

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA  
I DEL MEDI NATURAL

GRAU EN BIOTECNOLOGIA



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



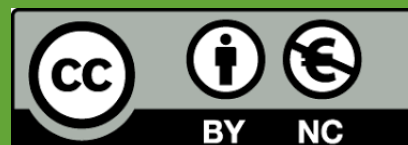
Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

# Activitat desnitrificant de fraccions cel·lulars de *Pseudomonas stutzeri* utilitzada en tasques de bioneteja en pintura mural

---

TREBALL DE FI DE GRAU  
CURS 2019-2020

AUTOR: MIGUEL MARTÍ ESPÍ  
TUTORA: ROSA MARÍA MONTES ESTELLÉS  
COTUTOR: ISMAEL RODRIGO BRAVO  
VALÈNCIA, JULIOL DE 2020





# **Activitat desnitrificant de fraccions cel·lulars de *Pseudomonas stutzeri* utilitzada en tasques de bioneteja en pintura mural.**

## **Resum**

En els últims anys, s'ha investigat i treballat a la utilització d'aplicacions biotecnològiques per a la restauració d'obres d'art, particularment en la neteja de pintures murals amb l'aplicació de bacteris vius, el que s'ha denominat bioneteja en els treballs de conservació de pintura mural. En el Laboratori de Microbiologia de la UPV s'ha desenvolupat aquesta tècnica i s'ha aplicat a les pintures murals de les esglésies de Sant Nicolau i dels Sants Joans de València, utilitzant *Pseudomonas stutzeri* per a l'eliminació de crostes de nitrats insolubles, obtenint-se resultats espectaculars. No obstant això, l'ús de bacteris vius limita molt la tècnica i els treballs en els quals es pot aplicar, per tant, es considera interessant investigar si és possible utilitzar els bacteris inactius o una fracció d'ells i que es conserve l'activitat desnitrificant. Una vegada identificada la capacitat desnitrificant del cep aïllat, que implica un primer pas de reducció de nitrat a nitrit mitjançant l'acció de una nitrat reductasa, es procedeix a la identificació i caracterització d'aquesta activitat enzimàtica. Per a això, s'estudia la possibilitat de realitzar extractes enzimàtics a partir dels cultius bacterians, estudiant l'efectivitat de diferents mètodes de disrupció cel·lular descrits a la bibliografia (ruptura per ultrasons, ús de detergents, ús de cicles de congelació/descongelació) amb l'objectiu d'obtenir un lisat cel·lular que continga l'activitat nitrat reductasa. S'investiga la compartimentalització de la dita activitat mitjançant fraccionament subcel·lular utilitzant diferents estratègies. Del lisat total (TL) s'obtindrà la fracció citosòlica i periplasmàtica (CPP) i la fracció membranosa total (TM), la qual pot dividir-se en les seues corresponents fraccions de membrana externa i interna. A més a més, s'investiga bibliogràficament la possibilitat que aquesta activitat siga part del proteoma periplasmàtic, estudiant la preparació selectiva de proteïnes periplasmàtiques mitjançant diferents procediments, que deixarien les proteïnes periplasmàtiques en la fracció sobrenedant després d'una centrifugació. Amb les dades obtingudes en bibliografia, es valorarà la possibilitat d'obtenir una preparació purificada de l'activitat nitrat reductasa de *Pseudomonas stutzeri* que constituïska el punt de partida d'una aplicació biotecnològica per a l'eliminació de crostes de nitrats en processos de restauració d'obres d'art.

**Paraules clau:** *Pseudomonas stutzeri*, bioneteja, enzims, desnitrificant

**Autor:** Miguel Martí Espí

**Tutora:** Rosa María Montes Estellés

**Cotutor acadèmic:** Ismael Rodrigo Bravo

València, juliol de 2020

## **Denitrifying activity of *Pseudomonas stutzeri* cell fractions used in biocleaning tasks in wall painting.**

### **Abstract**

In recent years, research and work has been done on the use of biotechnological applications for the restoration of works of art, particularly in the cleaning of murals with the application of living bacteria, which has been called biocleaning in the works of conservation of mural painting. This technique has been developed in the Laboratory of Microbiology of the UPV and has been applied to the mural paintings of the churches of Sant Nicolau and Sants Joans in Valencia, using *Pseudomonas stutzeri* for the removal of insoluble nitrate crusts, obtaining spectacular results. However, the use of living bacteria greatly limits the technique and the works in which it can be applied, so it is interesting to investigate on the possibility to use inactive bacteria or a fraction of them to preserve the denitrifying activity. Once the denitrifying capacity of the isolated strain has been identified, which involves a first step of reducing nitrate to nitrite by the action of a nitrate reductase, this enzyme activity will be identified and characterized. To this purpose, the possibility of making enzymatic extracts from bacterial cultures will be studied, considering the effectiveness of different methods of cell disruption described in the literature (ultrasonic rupture, use of detergents, use of freeze/thaw cycles) in order to obtain a cell lysate containing nitrate reductase activity. The compartmentalization of this activity by subcellular fractionation using different strategies is investigated. From the total lysate (TL) the cytosolic and periplasmic fraction (CPP) and the total membranous fraction (TM) will be obtained, which can be divided into their corresponding outer and inner membrane fractions. In addition, the possibility that this activity is part of the periplasmic proteome is investigated bibliographically, studying the selective preparation of periplasmic proteins by different procedures, which would leave the periplasmic proteins in the supernatant fraction after centrifugation. With the data obtained in the literature, the possibility of obtaining a purified preparation of the nitrate reductase activity of *Pseudomonas stutzeri* will be assessed as a starting point for a biotechnological application for the removal of nitrate crusts in restoration processes of works of art.

**Key words:** *Pseudomonas stutzeri*, biocleaning, enzymes, denitrifying

**Author:** Miguel Martí Espí

**Tutor:** Rosa María Montes Estellés

**Cotutor:** Ismael Rodrigo Bravo

València, July 2020

## **Actividad desnitrificante de fracciones celulares de *Pseudomonas stutzeri* utilizada en labores de biolimpieza en pintura mural.**

### **Resumen**

En los últimos años, se ha investigado y trabajado en la utilización de aplicaciones biotecnológicas para la restauración de obras de arte, particularmente en la limpieza de pinturas murales con la aplicación de bacterias vivas, lo que se ha denominado biolimpieza en los trabajos de conservación de pintura mural. En el Laboratorio de Microbiología de la UPV se ha desarrollado esta técnica y se ha aplicado a las pinturas murales de las iglesias de San Nicolás y de los Santos Juanes de Valencia, utilizando *Pseudomonas stutzeri* para la eliminación de costras de nitratos insolubles, obteniéndose resultados espectaculares. Sin embargo, el uso de bacterias vivas limita mucho la técnica y los trabajos en los que se puede aplicar, por tanto, se considera interesante investigar si es posible utilizar las bacterias inactivas o una fracción de ellas y que se conserve la actividad desnitrificante. Una vez identificada la capacidad de desnitrificar de la cepa aislada, que implica un primer paso de reducción de nitrato a nitrito mediante la acción de una nitrato reductasa, se procede a la identificación y caracterización de esta actividad enzimática. Para ello, se estudia la posibilidad de realizar extractos enzimáticos a partir de los cultivos bacterianos, considerando la efectividad de diferentes métodos de ruptura celular descritos en la bibliografía (ruptura por ultrasonidos, uso de detergentes, uso de ciclos de congelación/descongelación) con el objetivo de obtener un lisado celular que contenga la actividad nitrato reductasa. Se investiga la compartimentalización de dicha actividad mediante fraccionamiento subcelular utilizando diferentes estrategias. Del lisado total (TL) se obtendrá la fracción citosólica y periplasmática (CPP) y la fracción membranosa total (TM), la cual puede dividirse en sus correspondientes fracciones de membrana externa e interna. Además, se investiga bibliográficamente la posibilidad de que esta actividad sea parte del proteoma periplásmico, estudiando la preparación selectiva de proteínas periplasmáticas mediante diferentes procedimientos, que dejarían estas proteínas en la fracción sobrenadante tras una centrifugación. Con los datos obtenidos en la bibliografía, se valorará la posibilidad de obtener una preparación purificada de la actividad nitrato reductasa de *Pseudomonas stutzeri* que constituya el punto de partida de una aplicación biotecnológica para la eliminación de costras de nitratos en procesos de restauración de obras de arte.

**Palabras clave:** *Pseudomonas stutzeri*, biolimpieza, enzimas, desnitrificante

**Autor:** Miguel Martí Espí

**Tutora:** Rosa María Montes Estellés

**Cotutor académico:** Ismael Rodrigo Bravo

València, julio de 2020

## **Agraïments i dedicatòries**

M'agradaria començar donant les gràcies a tota eixa gent que m'ha ajudat en l'elaboració d'aquest treball. Tant a Rosa com a Ismael per guiar-me i acompanyar-me al llarg d'aquests dies. A Ana, Nancy, Miguel i Alicia per a ajudar-me i integrar-me en el laboratori, tot i que el temps va ser massa reduït. I a Ana, per eixa ajuda final.

També, agrair a Clara, Marina, Paula, Sergi, Alba, Carmen, Mar i Cris per haver-me acompanyat durant aquests 4 anys. Sense vosaltres, dubte molt que haguera arribat a acabar el que havia començat. Gràcies per ser la meua guia i inspiració.

A la família i amics, sobretot als meus pares i germans, per estar ahí i compartir penes i alegries. A Pandora, per permetre'm evadir-me de la realitat durant alguns moments d'aquest confinament. I, finalment, a les camarades del Cabanyal i l'Olivereta, per ajudar-me a trobar el meu camí i la meua manera de pensar durant aquest any. Gràcies.

Per acabar, m'agradaria dedicar aquest treball a Ángeles, Marciana, Juanito i Domingo, pels que estan i pels que ens han deixat. Gràcies per portar-me fins ací.

“No saber el que ha succeït abans de nosaltres és com ser incessantment xiquets”

Marc Tul·li Ciceró

## Taula de continguts

<b>1. Introducció .....</b>	<b>1</b>
1.1. Deteriorament de les pintures murals .....	1
1.2. Reducció bacteriana de nitrats: activitats Nar i Nap.....	3
1.3. <i>Pseudomonas stutzeri</i> en la bioneteja .....	7
<b>2. Objectius.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Materials i mètodes.....</b>	<b>11</b>
3.1. Recuperació del bacteri .....	11
3.2. Tires API.....	11
3.3. Comprovació del poder desnitrificant del cep .....	12
<b>4. Estudi bibliogràfic .....</b>	<b>13</b>
4.1. Preparació d'enzims bacterians .....	13
4.1.1. Ruptura per ultrasons .....	13
4.1.2. Ús de detergents .....	14
4.1.3. Cicles de congelació/descongelació .....	14
4.2. Compartimentalització de l'activitat nitrat reductasa .....	15
4.2.1. Purificació de Nar i fracció membranosa.....	15
4.2.2. Purificació de Nap i fracció periplasmàtica .....	17
4.3. Estabilització .....	19
4.4. Caracterització.....	22
4.4.1. Caracterització de l'activitat desnitrificant de <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	22
4.4.2. Caracterització dels enzims.....	23
4.4.2.1. Caracterització de Nar .....	24
4.4.2.2. Caracterització de Nap .....	24
4.5. Aplicació dels enzims .....	25
<b>5. Resultats.....</b>	<b>27</b>
5.1. Recuperació del bacteri .....	27
5.2. Tires API.....	27
5.3. Resultats de les proves desnitrificants.....	28
<b>6. Discussió i perspectives de futur.....</b>	<b>30</b>
<b>7. Conclusió.....</b>	<b>34</b>
<b>8. Bibliografia.....</b>	<b>35</b>



## Índex de figures

Figura 1. Eflorescència de sal. _____	1
Figura 2. Estructura del centre actiu de varies nitrat reductases de diferents organismes. _____	4
Figura 3. Estructura tridimensional de la NapA de Desulfovibrio desulfuricans. _____	5
Figura 4. Estructura típica de l'enzim Nar. _____	6
Figura 5. Esquema del procés de la reducció de nitrat per l'enzim Nar acoblat a la membrana. _____	7
Figura 6. Mostra de la bioneteja de la pintura d'una àguila en la lluneta de l'Església dels Sants Joans. _____	9
Figura 7. Placa sembrada amb triple estria després de la incubació a 37 °C. _____	11
Figura 8. Reacció de Griess. _____	12
Figura 9. Procés de desnitrificació en les membranes i periplasma de P. stutzeri. _____	15
Figura 10. Diferents mètodes d'immobilització enzimàtica. _____	20
Figura 11. Diversos procediments d'aplicació sobre la pintura mural. _____	25
Figura 12. Tira API del cep 5190 després de 24 hores. _____	27
Figura 13. Tira API del cep 5190 després de 48 hores. _____	27
Figura 14. Full de control que mostra les diferències entre les 24 i les 48 hores. _____	28
Figura 15. Resultats dels tests de nitrats i nitrits. _____	29
Figura 16. Resultats de la prova del reactiu de Griess. _____	29

## Abreviatures

ATP: Trifosfat d'adenosina

CN: Caldo nitrat

DEAE: Dietilamonietil

DMSOR: Dimetilsulfòxid reductasa

DTT: Ditiotreitòl

EDTA: Àcid etilendiamintetraacètic

FMN: Mononucleòtid de flavina

HEPES: Àcid 4-(2-hidroxietil)-1piperazil-etanosulfònic

HPLC: Cromatografia líquida d'alta resolució

MD: Medi desnitrificant.

MOPS: Àcid 3-(N-morfolí)propil-sulfònic

MQH<sub>2</sub>: Menaquinol

NAD<sup>+</sup>/NADH: Nicotinamida adenina dinucleòtid

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat

Nar: Nitrat reductasa assimilatòria

Nap: Nitrat reductasa periplasmàtica

NED: 1-naftiletildiamina

PMSF: Fluorur de fenilmetilsulfonil

SO: Sulfit oxidasa

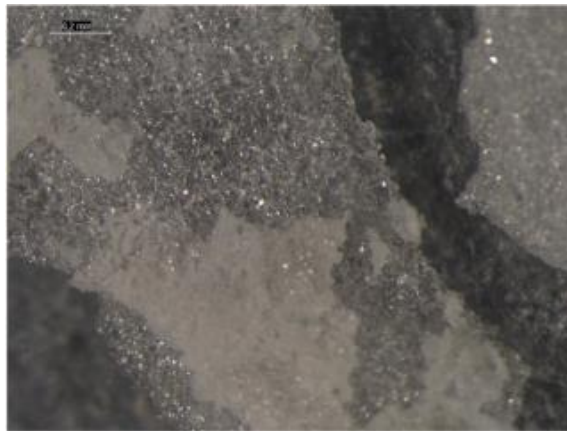
Tris: Tris(hidroximetil)aminometà

XO: Xantina oxidasa

# 1. Introducció

## 1.1. Deteriorament de les pintures murals

Un dels principals problemes que es pot trobar en la degradació d'obres d'art d'exterior i d'interior és la contaminació per sals solubles. La deterioració es produeix principalment pels processos de cristallització i solubilització que presenten les sals (Bosch-Roig et al., 2019). En les pintures murals d'interior, el procés de degradació més important és la formació d'eflorescències de sal (Figura 1), ja que l'acumulació de cristalls de sal a l'interior del mur provoca un augment de la pressió, que desemboca en la fragmentació i deteriorament de la pintura (Bosch-Roig et al., 2013).



**Figura 1. Eflorescència de sal.** Extreta pintures murals de l'Església dels Sants Joans vista a microscopi òptic. (Bosch-Roig et al., 2013)

Per tal d'evitar aquest deteriorament, és necessària la reducció de la quantitat de sal present en la pedra del mur. Aquest procés de neteja es diu dessalinització, i busca reduir el màxim possible la quantitat de sal present. Hi ha diferents mètodes per a fer la dessalinització, tant físics com els ultrasons o l'eliminació amb bisturí, com químics, on destaca la utilització de àcids, tensioactius, alcaloides entre altres. No obstant això, aquest mètodes solen ser molt dràstics i causar problemes severos i permanents en la pintura mural, com poden ser canvis de color, moviments en l'estructura del material i eliminació excessiva del material original. De la mateixa forma, en aquests mètodes trobem deficiències de neteja, no sent sempre completa i deixant errors en comparació amb altres tècniques com la bioneteja. Finalment, l'ús de químics també exposa als treballadors i a l'atmosfera a residus tòxics i perjudicials (Cappitelli et al., 2007 ; Bosch-Roig et al., 2013).

De forma alternativa a aquests mètodes, trobem la bioneteja, que és la utilització de microorganismes o enzims per a eliminar aquest excés de sal. Tot i que molts microorganismes són responsables directes i indirectes de la destrucció de pintures murals, sí que s'ha observat que la bioneteja amb microorganismes específics permet una dessalinització eficient, sense toxicitat i respectuosa amb el medi ambient (Ranalli et al., 2018; Bosch-

Roig et al., 2013). A més a més, ens molt casos s'ha confirmat la seguretat d'utilitzar la bioneteja en la restauració d'obres d'art murals; no obstant això, encara són necessaris més estudis ( Bosch-Roig i Ranalli, 2014).

Dins de la problemàtica de l'acumulació de cristalls de sal, trobem que moltes de les alteracions es produeixen per la nitració i la sulfatació. Els cristalls de sal de nitrats es produeixen, generalment per la presència d'un espai entra la part posterior del mural i la pedra de la volta, ubicada darrere de la pintura. En eixos espais es reuneixen xicotets animals com ratolins i rates, ocells o insectes, que generen una acumulació important de residus orgànics. En aquesta matèria es troben compostos amb nitrogen, que al ser oxidats es transformen en nitrats. Finalment, l'aigua de pluja arrastra aquests nitrats, filtrant-los a través de la pintura i formant les eflorescències, que acabaran formant una crosta blanca sobre la superfície del fresc (Bosch-Roig et al., 2013). A l'hora de remoure nitrats, *Pseudomonas stutzeri* és un bacteri molt efectiu i ràpid, el que permet eliminar els excessos de sal d'una manera relativament senzilla (Lustrato et al., 2012 ; Ranalli et al., 2000).

Per altra banda, l'acumulació de substàncies orgàniques també és un greu problema. Si la matèria orgànica aplicada sobre la pintura no es remou adequadament i es mantenen sobre la pedra restes d'aquesta matèria, es pot crear un ambient proliferatiu, ja que provoca l'aparició de colònies de fongs i bacteris nocius per a l'obra d'art (Lustrato et al., 2012). Tot i que és veritat que els organismes que es solen utilitzar per a la bioneteja no són els causant directes de la biodeterioració, sí que poden crear el ja esmenat ambient proliferatiu que puga atraure a bacteris realment perillosos com els cianobacteris, que creen ambients nutritius per altres organismes. Aquests organismes poden ser, per exemple, productors d'àcids que afecten al pH local com *Nitrosomonas* spp. o *Nitrobacter* spp. (Crispim i Gaylarde, 2004). Aquest tipus de colonització, pot accelerar de forma brusca la destrucció del patrimoni cultural, ja que el metabolisme de molts microorganismes afecta directament a la matriu mineral de la paret, creant danys físics, químics i estètics problemàtics. La formació de biopel·lícules sobre la pedra, sotmet a aquesta a forces de tensió, que afavoreixen l'acumulació de pol·lució i sals i la fragmentació de la pintura. En aquest sentit és molt important mantindre ben controlades les condicions ambientals, ja que controlant les fonts de nutrients, aigua i llum es pot evitar la proliferació descontrolada. A més a més, la falta de control pot obligar a l'ús de biocides, que es desaconsellen per la seua toxicitat (Bosch-Roig et al., 2015).

Tenint en compte que la bioneteja és una eina relativament recent, el camp d'investigació segueix prou obert i, per tant, l'estudi de les conseqüències a mitjà i llarg termini també (Bosch-Roig i Ranalli., 2014). Per aquests motius, és molt interessant l'estudi d'alternatives a l'aplicació directa dels microorganismes vius sobre la pedra, com és, per exemple, l'ús d'enzims actius aïllats dels microorganismes.

## 1.2. Reducció bacteriana de nitrats: activitats Nar i Nap

La desnitrificació en bacteris és una transformació assimilatòria, és a dir, està relacionada amb la conservació d'energia i proporciona als bacteris la possibilitat de subsistir en un medi anaeròbic. Per tant, aquest tipus de respiració és facultativa i es pot inhibir amb oxigen, tot i que també pot donar-se el cas de que romanga activa en situacions microaeròfiles i inclòs aeròbiques (Lalucat et al., 2006).

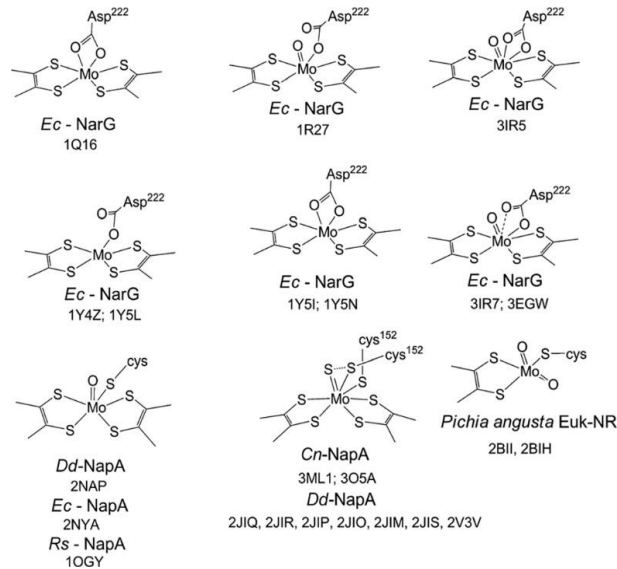
Diferents tipus de metal·loproteïnes, durant el procés de desnitrificació, catalitzen la reducció de nitrat a nitrit, d'aquest a òxid de nitrogen i d'aquest últim a òxid nítric, que, finalment, serà reduït a nitrogen atmosfèric o dinitrogen. Per tant, la desnitrificació pot constar de 4 fases on participen 4 tipus d'enzims diferents: nitrat reductasa, nitrit reductasa, òxid nítric reductasa i òxid nítric reductasa (Hochstein i Tomlison, 1988). No obstant això, la desnitrificació no implica necessàriament el procés complet, és a dir, els 4 passos no tenen perquè realitzar-se en la seua totalitat. En aquest sentit, el primer pas, que és la reducció de nitrat a nitrit, pareix tindre un paper prou important (Blümle i Zumft, 1991).

En bacteris, se necessiten aproximadament uns 50 gens per a poder estructurar tot el sistema de desnitrificació. Ens aquests gens no sols hi ha informació per a construir els enzims; també es troba informació per a la síntesis de cofactors, maduració i regulació. De forma general, els gens de la desnitrificació es troben en el cromosoma bacterià, com és el cas de *Pseudomonas stutzeri* (Lalucat et al., 2006). Ara bé, aquests gens també es poden localitzar en plàsmids i ser igualment funcionals (Vollack et al., 1998). A més a més, aquests gens es divideixen en clústers segons la funció que hagen de realitzar. En el cas de la reducció de nitrats estan els gens *nar*, els gens *nir* per a la reducció de nitrits i els gens *nor* i *nos* per a la reducció de òxid nítric i òxid nítric respectivament (Zumft, 1997).

Com ja ha sigut mencionat anteriorment, el procés complet de desnitrificació comença amb la reducció de nitrat a nitrit; per tant, aquest és un pas clau. Per aquest motiu, molts bacteris tenen més d'un tipus de nitrat reductasa. En total, hi ha 3 tipus: una nitrat reductasa assimilatòria soluble i dues no solubles que es divideixen en respiratòria i periplasmàtica (Lalucat et al., 2006). Les reductases de nitrat, a més a més, són enzims molt variats entre espècies i ceps, tant en llocs actius, com nombre i forma de les subunitats i la localització a nivell cel·lular (Hettmann et al., 2002). L'activitat nitrat reductasa sol estar associada a la membrana plasmàtica, és a dir, són enzims de membrana. Per tant, la reducció de nitrat a nitrit està acompanyada per una translocació de protons (Hochstein i Tomlison, 1988). Aquesta traspàs d'electrons, crea un gradient electroquímic que es pot utilitzar per a generar ATP a través de l'ATP sintasa (Sparacino-Watkins et al., 2014).

Aquesta activitat de desnitrificació es realitza en el centre actiu dels enzims, que solen contindre un àtom de molibdè i fent complexes amb heterocicles de pterina, que serveixen de bastida per a mantindre al molibdè en el lloc actiu (Figura 2). Aquests enzims es poden classificar en tres grups principals: dimetilsulfòxid reductasa (DMSOR), sulfat oxidasa (SO) i xantina oxidasa (XO). Les DMSOR contenen dos cofactors de pterina

mentre que SO i XO sols un. A banda de la pterina, el molibdè necessita d'altres lligands addicionals per a coordinar el centre actiu de forma correcta. Així, per exemple, el lligant addicional de Nap (nitrat reductasa periplasmàtica) és la cisteïna, mentre que en Nar (nitrat reductasa assimilatòria), és l'aspartat (Sparacino-Watkins et al., 2014).



**Figura 2. Estructura del centre actiu de varies nitrat reductases de diferents organismes.** *Ec*: *Escherichia coli*, *Dd*: *Desulfovibrio desulfuricans*, *Rs*: *Rhodobacter sphaeroides*; *Cn*: *Cupriavidus necator*. (Sparacino-Watkins et al., 2014).

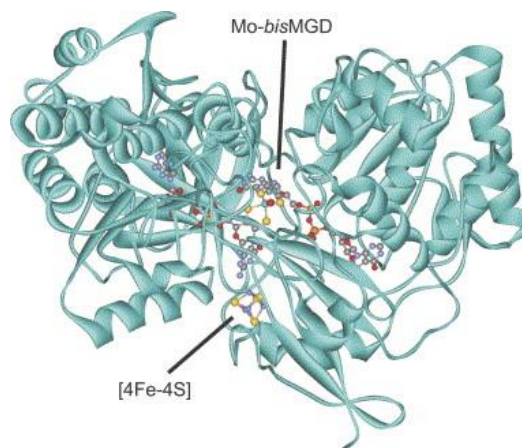
La reducció de nitrat a nitrit en les reductases de nitrat, requereix de dos electrons i se combina amb la transferència de dos protons. Aquest tipus de reacció és típica dels enzims que contenen molibdè i pterina, i implica que el centre de molibdè experimente canvis en el seu estat redox. L'oxigen resultant de la transformació de nitrat a nitrit forma una molècula d'aigua que s'acobla amb un protó (Sparacino-Watkins et al., 2014).

De forma general, molts organismes que fan la desnitrificació, a part de la nitrat reductasa assimilatòria que es pot considerar l'enzim principal, tenen una altra, però aquesta en forma d'enzim dissimilatori periplasmàtic, encara que no hi ha proves d'existència d'aquesta reductasa en el grup de *Pseudomonas* desnitrificants. En aquest sentit, *P. stutzeri* també és especial, ja que s'han trobat indicis d'aquest enzim en el genoma del bacteri (Lalucat et al., 2006). No obstant això, la producció de Nap està regulada per les concentracions de nitrats i oxigen presents en l'ambient. Per tant, Nap sols s'expressa en cas de necessitat (Ji et al., 2013).

De la mateixa forma que Nar, Nap també es troba associada a la membrana plasmàtica, però en el lloc periplasmàtic. A més a més, tot i que en algunes espècies la Nap també està implicada en la respiració de nitrats, aquesta hipòtesis encara no està generalitzada, i les proves que hi ha indiquen que produeix considerablement menys ATP que la Nar. No obstant això, la major afinitat per nitrat de Nap, podria superar aquesta diferència de potència (Sparacino-Watkins et al., 2014).

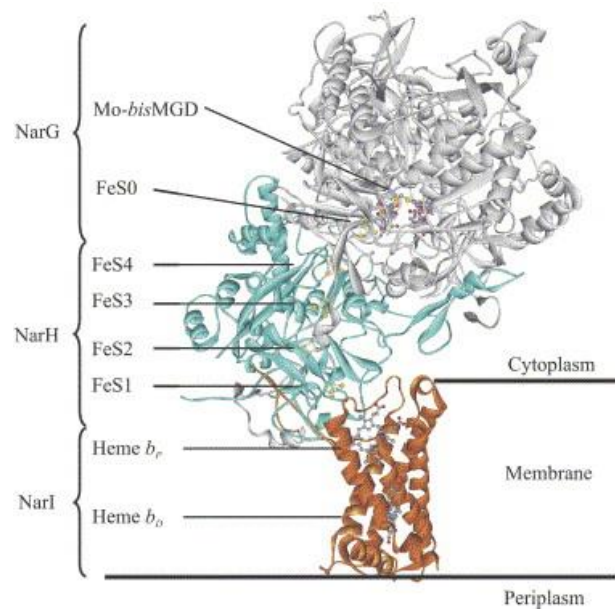
Al contrari que la resta de reductases de nitrat, en les quals s'observa que mantenen una funció més o menys conservada entre espècies, Nap és funcionalment diversa. De fet, la presència d'un homòleg de la seqüència de *nap* en el genoma no implica que aquest organisme tinga la capacitat de fer la desnitrificació. De la mateixa manera que es troba implicada en la desnitrificació, Nap també té la capacitat de reduir el nitrat a amoníac, participant en l'equilibri redox i en l'eliminació del nitrat. A nivell estructural, Nap, de la mateixa forma que Nar, conté un centre catalític format per un àtom de molibdè i per 2 cofactors de pterina, per tant es troben dins del grup DMSOR (Sparacino-Watkins et al., 2014).

Nap és una proteïna molt diversa i per tant es presenta en moltes formes. Per una banda, es troba la Nap monomèrica que té forma d'embut. Aquesta forma ve determinada per la disposició espacial de 2 dels 4 dominis implicats en la unió dels cofactors de pterina amb l'àtom de molibdè. Aquesta forma d'embut, forma una mena de canal per on es creu que entra el nitrat i ix, després, el nitrit. També conté complexos de ferro-sofre encarregats del transport d'electrons. Per altra banda, està la Nap heterodimèrica. Està formada per dos subunitats, una gran anomenada NapA i altra, relativament xicoteta, anomenada NapB. En NapA és on es troba el centre actiu (Figura 3) i és molt similar a la Nap monomèrica (González et al., 2006).



**Figura 3. Estructura tridimensional de la NapA de *Desulfovibrio desulfuricans*.** (González et al., 2006).

La nitrat reductasa unida a la membrana es caracteritza per tindre tres subunitats  $\alpha$ ,  $\beta$ , i  $\gamma$  (Figura 4). La subunitat  $\alpha$  té el centre catalític que conté molibdè i dos cofactors de pterina. Per altra banda, la subunitat  $\beta$  està relacionada amb el transport d'electrons, ja que conté complexos de ferro-sofre. Finalment, la subunitat  $\gamma$  és un citocrom del tipus b que està escampat per la membrana (Hettmann et al., 2002). En total, l'enzim té aproximadament 13 grups de ferro-sofre i un àtom de molibdè unit als cofactors de pterina, que se creu que modulen el comportament redox del molibdè, així com ajuden a la transferència d'electrons entre altres centres que no tenen eixe cofactor. En resum, aquests cofactors tenen dos funcions principals: connectar el flux d'electrons entre el centre ferro-sofre i l'àtom de molibdè i fixar aquest àtom en el centre de la matriu de proteïnes (Lalucat et al., 2006).



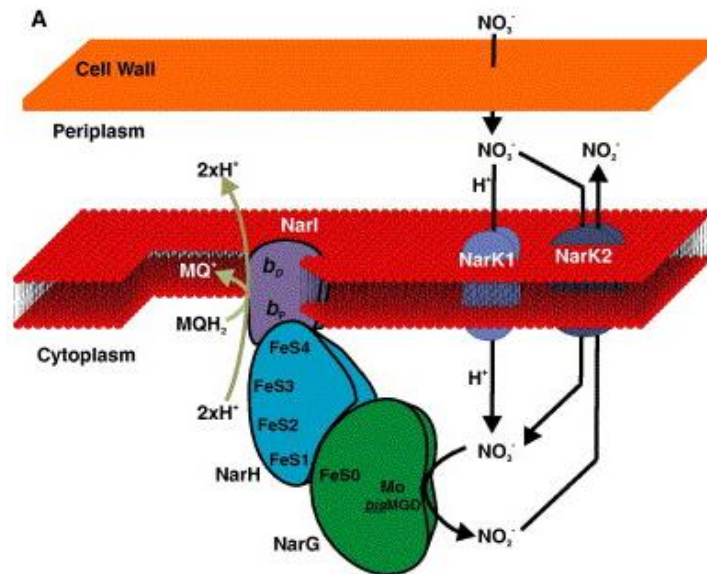
**Figura 4. Estructura típica de l'enzim Nar.** Es pot apreciar l'estructura trimerica on NarG, NarH i NarI corresponen a les subunitats  $\alpha\beta\gamma$  respectivament. (González et al., 2006).

Per altra banda, els propis complexos de ferro-sofre pareix que tinguen el paper de transportadors d'electrons des del grup quinol de la membrana fins al centre actiu. Finalment, la subunitat  $\gamma$  actua com a ancora transmembranal i que té com a funció el transport d'electrons fins a la subunitat  $\beta$  i els seus complexos de ferro-sofre. També, està relacionada en l'oxidació del MQH<sub>2</sub> de la membrana (Lalucat et al., 2006; González et al., 2014).

La subunitat  $\gamma$  pot separar-se de la resta mitjançant una etapa de solubilitat per calor. Com el molibdè i la pterina es troben en la subunitat  $\alpha$ , el centre catalític és el mateix en l'enzim complet que en la forma  $\alpha\beta$  (Hettmann et al., 2002 ; Lalucat et al., 2006).

La reducció de nitrat mitjançant Nar es produeix de la següent manera (Figura 5). La subunitat  $\gamma$  allibera 2 protons al periplasma que oxiden MQH<sub>2</sub>. Els electrons viatgen a través dels complexos ferro-sofre fins al centre actiu, on el nitrat es redueix consumint dos protons del citoplasma. Com aquest centre actiu es troba en la part citoplasmàtica, el nitrat deu entrar dins de la cèl·lula. Aquesta tasca la realitzen dos transportadors: NarK1, que s'activa al principi de la respiració, transporta el nitrat des del periplasma en companyia d'un protó. A mesura que va acumulant-se nitrit, NarK2 s'activa, transportant el nitrit fora del citoplasma i mantenint l'estat estacionari del citoplasma. Aquest procés, acoblat a l'oxidació de formiats, genera la força motriu de protons suficient per a activar la síntesi d'ATP (González et al., 2006).





**Figura 5. Esquema del procés de la reducció de nitrat per l'enzim Nar acoblat a la membrana.** (González et al., 2006).

### 1.3. *Pseudomonas stutzeri* en la bioneteja

*P. stutzeri* és un bacteri del gènere *Pseudomonas* que està englobat dins de la classe *Gammaproteobacteria*. Està caracteritzat per tindre una forma de vareta, una longitud de 1 a 3  $\mu\text{m}$  i un ample de 0,5  $\mu\text{m}$ . A més a més, sols té un flagel polar. S'ha detectat en *P. stutzeri* activitat catalasa i oxidasa, i el que importa en aquest estudi, activitat desnitrificant. Una característica diferencial d'altres bacteris del gènere *Pseudomonas* és que *P. stutzeri* no produeix pigments fluorescents, per tant, no té aquesta activitat luminescent (Lalucat et al., 2006).

Els ceps de *P. stutzeri* tenen principalment un metabolisme respiratori on l'oxigen és l'últim acceptor d'electrons; no obstant això, tots tenen l'habilitat d'utilitzar el nitrat com a receptor final alternatiu, per tant, són capaços de realitzar la desnitrificació, que en aquest cas és una desnitrificació reprimible per oxigen. De fet, la gran activitat desnitrificant del bacteri, l'ha convertit en un organisme model per a estudiar el procés i els estudis que s'han realitzat en ell han permet grans avanços en el camp de la desnitrificació (Lalucat et al., 2006).

En comparació a altres espècies del mateix gènere, *P. stutzeri* té una activitat desnitrificant més elevada, sobretot a nivell de reducció de nitrats. No obstant això, aquesta alta activitat de reducció de nitrats entra en contrast amb l'activitat reductora de nitrits. Aquesta activitat és bastant menor i els mitjans on sol créixer *P. stutzeri* tenen restes de nitrits que no han pogut metabolitzar. Amb tot, aquesta activitat segueix sent superior a altres bacteris com *P. denitrificans* i *P. aeruginosa*. A més a més, els avantatges de *P. stutzeri* no es redueixen sols a la seua activitat. També és destacable la seua gran afinitat pels nitrats i la seua fàcil manipulació (Carlson i Ingraham, 1983).

En el cas característic de *P. stutzeri*, els gens que codifiquen les diferents reductases assimilatòries, és a dir, els gens *nar*, no estan associats als gens encarregats de la desnitrificació, quedant fora dels clústers típics d'aquest gens. Per tant, en el cromosoma de *P. stutzeri* ens trobem un grup *nos-nir-nor* per un costat i els gens *nar* per l'altre. L'organització dels gens *nar* està quasi determinada i s'han trobat homologies molt interessant en organismes model com *E. coli* (Lalucat et al., 2006).

Tot i que *Pseudomonas stutzeri* s'ha utilitzat amplament en la bioneteja, normalment sols s'ha utilitzat per a eliminar la matèria orgànica present en les pintures murals (Bosch-Roig et al., 2013). Aquestes restes són part del pegament animal i la caseïna que s'utilitzen en algunes tècniques de restauració com l'*strappo*, que es basa en arrancar la pintura del mur i traspassar-la a un altre suport, com pot ser una tela, per a traslladar-la a un altre lloc. Es pot fer de diferents maneres, però totes elles porten a la separació del mural de la pedra (Gianni et al., 2008). Les restes orgàniques també poden ser part de les deposicions atmosfèriques fetes al llarg del temps, sobretot si es tracten de pintures murals a l'aire lliure, no obstant això, aquestes restes són molt més difícils d'eliminar. Com a exemple de l'eliminació de restes orgàniques amb *P. stutzeri*, està el fresc del Cementeri Monumental de Pisa de Buffalmacco Buonamico, *Història dels Sants Pares*. La bioneteja va ser molt ràpida (2 hores) i les condicions experimentals van ser segures, no invasives i sense riscos (Lustrato et al., 2012).

Per altra banda, en els últims anys també s'ha començat a utilitzar el bacteri per a la neteja de les eflorescències de sal per les seues grans qualitats desnitrificants. De forma pionera, destaca el cas de la neteja dels frescos de l'Església dels Sants Joans de la ciutat de València (Bosch-Roig et al., 2013).

Els Sant Joans, tot i ser construïda en el 1240, va ser reconstruïda i remodelada durant els segles XVII i XVIII, sent per tant, d'estil barroc. Durant aquests anys, a l'interior del temple van ser pintats els frescos que es poden veure en el present, els quals es consideren unes de les pintures murals valencianes més grans i importants. La tècnica que es va utilitzar per a fer els frescos és la dels pigments aplicats amb aigua i fixats amb cal i arena, mitjançant un procés de carbonatació sobre la pedra del mur. No obstant això, els incendis provocats a l'interior durant la Guerra Civil van deteriorar severament les pintures (Bosch-Roig et al., 2013).

Entre el 1958 i 1963 es va produir el procés de restauració, utilitzant la tècnica de l'*strappo* (Bosch-Roig et al., 2013). No obstant això, aquesta tècnica va ser insuficient i perjudicial per a les pintures. Aquesta restauració també va produir la formació i l'acumulació d'eflorescències de sal insoluble. Es van utilitzar diferents tècniques físiques i químiques per a intentar solucionar aquests problemes, però no es van obtenir resultats massa satisfactoris; per això, es va decidir intentar la bioneteja amb *P. stutzeri* sobre una part del fresc (Bosch-Roig et al., 2013).

La composició química de les eflorescències era fonamentalment de nitrat de potassi, amb una concentració de nitrat mitjana de 1671,93 mg kg<sup>-1</sup>. En el treball es demostra que utilitzant el cep DSMZ 5190 del bacteri *P. stutzeri* en agar durant 90 minuts, es produeix una neteja molt eficient de

les eflorescències de nitrat, amb una reducció aproximada del 92% (Bosch-Roig et al., 2013). Per tant, es demostra la utilitat del bacteri en la bioneteja, no sols en l'eliminació de matèria orgànica, també en la reducció del nitrat, el que fa que els enzims desnitrificants del bacteri siguin eficients.



**Figura 6. Mostra de la bioneteja de la pintura d'una àguila en la lluneta de l'Església dels Sants Joans.** En la primera imatge es mostra la pintura abans del tractament, on es pot apreciar perfectament la crosta que forma l'eflorescència de nitrat. En la segona, durant el tractament amb *Pseudomonas stutzeri* atrapat dins de l'agar. En la tercera es mostra la pintura després de 90 minuts de tractament i la retirada del material. Com es pot apreciar en la tercera imatge, l'eflorescència de sal ha sigut remoguda eficientment. (Bosch-Roig et al., 2013).

Degut a la pandèmia i a l'estat d'alarma provocats pel Covid-19, el temps passat al laboratori ha sigut substancialment reduït. Per tant, la part experimental s'ha vist considerablement limitada. En conseqüència, una part important d'aquest treball inclourà una recerca bibliogràfica que permeti perfilar futures aproximacions. De la mateixa manera, aquesta situació també ha modificat parcialment els objectius buscats.

## 2. Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball és descriure un protocol per a l'obtenció dels enzims Nar i Nap de *Pseudomonas stutzeri* per a la bioneteja d'eflorescències de sal de nitrat de pintures murals.

Els objectius específics són:

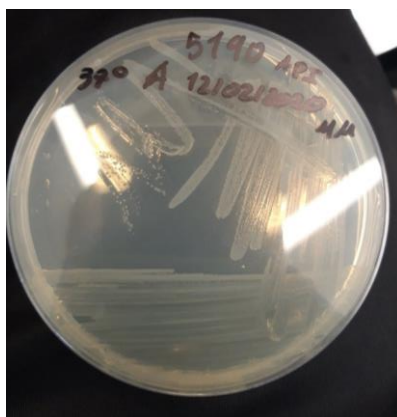
- Identificar l'activitat nitrat reductasa de *P. stutzeri*.
- Analitzar diferents protocols de purificació dels enzims Nar i Nap.
- Identificar les condicions òptimes per al rendiment del Nar i Nap mitjançant la caracterització bacteriana i enzimàtica.
- Analitzar les diferents maneres d'estabilitzar els enzims.
- Evitar la pèrdua de la major part possible d'activitat nativa dels enzims.
- Analitzar els diferents mètodes per a aplicar els enzims Nar i Nap sobre la pintura mural.

### 3. Materials i mètodes

#### 3.1. Recuperació del bacteri

Es va procedir al cultiu de 4 ceps diferents de *Pseudomonas stutzeri* cedits per el Laboratori de Microbiologia de la Universitat Politècnica de València: 5190 (l'utilitzat en la bioneteja de l'Església dels Sants Joans (Bosch-Roig et al., 2013)), A6166, P30 i 46326.

Es van realitzar tres plaques del primer cep i dos dels altres 3 ceps. Com del primer cep es van utilitzar dos plaques diferents per a fer la recuperació, es van obtindre un total de 6 plaques del cep 5190. La sembra es va fer amb el procediment de triple estria (Figura 7) en plaques d'Agar "Plate count" (Scharlab, 01-161-500) amb una nansa de sembra i es va sembrar a 37 °C es una estufa.



**Figura 7. Placa sembrada amb triple estria després de la incubació a 37 °C.**

#### 3.2. Tires API

Per confirmar que es treballa amb el bacteri desitjat, es comprova la seua identitat amb una tira API (Biomérieux, API® 20 NE, 20 050-25). Es dilueix una colònia en l'ampolla subministrada i amb l'ajuda d'una pipeta es reparteix la dilució en els diferents pouets que marca la tira. La tira s'incuba en estufa a 28 °C i es fa la mesura 24 hores després. Si les dades no són concloents, es fa a les 48 hores després de preparar la tira. En aquest cas, es van realitzar les dos mesures i el procés es va repetir dues vegades.

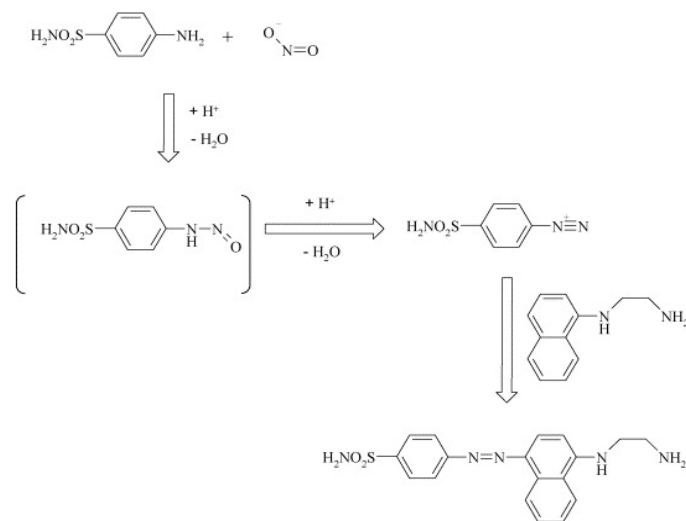
Finalment, també s'agafa mostra del pouet de glucosa de la tira API per a cultivar-lo. Es fan un total de 4 rèpliques, 2 per a cultivar-se a 28 °C i altres 2 a 37 °C.

### 3.3. Comprovació del poder desnitrificant del cep

Per a comprovar que el cep té l'activitat desnitrificant es van utilitzar diferents eines.

Se realitzen cultius en dos medis diferents: 1) medi desnitrificant o MD (per a 100 ml: solució salina estàndard al 1/20 1000 ml, 2 g de nitrat potàssic, 10 g de glucosa, 5 g de carbonat càlcic i 1 ml de solució d'oligoelements); 2) caldo nitrat o CN (per a 300 ml: 6 g d'aigua de peptona, 0,06 g de nitrat potàssic i 300 ml d'aigua destil·lada). Ambdós medis es posen dins de tubs i els del medi CN contenen una campana Durham invertida cadascun. Des les 6 plaques del cep 5190, es sembren un tub de cada medi i s'incuben a 30 °C al menys durant un dia. De les plaques fetes a partir de la mostra de la tira API també es sembren 4 tubs: 2 del medi MD i 2 del CN. Un de cada tipus s'incubarà a 28 °C i l'altre a 37 per a observar si la temperatura afecta a l'activitat desnitrificant. El medi CN es comprovarà mitjançant l'aparició d'una bombolla de gas en l'interior de la campana i, al igual que el medi MD, també pels tests de nitrats i nitrits i el reactiu de Griess.

En la reacció de Griess (Figura 8), si hi ha nitrit en la mostra, aquest reacciona en condicions àcides amb l'àcid sulfanílic, formant el catió diazoni (per això també s'anomena reacció de diazotació de Griess). Finalment, el catió diazoni s'unirà a l'amina aromàtica 1-naftilamina, formant un colorant de tipus azo soluble en aigua, d'un color entre roig i violeta (Tsikas, 2007).



**Figura 8. Reacció de Griess.** (Tsikas, 2007)

Finalment, per a comprovar que s'ha consumit el nitrat del medi i hi ha presència de nitrit es realitzen dos proves: els tests de nitrats (Merck, 110092) per a comprovar que ha disminuït la quantitat d'aquest i el tests dels nitrits 0,1-3 g/l (Merck, 110022) i 2-80 mg/l (Merck, 110007) per a assegurar que la consumició del nitrat ha donat com a resultat l'aparició de nitrits. També, com s'ha anomenat anteriorment, es realitzarà la prova de Griess en ambdós medis.

## 4. Estudi bibliogràfic

Pels motius explicats en l'anterior punt, els experiments de fraccionament cel·lular i aïllament de proteïnes no s'han pogut efectuar. Per a completar l'estudi es realitzarà una recerca bibliogràfica per a estudiar el treball d'altres grups, analitzar la situació actual del tema i dissenyar protocols de futura aplicació.

Aquesta recerca bibliogràfica s'ha articulat al voltant de 58 articles citats i referenciats a l'apartat de bibliografia, trets de la consulta de bases de dades com PubMed, Science Direct o Google Scholar. La tria dels articles s'ha fet de la següent manera.

La selecció i recerca del articles s'ha fet principalment al voltant de les següents paraules: "*Pseudomonas stutzeri*", "activitat nitrat reductasa" o "enzim Nar i Nap". No obstant això, segons l'apartat, les paraules "purificació", "caracterització", "estabilització", "aplicació" o "bioneteja" també s'han utilitzar sovint per a afinar la recerca. Finalment, altres criteris també utilitzats han sigut "bacteri" o "bacteriana" i els noms d'enzims similars a *P. stutzeri* com "*Pseudomonas aeruginosa*".

S'ha intentat sempre triar els protocols d'articles més recents, però al tractar-se d'estudis que s'han realitzat sobretot fa dècades i que la majoria dels protocols més recents estan basats en aquest estudis més antics, també s'han seleccionat molts articles d'abans del 2000, sempre tenint cura de que la informació que s'ha sostret no estiga desactualitzada o rebutjada actualment.

### 4.1. Preparació d'enzims bacterians

Com s'ha indicat prèviament, les bioneteja és una tecnologia d'aplicació relativament recent i el seu camp d'investigació continua obert a millores o alternatives a l'aplicació directa dels microorganismes, com pot ser, l'ús d'enzims actius aïllats dels microorganismes. Per tant, es consideren algunes de les principals tècniques comunament utilitzades per a obtindre preparats enzimàtics bacterians.

#### 4.1.1. Ruptura per ultrasons

La ruptura per ultrasons es basa en desestabilitzar les forces intermoleculares utilitzant vibracions ultrasòniques que causen fluctuacions de pressió, resultant en una cavitació o formació de porus en les membranes cel·lulars. Per tant, el resultat final és l'expulsió a l'exterior dels component interiors de la cèl·lula. Les vibracions ultrasòniques produïdes cobreixen un rang de freqüències que s'estén més enllà dels 20 kHz. Aquesta disrupció depèn de molt factors, però sobretot del volum cel·lular i de la fase de creixement (Harrison, 1991). El resultat, moltes vegades, és la completa destrucció de les cèl·lules, el que permet separar, mitjançant la centrifugació, les cèl·lules no destruïdes i els agregats

insolubles, que aniran al sediment, de les proteïnes cel·lulars solubles (Van Hartingsveldt et al., 1971). La tècnica pot aplicar-se per cicles. Per exemple, en el treball de Huang et al. (2015), on es volia mesurar la quantitat de nitrogen intracel·lular en *P. stutzeri*, es van utilitzar 80 cicles, que consistien en 5 segons de pols i 6 segons de descans, mantenint l'extracte sempre a 4 °C en un bany de gel per a evitar la desnaturalització de proteïnes.

A més a més, la tècnica de disrupció cel·lular també s'ha utilitzat en anteriors treballs per a obtenir proteïnes de membrana de *P. stutzeri* i els seus enzims desnitrificants com la nitrat reductasa o la nitrit reductasa amb bastant èxit (Blümlé i Zumft, 1991; Tattawasart et al., 2000; Wu et al., 2020).

La ruptura per ultrasons és molt útil per a separar la fracció membranosa de la citosòlica una vegada que ja s'ha eliminat la periplasmàtica. És a dir, es fa la sonicació sobre els esferoplasts (Carter et al., 1995).

#### **4.1.2. Ús de detergents**

Els agents tensioactius participen en la disrupció cel·lular mitjançant la solubilització de proteïnes i la pertorbació de les interaccions entre els lípids de membrana i les proteïnes que la formen, el que provoca el desorganització de les membranes cel·lulars (Harrison, 1991). L'ús de detergent sol acompanyar a un tractament per calor. De fet, en el cas de la nitrat reductasa, la presència del detergent és necessària per a obtenir l'enzim complet. En el cas d'*E.coli*, quan sols hi ha tractament amb calor, només s'aconsegueixen els les subunitats  $\alpha\beta$ , mentre que si el tractament va acompanyat d'un detergent, també s'obté la  $\gamma$  (Brito et al., 1995).

En el cas de la nitrat reductasa de *P. stutzeri*, el treball de Hettmann et al. (2002) mostra l'obtenció de les subunitats  $\alpha\beta$  actives mitjançant una combinació de ultrasons i tractament per calor amb detergent. En aquest cas, es busca la separació del centre actiu situat en aquestes dos subunitats, de la subunitat  $\gamma$ , que es troba unida a la membrana.

Els detergents també permeten la formació d'esferoplasts i la conseqüent eliminació del periplasma bacterià. Així, tractaments amb EDTA, Tris-HCl o  $MgCl_2$ , combinats amb centrifugacions o enzims, dissolen les parts exterior del bacteri (Imperi et al., 2009).

#### **4.1.3. Cicles de congelació/descongelació**

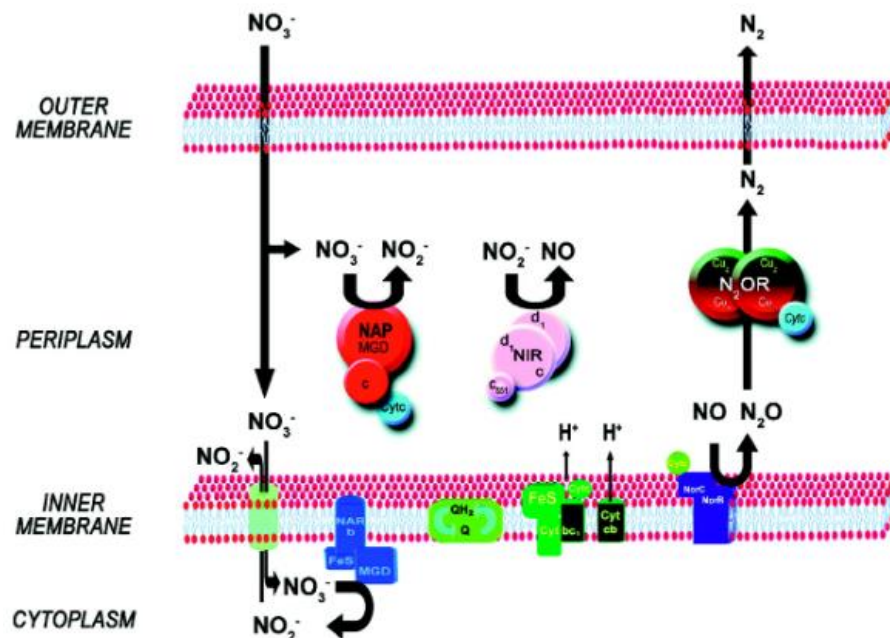
Mitjançant la congelació i la descongelació de les cèl·lules es pot arribar a la disrupció de la membrana per la formació i destrucció de cristalls de gel formats en el si de la membrana. Aquest procés pot ser accelerat mitjançant la pressió i mòlta, ja que l'estructura congelada és més fàcilment destruïda. No obstant això, aquesta tècnica va acompanyada d'inconvenients, com per exemple, la formació de cristalls massa gruixuts, que afecten a la integritat de la cèl·lula. Per altra banda, l'inconvenient



més preocupant en aquest cas és que molts enzims solen perdre la seua activitat després d'aquest procés, el que impedeix obtenir íntegrament l'activitat enzimàtica desitjada (Harrison , 1991).

## 4.2. Compartimentalització de l'activitat nitrat reductasa

Com s'ha pogut observar en la recerca bibliogràfica, hi ha proves de que *Pseudomonas stutzeri* té dos activitats nitrat reductasa: una localitzada en la cara interior de la membrana plasmàtica i que, per tant, té el seu centre actiu situat en el citoplasma, i una altra periplasmàtica, ja que *P. stutzeri* és un bacteri Gram negatiu amb membrana externa i per tant amb espais periplasmàtic (Figura 9). Aquestes dues activitats que corresponen amb Nar i Nap respectivament (Lalucat et al., 2006). Mitjançant l'estudi de diferents tècniques de purificació, s'espera trobar la que millor encaixe en l'aplicació que es vol desenvolupar en aquest estudi.



**Figura 9. Procés de desnitrificació en les membranes i periplasma de *P. stutzeri*.** (Lalucat et al., 2006).

### 4.2.1. Purificació de Nar i fracció membranosa

Per a poder aïllar Nar, primer s'ha d'aconseguir separar la fracció membranosa de la resta de la cèl·lula. Per exemple, en l'estudi de les membranes de *P.aeruginosa* fet pel grup de Matsushita (1978), el primer pas que fan és eliminar la fracció periplasmàtica. Les cèl·lules que tenen emmagatzemades a -20 °C es suspèn 60 ml de Tris-Cl 0,01 M a pH 8.4, amb un 20% de sacarosa i MgCl<sub>2</sub> 0,01M. Després d'afegir 16 mg de lisozim, la suspensió s'incuba durant una hora a 25 °C i amb agitació suau. Es centrifuga a 13000 g durant 10 minuts, es resuspèn amb Tris-Cl 0,01M pH 8,4 amb MgCl<sub>2</sub> 0,01M i es torna a repetir la centrifugació. El sediment es suspèn amb 20 ml de fosfat potàssic 0,01 M amb 5 mM de MgCl<sub>2</sub> a pH

6,2. S'afegeix DNasa i RNasa i es sotmet a la suspensió amb una premsa francesa. Es centrifuga tot a 1800 *g* durant 10 minuts per a eliminar les cèl·lules intactes i finalment es centrifuga a 68000 *g* durant 90 minuts. En aquest sediment final es mantenen les membranes amb els enzims actius (Matsushita et al., 1978).

De forma més recent i amb *P. stutzeri*, es troba el treball del grup de Hettmann (2002) on es busca obtenir el centre actiu de la nitrat reductasa del bacteri, per tant, el primer que busquen és aïllar la fracció de la membrana. Després de desintegrar les bacteries físicament mitjançant una premsa, separen les proteïnes citosòliques utilitzant varies filtracions amb porus de 0,16 µm. La fracció de la membrana s'ultracentrifuga i es tracta amb ultrasons. Amb l'objectiu de solubilitzar les proteïnes, les membranes concentrades són tractats amb del tampó (HEPES-KOH 20 mM pH 8, EDTA 1mM i DTT 0,25 mM) amb un 10% de dodecil-β-D-maltosid. Aquesta barreja és agitada durant una hora a temperatura ambient i posteriorment centrifugada. Es comprova l'activitat nitrat reductasa de les diferents fraccions i es descarten els sediments. El sobrenedant es carrega en una columna d'intercanvi iònic. Es descarta el flux continu, ja que no té activitat nitrat reductasa i l'enzim s'obté finalment per l'elució de la columna. També en aquest estudi es proven dos mètodes per a purificar la nitrat reductasa però sols les subunitats αβ. En el primer dels mètodes, les membranes es dilueixen a una concentració de 2 mg/ml amb tampó de fosfat de potassi 50 mM a pH 7,5. Aquesta solució s'agita durant 20 minuts a 60 °C, refreda i es filtra amb un filtre Omega de 300 kDa. Tot el procés de dilució i filtració es repeteix. Els filtrats es combinen i es concentren amb un filtre de 10 kDa. Aquest filtrat finalment es dilueix amb tampó Tris/bis-Tris-propà/HCl 25 mM i pH 8,0. La solució resultant s'aplica a una columna d'intercanvi iònic i la nitrat reductasa s'elueix amb un gradient de NaCl de 0-0,6 M del tampó. Les fraccions amb activitat nitrat reductasa s'agrupen i es dessalinitzen i canvien al tampó de fosfat de potassi 50 mM pH 7,5 amb una filtració en gel HiPrep 26/10. Finalment, la solució es barreja amb solució saturada de sulfat d'amoni en tampó de fosfat de potassi i s'aplica a una columna de fenil-èter. Finalment, la mateixa solució saturada del 0 al 50% s'utilitza coma gradient, obtenint-se la proteïna final (Hettmann et al., 2002).

En l'altre mètode, la fracció membranosa es calenta amb clorhidrat de guanidí 140 mM, EDTA 3 mM, Tris-HCl 25 mM a 40 °C durant 3 h. És important recalcar que aquest efecte de la temperatura ja afecta a l'activitat enzimàtica final. És proven diferents pH per a valorar amb quin es produeix la millor dissociació i es concreta que el pH que menys afecta a l'enzim és 7,2. La solució es refreda a temperatura ambient i es carrega a una columna de cromatografia DEAE de capa expandida. La subunitat αβ s'elueix finalment amb NaCl 400 mM, Tris-HCl 25 mM a pH 8 (Hettmann et al., 2002).

No obstant això, aquests dos mètodes es basen en el treball fet per Blümle i Zumft (1991). Després de fragmentar les cèl·lules amb ultrasons, van aïllar la suspensió de la membrana. Aquesta suspensió va ser ajustada a una concentració de proteïna de 10 mg/ml amb 20mM de tampó de fosfat de potassi. La dissolució va ser tractada amb calor durant una hora en un bany a 60 °C i agitació continua per a, després, ser ràpidament refredada.

El pas següent va ser centrifugar durant 90 min a 4 °C, quedant-se amb el sobrenedant que és on es troba l'enzim.

Seguidament, el sobrenedant es passa per una columna de DEAE-safarosa CL-6B. Les fraccions que contenen activitat nitrat reductasa s'agrupen i concentren a 2 ml mitjançant ultrafiltració. Es torna a passar per una columna, aquesta vegada Sephadex G-150 i es torna a ultrafiltrar, guardant-se a -24 °C. Finalment, l'enzim es separa i s'identifica mitjançant un gel de poliacrilamida i la nitrat reductasa s'extrau de la banda del gel (Blümle i Zumft, 1991).

#### **4.2.2. Purificació de Nap i fracció periplasmàtica**

Per poder obtindre la nitrat reductasa periplasmàtica hem de fraccionar el proteoma cel·lular per quedar-nos amb el periplasmàtic. Una de les principals formes per a fer aquest fraccionament és mitjançant la formació d'esferoplasts. Alefounder i Ferguson en el 1980 descriuen protocols en *Paracoccus denitrificans* que després seran seguits i modificats per molts a l'hora de obtindre proteïnes del periplasma. Per a obtindre els esferoplasts, es centrifuguen les cèl·lules durant 20 minuts a 5000 g i a 4 °C i es llava amb NaCl 150 mM i Tris-HCl 10 mM a 4 °C i pH 7,3. Es suspenen en 10 ml de sacarosa 0,5 M, Tris-HCl 10 mM a pH 7,3. El primer tipus de esferoplasts s'obté al diluir la meitat d'aquesta suspensió amb 400 ml de l'anterior dilució i s'afegeixen 100 mg de lisozim diluïts en 2 ml d'aigua, incubant-se a 30 °C per ser, finalment, centrifugat 10 minuts a 4 °C i 37000 g, separant-se els esferoplasts de la fracció periplasmàtica. El segon tipus d'esferoplasts s'obté al barrejar l'altra meitat de la suspensió cel·lular amb 200 ml de Tris-HCl 200 mM, pH 7,3, sacarosa 0,5 mM EDTA i 0,5 mM contenint 50 mg de lisozim. També es realitza un xoc osmòtic al afegir 200 ml d'aigua i incubar-ho tot 40 minuts a 30 °C. La centrifugació final es realitza amb les mateixes condicions que l'anterior (Alefounder i Ferguson, 1980).

El segon mètode s'utilitza per a estudiar l'activitat nitrat reductasa en *Pseudomonas putida*, però modificant el protocol, ja que allarguen la incubació amb lisozim de 40 minuts a 2 hores. També s'utilitzen els ultrasons amb els esferoplasts per a, després, amb la centrifugació, separar el citosol de la membrana. Així, obtenen tres fraccions per a estudiar l'activitat nitrat reductasa: la periplasmàtica, la membranosa i la citoplasmàtica. Com l'activitat nitrat reductasa es manté activa en la fracció periplasmàtica, significa que el mètode permet obtindre l'enzim actiu (Carter et al., 1995).

Un assaig en una bacteri del mateix gènere que *P. stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, ens mostra també diferents maneres de obtindre les proteïnes del periplasma.

En primer lloc, utilitzen un xoc osmòtic. Parteixen d'un sediment obtingut de la centrifugació d'un litre de cultiu bacterià. El resuspenen amb 30 ml de tampó Tris-HCl a pH neutre i un 20% de sacarosa i 1 mM de PMSF. Després d'una incubació de 30 minuts, les cèl·lules es centrifuguen a 11000 g, durant 10 minuts i a 4 °C. Es torna a suspendre en 30 ml de

MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM a baixa temperatura i s'agita dèbilment durant 5 minuts en un bany de gel. Finalment es torna a centrifugar a 30000 g durant 15 minuts a 4 °C, recol·lectant el sobrenedant que és on es troben les proteïnes periplasmàtiques (Imperi et al., 2009).

El altres dos mètodes que utilitzen implique la formació d' esferoplasts, però en un cas s'utilitza lisozim i sacarosa i l'altra lisozim amb MgCl<sub>2</sub>. En el primer cas, resuspenen el sediment cel·lular amb 30 ml de Tris-HCl 30 mM de nou, però aquesta vegada amb un pH 8, 20% de sacarosa, EDTA 4 mM, 0,5 mg/ml de lisozim i PMSF 1 mM. La suspensió és incubada durant 60 minuts a 30 °C en un bany d'aigua amb una lleugera agitació afegint 10 mM MgCl<sub>2</sub>. La suspensió es centrifuga a 11000 g durant 15 minuts a 4 °C. Com el cas anterior, les proteïnes del periplasma es troben en el sobrenedant (Imperi et al., 2009).

En el cas final, el sediment es resuspèn en 30 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 8,4, MgCl<sub>2</sub> 200 mM, 0,5 mg/ml de lisozim i 1 mM de PMSF, incubant-se 30 minuts a temperatura ambient i amb una lleugera agitació. Finalment, la suspensió es centrifuga a 11000 g durant 15 minuts i 4 °C, rescatant el sobrenedant (Imperi et al., 2009).

També en *P. aeruginosa* és interessant seguir estudiant el xoc osmòtic, abans esmenat. 1 g de cèl·lules es suspèn en 40 ml de Tris-HCl 0,033 M a pH 7,1 i es barreja amb 40 ml de sacarosa al 40%. Després de 30 minuts, es centrifuga i es suspèn ràpidament amb 50 ml de MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM en un bany gelat (Jens i Fricke, 1997). És interessant constatar que en aquest experiment decideixen eliminar del procediment original (Nossal i Heppel 1966) a l'agent quelant EDTA perquè consideren als bacteris del gènere *Pseudomonas* massa sensibles a ell. En experiments previs, s'observa com la concentració d'EDTA pot afectar a la densitat de la membrana, produint també un descens en l'activitat dels enzims associats a ella (Matsushita et al., 1978).

Per altra banda, en el treball de Jens i Fricke també s'estudien altres alternatives més enllà dels esferoplasts i el xoc osmòtic. Per exemple, l'ús de cloroform. En el protocol original (Ames et al., 1984), s'extrauen els bacteris mitjançant una centrifugació de 2 ml de cultiu bacterià. El sediment es resuspès amb 20 µl de CHCl<sub>3</sub> i incubat a temperatura ambient durant 15 minuts, afegint, després, 0,2 ml de Tris-HCl 0,01 M a pH 8. Finalment es centrifuga 20 minuts a 6000 g, separant el sobrenedant on es troben les proteïnes. No obstant això, aquest protocol es desconsidera pel dany que pot causar tant a les cèl·lules com a les proteïnes. També proven tractaments amb MgCl<sub>2</sub> i l'antibiòtic Polimixina, però tampoc s'obtenen resultats tan desitjables com en els casos anteriors (Jens i Fricke, 1997).

En el cas de *Pseudomonas stutzeri*, l'anàlisi del periplasma es fa per a estudiar una reductasa d'òxid nítrós, partint d'un protocol basat també en formació d'esferoplasts (Körner i Mayer, 1991). El cas és similar a la resta, ja que l'operació es realitza tota a 4 °C. El sediment cel·lular es resuspèn amb 0,25 ml de Tris-HCl 200 mM a pH 8. A aquesta suspensió s'afegeix també 0,25 ml de Tris-HCl 200 mM pH 8, amb 1 M de sacarosa i 25 µl d'EDTA 100 mM a pH 7,6, amés de 0,5 ml d'aigua desionitzada amb 1 mg/ml de lisozim. Després de 20 minuts d'incubació, afegeixen 50 µl de

MgCl<sub>2</sub> 500 mM i centrifuguen 10 min a 100000 rpm. En aquest cas, una vegada extret el sobrenedant amb el periplasma, el precipiten amb àcid tricloroacètic (Pages et al., 1984).

Una vegada s'ha obtingut la fracció periplasmàtica, s'ha de separar la Nap de la resta de proteïnes. L'extracte periplasmàtic es carrega en una columna de DEAE-Sepharose CL-6B de 50 x 5 cm, prèviament equilibrada amb 20 mM de Tris-HCl a pH 8 i 20% de glicerol. La columna es lava amb un volum equivalent al volum de tampó de la columna per a equilibrar-la, i s'aplica un gradient de 0 a 500 mM de NaCl. L'activitat nitrat reductasa s'elueix a 150 mM i es precipita amb una saturació de sulfat d'amoni del 60%. Aquest precipitat es resuspèn en 10 ml de MOPS-NaOH 20 mM a pH 7, NaCl 1 M, 20% de glicerol i 0,25 mM d'imidazole. Es prepara una columna d'afinitat de metall amb Ni(II)-immobilitzat. Després de carregar-se la columna, es lava amb el tampó i s'utilitza un gradient de 0,25 a 20 mM d'imidazole, obtenint-se l'activitat nitrat reductasa a 9mM. Les fraccions que contenen activitat nitrat reductes s'agrupen i es concentren mitjançant ultrafiltració. Finalment, s'aplica a una cromatografia d'exclusió per mig de HPLC a 24 °C amb una columna TSKG 300 SW. El tampó per a la cromatografia és MOPS-NaOH 20 mM a pH7, NaCl 0,5 M, fluïnt a 3 ml per minut (Berks et al., 1994).

En altres exemples més recents i més ràpids, la fracció periplasmàtica es carrega a una columna de DEAE-cel·lulosa equilibrada amb 10 mM de Tris-HCl a pH 8, sent llavada amb KCl 30 mM i Tris-HCl 10 mM, pH 8, i utilitzant un gradient de KCl de 30 a 80 mM per a eluir les proteïnes. En aquest cas, per a eluir la subunitat catalítica o NapA, es carrega l'elució anterior a una columna de butil-Sepharose equilibrada amb Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 3 M i 2% de glicerol. Per a l'elució s'utilitza un gradient de 3 a 0 M NaCl, aconseguint-se la subunitat al final. Per acabar, la NapA s'obté finalment amb una columna de Superdex-200 equilibrada amb Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 100 mM i 2% de glicerol utilitzant filtració en gel (Jepson et al., 2007).

### **4.3. Estabilització**

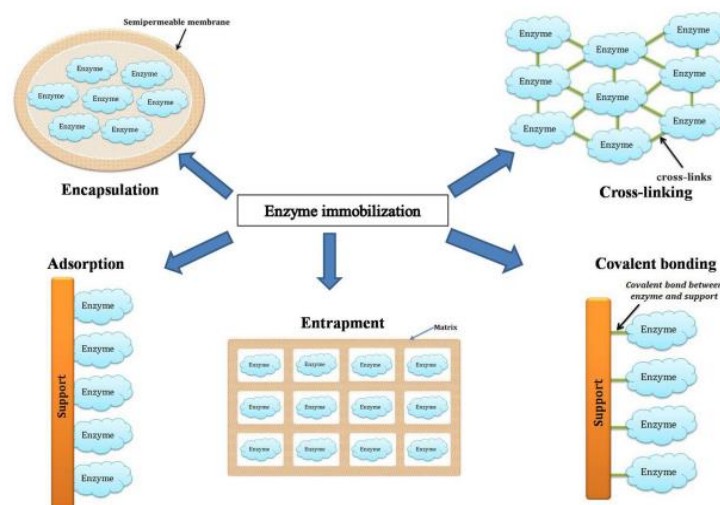
Tot i que després d'haver purificat ja obtinguem l'enzim actiu, el vertader repte comença a partir d'aquest punt. Els enzims purificats ja no es troben en el seu ambient natural i, per tant, la seua estructura i, en conseqüència, la seua activitat, poden no mantindre intactes indefinidament. És a dir, els enzims s'enfronten a les agressions de l'ambient i poden sofrir desnaturalitzacions. Per exemple, un dels principals problemes als qual s'enfronten els enzims solubles és al contacte amb l'atmosfera ja que són extremadament sensibles a l'oxidació i aquesta pot provocar que perden la seua estructura terciària i causar una ràpida pèrdua d'activitat (Lowe i Evans, 1964). Per això, és molt important obtindre un bon protocol per a estabilitzar els enzims i conservar-los intactes per a realitzar la bioneteja allà on siga necessari. Aquest problema existeix, de fet, al llarg de tot el procés d'extracció i purificació, encara que siga parcial, pel que hi ha que prestar una especial atenció a la protecció de l'activitat i fer el protocol el més curt millor.

L'estabilització es pot dividir en dos tipus: estabilització termodinàmica, que es centra en evitar la desnaturalització immediata, i l'estabilització a llarg termini, que es focalitza en la resistència a la inactivació irreversible (Iyer i Ananthanarayan, 2008).

Hi ha moltes condicions que s'han de tindre en compte a l'hora de l'estabilització com poden ser la temperatura, la pressió, el pH, la presència d'agent inhibidor o la resistència a altes concentracions de sal. Per això, també existeixen diferents tipus d'estabilització. Per exemple, l'estabilització es pot buscar abans de la purificació mitjançant l'enginyeria genètica per a que, modificant bacteris mesòfils que produeixen enzims més estables, es puguin aconseguir enzims d'extremòfils amb més rendiment. Per altra banda, d'una manera més senzilla és pot buscar l'estabilització mitjançant la immobilització a un suport o afegint additius estabilitzadors (Iyer i Ananthanarayan, 2008).

La immobilització és una de les estratègies més utilitzades i millor valorades per a l'estabilitat dels enzims. Aquesta tècnica permet crear un microambient protector que aïlla l'enzim de condicions desfavorables mitjançant la unió a un suport sòlid (Iyer i Ananthanarayan, 2008). A més a més, aquest tipus d'estabilització és molt interessant per a la bioneteja ja que, per a aplicar el bacteri o l'enzim sobre la pintura, moltes vegades és necessària d'un suport que permeti el contacte entre la superfície i l'agent actiu.

Hi ha diferents tipus d'immobilització (Figura 10), però destaquen sobretot la creació d'interaccions sobre el suport com els enllaços covalents, l'adsorció física o electroestàtica, l'encapsulació de l'enzim dins d'una membrana, atrapar l'enzim dins d'una matriu polimèrica o mitjançant la formació d'enllaços covalents creuats (Sirisha et al, 2016). Per tant, ens trobem amb diferents tipus d'unió de l'enzim al suport, des d'enllaços forts fins a interaccions dèbils superficials. Com avantatge, la immobilització no sol afectar a l'estructura de l'enzim i aquest roman més estable i protegit de la desnaturalització, però al tractar-se d'un espai limitat, ens podem trobar amb pèrdues de massa total i, si el suport sofreix de qualsevol problema, es poden produir fugues d'enzims (Zucca et al., 2016).



**Figura 10. Diferents mètodes d'immobilització enzimàtica.** (Sirisha et al., 2016).

La immobilització de nitrats reductases actives és possible i hi ha diferents exemples en la bibliografia. Podem considerar per un banda l'encapsulament de Nap bacteriana en sol-gel. Aquest procés és relativament senzill i sols necessita de dos passos. En primer lloc, el silica sol de catalització àcida es tracta mitjançant sonicació en un bany gelat de tetrametilortosilicat (0,92 ml), aigua desionitzada (0,54 ml) i HCl (0,05 mol l<sup>-1</sup>, 12,5 µl) durant 30 minuts. Aquest precursor del silica-sol es barreja a parts igual amb la solució formada pel tampó fosfat (25 mmol l<sup>-1</sup> a pH 7) i la Nap purificada. Aquesta solució es transfereix al costat d'una cubeta orientada horitzontalment i amb barreres de Parafilm per a crear gels de 15 x 10 x 1 mm. El sol-gel tarda uns 10 minuts en solidificar-se. Una vegada format, el gel es pot emmagatzemar a 4 °C en un bany de tampó fosfat (50 mmol l<sup>-1</sup> a pH 7,6). El emmagatzematge pot durar fins una setmana, però renovant el tampó el dia 4, ja que el sol-gel no pot resistir en un ambient sec. El resultat és un gel format per xicotetes encapsulacions de l'enzim (Aylott et al., 1997).

Per altra banda, també hi ha diferents formes de construir matrius que atrapen la nitrata reductasa activa. Per exemple, la formació d'una matriu d'argila que atrapa la nitrata reductasa. Per a formar-la, es crea una suspensió aquosa de 22 µl que conté 1 mg/ml de laponita, 6 µl/ml de glutaraldehyd i l'enzim sobre una superfície vítrica de carbó. La barreja es seca al buit per a crear la matriu i es submergeix en Tris 0,1 M a pH 7,5 i en agitació durant 20 minuts per a eliminar l'enzim no adherit (Cosnier et al., 2008). Altre exemple, busca la formació d'un polímer amb nitrats reductases: 0,2 mg de l'enzim es barregen en una solució aquosa a pH 7,5 amb 113,3 mg de nitrata, 375 mg d'acrilamida i 20 mg de N,N'-metilè-bis(acrilamida) i es fa polimeritzar per a formar una matriu tridimensional de poli(acrilamida). La nitrata reductasa atrapada en aquesta matriu manté un 55% de la seua activitat nativa (Willner et al., 1990).

Els additius s'han convertit també en una forma molt popular de mantindre estable l'activitat dels enzims. No obstant això, alguns additius poden afectar a la forma final d'utilitzar-los, per tant, s'ha de tindre molt clar quins tipus es poden utilitzar segons l'enzim i segons la seua utilitat final. Els additius que es poden utilitzar per a l'estabilització poden ser de molts tipus. Per exemple, es pot utilitzar l'addició de lligands o substrats que mantinguen a l'enzim actiu. Aquests substrats poden ser des de NAD<sup>+</sup> i NADH, fins al lactat, la glucosa o la lactosa, entre altres. També es poden utilitzar diferents sals per a estabilitzar enzims. Tanmateix, aquesta estabilització pot arribar a ser molt específica i és molt difícil arribar a fer un protocol comú. En general, depenen de l'enzim i de la seua activitat es poden utilitzar additius molts variats com sucres, glicerol o polímers entre altres (Iyer i Ananthanarayan, 2008).

A més a més, les possibilitats de l'estabilització són molt més amples perquè les diferents tècniques no són excloents. Mitjançant la combinació de diferents mètodes es pot arribar a aconseguir que l'activitat de l'enzim perdure bastant en el temps. Per exemple, en la immobilització mitjançant encapsulament, es poden utilitzar additius com osmolits per a aconseguir una bona estabilitat tèrmica de les proteïnes (Brennan et al., 2002).

## 4.4. Caracterització

De forma complementaria a l'estabilització, es troba la realització de la caracterització. Per una banda, la del bacteri per a saber quan es pot obtenir el màxim d'expressió dels enzims i, per l'altra, la dels enzims en sí, per poder controlar la seua activitat i el rendiment.

### 4.4.1. Caracterització de l'activitat desnitrificant de *Pseudomonas stutzeri*

És important conèixer les condicions a les quals el bacteri té els nivells d'activitat desnitrificant més alts per poder aconseguir la major quantitat d'enzim purificat possible. En el cas de la quantitat de substrat, per exemple, concentracions per davall de 2 mg per litre de nitrats i d'oxigen donen com a resultat majors nivells de nitrat reductasa (Blümle i Zumft, 1991).

Els principals factors que afecten a l'activitat desnitrificants dels bacteris són la temperatura, la quantitat d'oxigen dissolt, el pH i la relació C/N (Huang et al., 2015). Tot i que *P. stutzeri* té una alta gama de temperatures a les quals pot créixer, des dels 4 fins al 45 °C, però limitat a certs ceps, (Lalucat et al., 2006), la veritat és que els enzims desnitrificants de molts ceps pareixen sensibles a la temperatura (Zhao et al., 2018). En general, el bacteri mostra la millor activitat desnitrificant al voltant dels 30 °C (Huang et al., 2015); no obstant això, el major consum de nitrats es pot produir en un espectre de temperatures entre els 30 i els 40 °C. Per altra banda, ambdues activitats es redueixen notablement sota els 20 °C i, en general, el consum total de nitrats, també cau ja al voltant dels 40 °C (Zhao et al., 2018).

El rang de pH pot ser molt ampli segons el cep. Per exemple, en el cas del cep ASM-2-3, el bacteri pot créixer entre pH 6 i 12, podent eliminar el nitrat present en qualsevol valor del pH (Kariminiaae-Hamedani et al., 2003) o altres ceps que poden fer el mateix entre 6 i 9 (Rezaee et al., 2010). Per altra banda, en el cas del cep ZF31, el rang òptim de pH es situa entre 7 i 9, sent 8,23 el que millors resultats dona en combinació amb altres característiques com la temperatura i la relació C/N (Huang et al., 2015). En sí, es pot apreciar que l'efecte del pH sobre l'activitat depèn dels ceps.

En general, una relació baixa de C/N (al voltant de 5) comporta que l'activitat desnitrificant i el consum de nitrats siguin menors. Per tant, quan més alta siga aquesta relació millor, tot i que, depenent del cep, amb una relació d'entre 6 i 10 l'activitat ja és relativament prou eficient (Huang et al., 2015; Zhao et al., 2018).

Finalment, la quantitat d'oxigen dissolt depèn de l'agitació. A nivells estàtics i, per tant, a menor concentració d'oxigen dissolt, l'activitat nitrat reductasa és relativament baixa. A mesura que augmenta la concentració d'oxigen, també augmenta el consum de nitrats, per tant, a més oxigen dissolt més activitat desnitrificant. No obstant això, pareix que també hi ha un límit de concentració que pot arribar a inhibir l'activitat. Aquesta



inhibició també depèn del cep (Huang et al., 2015; Zhao et al., 2018). En aquest sentit també és interessant saber que l'expressió de l'enzim Nap està moltes vegades condicionada per l'estat redox del bacteri, que al seu torn està condicionat pels requeriments energètics (Tamegai et al., 2007).

#### **4.4.2. Caracterització dels enzims**

Quan es comprenen les condicions que afecten a la desnaturalització i a la pèrdua d'activitat d'un enzim, es poden controlar millor aquests processos de desactivació. És a dir, és molt important conèixer en quines condicions un enzim té els seus màxims nivells d'activitat catalítica o quan es produeixen les baixades d'aquesta o la seua inactivació irreversible per poder establir i extraure el millor rendiment de l'enzim (Iyer i Ananthanarayan, 2008).

Per a assajar l'activitat de la nitrat reductasa es poden utilitzar diferents donadors d'electrons com poden ser NADH, NADPH o FMNH<sub>2</sub> (Amy i Garrett, 1980). També es pot utilitzar el viologen de metil (Blümle i Zumft, 1991; Ellington et al., 2003) o blau de metilè entre altres (Borcherding et al., 2000). És destacable que, a sovint, ambdós enzims no poden utilitzar algun dels donadors. En el cas del viologen de metil, sí que hi ha activitat per part dels dos, però en el cas de la NADH, hi ha vegades que no (Bedzyk et al., 1999).

Els assajos per a estudiar l'activitat de les nitrat reductases són bastant similars i les diferències es basen sobretot en el tipus de donador d'electrons. Un dels més utilitzats és el viologen de metil i hi ha diferents exemples. En un d'ells, es preparen diferents dilucions de l'enzim de 0,3 a 0,8 U/ml, i 20 µl es barregen amb 160 µl tampó d'incubació format per fosfat de potassi 0,05 M a pH 7,5, 1,48 mM de viologen de metil i 30 mM de nitrat de sodi. S'utilitza una solució de nitrat estàndard de 0 a 10,9 mM per a calibrar. Per a iniciar el test s'afegeixen 20 µl de ditionit de sodi 320 mM. Després de 4 minuts d'incubació a la temperatura d'estudi, 20 µl de la reacció es dilueixen en 80 µl per airejar-la i després, realitzar la prova amb el reactiu de Griess. Després de 10 minuts a temperatura ambient, es mesura el resultat fotomètricament amb una longitud d'ona de 546 nm (Borcherding et al., 2000). El cas del viologen de metil com a donador també s'ha donat en altres experiments i els assajos són molt similar, amb variacions mínimes (Blümle i Zumft., 1991).

En quan al NADH com a donador d'electrons, la reacció es forma amb 10 mM de KNO<sub>3</sub>, 0,056 M de HEPES a pH 7, 0,5 mM de NADH en tampó fosfat 0,04 M a pH 7,2 i l'enzim per a fer 1,5 ml. La reacció comença quan s'afegeix el NADH i s'incuba durant 15 minuts per ser, finalment, interrompuda amb HCl i NED. Els resultats es mesuren fotomètricament a 340 nm, que correspon amb la longitud d'ona diferencial entre NADH i la seua forma oxidada NAD<sup>+</sup> (Nakagawa et al., 1984).

#### 4.4.2.1. Caracterització de Nar

El rang de temperatura de l'enzim és prou ampli, mantenint la seua activitat des dels 4 °C fins als 76 °C, sent aquesta última la temperatura, a partir de la qual l'enzim ja comença a patir desnaturalitzacions (Borcherding et al., 2000).

La constant de Michaelis ( $K_M$ ) de Nar sol estar molt condicionada pel tipus de reductor que utilitza cada bacteri (Hochstein i Tomlison, 1988). En el cas de la Nar de *P. stutzeri* aquesta  $K_M$  es situa en 3,8 mM quan es solubilitza per calor i s'utilitza com a donador d'electrons el viologen de metil. A més a més, es produeix inhibició competitiva per azida i cianur (Blümle i Zumft, 1991). Altres compostos que també inhibeixen l'activitat nitrata reductasa són el tiocianat i el toluè-3,4-ditiol (Hochstein i Tomlison, 1988).

En el cas de l'enzim parcial format per les subunitats  $\alpha\beta$  es mostra una activitat, molt superior a altres Nar com la d'*Escherichia coli* o *Paracoccus denitrificans*. Aquesta activitat es va registrar a temperatura ambient i a un pH de 7,5. També, mostra activitat en el rang de pH entre 6 i 9 i sobretot a 7,5 i 8. El valor de  $K_M$  registrat es de 3,2 mM, més baix que l'enzim complet i per tant, d'una major afinitat pel seu substrat. En quant als inhibidors, pot resistir al clorat de sodi fins als 100 mM i, tot i ser inhibida per l'azida de sodi, a altes concentracions de nitrata es pot superar, ja que es tracta d'una inhibició competitiva (Hettmann et al., 2002). En general, el pH òptim de la Nar es troba al voltant de 7,5 i 8 (Borcherding et al., 2000).

L'efecte d'altres additius també ha sigut estudiat. Per exemple, la presència de clorat pot augmentar aquesta activitat des de  $27,8 \pm 0,8$  U/ml fins  $29,8 \pm 1,1$  U/ml amb 11 mM de clorat. Per altra banda, s'ha provat que la concentració de sal no té un efecte directe sobre la seua activitat, al menys des d'1 fins a 1000 mM de clorur de sodi. Altres additius com la seroalbúmina bovina (BSA) també poden afectar, però els seus efectes són mínims i no tenen correlació, tot i que la seua presència pot reduir el risc de degradació per proteases (Borcherding et al., 2000).

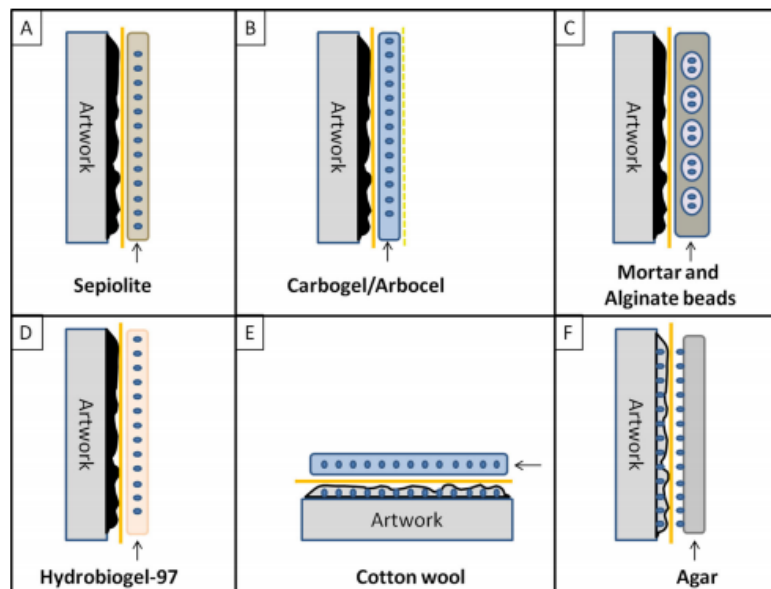
#### 4.4.2.2. Caracterització de Nap

En general, al ser enzims relativament similars, Nap i Nar comparteixen moltes característiques, com per exemple l'estabilitat d'activitat al voltant d'un pH entre 7 i 8. No obstant això, també hi ha diferències apreciables com que la Nap és insensible a concentracions d'azida a les qual Nar sí que ho és (Berks et al., 1994; Steenhoudt et al., 2001).

## 4.5. Aplicació dels enzims

L'últim pas és, per tant, l'aplicació directa de l'enzim sobre la zona danyada de la pintura. Aquest pas és molt important, ja que aplicar l'enzim d'una manera o una altra pot influir en l'activitat final de l'enzim. A més a més, aquest punt enllaça directament amb l'apartat de l'estabilització, ja que els additius o el tipus de suport utilitzats poden condicionar el mètode final d'aplicació. Per altra banda, no és sols la forma d'aplicació; també és molt important controlar les condicions i el temps. L'execució bioneteja pot durar entre unes poques hores fins a mesos, no obstant això, el temps d'exposició al qual pot estar sotmès la pintura és molt reduït: entre 90 minuts i unes poques hores (Bosch-Roig et al., 2019), i no tindre controlat aquest paràmetre pot afectar a la pintura per mantindre el contacte amb el mural durant massa temps o ser una neteja ineficient per fer l'aplicació massa ràpidament.

L'aplicació es pot fer de diverses maneres i mitjançant diferents suports (Figura 11). Es poden utilitzar pinzells o cotó per a subministrar el cultiu bacterià directament sobre els desperfectes. Per l'altre costat, també es pot utilitzar un suport per a mantindre el cultiu bacterià com pot ser el agar-agar, l'agarosa, un carbogel, una capa de cotó impregnat pel cultiu o sepiolita entre altres (Alfano et al., 2011; Bosch-Roig et al., 2019; Ranalli et al., 2000; Bosch-Roig et al., 2013). Per a mantindre la reacció estable, es poden utilitzar instruments per a establir una temperatura continua com per exemple, l'ús d'un llum de calor per infrarojos (Bosch-Roig et al., 2019).



**Figura 11. Diversos procediments d'aplicació sobre la pintura mural.** (Bosch-Roig et al., 2015).

En l'aplicació de l'enzim pur directament sobre la pedra, alguns estudis han demostrat que el rendiment més alt s'aconsegueix amb una brotxa, ja que els pèls que la conformen permeten crear una mena de pressió mecànica suau i repetitiva que ajuda a augmentar el rendiment. Aquesta

comparació es va fer sobre altres dos mètodes que no requereixen de pressió repetitiva com són el hisop i els discs de paper. A més a més, aquestes proves es van fer sobre una superfície ja netejada amb cultiu de bacteris complets i amb aparells que intentaven mantindre una temperatura òptima de 38 °C. També és important recalcar que en aquest cas es buscava eliminar material orgànic i es treballava amb proteases i col·lagenases (Ranalli et al., 2005). L'estratègia a seguir també pot ser submergir el material a tractar en una solució amb l'enzim i diferents concentracions de compostos i additius (Valentini et al., 2010). No obstant això, en aquest cas es tracta d'una pràctica desaconsellable pel perill que suposa submergir directament una pintura en un líquid.

Tot i que l'aplicació mitjançant la brotxa pareix la millor opció, la utilització d'un suport no s'ha de descartar. Per exemple, la utilització de una capa de cotó banyada amb la solució permet una aplicació senzilla i on els paràmetres són relativament senzills de controlar; a més a més, és un material molt econòmic (Ranalli et al., 2005). No obstant això, cal recalcar que el cotó aplicat de forma vertical pot causar danys (Bosch-Roig et al., 2013). L'agar també és una opció a tindre en ment, ja que és un material que ja s'ha utilitzat amb molt d'èxit (Bosch-Roig et al., 2013) i, a més a més, al ser un material molt útil en l'estabilització enzimàtica, es poden combinar ambdós procediments (Zucca et al., 2016).

Finalment, quan s'aplica l'enzim, també s'ha de tindre en compte la seua retirada. L'aplicació es sol fer en condicions d'humitat, que a llarg termini poden causar danys com el despreniment de la pintura. En eixe sentit, també s'han de controlar certes tècniques que produeixen un secat massa ràpid, el que pot afectar negativament a la pintura de manera directa o indirecta, ja que la bioneteja no s'acompleix totalment (Ranalli et al., 2005). Per acabar, també s'ha de realitzar una eliminació total del material, ja que si queden restes orgàniques sobre la pintura, es poden crear ambients proliferatius de microorganismes nocius o produir dany estètic directament. En aquest sentit, es poden utilitzar solucions de neteja amb aigua destil·lada o de tampó de carbonat. Aquest procés s'ha d'aplicar amb molta cura, realitzant passades amb una esponja de forma suau, i intentant utilitzar la mínima quantitat d'aigua possible, per a no eliminar pintura del mural (Ranalli et al., 2005; Valentini et al., 2010).

## 5. Resultats

### 5.1. Recuperació del bacteri

Del 4 ceps sembrat, els ceps A6166, P30 i 46326 no van mostrar signes de creixements després de 6 dies d'incubació a 37 °C i, per tant, es van descartar per a l'experiment. Per altra banda, del cep 5190, els dos cultius del cep van créixer perfectament en les 3 plaques, per tant, es decideix seguir l'estudi amb ells.

### 5.2. Tires API

Es van realitzar dos identificacions mitjançant tira API, una per cada cultiu del cep 5190. En ambdós casos, la lectura a les 24 hores no era conclouent (Figura 12) i, per tant, es va realitzar una segona lectura a les 48 hores (Figura 13). En aquest cas, els resultats mostraven un 99,9% de coincidència amb *Pseudomonas stutzeri*.

No obstant això, al realitzar-se les proves de desnitrificació en els medis MD i CN sembrats amb les colònies de les plaques fetes a partir del bacteris de la tira API, els resultats no van ser del tot clars. Per tant, el procediment es va repetir, aconseguint en aquest cas resultats positius en les proves de desnitrificació i confirmat al cep (Figura 14) com a candidat per als experiments següents.



Figura 12. Tira API del cep 5190 després de 24 hores.



Figura 13. Tira API del cep 5190 després de 48 hores.

CE 07224 B REF : \_\_\_\_\_  
 Origine / Source / Herkunft /  
 Origen / Orígen / Προέλευση /  
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie : \_\_\_\_\_  
 BIOMÉRIEUX  
 Ingénierie en France / Printed in France

Test	24 h	48 h
MD <sub>1</sub> / M <sub>2</sub>	+	+
1	-	-
2	-	-
4	-	-
NO <sub>3</sub>	-	-
TRP	-	-
GLU	-	-
ADH	-	-
URE	-	-
ESC	-	-
GEL	-	-
PNG	-	-
GLUJ	+	+
1	-	-
2	-	-
4	-	-
1	-	-
2	-	-
4	-	-
1	-	-
2	-	-
4	-	-
1	-	-
2	-	-
4	-	-
1	-	-
2	-	-
4	-	-
1	-	-
2	-	-
4	-	-
1	-	-
2	-	-
4	-	-
OX	+	+

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
 Andre tests / Inne testy : \_\_\_\_\_  
 Ident. / Ταυτοποίηση : \_\_\_\_\_

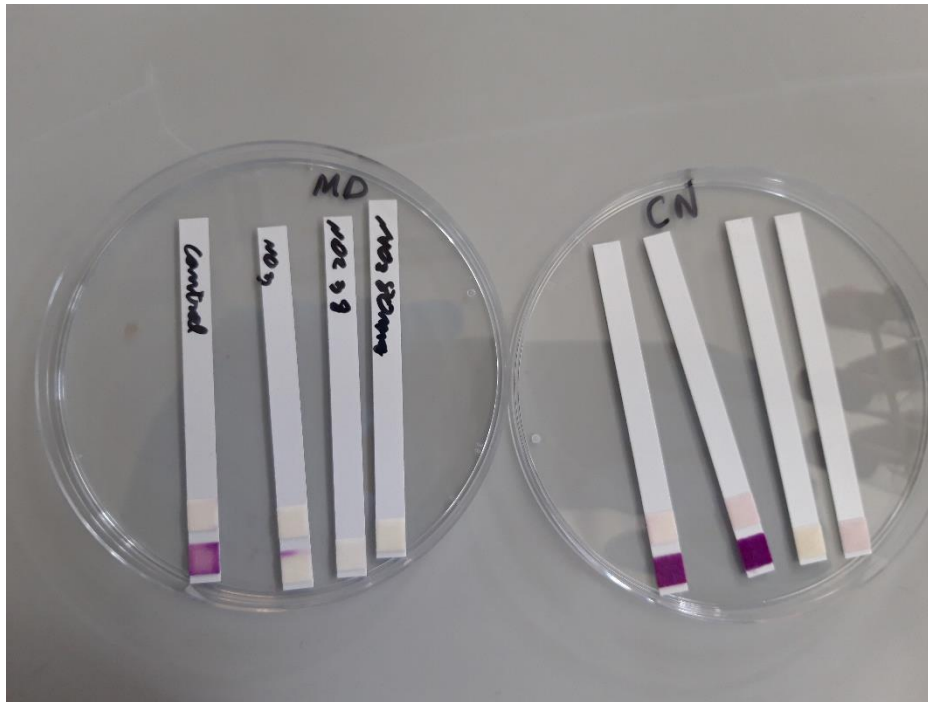
**Figura 14. Full de control que mostra les diferències entre les 24 i les 48 hores.** El signe d'interrogació de la prova MAN (fermentació/oxidació de manitol) no aporta res significatiu, ja que siga "+" o "-", el resultat segueix sent *Pseudomonas stutzeri* amb una diferència del 0,5 %: 99,9% i 99,4% respectivament.

### 5.3. Resultats de les proves desnitrificants

La primera comprovació es va fer directament sobre els tubs del medi CN sembrats a partir de colònies de les plaques de recuperació. Després de 3 dies d'incubació a 30 °C es va mostrar l'aparició d'una bombolla dins de la campana Durham invertida. No obstant això, tot i que sí que hi ha indicis de consum de nitrats, la bombolla era massa xicoteta.

El següent pas va ser realitzar el test de nitrats i de nitrits. En ambdós medis es realitza un control amb tubs sense sembrar que ha de ser positiu per als nitrats i negatiu per als nitrits. Es realitzaren tres proves: nitrats, nitrits de 2-80 mg i nitrits de 0,1 a 3 grams. En el medi MD totes les proves resultaren negatives, per tant, el bacteri va consumir tant els nitrats com els nitrits. El medi CN, com es tracta d'un medi molt saturat de nitrats, la tira de nitrats va seguir sent positiva, però les tires de nitrits també mostraren que havia augmentat la quantitat de nitrits. No obstant això, com els resultats no van ser massa bons i els resultats de les colònies de la tira API tampoc, es va decidir fer una repetició.

A la segon ronda els resultats del medi MD van ser els mateixos que en l'anterior però els resultats del medi CN mostraren que hi ha més nitrits (Figura 15). Finalment, es va realitzar una prova amb el reactiu de Griess. En el medi MD no hi ha reacció perquè els nitrats i els nitrits s'han consumit totalment. Per altra banda, el medi CN mostra quasi immediatament una coloració rogenca per la presència de nitrits (Figura 16), tant de les plaques de recuperació com de les plaques fetes a partir de la segona tira API.



**Figura 15. Resultats dels tests de nitrats i nitrits.** En cada placa es troben 4 tires. La tira 1 és el control que mostra, en el quadrat de baix, la presència de nitrats i en el de dalt la de nitrits. El color morat indica que és positiu i la intensitat la concentració. Com s'observa, la quantitat de nitrats és major en el medi CN que en el MD. La tira 2 és la prova de nitrats, la 3 la de nitrits de 0,1-3 g i la 4 la de nitrits de 2-80 mg. En el medi MD totes són negatives perquè s'ha consumit tant el nitrat com el nitrit. En el medi CN es mostra que encara hi ha molt de nitrat, però la coloració lleugerament morada de les proves de nitrits, revela que s'ha consumit una part.



**Figura 16. Resultats de la prova del reactiu de Griess.** A l'esquerra està el tub del medi MD i a la dreta el de CN, ambdós sembrats amb les colònies utilitzades per a fer la segona tanda de la tira API. En el medi MD no hi ha reacció mentre que en el CN sí, ja que hi ha molts nitrits resultants de la consumició de nitrats.

Amb aquestes proves es demostra que el cep 5190 consumeix adequadament els nitrats i és adequat per a continuar els experiments.

## 6. Discussió i perspectives de futur

Donada la situació d'excepció, la major part de la part experimental no s'ha pogut realitzar com es tenia previst. Per aquest motiu, aquest punt anirà dedicat no sols a l'anàlisi de les dades obtingudes sinó també a la comprensió i síntesi dels diferents procediments experimentals que han fet altres autors per a poder, amb una base ferma, dissenyar un protocol propi adaptat a les nostres necessitats.

En primer lloc, entrant a valorar les dades que s'han realitzat, queda clar que *Pseudomonas stutzeri* és un dels millors desnitrificadors que hi ha i que té moltes utilitats en bioneteja, com han demostrat els diferents autors consultats. Per altra banda, el cas del cep 5190 no queda sols demostrat pel fet de que s'haja utilitzat per a netejar les pintures de l'Església dels Sants Joans; també perquè les proves realitzades en el laboratori així ho han demostrat. Per altra banda, els tests de les tires de nitrats i nitrits també ha permès veure que en ambients saturats de nitrats com és el CN, el bacteri té menys rendiment tant en el consum de nitrats com en el de nitrits que en altres on la concentració és més baixa, com el MD. Aquesta observació es confirma amb estudis d'altres autors (Blümle i Zumft, 1991).

En l'estudi de la purificació dels enzims, tot i que la recerca de protocols s'ha realitzat de forma separada per a cadascun, és interessant arribar a un procediments unificat. Això, no és impossible; de fet és relativament senzill, ja que al tractar-se d'enzims que es situen en dos llocs diferents de la cèl·lula, mitjançant fraccionament subcel·lular, es pot aconseguir.

En primer lloc, amb motiu d'aconseguir la fracció periplasmàtica, es poden descartar directament els mètodes que fan servir cloroform i polimixina, ja que, tot i que si que permeten fraccionar el periplasma, aquests mètodes tan agressius solen fer malbé la membrana plasmàtica, creant fissures o una disrupció cel·lular directament (Jensch i Fricke, 1996) . Per tant, no interessen per dos motius: la contaminació del periplasma amb material del citoplasma i, el més important, la destrucció de la fracció membranosa on es troba la Nar. També pareix recomanable eliminar els protocols que inclouen EDTA, ja que poden afectar a la integritat de les membranes i les seues proteïnes associades dels bacteris del gènere *Pseudomonas* (Matsushita et al., 1978). No obstant això, protocols més actuals, mostren que l'EDTA a baixes concentracions no té perquè provocar problemes (Alefounder i Ferguson 1980; Carter et al., 1995).

Per altra banda, el mètode que més pareix utilitzar-se és la formació d'esferoplasts, ja que permet separar el periplasma de la resta de la cèl·lula, mantenint una bona integritat. No obstant això, aquest mètode té diferents protocols, que tot i ser molt similars, presenten xicotetes diferències que poden marcar el resultat final. De tots els estudiats, hi ha una mètode que es repeteix varies vegades amb prou d'èxit: aquest és la formació d'esferoplasts mitjançant l'ús de lisozim i sacarosa. Per una banda, en el treball d'Alefounder i Ferguson (1980) , ambdós protocols que utilitzen són exitosos, però destaca sobretot el segon, el que també utilitza EDTA. Aquest últim és, el que més tard, utilitza el grup de Carter



(1995) amb unes poques modificacions. Aquest estudi és de molta utilitat perquè es realitza un fraccionament total del bacteri: periplasma, membranes i citoplasma. Tot i que indica que la pèrdua d'activitat nitrats reductasa en comparació a cèl·lula completa pot variar des d'un 16% fins a un 61% en cada fracció, també observa que d'aquesta activitat final, el 80% correspon al periplasma, el que pareix mostrar que el protocol no fa excessivament mal a la Nap. Per altra banda, està l'estudi del grup d'Imperi (2007) on comparen 3 mètodes de fraccionament del periplasma: xoc osmòtic, esferoplasts per lisozim i sacarosa i esferoplasts per lisozim i  $MgCl_2$ . En aquest cas, també és el protocol amb lisozim i sacarosa el que destaca perquè permet obtenir un periplasma amb més proteïnes actives i amb més quantitat d'aquestes. Cal afegir que també s'utilitza EDTA en aquest procediment. Finalment, l'estudi de Pages et al. (1984) també descriu un mètode similar.

Per a l'obtenció de la fracció membranosa es pot utilitzar una combinació dels mètodes dels grups de Hettmann (2002) i Carter (1995). És a dir, els esferoplasts es poden tractar amb ultrasons per a eliminar, seguidament, mitjançant filtres, la fracció del citoplasma. Un últim pas seria la realització d'ultrafiltracions per a obtenir la fracció membranosa.

Abans de passar a la purificació en sí, és molt interessant valorar seriosament la purificació completa o parcial de l'enzim Nar. Com mostra Hettmann et al. (2002), l'enzim pot mantindre la seua activitat amb sols les subunitats  $\alpha\beta$ , prescindint de la  $\gamma$ . Ara bé, aquesta activitat es veu afectada. Dels dos mètodes que mostra per a la purificació parcial de l'enzim, el mètode I sols manté un 30% de l'activitat nitrats reductasa en comparació a l'enzim complet, mentre que el mètode II augmenta fins un 70%. No obstant això, l'enzim complet té una  $K_M$  major (és a dir, menor afinitat) i necessita, per tant, molt més temps per a realitzar la reacció que la subunitat  $\alpha\beta$ . A més a més, l'enzim complet es satura a concentracions de nitrats més baixes. Açò s'explica perquè al existir la subunitat  $\gamma$ , els donadors d'electrons necessiten reduir-la a ella primer, el que requereix d'un temps molt llarg. Per altra banda, la seua absència permet que aquests donadors arriben més ràpidament al centre catalític, accelerant el procés. Per tant, tot i que hi ha una pèrdua d'activitat, l'enzim parcial pareix molt més aplicable que el complet. A més a més, el mètode II permetria unificar els protocols de purificació de Nar i Nap (Hettmann et al., 2002).

Per tant, el protocol de purificació començaria amb la formació dels esferoplasts i l'obtenció de la fracció periplasmàtica. Tenint en ment que quasi tots els protocols són similars i que el de Carter et al. (1995) es basa en l'anàlisi de l'activitat nitrats reductasa d'un bacteri del gènere *Pseudomonas*, pareix aquest últim el protocol més adequat.

Abans de realitzar aquesta purificació, és important realitzar una caracterització del cep. Amb aquesta, es podrà fer la purificació amb el cultiu on es donen les millors condicions per a l'activitat nitrats reductasa. No obstant això, és important tindre en compte que al tractar-se de dos enzims, eixes condicions no tenen perquè beneficiar a l'expressió dels dos enzims per igual i, per tant, que els nivells de purificació poden ser desiguals. Com aquesta prova no s'ha pogut realitzar en el laboratori,

encara no ho podem saber. Per altra banda, amb els treballs previs sí que podem fer una aproximació de les millors condicions: un pH entre 7 i 9 pareix ser la constant entre diferents ceps, una temperatura al voltant dels 30 °C i una C/N per damunt de 6 i per davall de 10. En quan a la concentració d'oxigen dissolt, seria interessant estudiar la concentració limitant del cep 5190.

Seguint amb la purificació, les cèl·lules sembrades en el cultiu líquid es centrifuguen durant 20 minuts a 5000 g i s'utilitza un tampó format per Tris-HCl 10 mM i NaCl 150 mM a pH 7,3, tot a 4 °C. El sediment es resuspèn amb 5 ml de 0,5 M de sacarosa i Tris-HCl 10 mM a pH 7,3. La suspensió es barreja amb 200 ml de Tris-HCl 200 mM pH 7,3, 0,5 mM de sacarosa i 0,5 mM de d'EDTA i 50 mg de lisozim. Finalment, s'afegeixen 200 ml d'aigua i s'incuba 2 hores a 30 °C. Seguidament, es realitza una centrifugació a 37000 g a 4 °C durant 10 minuts. En el sobrenadat es troben les proteïnes del periplasma, i en el sediment els esferoplasts. Aquests esferoplasts es tracten mitjançant ultrasons i ultracentrifugació per a separar les membranes del citoplasma. En aquest punt, la fracció membranosa i la fracció periplasmàtica ja estan separades de la cèl·lula completa. Per a la purificació de les proteïnes, podria ser interessant utilitzar una combinació del mètode II de Hettmann et al. (2002) i del protocol del grup de Jepson (2006), ja que ambdós processos són compatibles i es poden unificar. La fracció membranosa s'incuba a 40 °C durant 3h amb clorhidrat de guanidi 140 mM, EDTA 3 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 7,2. La suspensió es refreda a temperatura ambient i en aquest punt és on es pot intentar el pas comú, ja que per a la purificació utilitzen una columna de cromatografia del tipus DEAE. En el cas de l'enzim Nar, l'elució es realitza amb NaCl 400 mM, Tris-HCl 25 mM a pH, mentre que en el cas de Nap, l'elució es realitza amb 30 mM KCl i 10 mM Tris-HCl a pH 8. És possible que qualsevol dels dos mètodes fora vàlid, però és necessari realitzar proves per a comprovar-ho. En el cas de Jepson et al. (2006), aquesta elucidació es produeix sobre la subunitat NapA, que és la catalítica de les Nap heterodimèriques i que és molt semblant a les Nap d'una sola subunitat, per tant, podria ser extrapolable a qualsevol tipus de Nap.

Seguidament, es realitzaria la caracterització dels enzims. En aquest cas, succeeix el mateix que amb la caracterització del cep, per tant ens hem de basar en les dades d'altres investigacions. En aquest cas, ambdós enzims tenen un pH òptim neutre i actuen a les mateixes temperatures. Per tant, durant l'aplicació, és relativament senzill controlar les reaccions, ja que no necessiten condicions particulars. És suficient mantenint un ambient neutre i establint una temperatura amb ajuda de, per exemple, un llum d'infrarojos (Bosch-Roig et al., 2019). En el cas d'haver de realitzar la caracterització, els mètodes de Borchering (2000) o de Blümle i Zumft (1991) serien acceptables, ja que el viologen de metil és un bon donador d'electrons per als dos enzims, mentre que el NADH, no per a Nap. De qualsevol manera, caldria comprovar-ho experimentalment.

Paral·lelament, per a l'estabilització dels enzims la immobilització a un suport és, probablement, la millor opció en aquest cas perquè permet crear un suport funcional útil per a l'aplicació sobre la pintura mural. Com hem vist, alguns suports que formen matrius amb la nitrat reductases

poden mantindre més de la meitat de l'activitat nativa d'aquesta (Willner et al., 1990) o també mitjançant encapsulació es pot mantindre aquesta activitat (Aylott 1997), el que indica que és un bon exemple per a utilitzar. Ambdues opcions pareixen bones, però a falta de la possibilitat per a experimentar, pot ser, l'opció més convenient siga la del grup d'Aylott (1997), ja que la formació d'aquest sol-gel no sols manté l'activitat durant, al menys, una setmana, també brinda l'oportunitat de encapsular amb la Nar i la Nap, additius com el viologen de metil per a que actue com a substrat estabilitzador (Iyer i Ananthanarayan, 2008).

Finalment, prèviament a l'aplicació, caldria fer proves de laboratori sobre una superfície que copie les característiques d'una pintura mural amb eflorescències de sal. D'aquesta manera, es podria saber quin de tots els mètodes de immobilització és el més adequat o provar d'altres més senzills com la brotxa o el cotó, per comprovar la seua efectivitat. Per altra banda, aquestes proves també permetrien saber si la tècnica és perjudicial per a la pintura i ajudarien a crear un protocol adequat per a l'elaboració posterior.

Les perspectives de futur amb la bioneteja són molt amplies i diverses. Com ja s'ha dit anteriorment, aquesta tècnica és relativament nova i, per tant, molts camps d'investigació segueixen oberts o per descobrir. La quantitat de ceps que es poden utilitzar és molt gran i aquesta xifra encara augmenta més si utilitzem l'enginyeria genètica per a millorar-los de cara a la biorrestauració. De la mateixa manera, les tècniques de purificació, estabilització i aplicació també són molt variades, el que ens deixa un món molt obert per a la construcció de protocols.

A més a més, els propis problemes que mostra el patrimoni també són diversos i apareixen nous contínuament. Per tant, la necessitat d'utilitzar tècniques o microorganismes de forma innovadora està fortament present. Per altra banda, la biorrestauració també deu anar més enllà i no centrar-se sols en la bioneteja. Per exemple, els danys causats al patrimoni són provocats moltes vegades per problemes de conservació. Un exemple és que edificis antics com catedrals o esglésies, construïts amb material inflamables com la fusta (moltes vegades deteriorada pel temps), actualment es troben més amenaçades pel foc que antigament per culpa de les instal·lacions elèctriques, pels nous materials o per actituds negligents, com s'ha pogut veure en els incendis de Notre Dame (2019) i de la catedral de Nantes (2020), en França. Les possibilitats dels enzims bacterians van més enllà de la desnitrificació que és l'objecte d'aquest treball, per exemple, l'aplicació d'altres hidrolases (lipases, proteases, amilases, esterases...) per a eliminar residus adherits de diversa naturalesa o inclús corregir restauracions deficientes prèvies (Palla, 2007). Per tant, seria molt interessant i revolucionari arribar a crear tècniques amb microorganismes que no sols ens ajuden a netejar, sinó també a conservar el nostre patrimoni per a les generacions futures.

## **7. Conclusió**

Per una banda, la purificació, tant de l'enzim Nap com de l'enzim Nar, es pot realitzar sense perdre excessivament activitat nitrato reductasa. Per altra banda, aquesta activitat també es pot mantindre en suports durant, relativament, molt de temps per a la seua aplicació sobre la pintura mural. Aquests suports poden ser molt variats i anar acompanyats de additius que ajuden a mantindre aquesta activitat. També, en relació amb l'aplicació, s'ha observat que els enzims aïllats es poden utilitzar per a la bioneteja de la mateixa manera que es fa amb els microorganismes complets.

Finalment, existeixen motes tècniques similars i diferents per a arribar al mateix punt, com s'ha pogut observar, per tant, no hi ha una sola metodologia correcta i seria molt interesant provar les més interessants per a trobar la que millor podria encaixar en aquest projecte.

## 8. Bibliografia

- ALEFOUNDER, P. and FERGUSON, S., 1980. The location of dissimilatory nitrite reductase and the control of dissimilatory nitrate reductase by oxygen in *Paracoccus denitrificans*. *Biochemical Journal*, 192(1): 231-240. <https://doi.org/10.1042/bj1920231>
- ALFANO, G., LUSTRATO, G., BELLI, C., ZANARDINI, E., CAPPITELLI, F., MELLO, E., SORLINI, C. and RANALLI, G., 2011. The bioremoval of nitrate and sulphate alterations on artistic stonework: The case-study of Matera Cathedral after six years from the treatment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(7): 1004-1011. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.07.010>
- AMES, G., PRODY, C. AND KUSTU, S., 1984. Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *Journal of Bacteriology*, 160(3): 1181-1183. <https://doi.org/10.1128/jb.160.3.1181-1183.1984>
- AMY, N. and GARRETT, R., 1974. Purification and Characterization of the Nitrate Reductase from the Diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant Physiology*, 54(4): 629-637. <https://doi.org/10.1104/pp.54.4.629>
- AYLOTT, J., RICHARDSON, D. and RUSSELL, D., 1997. Optical Biosensing of Nitrate Ions Using a Sol-Gel Immobilized Nitrate Reductase. *The Analyst*, 122(1): 77-80. <https://doi.org/10.1039/a606146j>
- BEDZYK, L., WANG, T. and YE, R., 1999. The Periplasmic Nitrate Reductase in *Pseudomonas* sp. Strain G-179 Catalyzes the First Step of Denitrification. *Journal of Bacteriology*, 181(9): 2802-2806. <https://doi.org/10.1128/jb.181.9.2802-2806.1999>
- BERKS, B., RICHARDSON, D., ROBINSON, C., REILLY, A., APLIN, R. and FERGUSON, S., 1994. Purification and characterization of the periplasmic nitrate reductase from *Thiosphaera pantotropha*. *European Journal of Biochemistry*, 220(1): 117-124. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18605.x>
- BLÜMLE, S. and ZUMFT, W., 1991. Respiratory nitrate reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*, purification, properties and target of proteolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1057(1): 102-108. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(05\)80089-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(05)80089-1)
- BORCHERDING, H., LEIKEFELD, S., FREY, C., DIEKMANN, S. and STEINRÜCKE, P., 2000. Enzymatic Microtiter Plate-Based Nitrate Detection in Environmental and Medical Analysis. *Analytical Biochemistry*, 282(1): 1-9. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4585>
- BOSCH-ROIG, P. and RANALLI, G., 2014. The safety of biocleaning technologies for cultural heritage. *Frontiers in Microbiology*, 5: 155. <https://doi.org/10.3390/su11154227>
- BOSCH-ROIG, P., ALLEGUE, H. and BOSCH, I., 2019. Granite Pavement Nitrate Desalination: Traditional Methods vs. Biocleaning Methods. *Sustainability*, 11(15): 4227. <https://doi.org/10.3390/su11154227>
- BOSCH-ROIG, P., LUSTRATO, G., ZANARDINI, E. and RANALLI, G., 2014. Biocleaning of Cultural Heritage stone surfaces and frescoes: which delivery system can be the most appropriate? *Annals of Microbiology*, 65(3): 1227-1241. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0938-4>
- BOSCH-ROIG, P., REGIDOR ROS, J. and ESTELLÉS, R., 2013. Biocleaning of nitrate alterations on wall paintings by *Pseudomonas stutzeri*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84: 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.09.009>
- BRENNAN, J., BENJAMIN, D., DIBATTISTA, E. and GULCEV, M., 2003. Using Sugar and Amino Acid Additives to Stabilize Enzymes within Sol-Gel Derived Silica. *Chemistry of Materials*, 15(3): 737-745. <https://doi.org/10.1021/cm020768d>
- BRITO, F., DEMOSS, J. and DUBOURDIEU, M., 1995. Isolation and identification of menaquinone-9 from purified nitrate reductase of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 177(13): 3728-3735. <https://doi.org/10.1128/jb.177.13.3728-3735.1995>

- CAPPITELLI, F., TONIOLO, L., SANSONETTI, A., GULOTTA, D., RANALLI, G., ZANARDINI, E. and SORLINI, C., 2007. Advantages of Using Microbial Technology Over Traditional Chemical Technology in Removal of Black Crusts from Stone Surfaces of Historical Monuments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17): 5671-5675. <https://doi.org/10.1128/AEM.00394-07>
- CARLSON, C. and INGRAHAM, J., 1983. Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(4): 1247-1253. <https://doi.org/10.1128/aem.45.4.1247-1253.1983>
- CARLSON, C. and INGRAHAM, J., 1983. Comparison of denitrification by *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(4): 1247-1253. <https://doi.org/10.1128/aem.45.4.1247-1253.1983>
- CARTER, J., RICHARDSON, D. and SPIRO, S., 1995. Isolation and characterisation of a strain of *Pseudomonas putida* that can express a periplasmic nitrate reductase. *Archives of Microbiology*, 163(3): 159-166. <https://doi.org/10.1007/BF00305348>
- COSNIER, S., DA SILVA, S., SHAN, D. and GORGY, K., 2008. Electrochemical nitrate biosensor based on poly(pyrrole–viologen) film–nitrate reductase–clay composite. *Bioelectrochemistry*, 74(1): 47-51. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1052-5>
- CRISPIM, C. and GAYLARDE, C., 2004. Cyanobacteria and Biodeterioration of Cultural Heritage: A Review. *Microbial Ecology*, 49(1): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1052-5>
- ELLINGTON, M., SAWERS, G., SEARS, H., SPIRO, S., RICHARDSON, D. and FERGUSON, S., 2003. Characterization of the expression and activity of the periplasmic nitrate reductase of *Paracoccus pantotrophus* in chemostat cultures. *Microbiology*, 149(6): 1533-1540. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26277-0>
- GIANNINI, C., ROANI, R., LANTERNA, G. and PICOLLO, M., 2008. *Diccionario De Restauración Y Diagnóstico*. Editorial: Nerea. 224 pp.
- GONZÁLEZ, P., CORREIA, C., MOURA, I., BRONDINO, C. and MOURA, J., 2006. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(5-6): 1015-1023. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.11.024>
- HARRISON, S., 1991. Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnology Advances*, 9(2): 217-240. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(91\)90005-G](https://doi.org/10.1016/0734-9750(91)90005-G)
- HETTMANN, T., ANEMÜLLER, S., BORCHERDING, H., MATHÉ, L., STEINRÜCKE, P. AND DIEKMANN, S., 2002. *Pseudomonas stutzeri* soluble nitrate reductase  $\alpha\beta$ -subunit is a soluble enzyme with a similar electronic structure at the active site as the inner membrane-bound  $\alpha\beta\gamma$  holoenzyme. *FEBS Letters*, 534(1-3): 143-150. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03837-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03837-1)
- HOCHSTEIN, L. and TOMLINSON, G., 1988. The Enzymes Associated with Denitrification. *Annual Review of Microbiology*, 42(1): 231-261. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.42.1.231>
- HUANG, T., GUO, L., ZHANG, H., SU, J., WEN, G. and ZHANG, K., 2015. Nitrogen-removal efficiency of a novel aerobic denitrifying bacterium, *Pseudomonas stutzeri* strain ZF31, isolated from a drinking-water reservoir. *Bioresource Technology*, 196: 209-216. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.059>
- IMPERI, F., CICCOSANTI, F., PERDOMO, A., TIBURZI, F., MANCONE, C., ALONZI, T., ASCENZI, P., PIACENTINI, M., VISCA, P. and FIMIA, G., 2009. Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. *PROTEOMICS*, 9(7): 1901-1915. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800618>
- IYER, P. and ANANTHANARAYAN, L., 2008. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43(10): 1019-1032. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.004>

- JENSCH, T. and FRICKE, B., 1997. Localization of alanyl aminopeptidase and leucyl aminopeptidase in cells of *Pseudomonas aeruginosa* by application of different methods for periplasm release. *Journal of Basic Microbiology*, 37(2): 115-128. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620370206>
- JEPSON, B., MOHAN, S., CLARKE, T., GATES, A., COLE, J., BUTLER, C., BUTT, J., HEMMINGS, A. and RICHARDSON, D., 2006. Spectropotentiometric and Structural Analysis of the Periplasmic Nitrate Reductase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9): 6425-6437. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607353200>
- JI, B., WANG, H. and YANG, K., 2013. Tolerance of an aerobic denitrifier (*Pseudomonas stutzeri*) to high O<sub>2</sub> concentrations. *Biotechnology Letters*, 36(4): 719-722. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1417-x>
- KARIMINIAAE-HAMEDAANI, H., KANDA, K. and KATO, F., 2004. Denitrification activity of the bacterium *Pseudomonas* sp. ASM-2-3 isolated from the Ariake Sea tideland. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(1): 39-44. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70163-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70163-2)
- KÖRNER, H. and MAYER, F., 1992. Periplasmic location of nitrous oxide reductase and its apofrom in denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of Microbiology*, 157(3): 218-222. <https://doi.org/10.1007/BF00245153>
- LALUCAT, J., BENNASAR, A., BOSCH, R., GARCÍA-VALDÉS, E. and PALLERONI, N., 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2): 510-547. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00047-05>
- LOWE, R. and EVANS, H., 1964. Preparation and some properties of a soluble nitrate reductase from *Rhizobium japonicum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects*, 85(3): 377-389.
- LUSTRATO, G., ALFANO, G., ANDREOTTI, A., COLOMBINI, M. and RANALLI, G., 2012. Fast biocleaning of mediaeval frescoes using viable bacterial cells. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 69: 51-61.
- MATSUSHITA, K., ADACHI, O., SHINAGAWA, E. and AMEYAMA, M., 1978. Isolation and Characterization of Outer and Inner Membranes from *Pseudomonas aeruginosa* and Effect of EDTA on the Membranes. *The Journal of Biochemistry*, 83(1): 171-181. [https://doi.org/10.1016/0926-6569\(64\)90301-3](https://doi.org/10.1016/0926-6569(64)90301-3)
- NAKAGAWA, H., POULLE, M. and OAKS, A., 1984. Characterization of Nitrate Reductase from Corn Leaves (*Zea mays* cv W64A × W182E). *Plant Physiology*, 75(2): 285-289. <https://doi.org/10.1104/pp.75.2.285>
- NOSSAL, N. G., & HEPPEL, L. A. (1966). The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* and in exponential phase. *Journal of Biological Chemistry*, 241(13): 3055-3062. <https://www.jbc.org/content/241/13/3055.short>
- PAGES, J., ANBA, J., BERNADAC, A., SHINAGAWA, H., NAKATA, A. and LAZDUNSKI, C., 1984. Normal precursors of periplasmic proteins accumulated in the cytoplasm are not exported post-translationally in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 143(3): 499-505. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08398.x>
- PALLA, F., 2017. Blue-Biotechnology and biocleaning of historic- artistic artifacts. *Conservation Science in Cultural Heritage*, 16: 185-196. <https://doi.org/10.6092/issn.1973-9494/7169>
- RANALLI, G., ALFANO, G., BELLI, C., LUSTRATO, G., COLOMBINI, M., BONADUCE, I., ZANARDINI, E., ABBRUSCATO, P., CAPPITELLI, F. and SORLINI, C., 2005. Biotechnology applied to cultural heritage: biorestitution of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1): 73-83. <https://doi.org/10.1111/jam.13913>

- RANALLI, G., ZANARDINI, E., ANDREOTTI, A., COLOMBINI, M., CORTI, C., BOSCH-ROIG, P., DE NUNTIIS, P., LUSTRATO, G., MANDRIOLI, P., RAMPAZZI, L., GIANTOMASSI, C. and ZARI, D., 2018. Hi-tech restoration by two-steps biocleaning process of Triumph of Death fresco at the Camposanto Monumental Cemetery (Pisa, Italy). *Journal of Applied Microbiology*, 125(3): 800-812. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02429.x>
- RANALLI, G., MATTEINI, M., TOSINI, I., ZANARDINI, E., & SORLINI, C., 2000. Bioremediation of Cultural Heritage: Removal of Sulphates, Nitrates and Organic Substances. In *Of Microbes and Art*, 231-246. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4239-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4239-1_16)
- REZAAE, A., GODINI, H., DEHESTANI, S., & KAVIANI, S. (2010). Isolation and characterization of a novel denitrifying bacterium with high nitrate removal: *Pseudomonas stutzeri*. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 7(4):313-318. <https://ijehse.tums.ac.ir/index.php/jehse/article/view/261>
- SIRISHA, V. L., JAIN, A., & JAIN, A., 2016. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. In *Advances in Food and Nutrition Research*, 75: 179-211. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>
- SPARACINO-WATKINS, C., STOLZ, J. and BASU, P., 2014. Nitrate and periplasmic nitrate reductases. *Chem. Soc. Rev.*, 43(2): 676-706. <https://doi.org/10.1039/c3cs60249d>
- STEENHOUDT, O., KEIJERS, V., OKON, Y. and VANDERLEYDEN, J., 2001. Identification and characterization of a periplasmic nitrate reductase in *Azospirillum brasilense* Sp245. *Archives of Microbiology*, 175(5): 344-352. <https://doi.org/10.1007/s002030100271>
- TAMEGAI, H., IKEDA, E., KATO, C. and HORIKOSHI, K., 2007. Identification of the Functional Periplasmic Nitrate Reductase (nap) Gene Cluster from the Deep-Sea Denitrifier *Pseudomonas* sp. Strain MT-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(8): 2041-2045. <https://doi.org/10.1271/bbb.70256>
- TATTAWASART, U., MAILLARD, J., FURR, J. and RUSSELL, A., 2000. Outer membrane changes in *Pseudomonas stutzeri* resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16(3): 233-238. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00206-5](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00206-5)
- TSIKAS, D., 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of Chromatography B*, 851(1-2): 51-70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.054>
- VALENTINI, F., DIAMANTI, A. and PALLESCHI, G., 2010. New bio-cleaning strategies on porous building materials affected by biodeterioration event. *Applied Surface Science*, 256(22): 6550-6563. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.04.046>
- VAN HARTINGSVELDT, J., MARINUS, M. G., & STOUTHAMER, A. H., 1971. Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* blocked in nitrate or nitrite dissimilation. *Genetics*, 67(4): 469-482. PMID: 4999627
- VOLLACK, K., XIE, J., HARTIG, E., ROMLING, U. and ZUMFT, W., 1998. Localization of denitrification genes on the chromosomal map of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 144(2): 441-448. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-2-441>
- WILLNER, I., RIKLIN, A. and LAPIDOT, N., 1990. Electron-transfer communication between a redox polymer matrix and an immobilized enzyme: activity of nitrate reductase in a viologen-acrylamide copolymer. *Journal of the American Chemical Society*, 112(17): 6438-6439. <https://doi.org/10.1021/ja00173a065>
- WU, L., ZHU, G., ZHANG, X. and SI, Y., 2020. Silver nanoparticles inhibit denitrification by altering the viability and metabolic activity of *Pseudomonas stutzeri*. *Science of The Total Environment*, 706: 135711. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135711>
- ZHAO, B., CHENG, D., TAN, P., AN, Q. and GUO, J., 2018. Characterization of an aerobic denitrifier *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 to achieve efficient nitrate removal. *Biore-source Technology*, 250: 564-573. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.038>



ZUCCA, P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. and SANJUST, E., 2016. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. *Molecules*, 21(11): 1577. <https://doi.org/10.3390/molecules21111577>

ZUMFT, W., 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(4): 533-616. <https://doi.org/10.1128/.61.4.533-616.1997>