

# Aplicaciones de la biotecnología en el Ministerio de Defensa

Luis E. Martín Otero<sup>1</sup>

*Med Mil (Esp) 2002; 58 (4): 32-36*

## DETECCIÓN DE SUSTANCIAS DE ALTO RIESGO POR MÉTODOS BIOLÓGICOS

En los últimos años se ha incrementado la cantidad de nuevos compuestos químicos, obtenidos por síntesis y que se encuentran afectando al medio ambiente y a las personas expuestas. Para poder valorar el beneficio potencial de cualquier compuesto frente al posible daño hay que tener en cuenta no sólo el compuesto en cuestión, sino también la extensión de la producción y el tipo de exposición.

Los daños que en el entorno sobrevienen por una gestión inadecuada de estos productos no se localizan sólo en el punto donde se generan, sino que se extienden indefinidamente por acción de las corrientes que constituyen el ciclo natural del agua y por acción de las corrientes atmosféricas en el caso de que estén en fase gaseosa. Los residuos sólidos que se almacenan en la superficie o enterrados están sujetos a los mismos efectos. El problema de un compuesto puro extraño al entorno es que se encuentre disuelto, pues en caso contrario estaría localizado y por tanto controlado, mientras que si está disuelto el perjuicio se extiende a kilómetros de distancia contaminando todo a su paso. Como el agua es uno de los medios que más participa a la hora de la extensión de la contaminación, es uno de los parámetros sobre el que hay que ejercer un mayor control.

Por otro lado a lo largo de la cadena trófica un compuesto que en principio llega al medio ambiente de forma muy diluida puede llegar a concentrarse en gran medida al final de la cadena, a este proceso se le denomina bioconcentración. Además, hay que considerar las posibles modificaciones que pueden acontecer sobre las distintas sustancias tanto por sus propias reactividades como por el metabolismo de los distintos organismos.

El proyecto se encuentra dividido en dos etapas gradualmente abordadas. En un primer lugar el desarrollo y puesta a punto de una metodología aplicable a medio ambiente de forma rutinaria y que es indicadora de forma inespecífica de un cierto riesgo; y en una segunda etapa en la que se persigue un objetivo totalmente específico, la detección de compuestos utilizables como agresivos químicos o susceptibles de ser utilizados en acciones terroristas, o accidentes industriales.

Respecto a la primera parte del proyecto en la valoración inespecífica se debe tener en cuenta el ciclo de vida de un compuesto. En este hay que considerar la producción, almacenamiento, transporte, utilización y destrucción. A lo largo de las distintas etapas se van produciendo pérdidas al medio ambiente, suelo, aire y agua lo que va ocasionando una deslocalización del problema de contaminación.

Debido a que la tasa de crecimiento de la industria, para facilitar el desarrollo de la vida, ha sido tan rápida y se ha reaccionado tan tarde frente al impacto que ejercen todos sus productos químicos, los estudios relativos a su potencial toxicológico en los ecosistemas distan mucho de estar completos. En estas condiciones, al objeto de reducir el riesgo sobre el hombre y el medio ambiente, su fabricación, uso y eliminación se llevarán a cabo en condiciones que aseguren el control de su posible dispersión.

Las nuevas reglamentaciones internacionales plantean un doble objetivo alcanzable a través de la herramienta de evaluación de riesgo ambiental basado en el criterio de no efecto, ya que este tipo de criterios son proteccionistas (Fig. 1).

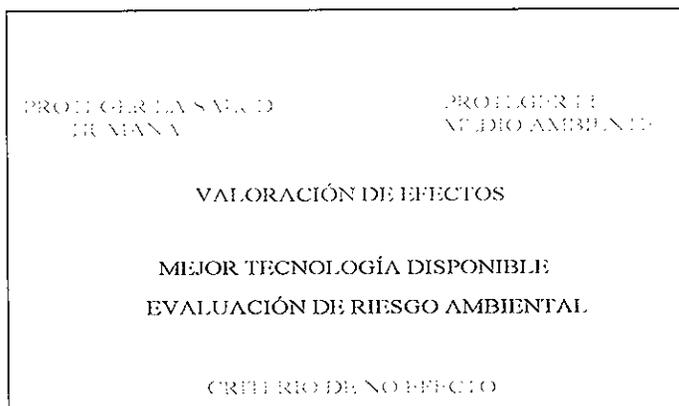


Figura 1. Objetivos de las nuevas reglamentaciones internacionales.

Los compuestos de nueva creación presentan en común la falta de información sobre el posible impacto ambiental negativo, fruto de su producción, transporte y uso. Priorizando los estudios relacionados con su mecanismo de acción, sintomatología, patologías, prevención y terapias se ha infravalorado la importancia y transcendencia de este tipo de estudios. Debido a la repercusión que suponen sobre la salud humana se considera de gran relevancia el impacto ambiental que producen incluso si la atención se centra única y exclusivamente en su producción y transporte sin considerar su ulterior uso. Son productos relacionados con el campo de los fitosanitarios, productos utilizados como antidisturbios o incluso agresivos químicos, que debido a la situación actual de actos terroristas, pudiera ocurrir que grupos desestabilizadores los utilizaran para crear focos de subversión.

Las metodologías clásicas de análisis de riesgo se basan en análisis físico-químicos. El principal inconveniente de esto es que son sumamente específicas y cualquier alteración sobre la estructura de un compuesto puede conducir a resultados erróneos produciendo falsos positivos o falsos negativos haciéndose necesario el complementarlas con valoraciones menos selectivas en principio como son los métodos biológicos (biosensores) pero que proporcionan una respuesta de toxicidad basal de suma importancia. Para la detección de sustancias de alto riesgo se optó por las metodologías biológicas ya que en un principio se ha priorizado la detección de un problema de forma genérica frente a la detección selectiva de un compuesto tal que se produzca una señal de alerta que permite tomar medidas preventivas de forma rápida y en una etapa posterior tratar de identificar la naturaleza del compuesto.

Dada la complejidad de las sustancias presentes en la biosfera, los fenómenos de interacciones (sinergias, inhibiciones, etc.) pueden modificar en gran medida el efecto del compuesto. La gran ventaja de los biosensores es la de suministrar una medida integradora del efecto.

El objetivo común de toda valoración de riesgo es proporcionar un dato numérico de la posible incidencia sobre una unidad biológica, y ya que por definición la toxicidad es una respuesta biológica, los ensayos biológicos son el método más apropiado para poder establecerla además de que son los que mejor integran los efectos de los contaminantes.

Actualmente, para poder analizar el riesgo una vez que se ha identificado un peligro es necesario valorar paralelamente la respuesta producida a distintas dosis del compuesto en cuestión y la propia exposición.

<sup>1</sup> Tcol. Vet. Sección de Defensa Biológica y Toxicología Ambiental. Departamento NBQ. Fábrica Nacional de La Marañosa. DGAM. MINISDEF.

En este proyecto, las valoraciones se han realizado mediante metodologías *in vitro* y de pequeños organismos. Son metodologías asequibles desde el punto de vista de infraestructura y operatividad, no son costosas y el tiempo de respuesta es corto, además de la facilidad de realizar múltiples replicados y de su altísima reproducibilidad. Este tipo de test proporcionan mayores posibilidades porque permiten un mejor control de las condiciones experimentales llegando a conocer el mecanismo de acción de un compuesto. Las tasas de variabilidad son reducidas respecto a cuando se comparan con los test *in vivo*, pero para poder sustituir los test clásicos por estos se hace imprescindible el conocer las relaciones existentes entre ambos sistemas, siendo irreal y peligrosa la pretensión de abolir totalmente estos ensayos en una etapa previa a la posible exposición al hombre para aumentar la seguridad de la salud pública. Las técnicas de futuro tienden a la minimización de la utilización de animales superiores de forma que las primeras etapas de validación sean *in vitro* para obtener unas primeras conclusiones y, cuando se crea conveniente, confirmarlas con las metodologías clásicas.

El medio acuático es el único para el que la Unión Europea ha establecido Criterios de Peligrosidad dando los rangos en ppm. Los criterios establecidos están basados en estudios de toxicidad aguda en *Oncorhynchus mykiss*, *Daphnia magna* y *Chlorella vulgaris*. Los test agudos desarrollados con estos organismos se encuentran estandarizados. El test de inhibición del crecimiento de algas, estandarizado (OCDE, 1984), utiliza *Chlorella vulgaris* como sistema de predicción y valoración de riesgo de sustancias puras y muestras ambientales. El ensayo de toxicidad aguda de *Daphnia magna*, estandarizado por la OCDE (Directiva N° L 133/89) como sistema de predicción y valoración de riesgo de sustancias puras y muestras ambientales utiliza el cladócer *Daphnia magna* y el ensayo de toxicidad con *Oncorhynchus mykiss* valora el efecto desfavorable, discernido, inducido en un organismo durante un corto plazo de exposición a una sustancia dada (OCE, París 1981, test guideline 203).

Cuando lo que se pretende es establecer Criterios de Peligrosidad, se realizan siempre sobre test estandarizados, con ensayos interlaboratoriales, ringtest y con protocolos totalmente definidos utilizando metodologías al alcance de todos los profesionales. Son ensayos alternativos a los ensayos con animales de experimentación. Cuando lo que se necesita es cumplir una normativa en la que se especifica la exigencia del desarrollo de unos determinados ensayos es obligatorio el uso de test estandarizados. Las nuevas Directivas (Directiva 96/61/CE del Consejo del 24 de septiembre del 1996 relativa a la prevención y control integrados de la contaminación) obligan a utilizar la mejor tecnología disponible, y esta tecnología son ensayos alternativos, que proporcionan información sobre lo que podría ocurrir en el medio ambiente. Cuando lo que se buscan son alternativas prácticas y el no cumplimiento de unas determinadas normativas que exigen la aplicación de determinados ensayos y lo que se pretende es conocer la posible toxicidad de un compuesto o de una mezcla de composición no definida, se pueden utilizar ensayos no estandarizados siempre que estén suficientemente validados, bien referenciados mediante Draft o en publicaciones que hayan pasado las críticas de revistas internacionales.

En el caso presente lo que se pretendió fue discernir que bioensayo podría ser el más adecuado para valorar compuestos de distinta naturaleza; para ello se sometieron una serie de microorganismos a distintas dosis de compuestos y se valoraron sus efectos. Los ensayos se han realizado con grupos filogenéticamente diferentes que engloban totalmente el entramado trófico existiendo ya un rango establecido para estos organismos que permite la clasificación de compuestos según su toxicidad en base a la especie más sensible de las tres. En el caso presente se sustituyó el uso de *Oncorhynchus mykiss* por cultivos celulares (Línea RTG-2), por la gran cantidad de ventajas que proporciona. Es obligatorio el trabajar al menos con tres eslabones y a la hora de clasificar un compuesto seleccionar la especie más sensible ya que estos criterios son proteccionistas. Estos tres tipos de ensayos (su operación conjunta) son la mejor tecnología disponible, siendo una herramienta imprescindible los tres juntos para establecer la toxicidad de un compuesto o de una mezcla de compuestos, además facilitan mucha información de soporte a las técnicas analíticas.

Respecto al segundo punto del proyecto, los ensayos validados pueden ser indicativos de una señal aguda, pero interesa el desarrollo de metodo-

logías más adecuadas, bien por su sensibilidad, bien por su eficacia en la respuesta.

Cuando se habla de detección de compuestos conviene recordar que esta se basa en distintos mecanismos en función del compuesto en cuestión que se quiera detectar. Se ha desarrollado la metodología para la detección de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) perteneciente al grupo de explosivos rompedores para lo cual se optó por el empleo de microalgas como elemento sensible del biosensor. La razón de elegir este organismo es por su gran diversidad existente además de ser la base de la cadena trófica y su gran peculiaridad frente al TNT, en presencia de trazas del mismo se inhibe inmediatamente su fluorescencia. El método desarrollado se basa en la inhibición de la fluorescencia de un cultivo cuando se ve expuesto a este tipo de compuestos (Fig. 6).

La razón de la sensibilidad reside en que seguramente es la primera vez que este tipo de sustancias entra en contacto con estos organismos en su historia evolutiva, siendo el estudio de adaptación y supervivencia de estos organismos de gran interés. La supervivencia puede ocurrir por dos fenómenos, adaptación fisiológica o mutación genética. Si bien es cierto que existe variabilidad interespecífica en la resistencia a distintos compuestos es la variación genética la que permite la supervivencia frente a los cambios ambientales. La principal fuente de variación genética de una población la constituye la mutación en cuanto es la única fuerza evolutiva capaz de generar nuevos alelos. En base a esto se han expuesto distintas especies de microalgas al TNT demostrando su capacidad de supervivencia al mismo por mutación espontánea.

La fluorescencia es una propiedad intrínseca de las microalgas, cuando se ven excitados sus pigmentos por una determinada longitud de onda, emiten a otra determinada longitud de onda. Las longitudes de onda tanto de excitación, como de emisión son características del tipo de pigmento. Esto es la base del funcionamiento del biosensor.

Una vez que se obtuvo la población de mutantes se comprobó que su inhibición de fluorescencia no era ni con mucho tan drástico como ocurría en el caso de la población natural. Esto constituye la base del biosensor. El siguiente paso lo constituye la inmovilización de estos organismos en un entramado que permita la difusión del medio externo al organismo biosensor. Para esta inmovilización en principio se pensó en encapsulamiento en un polímero natural, optimizando el tamaño y forma de estos encapsulados. Es preciso realizar estudios en condiciones controladas de campo para confirmar el buen funcionamiento del sistema. Se comprobó la especificidad del biosensor en base a la diferente respuesta frente al agente selectivo, los cultivos naturales actúan como control frente a los mutantes.

## DETECCIÓN Y PROFILAXIS FRENTE A AGRESIVOS BIOLÓGICOS

### INTRODUCCIÓN

La aparición de las armas biológicas en el escenario internacional, su fácil fabricación así como su accesibilidad, las han convertido en un riesgo al cual hay que hacer frente. La capacidad de realizar una detección rápida y fiable, así como la de disponer de medios que permitan la generación de vacunas eficaces frente a los distintos patógenos utilizados en este tipo de acciones, es actualmente de gran importancia.

La biotecnología ofrece, al campo de la defensa biológica, las herramientas necesarias para desarrollar métodos rápidos que permitan la detección de agresivos biológicos de uso en acciones militares o terroristas, así como la adaptación de estas técnicas a sistemas portátiles con los que poder detectar los agentes patógenos en el lugar del suceso con la máxima fiabilidad y rapidez. Los estudios inmunológicos y moleculares de los agentes patógenos proporcionarían la tecnología necesaria para abordar en un futuro próximo el desarrollo de vacunas de nueva generación.

Este Programa nace como consecuencia de la preocupación de nuestras FAS por una parte y de los requerimientos de la Organización para el Tratado del Atlántico Norte (OTAN) por otra, de desarrollar proyectos que respondan a las inquietudes actuales que existe en materia NBQ (Nuclear, Biológica y Química) en general y en asuntos biológicos en particular. Es necesario disponer de laboratorios que tengan la capacidad de detectar e identificar los agresivos biológicos, así como diseñar sistemas que puedan ser trasladados a Zona de Operaciones para la detección *in situ*. El proyec-

to también pretende abordar otra faceta que es generar la metodología necesaria para una buena medicina preventiva, incluyendo el desarrollo de herramientas de laboratorio que permitan el diseño de vacunas de nueva generación en el caso de que fuese necesario.

El Programa es liderado y coordinado por la **FÁBRICA NACIONAL DE LA MARAÑOSA**, a través de la Sección de Defensa Biológica del Departamento NBQ. La Fabrica Nacional de la Marañosa es un centro perteneciente a la Subdirección General de Tecnología y Centros, integrado en la Dirección General de Armamento y Material del Ministerio de Defensa (SGTECEN/DGAM).

Al ser un programa con unos objetivos muy ambiciosos y siendo conscientes de la envergadura del trabajo a realizar, se consideró oportuno contar con la colaboración de centros y laboratorios nacionales de carácter no militar y de reconocido prestigio, al objeto de un mejor cumplimiento de las tareas encomendadas.

Así, tras numerosas gestiones, debates y reuniones, y siempre bajo la coordinación y dirección de la Sección Biológica de la Fábrica Nacional de La Marañosa, se consiguió la colaboración de los siguientes Centros:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL (CISA).** Perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

**FACULTAD DE VETERINARIA.** Perteneciente a la Universidad Complutense de Madrid, del Ministerio de Educación y Cultura. Participación del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal), a través de SAMA (Laboratorio de Sanidad Animal y Medio Ambiente).

**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III.** Organismo Autónomo del Ministerio de Sanidad y Consumo. Participación de las siguientes dependencias de la Subdirección General de Laboratorios y Servicios en Salud Pública del Instituto:

- **CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA**  
Servicio de Microbiología Diagnóstica.  
Servicio de Bacteriología.
- **UNIDAD DE BIOINFORMÁTICA.**  
LABORATORIOS HIPRA, S. A. Amer (Gerona). Participación del Departamento de I+D.

## OBJETIVOS DEL PROYECTO

Ante un hipotético ataque con armas biológicas las acciones deben estar encaminadas a la detección del tipo de agente empleado. Las fases que son necesarias cumplir son:

1. Detección (fase de alerta). Tiene que realizarse en cuestión de minutos
2. Identificación. A ser posible en menos de 24 horas.
3. Confirmación. En pocos días.

El primer objetivo del proyecto es el desarrollo de técnicas rápidas, específicas y sensibles que nos permitan cumplir con las fases de identificación y confirmación de muestras que pudieran contener agentes patógenos utilizados en guerra biológica, como por ejemplo las bacterias responsables del ántrax, muermo, etc. Estos microorganismos, así como muchos otros, son del máximo interés para la defensa. Se trata de agentes hacia los cuales los países desarrollados, y en particular la OTAN han dirigido su atención y esfuerzos con el objeto de prevenir a todos los niveles los efectos que desencadenaría su aparición.

Para poder desarrollar los diferentes sistemas de detección e identificación biológica sobre los gérmenes mencionados es necesario en primer lugar un buen conocimiento de los mismos. Ello implica en la mayoría de los casos el cultivo de microorganismos, que se llevará a cabo en lugares especialmente preparados al efecto, esto es, con niveles de seguridad biológica adecuados (nivel 2, nivel 3, y nivel 4, cuando proceda), utilizando para ello las instalaciones de que dispongan los centros investigadores participantes en el proyecto.

Las técnicas de laboratorio elegidas para proceder al diagnóstico e identificación, han de caracterizarse por ser rápidas, específicas y fiables. Entre ellas. Se incluyen las técnicas de amplificación genómica y las técnicas inmunológicas.

Las **técnicas de amplificación genómica** serán las que se aplicarán de forma preferente. Consisten en el desarrollo de sistemas capaces de multiplicar de forma geométrica el número de copias del genoma objeto de investigación, de forma que se pueda detectar de forma específica y sensible la presencia de un microorganismo en muestras diversas. La técnica más utilizada para obtener este resultado es la llamada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*). La reacción, en términos generales, estará encaminada a detectar la presencia de aquellos genes que con mayor sensibilidad y especificidad permitan la identificación del agente.

Las **técnicas inmunológicas** nos permiten, a través de reacciones antígeno-anticuerpo, la identificación de numerosos microorganismos, caracterizándose también por su sensibilidad y rapidez.

Una vez desarrolladas las diferentes técnicas anteriormente mencionadas, el siguiente paso es la adaptación de los sistemas estudiados a formatos automatizados que permitan trabajar en un entorno de riesgo NBQ. De hecho, el punto final en el diagnóstico de estos agentes debería ser la independencia total de un Laboratorio central situado fuera de la Zona de Operaciones, en definitiva la capacidad de transportar los sistemas de detección al campo. El desarrollo de nuevas tecnologías, fruto de la convergencia de la biología molecular y las tecnologías de la información, ha permitido la aparición de los microdispositivos, algunos de los cuales tienen aplicación en microbiología. La finalidad de estos equipos es facilitar la realización de ensayos microbiológicos empleando nuevas metodologías que permiten su implantación en dispositivos de pequeño tamaño. En la actualidad, se están desarrollando diversos dispositivos en este sentido, como son los biochips o los kits manuales de identificación rápida (HHTK).

Los **biochips** son sistemas de identificación miniaturizados basados en la hibridación con sondas específicas que permiten detectar bacterias o virus. La ventaja de estos dispositivos radica en la posibilidad de utilizarlos como método de detección "in situ".

Los **HHTK (hand held test kit)** son también dispositivos portátiles basados en técnicas inmunológicas como método de diagnóstico.

El segundo gran objetivo de este Proyecto es el estudio de la bacteria causante del ántrax (*Bacillus anthracis*) desde el punto de vista inmunológico y molecular, identificar los antígenos de interés así como los genes que los codifican, todo ello con el fin de disponer de las herramientas necesarias para poder desarrollar una vacuna eficaz.

La inclusión en el proyecto de *Bacillus anthracis* (agente causal del ántrax) es, de alguna manera, obligada. Las investigaciones a nivel mundial sobre esta bacteria definen un estado tecnológico tal que en estos momentos es una de las armas biológicas que mayor preocupación genera, tanto por su posible uso militar como por su posible uso en acciones terroristas. La facilidad de su producción, la estabilidad de sus esporas para su almacenamiento y la enorme letalidad sin posibilidad de tratamiento cuando se administra por vía aerógena, hacen del ántrax un arma biológica de primera magnitud. Por otro lado, las pautas de vacunación utilizadas actualmente para conferir protección frente a esta bacteria adolecen de lentitud en la respuesta inmune y generan efectos secundarios. Por ello diversos países han entendido que es preciso abordar nuevas estrategias para proceder a la inmunización del personal expuesto o en riesgo, mediante herramientas de biología molecular. España, a través de la ejecución de este proyecto, tendrá un papel fundamental en el desarrollo de estas aplicaciones concretas.

## CONCLUSIONES

El presente proyecto va a permitir dar un paso notable en el diagnóstico rápido de agresivos biológicos, así como definir nuevas líneas en el diseño de vacunas. La rapidez y especificidad en la respuesta diagnóstica y la solución de los problemas inherentes a las vacunas convencionales son dos requisitos fundamentales en el desarrollo de nuevas tecnologías y su potencial comercialización futura.

El desarrollo de sistemas rápidos y fiables de detección de los microorganismos y toxinas manejados en el proyecto, así como la información que se obtenga acerca de la respuesta inmune frente a dichos agentes, tiene una clara aplicación comercial a corto plazo en forma de kits de diagnóstico.

Por lo tanto, desde el punto de vista comercial se aprecia que el proyecto tiene gran interés para la industria nacional, ya que se van a aplicar estrategias novedosas en un momento en el que todavía los desarrollos internacionales están en fase de investigación.

En resumen, este Proyecto tiene un enorme interés, tanto en el ámbito militar como civil, por cuanto permite aumentar nuestras capacidades de defensa ante posibles acciones bélicas o terroristas en las que se utilicen armas biológicas.

**BIODESCONTAMINACIÓN DE SUSTANCIAS QUÍMICAS: BIODEGRADACIÓN DE TIODIGLICOL**

**ANTECEDENTES**

Actualmente se contemplan tres formas de eliminación del agresivo químico iperita: i) incineración, ii) hidrólisis en exceso de álcali y iii) hidrólisis en agua a 90°C. Tanto la incineración como la hidrólisis con álcali plantean problemas por la formación de subproductos potencialmente tóxicos. La hidrólisis a alta temperatura de la iperita da lugar a la formación mayoritaria de tiodiglicol (TDG). Comparado al agresivo, el TDG es relativamente poco tóxico; dependiendo de las especies la LD<sub>50</sub> varía entre 3 y 6 g/kg. El TDG tiene varios usos industriales en la composición de elastómeros, lubricantes, estabilizadores, antioxidantes, tintes etc. Sin embargo, el TDG puede ser utilizado también para la fabricación de iperita, por lo que está clasificado dentro de la convención de armas químicas y, por tanto, debe ser eliminado mediante un proceso de mineralización.

Mientras que la iperita, por su baja solubilidad en agua y toxicidad no es buen candidato para la biodescontaminación, el TDG sí puede ser sometido a procesos de biodegradación. Hasta el momento se han abordado dos aproximaciones prácticas:

- Utilización de mezclas biológicas no definidas (fangos de río) en reactores aerobios
- Utilización de un cultivo puro de una bacteria capaz de utilizar TDG como única fuente de carbono (*Alcaligenes xylosoxydans*), bien en medio líquido o inmovilizadas en microesferas.

Ninguna de las dos aproximaciones ha pasado de la fase experimental. Los problemas que quedan sin resolver se refieren a:

- Acumulación de sustancias no deseables durante la biodegradación de TDG
- Limitaciones en la concentración de TDG y en la velocidad de crecimiento de los cultivos debido a que es necesario utilizar medios pobres en los que el TDG es la única fuente de carbono y energía.

**OBJETIVOS PLANTEADOS**

- Búsqueda de nuevos microorganismos capaces de oxidar TDG
- Caracterización de los productos de degradación
- Aislamiento de los enzimas claves para la degradación
- Estudio de la posibilidad de utilización del microorganismo o el/los enzimas aislados para la descontaminación *in situ*.

**OBJETIVOS ALCANZADOS**

- Identificación de dos nuevas cepas capaces de metabolizar TDG.
- Determinación de la ruta de degradación hasta metabolitos intermedios no tóxicos.
- Parámetros de cultivo adecuados para la degradación de TDG en fermentadores.

**INNOVACIÓN**

Los resultados obtenidos en este trabajo representan un avance respecto a otras aproximaciones en los siguientes puntos:

- Las dos cepas aisladas degradan TDG mientras utilizan otros nutrientes para crecer. Esto implica que se puede obtener un crecimiento más rápido del cultivo y mayor densidad de células que los que se obtienen en medios de cultivo pobres. Hasta ahora no se ha-

bía descrito el metabolismo de TDG en medios de cultivo ricos (co-metabolismo)

- Incremento de la eficiencia de degradación por regulación de la acidez del medio: la capacidad de degradación se incrementa si se evita la acidificación del medio de cultivo debido al metabolismo del TDG
- El hecho de que las cepas aisladas puedan degradar TDG sin utilizarlo como fuente de carbono implica que es teóricamente posible utilizar células en reposo para la degradación. Abre la posibilidad de utilizar los cultivos para la descontaminación *in situ*.

**RESULTADOS**

• Selección

A partir de 100 microorganismos aislados de fangos del río Jarama se seleccionan 2 en los que se observa degradación aerobia de TDG en medio rico. Ninguno de los organismos parece capaz de utilizar TDG como única fuente de carbono y energía.

*Comparación con los resultados obtenidos utilizando Alcaligenes xylosoxydans.*

|  | Lee et al, 1997<br>Reactor discontinuo, medio mineral, Alcaligenes xylosoxydans SH91 | Kim et al, 1997<br>Alcaligenes xylosoxydans SH91 inmovilizado en microesferas, medio mineral | Irvine et al, 1997<br>Reactor de fango activado | NBQ<br>Reactor discontinuo, Alcaligenes sp.PGH10 en medio rico |
|--|--|--|---|--|
| TDG inicial                            | 6 g/l  | 5 g/l  | 8 g/l   | 6 g/l  |
| TDG final                              | 0  | 0  | 0.035 g/l                                       | 0  |
| Acumulación de metabolitos intermedios | Acido tiodiglicólico (5%)<br>Tiodiglicol sulfóxido (5%)                              | Tiodiglicol sulfóxido, concentración no especificada   | No especificado                                 | Acido tiodiglicólico<br>No tiodiglicol sulfóxido               |
| Control de pH                          | No   | Sí   | No  | Sí   |
| Tiempo                                 | 60 horas   | 96 horas   | 24 horas  | 48 horas*  |

\* Tiempo que transcurre entre el comienzo de la degradación y el 90% de reducción en la concentración de TDG.

• Caracterización de las cepas:

PGH10: *Alcaligenes xylosoxydans*. No muestra resistencia a los principales antibióticos excepto estreptomicina

DO61: *Arthrobacter protoformiae* No muestra resistencia a los principales antibióticos excepto a ácido nalidíxico.

• Degradación de TDG

En medio completo sin control de pH, TDG inicial 7.2 g/l;

PGH10: Máxima densidad a 660 nm :6.5; TDG final (5 días): 3.3 g/l. Reducción de 53% (Fig. 2).

En fermentador, a pH constante: TDG inicial 6 g/l:

PGH10: TDG final (6 días): indetectable (menor de 0.003 g/l), reducción > 99% (Fig. 3).

Conclusión: el control de pH del medio mejora drásticamente la eficiencia de degradación de TDG.

**CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS PRODUCIDOS DURANTE LA DEGRADACIÓN DE TDG.**

Existen dos posibles rutas de degradación para el tiodiglicol :

- A. Oxidación a tiodiglicol sulfóxido.

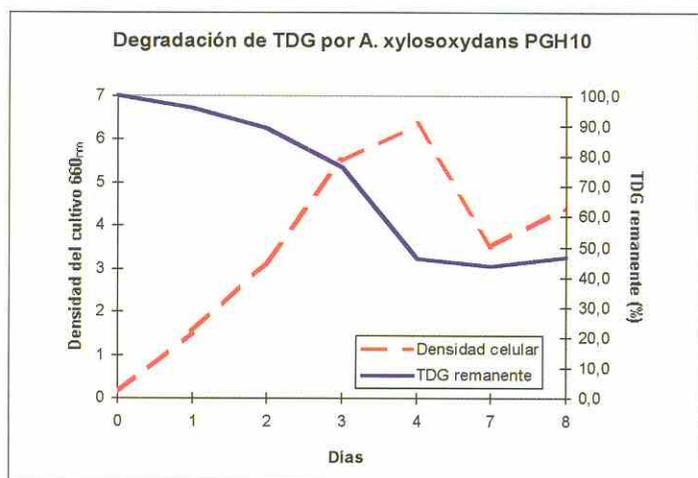


Figura 2. Degradación de TDG (1).

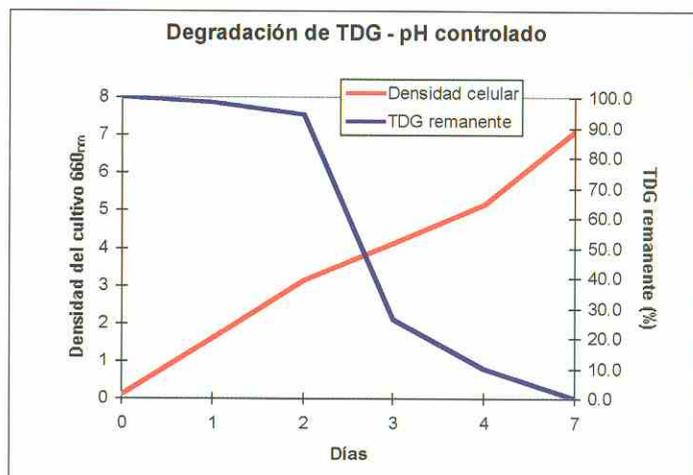


Figura 3. Degradación de TDG (2).

B. Oxidación a ácido tioglicólico e incorporación a la masa celular.

La posibilidad A no parece ocurrir en PGH10, ya que hemos comprobado que el tioglicol sulfóxido no se produce durante el crecimiento en TDG.

La posibilidad B, sí se ha detectado la acumulación de ácido tioglicólico (TDGA), lo cual sugiere que la ruta de degradación pasa por este metabolito.

La transformación TDG → TDGA la lleva a cabo una enzima: butanol deshidrogenasa dependiente de NAD.

La diferencia entre las concentraciones de TDGA detectado y de TDG inicial, indican que parte del TDGA se metaboliza, y los productos probablemente acaban incorporados a la masa celular

#### PLANTEAMIENTO FUTURO

La cepa PGH10 (*Alcaligenes xylosoxydans*) es capaz de degradar TDG al menos con la misma eficiencia que las otras cepas de *Alcaligenes xylosoxydans*, pero con la ventaja de producir esa degradación en medios de

cultivo que permiten el crecimiento rápido de la bacteria y alcanzar densidades celulares muy altas. Se plantean dos posibilidades:

- A. Aislar el enzima butanol deshidrogenasa para utilizarlo como catalizador en la transformación de TDG en TDGA
- B. Estudiar la forma de utilizar células vivas de *Alcaligenes xylosoxydans* PGH10 en las tareas de descontaminación.

La primera posibilidad no parece aconsejable ya que el enzima requiere un cofactor (NAD) cuyo coste haría económicamente inviable la utilización a gran escala.

Respecto a la segunda posibilidad pueden plantearse las siguientes aproximaciones no excluyentes:

- Degradación de TDG tras la rehidratación de cultivos de PGH10 liofilizados
- Sobreexpresión de la enzima butanol deshidrogenasa para incrementar la velocidad de degradación
- Degradación de TDG utilizando cultivos de PGH10 inmovilizados en microesferas (ej: geles de polivinil-alcohol).