

Lena Sarholm, Ann Kjellström, Marita Wanhatalo,  
Dennis Menning och Erik Holmgren,

## Årsrapport för projektet Landminsystem: Detektion och neutralisation

TOTALFÖRSVARETS FORSKNING SINSTITUT

Vapen och skydd

147 25 Tumba

FOI-R--1432--SE

December 2004

ISSN 1650-1942

**Användarrapport**

Lena Sarholm, Ann Kjellström, Marita Wanhatalo,  
Dennis Menning och Erik Holmgren,

## Årsrapport för projektet Landmins-system: Detektion och neutralisation

<b>Utgivare</b> Totalförsvarets Forskningsinstitut - FOI Vapen och skydd 147 25 Tumba	<b>Rapportnummer, ISRN</b> FOI-R--1432--SE	<b>Klassificering</b> Användarrapport
	<b>Forskningsområde</b> 5. Bekämpning och skydd	
	<b>Månad, år</b> December 2004	<b>Projektnummer</b> E 2003
	<b>Delområde</b> 51 VVS med styrda vapen	
	<b>Delområde 2</b>	
<b>Författare/redaktör</b> Lena Sarholm Ann Kjellström Marita Wanhatalo Dennis Menning Erik Holmgren	<b>Projektledare</b> Lena Sarholm	
	<b>Godkänd av</b> IC, FoF och AC	
	<b>Uppdragsgivare/kundbeteckning</b> FM	
	<b>Tekniskt och/eller vetenskapligt ansvarig</b>	
<b>Rapportens titel</b> Årsrapport för projektet Landminsystem: Detektion och neutralisation		
<b>Sammanfattning (högst 200 ord)</b> I rapporten ges en kort beskrivning av den internationella utvecklingen för minsystem och substridsdelar. Migrationsstudier från TNT som läckt ut från minor i FOI testfält beskrivs. Studier av migration och nedbrytning av hexogen, oktogen, tetryl och pentyl har påbörjats samt utvecklingen av analysmetoder för dessa ämnen i jordmatriser Med hjälp av LC-MS-UV analys kan de sex olika isomererna av TNT samt relaterade föreningar från tillverkningsprocesser och nedbrytningsprodukter separeras och detekteras. Den pågående studien om Bakteriella biosensorer redovisas liksom studierna avseende nedbrytbara energetiska salter och plaster.		
<b>Nyckelord</b> detektion, analys, explosivämnen, nedbrytning, bakteriella biosensorer,		
<b>Övriga bibliografiska uppgifter</b>	<b>Språk</b> Svenska	
<b>ISSN</b> 1650-1942	<b>Antal sidor:</b> 40s.	
<b>Distribution enligt missiv</b>	<b>Pris:</b> Enligt prislista	

<b>Issuing organization</b> FOI – Swedish Defence Research Agency Weapons and Protection SE-147 25 Tumba	<b>Report number, ISRN</b> FOI-R--1432--SE	<b>Report type</b> User report
	<b>Programme Areas</b> 5. Strike and protection	
	<b>Month year</b> December 2004	<b>Project no.</b> E 2003
	<b>Subcategories</b> 51 Weapons and Protection	
	<b>Subcategories 2</b>	
<b>Author/s (editor/s)</b> Lena Sarholm Ann Kjellström Marita Wanhatalo Dennis Menning Erik Holmgren	<b>Project manager</b> Lena Sarholm	
	<b>Approved by</b>	
	<b>Sponsoring agency</b> Swedish armed forces	
	<b>Scientifically and technically responsible</b>	
<b>Report title (In translation)</b> Annual report for the project Land Mine System: Detection and neutralisation		
<b>Abstract (not more than 200 words)</b> <p>This annual report gives a short description of the international development of land mine systems and sub munitions. Migration studies from mines containing TNT and related compounds from FOI test field are presented. Studies of migration and degradation of other explosives like RDX, HMX, Tetryl and PETN have started and development of methods for analysing the expected low concentration levels in soil is ongoing.</p> <p>Separation and detection of six TNT isomers and related compounds from manufactory processes have been performed with LC-MS-UV system.</p> <p>Results from studies with Bacterial biosensors are given and results from degradation of energetic materials and polymers are also given.</p>		
<b>Keywords</b> detection, analysis and degradation of explosives, bacterial biosensor		
<b>Further bibliographic information</b>	<b>Language</b> Swedish	
<b>ISSN</b> 1650-1942	<b>Pages</b> 40 p.	
	<b>Price acc. to pricelist</b>	

## Innehållsförteckning

1. Sammanfattning och nyttan för försvarsmakten .....	5
2. Inledning.....	6
3. Hotbilden.....	7
3.1 Substridsdelar och avståndsläggning .....	8
3.2 Smart Munitions: Sensor Fused Weapons (SFW).....	9
3.3 BLU-108 ”Skeet” .....	10
3.4 SMArt 155 .....	11
3.5 Motiv-3M / SPBE-D .....	11
4. Migrationsstudier.....	12
4.1 Provtagning runt skarpa minor i FOI testfält.....	12
4.1.1 Material och metoder .....	12
4.1.2 Resultat och Diskussion.....	15
4.2 Provtagning runt skarpa minor i olika jordmaterial .....	18
4.2.1 Material och metoder .....	18
4.2.2 Resultat och Diskussion.....	18
5. Detektion av minor .....	21
6. Analys av explosivämnen.....	21
6.1 Analys med vätskekromatograf-masspektrometer (LC-MS) .....	22
6.2 Analys av TNT och dess föroreningar .....	22
7. Bakteriella biosensorer .....	26
7.1 Inledning.....	26
7.2 Projektbeskrivning och tidigare uppnådda resultat .....	27
7.3 Resultat uppnådda under 2004 (till oktober).....	28
8. Nedbrytbara energetiska salter och plaster.....	31
8.1 Inledning.....	31
8.2 Nedbrytning i fält .....	31
8.3 Nedbrytning i närvaro av svampar .....	33
8.4 Accelererad åldringsstudie vid 60°C .....	35
8.5 Kompatibilitetsmätningar .....	36
8.6 Slutsatser .....	37
9. Tack.....	38
10. Konferenser, resor och artiklar .....	38
11. Referenslista .....	38
Bilaga.....	39

## 1. Sammanfattning och nyttan för försvarsmakten

I rapporten ges en presentation av den utveckling som internationellt pågår av minsystem och andra system, främst substridsdelar, som kan komma att utgöra ett hot mot svensk trupp i internationella insatser eller vid ett begränsat väpnat angrepp mot Sverige.

Vid svenskt deltagande i internationella insatser utgörs minhotet ofta av äldre, enklare och platslagda minor. Hotet kommer efterhand att kompletteras eller ersättas med modernare system. Andelen oexploderad ammunition (OXA), inklusive terroristladdningar (Improvised Explosive Device, IED), tycks öka i varje krig eller konflikt.

För att detektera explosivämnen i olika objekt kan kemiska metoder eller biologiska sensorer t ex hundar användas. De kunskaper som framkommit inom detta projekt används för att utveckla nya metoder för att analysera mycket låga halter av explosivämnen vid detektion av minor, OXA och IED. I första hand är det kemiska analysmetoder och bakteriella biosensorer som utvecklats. Genom att förbättra och sänka kemiska analysmetoders detektionsgränser finns bl a förutsättningar för att på ett bättre sätt utveckla och verifiera inlärnings- och testmetoder för explosivämnessökande hundar. Analysmetoderna är även lämpliga att använda för verifiering vid FMs miljö- och saneringsarbeten inför överlämning av skjutfältsområden till det civila samhället.

Migrationsstudier, d.v.s. studier av transport och nedbrytning av explosivämnen som läcker ut i marken från nedgrävda objekt, har genomförts för TNT och dess relaterade föreningar. Nu har motsvarande studier påbörjats för explosivämnen hexogen, oktogen, pentyl och tetryl.

Vid institutionen för biokemi och biofysik vid Stockholms Universitet pågår en studie för att med bakterier som biosensor detektera minfält. Arbetet utförs av Professor Peter Brzezinski och Dr Irina Smirnova. Naturligt förekommande jordbakterier kan ställa om sin metabolism så att den känner av explosivämnesrelaterade substanser i jorden och använda dem som föda. När bakterierna kommer i kontakt med dessa ämnen börjar bakterien att fluorescera vilket kan upptäckas genom att bestråla området med UV- ljus. Utspridning av bakterierna samt bestrålningen skulle kunna ske från till exempel en UAV. Studier om vad som händer med de utspridda bakterierna, när de gjort sin insats pågår också. Antingen dör de därför att de inte kan konkurrera med de naturliga bakterierna i området. Alternativt, och det mest sannolika, kan de muterade bakterierna göra sig av med de

manipulerade DNA-strängarna och återta sin naturliga form. Studien genomförs för trotyl (TNT) och dinitrotoluen (2,4-DNT).

En eventuell framtida användning av nedbrytbara explosivämnen (energetiska salter) i olika vapensystem kräver att det finns olika typer av detektionsteknologier även för dessa system. Genom att genomföra nedbrytningsstudier på dessa föreningar, samtidigt som forskningen och utvecklingen för att framställa dem pågår, finns förhoppning om att minska avståndet mellan vapenutvecklingen och utvecklingen av detektionsmöjligheter. Dessa ämnen kan också tänkas ingå i SAT-enheter (säkrings-, armerings och tändenhet) i framtida vapensystem för att erhålla begränsad verkanstid och undvika att oexploderad ammunition utgör ett hot i decennier. (Tilläggsprotokoll 5 till FN:s vapenkonvention från 1980 om "Explosive Remnants of War" ERW).

En studie (FramFoT) har genomförts, på uppdrag av FM, avseende framtida forskning för skydd mot landmins-system. Resultat av studien har utgjort underlag för det FM-beslut som fattats för den framtida forskningen inom minområdet. Den övervägande delen av forskningen skall fr o m 2005 bedrivs inom det så kallade MOMS-projektet (**M**ulti **O**ptisk **M**inSpaning) för detektion *av ytlagda och sidverkande minor*. En mindre del av forskningen skall ske i ett projekt kallat "Doftbild". Målet för det projektet är att erhålla långsiktig kunskapsutveckling för att kunna bedöma utvecklingen av framtida kemiska och biologiska sensorer och analyssystem samt att stödja FMs utveckling av minhundar. Övrig verksamhet i nuvarande projekt läggs ner och projektet avslutas ett år i förtid.

I denna rapport redovisas det arbete som utförts vid avdelningen Vapen och skydd under innevarande år. En slutrapport över arbetet som utförts inom projektet kommer förhoppningsvis att kunna färdigställas under första halvåret 2005.

## 2. Inledning

FOI har under ett antal år forskat inom flera teknologiområden, kemiska metoder, bakteriella biosensorer, markradar och optiska sensorer för att kunna detektera framför allt nedgrävda minor samt dold OXA. Avståndsutlagda minor, ytlagda substridsdelar, OXA och IED utgör ett hot som också måste kunna detekteras.

I dag finns det ingen enskild teknologi som kan uppnå den höga detektionsnivå som krävs framför allt vid internationella insatser och humanitär ammunitions- och minröjning. Ett sätt att öka detektionssannolikheten är att använda flera detektionsmetoder som bygger på olika teknologier. Teknologerna kan användas i samma system i så kallade multisensorsystem eller för att verifiera

varandra. Några teknologier bygger på att detektera explosivämnen som läcker ut från nedgrävda minor och dold OXA till omgivande jord och luft. Dessa kan vara kemiska metoder och biosensorer, som till exempel hundar, råttor, bin, bakterier och antikroppar.

### 3. Hotbilden

Sedan vapenkonventionen CCW (*Convention on Certain Conventional Weapons*) 1980 [1] och Ottawafördraget (även kallat *Mine Ban Treaty – MBT*) 1997 [2] har oviljan hos de stater som valt att ej gå med i någondera eller endera fördrag utgjort, utgör och kommer att utgöra en del av den nuvarande och framtida minhotbilden i världen. Samtidigt har reduktionen av världens lager av truppminor de senaste åren inneburit ett konkret minskat minhot, då tillgången till antalet minor och därmed möjligheten att använda dem minskat.

Enligt Landmine Monitor har sedan Ottawafördraget (förbud mot att utveckla, tillverka, lagerföra överföra och använda truppminor) undertecknades 1997 fram till den 12 februari 2004 totalt 68 stater förstört nära 30,5 miljoner truppminor.[3] Samtidigt har fortfarande en betydande del av världen ej visat sig ha viljan att ansluta sig (Tabell 1).

**Tabell 1** Förteckning över de 43 stater som ej undertecknat Ottawafördraget den 28 juni 2004.[4]

Världsdel	Stat/Land
Nordamerika	Kuba, USA
Sydamerika	-
Europa	Finland, Lettland, Ryssland, f.d. Jugoslavien (utom Bosnien-Herzegovina och Kroatien som undertecknat fördraget)
Afrika	Egypten, Libyen, Marocko, Somalia
Asien	Armenien, Azerbajdzjan, Bahrain, Bhutan, Kina, Georgien, Iran, Irak, Indien, Laos, Kazakstan, Nordkorea, Israel, Kuwait, Kirgizistan, Sydkorea, Libanon, Mongoliet, Burma, Nepal, Pakistan, Oman, Saudiarabien, Singapore, Sri Lanka, Syrien, Förenade Arabemiraten, Uzbekistan, Vietnam
Oceanien	Mikronesien, Palau, Tonga, Tuvalu



Bilden idag av explosiva lämningar av krig (*Explosive Remnants of War – ERW*) efter konflikter och krig blir allt mer komplicerad, då nya typer av ammunition och stridsdelar kommer i bruk på slagfälten och de ”klassiska” minfälten som känns igen från tidigare konflikter endast blir en del i en mer komplex minhotbild. Dessa nya typer av efterkrigsmiljöer påträffas exempelvis i Kuwait efter Gulfkriget 1991 samt i pågående konflikter i Afghanistan, Irak och i Tjetjenien, där även ett stort hot från terroristladdningar (*Improvised Explosive Devices – IED*) föreligger för civilbefolkningen.

Skillnaden i hotbild utgörs av minor/substridsdelar med mer avancerade funktioner än för ett par decennier sedan. Självdeaktiverings- och självdestruktionsmekanismer är idag regel för framtagna minor/substridsdelar för att taktiskt kunna utnyttja minvapnet mer effektivt än tidigare. Trots denna teknologiska utveckling är det ett faktum att felfunktionen hos de nya min- och substridsdel-systemen ofta är mycket högre i stridszonen än vad tillverkaren uppger, eller vad som uppmätts i terräng och miljöförhållanden på smått idealiserade testfält.

### 3.1 Substridsdelar och avståndsläggning

Human Rights Watch rapporterade 2002 att 33 länder producerar minst 208 olika typer av ammunition som innehåller substridsdelar, samt att 56 länder lagerför substridsdelar. Substridsdelar har använts i minst 13 länder, bland annat i f.d Jugoslavien (inklusive Kosovo), Kuwait, Afghanistan, Irak och Tjetjenien.[5]

Substridsdelar sprids i konflikter med främst avståndsläggningssystem av olika typer där man i öst, med Ryssland som den ledande tillverkaren, främst fokuserar på raketartilleri (*Multiple Rocket System – MRS*) i kalibrar från 122 mm (Grad) upp till 300 mm (Smerch), med räckvidder från 20 till 90 km (Figur 1).



**Figur 1** Ryska avståndsläggningssystem för substridsdelar i form av raketartilleri. Grad (till vänster), Smerch (i mitten) och Uragan (till höger).

Inriktningen i väst avseende avståndsutläggningssystem, med USA som ledande tillverkare, är att integrera substridsdelsystem i så många olika leveranssystem som möjligt för att få utökade valmöjligheter i en stridssituation. Räckvidden för avståndsutläggningen sträcker sig från ett par meter för mekaniska/maskinella system till över 100 mil för kryssningsmissilbaserade system. Ett par exempel på system som är i bruk idag inom den amerikanska krigsmakten ges nedan ( Figur 2).



**Figur 2** Ett par exempel på USA:s system för avståndsutläggning av substridsdelar. AGM-154/B *Joint Stand-Off Weapon- JSOW* (till vänster), CBU-89 (i mitten) och *Tomahawk Land Attack Missile- TLAM-D* (till höger).

Avståndsutläggningssystemen anpassas efter de allt mer avancerade substridsdelar som utvecklas och är under utveckling idag och man skapar olika typer av modulsystem för att dessa skall kunna implementeras i dispensrar, artilleriammunition och avancerade taktiska robotar, exempelvis det amerikanska *Army Tactical Missile System – ATACMS*. Dessa system kan i sin tur användas i befintliga utskjutnings- och leveranssystem, likt *Multiple Rocket Launch System – MLRS* och stridsflyg såsom F-15, F-16 och F/A-18. Sedan 1990-talet kan också amerikanskt strategiskt bombflyg, likt B-52, B-1B och B-2A utrustas med dessa system, men även *Unmanned Aerial Vehicles – UAV* kan bära potentiella leveranssystem för substridsdelar, vilket ett nyligen genomfört test med BLU-108 i USA, i september, 2004 visat.[6]

### 3.2 Smart Munitions: Sensor Fused Weapons (SFW)

Ett begrepp för de allt mer avancerade substridsdelar som har utvecklats sedan slutet av 1980-talet och i början på 1990-talet och som nu används eller som är redo för användning i en nära framtid är så kallade *smart munitions*. Ett känt begrepp är *Wide Area Munition – WAM*, med M93 *Advanced Hornet* som exempel, men *smart munitions* omfattar även avancerade substridsdelar, eller så kallade *sublets*, där sensorer av olika slag upptäcker mål som skall bekämpas och initierar verkansdelen. Dessa verkansdelar har ofta två separata självdestruktionsfunktioner och en självdeaktiveringsmekanism som extra åtgärd ifall de förstnämnda mekanismerna fallerar. Det är dock oklart hur känsliga dessa substridsdelar är och vilken säkringsstatus de har ifall de hittas som oexploderade objekt, eller *duds* enligt amerikansk terminologi.

Genom att passiva och/eller aktiva sensorer står för initiering av verkansdelen har en del av dessa stridsdelar (främst de substridsdelar som är avsedda för bekämpning av bepansrade fordon) fått beteckningen *Sensor Fused Weapons – SFW*. Exempel på sensorer är millimetervågsradar, IR i olika frekvensområden, akustiska och seismiska sensorer. Ett par exempel är de amerikanska *Sense and Destroy Armor – SADARM* och *Brilliant Anti-Armour Technology – BAT*. [7]

Förbättringar av befintliga *SFW*-koncept genomförs kontinuerligt för att förbättra verkansräckvidd, genomslagsförmåga och selektionsförmåga hos verkansdelen, men även kostnadsreducering, införandet av lågkänsliga sprängämneskompositioner och flerfunktionsverkan hos stridsdelen är viktiga aspekter i de så kallade *P3I*-programmen (*Pre-Planned Product Improvement*) ingående i de amerikanska vapensystemskoncepten. Ett par *Sensor Fused Weapons* är i produktion idag och används i viss utsträckning. Dessa beskrivs mer ingående nedan.

### 3.3 BLU-108 ”Skeet”

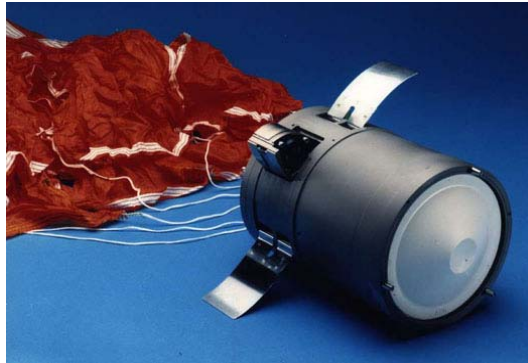
BLU-108 är ett av få så kallade intelligenta ammunitionssystem som finns i bruk i världen idag och är ett amerikanskt vapensystem som varit i produktion sedan 1992.[8] Vapensystemet är baserat på avståndsläggning med bland annat flyg, taktiska robotar, kryssningsrobotar och raketartilleri och består av en dispenser med fyra verkansdelar, kallade *skeet*. Dessa *sublets* består av en IR-sensor, elektronik, hölje, samt en RSV-verkansdel i form av en *Explosively Formed Penetrator – EFP* i tental, som ovanifrån slår hål på det bepansrade fordonshöljet (Figur 3). BLU-108 finns sedan 2001 i en förbättrad version, som innefattar bland annat multipla sensorer (aktiv/passiv IR) för detektion av mål, dubblad räckvidd för bekämpning (121 m<sup>2</sup>) och införandet av lågkänsligt plastbundet sprängämne i verkansdelen, samt en dubbelfunktion hos *EFP*-projektilen genom att den ursprungliga tantallinsen kompletterats så att en fragmentkrona ger omgivande splitterverkan.[7-9]



**Figur 1** BLU-108 med verkansdel, kallad ”Skeet”. Verkansdelen bekämpar mål ovanifrån.[8]

### 3.4 SMArt 155

SMArt 155 är ett *Sensor Fused Weapon* utvecklat i Tyskland, satt i produktion 1997 och som avståndslägg med hjälp av artilleri. En *sublet* lokaliserar och identifierar det bepansrade målet med hjälp av en IR-, radiometer- och en millimetervågradarsensor, vilka sedan initierar verkansdelen då algoritmkrakterierna uppfyllts. Om inga mål upptäcks går substridsdelen till självdestruktion. Om den fallerar skall en självdeaktiveringsmekanism träda in (Figur 4).[10, 11]

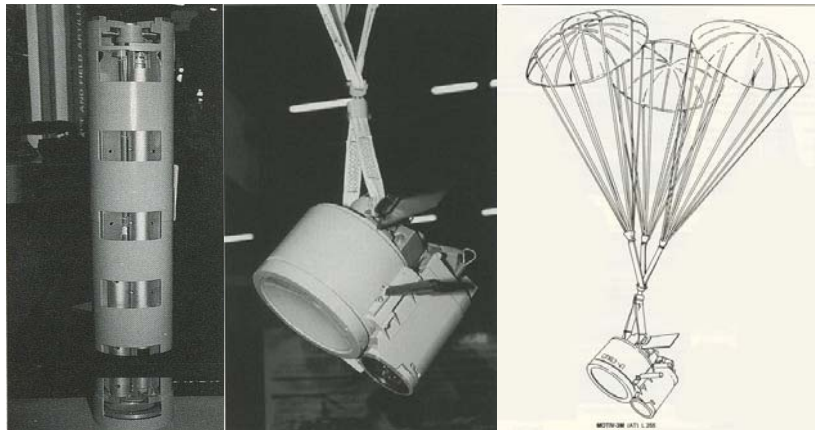


**Figur 2** Verkansdelen till SMArt 155.[10]

SMArt 155 finns i en förbättrad version, SMArt 155 PI, där bland annat verkansräckvidden utökats kraftigt, vilket bekräftats i tester gjorda under 2002.[11]

### 3.5 Motiv-3M / SPBE-D

Detta *Sensor Fused Weapon* är Rysslands svar på USA:s och Västeuropas motsvarigheter. Denna verkansdel riktar sig också mot bepansrade stridsfordon och skjuts ut med hjälp av raketartilleri (substridsdelen betecknas Motiv-3M) eller levereras i dispenserform av flyg eller attackhelikoptrar (substridsdelen betecknas då SPBE-D). Verkansdelen slår hål på fordonstaket med en *EFP*-projektil och om inget mål upptäcks med de dubbla IR-sensorerna, är det tänkt att verkansdelen skall gå till självdestruktion (Figur 5). [7, 12, 13]



**Figur 3** Den ryska varianten på SFW, som levereras med raketartilleri. Stridsdelen 9N139 (till vänster) innehållandes 5 substridsdelar. Motiv-3M (i mitten), med utfällda fallskärmar (till höger).[13]

## 4. Migrationsstudier

Migrationsstudier bedrivs för att få kunskap om vad som händer när explosivämnen läcker ut från nedgrävda minor och dold OXA. För att använda metoder som bygger på att detektera explosivämnen behövs kunskap om vilka föreningar och nedbrytningssubstanser som finns i marken runt ett objekt och vad som kan tänkas finnas i luftfasen över objektet.

I FOI testfält har därför skarpa minor utan tändare samt blinda minor placerats ut, stridsvagnsmina m/47B och truppmina, tidigare benämnd trpm 10. I enlighet med Ottawafördraget är det tillåtet att nyttja truppminor, i ett mycket begränsat antal, för forskningsändamål enbart avseende detektion. Jordprover i markytlaget omkring och i nedförslut från skarpa minor har tagits och analyserats med avseende på TNT och relaterade föreningar.

För att studera hur olika jordarter påverkar spridning och nedbrytning av explosivämnen har nedgrävda "lådor" med sju olika jordarter placerats i FOI testfält. Två st truppminor har placerats på två olika djup i varje låda (3 och 10 cm). Minorna är försedda med stödpropp i tändarhålet. Minorna har således legat i jorden lika lång tid och varit utsatta för samma typ av klimat under studien.

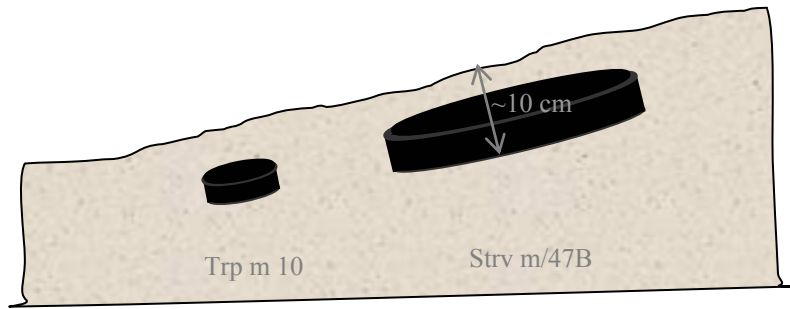
Väderstationen på FOI testfält är ur funktion på grund av ett nedslag i ett tidigare åskväder.

### 4.1 Provtagning runt skarpa minor i FOI testfält

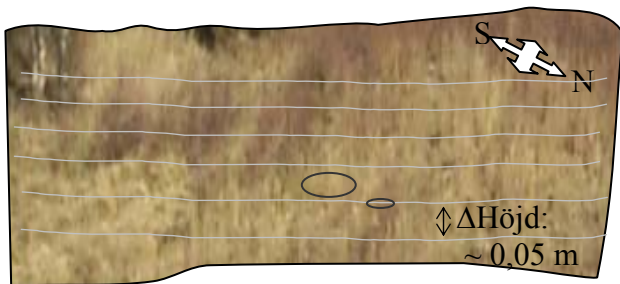
#### 4.1.1 *Material och metoder*

Minorna placerades i FOI testfält hösten 1998 och provtagningen skedde i september 2004, d.v.s. ca 6 år efter utplaceringen. Det aktuella provtagningsområdet är avsett för detektion med optiska sensorer placerade 10 m upp i en skylift, men har merutnyttjats för migrationsstudierna. Mätningar har gjorts över flera dygn vid ett antal tillfällen. Minorna har med avsikt placerats nära varandra, ca 0,5 m, för att kunna mäta om det är möjligt att detektera båda minorna med optiska sensorer (FOI-R—0066—SE). Det är viktigt att kunna detektera en truppmina som ligger nära (i skuggan av) en större mina, vilket har varit ett vanligt militärt sätt för utplacering av truppminor. Båda minorna har placerats med bottendelen på 10 cm djup. Marken där minorna är placerade är gammal jordbruksmark och lutar ca 20 cm per meter (Figur 6 och 7). Växtligheten som består av olika grässorter, tistlar och en del småväxt sly har inte röjts eller klippts under den period minorna har legat nergrävda.





**Figur 6** Schematisk skiss av minornas placering i förhållande till varandra, marken i genomskärning.



**Figur 7** Minorna är placerade där marken lutar ca 20 cm per meter. Truppminan ligger placerad nordost om stridsvagnsminan och i nedförslut i förhållande till densamma.

Båda mintyperna (Figur 8) innehåller TNT, 5,5 kg i stridsvagnsminan och 0,12 kg i truppminan, (Tabell 2). Förutom minornas storlek skiljer de sig också genom olika höljesmaterial. Stridsvagnsminans höljesmaterial är av plåt och truppminans hölje består av konstgummi och fenolhårdplast. Båda minorna är utlagda i fältet med stödpropp, dvs utan tändare.



**Figur 8** Stridsvagnsmina m/47B med trycklock och truppmina 10 med säkringshuv och stödpropp.

**Tabell 2** Data för minorna

	<b>Strv m/47B</b>	<b>Trpm 10</b>
Diameter	345 mm	80 mm
Höjd (minkropp)	60 mm	30 mm
Höjd med tändsystem	100 mm	30 mm
Höljesmaterial	Plåt	Gummi + plast
Total vikt	9,5 kg	0,2 kg
Sprängämne	Trotyl	Trotyl
Sprängämnets vikt	5,5 kg	0,12 kg
Tändsystem	Trycklock	Tryckutlösare

Markprov har tagits i ytskiktet över, i nära anslutning omkring och i nedförslut från minorna. Efter avslutad provtagning i ytskiktet blottades minorna och lyftes ur sina positioner för att provtagning av jord skulle kunna ske under minorna. Varje prov omfattade cirka 10 till 20 ml material (1 ml=1 cm<sup>3</sup>). Av detta material användes ca 1 g för att bestämma torrhalten i provet, torrsubstansen (TS), och ca 1 g användes för att bestämma halten av TNT och relaterade föreningar.

Analys av TNT och relaterade föreningar ur jordprov gjordes med hjälp av den av FOI framtagna extraktions- och analysmetoden för dessa föreningar (FOI-R—0923—SE). Markproven har analyserats med avseende på de i Tabell 3 angivna föreningarna. Detekterade halter anges i nanogram per gram torrsubstans (ng/g TS), dvs 10<sup>-9</sup> gram av den detekterade föreningen per gram torrt provmaterial. Föreningarna markeras också av färgkoder, (Figur 9) och area samt sifferangivelse som anger detekterad halt. För att försöka skapa en överskådlig bild av mönstret av TNT och relaterade föreningar presenteras data på detta sätt. Tanken är att läsaren skall kunna jämföra olika areor och fäger och bilda sig en uppfattning om de olika mönster av föreningar och halter som detekterats. Observera att de färgade fälten anger inte den exakta positionen där föreningen detekterats utan snarare området för detektion i förhållande till minan.

**Tabell 3** TNT och relaterade föreningar.

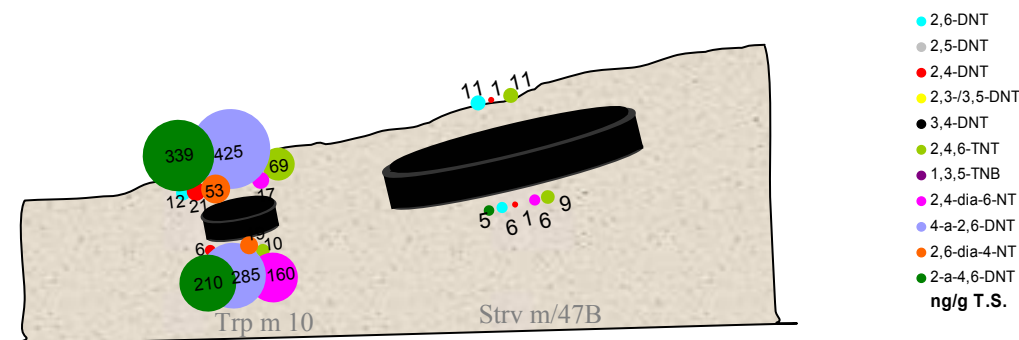
<b>Ämne</b>	<b>Förkortning</b>	<b>Kommentar</b>
2,4,6-Trinitrotoluen	2,4,6-TNT	Huvudkomponent som bildas vid tillverkning av explosivämnet trotyl. I dagligt tal refererad till som trotyl eller TNT.
2,6-Dinitrotoluen	2,6-DNT	Biprodukt som kan bildas vid tillverkning av TNT.
2,5- Dinitrotoluen	2,5-DNT	Biprodukt som kan bildas vid tillverkning av TNT.
2,4- Dinitrotoluen	2,4-DNT	Biprodukt som kan bildas vid tillverkning av TNT.
2,3- Dinitrotoluen	2,3-DNT	Biprodukt som kan bildas vid tillverkning av TNT.
3,4- Dinitrotoluen	3,4-DNT	Biprodukt som kan bildas vid tillverkning av TNT.
3,5- Dinitrotoluen	3,5-DNT	Biprodukt som kan bildas vid tillverkning av TNT.

1,3,5-Trinitrobensen	1,3,5-TNB	Biprodukt som kan bildas vid tillverkning av TNT.
2-Amino-4,6-Dinitrotoluen	2-a-4,6-DNT	Nedbrytningsprodukt efter påbörjad bakteriell nedbrytning av TNT.
2,4-Diamino-6-Nitrotoluen	2,4-dia-6-NT	Nedbrytningsprodukt efter fortsatt bakteriell nedbrytning av TNT.
4-Amino-2,6-Dinitrotoluen	4-a-2,6-DNT	Nedbrytningsprodukt efter påbörjad bakteriell nedbrytning av TNT
2,6-Diamino-4-Nitrotoluen	2,6-dia-4-NT	Nedbrytningsprodukt efter fortsatt bakteriell nedbrytning av TNT

#### 4.1.2 Resultat och Diskussion

Detekterade föreningar i jordprov tagna över och under stridsvagnsminan och truppminan visas i (Figur 9). I prov taget i markskiktet rakt över stridsvagnsminan detekterades låga nanogramhalter ( $10^{-9}$ g) av 2,4,6-TNT och 2,6-DNT samt 2,4-DNT. Under samma mina var halten av detekterade föreningar i samma låga nivå som i provet över minan men här detekterades fler föreningar. Under stridsvagnsminan har förutom 2,4,6-TNT, 2,6-DNT och 2,4-DNT även 2,4-dia-6-NT och 2-a-4,6-DNT detekterats. De förstnämnda föreningarna är huvudsprängämnet samt biprodukter som uppstår vid tillverkningen. De sistnämnda två föreningarna, de s.k. aminoföreningarna, är nedbrytningsprodukter från 2,4,6-TNT.

Över truppminan detekterades 2,4,6-TNT, biprodukterna 2,6-DNT och 2,4-DNT samt de biologiska nedbrytningsprodukterna 2-a-4,6-DNT, 2,4-dia-6-NT, 4-a-2,6-DNT och 2,6-dia-4-NT. Under minan återfanns 2,4,6-TNT och 2,4-DNT samt de biologiska nedbrytningsprodukterna. Över och under truppminan detekterades betydligt högre halter av de biologiska nedbrytningsprodukterna än i samma positioner vid stridsvagnsminan. Även TNT och 2,4-DNT återfinns i en högre halt vid truppminan än stridsvagnsminan.



**Figur 9** 2,4,6-TNT och relaterade föreningar detekterade i jordprov över och under stridsvagnsminan och truppminan (båda med blind tändare).



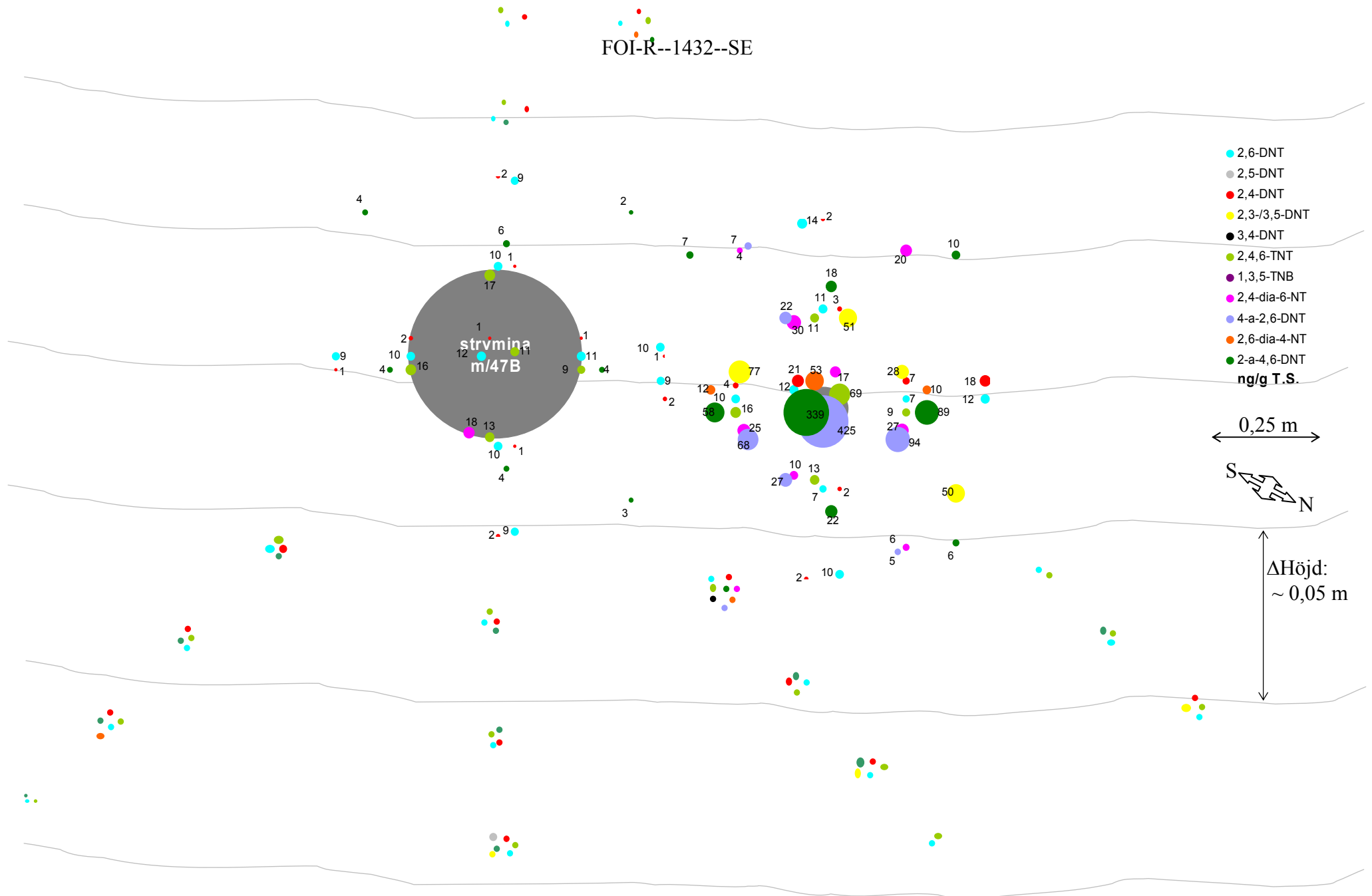
Figur 10 visar resultat från prov tagna i ytskiktet över, runtomkring och nedanför minorna. I proven tagna omkring truppminan kan samma mönster med högre halter och fler föreningar skönjas som i proven över och under de båda minorna, d.v.s. högre halter och fler föreningar omkring truppminan än omkring stridsvagnsminan. I prov tagna i ytskiktet av marklagret i slutningen ovanför och nedanför minorna har i övervägande antal prov detekterats 2,4,6-TNT, 2,6-DNT, 2,4-DNT samt 2-a-4,6-DNT (i koncentrationer  $10^{-9}$ g/g torrsustans). Resultatet tyder på att det finns en kontaminering av bakgrunden på detta område av fältet. Eftersom det finns fler minor placerade i detta område kan en möjlig anledning vara att små kontaminerade partiklar spridas med vinden. Närvaron av en detekterbar mängd av den biologiska nedbrytningsprodukten 2-a-4,6-DNT indikerar att en ständig nedbrytning av 2,4,6-TNT sker. Fler prov bör därför tas på andra ställen runt omkring testfältet för att klargöra hur bakgrunden ser ut. Dock kan inte denna bakgrundsnivå detekteras i den del av fältet där lådor med olika jordarter är placerade.

I truppminans närhet kan ett tydligt mönster urskiljas från bakgrunden. Det mönster som TNT och relaterade föreningar bildar i truppminans närhet är en tydlig indikation på en innesluten TNT-källa i ett genomsläppligt hölje. Närvaron av DNT indikerar att källan är military grade TNT och de höga halterna av biologiska nedbrytningsprodukter av TNT (aminoföreningarna) tyder på att det finns någon slags barriär som är genomsläpplig men ändå ”bromsar” upp migrationen av TNT ut från källan.

Om det inte funnits någon barriär mellan TNT-källan och den omgivande marken hade TNT migrerat ut i den omgivande jorden i så höga koncentrationer att området i minans absoluta närhet blivit förgiftat. Denna förgiftning innebär att migrationsmönstret av TNT och relaterade föreningar runt minan blir helt förändrat på grund av att markens organismer inte maktar med att bryta ned TNT lika fort som det tillkommer nytt.

Koncentrationen och närvaron i markyttskiktet av TNT och relaterade föreningar omkring stridsvagnsminan är i samma nivå som koncentrationen av de ämnen som är detekterade i slutningen ovanför samt nedanför, varför något mönster av dessa ämnen ej kan peka ut stridsvagnsminans närvaro. Genom stridsvagnsminans metallhölje diffunderar inga molekyler, läckage av sprängämnet sker genom skarvar och håligheter t ex för tändare. Genom truppminans plast- och gummihöljen diffunderar olika mängder av sprängämnet, mest diffunderar det genom gummihöljet.

De ovan beskrivna mönstren av migrerande föreningar från dessa minor visar tydligt på nödvändigheten i att kombinera system för detektion, i detta fall t.ex. minhund och metalldetektor.



Figur 10 2,4,6-TNT och relaterade föreningar detekterade i jordprov runt och nedanför stridsvagnsmina m/47B och truppmina 10 (båda med blind tändare).

## 4.2 Provtagning runt skarpa minor i olika jordmaterial

### 4.2.1 Material och metoder

Nedgrävda ”lådor” med sju olika jordarter har placerats i FOI testfält för att bedriva migrationsstudier av TNT som läcker ut från minor. De olika jordarterna har placerats i testfältet genom att rektangulära gropar, ca 0,6 m djup, 2,4 m längd och 1,2 m bredd, har klätts in med markduk och fyllts. 1998 placerades TNT-block av gjuten military grade TNT direkt i de olika jordarterna. Det visade sig efter ett tag att för höga halter TNT läckte ut till omkringliggande jordmaterial. Analyser gjorda på jordprov tagna i testfält utomlands visade att läckage och migration av TNT från en innesluten TNT-kropp placerad i jord inte kan jämföras med läckage från en laddning utan höljesmaterial. 1999 avbröts försöket och lådorna grävdes ur och ny installation av jordmaterial påbörjades.

År 2001 placerades två stycken truppminor (Figur 8) med stödpropp i tändarhålet, ut på 3 respektive 10 cm djup i varje jordart (från minans övre del till jordytan). Jordtyperna är fin och grov sand, fin och grov morän, lera, laterit och magnetit. Provtagning har utförts fyra gånger under sommarhalvåret 2004. Proven har tagits rakt över minan, ca 10 cm från minans kant (markerat med den inre grå ringen i Figur 11-18) samt ca 20 cm från minans kant (yttre grå ring). Totalt har 9 st prov tagits/mina vid varje provtagningstillfälle. Provtagning och analys har skett på samma sätt som finns beskrivet i 4.1.1. Resultaten redovisas här på samma sätt som i 4.1.2, dvs med färgkoder och areor som motsvarar dess inbördes skillnad i koncentration.

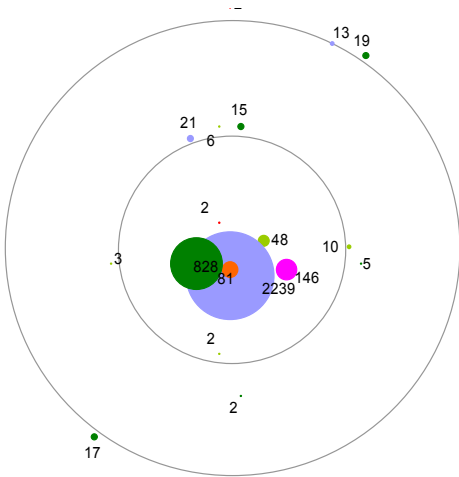
Alla jordprov har placerats i bruna glasvialer (40 ml) som förslutits med skruvlock med teflonpackning för att hålla tätt. De har förvarats i frys (-18°C) till dess analyser har kunnat utföras. Orsaken till detta är att bromsa hastigheten av den biologiska nedbrytningen som pågår i jorden. Mörka vialer minskar den nedbrytning av sprängämnet som sker genom UV-ljuset. Tidigare studier har påvisat att detta förfarande bäst bevarar provet så att halterna av ingående substanser är jämförbara med halterna vid provtagningstillfället.

### 4.2.2 Resultat och Diskussion

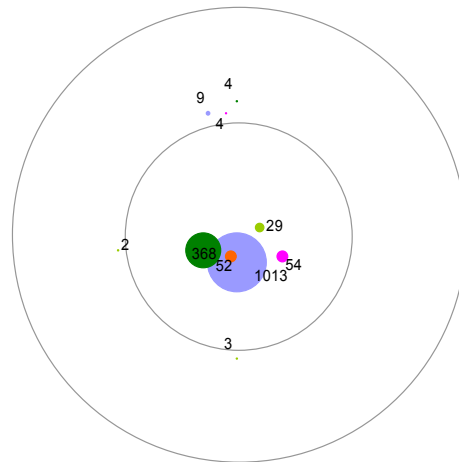
Detekterade föreningar i jordprov över och runt omkring minorna i fin och grov sand visas i Figurer 11-18. Proven är tagna i maj, juni och augusti 2004. Prov har även tagits i laterit, magnetit, lera och morän men dessa analyser är inte helt klara vid tidpunkten för denna rapport. På grund av detta redovisas endast delresultat från årets migrationsstudier i olika jordmaterial.

I prov tagna över minorna i fin sand har låga koncentrationer spårats av 2,4,6 TNT och 2,4 DNT samt nedbrytningsprodukterna 2,4-dia-6-NT, 2,6-dia-4-NT, 4-a-2,6-DNT och 2-a-4,6-DNT. Höga halter återfinns av monoaminoföreningarna (4-a-2,6-DNT och 2-a-4,6-DNT).

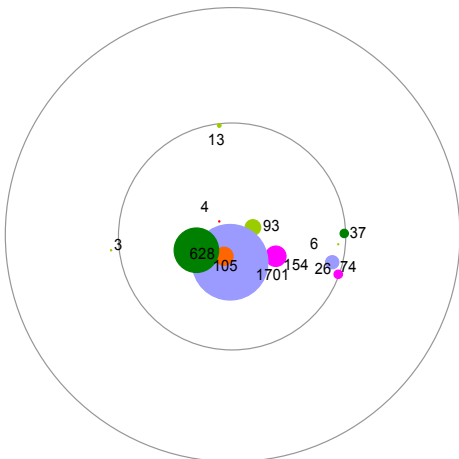
I prov tagna i grov sand vid samma tidpunkter återfinns endast mycket låga koncentrationer av 2,4,6-TNT. I provet taget i augusti återfinns dock både 2,4,6-TNT och monoaminoföreningarna.



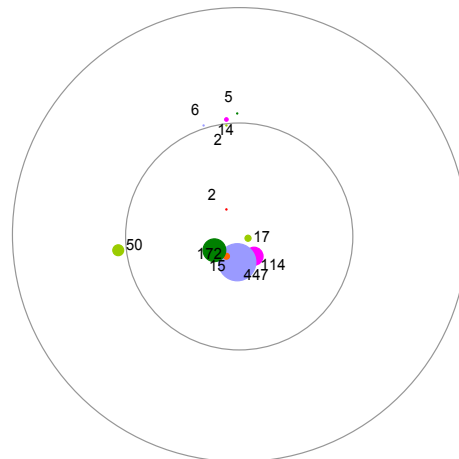
**Figur 11** Fin sand 2004-05-26



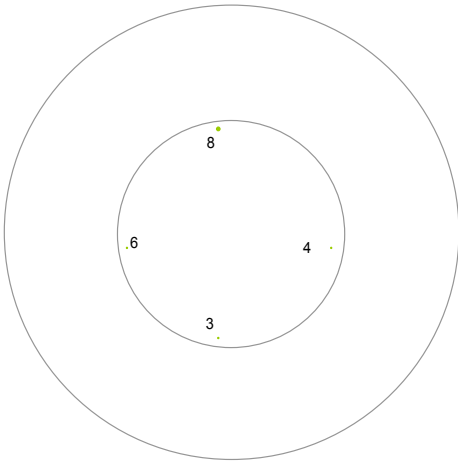
**Figur 12** Fin sand 2004-06-17



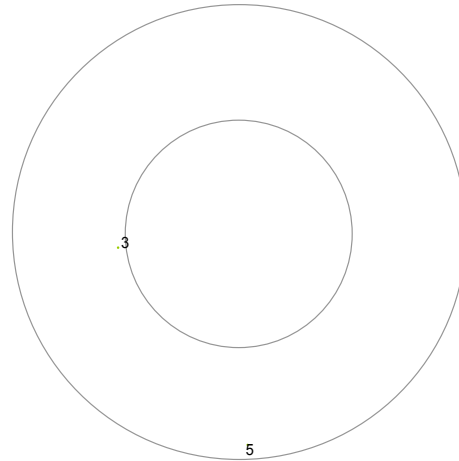
**Figur 13** Fin sand 2004-06-23



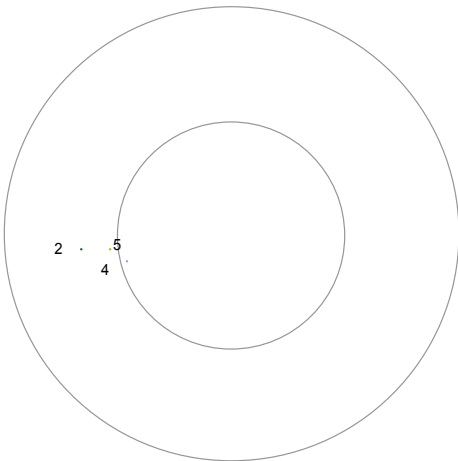
**Figur 14** Fin sand 2004-08-04



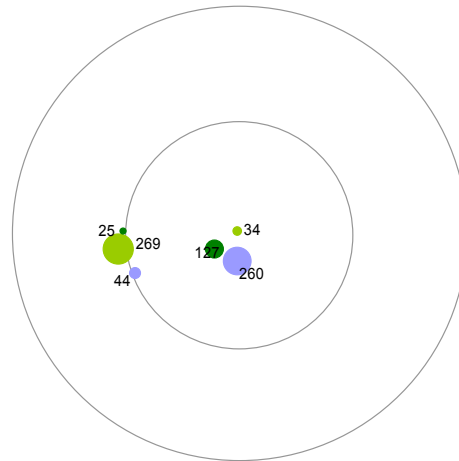
**Figur 15** Grov sand 2004-05-26



**Figur 16** Grov sand 2004-06-17



**Figur 17** Grov sand 2004-06-23



**Figur 18** Grov sand 2004-08-04

Den gemensamma migrationsbilden i fin sand visar att de högsta halterna detekteras i prov tagna rakt över minan. Där återfinns fler föreningar och i högre koncentrationer än i grov sand. En tänkbar orsak kan vara att den totala ytan (arean) som är tillgänglig för adsorption är mycket mindre i grov sand än i fin sand. Dessutom är hålligheterna i den grova sanden större än i den fina sanden. Detta kan resultera i en ökad migrations- och nedbrytningshastighet för dessa föreningar. De högre halterna i grov sand i augusti månad (Figur 18) kan eventuellt förklaras av ändrade väder-förhållanden som skapat bättre förutsättningar för adsorption av dessa föreningar till sandmatrisen. I övrigt visar den totala migrationsbilden av truppminan i dessa två matriser, på en ständig förändring och att den är matrisberoende eftersom övriga parametrar som placering, tid, och miljö/klimat är samma.

## 5. Detektion av minor

Det är naturligt att använda explosivämnesdetektorer som en typ av sensor vid ammunitions- och minröjningsarbete. Explosivämnet är det som är gemensamt för farliga objekt, och skiljer ett farligt objekt från ett ofarligt. För att använda kemiska eller biologiska sensorer, till exempel hundar, att detektera minor och annan dold ammunition måste det finnas något som kan detekteras och kunskap om vad detta är.

Fram till i år har inriktningen i projektet varit att detektera TNT och relaterade föreningar eftersom TNT är det sprängämne som förekommer mest i de minor som finns utlagda idag. Nu är kunskapen om vad som händer när TNT och dess explosivämnesrelaterade föreningar (ERS) läcker ut i jorden ganska god. Modernare minor och ammunition kan innehålla andra sprängämnen såsom hexogen, tetryl, pentyl och oktogen. Därför har i år studier påbörjats för att få kunskap om vad som händer när dessa sprängämnen läcker ut i jorden och om de kan detekteras i luft- och partikelfaserna.

Dessa sprängämnen har lägre ångtryck än TNT vilket kan betyda att diffusionen (permeation) genom minihöljen skiljer sig från hur TNT diffunderar. Vilka processer som startar mellan de nu studerade explosivämnena och olika jordarter vet vi inte ännu. Pressade tabletter har placerats i en liten plastbehållare som sedan har placerats i sand i exikatorer. Prover har också placerats ut i de olika jordarter som finns på FOI testfält.

Flera väderfaktorer påverkar substansernas rörelser och koncentrationer från markytan till gränsskiktet närmast markytan (jord - atmosfärskiktet). Man vet att skillnader i temperatur mellan mark och luft har stor påverkan på vertikal luftrörelse i gränsskiktet. Om marktemperaturen är högre än luftens temperatur blir gränsskiktet ostabilt genom så kallad minitermik och molekylerna i gränsskiktet späs ut, ju större skillnad desto större påverkan. Är temperaturen i marken däremot lägre än luftens dras molekylerna in i gränsskiktet. Dessutom påverkar vindhastigheten gränsskiktets tjocklek, hög hastighet minskar tjockleken och utspädningen av molekylerna ökar. [14]

## 6. Analys av explosivämnen

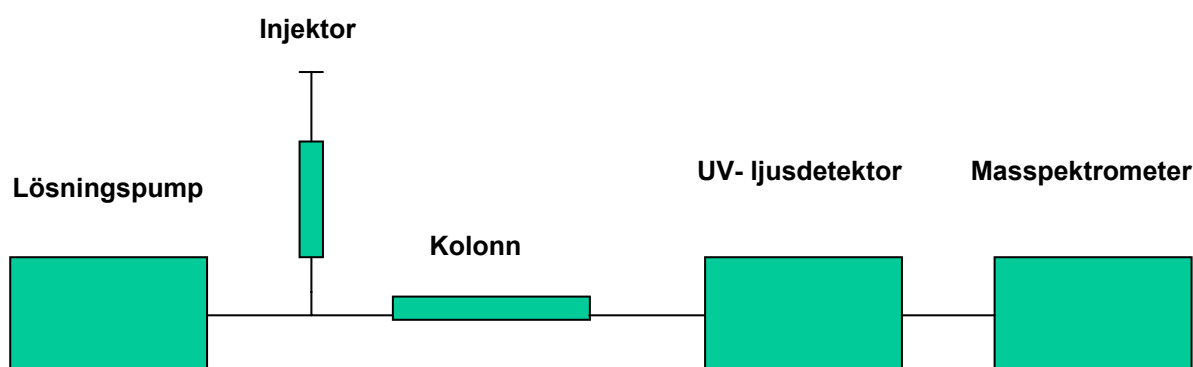
För att kunna detektera de mycket låga koncentrationerna av trotyl och relaterade substanser som förekommer i jord-, luft-, och vattenfas, har förbättrade upparbetnings- och analysmetoder utvecklats. Arbete pågår nu för att kunna detektera andra explosivämnen som hexogen, pentyl, och tetryl. Tabell 4 visar ångtrycket (Vapour pressure) för några explosivämnen. Som synes skiljer sig dessa explosivämnens ångtryck markant från TNT och DNT, vilket betyder att färre molekyler lämnar explosivämnet till omgivande matriser.

**Tabell 4** Ångtrycket vid olika temperaturer

	Ämne	Ångtryck vid 25°C	100°C	200°C
1	TNB		0,5 mbar (122°C mp.)	14 mbar
2	Hexogen	0,000061 mbar	0,00054 mbar (110°C)	0,0053 mbar (139°C)
3	Oktogen		0,000003 mb	
4	TNT	0,077 mbar	0,14 mbar	14 mbar
5	2,4-DNT	0,014 mbar (35°C)	0,83 mbar	50,5 mbar
6	Tetryl		0,000076 mbar	
7	Pentyl	0,00019 mbar	0,0011 mbar (97°C)	0,094 mbar (139°C)

### 6.1 Analys med vätskekromatograf-masspektrometer (LC-MS)

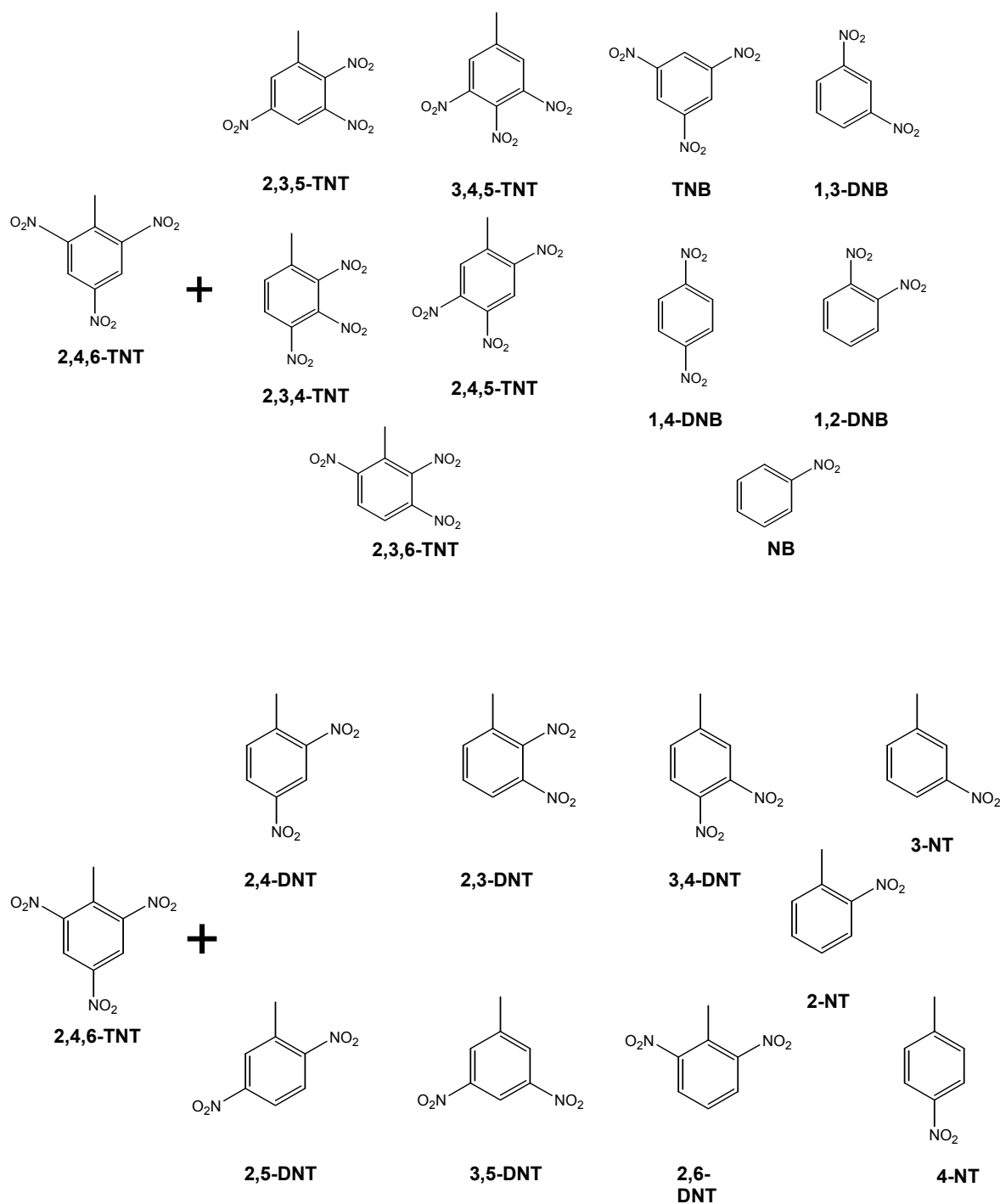
Inom projektet har en tidigare utvecklad analysmetod modifierats i syfte att detektera flera explosivämnen som är och kommer att vara intressanta vid detektion av nedgrävda minor och dold OXA. Med den modifierade metoden ges möjligheten att jonisera TNT, TNT-relaterade föreningar, hexanitrostilben (HNS), hexogen (RDX), oktogen (HMX), pentyl och CL 20, vilket gör det möjligt att uppnå separation och detektion av de individuella föreningarna i olika provmatriser. Den nya analysmetoden kan användas som en allmän analysmetod för att detektera de flesta explosivämnen som förekommer i olika matriser såsom jord, vatten och luft i samband med detektion av minor och OXA. Metoden kan också användas för verifieringsanalys av rena explosivämnen, t.ex. av explosivämnesprov från olika objekt samt för bestämning av föroreningar i explosivämnen. I Figur 19 visas en schematisk bild på den utrustning som används för analyser.

**Figur 19** Schematisk bild över den befintliga HPLC-UV-MS utrustningen

### 6.2 Analys av TNT och dess föroreningar.

2,4,6-TNT kan syntetiseras och uppenas med flera olika metoder varvid metods specifika biprodukter och föroreningar bildas (Figur 20). Ett användningsområde är att kunna spåra olika tillverkare av TNT. En förutsättning är dock att man har ett referensbibliotek att jämföra med.

Vidare kan dessa föreningar vara viktiga vid träning och användning av explosivämnessökande hundar. Miljöanpassningen av minhundar i olika internationella insatser kan vara av största vikt då doftbilderna hos de olika TNT-producenternas produkter kan ha betydelse för hundens möjlighet att hitta TNT. Skillnaderna mellan olika tillverkares TNT åskådliggörs i Figur 21-22. Hundarna bör därför ges tillfälle att träna på den typ av explosivämnen som förekommer i ett missionsområde.

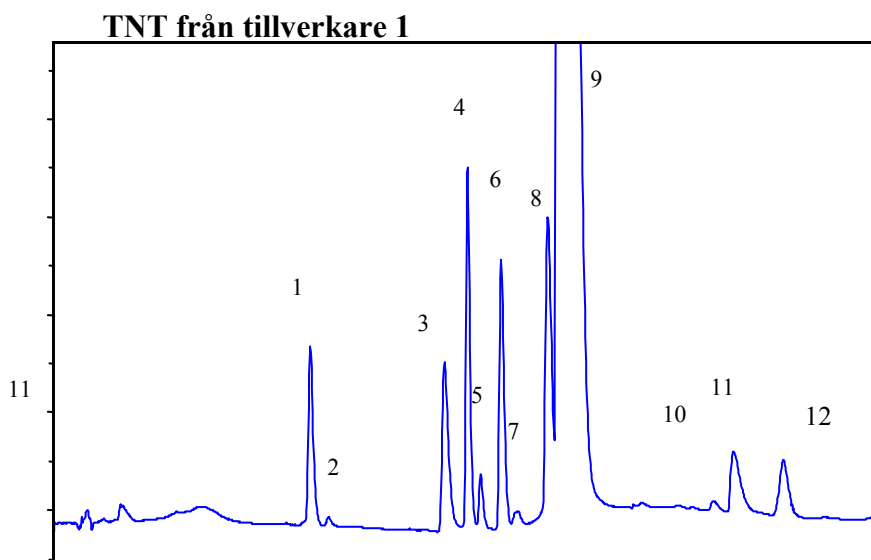


Figur 20 Olika föreningar som bildas vid tillverkning av 2,4,6-TNT



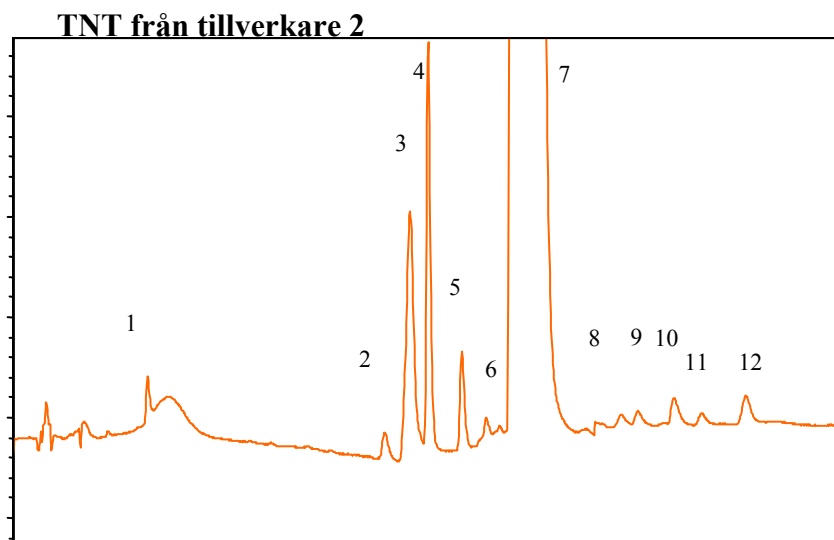
Nedan visas två kromatogram för TNT tagna från olika tillverkare. Här syns tydligt att de innehåller olika föreningar som härstammar från respektive tillverkningsprocess samt en del ännu inte identifierade substanser. Hur detta påverkar den doftbild som härrör från sprängämnet i olika objekt är ännu inte känt.

Elueringsordning	Förkortning
1	2,6-DNT
2	2,3 DNT
3	Unknown
4	2,3,6-TNT
5	2,4,5-TNT
6	2,3,4-TNT
7	2,5-DNT
8	2,4-DNT
9	2,4,6-TNT
10	TNB
11	Unknown
12	Unknown



**Figur 21** HPLC-UV kromatogram från analys av military grade TNT. Notera den stora toppen 2,4,6-TNT.

Elueringsordning	Förkortning
1	1,2-DNB
2	4-amino-2,6-DNT
3	1,4-DNB
4	2,3,6-TNT
5	2,3,4-TNT
6	Unknown
7	2,4,6-TNT
8	Unknown
9	Unknown
10	TNB
11	Unknown
12	Unknown

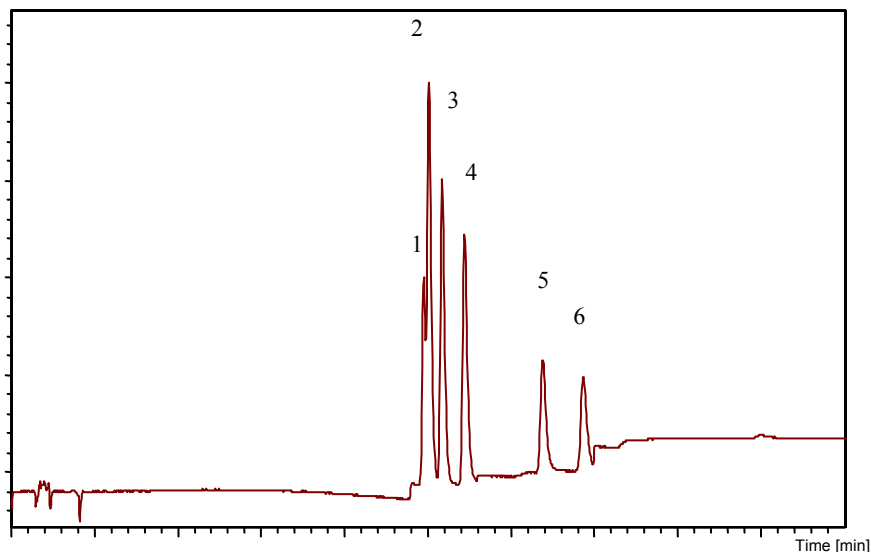


**Figur 22** HPLC-UV kromatogram från analys av military grade TNT. Notera den stora toppen 2,4,6-TNT.

För att på ett enkelt och snabbt sätt undersöka en okänd laddning eller prov har en ny HPLC-UV analysmetod tagits fram. Finns ingen masspektrometer tillgänglig kan en UV-detektor användas. Detektionsgränserna för dessa ämnen ligger i området 0,5 – 9,9 ng/analys. Om istället en

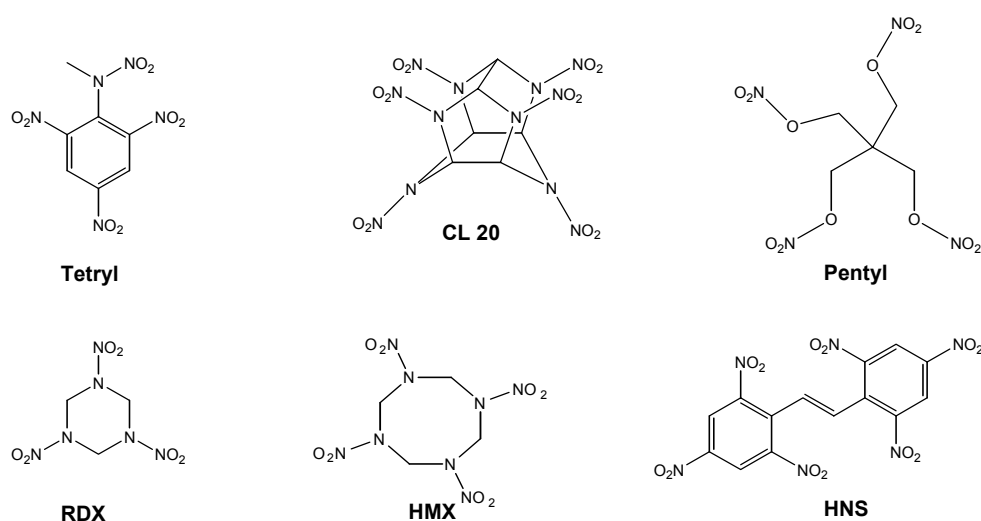
masspektrometer används som detektor ligger detekteringsgränserna i området 0,3 – 78 ng/analys. Nedan visas ett kromatogram där TNT:s sex olika isomerer har separerats.

Elueringsordning	Förkortning
1	3,4,5-TNT
2	2,3,6-TNT
3	2,4,5-TNT
4	2,3,4-TNT
5	2,4,6-TNT
6	2,4,6-TNT



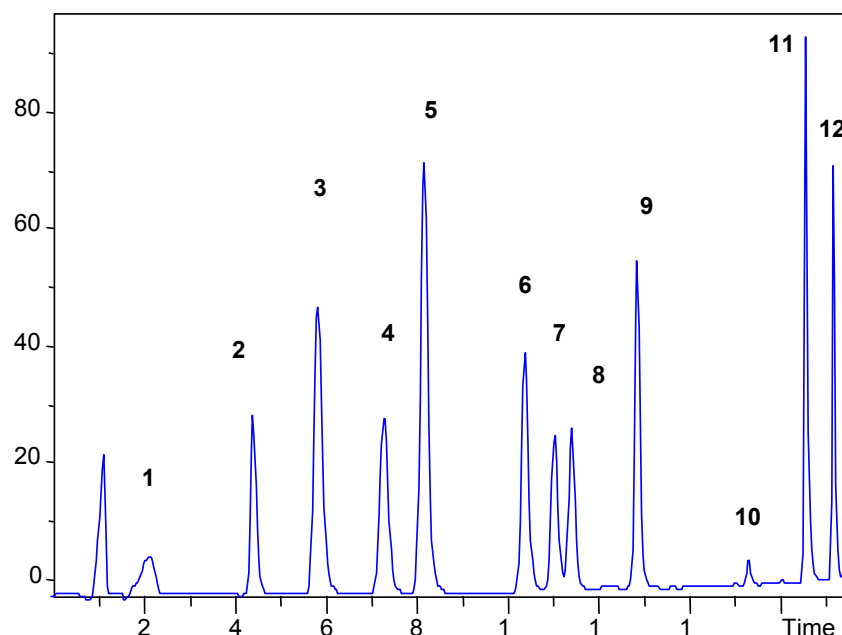
**Figur 23** HPLC-UV kromatogram från analys olika isomerer av TNT. Referensprov.

Utvecklingsarbetet pågår för att förbättra detektionsnivåerna för RDX, HMX och tetryl samt att detektera pentyl och hexanitrostilben (HNS) vilka inte tidigare har kunnat analyseras med LC-MS. Arbete pågår också för att reducera analysiden och har nu reducerats från 45 min till 15 min med bibehållen separation av de ingående substanserna. Pentyl och HNS kan i dagsläget analyseras genom att kolonnens mobilfaskkomposition i har optimerats. Nedan visas de kemiska strukturerna för de explosivämnen som nu studeras liksom en tabell med de detekteringsgränser som för närvarande är aktuella.



**Figur 24** Andra förekommande explosivämnen förutom 2,4,6-TNT.

Elueringsordning	Förkortning
1	FOX 7
2	TNAZ
3	TNB
4	RDX
5	HMX
6	TNT
7	2,4 DNT
8	2,6 DNT
9	Tetryl
10	Pentyl (PETN)
11	CL 20
12	HNS



**Figur 25** HPLC-UV kromatogram från analys av några vanligt förekommande explosivämnen och relaterade substanser.

## 7. Bakteriella biosensorer

### 7.1 Inledning

En studie för att detektera minfält med hjälp av bakterier pågår. Det är ett helt nytt angreppssätt att försöka få naturligt förekommande bakterier att ställa om sin metabolism så att den känner av explosivämnesrelaterade substanser i jorden. När bakterien kommer i kontakt med dessa ämnen börjar de fluorescera och kan detekteras vid belysning med UV-ljus.

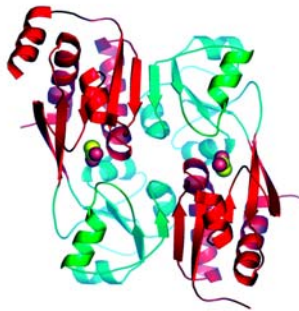
Den metod som för närvarande utvecklas i detta projekt bygger på användning av naturliga bakterier för att detektera förekomsten av landminor i mark. Metoden bygger på att bakterier har en förmåga att mycket snabbt anpassa sig till nya livsvillkor. Om ett nytt ämne introduceras i en viss miljö och detta ämne kan utnyttjas av bakterien som föda, kommer bakterierna att snabbt ställa om sin metabolism på ett sådant sätt att det nya ämnet kan tas upp, brytas ner och infogas i bakteriens ämnesomsättning. Detta åstadkommes genom produktion av biologiska katalysatorer, enzymer, som är proteiner som assisterar vid nedbrytning av den organiska substansen. Syntesen av dessa enzymer startar först då de kemiska föreningar som bakterien är "intresserad av" uppträder i naturen där bakterien lever. För att åstadkomma detta måste det finnas en regulatormekanism som kan initiera produktionen av dessa enzymer.

När en organisk kemikalie från omgivningen kommer in i bakterien binds den till ett regulatorprotein, vilket orsakar en förändring i proteinets form och aktiverar detta. Under aktiveringen binds det till en specifik plats på DNA-matrisen i bakterien, vilket initierar

inläsningsprocessen och resulterar i syntetisering av ett passande enzym som används för att bryta ner den organiska föreningen. I det aktuella projektet har den DNA-matris som är ansvarig för syntes av nedbrytningsenzymet ersatts av en DNA-matris som kodar för ett grönt fluorescerande protein (GFP). I detta fall kan den "lurade" bakterien starta en syntes av grönt fluorescerande protein när den känner av den organiska föreningen, och bilda gröna fläckar på t.ex. en substans som kommer från ett sprängämne. Fluorescensen kan därefter detekteras med hjälp av UV-ljus.

## 7.2 Projektbeskrivning och tidigare uppnådda resultat

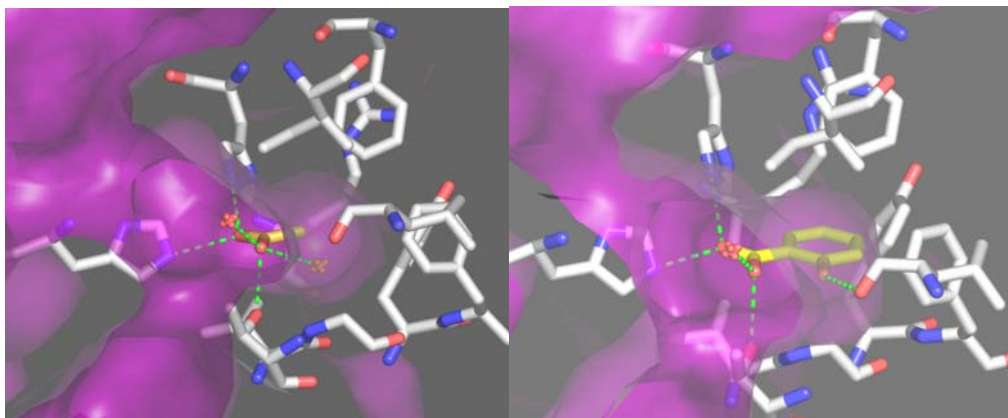
Den sensor som för närvarande utvecklas är baserad på ett helcellsystem (fluorescerande bakterier). Ett viktigt delmål i projektet är att förbättra strukturen av ett naturligt regulatorprotein (DntR) i jordbakterien *Burkholderia DNT*. Detta protein sitter bundet till en DNA-sträng och det används av bakterien för att känna igen t.ex. DNT och TNT. Det ämne som skall brytas ner (substratet, som i detta fall är t.ex. DNT) binder till en specifik ficka i regulatorproteinet (DntR). Vid bindning förändras sensorproteinets struktur, vilket leder till att syntesen av det fluorescerande proteinet aktiveras. För att optimera specificiteten för bindning av t.ex. DNT och öka känsligheten måste substratbindningsfickan i DntR förändras så att DNT binder starkt och så att andra substrat binder mycket svagare. Problemet angreps genom att bestämma strukturen för DntR och sedan på ett rationellt sätt modifiera substratbindningsätet. När strukturen är känd kan man modellera olika substrat i bindningsätet och bestämma vilka aminosyrarester som måste bytas ut för att optimera bindning för DNT, samtidigt som man undertrycker bindning av andra, oönskade substrat.



**Figur 26** Strukturen för DntR. Bilden visar två DntR-molekyler där varje molekyl består av en röd och en grön "domäner".

Två typer av kristaller av DntR har erhållits (Nativ 1 och Nativ 2). Dessa kristaller preparerades från en acetat- respektive en tiocyanatinnehållande lösning. Båda kristallformerna gav samma proteinstruktur. DntR visade sig vara uppbyggt av en dimer där de två monomererna är ordnade i en antiparallell geometri (Figur 26). Strukturen visar att substratbindningsdomänen består av två delar, där aminosyrorna 90-166 och 274-301 utgör den första domänen och aminosyrorna 171-269

den andra domänen. Domänerna är förbundna via en flexibel del som består av aminosyraresterna 167-170 och 270-273. Den relativa orienteringen av domänerna i förhållande till varandra är stabiliserad via ett antal interaktioner, framförallt av saltbryggor mellan H228 och D105 samt mellan R248 och E300.



**Figur 27** Acetat inne i bindningsfickan i DntR. Acetat visas i gult. Syre- och kväveatomer visas i rött respektive blått. Gröna linjer visar vätebindningar.

**Figur 28** Modell av salicylat i substratbindningsfickan. Salicylat visas i gult. Andra atomer är färgade som i Fig. 27

Gångar som leder till kaviteter i proteinets inre finns i gränsytan mellan de båda domänerna i varje DntR monomer. Vid ingången till kaviteterna är ytan huvudsakligen hydrofil, medan den inuti kaviteten är framförallt hydrofob. Dessa kaviteter innehåller acetat och tiocyanat i respektive kristallformer. Funktionella studier visar att dessa kaviteter är just de som binder DNT och är alltså proteinets substratbindningssäte. I nativ 1-kristaller finns en acetat i var och en av de båda bindningssätena i dimeren (Figur 27). I Nativ 2-kristallerna innehåller var och en av dimerens kaviteter en tiocyanatjon, som binder något djupare ner i kaviteten än acetat, men som binder via liknande interaktioner.

Strukturen visar att fickan kan binda även mycket större substrat än acetat och tiocyanat. Med utgångspunkt från de erhållna strukturerna kunde man därför modellera in salicylat i kaviteten (Figur 28). Tidigare studier visade att bakterien är känslig just för detta substrat. Modellen visar att salicylat binder på liknande sätt som acetat, men salicylat binder via fler hydrofoba interaktioner. Modellen visar också att salicylat kan binda till DntR utan att dess bindningsficka behöver förändras på något sätt.

### 7.3 Resultat uppnådda under 2004 (till oktober)

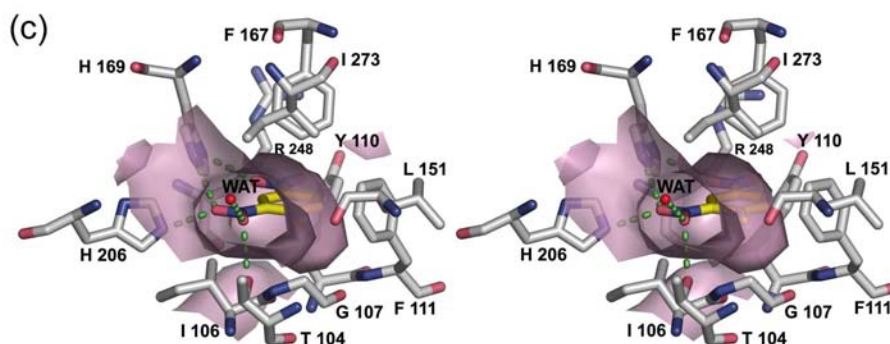
Den struktur för DntR som har bestämts är den första som har bestämts för denna typ av sensor med substrat bundet i bindningsfickan. Resultaten beskrivs i en artikel som nyligen blev publicerad

i den prestigefyllda internationella tidskriften "*Journal of Molecular Biology*" (Smirnova IA, Dian C, Leonard GA, McSweeney S, Birse D, Brzezinski P). *Development of a bacterial biosensor for nitrotoluenes: The crystal structure of the transcriptional regulator DntR*. *J. Mol. Biol.* 340, p 405-418. Redaktören valde dessutom att visa "vårt" protein, dvs DntR, på omslaget (Figur 29).



**Figur 29** Omslag Journal of Molecular Biology nr 340 (3)

I det fortsatta arbetet används strukturen för att kartlägga vilka aminosyrarester i bindningsfickan som måste förändras för att 2,4-DNT skall kunna binda effektivt. För att lägga grunden för detta fortsatta arbete har 2,4-DNT modellerats in i bindningsfickan (Figur 30). Detta arbete beskrivs utförligt i bilagan.



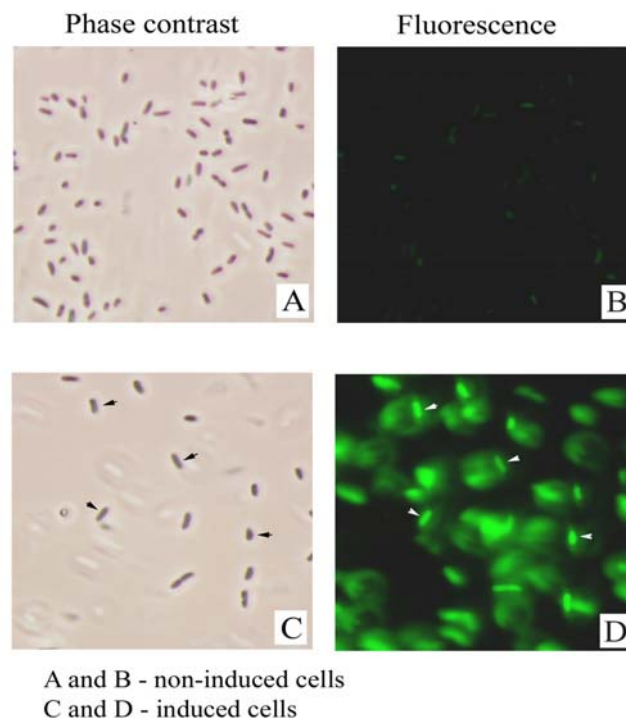
**Figur 30** Modellering av 2,4-DNT (i gult) i bindningsfickan (stereobild). Andra atomer är färgade som i Fig.27.

Under våren 2004 började metoder utvecklas för framställning av de olika mutanterna. Under sommaren erhöles två nya mutanter, en dubbelmutant och en enkelmutant. Under sommaren och hösten lyckades dessa mutanters strukturer bestämmas och för närvarande pågår analys av dessa. Nästa steg blir att undersöka om mutationerna har resulterat i en bakteriell biosensor som har en förhöjd specificitet och känslighet för 2,4-DNT. För närvarande pågår arbete med framställning av ytterligare ett antal mutantformer.

I detta sammanhang är det också viktigt att beakta spridning av de förändrade (muterade) bakterierna. De bakterier som man utgår från är naturliga jordbakterier som förekommer i stora mängder i olika jordar. Tidigare försök visade att bakterier i vilka DntR är förändrat (mutanter) överlever tillräckligt länge för att de skall kunna användas som biosensorer.

Därefter finns två möjligheter för det fortsatta förloppet. Den ena möjligheten är att de förändrade bakterierna dör eftersom de inte kan konkurrera med de naturliga bakterierna i omgivningen. Alternativt kan de muterade bakterierna överleva genom att göra sig av med de manipulerade DNA-strängarna och återgå till sin naturliga form. Det senare alternativet är en sannolik utveckling eftersom bakterier har mycket lätt att anpassa sig till sin omgivning. Båda dessa scenarier leder till att endast naturliga bakterier återfinns i miljön efter några dagar. Detta bekräftas av försök i laboratoriet.

Figur 31 visar fotografier tagna i mikroskop av modifierade celler. I bild A visas celler som inte inducerats med något substrat, bild B visar hur dessa blir vid belysning med UV-ljus. Bild C visar celler som inducerats med substratet och hur de ser ut vid belysning med UV-ljus. Cellernas känsligheten för DNT ligger för närvarande på ppm-nivå, ( $10^{-6}$ ) vilket kan vara realistiskt i vissa fall, men känsligheten behöver komma ned till minst  $10^{-9} - 10^{-12}$  för att vara användbar i de flesta sammanhangen.



**Figur 31** Mikroskopbilder av celler.



## 8. Nedbrytbara energetiska salter och plaster

### 8.1 Inledning

I kapitlet om hotbilder beskrivs nya typer av ammunition och minor/substridsdelar med avancerade funktioner. Självdestruerande eller självneutraliserande funktioner är av stort intresse för nya vapensystem men de har ofta hög felfunktion. En möjlig lösning på problemet skulle kunna vara att använda nedbrytbara delar i verkansdelen men framförallt i tändkedjan tillsammans med nedbrytbar plast i delar av eller hela höljet. Tiden för självneutralisation genom nedbrytning bestäms av valet av plast.

I den inledande principstudien [15] studerades två energetiska salter, guanidindinitramid (GDN) och guanidinureadinitramid (GUDN), samt flera bionedbrytbara plaster med avseende på termisk stabilitet och kemisk kompatibilitet. Nedbrytningsstudier i fält av GDN och GUDN med och utan plaster har bedrivits sedan november 2000.[16] Som en fortsättning på detta arbete lades under hösten 2002 ytterligare ett energetiskt salt, Guanidindinitrometan (GDNM), samt ytterligare ett antal nedbrytbara kommersiella plaster ut i fält.[17]

Parallellt med fältstudierna har under 2003-2004 även en studie av plasternas nedbrytning i närvaro av svampar genomförts samt en accelererad åldringsstudie av plasterna vid 60°C. Inledande analyser av de åldrade plasterna har gjorts med svepelektronmikroskop (SEM) och HPLC.

### 8.2 Nedbrytning i fält

Nedbrytningen i fält har studerats hos ett antal kommersiellt tillgängliga plastmaterial (Tabell 5) samt tre olika explosivämnen, Guanidindinitramid (GDN), guanidinureadinitramid (GUDN) och guanidinditrometan (GDNM).

**Tabell 5** Översikt över i studien ingående nedbrytbara kommersiella plaster.

<i>Namn</i>	<i>Polymer</i>	<i>Leverantör</i>
A: Biomax	Polyester	DuPont
B: Bionolle™ 1020	Polyester	Showa Highpolymer Co. Ltd.
C: Bionolle™ 3020	Polyester	Showa Highpolymer Co. Ltd.
D: CAPA	Polyester	Solvay Caprolactones
E: Mater-Bi™ YI	Stärkelsebaserad polymer	Novamont SpA
F: Mater-Bi™ NF	Stärkelsebaserad polymer	Novamont SpA
G: Eastar Bio	Sampolyester	Eastman Chemical Company
H: Solanyl	Stärkelsebaserad polymer	Rodenburg Biopolymers
I: Biopol	Polyester	Metabolix Inc.

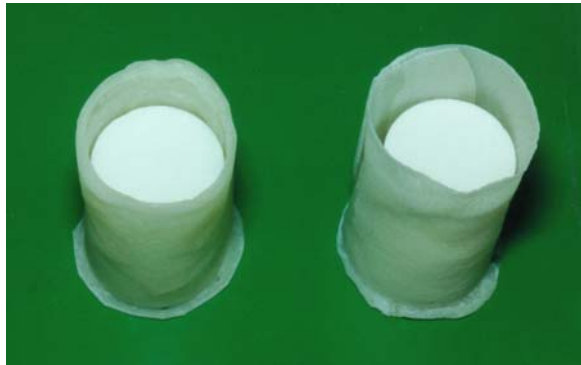


Två prov av varje plast (utstansade 2 mm tjocka plaststavar) samt explosivämne (pressade kulsar med en vikt av ca 20 g vardera) placerades på marken (Figur 32) och eventuella förändringar i vikt och utseende studerades.



**Figur 32** Vänster bild; provkroppar av GDN (ö.t.v.), GUDN (ö.t.h.) och GDNM (nederst). Höger bild; provstavar i fält.

Två av explosivämnena studerades även tillsammans med två olika plastmaterial. Cylindrar av explosivämnet placerades inuti ett plasthölje och lades ut på testfältet (Figur 33).

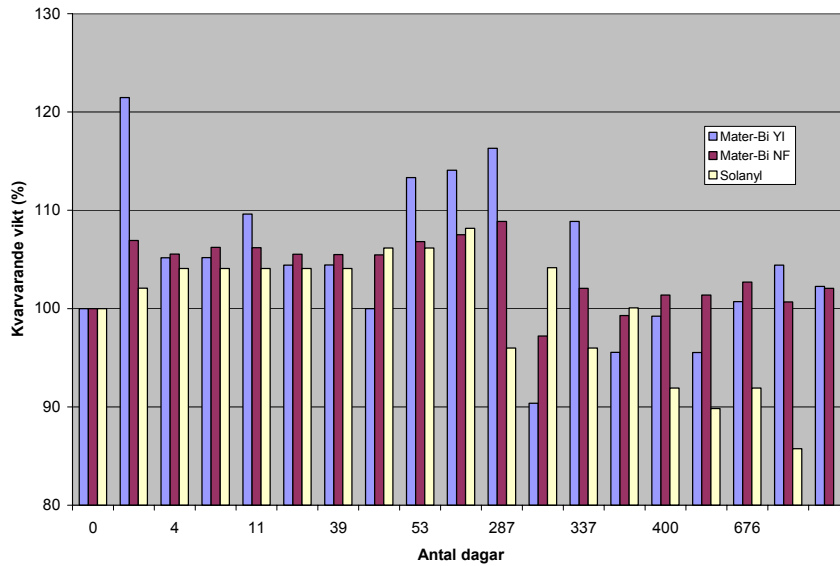


**Figur 33** Pressade prov av GDN and GUDN i plasthöljen av Mater-Bi™ YI.

De studerade explosivämnena i detta försök var GDN samt GUDN och plastmaterialen var Bionolle™ 3020 samt Mater-Bi™ YI.

Resultaten från studien i fält skiljer sig åt för de tre explosivämnena. GUDN har visat sig vara mest stabil av de tre medan GDN bryts ned, eller löses upp, snabbast. Det tog 371 dagar för GDN att försvinna helt medan GUDN och GDNM har förlorat 13% resp. 80% av sin vikt efter 785 dagar.

De olika plastmaterialen som placerats på testfältet visar ej någon viktsförändring förutom Mater-Bi™ YI, Mater-Bi™ NF och Solanyl. Beroende på fuktupptag ökade alla tre något i vikt till en början, där Mater-Bi™ YI hade den största viktökningen, innan de började minska i vikt. I dagsläget uppvisar Solanyl den största viktnedgången av de tre med 15%. Mater-Bi™ YI och Mater-Bi™ NF har återigen börjat öka i vikt efter en liten viktnedgång (Figur 34).



**Figur 34** Viktsförändringar hos markläggande plasterna Mater-Bi™ YI, Mater-Bi™ NF och Solanyl.

Optisk besiktning av de tre visar att Mater-Bi™ YI har genomgått en färgförändring och en fått hel del bubblor i materialet medan Solanyl-proven har blivit spröda och vitnat.

Experimentet med GDN och GUDN omgärdat av Mater-Bi™ YI och Bionolle 3020 visar att Mater-Bi™ YI bryts ned lättare än Bionolle 3020 i denna omgivning. Värt att notera är att de två plasterna brutits ned olika fort beroende på vilket explosivämne som det omsluttit (Figur 35).



**Figur 35** Vänster bild; GUDN med Bionolle (t.v.) och Mater-Bi (t.h.) efter 706 dagar utomhus.  
Höger bild; GDN med Bionolle (t.v.) och Mater-Bi (t.h.) efter 706 dagar utomhus.

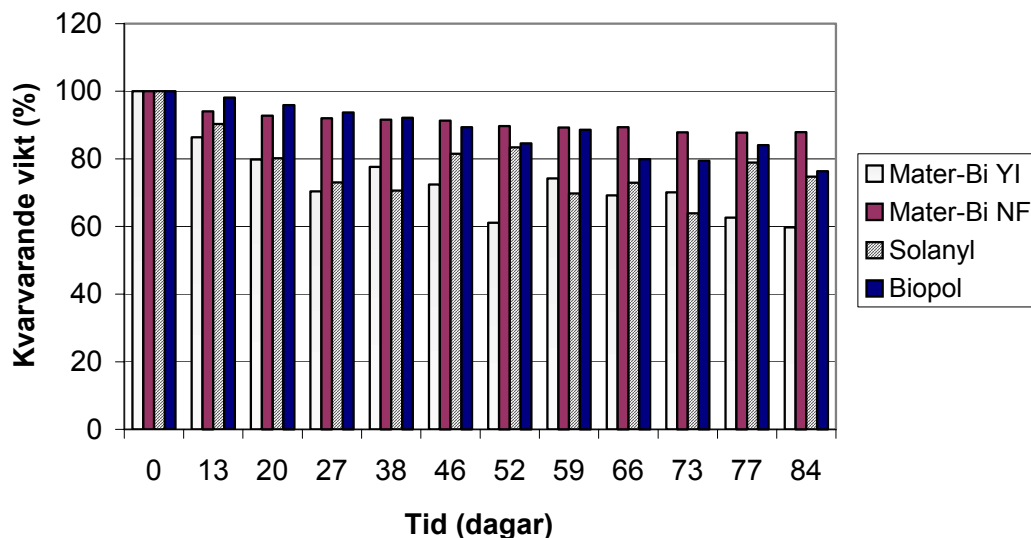
De båda plasterna runt GDN har försvunnit i avsevärt större grad än plasterna runt GUDN. Detta beror troligtvis på det faktum att GDN tar upp fukt lättare än GUDN och därigenom accelererar nedbrytningshastigheten hos plastmaterialet det omsluts av.

### 8.3 Nedbrytning i närvaro av svampar

Nedbrytningsstudien i närvaro av svampar gjordes under 84 dagar vid 30°C i 1800 ml Fernbach kulturkolvar innehållande 800 ml mineralmedium och 11 utstansade plastbitar av varje ämne.

Svampen *Aspergillus fumigatus* (AF 1771, 02-08) användes vid experimenten. Valet av *Aspergillus fumigatus* beror på att den är vanligt förekommande i naturen och återfinns i en rad material som hö, grödor, komposter och jord. För att främja svamptillväxten tillsattes extra kolkälla i form av granulat av poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) (PHBV) då denna vid tidigare studier visat sig vara effektiv vid nedbrytning av polymerer.[18] Vid varje provuttag togs 20 ml mineralmedium och en plastbit ut. Inget extra mineralmedium tillsattes efter provuttag och plastbitarna tvättades med 70 % etanol innan de fick torka vid rumstemperatur. Mineralmediet hade ett ursprungligt pH på 5.5 och buffrades ej under studien.

Undersökning av materialen som brutits ned av *Aspergillus Fumigatus* visar ingen tydlig viktminskning för huvuddelen av materialen. Dock uppvisar Mater-Bi™ YI, Mater-Bi™ NF, Solanyl och Biopol en viktminskning (Figur 36).



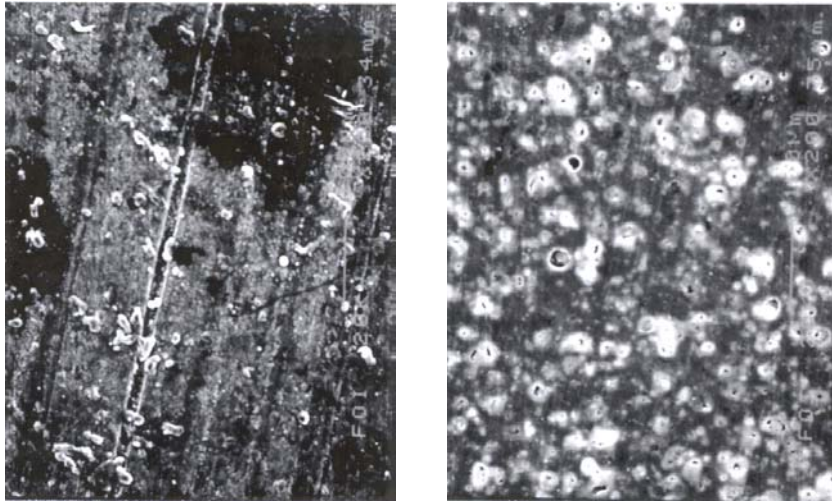
**Figur 36** Viktminskning hos Mater-Bi™YI, Mater-Bi™NF, Solanyl och Biopol åldrade i närvaro av *Aspergillus Fumigatus*.

Mater-Bi™ YI uppvisar den största viktminskningen på 40 vikts% och Solanyl den näst största med 25 vikts%.

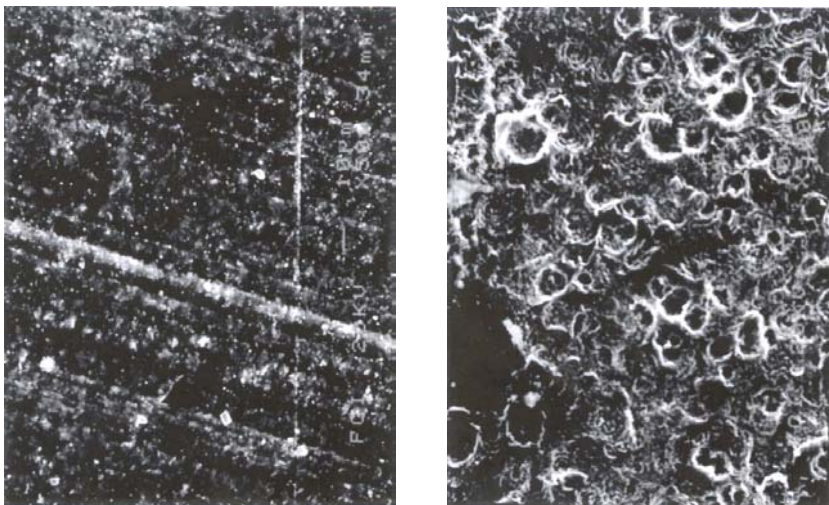
För att få en klarare bild av om det förekommer förändringar i ytskiktet hos plasterna från nedbrytningsstudien har dessa studerats med ett svepelektronmikroskop (SEM). Vid analysen användes ett JEOL svepelektronmikroskop av modellen JSM 6400 med en accelerationsspänning på 20 kV. Proven sputtrades med guld-palladium med en JEOL JFC-1100E sputter enhet under 5 minuter vid 10 mA. Vid analys av materialens ytor kan inget klart samband ses mellan uppmätt viktminskning och förändringar i ytstrukturen hos proverna från nedbrytningsstudien. Ytan hos Mater-Bi™ YI, icke-nedbruten och nedbruten i närvaro av *Aspergillus Fumigatus*, kan ses i Figur 37. Bilderna nedan visar viss erosion av ytan men dock ej lika tydligt som för Bionolle™1020



(Figur 38). Bilderna av Bionolle™1020 från nedbrytningsstudien visar en tydligare erosion av ytan men däremot har vikten bara minskat med 3.5%. Detta kan jämföras med Mater-Bi™ YI som har en viktninskning på 40%.



**Figur 37** SEM bilder av icke-nedbruten Mater-Bi™YI (vänster) och Mater-Bi™YI efter nedbrytning i närvaro av *Aspergillus Fumigatus* (höger).



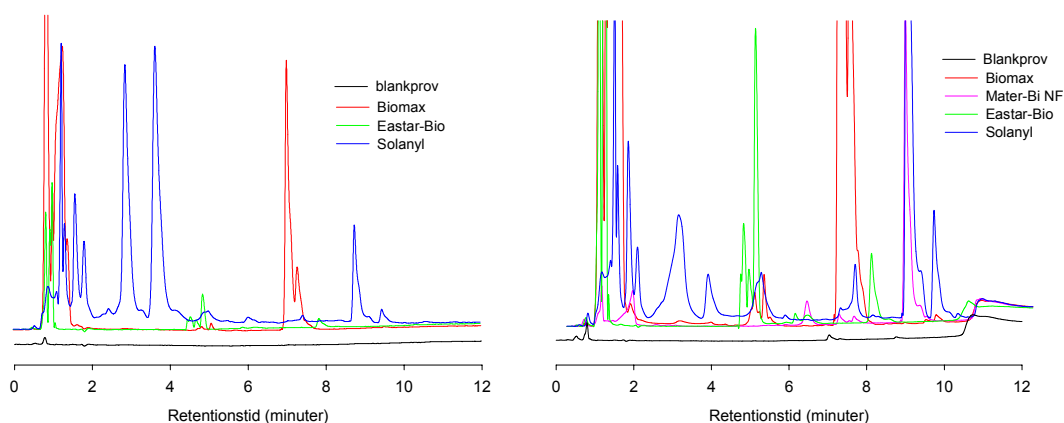
**Figur 38** SEM-bilder av icke-nedbruten Bionolle™1020 (vänster) och Bionolle™1020 efter nedbrytning i närvaro av *Aspergillus Fumigatus* (höger).

#### 8.4 Accelererad åldringsstudie vid 60°C

En accelererad åldringsstudie vid 60°C har genomförts på de olika plasterna. Åldringsstudien gör det möjligt att studera de nedbrytningsprodukter som de olika plasterna bildar. Granulat av plasterna (ca 6 g) har åldrats dels i 15 ml mineralmedium och dels i 15 ml HPLC-vatten. Åldringen pågick i 22 veckor och ett provrör av varje plast och medium togs ut med ungefär 4 veckors intervaller. Optisk besiktning av de olika provrören visar på stora skillnader där vissa granulat verkar helt oförändrade medan några, och speciellt Solanyl, brutits ned betydligt. För att få en uppfattning om förekomst av eventuella nedbrytningsprodukter har inledande HPLC analyser

gjorts på granulaten åldrade i HPLC vatten under 18 veckor. HPLC:n var utrustad med en Waters 2695 Quaternary HPLC System och en Waters UV Detector Model 996. UV detektorn arbetade mellan 210-350 nm, analysen gjordes under 30 minuter och med en flödes hastighet av 1.5 ml/minut. En C8 kolonn användes och som lösningsmedel en blandning av HPLC-vatten och acetonitril.

För att ett material skall vara lättnedbrytbart ute i naturen är det en fördel om det är känsligt för hydrolys och därmed kan brytas ned i mindre beståndsdelar. De inledande analyserna med HPLC visar att det främst är Biomax, Eastar-Bio och Solanyl som är mest hydrolyskänsliga eftersom de uppvisar rikligt med nedbrytningsprodukter.



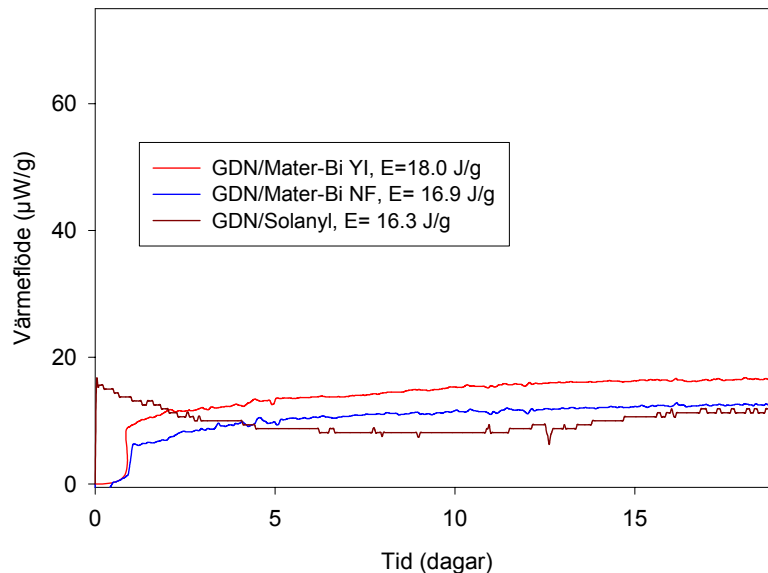
**Figur 39** HPLC kromatogram (210 nm till vänster och 230 nm till höger) över nedbrytningsprodukter efter åldring i vatten vid 60°C i 18 veckor.

Vid 210 och 230 nm, där främst ketoner, karbonyler och konjugerade system detekteras, uppvisar alla tre polymererna rikligt med nedbrytningsprodukter (Figur 39). Vid 250 nm, där främst aromatiska system detekteras, uppvisar alla de undersökta polymererna nedbrytningsprodukter i mer eller mindre stor utsträckning men även här är det Biomax, Eastar-Bio och Solanyl som uppvisar störst utslag (visas ej). Solanyl, som minskat i vikt både i fältförsöket och i nedbrytningsstudien, är även här det material som visar störst utslag. Mater-Bi™ YI som minskade mest i vikt vid nedbrytningen i närvaro av *Aspergillus Fumigatus* uppvisar däremot knappt några nedbrytningsprodukter i HPLC analysen.

## 8.5 Kompatibilitetsmätningar

För att undersöka om plasterna och de olika explosivämnena inte påverkas negativt av varandra och att de är kompatibla (förenliga med varandra) görs kompatibilitetsmätningar. Mätningarna görs med en mikrokalorimeter, TAM 2277 från Thermometric AB, och försöken utförs vid 75°C i 19 dygn, vilket motsvarar förvaring av ämnena vid 20°C i 10 år. Mätningarna sker isotermiskt och

eventuell energiutveckling mellan komponenterna registreras av TAM vilket gör det möjligt att fastställa om de två komponenterna är kompatibla eller ej. För att komponenterna ska anses som kompatibla skall den uppmätta energin,  $E$ , ej överstiga 30 J/g. [19]. Kompatibilitetsstudier mellan GDN och Mater-Bi™ YI, Mater-Bi™ NF samt Solanyl har gjorts (Figur 40).



**Figur 40** Mätningar utförda i mikrokolorimeter under 19 dagar vid 75°C.

Resultatet från mätningarna visar att energiutvecklingen för de tre blandningarna ligger långt under gränsvärdet på 30 J/g och alla tre plasterna är därmed kompatibla med GDN.

## 8.6 Slutsatser

Från nedbrytningssynpunkt är GDN den mest intressanta av de tre studerade salterna, dels eftersom den bryts ned snabbt men även eftersom den verkar påskynda nedbrytningen av den plast den omsluts av. GDNM bryts ned långsammare, detta kan dock vara intressant beroende på vilken nedbrytningshastighet som önskas. GUDN har dock en alltför dålig nedbrytning för att vara intressant i dessa sammanhang. De plaster som hittills verkar vara intressanta för nedbrytning ute i fält är främst Solanyl men även Mater-Bi™ YI. Vid nedbrytningsstudien i närvaro av svampar uppvisar Mater-Bi™ YI den största viktnskningen på 40 vikts% och Solanyl den näst största med 25 vikts%. Dock finns ingen korrelation mellan de material som minskat mest i vikt och de som uppvisar störst ytförändringar vid analys med svepelektronmikroskop (SEM). Vid den accelererade åldringen vid 60°C uppvisar Biomax, Eastar-Bio och Solanyl flest nedbrytningsprodukter medan Mater-Bi™ YI endast gav mindre utslag.

## 9. Tack

Stort tack till Professor Peter Brzezinski och Dr Irina Smirnova, Institutionen för biokemi och biofysik vid Stockholms universitet, för deras intressanta och uppmärksammade forskning om bakteriella biosensorer. Stort tack även till Mona Brantlind som utför provberedning och analyser på ett tillförlitligt och noggrant sätt och till Dr Carina Eldsäter som har tillfört väl underbyggda idéer och stöd till nedbrytningsstudierna.

## 10. Konferenser, resor och artiklar

35th International Annual Conference of ICT, Karlsruhe, 29 juni – 2 juli, 2004. Posterbidrag.

NDRF:s sommarkonferens i Fredrikshavn, Danmark 27-29 augusti 2004.

NDRF:s miniseminarium vid FOI Vapen och skydd, 28 oktober 2004.

Artikel: Se bilaga

## 11. Referenslista

1. *The Convention on Certain Conventional Weapons - Reference Documents:* [http://www.mineaction.org/countries/refdocs.cfm?doc\\_ID=120&from=misc/](http://www.mineaction.org/countries/refdocs.cfm?doc_ID=120&from=misc/), 2004-11-09.
2. *The Ottawa Treaty Text:* <http://vvaaf.org/proactive/newsroom/release.vtml?id=2000507>, 2004-10-12.
3. *Landmine Monitor Fact Sheet: Stockpile Destruction (Article 4).* 2004: Geneva, Switzerland. p.2.
4. [http://www.landminesurvivors.org/library\\_nonsignatories.php](http://www.landminesurvivors.org/library_nonsignatories.php), 2004-10-12.
5. *Human Rights Watch Memorandum to CCW Delegates: A Global Overview of Explosive Submunitions*, 1630 Connecticut Ave, NW, Suite 500: Washington DC, 20009, 2002.
6. *Press Release: Textron Systems' BLU-108 Submunition Is Successful In Weaponized UAV Demonstration.* [http://www.systems.textron.com/mainframe/pressroom/archives/2004/09\\_13\\_04c.html](http://www.systems.textron.com/mainframe/pressroom/archives/2004/09_13_04c.html), 2004-10-25.
7. *Complete Guide: Do-It-All Anti-Armour?*, in *Armada International*. Dec/Jan 2002/2003.
8. *BLU-108/B Submunition;* <http://www.globalsecurity.org/military/systems/munitions/blu-108.htm>, 2004-10-25.
9. *Press Release: Textron Systems' Improved Sensor Fuzed Weapon (P3I SFW) Approved for Full Rate Production;* [http://www.systems.textron.com/mainframe/pressroom/archives/2001/6\\_15\\_01.html](http://www.systems.textron.com/mainframe/pressroom/archives/2001/6_15_01.html), 2004-11-09.
10. *The New Era for Artillery Ammunition: SMarT 155;* <http://www.giws.de/texte/english/smart.htm>, 2004-11-01.

11. *News Release: ATK Partner GIWS Achieves 100-Percent Reliability in Tests of Extended Footprint SMArt 155 Munition*; <http://www.atk.com/releases/2002Releases/2002-05-09-SMART.htm>, 2004-11-09.
12. *Clusters of Death - Chapter 2: Cluster Munitions in the Russian Arsenal*; <http://www.mennonitecc.ca/clusterbomb/report/chapter2.htm>, 2004-10-27.
13. *Jane's Ammunition Handbook 2001-2002*. 2001, Sentinel House, 163 Brighton Road, Coulsdon, Surrey CR5 2YH, U.K.: Jane's Information Group Ltd.
14. Phelan J.M and Webb S.W: Chemical Sensing for buried landmines: fundamental processes influencing trace chemical detection. *Mine Detection Dogs: Training, Operations and Odour Detection*, GICHD, Geneva 2003
15. A. Langlet, C. Eldsäter, Inledande studier i kemisk/biologisk nedbrytning av energetiska salter och nedbrytbara polymerer, *FOA Memo 00-4576/S*, 2000.
16. L. Sarholm, Landminsystem: Minspaning/röjning, Årsrapport för år 2000, *FOA Memo 00-5995/S*, 2000.
17. L. Sarholm, A. Kjellström, H. Carlsson, M. Wanhatalo, E. Holmgren, M. Brantlind, Årsrapport 2002 för Landminsystem: Detektion och Röjning, *FOI Memo 02-3261*, 2002.
18. C. Eldsäter, Chemical and morphological characterisation of long-term properties of environmentally degradable polymers, Department of Polymer Technology, Royal Institute of Technology, Stockholm 1999.
19. STANAG 4147, NATO STANDARDISATION AGREEMENT (Draft Edition 2) Chemical Compatibility of Ammunition Components with Explosives (Non-Nuclear Applications).

## Bilaga

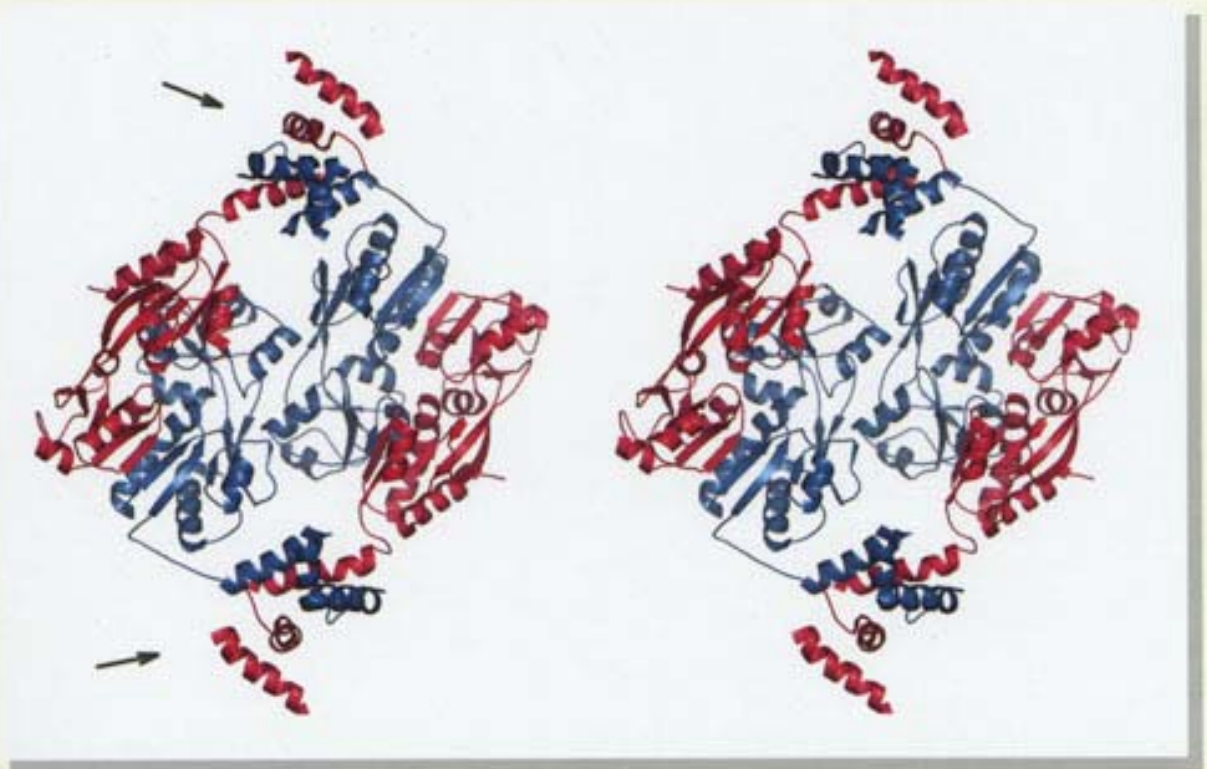
“Development of a Bacterial Biosensor for Nitrotoluenes: The Crystal Structure of the Transcriptional Regulator DntR.” I. Smirnov, C. Dian, G.A. Leonard, S. McSweeney, D. Birse and P. Brzezinski. *Journal of Molecular Biology*, vol 304, Issue 3, 9 July 2004, p 405-418.





# JMIB

JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY





# Development of a Bacterial Biosensor for Nitrotoluenes: The Crystal Structure of the Transcriptional Regulator DntR

Irina A. Smirnova<sup>1†</sup>, Cyril Dian<sup>1,2†</sup>, Gordon A. Leonard<sup>2</sup>  
Seán McSweeney<sup>2</sup>, Darcy Birse<sup>1,3</sup> and Peter Brzezinski<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, Arrhenius Laboratories for Natural Sciences, Stockholm University SE-106 91 Stockholm, Sweden

<sup>2</sup>Macromolecular Crystallography, European Synchrotron Radiation Facility B.P. 220, F-38043 Grenoble Cedex, France

<sup>3</sup>TGN Biotech Inc., 1000, route de l'Église, Suite 485 Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 3V9

The transcriptional regulator DntR, a member of the LysR family, is a central element in a prototype bacterial cell-based biosensor for the detection of hazardous contamination of soil and groundwater by dinitrotoluenes. To optimise the sensitivity of the biosensor for such compounds we have chosen a rational design of the inducer-binding cavity based on knowledge of the three-dimensional structure of DntR. We report two crystal structures of DntR with acetate (resolution 2.6 Å) and thiocyanate (resolution 2.3 Å), respectively, occupying the inducer-binding cavity. These structures allow for the construction of models of DntR in complex with salicylate ( $K_d \cong 4 \mu\text{M}$ ) and 2,4-dinitrotoluene that provide a basis for the design of mutant DntR with enhanced specificity for dinitrotoluenes. In both crystal structures DntR crystallises as a homodimer with a "head-to-tail" arrangement of monomers in the asymmetric unit. Analysis of the crystal structure has allowed the building of a full-length model of DntR in its biologically active homotetrameric form consisting of two "head-to-head" dimers. The implications of this model for the mechanism of transcription regulation by LysR proteins are discussed.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** transcriptional regulator; LysR family; crystal structure; bacterial biosensor; *Pseudomonas putida*

\*Corresponding author

## Introduction

The synthetic nitroaromatic compound 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT) is used in the manufacture of pesticides, polyurethane foams, munitions and explosives. As nitroaromatics are extremely hazardous for human health,<sup>1</sup> contamination of both soil and groundwater at sites of intensive use and fabrication of these compounds is a serious cause for concern and it is important to find a safe mechanism for the detection and removal of such contamination. Bacterial cell-

based sensors are useful tools in the former of these aims.

Many species of soil bacteria have adapted to the presence of xenobiotic organic compounds in the environment by developing the capacity to break them down into metabolic intermediates. In most cases the transcription of the genes encoding enzymes involved in such degradation is regulated and expression of these enzymes is enhanced by the presence of inducer molecules, which are usually either the compound to be degraded or an intermediate in the metabolic pathway. A biosensor might thus be engineered by placing a reporter gene under the control of a transcriptional regulator activated by the relevant inducer. Such systems have already been developed for detection of naphthalene, toluene and benzene.<sup>2–6</sup>

Recently, around 30 strains of bacteria from the genera *Burkholderia*, *Alcaligenes* and *Pseudomonas* that can degrade 2,4-DNT have been isolated from soil and surface water collected at Radford Army Ammunition plant, West Virginia, USA.<sup>7</sup> Among these is the *Burkholderia* sp. strain DNT, which is

†I.A.S. & C.D. contributed equally to this work.

Abbreviations used: C<sup>α</sup>, polypeptide backbone carbons; HTH, helix-turn-helix; IBD, inducer-binding domain;  $K_d$ , dissociation constant; MR, molecular replacement; r.m.s., root-mean square; SAD, single wavelength anomalous dispersion; 2,4-DNT, 2,4-dinitrotoluene.

E-mail address of the corresponding author: peterb@dbb.su.se

capable of using 2,4-DNT as a sole source of carbon. A pathway for the oxidative degradation of 2,4-DNT by this strain and by *Burkholderia cepacia* R34 has been well investigated.<sup>8–11</sup> These microbes harbour metabolic plasmids that carry genes encoding enzymes for oxidative degradation of 2,4-DNT under control of a transcriptional regulator, DntR, for which a gene and a promoter sequence were found upstream of the regulated genes.<sup>11–13</sup>

The genetic system from *Burkholderia* sp. strain DNT was used to develop a prototype biosensor for detection of dinitrotoluenes.<sup>13</sup> Here, a plasmid was constructed in which the expression of a reporter gene, *gfp*, encoding the green fluorescent protein, was placed under the control of the promoter  $P_{DNT}$  and the transcriptional regulator DntR. Bacteria containing this construct developed a fluorescent response in the presence of an inducer. However, the prototype biosensor had only a limited sensitivity to 2,4-DNT although it was clearly sensitive to the presence of salicylic acid<sup>13</sup> (I.A.S. *et al.*, unpublished results). Salicylic acid is an intermediate of the oxidative degradation of the aromatic ring in several species of soil bacteria. These include *Ralstonia* sp. U2,<sup>14</sup> where such degradation is under the control of a salicylate-dependent transcriptional activator NagR (EMBL; AAG13636.1), which has an amino acid sequence almost identical to that of DntR. The corresponding operons of *Ralstonia* sp. U2 and *Burkholderia* sp. DNT thus seem to either originate from a common ancestor or to have been introduced *via* lateral gene transfer with a consequent elimination of a salicylate-employing pathway in the latter microbe resulting from a frame-shift mutation.<sup>11</sup>

DntR belongs to the large LysR family of transcriptional regulators that control genes encoding a wide variety of metabolic pathways. These regulatory proteins are between 300 and 350 amino acid residues in length and consist of an N-terminal helix-turn-helix (HTH) region around 60–70 amino acid residues in length involved in DNA binding and a much larger C-terminal regulatory domain where inducer binding occurs.<sup>15–17</sup> For the prototype biosensor described above to be useful in the detection of dinitrotoluenes the inducer specificity of DntR must be modified. In order to achieve this we have chosen the rational re-design of the inducer-binding site of DntR. This approach requires knowledge of the three-dimensional structure of the protein. Based on this structure, subsequent modification of selected amino acid residues can then make the inducer-binding cavity exactly match the chemical and spatial properties of the inducer molecule desired to initiate transcription of the reporter gene and thus making the biosensor sensitive to a specific compound.

With this goal in mind we describe here conditions for purification, stabilisation and crystallisation of DntR from *Burkholderia* sp. strain DNT; the interaction of DntR with its promoter DNA region, its oligomerisation state and its inducer-

binding properties for sodium salicylate and 2,4-DNT as studied in solution. Using X-ray crystallography we have also determined two three-dimensional structures of DntR: one containing an acetate ion and the other a thiocyanate ion in the inducer-binding pocket. Analysis of the two structures allowed us to model how 2,4-DNT might bind to DntR and thus to make rational conclusions as to which amino-acid residues should be mutated in order to make DntR more specific for the binding of this moiety or its metabolites. The structures also allowed us to model the conformation of an inducer-bound, full-length LysR family member in its physiologically relevant tetrameric state. The implications of our model for the mechanism of transcription regulation by the LysR-type regulators are discussed.

## Results

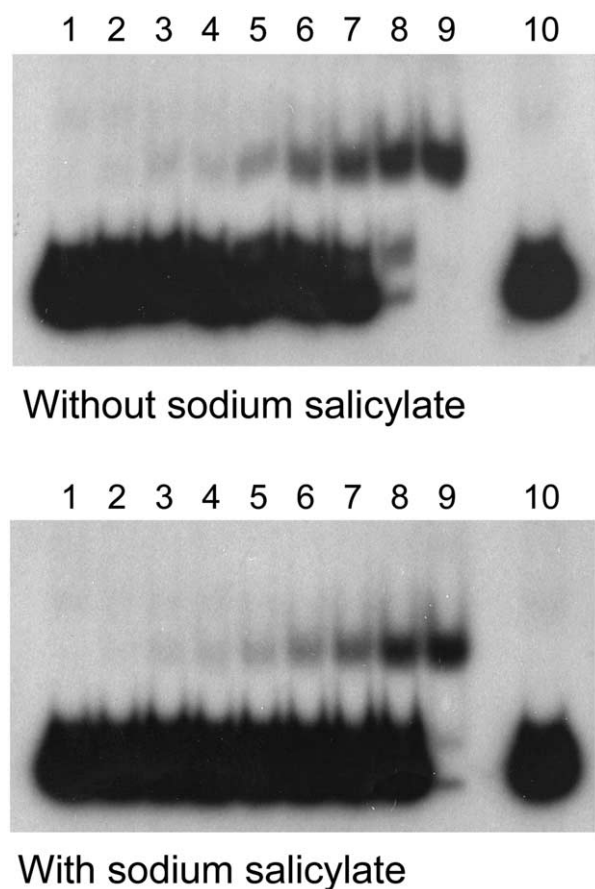
### The interaction of DntR with its promoter region DNA

A “LysR motif” promoter recognition sequence has been found 56 bp upstream of the transcriptional start of *dntA*, one of the genes regulated by DntR in *Burkholderia* sp. strain DNT.<sup>12</sup> To date, however, no studies have been carried out concerning the interaction of DntR with its promoter. Our electrophoretic mobility shift assay experiments show the formation of a DntR–DNA complex both in the presence and in the absence of an inducer molecule, sodium salicylate (Figure 1). Considering the protein concentration range where the shift was observed, this DntR-binding site is a low affinity site, similar to that described by Lorenz & Stauffer for MetR.<sup>18</sup> Although an estimation of the binding constants was difficult due to a partial retardation of the DntR–DNA complex at the start (not shown), it is seen that the presence of sodium salicylate slightly altered the affinity of DntR to DNA (Figure 1). This result is consistent with data available for other members of the LysR family and with the assumption that the inducer molecule binding by LysR proteins activates transcription *via* conformational changes of the protein–DNA complex without a significant increase in the DNA-binding constant.<sup>15,19–21</sup> A difference in mobility of the complex in the presence and in the absence of the inducer was significantly smaller than observed for CysB,<sup>19</sup> probably due to the smaller size of the DNA fragment used in our study.

### Inducer binding properties of the DntR protein

Quenching of the protein intrinsic fluorescence upon binding of an inducer<sup>22</sup> was used to estimate the dissociation constants ( $K_d$ ) of potential DntR–inducer complexes (Figure 2). For sodium salicylate a  $K_d$  of  $\sim 4 \mu\text{M}$  is estimated (Figure 2(a)), while no  $K_d$  in the concentration range studied is



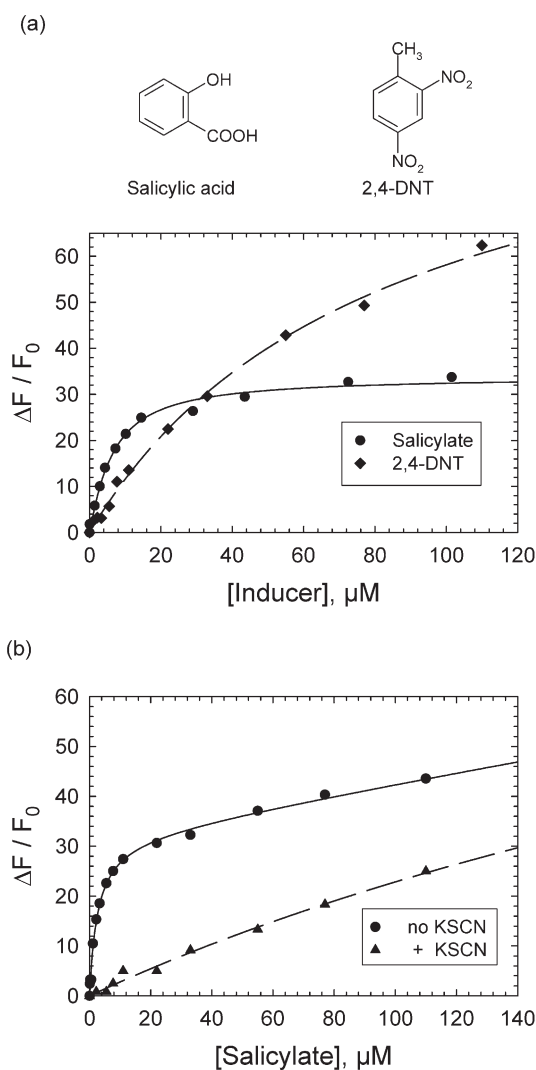


**Figure 1.** Binding of DntR to the  $P_{DNT}$  promoter region shown by an electrophoretic mobility shift assay. The assay was performed in the absence and in the presence of 10 mM sodium salicylate as indicated. The lanes show the mobility of the DNA fragment after incubation with increasing concentrations of DntR: 1, 38 nM; 2, 76 nM; 3 and 4, 0.19  $\mu$ M; 5, 0.38  $\mu$ M; 6, 0.76  $\mu$ M; 7, 1.44  $\mu$ M; 8, 1.9  $\mu$ M; 9, 3.8  $\mu$ M; 10, no DntR.

observed for the binding of 2,4-DNT, showing that there are no specific binding sites for this compound (Figure 2(a)). According to our structural data (see below), acetate or thiocyanate moieties, originating from the crystallisation liquors were found in the inducer-binding pockets of two crystal forms of DntR. Neither of these compounds causes any distinguishable fluorescence quenching at concentrations up to tens of millimolar (data not shown). However, the presence of a high (0.2 M) concentration of sodium thiocyanate reduced the binding of sodium salicylate drastically (Figure 2(b)). This result indicates that at such high concentrations thiocyanate binds in the inducer-binding pocket of DntR.

### The structure of the inducer-binding domain of DntR

Two crystal structures were obtained for DntR; one from an acetate-containing solution, the second from a thiocyanate-containing solution. The refined models (Table 1) of these structures are essentially



**Figure 2.** Inducer binding to DntR, monitored as a change in the protein intrinsic fluorescence. (a) Titration of the relative fluorescence intensity ( $\Delta F/F_0$ ) with sodium salicylate (circles) and with 2,4-DNT (diamonds). The continuous line represents a least square fit to equation (1) (see Methods) with  $K_d = 4 \mu$ M. The DntR concentration was 3  $\mu$ M. Incubation medium: 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -NaOH (pH 7.6), 0.1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 17% glycerol. 2,4-DNT was dissolved in dimethyl sulphoxide. The data were corrected for the fluorescence quenching caused by this solvent. (b) Titration of the fluorescence intensity with sodium salicylate in the absence (circles) and in the presence (triangles) of thiocyanate. The DntR concentration was 2.6  $\mu$ M. Incubation medium with thiocyanate: 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -NaOH (pH 7.6), 0.2 M KSCN, 0.1 M NaCl, 17% glycerol. The salt concentration was adjusted to maintain the same ionic strength as without thiocyanate.

isostructural with a superposition revealing an r.m.s. deviation in  $C^\alpha$  positions of only 0.35 Å. In these models DntR presents a homodimer in the asymmetric unit with the two DntR monomers lined up in a “head-to-tail” arrangement (Figure 3). The buried surface at the monomer-monomer interface is 1539 Å<sup>2</sup>.

**Table 1.** Refinement and model geometry statistics

Dataset	SeMet	Acetate-bound	Thiocyanate-bound
Beam-line	ID14-2 (ESRF)	ID29 (ESRF)	ID14-EH1 (ESRF)
Wavelength (Å)	0.933	0.976	0.932
$d_{\min}$ (Å)	3.0	2.6	2.20
$R_{\text{sym}}$ (%) <sup>a</sup>	10.5 (47.1)	9.1 (52.4)	9.4 (53.6)
Completeness (%) <sup>a</sup>	99.9 (99.9)	98.2 (97.7)	99.9 (99.9)
Anom. comp. (%) <sup>a</sup>	99.9 (99.9)	N/A	N/A
Multiplicity <sup>a</sup>	5.8 (6.0)	4.7 (4.8)	9.6 (2.7)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$ <sup>a</sup>	13.9 (3.7)	11.4 (2.8)	13.4 (2.8)
<i>Refined model composition</i>			
Protein residues	A89-A301 B89-B301	A89 A302 B75 B301	A89 A302 B75 B301
Water molecules	35	129	155
Glycerol molecules	0	5	0
Acetate ions	0	2	0
Thiocyanate ions	0	0	2
<i>Average isotropic thermal parameters (Å<sup>2</sup>)</i>			
Wilson plot		63.0	45.3
Overall	45.8	48.7	38.6
Main-chain/side-chains	46.4/48.7	48.5/48.8	
<i>Model quality indicators</i>			
R-work/R-free (%)	21.8/25.4	21.5/26.1	21.5/26.3
rm <sub>sd</sub> bond lengths (Å)/bond angles (°)	0.032/2.464	0.013/1.428	0.014/1.438
Estimated coordinate error (Å)	0.32	0.28	0.15
<i>Ramachandran analysis (%)</i>			
Favoured regions	A 92.3 B 89.6	A 91.8 B 92.9	A 88.5 B 90.8
Additionally, generously allowed regions	A 7.7 B 10.4	A 8.2 B 7.1	A 11.5 B 9.2
Disallowed regions	A 0 B 0	A 0 B 0	A 0 B 0

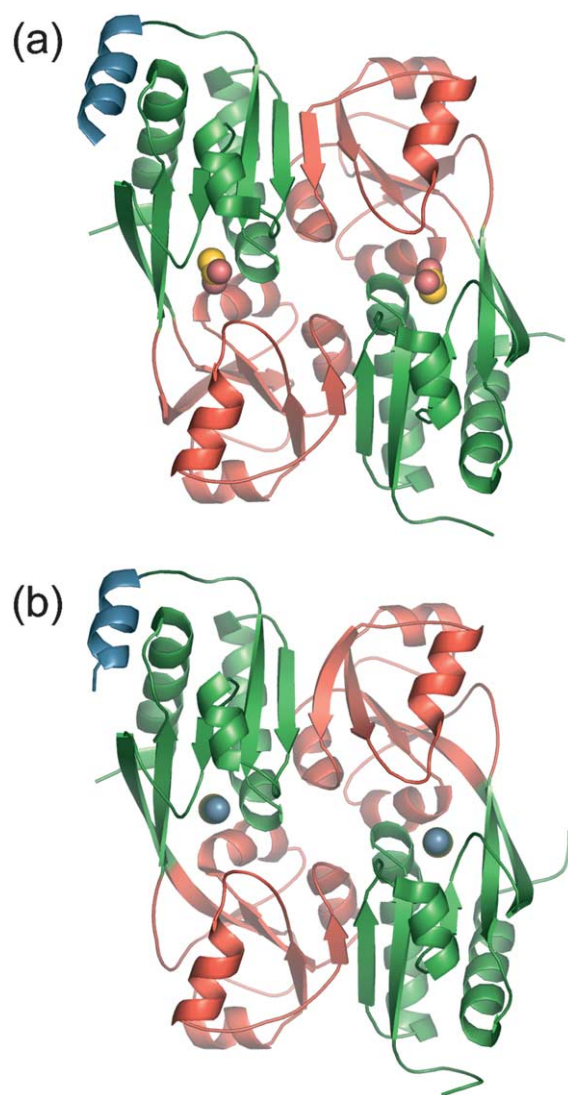
<sup>a</sup> Figures in parentheses are for the highest resolution ranges for each data set (3.16–3.0 Å, 2.65–2.60 Å and 2.32–2.20 Å for the SeMet, acetate-bound and thiocyanate-bound, respectively).

Although the full-length DntR protein was crystallised, in both crystal structures the electron density for the major part of the N-terminal HTH domains is poor and cannot be modelled to the satisfaction of the refinement programs used in the structure analysis. Thus, the structures presented here are essentially those of the inducer-binding domain (IBD) of DntR. Nevertheless, both the  $\sigma_A$ -weighted electron density ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ;  $\alpha_{\text{calc}}$ ) and the difference density ( $mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ;  $\alpha_{\text{calc}}$ ) maps calculated at the end of the refinement procedures give a good indication of both the positions and orientations of the helices linking the HTH and IBDs of DntR. This observation, in conjunction with the residual electron density seen in a lower resolution structure of DntR, has allowed us to model the structure of full-length DntR, the implications of which are discussed below.

The structure of the IBD of DntR consists of two sub-domains, each having a Rossmann-fold topology. Sub-domain I is comprised of residues 90–166 and residues 274–301 while sub-domain II is made up of residues 171–269. A “hinge” region consisting of residues 167–170 and 270–273 links the two sub-domains. The relative orientation of the two domains is stabilised by a number of interactions, the most notable being salt bridges formed between the side-chains of H228 and D105, and

R248 and E300. A search using the DALI server<sup>23</sup> reveals that the overall fold of the IBD of DntR is similar to those of several periplasmic substrate-binding proteins. However, the greatest similarity is with the structures of the IBDs of other LysR family members such as CysB,<sup>17</sup> OxyR<sup>24</sup> and CbnR.<sup>16</sup>

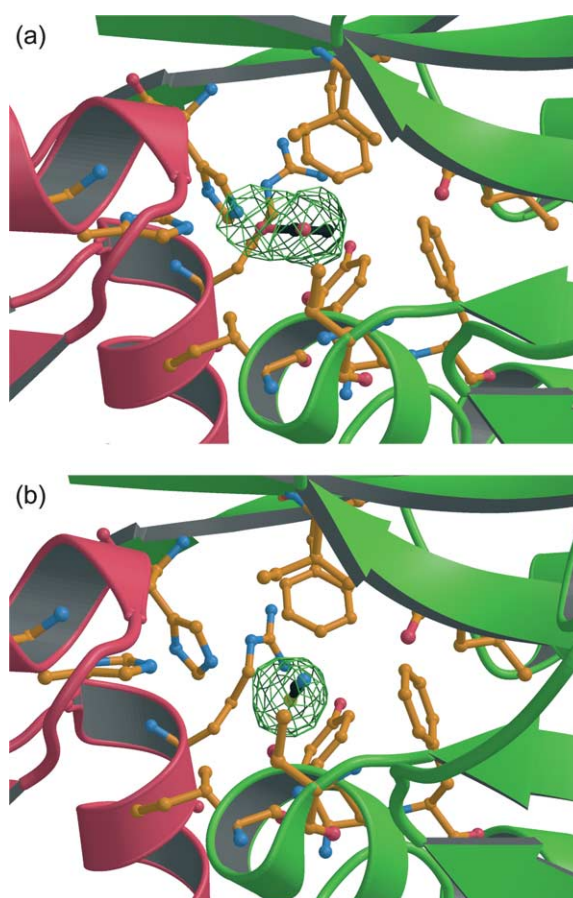
As in the structure of CysB,<sup>17</sup> the inducer-binding cavities are found at the interfaces of sub-domains I and II in each monomer of DntR. In the structure of DntR these are vase-shaped and are approximately 10 Å deep with a diameter of 7 Å. The entrance to these cavities is polar, being lined by side-chains of H169, H206, T104 and main-chain atoms of T104 and L151. The surface of the interior is largely hydrophobic, being lined by the side-chains of the residues I106, G107, Y110, F111, G152, F167, R248 and I273. In the crystals obtained from an acetate-containing solution, a single acetate ion is bound in each of the two cavities in the dimer (Figure 4(a)). These ions are located towards the top of each cavity and are held in place (Figure 5(a)) by a number of protein–ligand interactions. One oxygen atom of the acetate carboxyl group forms strong hydrogen bonds to the N<sup>ε2</sup> atoms of both H169 and H206. The second is involved in a direct hydrogen bond to O<sup>γ</sup> of T104 as well as two water-mediated interactions (both



**Figure 3.** The crystal structure of DntR. Ribbon representations of the homodimers found in acetate-bound crystals (a) and thiocyanate-bound crystals (b) of DntR. In both cases, sub-domains I and II of the IDB are shown in green and red, respectively, and the ordered portion of the linker helix seen for monomer B is shown in blue. The acetate and thiocyanate moieties that are found in the inducer-binding pocket of both monomers are shown in a space-filling representation. This Figure and Figures 4–9 were prepared using the program PyMol.<sup>40</sup>

via the same water molecule): one with the main-chain amide group of T104 and one with the carbonyl oxygen of L151. Longer-range hydrophobic interactions between the methyl group of the acetate moiety and the side-chain or main-chain atoms of G107, I273 and F111 reinforce protein–acetate interactions.

In the crystals obtained from a thiocyanate-containing solution each of the two cavities contains a thiocyanate ion. Here (Figure 4(b)) the ion is situated somewhat deeper in the cavity than acetate, but binds to the protein through a similar combination of H-bonding and hydrophobic interactions.



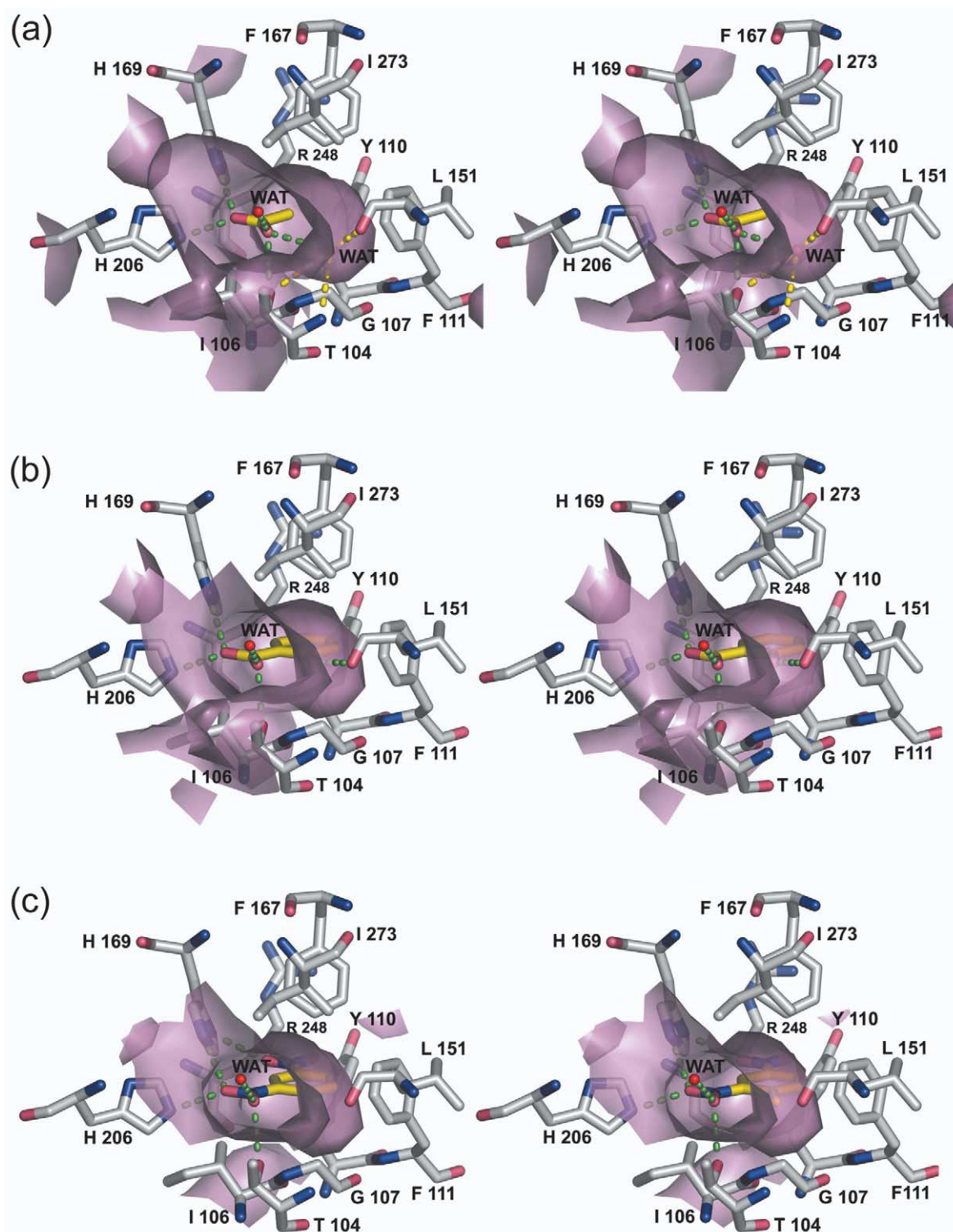
**Figure 4.** The “omit” electron density maps for the inducer-binding cavities of DntR. The acetate-bound crystals (a) and the thiocyanate-bound crystals (b). The backbone of the DntR residues is shown as a ribbon representation with residues from sub-domain I of the IDB coloured red and those from sub-domain II shown in green. The side-chain atoms of the amino acid residues that line the cavity as well as the acetate and thiocyanate moieties bound in it are shown in a ball-and-stick representation with carbon atoms coloured orange and black (for the ligands), oxygen atoms red, nitrogen atoms blue and the sulphur atom (of the thiocyanate moiety) yellow. Also shown, in green “chicken wire” is the “omit” electron density ( $mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ ,  $\alpha_{\text{calc}}$ ), contoured at the  $3 \times$  r.m.s. level, calculated after a round of refinement in which the occupancy of the acetate and thiocyanate groups were set to zero.

In these crystals the presence of thiocyanate in the inducer-binding cavity is consistent with the results from our fluorescence-quenching measurements (see Figure 2(b)).

#### Modelling of salicylate and 2,4-DNT into the inducer-binding cavity

As can be seen in Figure 5(a), the inducer-binding cavities can clearly accommodate a much larger moiety than acetate or thiocyanate. Using the positions of the acetate ions as markers we have manually positioned salicylic acid in both cavities (Figure 5(b)). In our model, it is clear that





**Figure 5.** DntR–ligand interactions. Stereoviews showing substrate–protein interactions for the acetate-bound crystals (a) and for the models of DntR containing salicylate (b) and 2,4-DNT (c) in the inducer-binding cavities. The surface defined by protein residues is shown in light purple. Both side-chain and main-chain atoms of amino acid residues that line the inducer-binding cavity are shown in ball-and-stick representation with carbon atoms coloured grey, oxygen atoms red and nitrogen atoms blue. Acetate, salicylate and 2,4-DNT are also shown in ball-and-stick mode with carbon atoms coloured yellow, oxygen atoms red and nitrogen atoms blue. Water molecules are shown as red spheres. Direct and water-mediated hydrogen bonding interactions are shown as green and yellow broken lines, respectively.

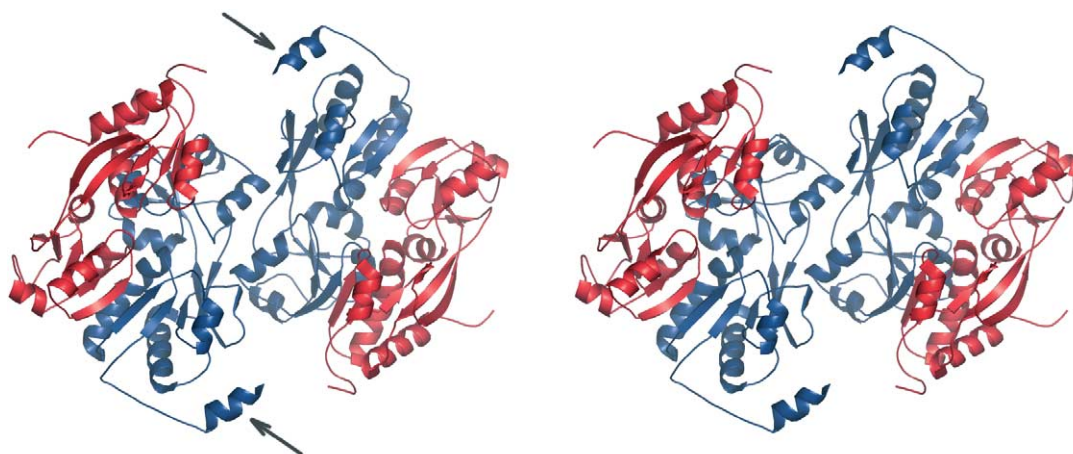
binding of salicylate by DntR could be accomplished with only minor rearrangements in the positions of the side-chains defining the surface of the cavity. The carboxyl group of the salicylic acid forms direct hydrogen bonds to the side-chain atoms of H169, H206 and T104. Its hydroxyl group occupies the space taken by a water molecule in the acetate-bound crystals where it likely forms direct hydrogen bonds with the main-chain amide of T104 and the carbonyl oxygen of L151. The aromatic ring of salicylic acid participates in many more hydrophobic interactions (particularly involving Y110, F111 and I273) with the interior of the inducer-binding cavity than either the methyl group of the acetate ions or the sulphur atom of the thiocyanate ions found in the inducer-binding pockets in the crystal structures that we report. These latter clearly contribute to the specificity of DntR for salicylic acid.

We have also manually modelled 2,4-DNT into the binding cavity, this time using the acetate group seen in our crystals as a template for the position of its 2-nitro group. In this orientation (Figure 5(c)) the oxygen atoms of the 2-nitro group of 2,4-DNT form favourable interactions with H206 and T104. However, interactions between the carbon atoms of the aromatic ring and the side-chains of F111 and F167 are unfavourable, as are those between the oxygen atoms of the 4-nitro group of 2,4-DNT and the side-chain atoms of Y110, and R248. Figure 5(c) also shows that oxygen atoms from both the 2-nitro and 4-nitro groups of 2,4-DNT appear to form hydrogen bonds with different nitrogen atoms in the side-chain of H169. However, unless H169 is doubly protonated, at least one of these potential hydrogen bonds with 2,4-DNT will be unfavourable. Additionally, other interactions between 2,4-DNT and the side-chain of H169 are also unfavourable, with several inter-atomic distances being 3.0 Å or less. Taken together

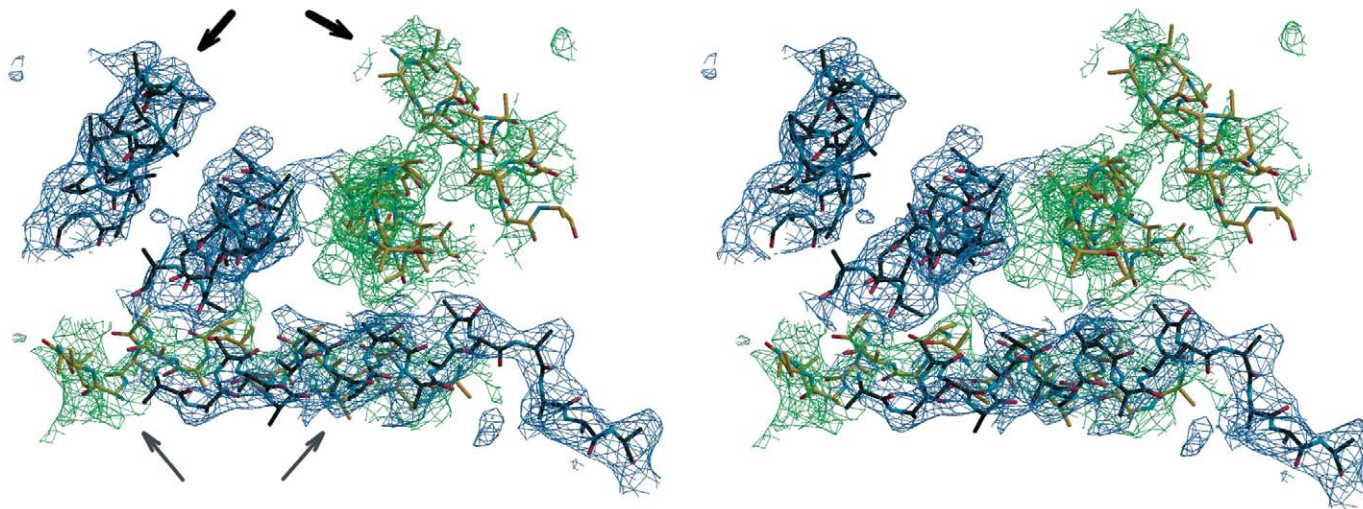
the number of unfavourable interactions seen in our model for 2,4-DNT binding suggests a lack of specificity of DntR for 2,4-DNT and confirms both the results of Ng & Forsman<sup>13</sup> and those of our fluorescence quenching measurements (cf. Figure 2(a)).

#### Quaternary structure of the active DntR tetramer and modelling of the N-terminal DNA binding domain

As described above, the asymmetric units of the crystal structures of DntR reported here contain a homodimer with a head-to-tail orientation of the monomers (Figure 3). However, gel filtration studies (data not shown) demonstrate that in solution DntR is, as are other LysR transcription regulators,<sup>25,26</sup> a homotetramer. Examination of the packing between molecules in our crystals reveals the structure of a homotetramer (Figure 6). This homotetramer consists of a dimer of dimers with the buried surface at the dimer–dimer interface being 839 Å<sup>2</sup>. In this tetramer the IBDs of DntR adopt a “head-tail-head-tail” arrangement similar to that recently reported for the structure of full-length CbnR.<sup>16</sup> We have also solved and refined, to 3.0 Å resolution, the structure of DntR in crystals obtained from a third crystallisation condition (see Methods). Both unit cell dimensions and space group are the same as those reported here for the acetate and thiocyanate-bound structures. The structure of the DntR IBD is identical to that found in the latter crystals (r.m.s. deviations in C<sup>α</sup> positions are 0.23 Å and 0.33 Å, respectively). However, somewhat paradoxically for a lower resolution structure, the residual electron density for the N-terminal HTH domain is clearer than in either the acetate and thiocyanate-bound crystals. This observation has allowed us to position, but not refine, the linker helices and the two helices in

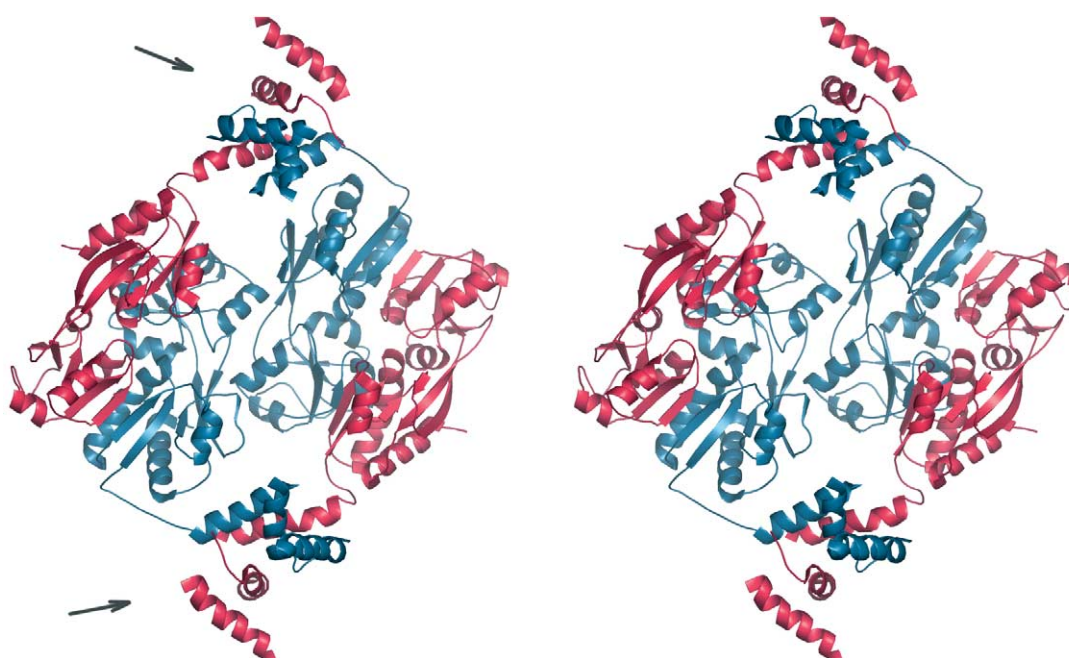


**Figure 6.** The DntR homotetramer. (a) A ribbon representation of the homotetramer of DntR. The two molecules that make up the dimer in the asymmetric unit of the DntR crystals are shown in red and blue, respectively. The arrows indicate the position of the linker helices of the monomers. (b) The homotetramer is the result of the interaction of two homodimers related by a crystallographic symmetry such that the two dimers that constitute the homotetramer have co-ordinates  $(x, y, z)$  and  $(1 - x, y, 1/2 - z)$ .



**Figure 7.** Residual electron density for the N-terminal linker helices and HTH domain as seen in a crystal structure isomorphous to those reported here. The residual electron density ( $2mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}, \alpha_{\text{calc}}$ ) is shown in green chicken wire for monomer A and blue chicken wire for monomer B. In both cases the electron density is contoured at the  $0.6 \times \text{r.m.s.}$  level. For both monomers the linker helices (see thin arrows) and the two helices in the HTH domain (see thick arrows) can clearly be positioned.





**Figure 8.** The structure of the full-length DntR homotetramer. The putative structure of the full-length DntR homotetramer with the N-terminal domains modelled as described in the text. The monomers in the head-to-head dimers, two of which come together to form the DntR homotetramer, are shown in red (the extended monomer) and blue (the compact monomer). As they could not be reliably traced, the loops in the N-terminal domain containing the linker helices and the HTH domain are not shown. The arrows indicate the positions of the HTH domains.

the HTH domain for both DntR monomers found in the asymmetric unit of our crystals (Figure 7) and to produce a model of the full-length DntR homotetramer (Figure 8). At first sight our model of the full length DntR homotetramer is very similar to that reported for CbnR.<sup>16</sup> In our model the homotetramer actually consists of two oppositely directed dimers in a head-to-head arrangement where one monomer has an “extended” structure in which the angle between the long axis of the linker helix and that of the IBD is obtuse. The second monomer has a “compact” structure in which the angle referred to above is acute (Figure 8). Additionally, the relative orientation of the HTH domains in the head-to-head dimers is very similar to that found for CbnR with the distance between the recognition helices being around 31 Å in the full length DntR model and 30 Å in the structure of CbnR.

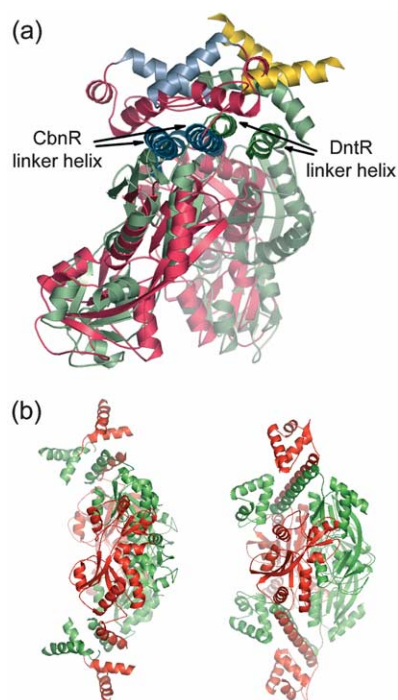
Nevertheless, although CbnR and DntR tetramers have globally similar structures, a superposition reveals differences between them. Perhaps the most significant of these is that, when compared to CbnR, the long axes of the linker helices in both monomers that make up the head-to-head dimers in DntR are translated horizontally by around 12 Å perpendicular to the approximate plane defined by the IBDs (Figure 9(a)). This means that the dispositions of the four DNA binding domains are different in the two structures (Figure 9(b)). In the structure of CbnR these form a concave surface while in the putative structure for the full length DntR, the two pairs of DNA binding domains are much further

apart. These differences in the quaternary structure may be significant and are discussed below.

## Discussion

Our modelling work indicates that efficient binding of salicylic acid does not require any large structural changes in the inducer-binding pocket of DntR. In contrast, the efficient binding of 2,4-DNT would probably require mutation of one or several of the amino acid residues F111, Y110, F167, H169, R248. These mutations are required to provide both a larger binding pocket and a binding pocket with the modified chemical properties needed to engender more favourable interactions between the protein and 2,4-DNT. Our structurally based prediction of potential amino acid residues requiring mutation tallies well with the available biochemical evidence. Gene shuffling experiments<sup>13</sup> have revealed a double mutant (F111L, R97C) of DntR with marginally enhanced sensitivity to DNTs. While the role of R97 is unclear, the effect of the F111L mutation would clearly be an enlargement of the inducer-binding pocket.

An analysis of the effects of amino acid mutations on the inducer-binding properties of another salicylate-activated LysR family member, NahR from *Pseudomonas*,<sup>27</sup> also supports our conclusions about the design of the inducer-binding pocket. Amino acid sequences of NahR and DntR share 60% identity and the structures of these proteins are presumably very similar. For NahR it



**Figure 9.** A comparison of the full-length structures of DntR and CbnR. (a) A superposition of the modelled, full-length DntR dimer with head-to-head orientation of monomers (green ribbons with recognition helices coloured yellow) and the structure obtained for the CbnR dimer (red ribbons with recognition helices coloured blue). Although the IBDs of the two compact monomers superimpose well, the IBD of the DntR extended monomer is tilted and rotated with respect to that of CbnR. The relative positions of the linker helices in the two dimers are translated resulting in the shift in the positions of the HTH-motif of the DNA binding domains. (b) A comparison of the quaternary structures of DntR (left) and CbnR (right). The more open conformation of the former is consistent with a decrease of the DNA bending in the protein–DNA complexes of activated LysR transcriptional regulators. Monomers forming head-to-head dimers are shown in red and green.

was particularly shown that the single mutations N169D and R248C (numbering according to the NahR sequence) resulted in a protein with increased affinity for a number of benzoic acid derivatives. R248 is conserved between the sequences of NahR and DntR and in the structure of the latter it is involved in stabilisation of the inducer-binding cavity. According to our prediction (see Results), this residue may need to be mutated to enhance the specificity of DntR for 2,4-DNT. The residue N169 is next to H170, which seems to participate directly in the inducer binding in NahR as H169 does in DntR.

Further support for our conclusions regarding possible mutations to DntR is provided from the analysis of the recently reported identical primary structures of two transcriptional regulators NbzR from *Comamonas* sp. JS765 and NtdR from *Acidovorax* sp. JS42. These respond to the presence of nitro-substituted toluenes as well as that of

salicylate.<sup>28</sup> The sequences of these two transcriptional regulators differ from that of DntR by five amino acid substitutions: I74V; H169L; K189R; P227S and I232V. Of these substitutions H169L would directly affect inducer binding according to our model of the structure of DntR. It is thus clear from both structural and biochemical data that this residue is a prime candidate when considering amino acid substitutions that would modify the inducer-binding properties of DntR.

The structure of the IBD of DntR reported here along with our modelling of the putative structure of full-length DntR has ramifications when considering the mechanism by which LysR family members control transcription. Both DntR and CbnR (the only other full-length LysR transcription factor that has been crystallised) adopt the same homotetrameric structure and it is probable that all LysR transcription regulators adopt this structural arrangement *in vivo*.

Our model of the putative structure of full-length DntR indicates that the orientations of the HTH domains with respect to IBDs are different in the structures of DntR and CbnR with the result that the two pairs of HTH domains are much further apart in the former. It is thus clear that full-length LysR transcription factors can adopt at least two rather different conformations. The structure of CbnR contains no molecules in the inducer-binding pocket and should represent the structure of a LysR transcriptional regulator in its inactive form. In contrast, the DntR inducer-binding pockets have substrate bound and our model is likely to represent the structure of a LysR transcriptional regulator in its active form.

It has been proposed that activation of transcription by LysR regulatory proteins is the result of a significant conformational change of the protein–DNA complex upon inducer binding.<sup>15,21</sup> This is proposed to result in a decrease of the DNA bending caused by pre-bound transcriptional activator.<sup>19,29,30</sup> The assignment of our model of the full-length structure of DntR as one typical of a LysR regulatory protein in its active conformation is consistent with this idea. LysR family members bind to DNA both in the presence and absence of inducer molecules and the same length of DNA bound by a LysR protein in its active form would clearly be much less bent than when it is bound to the concave surface presented by an inactive protein (as represented by the structure of CbnR). The models that we refer to may thus provide a structural insight as to how binding of inducer-molecules by LysR regulatory proteins can modulate DNA bending.

## Methods

### Cloning, expression, purification and characterisation of DntR

The amino acid sequence used for all the studies of

DntR described here was that available for *Burkholderia* sp. DNT from Ng & Forsman.<sup>13</sup> This sequence differs from that generally available (TrEMBL; AAP70493) because it contains eight additional residues (MNNG EGEV) at the N terminus and a T192S mutation on the core of the sequence. The sequence was further modified by the addition of a hexa-histidine tag at the C terminus of the protein to give a DntR-6His construct. However, the residue numbering used throughout this text refers to the 301 amino acid residue sequence available in the SwissProt/TrEMBL database.

The *DntR* gene from *Burkholderia* sp. strain DNT was PCR amplified from the vector pLCN60.9<sup>13</sup> using the forward primer TATTATCAAACCATGGCTAACGGT GAGGGTGAGGTCATG containing a NcoI site and the reverse primer TATCATTATCAGATCTTGCTTCAGA GAAAAGCTCGAC containing a BglII site. The *DntR* amplicon was ligated into the cloning ATG-vector pQE60 (QIAGEN) and transformed to *E. coli* strain M15[pREP4] cells (QIAGEN).

Cells were grown aerobically at 37 °C in Luria-Bertani medium supplemented with 100 µg/ml ampicillin and 25 µg/ml kanamycin. The expression of DntR-6His was induced by addition of 1 mM IPTG. The cells were harvested after five hours and frozen. The cells were then crushed with X-Press (AB BIOX, Sweden) and suspended in a buffer containing 0.3 M NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH (pH 8.0), 1 mM MgSO<sub>4</sub>, DNase II (Boehringer) and Complete EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail (Roche). The cell lysate was clarified by centrifugation at 210,000g (90 minutes) and supplemented with 10 mM imidazole. The DntR-6His protein was purified on a column with Ni-NTA Superflow resin (QIAGEN) equilibrated with 10 mM imidazole, 0.3 M NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH (pH 8.0). The protein was eluted with the imidazole concentration gradient ranging from 10 mM to 250 mM. Fractions containing a single polypeptide of ~35 kDa, as shown by SDS-PAGE analysis, were typically eluted between 97 mM and 156 mM imidazole. These were pooled, concentrated to half-volume, dialysed against the buffer consisting of 0.3 M NaCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, 17% (v/v) glycerol, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH (pH 7.5) and concentrated to 10 mg protein per ml by ultra-filtration. The purified protein solution was flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

Selenomethionine incorporation was achieved using the metabolic inhibition method.<sup>31</sup> The purification procedure was generally the same as for the native protein except that 10 mM β-mercaptoethanol and 0.1 mM EDTA were added to the chromatographic buffers and the dialysis buffer was flushed with nitrogen. Selenium for sulphur substitution was verified using MALDI-TOF mass spectroscopy with a sinapinic acid matrix (Voyager-DE, Applied Biosystems) and indicated a substitution rate of ~90%.

### Gel filtration

Gel filtration was performed on a Superdex 200 preparative grade column (Amersham) in a buffer containing 0.3 M NaCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM β-mercaptoethanol, 1.7% glycerol, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH (pH 7.5). Chymotrypsinogen A (25 kDa), ovalbumin (43 kDa), bovine serum albumin (67 kDa) and aldolase (158 kDa) were used for molecular size calibration (Amersham).

### Fluorescence measurements

The fluorescence spectra from 280 nm to 400 nm with excitation at 274 nm were recorded at 22 °C using a Perkin-Elmer instrument and emission values at 326 nm were used in the data processing.

We assume that the observed relative change in the fluorescence intensity ( $\Delta F/F_0$ ) was proportional to the fraction of the protein-inducer complex:

$$\Delta F/F_0 = 0.5k(K_d + [P] + [I] - \sqrt{(K_d + [P] + [I])^2 - 4[P][I]}) \quad (1)$$

where  $\Delta F = F_0 - F_1$  ( $F_0$  and  $F_1$  are the fluorescence levels before and after addition of the inducer, respectively),  $k$  is a constant;  $K_d$  is the dissociation constant and  $[P]$  and  $[I]$  are the molar concentrations of DntR and the inducer molecule, respectively. This model (equation (1)) takes into account that both concentrations of the free inducer and of the free protein decrease upon complex formation.  $K_d$  was estimated by non-linear regression from the dependence of the relative fluorescence quenching upon increasing the inducer concentration with the aid of the program Sigma Plot (SPSS Inc.) and the software package GIM (Graphic Interactive Management developed by Alexander L. Drachev).

As both salicylic acid and 2,4-DNT are fluorescent compounds the saturation of quenching could not be observed because of the inner filter effect, thus for these inducers only the first part of the titration curve (up to 100 µM inducer) was used for the estimation of  $K_d$ .

### Electrophoretic mobility shift assay

The assay was performed essentially as described in the literature.<sup>32</sup> A 120 bp DNA fragment containing the P<sub>DNT</sub> promoter sequence was obtained by PCR on the template pLCN32\_6<sup>13</sup> with primers CAGGGGTTCTACT ACCAGTT (forward) and TATGGGTGATTTAACTA (reverse) and purified with a PCR purification kit (QIAGEN). The 5' end of the fragment was labelled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Redivue, Amersham) using the forward polynucleotide-kinase reaction<sup>33</sup> and was purified with a QIA Nucleotide Purification Kit (QIAGEN).

Incubation of purified DntR with the labelled DNA fragment ( $5 \times 10^3$ – $20 \times 10^3$  cpm) was carried out at 22 °C for 40 minutes in 50 mM NaCl, 0.4 mM EDTA, 1 mM DL-dithiothreitol, 10% glycerol, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mg/ml BSA, 2 µg/ml poly(dI-dC)-poly(dI-dC) double strand (Amersham). Electrophoresis was carried out on 6% (w/v) polyacrylamide DNA Retardation Gels (Novex) using the running buffer containing 44.5 mM Tris, 44.5 mM boric acid, 1 mM EDTA (pH 8.9). After electrophoresis the gels were dried in filter paper and exposed to Fuji New RX medical X-ray film at -70 °C. In order to assess DNA binding in the presence of an inducer molecule, taking into account the negative charge of the salicylate moiety, 10 mM sodium salicylate was added to both the incubation medium and the running buffer.

### Crystallisation, data collection, data processing and structure solution

Crystals of the native protein were grown at 18 °C using the hanging-drop method by mixing 1 µl of the protein stock solution (8–10 mg ml<sup>-1</sup> protein) and 1 µl



of a reservoir solution. For the acetate-bound crystal (Table 1) the reservoir solution consisted of 0.1 M imidazole (pH 6.5) and 1.0–1.2 M sodium acetate. For the thiocyanate-bound crystal form the reservoir contained 0.2 M sodium tartrate, 0.2 M potassium thiocyanate, 0.5 mM sodium salicylate, 0.1 M Tris (pH 8.5) and 20% (w/v) PEG 8000. Crystals of the selenomethionyl derivative were obtained using a reservoir solution made up of 0.1 M imidazole (pH 6.5), 2.0 M sodium acetate and 2 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) and seeding was occasionally required. For the crystal form with better defined position of HTH domains (mentioned in Results as a third crystallisation condition) the reservoir contained 0.2 M magnesium acetate, 0.1 M sodium cacodylate (pH 6.5), 22% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol and 5 mM sodium salicylate. In all cases, indexing of initial diffraction images indicated that the crystals belonged to the trigonal or hexagonal crystal systems with unit cell dimensions of approximately  $a = b = 107 \text{ \AA}$ ;  $c = 297 \text{ \AA}$ .

The initial structure determination was carried out using the SAD technique using X-ray diffraction data from a single crystal of the selenomethionyl protein collected on beam-line ID14-EH2 of the ESRF. Determination of the positions of the selenium atoms in the crystal was carried out with anomalous difference data using direct methods as implemented in the program SHELXD.<sup>34,35</sup> Input command and data files for the program were prepared using the BrukerNonius program XPREP with data used in the search procedure being truncated at 4.5 Å resolution, which was the point where  $\langle \Delta F/F \rangle$  fell below 1.5 (as calculated using XPREP). The top 22 sites from the direct methods procedure were taken for further refinement and phase determination using data to 3.0 Å with the program SHARP.<sup>36</sup> 20 sites were finally accepted after this with the quality of experimentally phased ( $F_{\text{obs}}$ ,  $\Phi_{\text{best}}$ , FOM) electron density maps clearly indicating the correct space group to be  $P6522$ . Improvement of the experimentally obtained phases was then carried out using solvent flattening, histogram matching and 2-fold non-crystallographic symmetry (NCS) averaging in the program DM. The resulting electron density map ( $F_{\text{obs}}$ ,  $\Phi_{\text{DM}}$ , FOM<sub>DM</sub>) was of outstanding quality, allowing easy interpretation and manual building, using the program O,<sup>37</sup> of a starting model for refinement. It was clear that for both monomers in the asymmetric unit the N-terminal, DNA-binding, domain was disordered and the starting model thus consisted of only residues 90–301 for both molecules. Structure refinement was carried out imposing strong NCS restraints on the positions of the atoms using the program REFMAC5 interspersed with rounds of manual rebuilding in O.

X-ray diffraction data from a single acetate-containing crystal were collected on beam-line ID29 of the ESRF. The structure of a monomer of the SeMet protein was then used as a probe for molecular replacement (MR) calculations using data in the range 15–3.5 Å using the program AmoRe.<sup>38</sup> The initial phases obtained from the resulting homodimeric model were then extended to  $d_{\text{min}} = 2.6 \text{ \AA}$  using a combination of NCS averaging, solvent flattening and histogram-matching as implemented in the program DM after first calculating reliable  $\sigma_A$ -weighted figures of merit for the MR phases with the program SIGMAA. Model refinement, during which water, glycerol and acetate moieties were included, was carried out as described above.

X-ray diffraction data from a single thiocyanate-containing crystal were collected on beam-line ID14-

EH1 of the ESRF. A monomer taken from the final refined model for acetate-bound DntR, stripped of water, glycerol and acetate molecules was used as a probe for MR calculations using data in the range 15–3.0 Å using the program MOLREP. The resulting homodimeric model was then refined as before with several thiocyanate ions, including two in the inducer-binding pockets as the refinement procedure progressed.

The data from all three crystals were integrated and scaled using the programs MOSFLM and SCALA with structure factors and anomalous differences being obtained using the program TRUNCATE. Statistics showing the results of all data collection, data processing and structure refinement protocols are shown in Table 1. Unless otherwise specifically referenced all programs used are distributed *via* the CCP4 package.<sup>39</sup>

### Protein Data Bank atomic co-ordinates

Atomic co-ordinates and structure factor data for the X-ray structures referred to here (DntR (acetate-bound) and DntR (thiocyanate-bound)) have been deposited in the Protein Data Bank (accession codes 1UTB and 1UTH, respectively). Co-ordinates for the modelled structure of full length DntR are available from the authors upon request.

## Acknowledgements

We thank Lena Sarholm & Mats Forsman (The Swedish Defence Research Agency, FOI) for valuable discussions and support, and also for bacterial strains and vectors holding the *dntR* gene. I.A.S. thanks Margareta Svensson-Ek, Gisela Larsson, Karin Valegård & Tove Sjögren for valuable advices concerning protein crystallisation. These studies were supported by FOI.

## References

1. Rickert, D. E., Butterworth, B. E. & Popp, J. A. (1984). Dinitrotoluene: acute toxicity, oncogenicity, genotoxicity, and metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* **13**, 217–234.
2. King, J. M. H., DiGrazia, P. M., Applegate, B., Burlage, R., Sanseverino, J., Dunbar, P. *et al.* (1990). Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science*, **249**, 778–781.
3. Heitzer, A., Malachowsky, K., Thonnard, J. E., Bienkowski, P. R., White, D. C. & Sayler, G. S. (1994). Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bio-availability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1487–1494.
4. Ripp, S., Nivens, D. E., Werner, C. & Sayler, G. S. (2000). Bioluminescent most-probable-number monitoring of a genetically engineered bacterium during a long-term contained field release. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 736–741.
5. Willardson, B. M., Wilkins, J. F., Rand, T. A., Schupp, J. M., Hill, K. K., Keim, P. & Jackson, P. J. (1998). Development and testing of a bacterial biosensor for

- toluene-based environmental contaminants. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1006–1012.
6. Stiner, L. & Halverson, L. J. (2002). Development and characterization of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for bioavailable toluene and related compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1962–1971.
  7. Nishino, S. F., Paoli, G. C. & Spain, J. C. (2000). Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2139–2147.
  8. Spanggard, R. J., Spain, J. C., Nishino, S. F. & Mortelmans, K. E. (1991). Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3200–3205.
  9. Suen, W. C. & Spain, J. C. (1993). Cloning and characterization of *Pseudomonas* sp. strain DNT genes for 2,4-dinitrotoluene degradation. *J. Bacteriol.* **175**, 1831–1837.
  10. Haigler, B. E., Nishino, S. F. & Spain, J. C. (1994). Biodegradation of 4-methyl-5-nitrocatechol by *Pseudomonas* sp. strain DNT. *J. Bacteriol.* **176**, 3433–3437.
  11. Johnson, G. R., Jain, R. K. & Spain, J. C. (2002). Origins of the 2,4-dinitrotoluene pathway. *J. Bacteriol.* **184**, 4219–4232.
  12. Suen, W. C., Haigler, B. E. & Spain, J. C. (1996). 2,4-Dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT: similarity to naphthalene dioxygenase. *J. Bacteriol.* **178**, 4926–4934.
  13. Ng, L. C., Forsman, M. (2000). Whole cell biosensor for the detection of explosives. The FOA Defence Research Establishment research report.
  14. Zhou, N. Y., Fuenmayor, S. L. & Williams, P. A. (2001). *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *J. Bacteriol.* **183**, 700–708.
  15. Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 597–626.
  16. Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K. & Senda, T. (2003). Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J. Mol. Biol.* **328**, 555–566.
  17. Tyrrell, R., Verschueren, K. H., Dodson, E. J., Murshudov, G. N., Addy, C. & Wilkinson, A. J. (1997). The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. *Structure*, **5**, 1017–1032.
  18. Lorenz, E. & Stauffer, G. V. (1995). Characterization of the MetR binding sites for the *glyA* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 4113–4120.
  19. Hryniewicz, M. M. & Kredich, N. M. (1991). The *cysP* promoter of *Salmonella typhimurium*: characterization of two binding sites for CysB protein, studies of *in vivo* transcription initiation, and demonstration of the anti-inducer effects of thiosulfate. *J. Bacteriol.* **173**, 5876–5886.
  20. Schell, M. A. & Poser, E. F. (1989). Demonstration, characterization, and mutational analysis of NahR protein binding to *nah* and *sal* promoters. *J. Bacteriol.* **171**, 837–846.
  21. Perez-Martin, J., Rojo, F. & de Lorenzo, V. (1994). Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression. *Microbiol. Rev.* **58**, 268–290.
  22. Tetin, S. Y. & Hazlett, T. L. (2000). Optical spectroscopy in studies of antibody–hapten interactions. *Methods*, **20**, 341–361.
  23. Holm, L. & Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **233**, 123–138.
  24. Choi, H., Kim, S., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J., Storz, G. & Ryu, S. (2001). Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor. *Cell*, **105**, 103–113.
  25. Hryniewicz, M. M. & Kredich, N. M. (1994). Stoichiometry of binding of CysB to the *cysJIH*, *cysK*, and *cysP* promoter regions of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**, 3673–3682.
  26. Akakura, R. & Winans, S. C. (2002). Mutations in the *occQ* operator that decrease OccR-induced DNA bending do not cause constitutive promoter activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 15773–15780.
  27. Cebolla, A., Sousa, C. & de Lorenzo, V. (1997). Effector specificity mutants of the transcriptional activator NahR of naphthalene degrading *Pseudomonas* define protein sites involved in binding of aromatic inducers. *J. Biol. Chem.* **272**, 3986–3992.
  28. Lessner, D. J., Parales, R. E., Narayan, S. & Gibson, D. T. (2003). Expression of the nitroarene dioxygenase genes in *Comamonas* sp. strain JS765 and *Acidovorax* sp. strain JS42 is induced by multiple aromatic compounds. *J. Bacteriol.* **185**, 3895–3904.
  29. Ogawa, N., McFall, S. M., Klem, T. J., Miyashita, K. & Chakrabarty, A. M. (1999). Transcriptional activation of the chlorocatechol degradative genes of *Ralstonia eutropha* NH9. *J. Bacteriol.* **181**, 6697–6705.
  30. Huang, J. Z. & Schell, M. A. (1991). *In vivo* interactions of the NahR transcriptional activator with its target sequences. Inducer-mediated changes resulting in transcription activation. *J. Biol. Chem.* **266**, 10830–10838.
  31. Doublet, S. (1997). Preparation of selenomethionyl proteins for phase determination. *Methods Enzymol.* **276**, 523–530.
  32. Buratowski, S. & Chodosh, L. A. (1998). Mobility shift DNA-binding assay using gel electrophoresis. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K., eds), pp. 12.2.1–12.2.11, Wiley, New York.
  33. Tabor, S. (1998). Phosphatases and kinases. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K., eds), pp. 3.10.1–3.10.5, Wiley, New York.
  34. Sheldrick, G. M. (1986). Shelxs86. Program for Crystal structure Solution, University of Gottingen.
  35. Sheldrick, G. M. (1998). *Shelx: Application to Macromolecules. Direct Methods for Solving Macromolecular Structures* (Fortier, S., ed.), Kluwer AP, Dordrecht.
  36. Fortelle, E. d. l. & Brigogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. In *Methods in Enzymology* (Carter, C. W. & Sweet, R. M., eds), vol. 276, pp. 472–494, Academic Press, San Diego.
  37. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallog. sect. A*, **47**, 110–119.



- 
38. Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallog. sect. A*, **50**, 157–163.
39. Collaborative Computational Project, No. 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallog. sect. D*, **50**, 760–763.
40. DeLano, W. L. (2002). *The PyMol molecular graphic system*, DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.

*Edited by K. Morikawa*

*(Received 29 December 2003; received in revised form 19 April 2004; accepted 19 April 2004)*