necesitaban dos moléculas de TNT para liberar una molécula de nitrito (Dillewijn, *et al*., 2008; Wittich*, et al.*, 2009).

Estos resultados están asociados a la presencia de enzimas pertenecientes a la familia de las OYE, específicamente a las OYE Tipo II. Dentro del genoma de *Stenotrophomonas* sp. T30A se encontraron proteínas homólogas a esta familia, como la XenB, NEM reductasa y PETN reductasa. Este grupo de enzimas dependientes de NADPH, pueden reducir los grupos nitro a derivados HADNT y ADNT, y catalizar el el ataque nucleofílico del anillo aromático mediante la transferencia directa de iones hidruro, dando lugar a la formación de los complejos TNT-hidruro y dihidruro-Meisenheimer (French*, et al.*, 1998, Spain*, et al.*, 2000, Esteve-Núñez*, et al.*, 2001, Stenuit*, et al.*, 2006).

La presencia de los complejos Meisenheimer, usualmente se relacionan con un cambio de color o la formación de un precipitado coloreado en el medio (Rieger, *et al*., 1999). En el estudio realizado por Dillewijn, et al., (2008), al evaluar las enzimas XenB de *P.putida*, NEM reductasa de *E. coli* y PETN reductasa de *E. cloacae*, se observó la presencia de un precipitado coloreado en la solución de reacción. Luego de analizar esta solución por HPLC se observó la presencia de HADNT y complejos dihidruro Meisenheimer, junto a otros picos no identificados. Estos últimos fueron identificados como diarilaminas, mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (Blehert, *et al.,* 1999; Wittich, *et al.,* 2008). La presencia de estos compuestos en las tres enzimas evaluadas, mostró que las enzimas OYE Tipo II, en efecto están implicadas en las formación de diarilaminas (Dilleijn, *et al*., 2008). Estos resultados fueron respaldados por lo observado por Pak, *et al.* (2000) con la XenB y Stenuit, *et al.* (2006) con la NEM reductasa, cuando describieron la presencia de compuestos con la misma masa molecular exhibida por las diarilaminas secundarias resueltas por RNM. Probablemente la presencia de estas proteínas homólogas a las OYE Tipo II, se encuentran implicadas en la formación del color amarillo-café observado al final de 60 min de reacción, en los ensayos en los cuales se utilizó el NADPH como donador de electrones. En estos ensayos, también se observó la formación de ADNT y la presencia de un pico desconocido al analizar las muestras por GC.

En la cepa *Rhizobium* sp. T30B, mediante el uso de iniciadores degenerados, se identificaron proteínas homólogas a la familia OYE tipo II, tales como la NEM reductasa, Oxifitodienoato reductasa y la GTN reductasa. Esta última, a diferencia de sus homólogas se distingue por su capacidad para usar el NADH como donador de electrones en lugar del NADPH. Aunque esta enzima no muestra actividad frente al TNT, puede reducir compuestos tales como el PETN y GTN (Snape, *et al.,* 1997). En esta misma cepa se observó que la actividad degradadora de TNT en presencia de NADH, fue mayor en comparación con la cepa T30A. En este caso se observó una reducción en la concentración del TNT cercana al 20%. Aunque la actividad no fue mayor que la observada con NADPH, sugiere la presencia de enzimas capaces de utilizar tanto el NADH como el NADPH, pero que bajo las condiciones evaluadas, la actividad se favorece en presencia de NADPH.

En las cepas T30A y T30B, también se encontraron secuencias homólogas a las OYE Tipo I y a la familia de las nitrorreductasas insensibles al oxígeno. Estas enzimas pueden reducir los grupos nitro del TNT a derivados nitroso, hidorxilamino y amino. Dentro del grupo de las OYE Tipo I, se encontró una proteína homóloga a XenA en *Stenotrophomonas* T30A y en *Rhizobium* sp. T30B se identificó una secuencia homóloga a FMN oxidoreductasa. Estas dos enzimas se encuentran estrechamente relacionadas y al igual que las OYE Tipo I, utilizan el NADPH como donador de electrones (Fitzpatrick *et al.,* 2003; Riefler & Smets, 2002).

En cuanto a la familia de las nitrorreductasas insensibles al oxígeno ó del Tipo I, en el genoma de *Stenotrophomonas* T30A, se identificó una proteína homóloga a PnrB de *P. putida* JLR11 y a NfsB de *E. coli*. Esta enzima se encuentra englobada en el subgrupo B de las nitrorreductasas Tipo I. Estas enzimas pueden usar el NADH ó NADPH como donador de electrones (Roldán*, et al.,* 2008). Caballero, et al. (2005), reportó que la expresión de esta enzima junto con PnrA también de *P. putida* JLR11, se daba de manera constitutiva. De igual manera, reportó que la actividad de estas enzimas en condiciones aerobias se producía principalmente en el citoplasma. En los extractos de las cepas T30A y T30B, se observó que al igual que en PnrA y PnrB, la actividad reductora se mantuvo independientemente de las condiciones de cultivo, lo cual quiere decir que las enzimas presentes en estas cepas no dependen de la presencia de TNT para su

expresión y al igual que en el trabajo de Caballero, la actividad degradadora se encuentra asociada al citoplasma.

Aunque el papel fisiológico de estas enzimas no es muy bien conocido, algunas de estas se encuentran implicadas en procesos tales como bioluminiscencia, biosíntesis de la coenzima B12, respuesta al estrés oxidativo ó equilibrio redox (Roldán, et al., 2008) Enzimas como la NfsA de *E.coli* y la FMN oxidoreductasa, participan en la respuesta frente al estrés oxidativo mediado por SoxRS, minimizando los procesos de equilibrio redox (Li & Demple, 1994; Liochev, et al., 1999; Paterson, et al., 2002; Fitzpatrick et al. 2003; Morokutti, *et al.,* 2005; Kitzing, et al., 2006). En el genoma de *Stenotrophomonas* sp. T30A, se observó la presencia de un gen homólogo a SoxR, el cual activa la transcripción del gen *soxS*, el cual a su vez controla el regulón de respuesta al estrés oxidativo. SoxR contiene un clúster de hierro-azufre 2Fe-2S que puede actuar como un sistema de sensor redox (Liochev, et al., 1999). Aunque se observó que las enzimas presentes en las cepas T30A y T30B no dependen de la presencia de TNT para su expresión, no se puede descartar su participación en respuesta al estrés oxidativo.

La capacidad de estas enzimas para utilizar un amplio espectro de sustratos, es parte fundamental de la adaptación de las cepas a ambientes hostiles. La presencia de homólogos a la familia OYE especialmente del Tipo II, tanto en plantas como en bacterias, sugiere que la denitración del TNT mediante la formación de diarilaminas puede ser un proceso que se dé en la naturaleza. Sin embargo, estos compuestos pueden ser un producto final recalcitrante, razón por la cual es necesario realizar más estudios enfocados en su degradación.

# 7. Conclusiones y recomendaciones

## 7.1 Conclusiones

- El NADPH es el donador de electrones que favorece la actividad enzimática implicada en la reducción del TNT en las cepas *Stenotrophomonas* sp. T30A y *Rhizobium* sp. T30B.

- Las enzimas involucradas en la degradación del TNT en las cepas *Stenotrophomonas* sp. T30A y *Rhizobium* sp. T30B, no dependen de la presencia del explosivo para su expresión.

- En las cepas *Stenotrophomonas* sp. T30A y *Rhizobium* sp. T30B, la mayor actividad TNT-reductasa se evidenció en la fracción citoplasmática

- En la cepa *Rhizobium* sp. T30B, se identificó una proteína homóloga a la GTN reductasa y NEM reductasa de la familia de proteínas de las OYE Tipo II, las cuales pueden reducir explosivos.

- En el genoma de *Stenotrophomonas* sp. T30A, se identificaron proteínas homólogas a la familia de proteínas de las OYE y de la familia de las nitrorreductasas del Tipo I. De la familia de las OYE, específicamente se encontraron proteínas homólogas a la PETN reductasa, NEM reductasa, XenA y XenB, las cuales pertenecen a las OYE Tipo II.

- Las enzimas producidas por las cepas *Stenotrophomonas* sp. T30A y *Rhizobium* sp. T30B, son capaces de realizar el proceso de denitrificación del TNT, generando productos similares a lo reportado para las proteínas de las OYE Tipo II,

## 7.2 Recomendaciones

- Hacer estudios de knock out de los genes putativos presentes en las cepas *Stenotrophomonas* sp. T30A y *Rhizobium* sp. T30B, con el fin evaluar si su expresión puede estar implicada en los procesos de respuesta al estrés oxidativo.

- Identificar la presencia tanto de metabolitos orgánicos e inórganicos producto de la reducción de TNT, mediante espectrometría de masas, Resonancia Nuclear Magnética (RMN) y/o cromatografía de iones.

- Clonar los genes putativos y mediante expresión heterológa producir la(s) enzimas con el fin de purificarlas y caracterizarlas.

.

# A. Anexo: Composición del medio de cultivo T2

| Solución | Composición | Cantidad |
|---|---|---|
| **Tampón** En 250 ml con agua destilada | $K_2H_2PO_4$ | 17,5 g |
| | $KH_2PO_4$ | 7,5 g |
| **Sales** En 250 ml con agua destilada | HCl 1M | 3 ml |
| | NaCl | 12,5 g |
| | $MgSO_4$* 7H2O | 5 g |
| | $CaCl_2$ | 1 g |
| **Hierro** En 100 ml con agua destilada | HCl 1M | 3 ml |
| | $FeSO_4$ * $7H_2O$ | 0,3 g |
| **Elementos trazas** En 100 ml con agua destilada | HCl (18 – 19%) | 20 ml |
| | $MnSO_4$*$H_2O$ | 0,2 g |
| | $H_3BO_4$ | 0,1 g |
| | $CaSO_4$ * $5H_2O$ | 0,05 |
| | $NaMoO_4$ * $2H_2O$ | 0,01 g |
| | $NiSO_4$ * 6 $H_2O$ | 0, 01 g |
| **Fuente de carbono** En 100 ml con agua destilada | Glucosa | 2,5 g |
| | Glicerol | 2 ml |
| | Citrato | 2,5 g |
| | Acetato | 2,5 g |

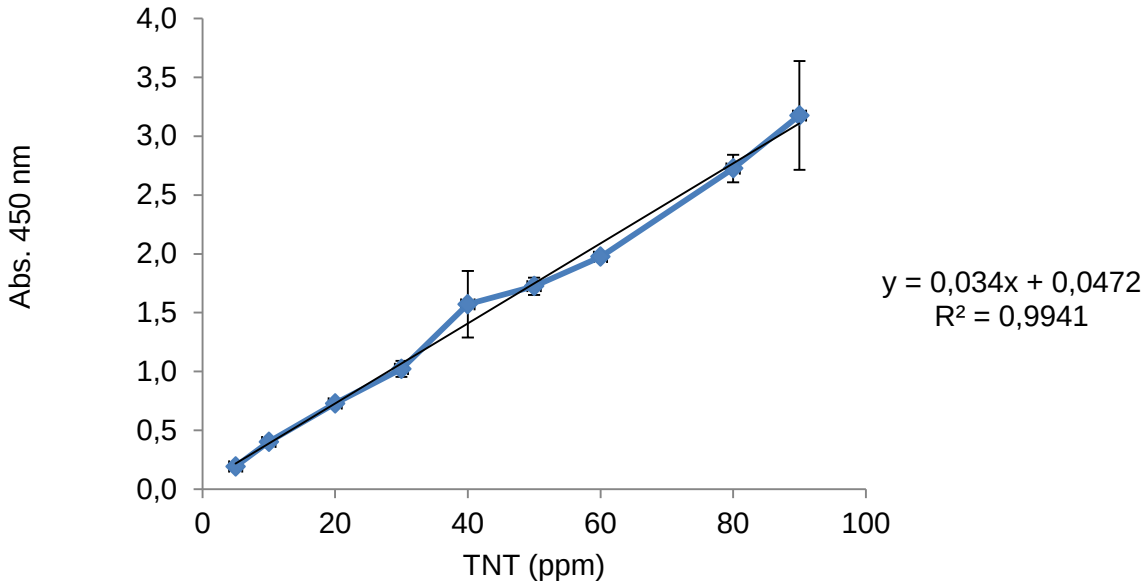
pH final 7.2 ± 0.2

# B. Anexo: Soluciones tampón o buffer

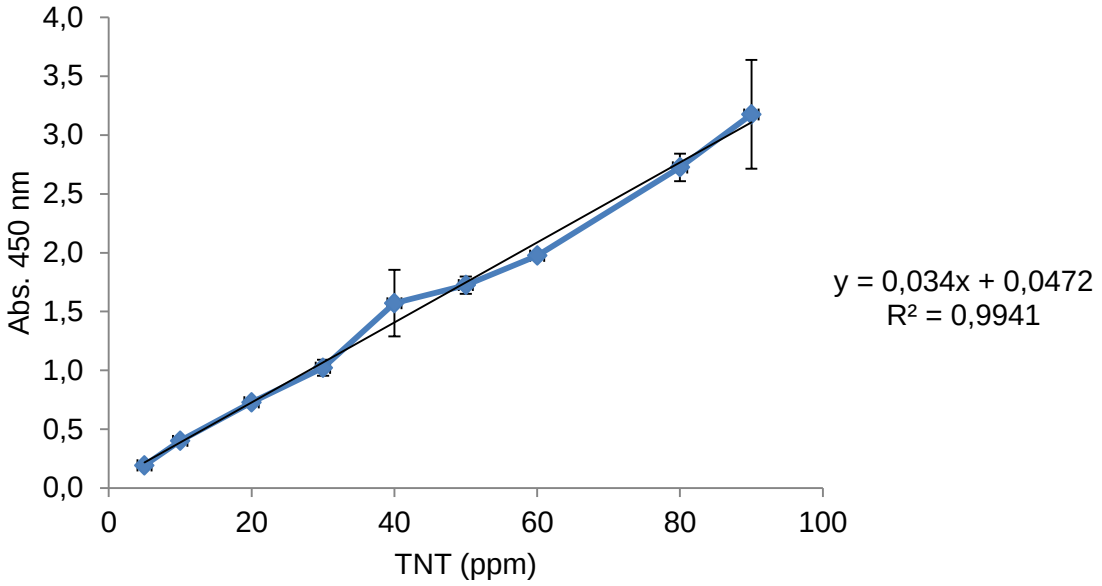
| SOLUCIÓN | COMPOSICIÓN |
|---|---|
| Buffer TE | Tris-HCl 10 mM<br>EDTA 1 mM<br>Ajustar a pH 8.0 |
| Buffer TAE 50x | 242 g Tris base<br>57.1 ml Ácido glacial acético<br>100 ml EDTA 0.5 mM<br>750 ml Agua desionizada<br>Ajustar a pH 8.0 |
| Buffer fosfato 50mM | 25 mM $KH_2PO_4$<br>25 mM $K_2HPO_4$<br>Ajustar a pH 7.0 |

# C. Anexo: Curvas de calibración

Curva TNT por colorimetría a 450 nm.

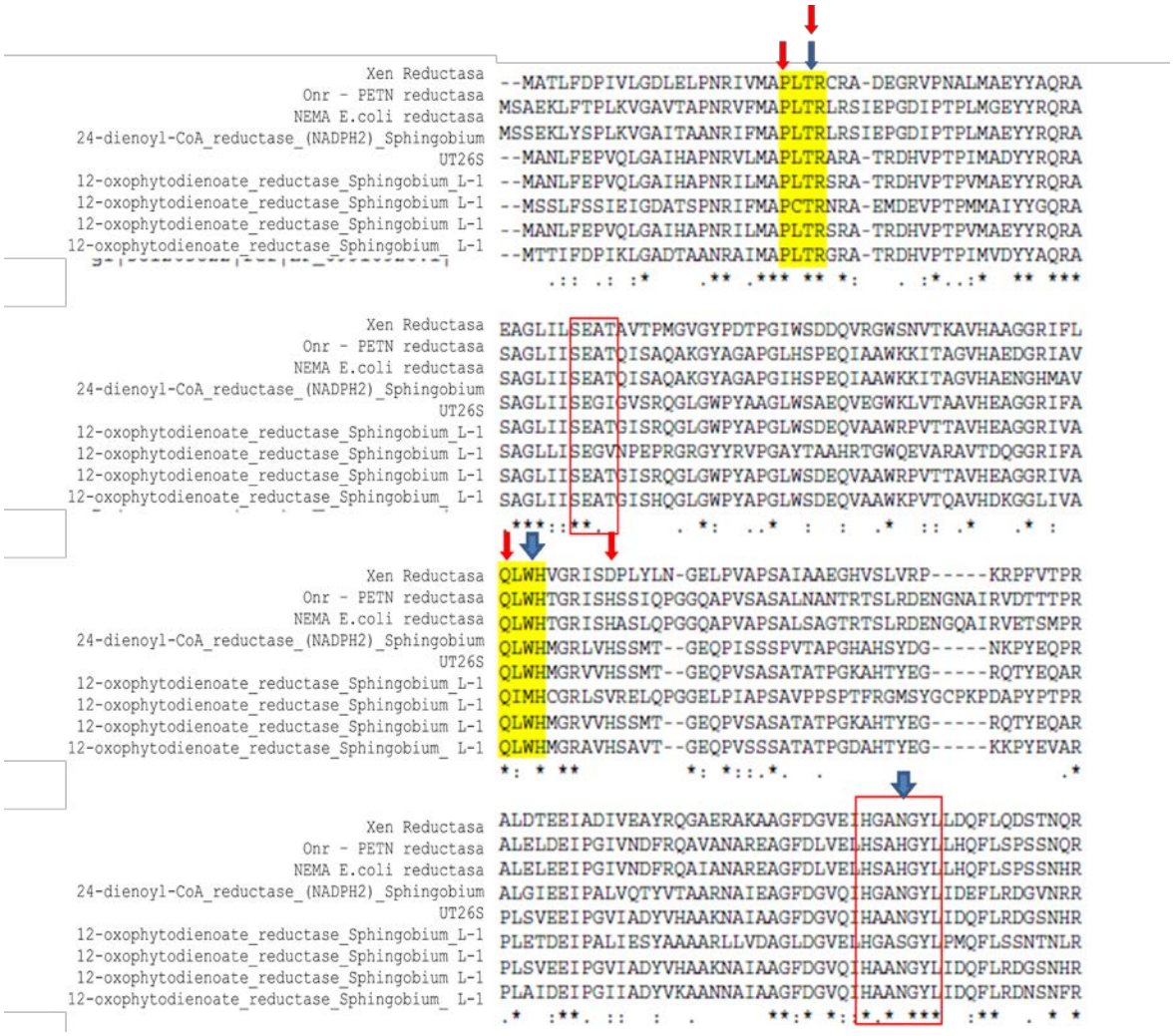



Curva $NO_2$ por colorimetría a 540 nm.



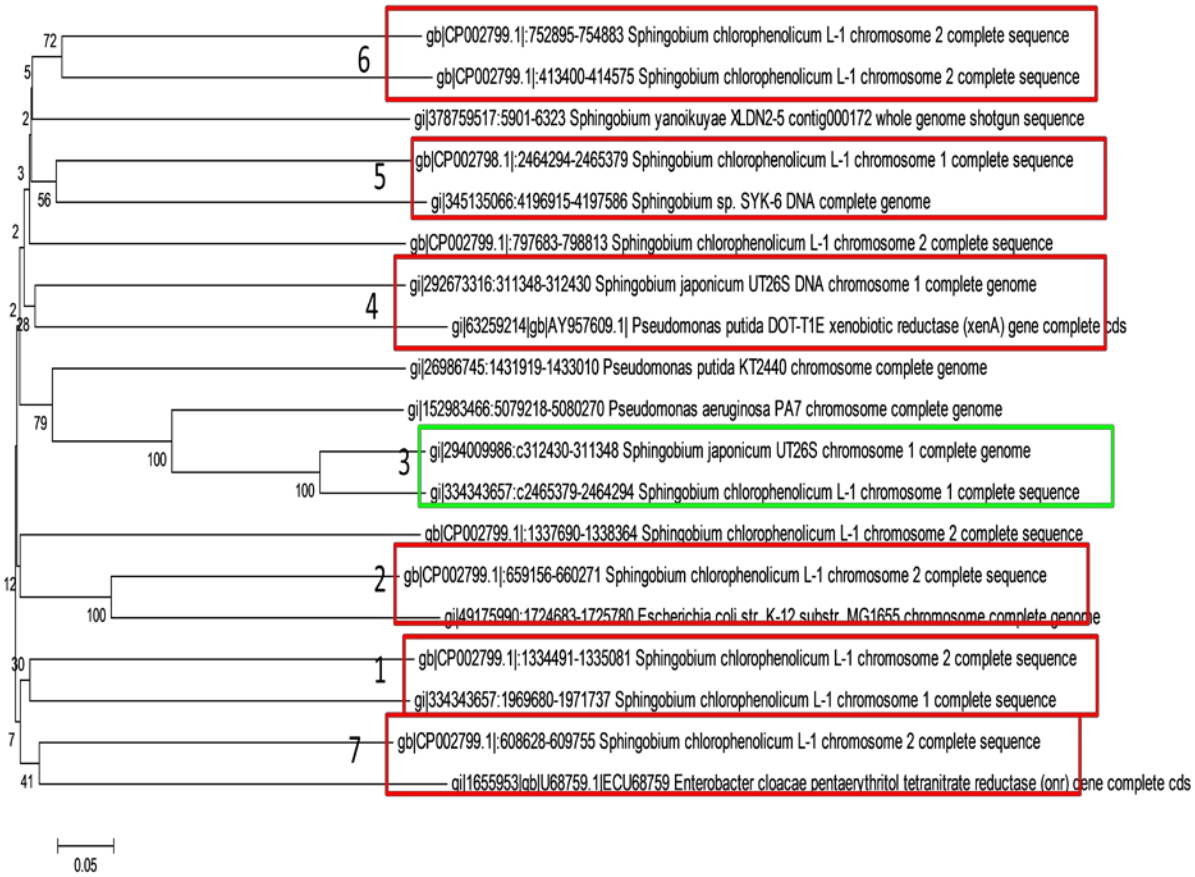
# C. Anexo: Diseño iniciadores degenerados

1. Alineamiento múltiple de las secuencias homólogas en *Sphingobium* sp., y las secuencias de las enzimas TNT-nitrorreductasas reportadas, pertenecientes a la familia de las OYE. El recuadro amarillo corresponde al sitio de unión al FMN, las flechas azules indican el sitio de unión al sustrato, las flechas y recuadros rojos corresponden al sitio activo.



Xen Reductasa TDRYGGSIENRARLLLEVTDAAISVWGAQRVGVHLAPRADSHDMGD-SNR
Onr - PETN reductasa TDQYGGSVENRARLVLEVVDAVCNEWSADRIGIRVSPIGTFQNVDNGPNE
NEMA E.coli reductasa TDQYGGSVENRARLVLEVVDAGIEEWGADRIGIRVSPIGTFQNTDNGPNE
24-dienoyl-CoA_reductase_(NADPH2)_Sphingobium UT26S EDAYGGPPENRVRLLREITQAVADAIGADRTAVRLSLNGDSQGTDD-SDP
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium_L-1 DDIYGGSVENRIRLLREVAQAVVDAVGAERVSVRLSPNGDSQGVDD-SDP
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium L-1 NDSYGGSIERRARFLLDVIDAMTGAVGAGRVAVKLSPAFRFHDVHD-EDP
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium L-1 DDIYGGSVENRIRLLREVAQAVVDAVGAERVSVRLSPNGDSQGVDD-SDP
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium_ L-1 DDIYGGSIENRVRLLREVTQAVVDAIGADRVSVRLSPNGDTQGVND-SNP
Xen Reductasa LETFSHVARELGKRGIAFICAREAQADDSIGVA--------LKEAFGGPY
Onr - PETN reductasa EADALYLIEELAKRGIAYLHMSETDLAGGKPYSEAFRQK--VRERFHGVI
NEMA E.coli reductasa EADALYLIEQLGKRGIAYLHMSEPDWAGGEPYTDAFREK--VRARFHGPI
24-dienoyl-CoA_reductase_(NADPH2)_Sphingobium UT26S ASLSLAVAQALDPIGLAFLELRELRTDGTRGASDVPRQSPLIRQHYRGPL
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium_L-1 SPLFAAAAEALQQIGIAFLELREPGPDGTFGRTDVPRQSPVIRRHFSGPL
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium L-1 VALYTHVARMLSDRGLAYVQVSDYGDYYSHAGMDPIGL---VRAHYNGVL
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium L-1 SPLFAAAAEALQQIGIAFLELREPGPDGTFGRTDVPRQSPVIRRHFSGPL
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium_ L-1 KPLFAAAADVLNQIGIAFLELREPGPDGTFGATDVPRLSPLIRQHFKGPL
Xen Reductasa IANEKFTRDSANAILARGDADAVAFGIPFIANPDLVKRLRNGAELNPPRP
Onr - PETN reductasa IGAGAYTAEKAEDLIGKGLIDAVAFGRDYIANPDLVARLQKKAELNPQRP
NEMA E.coli reductasa IGAGAYTVEKAETLIGKGLIDAVAFGRDWIANPDLVARLQRKAELNPQRA
24-dienoyl-CoA_reductase_(NADPH2)_Sphingobium UT26S VLNSDYDAARAQADLDSGLAQAISFGRPFISNPDLPERLSTGAPLSPLRQ
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium_L-1 ILNSDYGLERAQQDLDSGLADAVSFGRAFMANPDLPKRLLINAPLNEANM
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium L-1 VANGGLNAVSAQALLDEGKADAVAFGSAFMANPDLPERMRRGSPLNVADP
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium L-1 ILNSDYGLERAQQDLDSGLADAVSFGRAFMANPDLPKRLLINAPLNEANM
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium_ L-1 VLNSDYGLGRAQADLASGLADATSFGRPFLANPDLVDRLREGASLTQAQM
Xen Reductasa ETFYTGGTEGYLDYPTLD----------
Onr - PETN reductasa ESFYGGGAEGYTDYPSL----------
NEMA E.coli reductasa ESFYGGGAEGYTDYPTL----------
24-dienoyl-CoA_reductase_(NADPH2)_Sphingobium UT26S ETLYTQGAEGYVDYPAL--EKVA----------
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium_L-1 ATFYTQGAEGYVDYPAL--EEAAA----------
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium L-1 NTFYTGDAHGYIDYPPLGQGSGHATVAQSGTTQVDYGSFQHGRAAKVS
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium L-1 ATFYTQGAEGYVDYPAL--EEAAA----------
12-oxophytodienoate_reductase_Sphingobium_ L-1 ATFYSQGAEGYTDYPTLAEEKAAA----------

2. Dendograma de las enzimas TNT-nitrorreductasas reportadas, pertenecientes a la familia de las OYE y las secuencias homólogas encontradas en *Sphingobium* sp.



# D. Anexo: Iniciadores diseñados

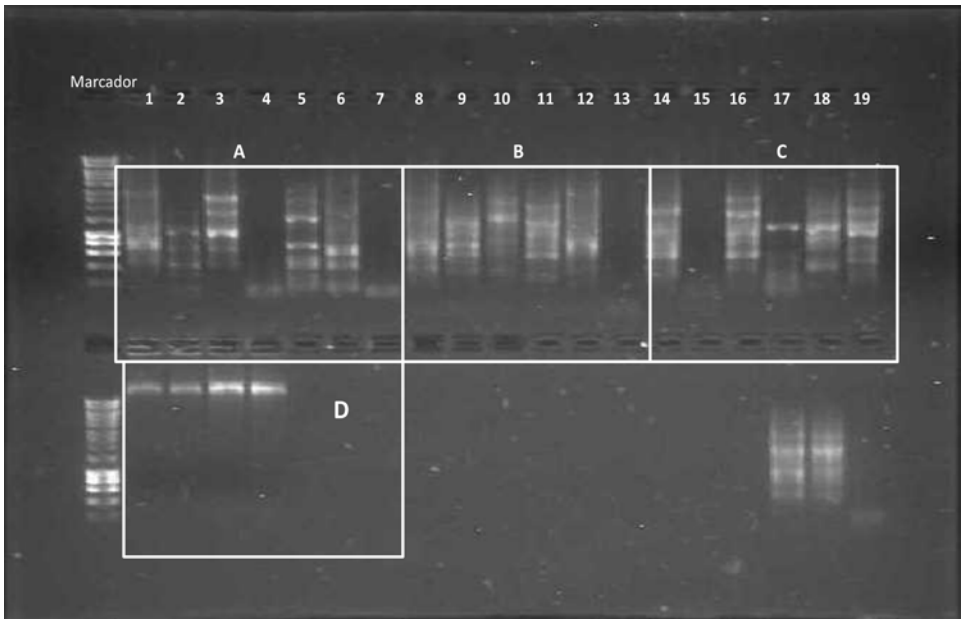
Grupo de iniciadores diseñados a partir del análisis de las secuencias de las enzimas reportadas que tienen actividad TNT- reductasa y las enzimas reportadas en *Sphingobium*sp.

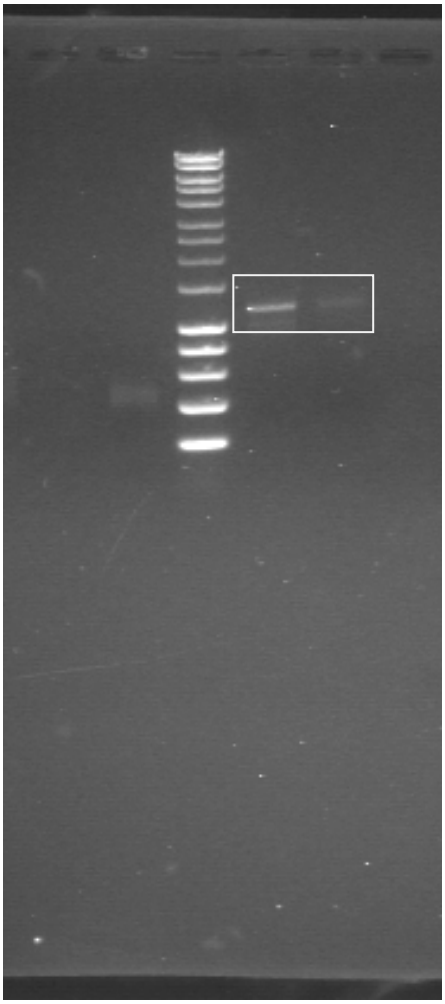
| Grupo | Secuencia | Tamaño esperado (Pb Aprox.) |
|---|---|---|
| **1** | Forward: TTCCGAyGrmGCCCKsGCCGC<br>Reverse:<br>GCGrAsAAyTCGGmrTCGA | 1025 |
| **2** | Forward:<br>GGAATAyTAyCGCCArCGyGCCA<br>Reverse:<br>CGTCGGrTArTCGGTATAGCC | 998 |
| **3** | Forward:<br>ATGGCCAATCTGTTCGAACCGGTGCA<br>Reverse:<br>ATAATCGACATAGCCTTCCGCGCCCTG | 1059 |
| **4** | Forward:<br>GCyGyTsrCCGskCrykyTGsTGTG<br>Reverse:<br>TCGAGCCrGTGsrsmTArGG | 1396 |
| **5** | Forward:<br>CGCATyGCsGGyGwrGAA | 1222 |

| | | |
|---|---|---|
| | CsAAGCCGAyCkGATCsAkCm<br>Reverse:<br>GmmGAACCGyATCkyCATGGCGCC | |
| **7** | Forward:<br>CTCCGsCGATCCGskCAsGmAGG<br>Reverse:<br>ATrGCGsCGmwmGGyCGC | 1265 |

# E. Anexo: Amplificación productos de PCR.

PCR convencional. **Recuadro A (*Primers* del grupo 3):** Pozo 1. Marcador de peso molecular; Pozo 2. T30; Pozo 3. T30 dilución 1/10; Pozo 4. T30 dilución 1/100; Pozo 5. T12A; Pozo 6. T12B; Pozo 7. T12B; Pozo 8. Control negativo. **Recuadro B (*Primers* del grupo 7):** Pozo 9. T30 dilución 1/10; Pozo 10. T30 sin diluir; Pozo 11. T12 B; Pozo 12. Cepa T12A; Pozo 13. Cepa T12B; Pozo 14. Control negativo. **Recuadro C (*Primers* del grupo 4):** Pozo 15. T30 dilución 1/10; Pozo 16. Control negativo; Pozo 17. T30; Pozo 18. T12A; Pozo 19. T12B; Pozo 20. T12B. **Recuadro D:** Pozos 1 - 4. ADN cepa T30 por extracción enzimática.





Producto de PCR de 1000 pb amplificado luego de optimizar las condiciones de la PCR.

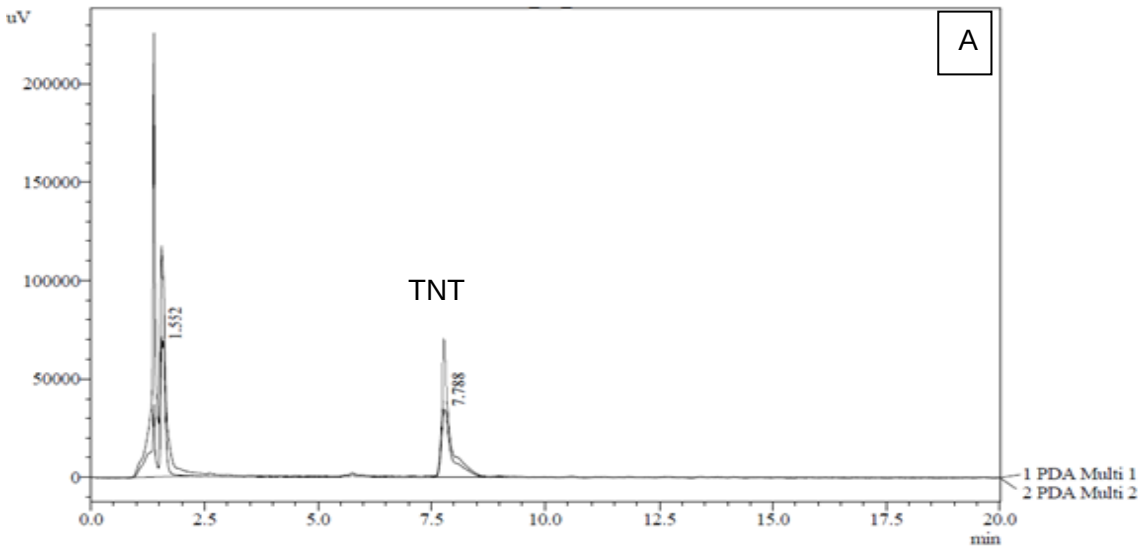
# F. Anexo: Alineamientos múltiples secuencias OYE.

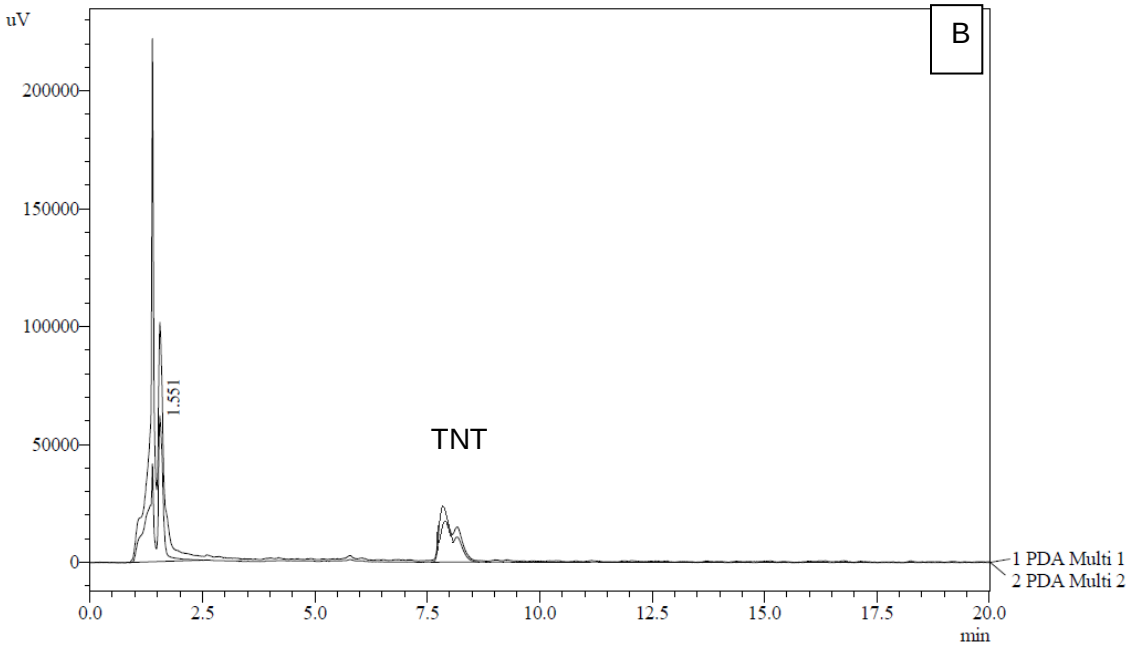
Alineamineto múltiple de las secuencias de las proteínas homólogas a la familia de las OYE Tipo II presentes en la cepa Rhizobium sp. T30B. En el recuadro se señalan los residuos conservados Tyr-Gly-Gly-Ser, característicos de la familia de las OYE.

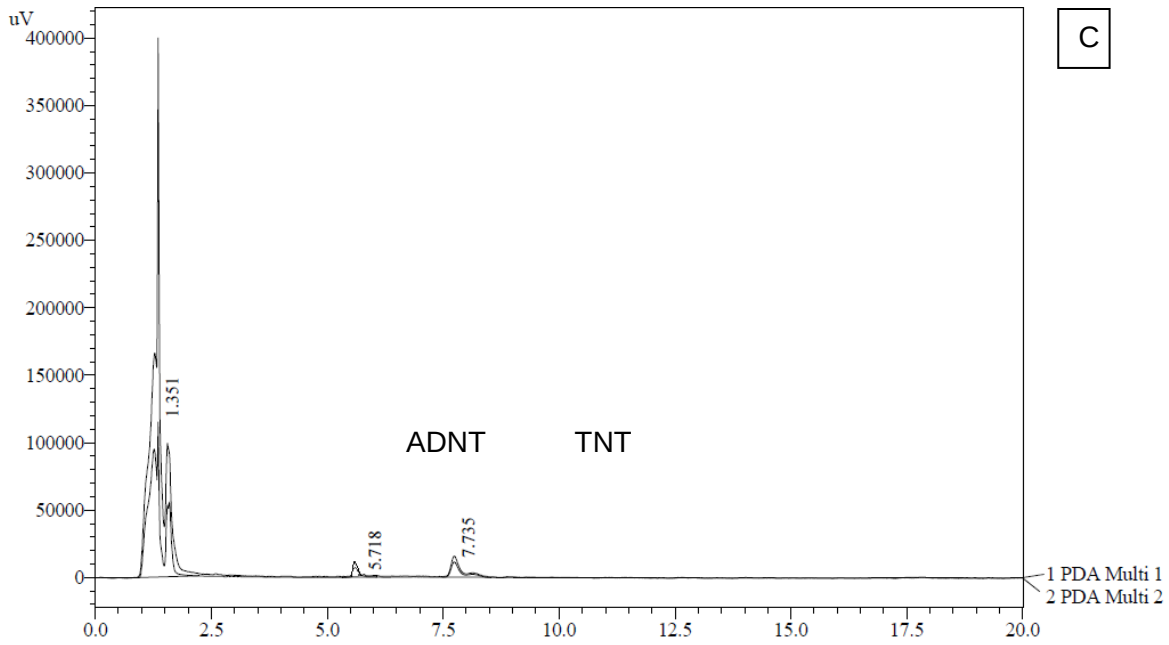
```
glycerol                MTKLFDPTKLGDIAIANRIVMAPLTRNRSPNAVPNDLNVKYYAQRATAGLIITEATAITH
N-ethylmaleimide        MTSLFEPAQAGDIELANRIVMAPLTRNRSPGAIPNNLNATYYEQRATAGLIVTEGTPISQ
FMN-binding             MTSLFEPAQAGDIALANRIVMAPLTRNRSPGAIPNNLNATYYEQRATAGLIVTEGTPISQ
12-oxophytodienoate     MSKLFQSTTVGDIAVANRVAMAPLTRNRSPGAVPNDLNVEYYRQRAGAGLIITEGTAITH
                        *:.**:.:  *** :***:.**********.*:**:**. ** *** ****:**.*.*::

glycerol                QGQGYADVPGLYTKDALDGWKKVTDAVHANGGKIVVQMWHVGRISHTSLQPNDGKPVSST
N-ethylmaleimide        QGQGYADVPGLYKREAIEGWKKITDGVHSAGGKIVAQIWHVGRISHTSLQPHGGQPVAPS
FMN-binding             QGQGYADVPGLYKKEAVEGWKKITDGVHVAGGKIVAQIWHVGRISHTSLQPHGGQPVAPS
12-oxophytodienoate     QGQGYADVPGLYLPEAIEGWKRVTSAVHEAGGKIVTQIWHVGRISHTSLQPDGGKPVAPS
                        ***********  :*::***.:*..**  *****.*:************* .*:**:.:

glycerol                SRAAKAKTYLVEKDGSGHFAETSEPRALETAEIPGIVEDYRKAARAAIDAGFDGVEIHGA
N-ethylmaleimide        AITAKSKTYIINDDGTGAFAETSEPRALTIDDIGLILEDYRSGARAALEAGFDGVEIHAA
FMN-binding             AIIAKSKTYIINDDGTGAFAETSEPRALTIDDIGLILEDYRTGARAALEAGFDGVEIHAA
12-oxophytodienoate     AIQAKSKTYILNPDGTGAFAETSEPRALELNEIPGLLEDYRKAARAAIDAGFDGVEIHAA
                        :  **:***::: **:* **********   :*  ::****..****::*********.*

glycerol                NGYLLDQFLRADINDRTDQYGGSIENRARFLFEVVDAVTKEIGAGRTAIRISPVTPANDA
N-ethylmaleimide        NGYLIEQFLKSSTNQRTDDYGGSIENRARFLLEVVDAVAEEIGAGRTGIRLSPVTPANDI
FMN-binding             NGYLIEQFLKSSTNQRTDEYGGSIENRARFLLEVVDAVAEEIGAGRTGIRLSPVTPANDI
12-oxophytodienoate     NGYLLEQFMRSSSNQRTDAYGGSIDNRIRLTVEVAEAVAKEIGGGRTGIRISPTTPANDV
                        ****::**:.:. *:*** ****:** *: .**.:**::***.***.**:**.*****

glycerol                SDPQPQPLFTYVIEGLAKYDLAYIHVIEGATGGARDF----LPFDYDALHAAYKAAGGKA
N-ethylmaleimide        FEADPQPLYNYVVEQLGKRNLAFIHVVEGATGGPRDFKQGDKPFDYASFKAAYRNAGGKG
FMN-binding             FEADPQPLYNYVAEELGKRNLAFIHVVEGATGGPRDFKQGDKPFDYAAFKAAYRNAGGKG
12-oxophytodienoate     SDPDPTAVYTALVEKLAAHDLAFIHVVEGATGGPRDV----LPFDWAALKAAYRAKGGKG
                         :.:* .::. : * *.  :**:***:******.**.     ***: :::***.  ***.

glycerol                GWMLNNGYDRELAEEAIDSGRADVVAFGKPFIGNPDLVRRLKENAPLNGLDQATLYGGGG
N-ethylmaleimide        LWIANNGYDRQSAIEAVESGKVDAVAFGKAFIANPDLVRRLKNDAPLNEPNQPTFYGGGA
FMN-binding             LWIANNGYDRESAIEAVESGKVDAVAFGKAFIANPDLVRRLKDNAPLNEPNQPTFYGGGA
12-oxophytodienoate     VWMVNNGYDRETAIEAVESGYADVVAFGKPFIANPDLVRRLKEEAPLNELDGSTLYGGGE
                         *: ******: * **::** .*.*****.**.*********::****  : .*:****

glycerol                KGYADYPTLDEVA
N-ethylmaleimide        EGYTDYPALAQ--
FMN-binding             EGYTDYPALG---
12-oxophytodienoate     QGYTTYPALA---
                        :**: **:*
```

# G. Anexo: Cromatogramas actividades enzimáticas.

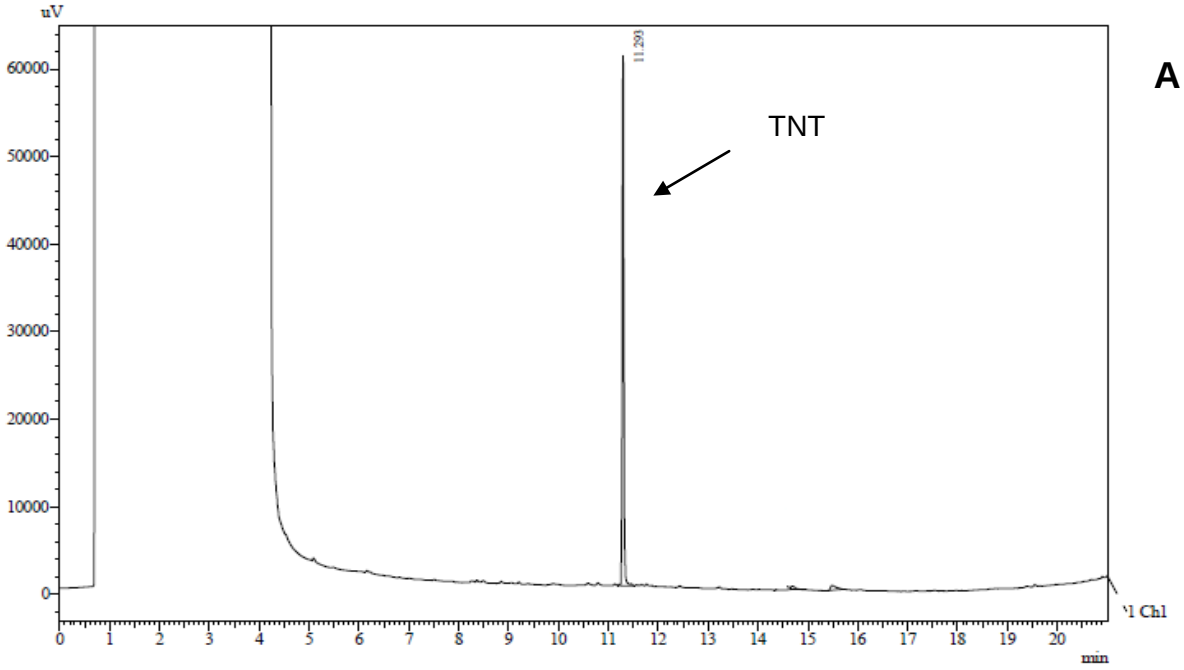
Cromatogramas. Transformación del TNT en los extractos crudos empleando NADPH (0.44 mM) a 30 °C, por HPLC (A. Tiempo 0 de la reacción; B. 15 min de reacción; C. 60 min de reacción.)

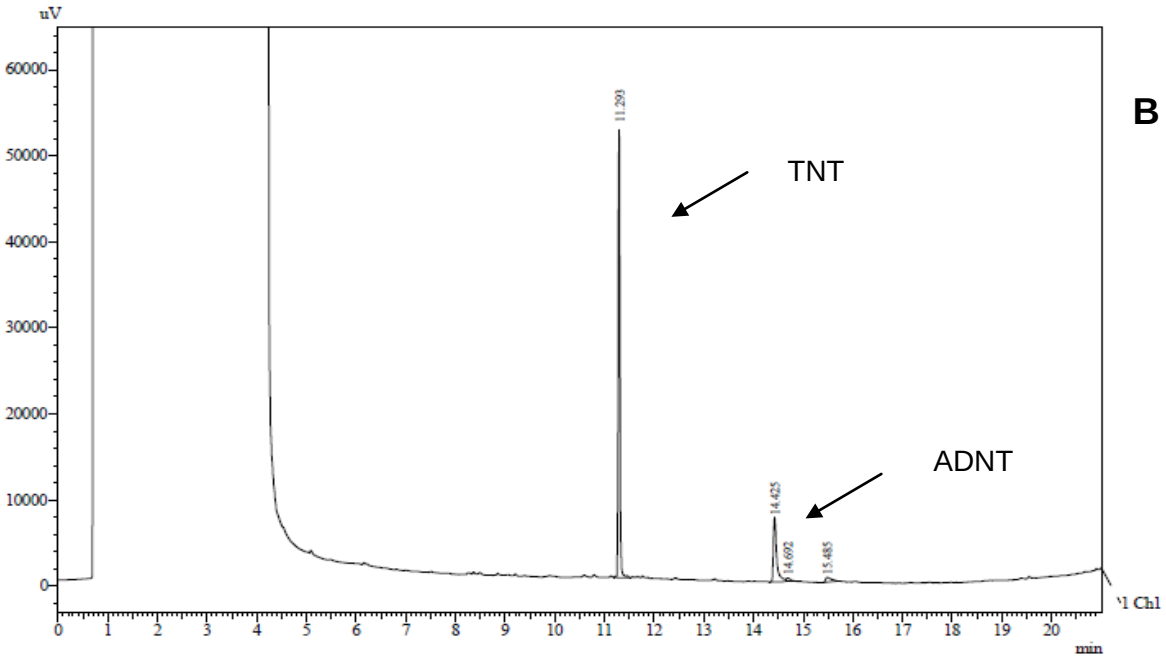


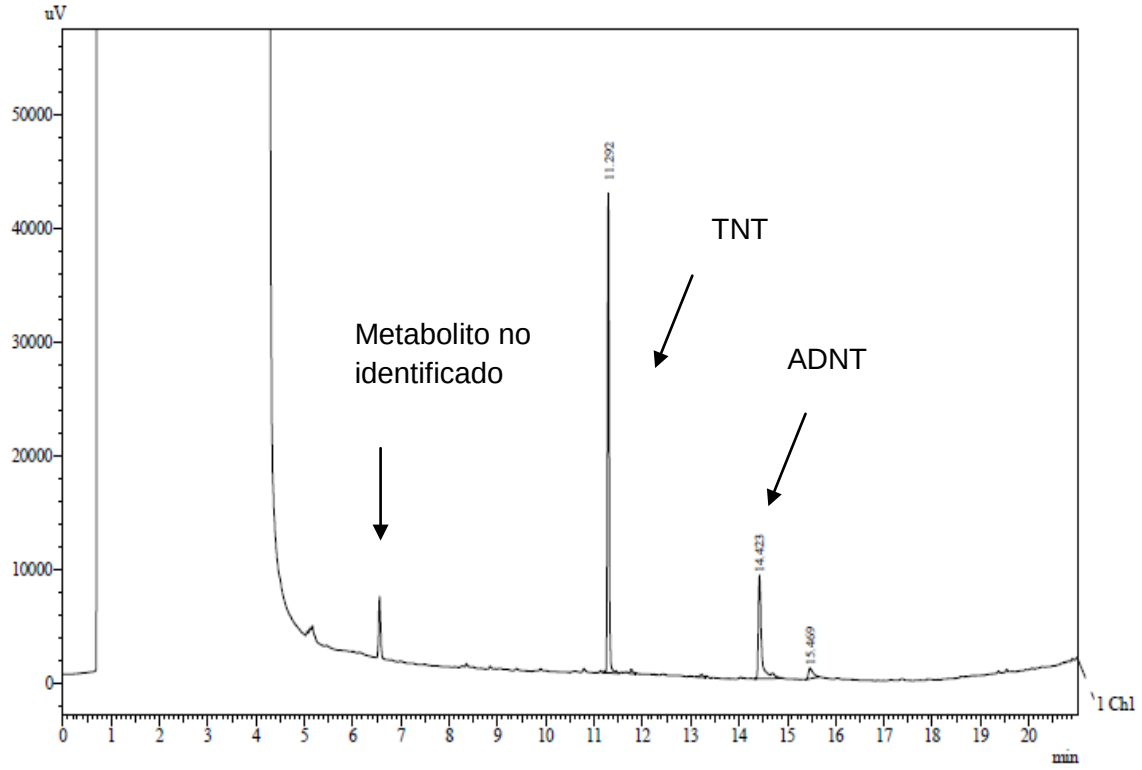


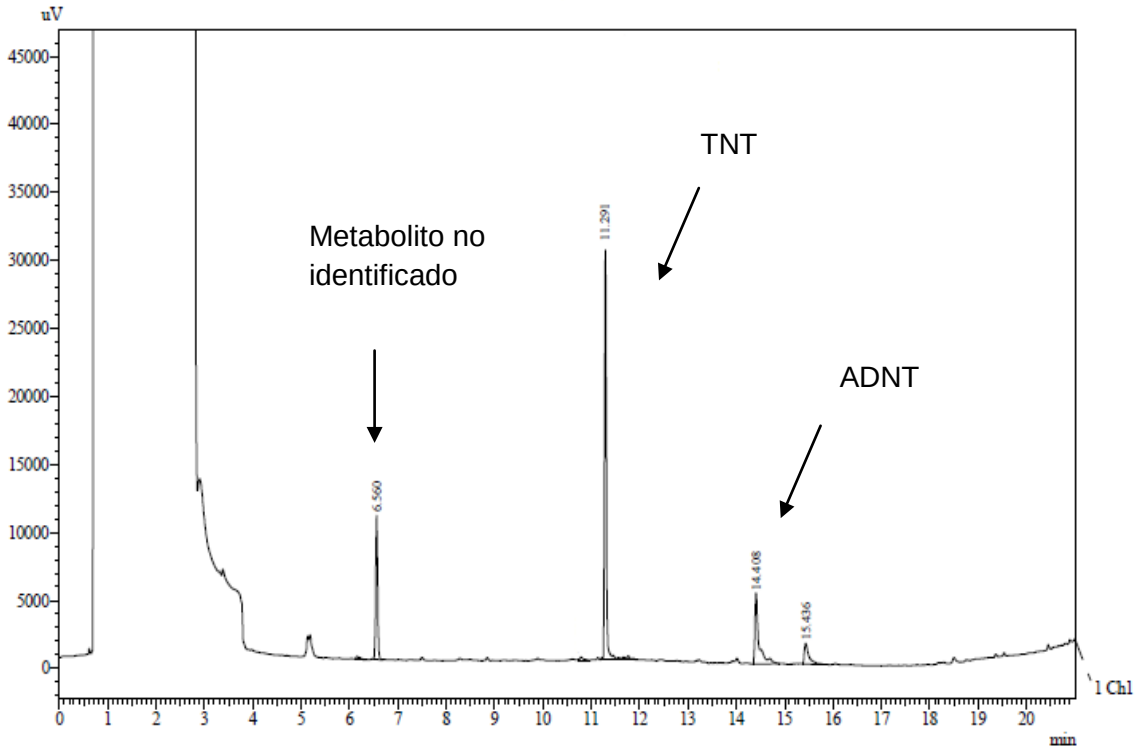

Cromatogramas. Transformación del TNT en los extractos crudos empleando NADPH (0.44 mM) a 30 °C, por GC-FID (A. Tiempo 0 de la reacción; B. 15 min de reacción; C. 30 min de reacción; D. 60 min de reacción)




uV
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
11.299
14.425
14.692
15.485
TNT
ADNT
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
min
1 Ch1

**B**


uV
50000
40000
30000
20000
10000
0
11.292
14.423
15.469
TNT
ADNT
Metabolito no identificado
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
min
1 Ch1


uV
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Metabolito no identificado
TNT
ADNT
6.560
11.291
14.408
15.436
1 Ch1
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
min

# Bibliografía


Andrews K, Patel B. 1996. Fervidobacterium gondwanense sp. Nov., a new thermophilic anaerobic bacterium isolated from nonvolvanically heated geothermal waters of the Great Artesian Basin of Australia. International Journal of Systematic Bacteriology. 46: 265-269.

Antonioli P, Lampis S, Chesini I, Vallini G, Rinalducci S, Zolla L, Righetti P. 2007. Stenotrophomonas maltophilia SeITE02, a New Bacterial Strain Suitable for Bioremediation of Selenite-Contaminated Environmental Matrices. Applied and Environmental Microbiology, 73(21): 6854–6863.

ATSDR, 1995. www.atsdr.cdc.gov/toxoprofiles/TP.asp?id=677$tid=125 Consultado Octubre 2013.

Arkhavan J. 2004. The Chemistry of Explosives. Second Edition. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House. Cambridge, UK. Pp.168.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402

Avila F. 2012. Estudio de la degradación aerobic de 2,4,6-Trinitrotolueno y pentaeritritol tetranitrato por bacterias aisladas de suelos contaminados. Trabajo de grado. Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

Aziz R, Bartels D, Best A, DeJongh M, Disz T, Edwards R, Formsma K, Gerdes S, Glass E, Kubal M, Meyer F, Olsen G, Olson R, Osterman A, Overbeek R, McNeil L, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008.The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. BMC Genomics.

Barbosa T, Levy S. 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. Journal of Bacteriology. 182: 3467-3474.

Beynon E, Symons Z, Jackson R, Lorenz A, Rylott E, Bruce N. 2009. The Role of Oxophytodienoate Reductases in the Detoxification of the Explosive 2,4,6-Trinitrotoluene by Arabidopsis. Plant physiology. 151: 253-26

Binks P, French C, Nicklin S, Bruce N. 1996. Degradation of Pentaerythritol Tetranitrate by *Enterobacter cloacae* PB2. Applied and Environmental Microbiology. 62(4): 1214–1219.

Binks P, Nicklin S, Bruce N. 1995. Degradation of Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine (RDX) by Stenotrophomonas maltophilia PB1. Applied and Environmental Microbiology, 61(4): 1318–1322.

Blehert D, Fox B, Chambliss G. 1999. Cloning and Sequence Analysis of Two *Pseudomonas* Flavoprotein Xenobiotic Reductases. Journal of Bacteriology. 181(20): 6254-6263.

Bryant C, McCalla D, Leeksma M, Laneuville P. 1981. Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. Canadian Journal of Microbiology. 27: 853-859.

Bryant C, Hubbard L, McElroy W. 1991. Clonning nucleotide sequence, and expression of the nitroreductase gene from *Enterobacter cloacae*. Journal of Biological Chemistry. 266: 4126-4130.

Bryant C, DeLuca M. 1991. Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. Journal of Biological Chemistry. 266: 4119-4125.

Caballero A, Lázaro J, Ramos J, Esteve-Núñez A. 2005. PnrA, a new nitroreductase-family enzyme in the TNT-degrading strain *Pseudomonas putida* JLR11. Environmental Microbiology. 7 (8): 1211–1219.

Caballero A. 2005. Bases Genéticas y Bioquímicas del Metabolismo del Nitrógeno del 2.4.6-Trinitrotolueno (TNT) en *Pseudomonas putida* JLR11. Memorías para aspirar al Título de Doctor. Universidad de Granada. Granda, España. Pp. 191

Cold Regions Research and Engineering Laboratory (CRREL). 2006. Conceptual Model for the Transport of Energetic Residues from Surface Soil to Groundwater by Range Activities. ERDC/CRREL TR-06-18. www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?Location=U2&doc=GetTRDoc.pdf&AD=ADA472270 Consultado Octubre 2013.

Deive F, Carvalho E, Pastrana L, Rúa M, Longo M, Sanroman M. 2009. Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27. Bioresource Technology. 100: 3630–3637.

Dillewijn P, Wittich R.M, Caballero A, Ramos J. 2008. Subfunctionality of Hydride Transferases of th Old Yellow Enzyme Family of Flavoproteins of Pseudomonas putida. Applied and Environmental Microbiology. 74(21): 6703 – 6708.

Dillewijn P, Wittich R.M, Caballero A, Ramos J. 2008. Type II Hydride Transferases from Different Microorganisms Yield Nitrite and Diarylamines from Polynitroaromatic Compounds. Applied and Environmental Microbiology. 74 (21): 6820–6823.

Dungan R, Yates S, Frankenberger W. 2003. Transformations of selenate and selenite by *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from a seleniferous agricultural drainage pond sediment. Environmental Microbiology. 5: 287-295.

Lee E, Jun Y, Cho K, Ryu H. 2002. Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene andxylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. Journal of the Air & Waste Management Association. 52: 400-406.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1994. Nitroaromatics and Nitramines by HPLC. Second update SW-846 Method 8330. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 2005. Handbook on the Management of Munitions Response Actions. EPA 505-B-01-001. http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=P100304J.txt

EPA (U.S. Environmental Protection Agency). 2012. Technical Fact Sheet-2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). Office of Solid Waste and Emergency Response (5106P). May 2012.

Environmental Security Technology Certification Program (ESTCP). 2010. Passive Biobarrier for Treating Comingled Perchlorate and RDX in Groundwater at an Active Range (ER-1028).

Esteve-Nuñez A, Caballero A, Ramos J. 2001. Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65 (3): 335–352.

French C, Nicklin S, Bruce N. 1996. Sequence and Properties of Pentaerythritol Tetranitrate Reductase from *Enterobacter cloacae* PB2. Applied and Enviromental Microbiology. 178 (22): 6623–6627

French C, Nicklin S, Bruce N. 1998. Aerobic Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by Pentaerythritol Tetranitrate Reductase. Applied and Enviromental Microbiology. 64(8): 2864–2868

Fuller M, Manning J. 2004. Microbiological changes during biorremediation of explosives-contaminated soils in laboratory and pilot-scale bioslurry reactors. Bioresource Technology. 91(2): 123-133.

Gómez R. 2010. Degradación de Compuestos Nitroaromáticos por *Rhodobacter*: Purificación de la nitrorreductasa NprB. Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Ciencias. Universidad de Córdoba. Córdoba, España. Pp. 136

González-Pérez M, Dillewijn P, Wittich R.M, Ramos J. 2007. Escherichia coli has multiple enzymes that attack TNT and release nitrogen for growth. Environmental Microbiology. 9: 1535 – 1540.

Haynes C, Koder R, Miller A, Rodgers D. 2002. Structrure of nitroreductase in the three states. Effect of inhibitor binding and reduction. Journal of Biological Chemistry. 13: 11513-11520.

Hauben, L., Vauterin, L., Moore, E.R., Hoste, B., and Swings, J. 1999. Genomic diversity of the genus Stenotrophomonas. International Journal of Systematic Bacteriology. 49:1749-1760

Hyoun-Young K, Hong-Gyu S. 2005. Purification and characterization of NAD(P)H-dependent nitroreductase I from Klebsiella sp. C1 and enzymatic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene. Biotechnologically Relevant Enzymes and Proteins. 68: 766 – 773.

Hyung-Yeel K, Bheong-Uk L, Yun-Seok C, Kyen-Heon O. 2007. Purification and characterization of the NAD(P)H-nitroreductase for the catabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) in *Pseudomonas sp*. HK-6. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 12: 433-440.

Juhasz A, Stanley G, Britz M. 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by Stenotrophomonas maltophilia strain VUN 10,003. Letters in Applied Microbiology. 30: 396-401.

Juhasz A, Naidu R. 2007. Explosives: Fate, dynamics and ecological impact in terrestrial and marine environments. Environmental Contamination Toxicology. 191: 163-215.

Kim H, Bennett G, Song H. 2003. Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by Klebsiella sp. Isolated from activated sludge. Biotechnology letters. 24: 2023-2028.

Kim H, Song H. 2005. Purification and characterization of NAD(P)H-dependent nitrorreductase I from Klebsiella sp. C1 and enzymatic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene. Applied Microbiology and Biotechnology. 68: 766-773.

Koike H, Ssaki H, Kobori T, Zenno S, Saigo K, Murphy M, Adman E, Tanokura M. 1998. 1.8A Crystal structure of the major NAD(P)H:FMN oxidoreductase of a bioluminescent bacterium, vibrio fisheri: overall structure, cofactorand substrate-binding and comparison with related flavoproteins. Journal of Molecular Biology. 280: 259-273.

Kulkarni M, Chaudhari A. 2007. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. Journal of Environmental Management. 85: 496-512.

Kutty R, Bennett G. 2005.Biochemical characterization of trinitrotoluene transforming oxygen-insensitive nitroreductases from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Archives of Microbiology. 184: 158–167.

Kobori T, Sazaki H, Lee W, Zenno S,Saigo K, Murphy M, Tanokura M. 2001. Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from Escherichia coli that reduces nitrocompounds. Alteration of pyridine nucleotide binding by a single amino acid substitution- Journal of Biological Chemistry. 276: 2816-2823.

Lewis A, Goszczynski T, Crawfoed R, Korus R, Adamassu W. 1996. Products of anaerobic 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transformation by *Clostridiun bifermentans*. Applied Environmental Microbiolgy. 62: 4669-4674.

Li Z, Demple B. 1994. SoxS an activator of speroxide stress genes in *Escherichia coli.* Journal of Biological Chemistry. 269: 18371-18377.

Li Z, Demple B. 1996. Sequence specificityfor DNA binding by *Escherichia coli* SoxS and Rob proteins. Molecular Microbiology. 20: 937-947.

Liochev S, Hausladen A, Fridovich I. 1999. Nitroreductase A is regulated as a member of the soxRS regulon of *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 96: 3537-3539.

Svensson-Stadler L, Mihaylova S, Moore E. 2011. *Stenotrophomonas* interspecies differentiation and indentification by *gryB* sequence analysis. FEMS Microbiology Letters. 327: 15-24.

Loeffler A. 1998. Evaluation of the NITREM process. National Defense Industrial Association, 24th Environmental Symposium & Exhibition, Tampa Fl. Paper N° 3. Pp, 1-4, www.ndia.ord/events/past/html. Consultado Octubre de 2013.

Lovering A, Hyde E, Searle P, White S. 2001. The structure of Escherichia coli nitroreductase complexed with nicotinic acid: three crystal forms at 1.7A, 1.8A and 2.4A resolution. Journal of Molecular Biology. 309: 203-213.

Maloney S, Engbert E, Suidan M, Hickey R. 1998. Anaerobic fluidized-bed treatment of propellant wastewater. Water Environmental Research. 70(1): 52-59.

Morokutti A, Lyskowski A, Sollner S, Pointner E, Fitzpatrick TB, Kratky C, Gruber K, Macheroux P. 2005. Structure and function of YcnD from *Bacillus subtillis*, a flavin-containing oxidoreductase. Biochemistry. 44(42):13724-33.

Nyanhongo G, Schroeder M, Steiner W, Gübitz G. 2005. Review: Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT): An enzymatic perspective. Biocatalysis and Biotransformation, Vol 23(2): 53-69

Nyanhongo G, Aicherniga N, Ortner M, Steiner W, Guebitza G.2009. Incorporation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transforming bacteria into explosive formulations. Journal of Hazardous Materials. 165: 285–290

Oh B, Sarat G, Shea P. 2001. TNT nitroreductase from a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from TNT- contaminated soil. Soil Biology and Biochemistry. 33: 875 – 881.

Pak J, Knoke K, Noguera D, Fox B, Chambliss G. 2000. Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene by Purified *Xenobiotic Reductase B* from *Pseudomonas fluorescens* I-C. Applied and Environmental Microbiology. 66 (11): 4742–4750.

Parkinson G, Skelly J, Neidle S. 2000. Crystal structure of FMN-dependent nitroreductase from Escherichia coli B: a prodrug-activating enzyme. Journal of Medical Chemistry. 43: 3624-3631.

Paterson E, Boucher S, Lambert I. 2002. Regulation of the *nfsA* gene in *Escherichia coli* by *Soxs*. Journal of Bacteriology. 184: 51-58.

Pérez-Reinado E, Blasco R, Castillo F,Moreno-Vivián C, Roldán M. 2005. Regulation and characterization of two nitroreductase nprA and nprB genes of *Rhodobacter capsulatus*. Applied Environmental Microbiology. 71: 7643–7649.

Race P, Lovering A, Green R, Ossor A, White S, Searle P, Wrighton C, Hyde E. 2005. Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. Journal of Biological Chemistry. 280: 13256-13264.

Ramos J, González-Pérez M, Caballero A, Dillewijn P. 2005. Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: Plants and Microbes Put up a Fight. Current Opinion in Biotechnology. 16: 275-281.

Riefler G, Smets B. 2002. NAD(P)H: Flavin Monononucleotide Oxidoreductase Inactivation during 2,4,6-Trinitrotoluene Reduction. Applied and Environmental Microbiology. 68(4): 1690-1696.

Rodgers J, Bunce N. 2001. Review Paper: Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives. Water Research. 35(9): 2101-2111.

Roldán M, Pérez-Reinado E, Castillo F, Moreno-Vivián C. 2008. Review: Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. Federation of Eurepean Microbiological Societies. 32: 474-500.

Rosser S, Basran A, Trams E, French C, Bruce N. 2001. Microbial Transformations of Explosives. Advances in Applied Microbiology. Vol 49.

Ryan R, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison M, Berg G, Van der Lelie D, Dow J.M. 2009. The versatility and adaptation of bacteria form the genus *Stenotrophomonas*. Nature Reviews, Microbiology. 7: 514-525.

Scheideler L., Ninnemann H. 1986. Nitrate Reductase Activity Test: Phenazine methosulfate-ferricyanide stop reagent replaces post assay treatment. Analytical Biochemistry. 154:29-33.

Snape J, Walkley N, Morey A, Nicklin S, White G. 1997. Purification, Properties, and Sequence of Glycerol Trinitrate Reductase from *Agrobacterium radiobacter*. Journal of Bacteriology. 179 (24): 7796-7802

Snelliz Z, Nepovim A, Taghavi S, Vangronsveld J, Vanek T, Van der Lelie D. 2002. Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. Environmental Science and Pollution Research. 9(1): 48-61.

Spain J. 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. Annual Review of Microbiology. 49: 523-555.

Spain, J. 1995. Bacterial degradation of nitroaromatic compounds under aerobic conditions. In J. C. Spain (ed.), Biodegradation of Nitroaromatic Compounds. Plenum Press, New York.

Spain J, Hughes J, Knackmuss H. 2000. Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. CRC Press. España. 435 p.

Steen K. 2007. Technical Expertise and U.S. Mobilization, 1917-1918: High Explosives and War Gases. Frontline and Company. Comparative perspectives on the chemical industry at war 914-1924. Pp 103- 122.

Stenuit B, Eyers L, El Fantroussi S, Agathos S. 2005. Promising strategies for the mineralisation of 2,4,6-trinitrotoluene. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 4: 39–60

Stenuit B, Eyers L, Rozenberg R, Habib-Jiwan J, Agathos S. 2006. Aerobic growth of *Escherichia coli* with 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) as the sole nitrogen source and evidence of TNT denitration by whole cells and cell-free extracts- Applied and Environmental Microbiology. 72: 7945-7948.

Stenuit B, Agathos S. 2010. Mini-Review: Microbial 2,4,6-trinitrotoluene degradation: could we learn from (bio)chemistry for bioremediation and vice versa?. Applied Microbiology and Technology. 88: 1043-1064.

Stenuit B, Agathos S. 2011. Biodegradation and Bioremediation of TNT and Other Nitro Explosives. S. *Comprehensive Biotechnology.* Segunda edición. Academic Press. Burlington. 167-181 p.

Symons Z, Bruce N. 2006. Highlight: Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. Natural Products Reports. 23: 845-850

Talley, JW (2006). Biorremediation of recalcitrant compounds. CRC Press. University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana, USA, 328 p.

Toogood H, Gardiner J, Scrutton N. 2010. Biocatalytic Reductions and Chemical Versatility of the Old Yellow Enzyme Family of Flavoprotein Oxidoreductases. Chem Cat Chem. 2: 2–25

Villegas S (2009) Aislamiento de microorganismos degradadores de 2,4,6-Trinitrotolueno (TNT) a partir de ambientes contaminados con explosivos. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Departamento de microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Vorbeck C, Lenke H, Fischer P, Spain J, Knackmuss H-J. 1998. Initial reductivereactins in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene. Applied and Environmental Microbiology. 64: 246-252

Williams R, Bruce N. 2002. New uses for an old enzyme- the old yellow enzyme family of flavoenzymes. Microbiology. 148: 1607-1614.

Williams R, Rathbone D, Scrutton N, Bruce N. 2004. Biotransformation of Explosives by the Old Yellow Enzyme Family of Flavoproteins. Applied and Environmental Microbiology. 70(6): 3566–3574.

Willems A., Collins M.D.1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic Bacteriology 43:305-313.

Wolf A, Fritze A, Hagemann M, Berg G. 2002. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52:1937–1944

Wittich R.M, Ramos J, Dillewijn P. 2009. Microorganisms and Explosives: Mechanisms of Nitrogen Release from TNT for Use as an N-Source for Growth. Environmental Science Technology. 43: 2773-2776.

Wittich R.M, Haïdour A, Dillewijn P, Ramos J.L. 2008. OYE Flavoprotein Reductases Initiate the Condensation of TNT-Derived Intermediates to Secondary Diarylamines and Nitrite. Environmental Science Technology. 42: 734-739.

White G, Snape J, Nicklin S. 1996. Biodegradation of Glycerol Trinitrate and Pentaerythritol Tetranitrate by *Agrobacterium radiobacter.* Applied and Environmental Microbiology. 62(2): 637–642

Yin H, Wood T, Smets B. 2005. Reductive transformation of TNT by *Escherichia coli*: pathway description. Applied Microbial and Cell Physiology. 67: 397–404.

Young J, Kuykendall L, Martínez-Romero E, Kerr A, Sawada H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes, R. rubi, R. undicola and R. vitis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51: 89-103.

Zhang J, Zheng Y, Liu Z, Shen Y. 2007. Preparation of 3-ketovalidoxylamine A C-N lyase substrate: N-p-nitrophenyl-3-ketovalidamine by *Stenotrophomonas maltophilia* CCTCC M204024. Applied Microbiology and Biotechnology. 73: 1275-1281.