

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca



El presente formulario debe ser diligenciado en su totalidad como constancia de entrega del documento para ingreso al Repositorio Digital (Dspace).

TITULO	Degradación del pentaeritritol Tetranitrato (PETN) por bacterias aisladas de ambientes con presencia de explosivos		
SUBTITULO			
AUTOR(ES) Apellidos, Nombres (Completo) del autor(es) del trabajo	García Gutiérrez, Andrea		
PALABRAS CLAVE (Mínimo 3 y máximo 6)	Pentaeritritol Tetranitrato		pH y temperatura
	Biorremediación		
	co-cultivo		
RESUMEN DEL CONTENIDO (Mínimo 80 máximo 120 palabras)	<p>El uso del Pentaeritritol Tetranitrato PETN en diferentes actividades industriales, impacta el ambiente, especialmente suelo y agua. En la búsqueda de minimizar este impacto, se buscan alternativas biológicas ambientalmente amigables (Biorremediación). El objetivo de esta investigación fue aislar microorganismos con capacidad degradadora de PETN en ambientes con presencia de explosivos. La metodología incluyó seleccionar microorganismos con capacidad de degradación, evaluación del comportamiento a diferentes valores de pH, temperatura y concentración de explosivo. Se encontró que dos bacterias que siempre se comportaron como co-cultivos presentaron el mejor comportamiento degradador de PETN, el pH y la temperatura no influyeron en su comportamiento, pero si la concentración de PETN. Se concluye que los microorganismos en co-cultivo aumentan las posibilidades de degradación de explosivos.</p>		

Autorizo (amos) a la Biblioteca Octavio Arizmendi Posada de la Universidad de La Sabana, para que con fines académicos, los usuarios puedan consultar el contenido de este documento en las plataformas virtuales de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

**Degradación del pentaeritritol tetranitrato (PETN) por bacterias
aisladas de ambientes con presencia de explosivos**

Andrea García Gutiérrez

**Universidad de la Sabana
Facultad de Ingeniería
Maestría en Diseño y gestión de Procesos
Junio de 2013**

**Degradación del pentaeritritol tetranitrato (PETN) por bacterias
aisladas de ambientes con presencia de explosivos**

Andrea García Gutiérrez

**Trabajo de investigación presentado como requisito parcial
para optar al título de
Magister en Diseño y Gestión de procesos con énfasis en Biosistemas**

Director

**Joaquín Lorenzo Benavidez López de mesa.
Magister en Microbiología
Docente investigador Universidad de la Salle.**

Codirector(a).

**Dra. Ligia Consuelo Sánchez Ligia
Magister en Biología Aplicada
Docente Universidad de la Sabana**

**Universidad de la sabana
Facultad de ingeniería
Maestría en Diseño y Gestión de procesos
Junio 2013**

*A mis padres,
Quienes me han apoyado en este y en todos los procesos de mi vida.*

*A Ana,
Por su paciencia y ayuda, cuando estaba lejos y ahora mucho más que está cerca.*

*A Hoover,
Por su apoyo en todo momento, su paciencia, y cariño*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a quienes me colaboraron en este proceso, el proyecto me permitió no solamente obtener conocimientos en el área de la investigación sino que también me permitió conocer a personas que me apoyaron en lo personal como en lo profesional, me llenaron de muchos conocimientos para mi vida:

MSc, Joaquín Lorenzo Benavidez López de mesa, quiero agradecerle por permitirme hacer parte de su grupo de investigación y poder desarrollar este proyecto.

Dra, Clementina Cueto, Universidad de la Sabana, por su apoyo durante mi formación en la Maestría y su voz de aliento, ayuda en los momentos difíciles del proyecto.

MSc, Hoover Varón López, por hacer parte de mi vida y ayudarme a culminar esta etapa de la vida, por apoyarme en cada instante cuando lo he necesitado.

MSc, Ligia Consuelo Sánchez, Universidad de la Sabana por su ayuda y compromiso incondicionalidad en lo profesional en lo personal, su paciencia y sus palabras sabias en todo proceso para desarrollar este proyecto.

Dr. Fabio Roldán, Universidad Javeriana, por sus grandes enseñanzas conceptuales y formativas para el proyecto de investigación y por permitir hacer parte del grupo.

Dr, Ziv Arbeli, Universidad Javeriana, por compartir sus conocimientos y estar pendiente del proyecto en todo momento.

A los compañeros de la Universidad Javeriana, aquellas personas que hacen parte de laboratorios de la Unidad de Saneamiento y Biorremediación Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana (UPJ), quienes me aportaron conocimientos y sin su colaboración esta investigación no habría culminado.

A Ricardo Montealegre, por permitirme trabajar en los laboratorios de la Universidad de La Salle, por su apoyo y colaboración durante todo el desarrollo de la investigación.

A todos aquellos amigos que estuvieron pendientes y me apoyaron moral y espiritualmente me tendiéndome su mano en todo momento.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
TABLA DE CONTENIDO.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Generalidades del pentaeritritol tetranitrato (PETN).....	7
2.2 Las bacterias en la naturaleza y su importancia en la biodegradación.....	11
Co-cultivos.....	13
2.2.1 Factores ambientales que afectan la Biodegradación.....	14
pH.....	14
Temperatura.....	14
Concentración de nutrientes.....	15
2.3 Biodegradación de ésteres de nitrato.....	16
2.3.1 Nitroglicerina (GTN).....	17
2.3.2 nitrocelulosa (NC).....	20
2.3.3 pentaeritritol tetranitrato (PETN).....	20
Bacterias en la degradación de PETN.....	20
Consorcios en la degradación de PETN.....	22
2.3.4. Fitorremediación para ésteres de nitrato.....	23
3. CONTEXTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	26
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo General.....	30
4.2 Objetivos específicos.....	30
5. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	31
Fase 1. Selección de cepas con capacidad de degradación del PETN.....	31
5. 1 Aislamiento de los microorganismos.....	31
5.2 Conservación de microorganismos.....	32
5.3 Pruebas de degradación.....	32
5.3.1 Criterios de inclusión.....	32
5.3.2 Obtención del inóculo.....	33
5.3.3 Técnica de Cuantificación de explosivo.....	33
5.3.4 Técnica para Análisis estadístico.....	34
5.3.5 Técnica de secuenciación.....	34
Fase 2. Crecimiento de las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones de PETN	35
5.4 Curvas de Crecimiento.....	35

5.4.1 Criterios de inclusión.....	36
5.4.2 Preparación concentraciones de PETN.....	36
5.4.3 Obtención del inóculo.....	36
5.4.4 Crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de explosivo.....	37
5.4.5. Técnica para Análisis Estadístico.....	37
5.4.6 Método de parámetros cinéticos.....	38
Fase 3. Degradación de PETN por las cepas seleccionadas bajo parámetros de pH y temperatura.....	40
5.5 Criterios de inclusión.....	40
5.5.1 Montaje Método por sacrificio.....	40
5.5.2 Prueba de biodegradabilidad según valores de pH.....	41
5.5.3 Prueba de biodegradabilidad según valores de temperatura.....	42
5.5.4 Análisis estadístico.....	42
Fase 4. Degradación de PETN por las cepas combinadas.....	43
5.6 Criterios de inclusión.....	43
5.7. Pruebas de antagonismo.....	43
5.7.1 Técnica de Gauze modificada por enfrentamiento dual.....	44
5.8. Mezcla de cepas bacterianas.....	44
5.8.1. Ensayo de biodegradabilidad.....	45
5.8.2 Análisis estadístico.....	45
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
Fase 1. Aislamiento de microorganismos.....	46
6.1. Pruebas de biodegradabilidad.....	54
Fase 2. Crecimiento de las cepas en estudio a diferentes concentraciones de explosivos.....	58
Fase 3. Degradación de PETN por las cepas seleccionadas bajo parámetros de pH y Temperatura.....	65
6.2 Degradación de PETN según valores de pH.....	65
6.3. Degradación de PETN según valores de temperatura.....	72
Fase 4. Degradación de PETN por las cepas combinadas.....	80
6.4. Degradación de PETN por la combinación de las cepas en estudio.....	80
6.4.1 Combinación de las cepas.....	80
6.4.2 Biodegradación del PETN.....	81
CONCLUSIONES.....	87
RECOMENDACIONES.....	89
REFERENCIAS.....	91
10. ANEXOS.....	96

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los ésteres de nitrato más comunes.....	7
Figura 2. Vía de degradación del GTN mediante <i>Pseudomonas</i> sp.....	18
Figura 3. Vía de remoción de ésteres de nitrato.....	19
Figura 4. Vía de reducción del PETN por la <i>Enterobacter cloacae</i> PB2.....	21
Figura 5. Vía de reducción del EDGN por <i>Phragmites australis</i>	25
Figura 6. Porcentajes de degradación de las cepas aisladas.....	56
Figura No 7 A. Curvas de crecimiento de la cepa P29 con recuento en placa (ufc/mL) a diferentes concentraciones B. Densidad óptica (D.O) para cada uno de los tratamientos establecidos.....	63
Figura No.8 C. Curvas de crecimiento de la cepa P31 con recuento en placa (ufc/mL) a diferentes concentraciones D. Densidad óptica (D.O) para cada uno de los tratamientos establecidos.....	64
Figura No 9. Degradacion de PETN por la cepa P29. A. pH 6.0. B. pH 7.0.....	67
Figura No 10. Degradacion de PETN por la cepa P29. C. pH 8.0.....	68
Figura No 11. Degradacion de PETN por la cepa P31. A. pH 6.0. B. pH 7.0.....	69
Figura No 12. Degradación de PETN por la cepa P31. C. pH 8.0.....	70
Figura No 13. Degradación de PETN por las cepas en estudio a 20°C.....	74
Figura No 14. Degradación de PETN por las cepas en estudio a 25°C.....	75
Figura No 15. Degradación de PETN por las cepas en estudio a 30°C.....	77
Figura No 16. Degradación de PETN por las cepas en estudio a 35°C.....	78
Figura No 17. Prueba de enfrentamiento dual de las cepas en estudio.....	81
Figura No 18. Degradación del consorcio con respecto a las cepas individuales a 30°C.....	83

INDICE DE TABLAS

Tabla No 1. Tipos de explosivos usados a nivel mundial.....	5
Tabla No 2. Consumo de explosivos en Colombia.....	9
Tabla No 3. Características macroscópicas y microscópicas de las Cepas aisladas.....	47
Tabla No 4. Porcentaje de degradación.....	55
Tabla No 5. Clasificación taxonómica.....	57
Tabla No 6. Parámetros cinéticos de las cepas P29 y P31.....	61
Tabla No 7. Porcentaje de degradación de los controles abióticos a diferentes pH.....	66
Tabla No 8. Porcentajes de degradación de los controles abióticos a diferentes temperaturas.....	72

RESUMEN

El impacto ambiental causado por la producción y uso de los explosivos, es de gran preocupación a nivel mundial, por ello, las investigaciones en biorremediación de ambientes impactados con estos xenobióticos se ha centrado en la búsqueda de métodos biológicos ambientalmente amigables.

Es el caso del pentaeritritol tetranitrato el cual hace parte de un grupo de compuestos alifáticos llamados ésteres de nitrato, su uso en la medicina es común para el tratamiento de desórdenes cardiovasculares y en el área militar como explosivo de alta potencia, también es usado en actividades mineras, de construcción, exploración de petróleo y de gas, ya que junto con el TNT es un componente activo del explosivo comercial pentolita.

Colombia es un país donde su economía se encuentra ligada a la explotación de estas actividades y por lo tanto, el uso de los explosivos es frecuente. El PETN por ser componente activo de la pentolita y por su naturaleza recalcitrante, se convierte en un compuesto xenobiótico contaminante del medio ambiente. Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue la obtención de microorganismos con capacidad degradadora de PETN, aislados de ambientes con presencia de explosivos. La metodología incluyó técnicas de aislamiento y siembra de microorganismos, preparación de medios de cultivos selectivos para estos tipos de microorganismos, técnica de cuantificación de explosivo (HPLC), técnica de medición de crecimiento de los microorganismos en

concentraciones altas de explosivos, combinación de cepas y cuantificación de su capacidad degradadora.

Como resultado se obtuvieron nueve cepas bacterianas degradadoras de PETN con una capacidad superior al 50% (es decir, degradan por encima del 50% de la concentración inicial de explosivo). También se evidenció una asociación denominada co-cultivo en seis de los microorganismos obtenidos. Dentro de este grupo se eligieron las dos especies que presentaron la mayor capacidad degradadora, para este caso fueron denominadas P29 y P31, la primera se trataba de una asociación conformada por los microorganismos *Methylobacterium adhaesivum* y *Leifsonia aquatica* y la segunda por *Cupriavidus basilensis* y *Rhodococcus ruber*.

Bajo las condiciones del estudio se evidenció que la concentración de PETN influye en el crecimiento de los microorganismos debido a que al aumentar el número de células viables en el tiempo, los microorganismos continúan creciendo y posiblemente se pueda hablar de una tolerancia a las concentraciones del explosivo. Así mismo, se estableció que no existen diferencias significativas en el porcentaje de degradación del explosivo en cuanto a los valores de temperatura 20-25-30-35 °C y de pH 6.0-7.0-8.0.

Con relación a las asociaciones, se observó que hay una mayor capacidad de degradación cuando están combinadas y el cultivo se realiza a un pH 7.0 e incubación a 30°C.

Los resultados obtenidos en esta investigación, permitieron determinar los parámetros de pH y temperatura en la cual las cepas y su mezcla degradan PETN,

estableciendo de esta manera, el conocimiento básico para el diseño de un dispositivo que contenga microorganismos degradadores (consorcio) de PETN que pueda ser incorporado en el explosivo Pentolita y evaluar su degradación. A futuro se proyectan estudios de biodegradación del explosivo *in situ* para la biorremediación de suelos con presencia de explosivos.

ABSTRACT

The environmental impact caused by the production and use of explosives is of great concern worldwide. Therefore, research in bioremediation of environments impacted with these xenobiotics has been focused on the search for environmentally friendly biological methods.

Pentaerythriol tetranitrate (PETN) is part of a group of aliphatic compounds called nitrate esters. In medicine, it is commonly used to treat cardiovascular disorders while and in the military is used as a powerful explosive. It is also used in mining, construction and oil and gas exploration. Along with TNT it is an active component of the commercially available pentolite.

Colombia is a country where its economy is linked to the exploitation of the above activities and thus the use of explosives is frequent. Because PETN is an active component of pentolite and is naturedly recalcitrant becomes a xenobiotic compound that pollutes the environment. For this reason, the objective of this study was to obtain microorganisms with PETN-degrading capacity isolated from environmental sites containing explosives. The methods included; microbial isolation and culture techniques, preparation of selective media for these types of microorganisms, quantification of explosive by HPLC techniques, quantification of microbial growth in high concentrations of explosive techniques, and combination of strains and quantification of their degradation capacity.

As a result, nine PETN-degradating bacterial strains were obtained with a degradation capacity greater than 50% (degradation above 50% from the initial explosive concentration). It was also evident an association called a co-culture in six of the obtained microorganisms. Within this group, two species which had the highest degradation activity were chosen and they were denominated P29 and P31. The first one was an association formed by the microorganisms *Methylobacterium adhaesivum* and *Leifsonia aquatica* while the second one by the microorganisms *Cupriavidus basilensis* and *Rhodococcus ruber*.

Under these study conditions, it was shown that the concentration of PETN influences the growth of the microorganisms since the increase of viable cells over time results in microorganisms' continuous growth and possibly can tolerate concentrations of explosive. Likewise, it was established that there are no significant differences in the percentage of explosive degradation at temperature values of 20, 25, 30, and 35 °C and at pH 6.0, 7.0, and 8.0.

In regard with the associations, it was observed that there is a higher capacity of degradation when they are combined and the culture is done at pH 7.0 and incubated at 30 °C.

The results obtained in this study allowed the determination of the pH and temperature's parameters in which the strains and their mixture degrade PETN thus, establishing the basic knowledge to design a device that contains PETN-degrading microorganisms (consortium) which can be incorporated into the explosive pentolite and then evaluate its degradation. In the future, explosive-biodegradation studies *in situ* are projected to bioremediate soils with the presence of explosives.

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los explosivos se considera uno de los mayores hitos de la sociedad moderna, en los últimos cien años la industria ha utilizado los esteres de nitrato en la medicina para controlar los desórdenes cardíacos y en la producción de explosivos de alta potencia.

El uso Comercial de los explosivos en Colombia se encuentra relacionado con la extracción de minerales, el carbón, y explotación del petróleo, dichas actividades se han incrementado en los últimos años debido a la alta demanda internacional de la exportación de materias primas, según el informe especial de CINEP de 2012. Aunque no hay datos en Colombia de la contaminación de suelos y agua por el uso de los explosivos, ni de la cuantificación de residuos generados por su fabricación, si existe una estimación del consumo del explosivo para la minería, reportado en el “anuario estadístico minero del 2009”. Este informe muestra que el uso de los explosivos es intensivo en estas actividades y por lo tanto los impactos en el ambiente se presentan desde hace tiempo, aunque no se encuentre reportado. El pentaeritritol tetranitrato (PETN) hace parte de compuestos explosivos comerciales, dicho explosivo también es utilizado en otras actividades como las militares y de construcción.

El PETN fue clasificado a nivel mundial como “tóxico para los organismos acuáticos, por ser altamente hidrofóbico, tiene una baja solubilidad en el agua, pero puede ser transportado fácilmente por las aguas subterráneas”. (Zhuang, 2007)

El alcance e impacto de esta investigación está relacionado con el hecho de que a nivel mundial hay poca información acerca de la degradación de PETN, por lo tanto encontrar cepas bacterianas en los sitios con presencia de explosivo que puedan degradar y reducir los impactos generados en la producción, prueba de municiones y uso comercial del explosivo, abre nuevas expectativas para crear condiciones favorables para los microorganismos a nivel de laboratorio y así diseñar posibles alternativas de biorremediación o tratamiento biológico de zonas con presencia de explosivo.

En esta investigación se evaluaron las cepas bacterianas que degradan el explosivo PETN, su crecimiento a diferentes concentraciones del explosivo, la cuantificación de la degradación de PETN bajo los parámetros de pH y temperatura y por último la degradación del explosivo con las cepas combinadas.

Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que nueve cepas bacterianas son degradadoras de PETN con una capacidad superior al 50% (es decir, degradan por encima del 50% de la concentración inicial de explosivo). Las dos cepas que presentaron mayor degradación y un crecimiento rápido fueron dos co-cultivos que se seleccionaron para realizar los estudios en diferentes pH y temperaturas y fueron la P29 conformada por *Methylobacterium adhaesivum*- *Leifsonia aquatica* y la P31 compuesta por *Cupriavidus basilensis*- *Rhodococcus ruber*.

Por otra parte, se determinaron los parámetros de pH y temperatura en los cuales las cepas y su mezcla degradan PETN. Este conocimiento servirá para el diseño de un

dispositivo que contenga microorganismos degradadores (consorcio) de PETN que pueda ser incorporado en el explosivo Pentolita para su posterior degradación.

2. MARCO TEÓRICO.

Los explosivos son considerados como un compuesto o la mezcla de compuestos que reaccionan muy rápidamente para producir grandes cantidades de gas y de calor. La velocidad de detonación es muy alta, la reacción exotérmica y de oxidación-reducción proporciona la energía liberada durante la detonación. La formación instantánea de los gases, además de su rápida expansión debido a la presión y el calor es la que produce la fuerza destructiva (Kumar, 2005).

Los explosivos se clasifican en tres grupos basándose en la sensibilidad de detonación

- Explosivos Primarios: muy sensibles
- Explosivos Secundarios: menos sensibles
- Explosivos Terciarios: muy poco sensibles

En la tabla 1, se relacionan los explosivos más utilizados a nivel mundial

Tabla No 1. Tipos de explosivos usados a nivel mundial

Nombre del explosivo	Símbolo	Composición
Explosivos primarios		
fulminato de mercurio	-	Hg(CNO) ₂
azida de Plomo	-	Pb(N ₃) ₂
azida de plata	-	AgN ₃
hexanitrate de manitol	MHN	C ₆ H ₈ (ONO ₂) ₆
diazodinitrofenol	DDNP	C ₆ H ₂ N ₄ O ₅
Explosivos secundarios		
nitroglicerina	GTN	C ₃ H ₅ (ONO ₂) ₃
pentaeritritol tetranitrato	PETN	C(CH ₂ ONO ₂) ₄
trinitrotolueno	TNT	CH ₃ C ₆ H ₂ (NO ₂) ₃
etilenglicol dinitrato	EGDN	C ₂ H ₄ (ONO ₂) ₂
ciclotrimetilentrinitramina	RDX	C ₃ H ₆ N ₆ (NO ₂) ₃
ciclotetrametilentetranitrato	HMX	C ₄ H ₈ N ₄ (NO ₂) ₄
nitroguanidina	NQ	CH ₄ N ₃ NO ₂
Nitrometano	NM	CH ₃ NO ₂
Nitrocelulosa	NC	Varía
dinitrato de etileno	EDDN	C ₂ H ₁₀ N ₄ O ₆
nitrato de amonio-combustible	ANFO	94/6--AN/FO
Explosivos terciarios		
mono nitrotolueno	MNT	CH ₃ C ₆ H ₄ NO ₂
perclorato de amonio	AP	NH ₄ ClO ₄
nitrato de amonio	AN	NH ₄ NO ₃

Los explosivos considerados en la tabla anterior pertenecen a compuestos nitroaromáticos, nitraminas y ésteres de nitrato (Kumar et al. 2005).

Los ésteres de nitrato son utilizados en la industria farmacéutica como vasodilatadores para el tratamiento de enfermedades del corazón (Zhuang, et al. 2007); la industria militar lo utiliza como materia prima de municiones y en actividades de extracción minera, exploración de petróleo y construcción son usados como artefacto explosivo (Energía, 2009).

La fabricación de los ésteres de nitrato para explosivos son usados porque proveen una alta energía en la formulación del explosivo, debido al mejor balance de oxígeno comparado con los compuestos nitroaromáticos, al mismo tiempo estos compuestos poseen alta sensibilidad, por la presencia de enlaces -O-NO₂ los cuales son enlaces más débiles que los de -N-NO₂ y C-NO₂. Entre estos materiales se encuentran, la nitrocelulosa (NC), nitroglicerina (GTN), dinitrato de etilenglicol (EGDN), dinitrato de isosorbide (ISDN) y el pentaeritritol tetranitrato (PETN)). (Agrawal et al., 2000). Las estructuras de estos compuestos se observan en la figura 1.

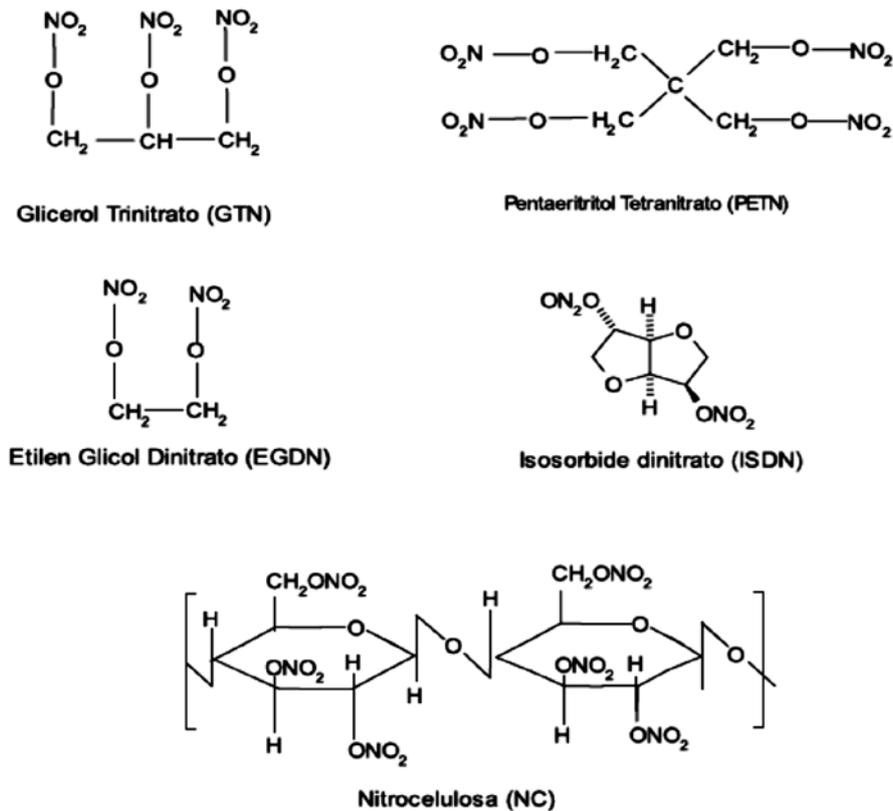


Figura 1. Estructura química de los ésteres de nitrato más comunes
(Tomado de: Agrawal et al. 2000)

2.1 Generalidades del pentaeritritol tetranitrato (PETN).

El PETN es un explosivo potente, el más estable químicamente y menos reactivo de los ésteres de nitrato. La sensibilidad del PETN es alta al impacto y a la fricción y se desensibiliza con productos como la cera para elaborar el cordón detonante, aceleradores, carga de base de detonantes y en forma compactada para *Boosters*, estos son accesorios para voladura, la cual contiene una mezcla de varios explosivos. El PETN es mezclado con polímeros para formar explosivos plásticos; una mezcla de PETN con TNT en cantidades iguales forma el explosivo conocido como Pentolita (Agrawal et al. 2000).

El PETN es preparado mediante la nitración de pentaeritritol con ácido nítrico concentrado (98%), formando subproductos sulfonados inestables; como el PETN es ligeramente soluble en ácido nítrico, se precipita al final de la nitración. Posteriormente, el precipitado es filtrado, lavado con agua, neutralizado y recristalizado con acetona; en algunos procesos el ácido nítrico es diluido con agua para mantener algunas impurezas en solución.

Una segunda precipitación de re-cristalización es comúnmente realizada como un ajuste del tamaño de la partícula para producir un polvo con una superficie de área específica.

Una variedad de formas son generadas, que van desde esferas a formas de alfileres largos y anchos, la forma más usada para los detonadores es de barra tetragonal.

Aunque el PETN es relativamente estable térmicamente, hay un número de factores que pueden contribuir a su inestabilidad, estos incluyen: inestabilidad del tamaño de la partícula, transformaciones polimórficas debido a la temperatura, a la presión, inestabilidades cristalinas, impurezas, oclusiones, incompatibilidades químicas e inclusive efectos de la actividad biológica, además el grado de confinamiento, pureza y tamaño del cristal que puede influir en la velocidad de degradación (Foltz, 2009).

En Colombia el explosivo PETN es usado en actividades de minería, construcción, artefactos bélicos, exploración del petróleo, en esta última los explosivos son para crear temblores artificiales con el fin de establecer los mapas del subsuelo; la detonación de los explosivos puede generar impactos en los acuíferos y muerte de peces (Calao, 2007); aquellos explosivos que no son detonados pueden provocar contaminación de fuentes subterráneas por la persistencia del explosivo en estas zonas.

Los explosivos en la minería subterránea se usan con frecuencia en la actividad de perforación, sus impactos son similares a las actividades petroleras y de construcción, el auge en estas actividades económicas aumenta el uso de explosivos (ver tabla 2) debido al interés internacional de las materias primas provenientes de estas actividades (Energía et al. 2009).

Tabla No 2. Consumo de explosivos en Colombia

Producto	Unidad	2004	2005	2006	2007	2008
Cordones detonantes comunes	Metros	6.583.650	6.151.850	6.951.100	8.033.825	8.610.000
Anfos	kilo	2.176.875	2.847.775	3.080.875	3.732.707	3.754.071
detonadores No elec 18 mts	Metros	700	59.819	1.377.986	1.811.328	2.094.767
indugelAp	kilo	119.650	306.675	281.750	782.500	683.900
Pentofex	kilo	519.915	611.404	754.147	835.270	950.286
indugelAv	kilo	119.650	306.675	281.750	782.500	683.900
Emulin	kilo	0	0	855.563	739.204	650.146
nitrate de amonio	kilo	1.050.000	845.000	700.00	755.00	278.750
Sismigeles	kilo	0	0	0	0	930
conectores de superficie	piezas	442	10.880	7.204	4.720	0

Tomado de: (energía et al. (2009)

El área de interés a nivel mundial con respecto a la actividad biológica de PETN está en el campo de la medicina, ya que este compuesto es comúnmente utilizado para el tratamiento de problemas cardiovasculares. Igualmente, ha despertado interés en los campos de la biorremediación y fitorremediación porque hay una buena cantidad de ambientes contaminados con el explosivo y los investigadores se encuentran buscando alternativas para la descontaminación de áreas como: zonas de producción de explosivos, disposición de residuos y áreas de prueba de municiones.

En la actualidad el uso del pentaeritritol tetranitrato no se ha regulado totalmente a nivel internacional, no existen datos de valores límite umbral (TLV abreviatura en Inglés *Thresold Limite Value*) parámetro toxicológico que hace referencia al nivel de exposición, generalmente a concentraciones de una sustancia a la cual una persona se encuentra expuesta día a día. Este explosivo si se ha considerado como “tóxico para los organismos acuáticos, por ser altamente hidrofóbico, posee una baja solubilidad en el agua, pero puede ser transportado fácilmente por las aguas subterráneas”, al respecto, el departamento de defensa de Estados Unidos estableció el PETN como un componente de municiones de gran preocupación por su amplio uso y su impacto en el ambiente. Zhuang y colaboradores, lo consideraron un compuesto recalcitrante a la biorremediación, debido a que su estructura de ésteres de nitrato no le permite ser biodegradado (Zhuang, 2007).

2.2 Las bacterias en la naturaleza y su importancia en la biodegradación

Las bacterias hacen parte de un grupo de microorganismos abundantes en la naturaleza, se ven favorecidas por un rápido desarrollo y su capacidad para atacar diferentes sustancias, más de 250 especies de bacterias han sido aisladas del suelo y al agregar cifras a las asociadas de restos vegetales, supera las 800 (Frioni, 1999). Las bacterias pueden clasificarse desde el punto de vista ecológico como a) autóctonas, las cuales hacen parte del área de estudio, como por ejemplo el suelo, en general su forma es cocoide o coco bacilos, capaces de esporular; b) las alóctonas son bacterias fermentativas más activas y llegan al suelo por las precipitaciones, abonos, aguas, pueden permanecer en estado latente y se desarrollan en cortos periodos de tiempo.

En la naturaleza las bacterias interactúan con otros microorganismos como hongos algas, protozoos integrando una comunidad (organismos que habitan un ecosistema), la cual puede ser polipoblacional o monopoblacional. Pueden verse afectadas en su ambiente natural debido a la cantidad de sustrato disponible, por lo tanto en vez de competir por el mismo sustrato realizan procesos de interacción, donde pueden intervenir dos o más poblaciones, estas interacciones se pueden observar tanto *in vitro* o *in vivo* y pueden ser de tres tipos: el **neutralismo**: se evidencia más evidente *in vitro* ya que las velocidades de crecimiento y las densidades poblacionales son semejantes, *in vivo* posiblemente se observa cuando las poblaciones son bajas y los nutrientes son abundantes. **Asociaciones sinérgicas**: se encuentran divididas en tres grupos: a) comensalismo: un organismo se beneficia el otro no es afectado; b) protocooperación o simbiosis nutricional: el beneficio es mutuo; c) simbiosis verdaderas: en los cuales los

integrantes se benefician en situación en la cual ninguno podría realizar una función vital. Por último, la interacción denominada **antagonismo**, de carácter perjudicial y se divide en amensalismo, predación y parasitismo. (Frioni et al, 1999).

Debido al desarrollo industrial durante el siglo XX, se aumentó la presencia de contaminantes antes desconocidos por el hombre; el auge de la industria química y la producción en cantidades de compuestos xenobioticos son reportados por Atlas y Bartha, cuya estructura química difiere de los compuestos orgánicos naturales; muchos de estos compuestos son grupos halógenos y nitrogenados, usados como propelentes, refrigerantes, disolventes, plásticos, explosivos, plaguicidas; son resistentes (recalcitrantes) a la biodegradación este término ha sido usado “para describir transformaciones de todo tipo, hasta las que producen compuestos más complejos que los de partida”. (Atlas et al, 2002). La mayoría de estos compuestos son acumulados en el suelo, las poblaciones microbianas se ven afectadas, pero ellas conservan su capacidad de sintetizar la mayoría de compuestos o lo biodegradan a metabolitos incompletos que pueden ser utilizados por otros seres vivos en la naturaleza. Las técnicas utilizadas para aumentar la biomasa microbiana con el fin de estimular la degradación es denominada “biorremediación” (Frioni, et al, 1999) y es la alternativa para disminuir las concentraciones de estos nuevos contaminantes.

Existen diferentes tipos de biorremediación:

Biorremediación pasiva o intrínseca: es aquella degradación natural realizada por los microorganismos nativos.

Bioestimulación: esta técnica consiste en la adición de fuente de nitrógeno y fósforo para estimular a los microorganismos nativos.

Bioaugmentación: Consiste en inocular el sitio contaminado con microorganismos seleccionados, para aumentar la degradación.

Bioventilación: Es el uso de gases como O₂ y CH₄ en forma pasiva o forzada en suelos con el fin de mejorar la degradación.

Rellenos sanitarios: Consisten en la incorporación y aplicación de suelos contaminados en la superficie de suelos no contaminados.

Compostaje: uso de procesos microbianos aerobios y termófilos en pilas o reactores.

Fitorremediación: Es el empleo de vegetales en la remoción, absorción y transformación de contaminantes

En la actualidad se habla de asociaciones también llamadas co-cultivos, cultivos mixtos o consorcios, para la biodegradación de compuestos recalcitrantes; pueden estar formados por bacteria-hongo, bacteria –bacteria, bacteria- levadura, hongos- levaduras, o por otros organismos. Silva se refiere al término co-cultivos, en degradación de hidrocarburos (Silva, 2007) y otros investigadores lo citan en estudios de residuos agroindustriales (Riaño y cols., 2010).

Co-cultivos.

La degradación de xenobióticos se ha evidenciado principalmente en cultivos denominados co-cultivos o cultivos mixtos (Silva et al, 2007), esto es bastante común en el ambiente, puesto que en la naturaleza la mayoría de los microorganismos forman

parte de comunidades microbianas donde se obtienen productos mediante la combinación de la vías metabólicas de los microorganismos; por lo general, los co-cultivos realizan una interacción positiva, como se pudo evidenciar en los resultados obtenidos en esta investigación y se confirmó con técnicas de biología molecular realizadas a los microorganismos bacterianos obtenidos.

2.2.1 Factores ambientales que afectan la Biodegradación.

Las condiciones ambientales son una serie de parámetros que influyen en la biodegradación, para esta investigación los factores que serán evaluados se describen a continuación.

pH.

El pH del medio es importante para el desarrollo de las bacterias, se ha establecido que el pH más adecuado se encuentra entre los rangos de 6.0 y 8.0 aunque el pH óptimo suele estar habitualmente alrededor del pH neutro para algunos microorganismos bacterianos (Nápoles et al. 2008). La variación del pH puede influir en el desarrollo del microorganismo puesto que puede alterar la membrana plasmática o inhibir la actividad de las enzimas y proteínas, por consiguiente la velocidad metabólica con que realice sus procesos (Santos, 2007).

Temperatura

La temperatura es un parámetro que influye en el proceso de degradación específicamente en la velocidad de degradación, las temperaturas pueden oscilar entre 15°C y 45°C; este rango es muy amplio puesto que las bacterias mesófilas aunque pueden realizar procesos bioquímicos en estas temperaturas, presentan unos rangos óptimos para sus procesos enzimáticos y por lo tanto es necesario hacer ensayos para establecer la temperatura óptima a la cual degradan un compuesto. Una disminución en la temperatura por debajo del nivel óptimo, disminuye drásticamente la actividad enzimática y por lo tanto la velocidad del proceso. (Rodríguez J, 1999).

Concentración de Nutrientes

Los microorganismos para realizar sus procesos metabólicos necesitan nutrientes, los sustratos deben tener en términos generales, fuente de carbono, nitrógeno y fósforo; sin embargo, en algunos casos es necesaria la adición de fuentes externas de estos elementos porque el sustrato puede no tener la cantidad suficiente para el metabolismo de los microorganismos.

Nitrógeno: Este nutriente interviene en la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y enzimas, por lo cual es requerido en grandes cantidades porque constituye cerca del 10% de la masa seca de la célula. Los microorganismos lo obtienen de forma natural como amonio, nitratos y nitritos, compuestos orgánicos, que contiene nitrógeno molecular o pueden estar presentes en materia orgánica como grupos aminos.

Los microorganismos utilizan preferentemente el amonio porque entra directamente al metabolismo, el nitrato es usado por algunos microorganismos pero puede retardar el crecimiento antes de que se produzcan enzimas que lo reduzcan, los nitritos son el producto de la reducción del nitrato y de la actividad metabólica. (Nápoles et al. 2008). Los microorganismos fijadores de nitrógeno pueden también tomar el nitrógeno en gas que tiene el aire y utilizarlo para la síntesis de las sustancias nitrogenadas para su desarrollo.

En el caso específico de esta investigación, se obligó a los microorganismos a utilizar la fuente de nitrógeno incluida en el medio de cultivo, el explosivo PETN para su crecimiento y desarrollo.

Carbono: Es el elemento más importante debido a su peso en la nutrición, especialmente para obtener energía en el proceso de la glucólisis.

Fosforo: Actúa en la formación de compuestos energéticos celulares, que se utilizan en los procesos de síntesis y degradación.

2.3 Biodegradación de ésteres de nitrato.

El uso prolongado de explosivos ha generado contaminación de suelos y agua subterránea, son introducidos a la naturaleza como compuestos xenobióticos (Gorontzy, 1994); en condiciones ambientales los ésteres de nitrato son resistentes a procesos naturales de atenuación. En la actualidad una serie de investigaciones han establecido alternativas de eliminación de explosivos presentes en suelo y agua contaminada, estos estudios se han centrado en la degradación biológica (bacterias,

hongos, consorcios), tratamientos de Fitorremediación y degradación química mediante el uso de hierro granular, esta última estudiada solo para el PETN.

Una variedad de microorganismos son capaces de metabolizar compuestos de explosivos en el ambiente (bacterias y hongos), en algunos casos se ha presentado una completa mineralización, mientras en otros, solo reacciones de biotransformación que producen metabolitos con menor o mayor efecto tóxico y/o recalcitrante.

Los ésteres de nitrato y sus metabolitos son generalmente tóxicos en altos niveles, pueden generar un impacto significativo en el ambiente ya que pueden persistir por largos periodos de tiempo (Spain Jim C., 2000). A continuación se describen los procesos de biodegradación de los ésteres de nitrato más estudiados.

2.3.1 Nitroglicerina (GTN).

En estudios realizados por Wendt en 1978, se determinó que la GTN es tóxica para los mamíferos en niveles de 30 a 1300 mg/kg (Went, 1978) y Urbański, estableció que LC_{50} para organismos acuáticos es de 1 a 3 mg/L (Urbański, 1984). El GTN es tóxico e inhibitorio para el crecimiento de algunas bacterias, estudios realizados por White confirmaron la vía nitro-reductiva secuencialmente la reducción de GTN a GDN siendo selectiva para el C2, mientras que la conversión de GDN a GMN demostró preferencia por el C1, la desnitrificación secuencial se realizó de GTN a GDN a GMN degradación realizada por la *Pseudomonas* sp y de GMN a glicerol mediante el *Geotrichum candidum* (White, 1982) Ver Figura 2.

Aunque en estos estudios no fue identificada la enzima encargada de la degradación, posteriormente en células mamíferas se encontró el uso de un sistema similar a la glutatión transferasa, Figura 3, responsable por la formación de óxido nítrico y óxido de nitrato (Ye Jing, 2004). En otro estudio, se evidenció que en la *Agrobacterium radiobacter*, se podía catalizar el GTN por la vía nitro-reductasa con NADH como co-factor y liberar nitritos (White et al., 1996).

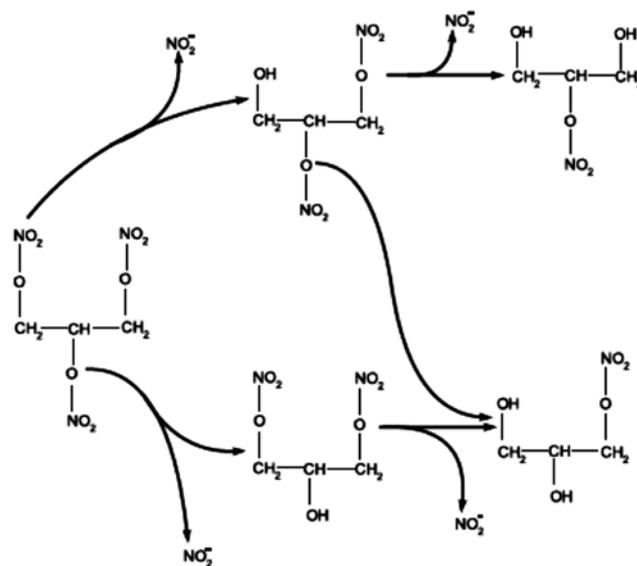


Figura 2. Vía de degradación del GTN mediante *Pseudomonas* sp
Tomado de White, Snape et al. (1996)

Otros mecanismos de degradación del GTN se observan en la Figura 3, los microorganismos encargados de estas rutas de degradación son los *Bacillus thuringiensis* - *Bacillus cereus* y *Enterobacter agglomerans*; en estas rutas se realiza rompimiento hidrolítico del éster donde el nitrógeno es removido del GTN como nitrato y luego reducido a nitrito, sin la presencia de un co-factor (White et al., 1996).

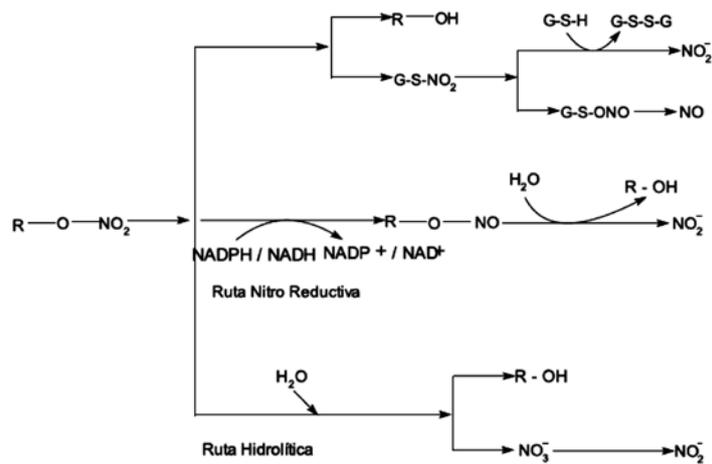


Figura 3. Vía de remoción de ésteres de nitrato
Tomado de Yen Jing et al. (2004)

Marshall y colaboradores en 2001 aislaron cuatro especies *Pseudomonas putida*, *Arthobacter* sp, *Klebsiella* sp y *Rhodococcus* sp de suelo contaminado con GTN, las cuales fueron capaces de degradar GTN secuencialmente pero solamente la *Klebsiella* sp mostró preferencia por el C2 del GTN, además el *Rhodococcus* sp fue capaz de convertir GMN a glicerol siendo la primera cepa reportada capaz de mineralizar el GTN (Marshall et al., 2001).

La degradación de GTN también ha sido estudiada en hongos como *Phanerochaete chrysosporium* el cual hidrolizó la nitroglicerina (Servent, 1991), aunque para este estudio no se trabajará con hongos.

Zhang y colaboradores, realizaron estudios con *Penicillium corylophilum*, ellos y otros investigadores demostraron la degradación de GTN a GDN a GMN paso a paso utilizando glucosa y nitrato de amonio los cuales fueron esenciales para una completa degradación. GDN y GMN y se detectaron en las primeras de 48 horas, el metabolito

GDN fue completamente transformado a GMN en 168 horas y la completa degradación de GMN fue alcanzada a las 336 horas.(Zhang et al., 1997)

2.3.2 Nitrocelulosa (NC).

Este compuesto no es tóxico para los humanos, pero su propiedad explosiva y su efecto de contaminación del aire seguida de la combustión lo hace material peligroso, es recalcitrante a la degradación microbial y solo puede ser degradado bajo condiciones anaeróbicas. En condición aerobia, los hongos con capacidades de degradación de celulosa y desnitrificación son los únicos identificados para degradar la nitrocelulosa, los cuales podrían ser estudiados en investigaciones posteriores.

2.3.3 Pentaeritritol Tetranitrato (PETN)

Los estudios iniciales de PETN se realizaron en ratas *in vivo* e *in vitro* en donde se pudo comprobar desnitrificación secuencial de PETN a pentaeritritol trinitrato, pentaeritritol dinitrato, pentaeritritol mononitrato y finalmente pentaeritritol. En los estudios de ratas, el PETN no era absorbido por el animal pero si fue metabolizado por la microflora intestinal (Zhuang et al. 2007).

Bacterias en la degradación de PETN

Se han evidenciado algunos reportes de degradación de PETN por bacterias como *Enterobacter cloacae* PB2, cuya enzima pent-reductasa desnitrifica PETN a

trinitratos y luego a dinitratos (Ver Figura 4), estos últimos son degradados a productos desconocidos (Binks et al. 1996).

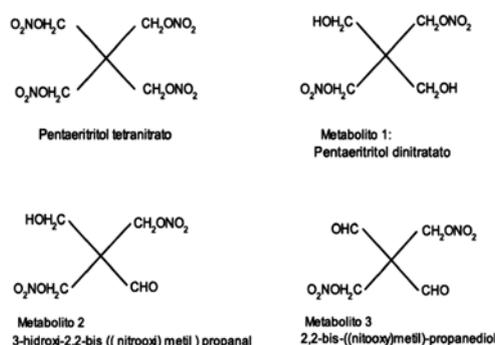


Figura 4. Vía de reducción del PETN por la *Enterobacter cloacae* PB2
Tomado de. (Binks et al. 1996)

En este estudio, *E. cloacae* utilizó en condiciones aeróbicas dos de los cuatro átomos de nitrógeno de PETN para su crecimiento. La Pent-reductasa de la PB2 fue caracterizada como una flavoproteína, que requiere NADPH y se une no covalentemente a FMN. El gen de la Pent-reductasa fue clonada en *Escherichia coli* para estudiar sus propiedades. Para determinar los metabolitos de la degradación del PETN, inicialmente se comprobó la presencia de los metabolitos por HPLC, pero además se utilizó la técnica TLC (*Thin-Layer Chromatography*), con material absorbente como sílica gel, óxido de aluminio o celulosa; mediante la acción capilar, los metabolitos fueron separados por esta técnica y posteriormente se identificaron mediante espectrofotometría de masas IE (ionización de electrón), obteniendo buenos resultados.

En el estudio de la bacteria *Agrobacterium radiobacter* subgrupo B se identificó la enzima éster de nitrato-reductasa que fue capaz de degradar el PETN solo a trinitratos y dinitratos (White et al., 1996).

Otras investigaciones de degradación del PETN utilizaron columnas con hierro granular para soluciones acuosas y de sedimentos contaminados con el explosivo (Zhuang et al., 2007). En las soluciones acuosas se demostró una degradación por desnitrificación secuencial con pentaeritritol y amonio como los productos finales, el pentaeritritol trinitrato y pentaeritritol dinitrato se identificaron y al parecer se removieron todos los grupos nitro del PETN; en cuanto al estudio con sedimentos, al parecer el hierro pierde su capacidad de reducir cuando hay una fuente diferente de nitratos adicional al sustrato, lo que sugiere que el hierro granular no es efectivo en la remediación de sedimentos contaminados con PETN.

Este proyecto solo estableció la biodegradación de PETN a través del tiempo mediante cepas aerobias obtenidas de suelos con presencia de explosivo que tuvieran la capacidad de degradación y se estableció que se realizaba cuando las cepas se mezclaban. En este estudio, se utilizó la cuantificación de explosivo con la técnica de HPLC para el análisis del PETN residual.

Consorcios en la degradación de PETN

Un gran número de bacterias son capaces de degradar compuestos xenobióticos utilizándolos como fuente de carbono en cultivos puros; sin embargo, en algunos casos en la naturaleza la bacteria no puede metabolizar el compuesto, pero al estar en poblaciones mixtas, formando consorcios pueden desarrollar una mayor degradación debido a que la información genética es más completa (Nápoles, 2008), sea por que se comparten genes o porque cada bacteria tiene una capacidad enzimática específica y al complementarse pueden activar reacciones simultaneas o sucesivas.

Los estudios para la degradación de PETN por medio de consorcios fue evaluada por García, quien determinó el comportamiento de los consorcios a través del tiempo y encontró que las bacterias que son degradadoras inicialmente, pierden la capacidad de degradación de los consorcios a través del tiempo (García, 2011); otras investigaciones como la de Zhuang Li, determinaron la degradación por consorcios bajo condiciones anaerobias, la evaluación consideró medios selectivos con nitratos y sulfatos y la concentración de explosivo baja (Zhuang Li, 2012).

2.3.4. Fitorremediación para ésteres de nitrato.

La fitorremediación de los explosivos TNT, GTN y PETN usando plantas *in vitro* como *Rheum palmatum*, *Saponaria officinalis*, *Populus simonii* mostraron que estos explosivos podían ser degradados a productos menos tóxicos y posiblemente incorporarlos a la pared celular o usados en el metabolismo celular de la planta, (Vanek, 2003).

En cuanto a la degradación de la nitroglicerina (GTN) por células de plantas es diez veces menor que la reportada en la degradación bacterial, aunque se observa la misma desnitrificación secuencial. En estudios de fitorremediación de PETN mostraron que fue completamente degradado después de diez días y todos los cuatro subproductos posibles se identificaron y el producto final el pentaeritritol es utilizado como fuente de carbono.

En un estudio con *Juncus inflexus* y *Phragmites australis* se demostró que la degradación de nitroglicerina (GTN) se realiza en un periodo de veinte días; en este estudio se identificaron sus metabolitos dinitroglicerina y mononitroglicerina y al final, la nitroglicerina desapareció completamente.

En el caso de EDGN, se degradó completamente usando *Juncus inflexus* y se redujo un 5% el explosivo con *Phragmites australis*; en los subproductos se identificó etilenglicol mononitrato (Podlipna, 2010). Un estudio *in vivo* utilizando *Phragmites australis* en aguas residuales provenientes de la producción de explosivos que contenían una mezcla de ésteres de nitrato, determinó que después de seis semanas solo se encontró MNG como subproducto de la degradación (figura 5).

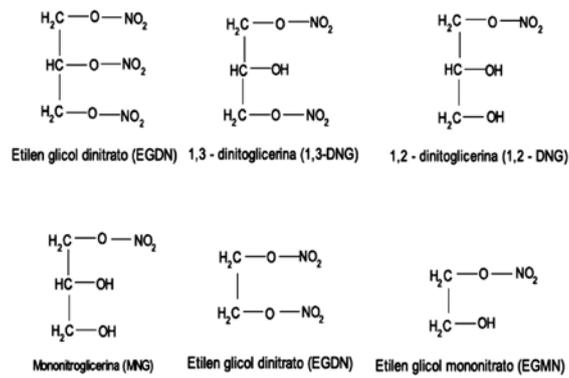


Figura 5. Vía de reducción del EDGN por *Phragmites australis*
Tomado de Podlipna et al.,2010

El mayor problema que tiene la fitorremediación es que cuando la planta es saturada por el contaminante, la contaminación se ha trasladado del suelo o agua a la planta, en donde la bioacumulación es un problema para animales y humanos quienes la consumen en la cadena alimenticia y se convierte en riesgo para la salud.

3. CONTEXTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.

El uso de compuestos orgánicos en actividades antropogénicas genera una gran cantidad de productos y residuos con características peligrosas, los cuales alteran el equilibrio natural de los ecosistemas. Entre estos compuestos, se encuentran los nitroaromáticos, cloro aromáticos y esteres de nitrato, que son materia prima para la síntesis de explosivos, plásticos, tintes, productos farmacéuticos y productos del petróleo.

En particular, la producción de explosivos a gran escala genera residuos que contaminan los ecosistemas terrestres y acuáticos, generando uno de los mayores problemas ambientales a nivel mundial. Estudios realizados en Estados Unidos estiman que los suelos pueden contener aproximadamente 1,2 millones de toneladas de residuos de este tipo de xenobióticos. (Hampton y Sisk, 1997). En países como Alemania, Inglaterra, Canada, España, Australia y Argentina han reportado en literatura contaminación por explosivos. (Bruns-Nagel, 1997) (Cattaneo, 1997) (Toze, 1997).

El PETN, es uno de los explosivos más utilizados a nivel mundial, ya que junto con el TNT hace parte del producto comercial Pentolita; durante su producción y manejo se generan residuos que contaminan el ambiente porque son considerados compuestos tóxicos y persistentes (Binks et al.,1996) (EPA, 2005). Por lo tanto su uso ha generado un impacto ambiental que afecta los ecosistemas terrestres y acuáticos

debido a las altas cantidades de nitrato que se liberan y a la producción de metabolitos e intermediarios tóxicos durante su degradación (Spain et al., 2000).

De la misma manera, algunos de los explosivos que son colocados en el subsuelo para la detonación de minas, no estallan y por lo tanto son abandonados, convirtiéndose en un riesgo por la posibilidad de generar explosiones no controladas, así como también sus subproductos y metabolitos de degradación pueden ser altamente tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos, (Haghighi-Podeh et al., 1996) (ASTDA, 1999) (Gong et al., 2001).

Estudios de bioaumentación han demostrado que los microorganismos con capacidad degradadora se pueden encontrar y aislar en lugares con presencia de estos compuestos, donde las bacterias ya se encuentran adaptadas metabólicamente a las condiciones ambientales y a la presencia de explosivos (French *et al.*, 1999) (Rosser, 2001).

Por esta razón, las investigaciones se han centrado en encontrar, aislar y potencializar bacterias aerobias con capacidad degradadora de explosivos, como alternativa biológica en respuesta a la problemática ambiental planteada encontrando de esta manera métodos y técnicas ambientalmente amigables.

Hasta el momento, en Colombia solo la Universidad Javeriana en convenio con la Universidad de la Salle, ha realizado trabajos sobre aislamientos, caracterización y estudios de biodegradación de explosivos (TNT, PETN y Pentolita), por parte de microorganismos aerobios y anaerobios que poseen dicha capacidad.

Este proyecto hace parte de la investigación de estas universidades y para aportar nuevo conocimiento se plantea la siguiente pregunta ¿Cuál es el efecto que causa el pH, la temperatura y la máxima concentración de PETN sobre la capacidad de degradación de las bacterias aisladas y combinadas pensando a futuro en un posible consorcio, que proceden de ambientes con presencia de explosivos?

Para dar respuesta a este planteamiento, el objetivo de este proyecto fue establecer los valores de pH y temperatura en los cuales la degradación biológica del PETN por parte de bacterias aisladas de suelos con explosivos mejora en términos de reducción de tiempo. La metodología incluyó la implementación de técnicas para el aislamiento de bacterias con capacidad degradadora de explosivos y establecer su comportamiento a altas concentraciones del mismo. Con los resultados de este proyecto se reportan los primeros estudios en Colombia sobre el efecto del pH y la temperatura en la degradación biológica de PETN.

La prospectiva de este trabajo es hacer un aporte al conocimiento básico para el diseño de un sistema con bacterias endógenas degradadoras de PETN, que pueda ser

incorporado en explosivo comercial Pentolita® y plantear una solución biológica en la disposición de los productos, usos y residuos de los explosivos, en el tiempo.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo General

Determinar el porcentaje de degradación del PENT por cepas aisladas de ambientes con presencia de explosivos

4.2 Objetivos específicos

- Establecer la capacidad degradadora de las cepas aisladas de ambientes con presencia de PETN.
- Determinar la cinética microbiana a diferentes concentraciones de PETN
- Establecer el porcentaje de degradación de PETN de las bacterias aisladas, bajo diferentes valores de pH y temperatura.
- Determinar el porcentaje de degradación de PETN por las cepas mezcladas.

5. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.

Fase 1. Selección de cepas con capacidad de degradación del PETN

5.1 Aislamiento de los microorganismos

Se tomaron muestras de suelo y de lodo en una planta de producción de explosivos en el municipio de Cundinamarca (Colombia), con el fin de realizar un screening “*in vitro*” de microorganismos bacterianos con capacidad degradadora de PETN. Se utilizaron tres medios de cultivo (denominados T1-T2-T3) los cuales contenían los siguientes compuestos por cada litro de agua: 10 ml de solución de buffer, 10 ml de solución de sales, 10 ml de solución fuente de carbono, 1 ml de solución de hierro, 1 ml de solución de trazas y 100 mg/L de PETN. La diferencia entre los medios de cultivo fue la fuente de nitrógeno así: para el T1, PETN y nitrato de sodio como fuente adicional de nitrógeno, para el T2, PETN como única fuente de nitrógeno y para el T3, PETN como única fuente de Carbono (No se utilizó la fuente de carbono de la mezcla descrita) y de Nitrógeno. Se agregó Agar-Agar a todos los medios (Carvajal, 2010).

El medio de cultivo, donde hubo mayor cantidad de morfotipos fue el T2, criterio por el cual, fue usado como único medio de cultivo en cada uno de los ensayos y pruebas realizadas en esta investigación.

A las cepas bacterianas que crecieron en el medio así obtenidas, se les clasificó de acuerdo con el tipo de pared celular por medio de la coloración de Gram y observación microscópica. Se hizo una caracterización de las colonias por observación macroscópica donde se determinó la forma, borde, elevación, color y textura de la colonia.

5.2 Conservación de microorganismos.

Los microorganismos fueron conservados en medio T2 sólido a 5°C y en medio T2 líquido con glicerol al 20% a -80°C.

5.3 Pruebas de degradación

5.3.1 Criterios de inclusión

Para las pruebas de degradación se establecieron los siguientes criterios:

- Uso de solución patrón de PETN diluido en acetonitrilo a 20.000 mg/L
- Crecimiento de los microorganismos en medio de cultivo mineral Líquido T2 (100 mg/L PETN), a 30 °C y 200 rpm
- Crecimiento bacteriano debe ser igual o superior a una Densidad óptica de $0,125 \pm 0.25$ (abs) a una longitud de onda de 600nm (Binks et al. (1996).

5.3.2 Obtención del inóculo

La biomasa obtenida en dos cultivos masivos de cada una de las cepas aisladas, fue agregado a 5 mL de medio de cultivo líquido T2 (n=3) con 100 mg/L de explosivo (PETN), se incubó durante 12 horas (overnight) a 30°C y a 200 rpm, a este crecimiento se le llamo “PRE-INOCULO”. A continuación, el volumen total de este pre-inóculo se colocó en un erlenmeyer que contenía un volumen de 45 ml de medio T2 líquido y 100 mg/L de explosivo (PETN) (n=3), se incubó en las mismas condiciones anteriores, hasta alcanzar la densidad óptica requerida; este crecimiento se llamo “INÓCULO”

5.3.3 Técnica de Cuantificación de explosivo

Para la prueba de degradación se tomaron 5ml del inóculo y se adicionaron a un erlenmeyer que contenía 45 ml de medio T2 líquido con 100 mg/L de explosivo, sin variar las condiciones de temperatura y agitación (aireación); fueron incubadas durante 240 horas, cuantificando la cantidad de explosivo residual en tres tiempos (T0, momento de la inoculación; T1, 120 horas de incubación; T3, 240 horas de incubación). El método para esta cuantificación fue el 8330B, establecido por la EPA (*Environmental Protection Agency*) “Determinación de explosivos nitroaromáticos (TNT) y ésteres de nitrato (PETN) por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)”(Ver **Anexo 1**).

Como control de degradación se utilizó medio T2 líquido a 100 mg/L de PETN, sin inoculación el cual fue incubado y cuantificado bajo las mismas condiciones de la prueba. Se realizaron controles de cromatografía usando Blancos Agua -Acetonitrilo

50:50 y estándares primarios de la curva de calibración (Ver **Anexo 2**) Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

Con respecto al análisis de cromatografía, las muestras fueron realizadas en los laboratorios de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental USBA de la Pontificia Universidad Javeriana, las condiciones empleadas para el análisis de las muestras fueron: columna (Pinnacle DB C18; Restek) (5 μ m, 250 x 4.6 mm), 1.2 ml/min, metanol: agua (50:50), detector de arreglo de diodos (longitud de onda: 210 nm). (García et al., 2011).

5.3.4 Técnica para Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos fueron sometidos a tratamientos Estadísticos en hoja de cálculo Excel, evaluando el promedio, desviación estándar, y coeficiente de variación, para así determinar tasa de degradación (%) según la siguiente Fórmula:

$$\% \text{ de degradación} = \frac{\text{concentración de explosivo inicial} - \text{concentración de explosivo final}}{\text{concentración de explosivo inicial}} \times 100 \% \quad (\text{ec } 1)$$

5.3.5 Técnica de secuenciación

Las cepas que presentaron porcentajes de degradación mayor al 50% fueron enviadas a la Pontificia Universidad Javeriana para realizar la caracterización molecular por técnicas de Biología Molecular, se realizó la secuenciación de los productos de PCR y análisis bioinformáticos. La purificación y secuenciación de los productos de PCR de cada cepa se realizó en Macrogen (Seúl, Corea del Sur) y los resultados obtenidos fueron editados y analizados utilizando el software CLC Workbench V 6.1 ®. Finalmente, las secuencias fueron comparadas con la base de datos RDP (del inglés Ribosomal Database Project, V.10) que contiene secuencias de rARN 16s de bacterias y el programa BLAST de la NCBI (del inglés National Center for Biotechnology Information). (Avíla, 2012)

Para la identificación molecular se tuvieron en cuenta porcentajes de identidad (PI) >98% para realizar la afiliación taxonómica de los microorganismos a nivel de especie y >90% para alcanzar una identificación hasta el nivel de género.

Fase 2. Crecimiento de las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones de PETN

5.4 Curvas de Crecimiento

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas de biodegradabilidad se establecieron los siguientes criterios para la selección de las cepas y las curvas de crecimiento en las diferentes concentraciones de explosivo:

5.4.1 Criterios de inclusión.

- Cepas con capacidad degradadora igual o superior al 80%
- Cepas de rápido crecimiento que alcancen una densidad óptica de $0,125 \pm 0,25$ (abs) en 120 horas
- Recuento en placa cada 72 horas a partir de diluciones de 10^{-3} - 10^{-4} - 10^{-5} - 10^{-6}

5.4.2 Preparación concentraciones de PETN

En tres erlenmeyers estériles vacíos se agregó el volumen necesario de solución patrón de explosivo para obtener cada una de las concentraciones establecidas para el ensayo (100- 300 -600 -1000 mg/L). La solución de explosivo se dejó hasta evaporación total del solvente con el fin de mejorar la solubilidad del PETN y minimizar posibles errores de cuantificación del explosivo residual, posteriormente se agregaron 90 ml de T2 líquido sin explosivo.

5.4.3 Obtención del inóculo.

Todos los inóculos usados en esta investigación, fueron obtenidos utilizando la técnica mencionada en el numeral 5.3.2 de este documento.

5.4.4 Crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de explosivo

Los medios de cultivo T2 líquido a las concentraciones de PETN establecidos, fueron sembrados con 10 mL de inóculo de cada una de las cepas seleccionadas e incubados a 30°C y a 200 rpm por 72 horas; los tiempos de conteo de células viables se establecieron a través de una prueba preliminar donde se determinó que para la cepa P29 los tiempos fueran 0-6-15-18-25-48-72 horas y para la cepa P31 0-3-6-9-12-15-18-24-48-72 horas, tanto para densidad óptica como para recuento en placa; para la técnica de dilución en placa, se sembraron diluciones de (10^{-4} hasta 10^6) en T2 sólido según el método de conteo de células viables (Madigan, 2004), para cada una de las cepas en estudio, las siembras fueron incubados sin variar las condiciones de temperatura establecidas por un periodo de 72 horas. Se usó como control T2 líquido y sólido sin adición de explosivo, tanto para el crecimiento como para el recuento en placa de cada una de las cepas seleccionadas.

5.4.5. Técnica para Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de normalidad (Kolmogorov), como fue rechazada, se transformaron los datos a logaritmo natural de los datos de conteo en placa; esta variable fue normal y por lo tanto se usó la prueba de ANOVA para observar la significancia, entre tiempo y concentración; posteriormente, se hizo una prueba de comparación múltiple (Duncan) por cada tiempo, se compararon las concentraciones

para cada una de las cepas, utilizando el programa estadístico S.P.S.S versión 15.0 y así comprobar la diferencia significativa en las diferentes concentraciones de explosivo.

Variable respuesta o dependientes: recuento en placa u absorbancia

Variable independiente: concentración de explosivo

Factor: Concentración de explosivo y los niveles son 0- 100-300.600.1000.

5.4.6 Método de parámetros cinéticos

Se hallaron los parámetros cinéticos: velocidad específica (μ_x) y el tiempo de duplicación t_d mediante las siguientes ecuaciones:

$$rx = \mu x \quad (\text{ec. 2})$$

Siendo la ecuación de primer orden, la concentración celular $rx = \frac{dx}{dt}$ (ec. 3)

Al integrar la (ec 2.) se obtiene una expresión para x en función de tiempo. Si μ es constante se integra $x = x_0$ a $t=0$ para obtener:

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (\text{ec. 4})$$

Donde x_0 es la concentración de células viables a tiempo cero. Tomando la ecuación 4 para representar el crecimiento exponencial en logaritmos neperianos:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (\text{ec. 5})$$

Para representar las gráficas fue necesario representar los datos utilizando logaritmos; posteriormente, para obtener las velocidades de crecimiento celular en términos de tiempo de duplicación $t = t_d$, se obtuvo de la ecuación 4.

Donde: concentración de células x_0 , la concentración a $t = t_d$ es $2x_0$

Sustituyendo estos valores en la ecuación 4:

$$2x_0 = x_0 e^{\mu t_d} \text{ (ec. 6)}$$

Y cancelando x_0 se obtiene:

$$2 = e^{\mu t_d} \text{ (ec 7)}$$

Tomando logaritmos neperianos a ambos lados:

$$\ln 2 = \mu t_d \text{ (ec. 8) entonces;}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \text{ (ec 9)}$$

Se alinearon los datos de la fase exponencial de la curva de crecimiento para cada concentración de explosivo con el fin de determinar el orden cinético y parámetros cinéticos.

Fase 3. Degradación de PETN por las cepas seleccionadas bajo parámetros de pH y temperatura

5.5 Criterios de inclusión.

- Los mencionados en el numeral 5.3.1
- Los valores de pH establecidos fueron 6.0 – 7.0– 8.0
- Los valores de temperatura establecidos fueron 20-25-30-35 °C, con el pH donde se presentó la mayor degradación de PETN.
- Método por sacrificio para prueba de biodegradabilidad.

5.5.1 Montaje Método por sacrificio

La baja solubilidad del PETN en el agua (5mg/L), generó una gran variabilidad en la cuantificación del explosivo residual en cada uno de los tiempos establecidos, por ello, el grupo de investigación estableció el método por sacrificio con el ánimo de minimizar el error típico estadístico y así mejorar la desviación estándar entre los datos obtenidos en dicha medida.

El método consistió en utilizar frascos serológicos a cambio de erlenmeyers, en un número equivalente a la cantidad de extracciones de muestras totales durante 96 horas de incubación (Número de frascos), para cada una de las cepas seleccionadas en pH

6.0 -7.0 - 8.0. Cada una de las extracciones se realizó por triplicado y se utilizó un control abiótico para cada uno de los tratamientos mencionados.

A cada frasco y bajo condiciones de asepsia, se les adicionó el volumen necesario de la solución patrón diluida en acetonitrilo para obtener 100 mg/L de PETN. Después de la evaporación total del solvente, los frascos fueron dosificados con 4.5 ml del medio T2 líquido ajustado a cada uno de los pH con NaOH 0,1 M ó HCl 0,1 M según el caso y fueron colocados a 30 °C y a 200 rpm durante 24 horas con el fin de aumentar la solubilidad del explosivo en el medio. Posteriormente, el total de los frascos fueron inoculados con 0.5 ml de la cepa a evaluar e incubados a 30°C y 200 rpm.

5.5.2 Prueba de biodegradabilidad según valores de pH

Para la prueba de biodegradabilidad por el método de sacrificio, al realizar la extracción de la muestra para la cuantificación del explosivo residual, el cultivo no era regresado a incubación, sino que simplemente era descartado para su posterior desactivación. Los tiempos en los cuales se cuantificó el explosivo residual fueron a las 0-24-48-72-96 horas; el tiempo cero (0) fue en el momento de la inoculación, este no fue incubado. También se cuantificó la acumulación de nitritos en cada uno de los tiempos mencionados. Se conservaron las condiciones de extracción y cromatografía enunciadas en la Fase 1.

5.5.3 Prueba de biodegradabilidad según valores de temperatura

Una vez establecido el valor del pH en donde se presentó mayor porcentaje de degradación de PETN para las cepas seleccionadas, se realizaron los ensayos a diferentes temperaturas 20-25-30-35 °C, el ensayo se hizo por triplicado ajustando el pH según el criterio de inclusión y se aplicaron la mismas condiciones para inoculación extracción y cuantificación de explosivo del ensayo anterior.

5.5.4 Análisis estadístico

Con el fin de determinar la diferencia significativa entre la degradación de las bacterias a diferentes pH, se utilizó prueba T para muestras independientes.

Variable respuesta o dependientes: Porcentaje de degradación

Variable independiente: pH

1 Factor: cepa. 2 niveles (P29-P31)

1 Factor (pH). 3 niveles (6.0-7.0-8.0)

En cuanto a los datos obtenidos en el ensayo de biodegradabilidad a diferentes temperaturas, también se realizó la prueba T para muestras independientes

Variable respuesta o dependientes: Porcentaje de degradación

Variable independiente: Temperatura

1 Factor: cepa. 2 niveles (P29-P31)

1 Factor (temperatura). 4 niveles (20-25-30-35)

Fase 4. Degradación de PETN por las cepas combinadas.

5.6 Criterios de inclusión.

Para combinar las bacterias y determinar su capacidad degradadora sobre el PETN, se tomaron los siguientes criterios de inclusión:

- Los establecidos en el numeral 5.3.1.
- Las bacterias en estudio que no presenten antagonismo
- La mezcla de las cepas que alcancen una densidad óptica mínima de 0.125 de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.
- Los valores de pH 7.0 y temperatura 30 °C

5.7. Pruebas de antagonismo.

La prueba de antagonismo se realizó aplicando la técnica de Gauze modificada para evaluar la interacción entre las bacterias. (Orjuela, 2003).

5.7.1 Técnica de Gauze modificada por enfrentamiento dual

Se realizó la siembra masiva de cada una de las cepas a evaluar en medio de cultivo T2 sólido con una concentración de 100 mg/L de explosivo. Esta siembra se uso como control de crecimiento. Posteriormente, en una caja con T2 sólido con 100 mg/L de explosivo, se dividió en dos áreas, en cada área se sembró una de las cepas a evaluar, de tal forma que el estriado quedara enfrentado uno con respecto al otro. Como control de esterilidad se usó un medio de cultivo T2. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Los cultivos fueron incubados a 30°C, se monitoreo diariamente el crecimiento de las cepas y se midió el diámetro del posible halo de inhibición generado por las cepas antagónicas.

5.8. Mezcla de cepas bacterianas.

Se realizó un pre-inoculo con cada una de las cepas evaluadas en la fase anterior. Se mezclaron en un solo inóculo, el cual bajo las condiciones establecidas en esta investigación alcanzó la densidad óptica esperada (0.125 abs a 600 nm de longitud de onda).

5.8.1. Ensayo de biodegradabilidad.

Para el ensayo de biodegradabilidad, no se variaron las condiciones de inoculación, agitación, tiempos de extracción y cuantificación de muestras enunciadas en las fase 3. El control que se utilizó fue un abiótico bajo las mismas condiciones fisicoquímicas del experimento.

5.8.2 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con ANOVA y pruebas de comparación múltiple de Duncan y Tukey para establecer la degradación de las cepas individuales en temperatura de 30 C° y a pH 7.0, con la mezcla de las cepas bacterianas.

Variable respuesta o dependientes: Porcentaje de degradación

Variable independiente: pH -Temperatura

1 Factor: cepa. 1 niveles (mezcla)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase 1. Aislamiento de microorganismos.

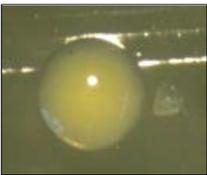
De las 78 cepas obtenidas en el screening de la investigación de Carvajal et al. 2010, se seleccionaron aquellas cuyo crecimiento en medio de cultivo sólido fue viable y no presentaron ningún tipo de contaminación. 38 cepas cumplieron con las condiciones planteadas.

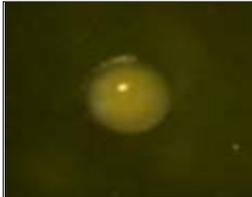
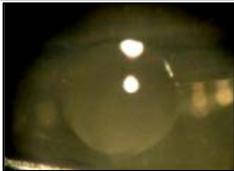
En la observación macroscópica se evidenciaron colonias con características morfológicas diferentes, a las cuales se le asignó un código de identificación dentro de los valores de P1 hasta P38; microscópicamente se observaron células de tipo bacilar, cocoide, Gram negativas y Gram positivas. Las características microscópicas y macroscópicas se presentan en la Tabla 3.

Aunque la toxicidad del PETN se ha reportado como menor con respecto a otros explosivos (Spain et al. 2000), las colonias aisladas presentaron pigmentaciones en diferentes tonalidades rojizas, resultado similar al obtenido por Avinash M, 2000, en su trabajo sobre aislamientos de bacterias utilizando como sustrato el 2,4,6 Trinitrotolueno (TNT). En este estudio el autor infirió que estas tonalidades se debían al ataque de los microorganismos por los cristales del TNT y era dependiente del metabolito que se generaba. Un resultado similar fue reportado por Villegas, 2009. Nyanhongo, 2009, utilizó esta característica para identificar el potencial degradador de microorganismos

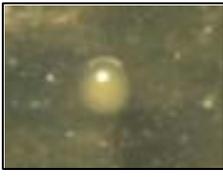
como *Pseudomona putida* y *Bacillus* SF (Termoalcalofílicos) en medio de cultivo sólido con TNT.

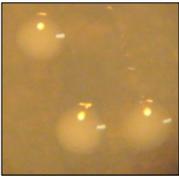
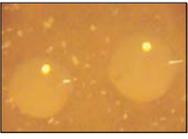
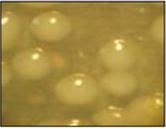
Tabla No 3. Características macroscópicas y microscópicas de las Cepas aisladas

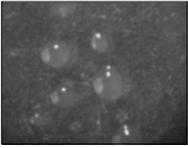
Cepa	Foto	Característica macroscópica	Característica microscópica
P1		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Amarillo Claro Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
P2		Forma: Ovalada Borde: Entero Elevación: Plana Color: Rosado Claro Textura: Suave	Bacilo Gram positivo
P3		Forma: Irregular Borde: Lobulado Elevación: Elevado Color: Rosado Textura: Dura	Bacilo Gram negativo
P4		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevado Color: Amarillo Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
P5		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevado Color: Blanco Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
P7		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: convexo Color: Amarillo Textura: Suave	Estafilococo Gram positivo

Cepa	Foto	Característica macroscópica	Característica microscópica
P8		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Blanco opaco Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: convexo Color: amarillo Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
P10		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevado Color: Blanco Brillante Textura: Pegajosa	Bacilo Gram negativo
P11		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Naranja claro Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
P12		Forma: Ovalada Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Blanco Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
P13	No Disponible	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Plano Color: Translucido Textura: Suave	Bacilo Gram positivo
P14		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevado Color: Blanco brillante Textura: Suave	Bacilo Gram negativo

Cepa	Foto	Característica macroscópica	Característica microscópica
P15		<p>Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevada Color: Blanco Textura: Suave</p>	<p>Bacilo Gram positivo</p>
P16		<p>Forma: Fusiforme Borde: Lobulado Elevación: Plano Color: rosado claro Textura: Cremosa</p>	<p>Bacilo Gram negativo</p>
P17		<p>Forma: Irregular Borde: Lobulado Elevación: Convexo Color: Rosado Claro Textura: Cremosa</p>	<p>Bacilo Gram negativo</p>
P18		<p>Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Blanco Textura: Suave</p>	<p>Bacilo Gram negativo</p>
P19		<p>Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Plano Color: Translucido Textura: Suave</p>	<p>Bacilo Gram negativo</p>
P20		<p>Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Blanco perla Textura: Suave</p>	<p>Bacilo Gram negativo</p>

Cepa	Foto	Característica macroscópica	Característica microscópica
P21		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevado Color: Rosado Textura: Suave	Bacilo Gram positivo
P22		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevado Color: Naranja Textura: Pegajosa	Bacilo Gram negativo
P23		Forma: Ovalada Borde: Entero Elevación: Plano Color: Blanco Textura: Pegajosa	Bacilo Gram negativo
P24	No Disponible	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Plano Color: Translucido Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
P25		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevado Color: Rosado claro Textura: Pegajosa	Bacilo Gram negativo
P26		Forma: Umbeliforme Borde: Entero Elevación: Elevado Color :Blanco Textura: Pegajosa	Estafilococo Gram positivo

Cepa	Foto	Característica macroscópica	Característica microscópica
P27		Forma: Ovalada Borde: entero Elevación: Elevado Color: Rosado brillante Textura: Cremosa	Bacilo Gram positivo
		Forma: Ovalada Borde: Entero Elevación: Elevado Color: Blanco Textura: Suave	Bacilo Gram positivo
P28		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Rosado claro Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
P29		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Rosado Textura. Suave	Bacilo Gram negativo
		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Blanco Textura: Suave	Bacilo Gram positivo
P30	No disponible	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Translucido Textura: Suave	Coco Gram positivo
P31		Forma: Ovalada Borde: Entero Elevación: Elevado Color: Rosado Textura: Suave	Coco Gram positivo
		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevado Color: Blanco Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
P32		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: plano Color: Blanco Textura: Suave	Bacilo Gram positivo

Cepa	Foto	Característica macroscópica	Característica microscópica
P33		Forma: circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Salmón opaco Textura: Cremosa Dura	Bacilo Gram positivo
		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Blanco Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: elevado Color: Blanco brillante Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
P34		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: elevado Color: Blanco brillante Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: elevado Color: Blanco perla Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
P35		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Blanco Textura: Cremosa	Bacilo Gram negativo
P36		Forma: Irregular Borde: Lobulado Elevación: Convexo Color: Naranja Textura: Suave	Bacilo Gram negativo
P37		Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Elevado Color: Blanco Brillante Textura: Suave	Bacilos Gram negativo
P38	No Disponible	Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexo Color: Translucido	Bacilo Gram negativo

Se asume entonces en esta investigación, que las colonias aisladas utilizando el PETN como sustrato, poseen el mismo comportamiento que las cepas aisladas cuando se utiliza TNT como sustrato y por lo tanto la investigadora considera que el cambio de pigmentación de las colonias no es necesariamente un indicador de degradación pero si de tolerancia; 15 de los morfotipos aislados no presentaron capacidad degradadora del explosivo, según cuantificación de PETN residual por HPLC.

En algunos de los aislamientos obtenidos, aunque se observó un solo tipo de colonia, se evidenció a nivel microscópico la presencia de dos tipos de microorganismos que al parecer podría interpretarse como una asociación microbiana a la cual se la ha denominado co-cultivo; esta clase de asociaciones ha sido reportada en investigaciones de biodegradación de hidrocarburos por Boonchan, 2000. Esta asociación fue comprobada durante este estudio por caracterización molecular y hace parte de los resultados que aquí se presentan y se discuten.

Se considera que las cepas aisladas en esta investigación utilizan el oxígeno como aceptor de electrones, son aerobios, por las condiciones en las que fueron aisladas; pueden ser aerobios obligados o Facultativos (Madigan et al, 2004).

Para el aislamiento de microorganismos potencialmente degradadores de explosivos, se utilizó el medio de cultivo T2, el cual contenía PETN como única fuente de nitrógeno y fuentes de carbono fácilmente asimilable como la glucosa, por cuanto para que el microorganismo utilice los carbonos del PETN requiere el acceso a los carbonos que forman su estructura básica o no era suficiente para el desarrollo de las cepas, situación recomendada en el estudio de Villegas, 2009, en donde sugiere la adición de fuentes de carbono diferentes al explosivo para el medio de cultivo, para generar un balance de nutrientes favorables para la degradación.

6.1. Pruebas de biodegradabilidad

De un total de 36 cepas, 26 presentaron una densidad óptica de crecimiento de 0.125 ± 0.25 . Con este criterio se garantizó que las cepas seleccionadas debían demostrar degradación del PETN mediante Cromatografía líquida HPLC (Ver **Anexo 3**). Las 10 cepas restantes no alcanzaron la densidad óptica establecida como criterio, y se excluyeron del análisis de degradación, como se muestra en la tabla 4.

Seis (6) de las cepas en estudio no presentaron porcentaje de degradación de PETN, posiblemente porque no se logró homogenizar el explosivo; por lo tanto, los resultados obtenidos en HPLC no fueron contundentes para determinar la presencia o ausencia de degradación. Las cepas fueron descartadas para este estudio y se consideró que debido a la baja solubilidad del explosivo no fue posible determinar el porcentaje de degradación. Una situación similar a la que se presentó en esta investigación, fue reportada por Binks en 1996, quien afirmó que algunos datos tuvieron que ser descartados del estudio, por presentar el mismo comportamiento reportado en este trabajo.

Con relación a las cepas que crecieron en presencia del explosivo pero que su porcentaje de degradación fue bajo, podría explicarse porque poseen algún mecanismo de tolerancia, produzcan las enzimas, pero sean intracelulares y no puedan intervenir en la degradación del explosivo, este proceso se ha reportado dentro o fuera de la célula; otro explicación podría ser por la presencia de bombas de flujo iónico que sacan el explosivo acumulado al interior del microorganismo y así se disminuyen el efecto tóxico (Nicolaou, 2010).

Tabla No 4. Porcentaje de degradación

Cepa	Porcentaje de degradación
P1	*
P2	18,28
P3	*
P4	19,87
P5	---
P7	20,47
P8	88,16
P10	62,11
P11	---
P12	*
P13	*
P14	55,77
P15	57,70
P16	6,58
P17	---
P18	---
P19	45,84
P20	---
P21	17,47
P22	*
P23	44,48
P24	---
P25	---
P26	---
P27	85,96
P28	*
P29	88,97
P30	---
P31	100
P32	46,83
P33	81,82
P34	73,67
P35	49,21
P36	38,80
P37	20,75
P38	---

***Indica concentración de PETN no determinada**
--- indica las cepas que no alcanzaron la densidad óptica

En la figura 6, se representa el porcentaje de cepas obtenidas con los diferentes porcentajes de capacidad degradadora de PETN, se observó que solo el 1.44% de las cepas aisladas poseían una capacidad degradadora que oscilaba entre el 51 al 75 %, mientras que el 1.80 % del total de las cepas obtenidas presentaban dicha capacidad entre el 76 al 100 %. De estas últimas se seleccionaron las cepas para continuar con la investigación.

Las cepas que degradaron el PETN en un porcentaje mayor o igual al 50% Ávila, 2012, fueron nueve (9) y se caracterizaron por biología molecular. (Ver Tabla 5).

Figura 6. Porcentajes de degradación de las cepas aisladas

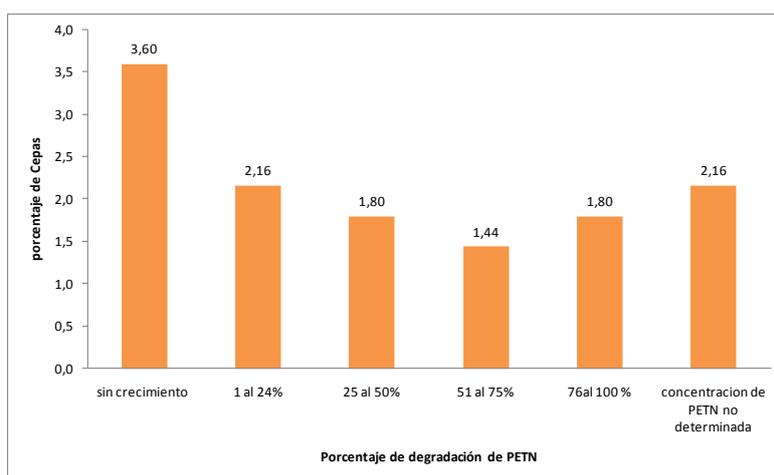


Tabla No 5. Clasificación taxonómica

Cepa	Nombre microorganismo	% de identidad
P10	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99
P14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	87
P29	<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	98
	<i>Leifsonia aquatica</i>	99
P31	<i>Cupriavidus basilensis</i>	98
	<i>Rhodococcus ruber</i>	99
P8	<i>Variovorax paradoux</i>	99
	<i>Variovorax boronicumulans</i>	99
P27	<i>Rhodococcus ruber</i>	99
	<i>Mycobacterium</i>	97
	<i>Fluoranthenvivorans</i>	97
P33	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99
	<i>Gordonia aichiensis</i>	99
P34	<i>Pseudomonas geniculata</i>	91
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98
	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	97
P15	<i>Rhodococcus gingshengii</i>	99

Los resultados de degradación y el tipo de microorganismo aislado permiten inferir que estas cepas podrían estar expresando enzimas de tipo reductasas capaces de degradar PETN como lo descrito por White, 1996 quién comprobó la presencia de éster de nitrato- reductasa en *Agrobacterium radiobacter* y Pent- reductasa en la *Enterobacter cloacae* PB2 (Binks et al. 1.996). La presencia de estas enzimas en las cepas será determinada en próximos estudios.

Algunas de estas cepas, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Variovorax paradoxus* han sido reportadas conformando consorcios capaces de degradar de 2,4 DNT sub producto del TNT, (Snellinx, 2003), este subproducto es más tóxico que el PETN.

Agrobacterium radiobacter ha sido reportado como degradador de PETN a los subproductos de pentaeritritol trinitrato y pentaeritritol dinitrato. Se infiere que *Agrobacterium larrymoorei* (P34) y *Agrobacterium tumefaciens* (P10) por ser del mismo género puede degradar el PETN.

Fase 2. Crecimiento de las cepas en estudio a diferentes concentraciones de explosivos.

Podría decirse que existe una baja toxicidad del PETN para las cepas seleccionadas que crecieron favorablemente en medio sólido T2, en concentraciones de explosivo de 100, 300, 600 y 1000 mg/L. En el control (0 mg/L de PETN), se observó bajo crecimiento con respecto a las concentraciones seleccionadas. Es así, como se infiere, que el PETN es utilizado como fuente de nitrógeno por las cepas seleccionadas y por lo tanto no es necesario aplicar una fuente adicional del nutriente en mención.

Para saber si existen diferencias en el número de células viables de las cepas en estudio para cada una de las concentraciones de PETN establecidas, se utilizaron las siguientes hipótesis:

- a. Es posible que la concentración de PETN en el medio de cultivo no influya en el número de células viables de las cepas en estudio.

$$H_0: \mu_0 = \mu_{100} = \mu_{300} \dots = \mu_{1000}$$

- b. Es posible que influya la concentración de PETN en el medio de cultivo en el número de células viables de las cepas en estudio.

$$H_a: \mu_i \neq \mu_j$$

Según el análisis estadístico observado en los diferentes tiempos, la concentración de PETN influye en el crecimiento de las dos cepas evaluadas (P31 y P29) (Ver **Anexo 4**). Se observó que a medida que las dos cepas van creciendo, las altas concentraciones de explosivo son menos tóxicas a través del tiempo, posiblemente debido a la reducción del sustrato en el medio de cultivo o a la tolerancia y adaptación que empiezan a tener las nuevas generaciones.

En los resultados de la cepa P29 se puede observar que las concentraciones de 100, 300 y 600 mg/L de PETN mejoran el crecimiento de la cepa, en términos de aumento de células viables y de producción de biomasa medida por densidad óptica. La fase exponencial se evidenció entre la 0 y las 24 horas y partir de este periodo la cepa presentó fase estacionaria.

A la concentración de 1000 mg/L, la cepa no presentó una fase exponencial por lo que se podría interpretar que la alta concentración de explosivo aumenta el tiempo de adaptación del microorganismo al medio de cultivo, o simplemente que es una

concentración que no puede tolerar. Se observó a partir de las 24 horas un crecimiento, por lo que se infiere, que sea posible que la cepa necesite más tiempo para colonizar el medio. Los datos de absorbancia para este caso no son confiables posiblemente debido a la baja solubilidad del explosivo.

En cuanto al control, se observó crecimiento durante las primeras seis horas de incubación, lo cual pudo ser provocado por las trazas de explosivo presentes en el medio cuando se inocula, pero luego se presentó una disminución en las células viables con aumentos leves hasta las 24 horas, donde se presentó la fase estacionaria. La ausencia de sustrato (PETN) en el medio de cultivo, disminuyó el crecimiento de la cepa para este microorganismo. Por lo que se infiere, para este caso que el PENT es utilizado como única fuente de nitrógeno y no es necesario añadir una fuente adicional. Ver Figura 7.

Con respecto a la cepa P31, se observó crecimiento en cada una de las concentraciones establecidas de explosivo y presentó fase exponencial en las primeras 24 horas tanto para el conteo en placa como para la absorbancia, dicho microorganismo crece apropiadamente a estas concentraciones de sustrato. Al igual que en la cepa anterior la ausencia de explosivo disminuye el crecimiento de la cepa. En la medición de densidad óptica, se observó un crecimiento diferente entre las concentraciones establecidas con respecto al número de células viables, esto pudo ser ocasionado por la acumulación y producción de metabolitos que no son detectados por el recuento en placa. Ver Figura 8

Para las cepas en estudio, se pudo inferir que la cantidad de nitrógeno que aporta el PETN es suficiente para el desarrollo de la población microbiana y las concentraciones de fuentes de carbono utilizadas en el medio de cultivo son viables para el crecimiento de la cepa, pero la ausencia del explosivo reduce su crecimiento.

Las regresiones lineales mostraron que el comportamiento para ambas cepas es de orden uno (**Ver Anexo 5**); la interpretación de estos resultados podría ser que la relación de crecimiento celular y cantidad de sustrato es directamente proporcional, es decir, a mayor concentración de sustrato (600 y 1000 mg/L) hay aumento en el número de células viables, además, estos datos permitieron la obtención de parámetros cinéticos para cada una de las cepas en cada concentración establecida. (Tabla 4).

Tabla No 6. Parámetros cinéticos de las cepas P29 y P31.

Concentración de PETN (mg/L)	Tiempo de duplicación (td)		Velocidad específica de crecimiento (μ_x)	
	Cepa P29	Cepa P31	Cepa P29	Cepa P31
100	2.94 h	2.83 h	0.10 h ⁻¹	0.11 h ⁻¹
300	2.78 h	2.77 h	0.12 h ⁻¹	0.12 h ⁻¹
600	2.56 h	2.56 h	0.15 h ⁻¹	0.15 h ⁻¹
1000	---	2.61 h	---	0.14 h ⁻¹

También se puede observar que en cuanto a las concentraciones 300 mg/L y 600mg/L la velocidad específica para las dos cepas es la misma, de igual forma, el crecimiento es similar porque tiene valores muy parecidos.

La cepa P29 no presentó fase exponencial a la concentración de 1000 mg/L, mientras que la cepa P31, presentó crecimiento a dicha concentración.

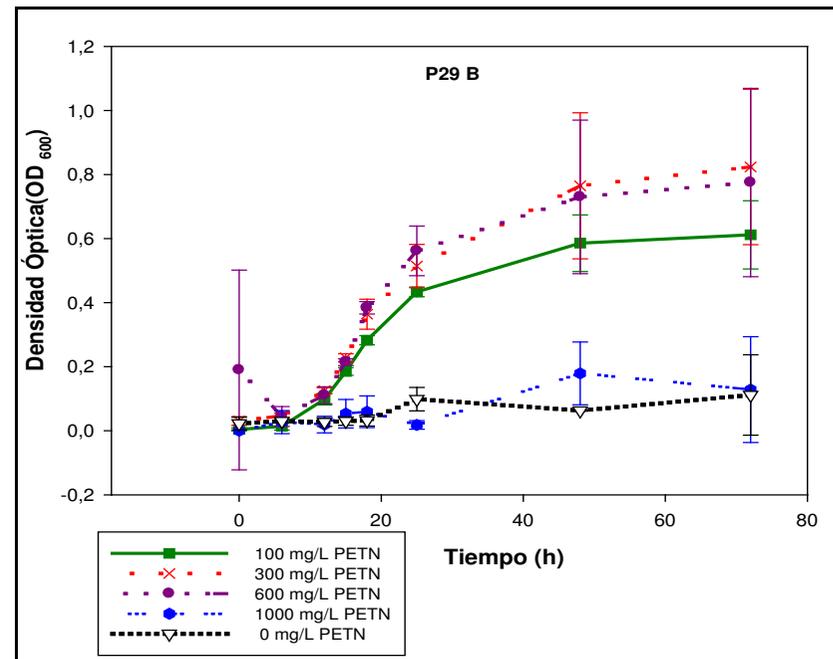
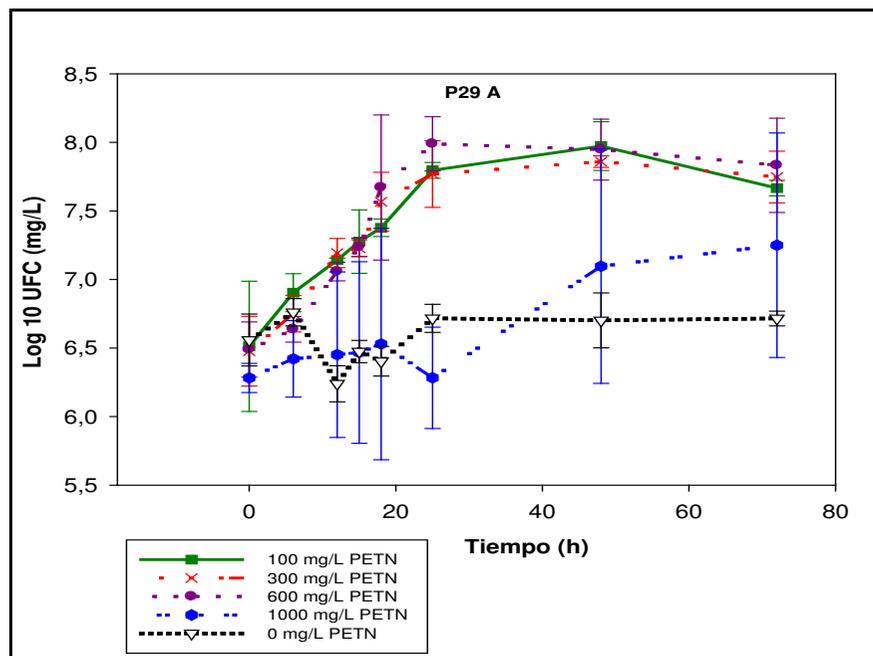


Figura No 7 A. Curvas de crecimiento de la cepa P29 con recuento en placa (ufc/mL) a diferentes concentraciones
 B. Densidad óptica (D.O) para cada uno de los tratamientos establecidos.

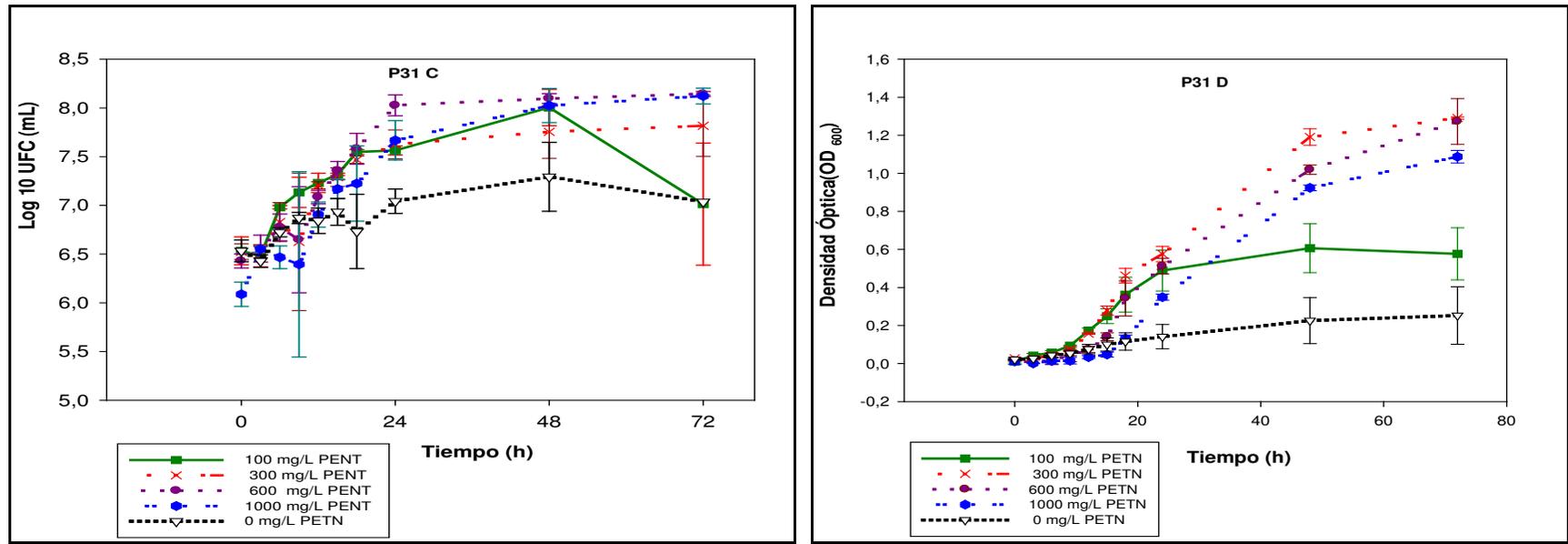


Figura No.8 C. Curvas de crecimiento de la cepa P31 con recuento en placa (ufc/mL) a diferentes concentraciones
 D. Densidad óptica (D.O) para cada uno de los tratamientos establecidos

Fase 3. Degradación de PETN por las cepas seleccionadas bajo parámetros de pH y Temperatura.

6.2 Degradación de PETN según valores de pH

Se evidenció degradación de PETN durante las 96 horas de incubación, a una temperatura de 30°C y a 200 rpm, por parte de las cepas en estudio para cada uno de los pH establecidos (6,0 ($\pm 0,03$) - 7.0 ($\pm 0,04$) - 8.0 ($\pm 0,03$)). Esta degradación se cuantificó a partir de dos variables que fueron: reducción de la concentración inicial del explosivo (Concentración inicial - Concentración final) y acumulación de nitritos (NO_2^-).

Los controles abióticos para cada uno de los pH establecidos presentaron degradaciones bajas (menores al 18%) pero diferentes en términos de porcentaje para cada uno de ellos. Así mismo, se observó que a pH 7.0., se muestra el porcentaje de degradación de los controles abióticos para cada uno de los pH establecidos. Ver Tabla No 7. Sin embargo, los porcentajes presentados por los abióticos en cada uno de los tratamientos son aceptados bajo las condiciones del estudio.

Tabla No 7. Porcentaje de degradación de los controles abióticos a diferentes pH

pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
17,1	9.37	16.63

La cepa P29 también presentó degradación de PETN en cada uno de los tratamientos establecidos, pero a diferencia de la cepa P31, el mayor porcentaje de degradación de explosivo con respecto a la concentración inicial se evidenció a pH 8.0 (84.28%), seguido por el pH 6.0 (82.16%) y finalmente pH 7.0 (74,28%). Para cada una de las cepas se observó una acumulación de nitritos. (Figura 9 y 10)

La cepa P31, en términos generales presentó degradación en cada uno de los tratamientos planteados, sin embargo, el mayor porcentaje de degradación con respecto a la concentración inicial de explosivo, se presentó a pH 7.0 (79,36%), seguido por el pH 6.0 (77,55%) y finalmente pH 8.0 (71,75%). Para cada una de las cepas se observó una acumulación de nitritos. (Figura No 11 y 12)

Con base en los resultados obtenidos el pH 7,0 y 8,0 para las cepas P31 y P29 respectivamente, fueron las de mejor comportamiento para la degradación de PETN. Para establecer si hay diferencias significativas entre cada uno de los pH para cada una de las cepas en estudio, se plantearon las siguientes hipótesis:

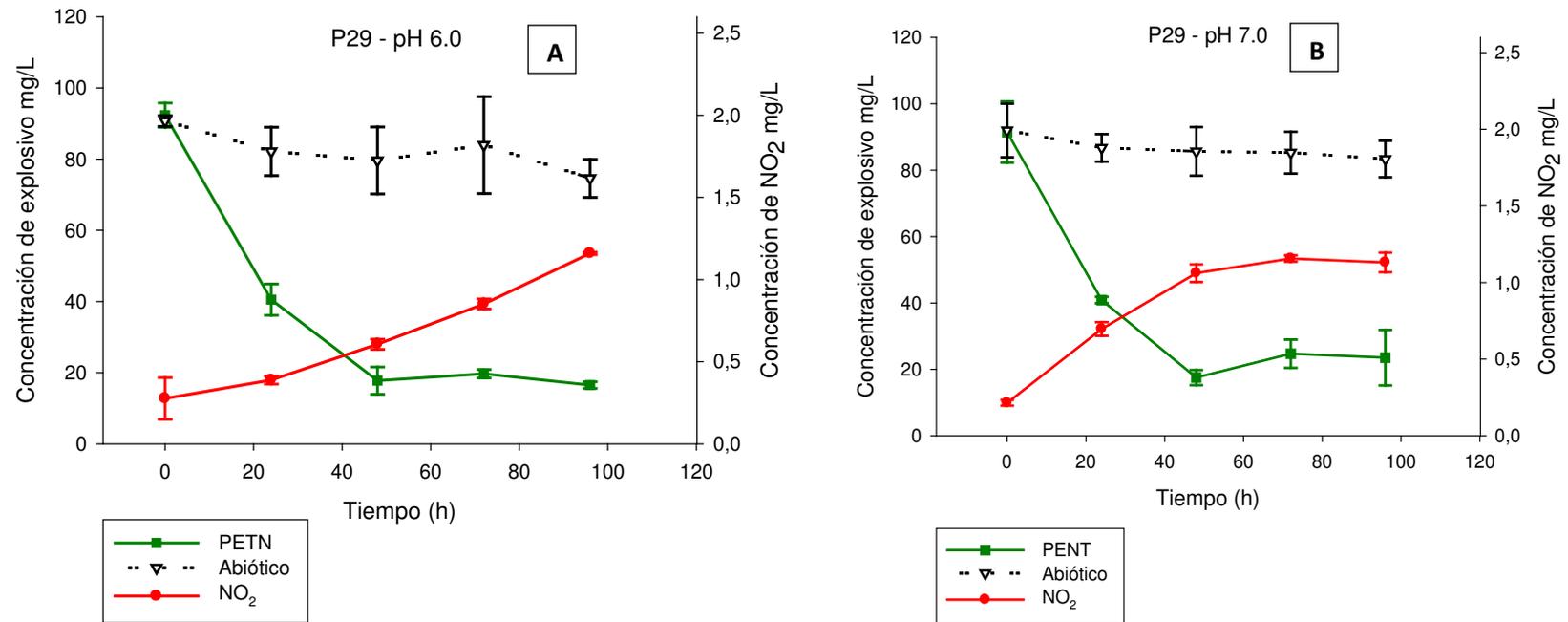


Figura No 9. Degradación de PETN por la cepa P29. A. pH 6.0. B. pH 7.0

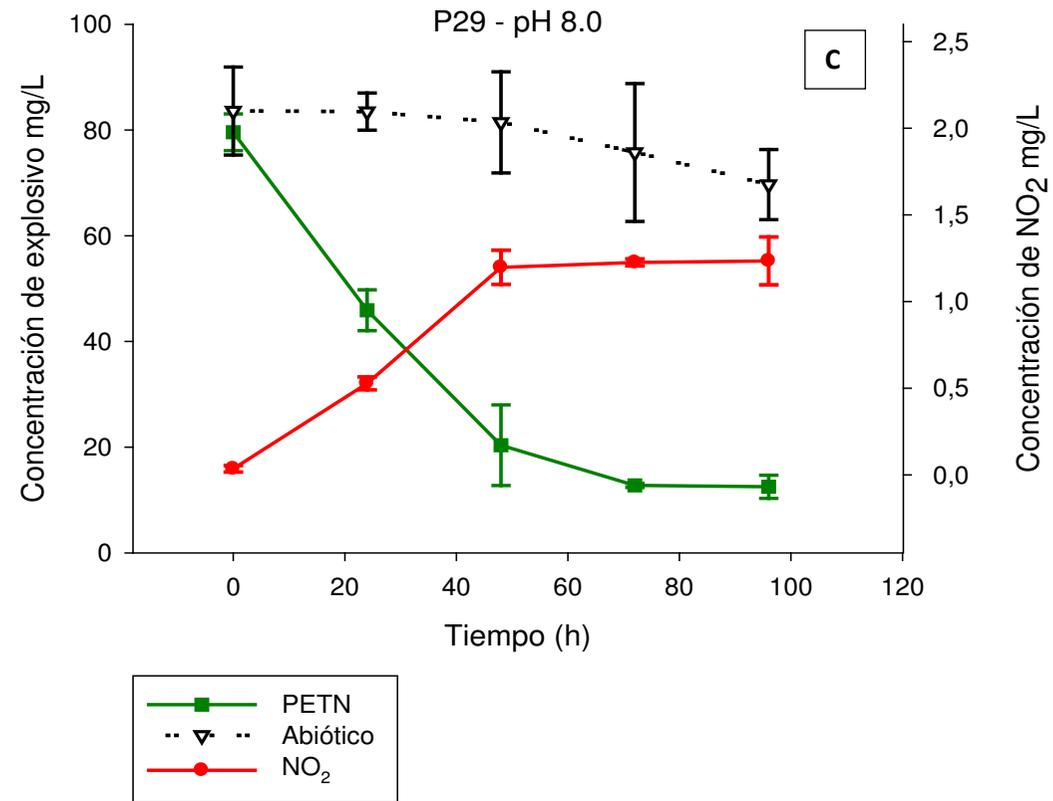


Figura No 10. Degradación de PETN por la cepa P29. C. pH 8.0

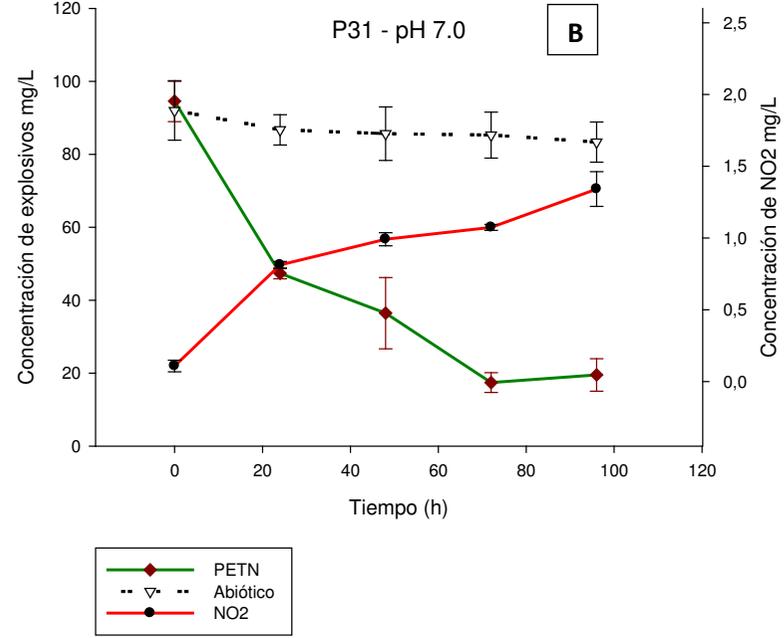
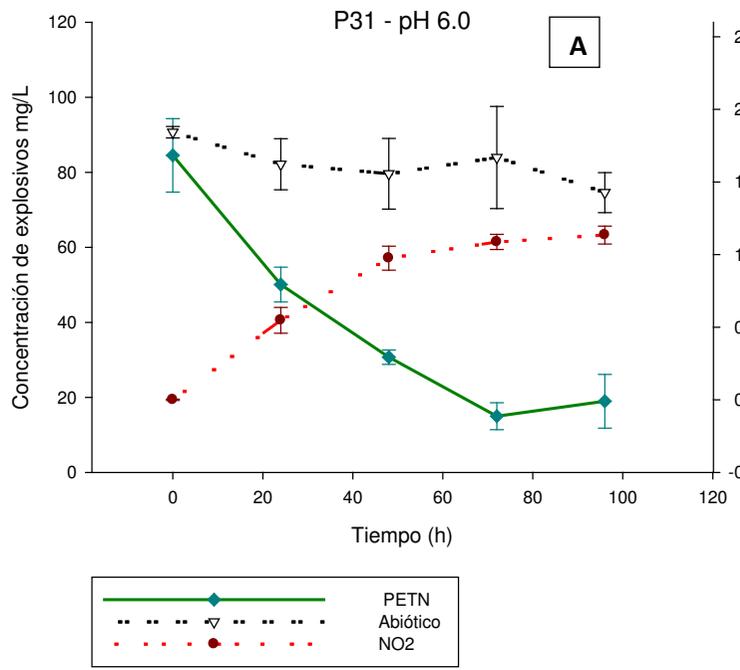


Figura No 11. Degradación de PETN por la cepa P31. A. pH 6.0. B. pH 7.0

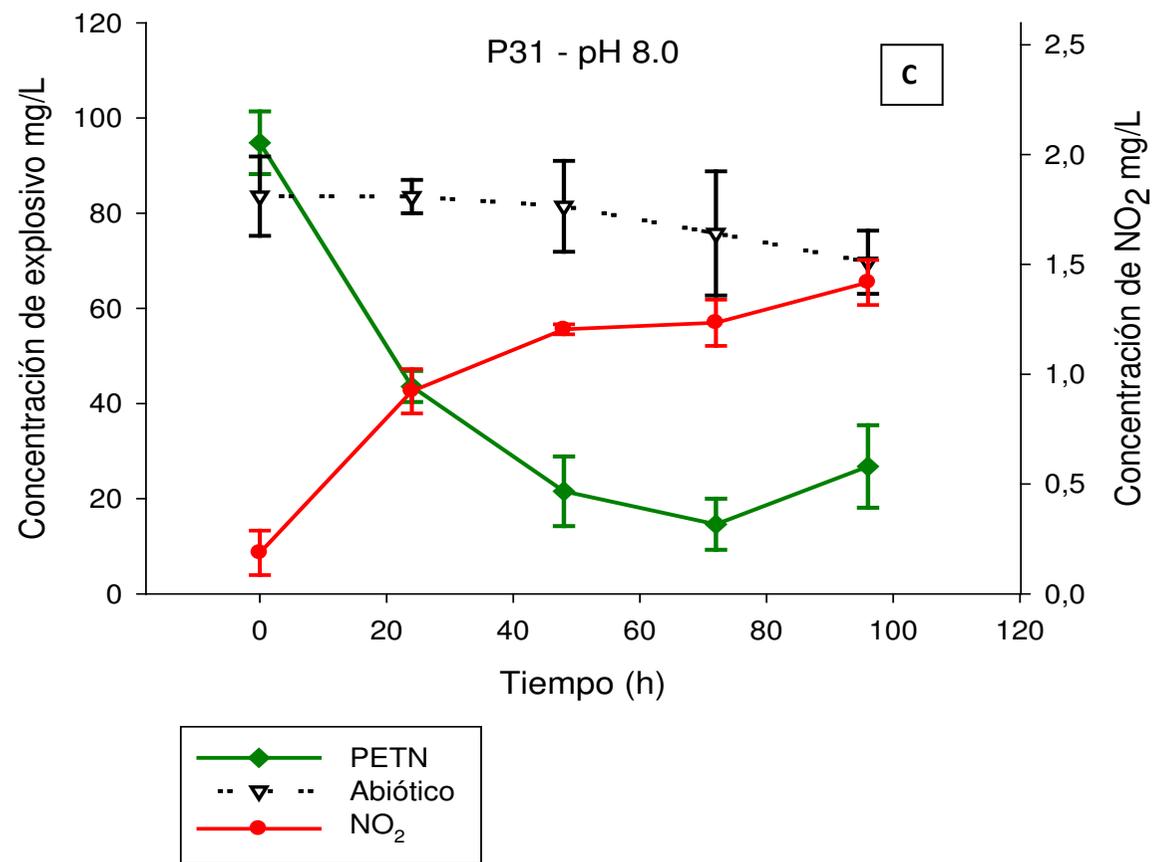


Figura No 12. Degradación de PETN por la cepa P31. C. pH 8.0

- a. El porcentaje de degradación del explosivo en cada uno de los pH establecidos es constante.

$$H_0: \mu_{6.0} = \mu_{7.0} = \mu_{8.0}$$

- b. El porcentaje de degradación del explosivo es diferente por lo menos en uno de los pH establecidos:

$$H_a: \mu_i \neq \mu_j$$

Según el análisis estadístico observado en los diferentes tiempos, los tratamientos de pH establecieron que no existen diferencias significativas en el porcentaje de degradación del explosivo, es decir, el comportamiento de las cepas es similar en cada uno de los pH. (Ver **Anexo 6**).

Debido a que las cepas P31 y P29 pueden degradar el explosivo a un rango amplio de pH, estos resultados sugieren que las cepas posiblemente expresan una pent-reductasa o éster de nitrato-reductasa muy estable y por lo tanto no se ve afectada su actividad enzimática o expresan varias reductasas que actúan en los diferentes pH evaluados, en ambos casos proporciona una ventaja a estas cepas de sobrevivir en el suelo.

6.3. Degradación de PETN según valores de temperatura.

Se evidenció degradación de PETN durante las 96 horas de incubación, a pH 7 (($\pm 0,3$)) y a 200 rpm, por parte de las cepas en estudio para cada uno de las temperaturas establecidas (20°C ($\pm 0,5$)) - 25°C ($\pm 0,4$) – 30°C ($\pm 0,3$) – 35°C (0,4)). Esta degradación se cuantificó a partir de la reducción de la concentración inicial del explosivo (Concentración inicial – Concentración final de PETN). La producción de subproductos propios de la degradación del explosivo no fue posible debido a la ausencia de estándares propios de la degradación de PETN como: Pentaeritritol dinitrato, Pentaeritritol mononitrato y Pentaeritritol, de compleja adquisición. Los datos obtenidos durante la cuantificación de nitritos (NO_2^-) no fueron fiables y por tal razón no fueron reportados.

Los controles abióticos para cada uno de las temperaturas establecidas presentaron degradación es más bajas con respecto al tratamiento con los diferentes pH, (menores al 15%). En la Tabla No 8, se muestra el porcentaje de degradación de los controles abióticos para cada uno de las temperaturas establecidos.

Tabla No 8. Porcentajes de degradación de los controles abióticos a diferentes temperaturas

Temperaturas			
20°C	25°C	30°C	35°C
14,26	14,50	9,45	13,5

Las cepas en estudio, presentaron su menor porcentaje de degradación a 20°C, dentro de esta variable, la cepa P29 exhibió una degradación del 35,50% con respecto a la concentración inicial de explosivo, mientras que la cepa P31 expreso un porcentaje del 40.35% (Figura No 13).

A 25°C se observó una disminución en el porcentaje de degradación de las dos cepas con respecto a la temperatura anterior, no fueron muy bajos pero si muy similares en relación a la temperatura de 20°C; se infiere que para la P29 el porcentaje fue de 32,29% y para la P31 del 40,10 %. (Figura No 14)

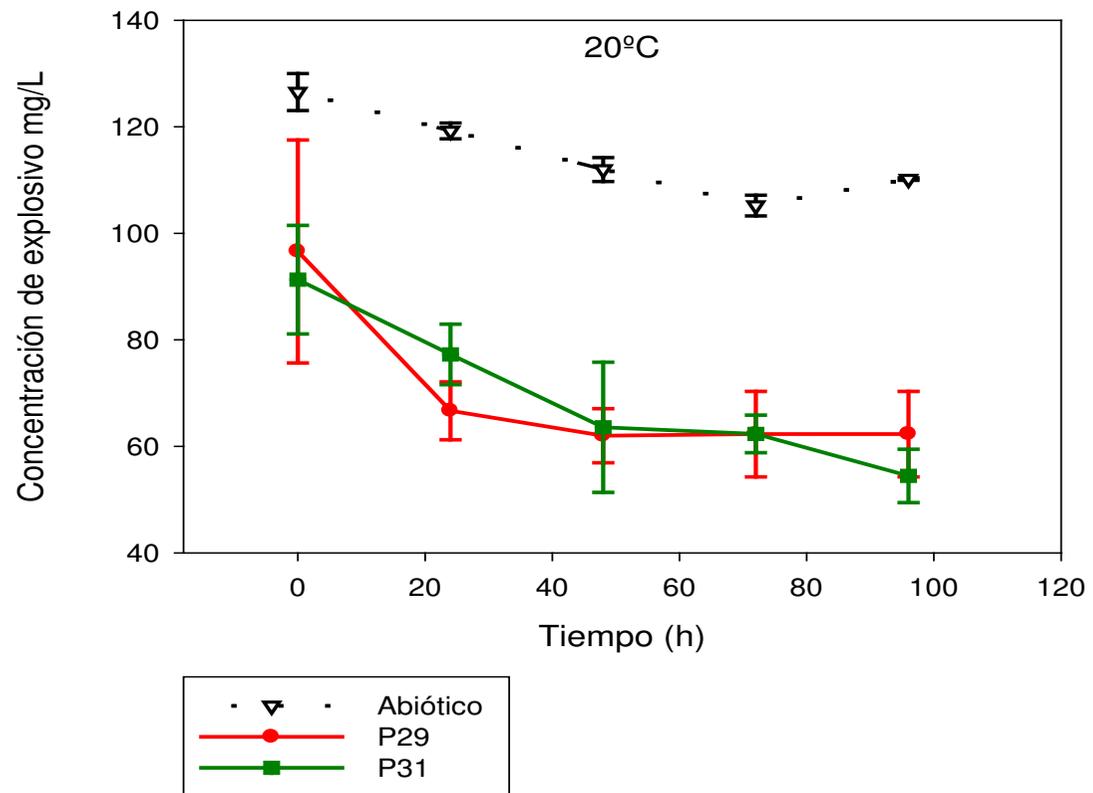


Figura No 13. Degradación de PETN por las cepas en estudio a 20°C

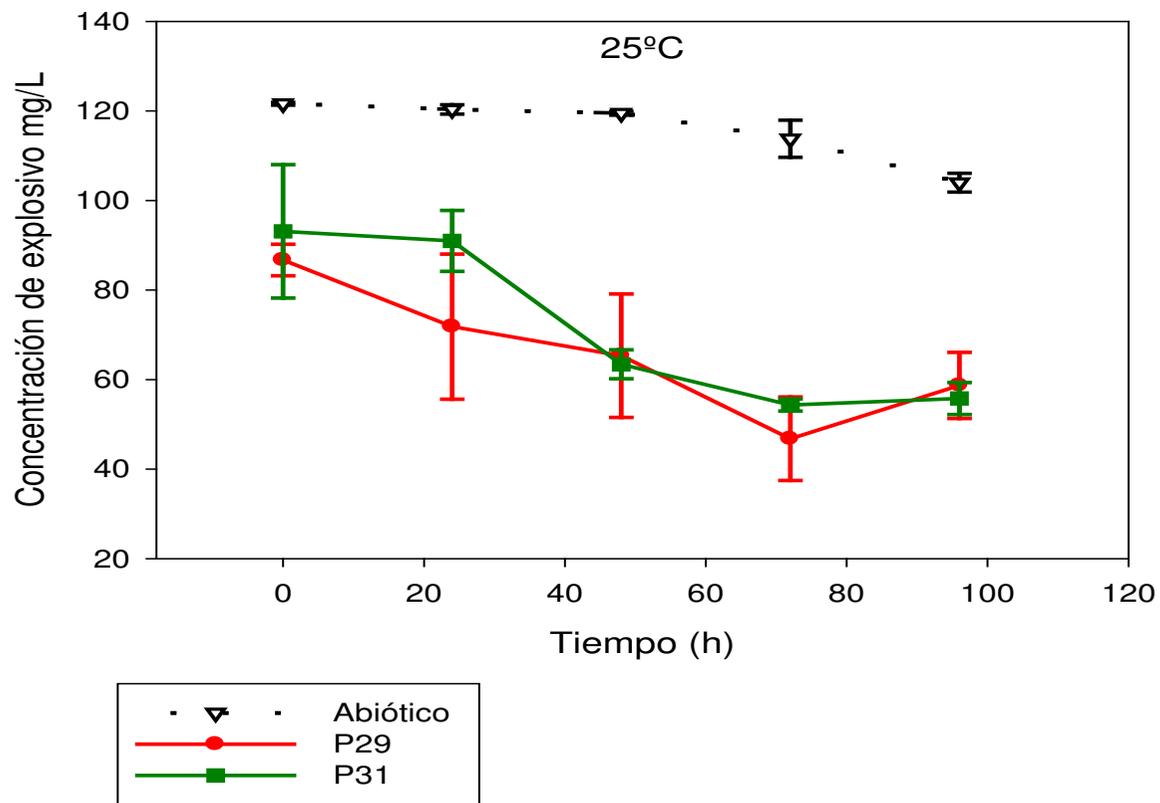


Figura No 14. Degradación de PETN por las cepas en estudio a 25°C

A 30°C se observaron los más altos porcentajes de degradación de todas las temperaturas establecidas, por parte de las cepas en estudio, se destaca la cepa P31 con un porcentaje del 53,51%, mientras que la cepa P29, solo reportó el 42,86%, lo que comprueba que la cepa P31 posee mayor capacidad degradadora a través del tiempo que la cepa P29. (Figura No 15).

A 35°C se observó para la cepa P29 el porcentaje de degradación más bajo de las temperaturas planteadas, solo fue del 33,33%, mientras que la cepa P31 lo hizo en un 50,01%, muy similar a la temperatura de 30°C (Figura No 16)

Para confirmar si la temperatura de 30°C es donde ocurre la mayor degradación del PETN, por parte de las cepas en estudio, se plantearon las siguientes hipótesis:

- a. El porcentaje de degradación del explosivo para cada una de las temperaturas establecidas es constante.

$$H_0: \mu_{20^\circ C} = \mu_{25^\circ C} = \mu_{30^\circ C} = \mu_{35^\circ C}$$

- b. El porcentaje de degradación del explosivo es diferente por lo menos en una de las temperaturas establecidas:

$$H_a: \mu_i \neq \mu_j$$

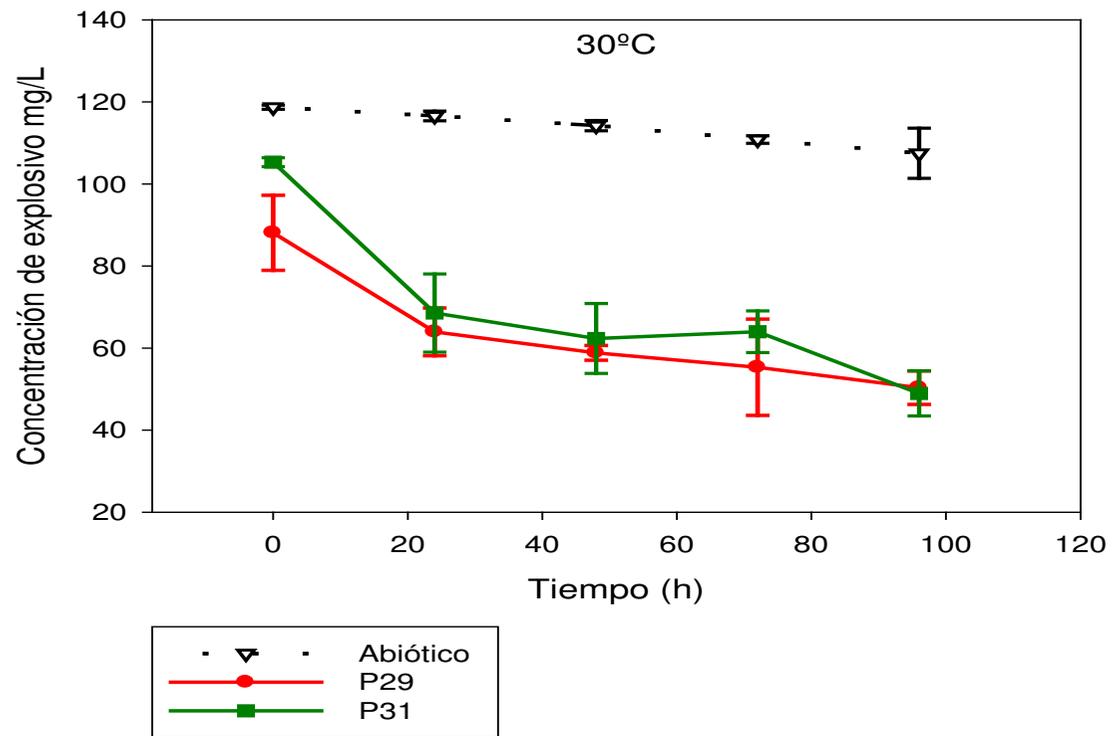


Figura No 15. Degradación de PETN por las cepas en estudio a 30°C

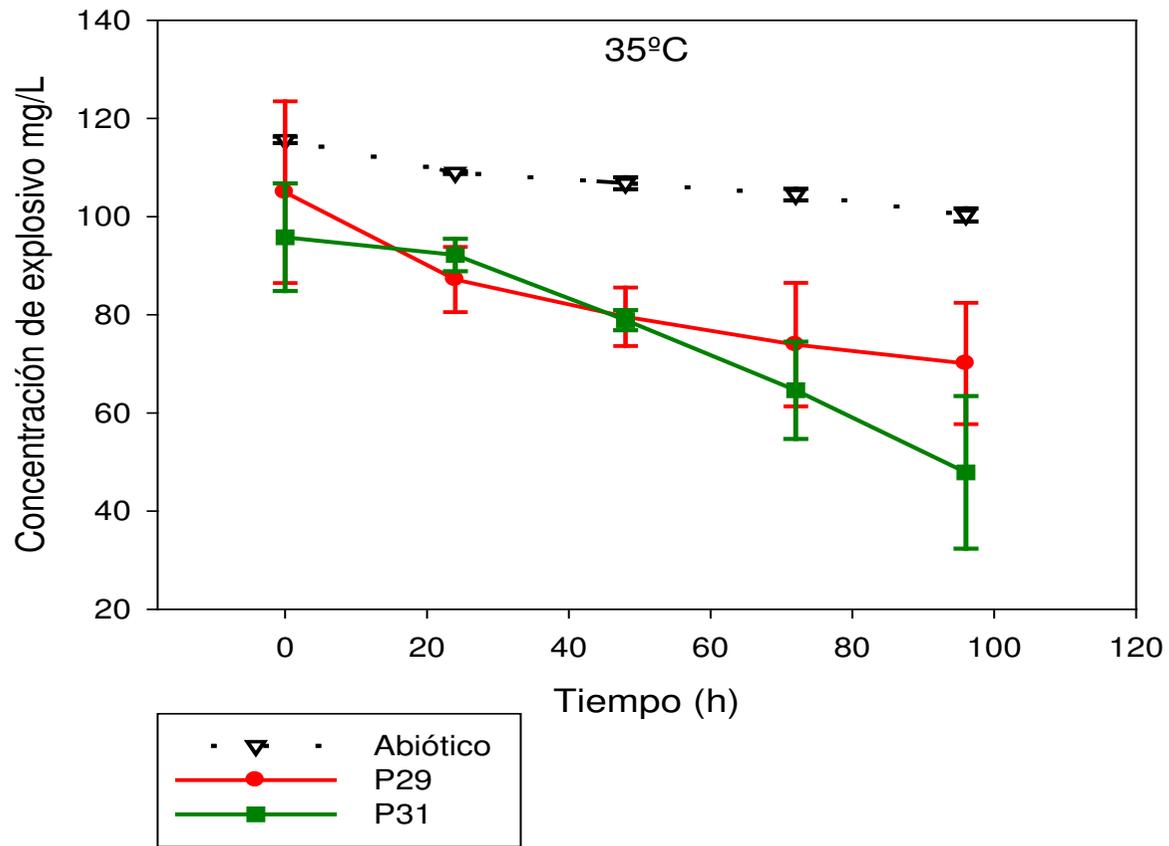


Figura No 16. Degradación de PETN por las cepas en estudio a 35°C

Los resultados estadísticos obtenidos para la cepa P29 se encuentran en el **Anexo 7**. En ellos se demuestra que no hay evidencia estadística de que la degradación del sustrato dependa de la temperatura en el tiempo. Para la cepa P31, la temperatura no influye en la degradación del PETN. A 30°C se presentó el porcentaje más alto de degradación por las cepas en estudio.

Estos estudios indican que las reductasas no son sensibles a la temperatura ni al pH, se sugiere una alta estabilidad de la enzimas, lo que podría significar que las cepas P31 y P29 puedan degradar el explosivo *in vivo* donde las temperaturas pueden variar dependiendo del tipo de suelo y la profundidad.

En general los dos co-cultivos (P29 y P31) obtenidos en este estudio podrían degradar PETN en forma individual o asociadamente. En el primer caso, cada cepa podría expresar la pent-reductasa u otra enzima desnitrificante y llevar a cabo la degradación secuencial completa del sustrato. Y cada cepa podría utilizar el PETN y sus metabolitos independiente de la otra.

En el segundo caso habría tres opciones a considerar. La primera es una degradación mediante la complementación. Es decir una de las cepas solo puede degradar parcialmente el sustrato, el cual es utilizado por la segunda cepa que a su vez termina el proceso de degradación. De esta manera, las dos cepas se benefician de la generación de metabolitos que le permiten su crecimiento. La segunda posibilidad sería, que una de las cepas utiliza los metabolitos que produce la otra cepa, al degradar el explosivo pero sin causar interacción negativa. Finalmente, la tercera posibilidad es de cooperación en la cual una de las cepas provee a la otra con los metabolitos del

PETN mientras la otra produce otros metabolitos que la otra cepa necesita; de esta manera, las dos cepas obtienen los elementos esenciales para crecimiento y supervivencia.

Fase 4. Degradación de PETN por las cepas combinadas.

6.4. Degradación de PETN por la combinación de las cepas en estudio

6.4.1 Combinación de las cepas.

Al realizar el confrontamiento dual, se observó que las bacterias en estudio, no produjeron sustancias tóxicas que inhibieran el crecimiento entre ellas. Por lo tanto son susceptibles a ser combinadas ya que mostraron sinergia (Figura No17). Esta prueba da una aproximación a la posible formación de consorcios, en donde una de las especies que lo conforman puede tomar como sustrato los metabolitos de la degradación de otra, para continuar con el proceso y posiblemente completarla o llevarla a la siguiente ruta de degradación. (Antolinez, 2001)

6.4.2 Biodegradación del PETN.

Las condiciones de pH y temperatura a las cuales se realizó el ensayo, se establecieron a pH 7.0 (aunque en las cepas individuales no hubo diferencia significativa en el porcentaje de degradación de explosivos entre los diferentes valores de pH. Se eligió 7.0 porque el explosivo presentó mejor solubilidad, a 30°C (aunque no hubo diferencias significativas en el porcentaje de degradación entre las temperaturas establecidas, 30°C fue donde se presentó la más alta degradación por cada una de las cepas) y a 200 rpm. La mezcla de las cepas en estudio evidenció una alta degradación de PETN durante las 96 horas de incubación, la cual se cuantificó bajo los mismos parámetros establecidos en el literal 3.1.

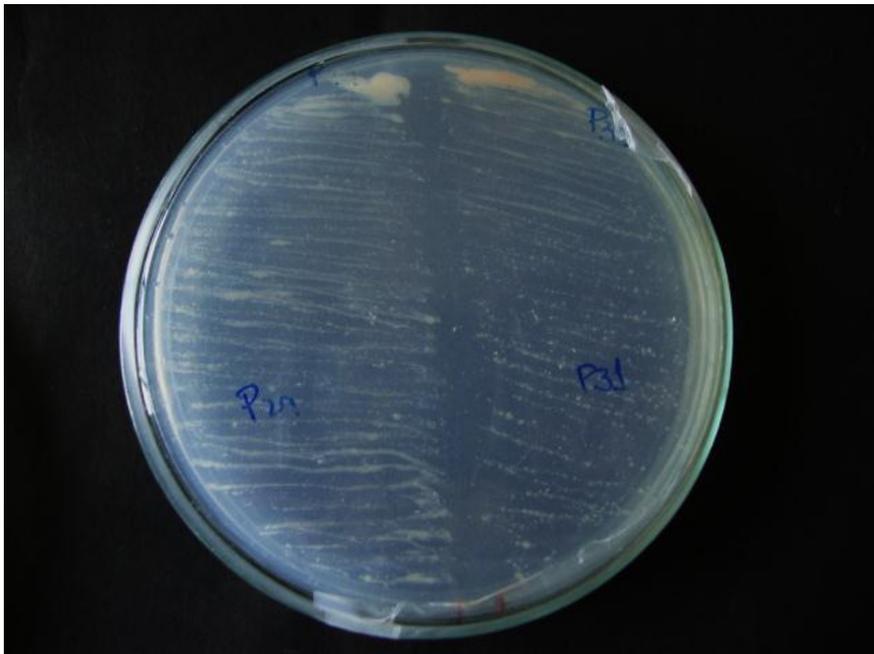


Figura No 17. Prueba de enfrentamiento dual de las cepas en estudio.

La mezcla de las cepas en estudio presentaron una degradación de PETN del 96.06%, durante 96 horas de incubación y bajo las condiciones establecidas. Este porcentaje fue mucho mayor que el presentado por cada una de las cepas de manera individual. Este resultado concuerda con lo reportado en otras investigaciones, las cuales afirman que la degradación en consorcios es mejor en términos de porcentaje de degradación y reducción de tiempo (Antolinez, 2001). (Figura No 18).

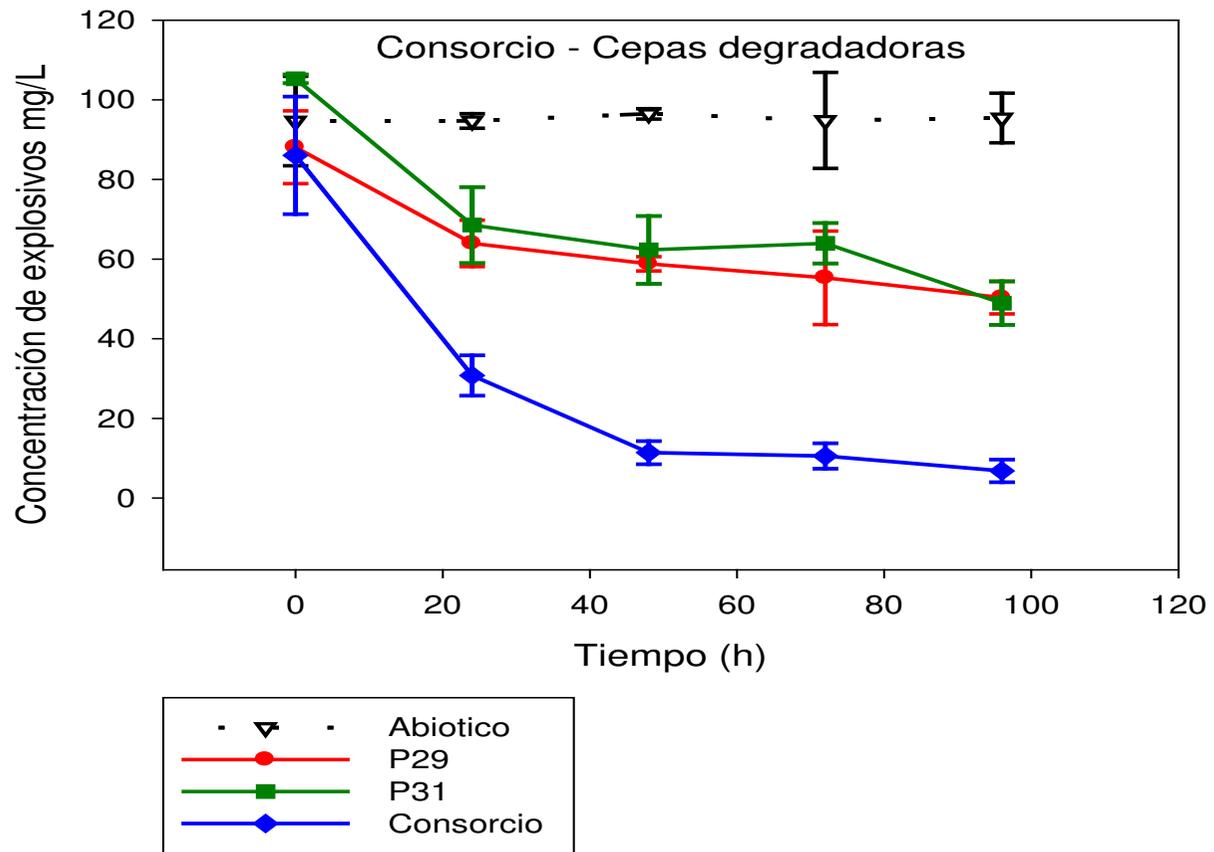


Figura No 18. Degradación del consorcio con respecto a las cepas individuales a 30°C

- a. El porcentaje de degradación de PETN presentado por las cepas combinadas es similar al presentado por las cepas individualmente.

$$\mathbf{H_0: \mu_{combinación} = \mu_{p29} = \mu_{p31}}$$

- b. El porcentaje de degradación de PETN presentado por la combinación de las cepas es diferente al presentado por las cepas individualmente.

$$\mathbf{H_a: \mu_i \neq \mu_j}$$

Para comprobar estas hipótesis se utilizaron las técnicas de Duncan y Turkey para comparación de muestras; los resultados obtenidos indicaron que existe diferencia al 5% de significancia en el porcentaje de degradación de las cepas en combinación con respecto al porcentaje de degradación presentado por cada una de las cepas a 30°C, mientras que no existe diferencia al 5% de significancia en el porcentaje de degradación presentado por las cepas P29 y P31 (Ver **Anexo 8**). Este resultado concuerda con lo reportado en otras investigaciones, las cuales afirman que la degradación en consorcios es mejor en términos de porcentaje de degradación y reducción de tiempo (Antolinez, 2001).

Los porcentajes mayores de degradación en la mezcla de las cepas sugieren una formación de comunidad donde se necesita comunicación entre células, posiblemente

mediante “*quorum sensing*”. Dos de las cepas identificadas en este estudio han sido estudiadas en la degradación de subproductos de TNT y se han asociado con otras cepas, lo que sugiere que tienen un potencial de interacción. Esto es importante porque indica que las cepas no han perdido su capacidad de interactuar en comunidad. Es necesario realizar estudios bioquímicos y moleculares más extensos, para determinar la interacción entre las cepas.

Por último, los resultados de este estudio indican un uso favorable de estas cepas *in vitro* ya que demuestran facilidad de crecimiento importante para producción en gran escala, degradación de PETN a rangos de pH y temperatura amplios, que pueden permitir que estas cepas se adapten a las condiciones de estudios de campo y mantienen su capacidad de formar comunidades lo cual permitiría en un futuro conformar nichos ecológicos para estos microorganismos altamente degradadores.

Para el trabajo en campo, existe una alta posibilidad de competencia con otras comunidades nativas; estar por largo tiempo bajo condiciones de laboratorio puede ser una desventaja para ellas, pues pueden haber perdido características que le permitan sobrevivir en el suelo. Otra desventaja de llevarlas a estudios de campo es la pérdida de presión selectiva que conduciría al uso de otros sustratos diferentes al PETN y posteriormente la pérdida de capacidad de degradación del explosivo, por cuanto las cepas pueden seleccionar sustratos más sencillos de degradar y consumir.

Por lo tanto es necesario realizar pruebas piloto en campo antes de formar el consorcio que hará parte del dispositivo.

CONCLUSIONES

De los ambientes con presencia de explosivos se aislaron cepas “*in vitro*” degradadoras de PETN con una capacidad de degradación mayor o igual al 50%. La mayoría son asociaciones de bacterias de diferentes especies llamadas co-cultivos, los cuales poseen una mayor capacidad degradadora que las especies no asociadas.

Las altas concentraciones de PETN reducen su toxicidad en la medida que las cepas P29 y P31 lo usan como sustrato y aumentan su población en el medio de cultivo. Es posible que al aumentar el porcentaje de degradación del explosivo se reduce la toxicidad en el medio.

El porcentaje de degradación del PETN por las cepas P29 y P31 en los rangos de pH y temperatura establecidos en la investigación no es significativamente diferente entre ellos. Sin embargo, se evidenció que la cepa P31 es más eficiente en procesos de degradación a altas concentraciones que la P29.

Las cepas P31 y P29 demostraron que no son antagónicas y por lo tanto pudieron ser mezcladas. La combinación de dichas cepas demostró que bajo los parámetros de pH y

temperatura establecidos, se aumenta la capacidad degradadora de PETN en comparación con el porcentaje obtenido por cada una de las cepas en estudio.

RECOMENDACIONES

Para próximas investigaciones sobre degradación de PETN donde se utilice la cepa P31, se sugiere adicionar surfactantes para mejorar las condiciones de degradación, ya que el *Rhodococcus ruber* que hace parte de este co-cultivo, en otras investigaciones de degradación de compuestos xenobioticos se ha reportado que el uso de surfactantes aumenta la capacidad de degradación.

Se recomienda que para próximos estudios “*in vitro*” relacionados con degradación de PETN con las cepas P31 y P29, se establezcan parámetros de pH 7.0 y temperatura 30°C, ya que el explosivo se comporta más estable en estos rangos.

De ser necesario evaluar la mezcla conformada por la cepa P29 y P31 en degradación de explosivos es importante establecer si en diferentes tiempos, su comportamiento es similar con relación a su capacidad degradadora.

Para minimizar los errores en la toma de datos con respecto a la solubilidad del PETN, se sugiere que dicho explosivo, antes de ser inoculado, sea conservado a 30°C, 200 rpm durante 7 días.

Se sugiere establecer otro método de medición del explosivo PETN como puede ser el método de Espectrofotometría de gases e implementar la técnica de *thin-layer chromatography* (TLC) con el fin de obtener los metabolitos del PETN y disminuir el error establecido por la solubilidad del explosivo mediante la técnica de HPLC.

Se sugiere realizar pruebas piloto en suelo con presencia de explosivo, de las cepas degradadoras P31 y P29, con el fin de determinar si estas no han perdido su capacidad de degradación y establecer estudios que permitan observar el comportamiento *in vivo* de estas cepas, con otras comunidades microbianas.

Si en las siguientes fases del proyecto, se utilizan las cepas P29 y P31, se recomienda diseñar los reactores para producción en masa de los microorganismos bajos los rangos de pH 6.0-7.0 y 8.0 y las temperaturas de 20-25-30-35 °C.

En cuanto al encapsulamiento de los microorganismos en el dispositivo de pentolita se recomienda realizar pruebas de post-encapsulamiento con el fin de observar y determinar la viabilidad de los microorganismos.

REFERENCIAS

1. Agrawal, J. P., Surve, R. N., Mehilal, & Sonawane, S. H. (2000). Some aromatic nitrate esters: synthesis, structural aspects, thermal and explosive properties. *Journal of hazardous materials*, 77(1-3), 11-31.
2. Antolinez, N., Acero, S., Martinez-Nieto P., Bernal-Castillo J. (2001). *Degradación del Malathion por Bacterias aisladas de la Bahía de Cartagena*. Paper presented at the IV Simposio Internacional de Desarrollo Sustentable/Regulación de la Fertilidad en Agroecosistemas de los Andes Tropicales.
3. Atlas, Ronald, Bartha Richard. (2006). *Ecología Microbiana y Microbiología ambiental*. Editorial Addison Wesley. Bogotá.
4. Ávila Arias Francy Helena. (2012) Estudio de la degradación aeróbica de 2,4,6 trinitrotolueno y pentaeritritol tetranitrato por bacterias aisladas de suelos contaminados. Máster. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencia Biológicas. Maestría en ciencia biológicas. Bogotá
5. Avinash M. T, K. J. (2000). Isolation of TNT tolerant *Pseudomonas* Species (strain KA) from TNT Contaminated Soil-Biotransformation of TNT.
6. Binks, P., French, C., Nicklin, S. & Bruce, N. 1996. Degradation of Pentaerythritol tetranitrate by *Enterobacter cloacae* PB2. *Applied and Environmental Microbiology*. 62 (4): 1214-1219.
7. Bruns-Nagel et al., (1997). Bioremediation of 2,4,6- trinitrotoluene-contaminated soil by anaerobic/aerobic and aerobic methods. In: Lewis, T., Newcombe, D., & Crawford, R. (2004). Bioremediation of soils contaminated with explosives. *Journal of Environmental Management* , 291–307.

8. Boonchan, S., Britz, M. L., & Stanley, G. A. (2000). Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), 1007-1019.
9. Calao, J. (2007). *Caracterización de la Industria Petrolera: tecnologías disponibles para la prevención y mitigación de impactos ambientales* Universidad Nacional sede Medellín Medellín.
10. Carvajal, S. M., y Herrera, D. Y. (2010). *Remoción del tetranitrato de pentaeritritol (petn) en agua residual sintética mediante bacterias nativas aisladas de ambientes con presencia de explosivos*. Undergraduate, Universidad de la Salle, bogotá.
11. Cattaneo et al., (1997). Natural attenuation of TNT in soil columns. In: Lewis, T., Newcombe, D., & Crawford, R. (2004). Bioremediation of soils contaminated with explosives. *Journal of Environmental Management* , 291–307.
12. Energía, M. d. M. y. (2009). *Anuario Estadístico Minero* Bogotá.
13. EPA, Environmental Protection Agency. 2005. Handbook on the management of munitions response actions. Office of solid waste and emergency response. Washington – United States.
14. Foltz, M. F. (2009). *Aging of Pentaerythritol Tetranitrate (PETN)*.
15. Frioni Lillian. (1999). Procesos microbiológicos. Fundación Universitaria de Rio Cuarto. Argentina.
16. García, E. J. (2011). Recuperación y evaluación de la capacidad degradadora de consorcios bacterianos aislados de ambientes impactados con TNT y PETN. Master, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá,.
17. Gorontzy, T., Drzyzga, O., Kahl, W., Bruns-Nagel, D., Breitung, J., Von Loew, E., & Blotevogel, K. H. (1994). Microbial Degradation of Explosives and Related Compounds. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol 20, N°4, 265-284.

18. Hampton and Sisk, (1997b). Environmental stability of windrow composting of explosives-contaminated soils. In: Lewis, T., Newcombe, D., & Crawford, R. (2004). Bioremediation of soils contaminated with explosives. *Journal of Environmental Management* , 291–307.
19. Kumar, A. (2005). Treatment of Waste from Explosives Industries. In E. Butterworth-Heinemann (Ed.), *Biotreatment of Industrial Effluents*.
20. Madigan T M, M. J., Parker J., Brock.(2004). *Biología de los Microorganismos*.Madrid: Pearson-Prentice-Hall.
21. Marshall, S. J., & White, G. F. (2001). Complete denitration of nitroglycerin by bacteria isolated from a washwater soakaway. *Applied and environmental microbiology*, 67(6), 2622-2626.
22. Nápoles Álvarez Janet, Á. R. A. (2008). *Biorremediación de Ecosistemas contaminados con xenobióticos*. cuba: Universidad del Oriente.
23. Nicolaou, S. A., Gaida, S. M., & Papoutsakis, E. T. (2010). A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metab Eng*, 12(4), 307-331.
24. Nyanhongo, G. S., Aichernig, N., Ortner, M., Steiner, W., & Guebitz, G. M. (2009). Incorporation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transforming bacteria into explosive formulations. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of hazardous materials*, 165(1-3), 285-290.
25. Orjuela, P., Sandon, A., franco, M. & Martinez, M. (2003). Evaluación de cepas antagonicas de actinomicetos y de Trichoderma spp. aislados a partir de suelos de cultivo de arroz (*Oryza sativa*) para el control de *Rhizoctonia solani*. *Revistas Mundo Microbiológico. Asociación Colombiana de Microbiología.*, 2(2), 9-14.
26. Podlipna, R., Fialova, Z., y Vanek, T. (2010). Degradation of nitroesters by plant tissue cultures. *Journal of hazardous materials*, 184(1-3), 591-596.

27. Rodríguez J, I. A. (1999). *Los residuos peligrosos, caracterización, tratamiento y gestión*. España
28. Rosser, S., French, C. y Bruce, N. 2001. Engineering plants for the phytodetoxification of explosives. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 37: 330-333.
29. Sánchez Riaño, A. M.; Gutiérrez Morales, A. Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, C. A. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 5 | 61-91
30. Santos, A. D. (2007). *Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos*. Universidad autónoma de Barcelona, Barcelona.
31. Servent, D., Ducrocq, C., Henry, Y., Guissani, A., & Lenfant, M. (1991). Nitroglycerin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*: evidence for nitric oxide and nitrite formation. *Biochim Biophys Acta*, 1074(2), 320-325.
32. Silva, M. A. H. S. S. D. J. A. T. J. (2007). *Cultivos Bacterianos Autoctonos con capacidad de degradar altas concentraciones de Fenoles*. Paper presented at the Q FB Congreso Regional Nuevo León.
33. Spain Jim C. , H. J., Hans Knackmuss (2000). *Biodegradation of nitroaromatic Compounds and explosives* United States of America: Lewis Publishers.
34. Toze et al., (1997). Sorption and biodegradation of munitions in a fractured basalt aquifer. In: Lewis, T., Newcombe, D., & Crawford, R. (2004). Bioremediation of soils contaminated with explosives. *Journal of Environmental Management* , 291–307
35. Urbański, T. (1984). *Chemistry and Technology of Explosives*.

36. Vanek, T. N., Podlipna, zeman, Vagner. (2003). *Phytoremediation of Selected Explosives* (Water, air and soil pollution :focus ed. Vol. 3).
37. Villegas, S. M. (2009). Aislamiento de microorganismos degradadores de 2,4,6-trinitrotolueno (tnt) a partir de ambientes contaminados con explosivos.undergraduate, pontificia universidad javeriana, bogotá.
38. Wendt, T. M., Cornell, J. H., and Kaplan, A. M. (1978). Microbial Degradation of Glycerol Nitrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 36, 693-699.
39. White, G. F., & Snape, J. R. (1993). Microbial cleavage of nitrate esters: defusing the environment. *J Gen Microbiol*, 139(9), 1947-1957.
40. White, G. F., Snape, J. R., & Nicklin, S. (1996). Biodegradation of Glycerol Trinitrate and Pentaerythritol Tetranitrate by *Agrobacterium radiobacter*. *Applied and environmental microbiology*, 62(2), 637-642.
41. Ye Jing , S. A. a. W. P. O. (2004). Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 117–135.
42. Zhang, Y. Z., Sundaram, S. T., Sharma, A., & Brodman, B. W. (1997). Biodegradation of glyceryl trinitrate by *Penicillium corylophilum* Dierckx. *Applied and environmental microbiology*, 63(5), 1712-1714.
43. Zhuang, L. (2007). *Remediation of Pentaerythritol Tetranitrate (PETN) Contaminated Water and Soil*. Doctor of Philosophy in Earth Sciences, University of Waterloo, Ontario.

10. ANEXOS

ANEXO 1. Condiciones de corrida HPLC (del inglés, High Performance Liquid Chromatography)

Las condiciones cromatografías empleadas fueron:

- Columna (Pinnacle DB C18; Restek) (5 μ m, 250 x 4.6 mm), 1.2 ml/min,
- Metanol: agua (50:50),
- Detector de arreglo de diodos (longitud de onda: 210 nm).

Coefficientes de determinación obtenidos en las curvas de calibración

Estándar Primario	Referencia Comercial	Tiempo de Retención (min)	Coefficientes de Determinación (R_2)
2,4,6-TNT	M-8330-11	7.62 \pm 0.04	0,9978
am-DNT	M-8330-14	7.69 \pm 0.02	0,9971
DNT	M-8330-03	7.90 \pm 0.02	0,9991
PETN	M-8330-ADD-2-10X	13.79 \pm 0.07	0,9984

Durante el análisis cromatográfico, para cada lote de 20 muestras, se corrieron los siguientes controles:

1. Blanco reactivos (agua: acetonitrilo, 50:50), con el fin de verificar si existía algún tipo de contaminación.
2. Dos estándares primarios de la curva de calibración a diferentes concentraciones para verificar la validez de la curva.
3. Se repitió la lectura de la última muestra, con el fin de evaluar la precisión del equipo.

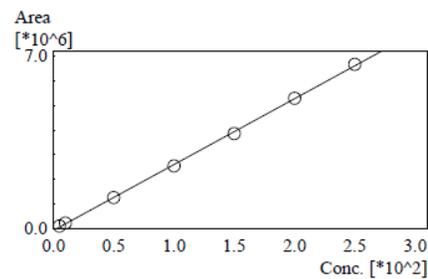
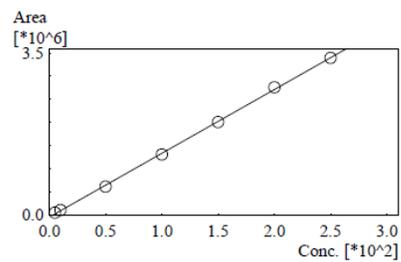
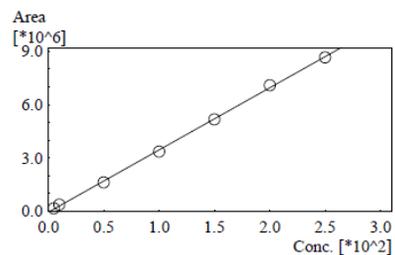
Teniendo en cuenta que en el país no hay un laboratorio de referencia comercial para el análisis de explosivos, no fue posible comparar los resultados obtenidos en este estudio. Por esta razón, se tuvieron en cuenta los valores de referencia estipulados por la EPA, para determinar la precisión y exactitud. Es así como, durante el estudio se obtuvo un porcentaje del coeficiente de variación $<7\%$ y porcentaje de recuperación entre el 70 -130% (EPA, 2006)

MODIFICACIONES AL METODO 8330B

Para determinar la concentración de explosivos se utilizó el método 8330B para muestras acuosas modificado (EPA, 2006). La modificación consistió en tomar 2 mL de muestra y no 5 mL como se encuentra reportado en el método y mezclarlos con 2 mL de acetonitrilo.

Posteriormente, se filtró la muestra con filtros de nylon (13 mm; 0,22 μm) para su análisis por HPLC. Esta modificación fue previamente puesta a punto en los laboratorios de USBA de la Pontificia Universidad Javeriana en el marco del proyecto “Diseño de un sistema con microorganismos degradadores de TNT y PENT incorporados en el explosivo comercial Pentolita. (García, B. Erika. 2011). Recuperación y evaluación de la capacidad degradadora de consorcios bacterianos aislados de ambientes impactados en TNT y PETN. Universidad Nacional de Colombia.

ANEXO 2. Curvas patrón PETN, TNT, 2,6DNT

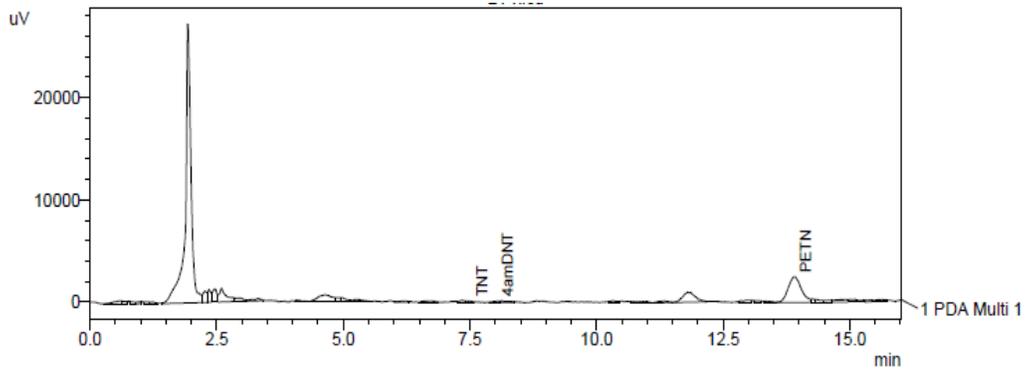
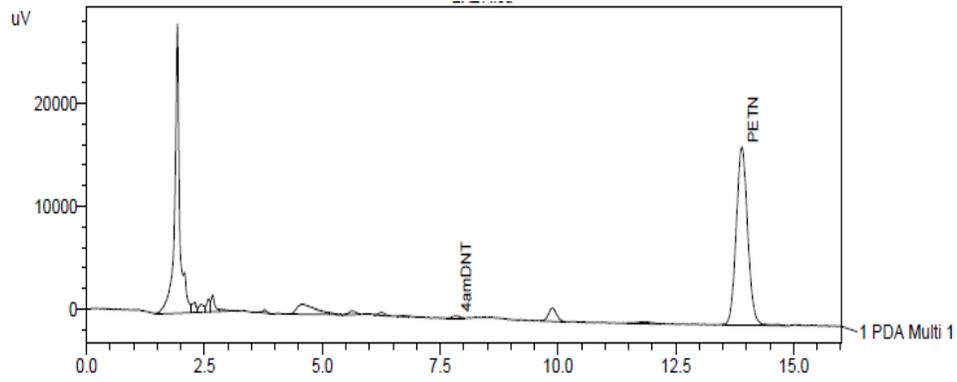
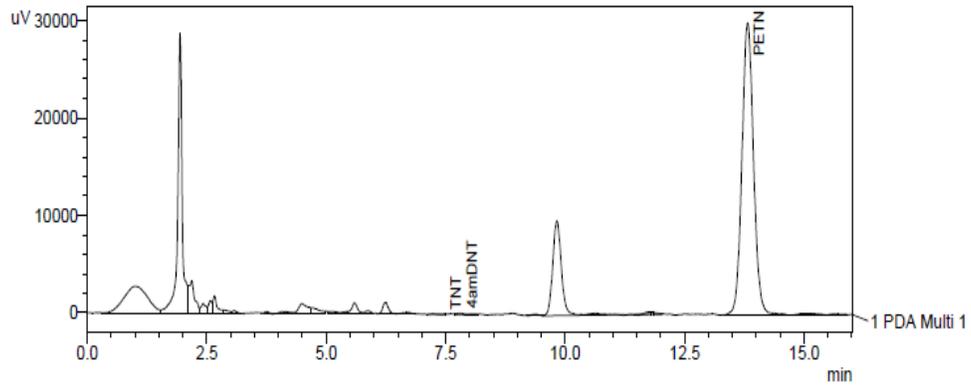


No	Concentración	Área
1	5.000	44548.4
2	10.000	99833.1
3	50.000	608941.2
4	100.000	1302899.8
5	150.000	2003321.7
6	200.000	2756275.7
7	250.000	3392934.2

No	Concentración	Área
1	5.0000	150302.2
2	10.0000	362364.6
3	50.0000	1611413.5
4	100.000	3347475.6
5	150.000	5165412.5
6	200.000	7081261.2
7	250.000	8652527.6

No	Concentración	Área
1	5.0000	106641.5
2	10.0000	223752.3
3	50.0000	1260120.7
4	100.000	2545467.2
5	150.000	3854505.4
6	200.000	5280681.9
7	250.000	6664346.0

ANEXO 3 Cromatogramas de PETN



ANEXO 4. Estadística de Crecimiento de las cepas P29 y P31a diferentes concentraciones de explosivo

CONTEO EN PLACA

Cepa P29 Resumen del procesamiento de los casos^a

Concentración explosivo PETN	Casos		
	Válidos		Perdidos
	N	Porcentaje	N
Conte 0	46	100,0%	0
o (UFC/ ml) 100	46	100,0%	0
300	46	100,0%	0
600	48	100,0%	0
1000	46	100,0%	0

Cepa P31 Resumen del procesamiento de los casos^a

Concentración explosivo PETN	Casos		
	Válidos		Perdidos
	N	Porcentaje	N
Conte 0	46	100,0%	0
o (UFC/ ml) 100	46	100,0%	0
300	44	100,0%	0
600	46	100,0%	0
1000	44	100,0%	0

P29 Comparaciones múltiples^b

Variable dependiente:Inconteo

	(I)Tiempo (horas)	(J)Tiempo (horas)	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.
t de Dunnet (bilateral) ^a	6	0	,5303	,23271
	12	0	,9454*	,23669
	15	0	1,1326*	,23271
	18	0	1,5718*	,23271
	25	0	2,1746*	,23669
	48	0	2,4281*	,23669
	72	0	2,3831*	,23271

P29 Comparaciones múltiples^b

Variable dependiente:Inconteo

	(I)Tiempo (horas)	(J)Tiempo (horas)	Sig.
t de Dunnet (bilateral) ^a	6	0	,118
	12	0	,001
	15	0	,000
	18	0	,000
	25	0	,000
	48	0	,000
	72	0	,000

P31 Comparaciones múltiples^b

Variable dependiente:Inconteo

	(I)Tiempo (horas)	(J)Tiempo (horas)	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.
t de Dunnet (bilateral) ^a	6	0	,5234 ⁺	,19258
	12	0	1,4072 ⁺	,19258
	15	0	1,6966 ⁺	,19587
	18	0	1,9742 ⁺	,19258
	24	0	2,5664 ⁺	,19587
	48	0	3,1921 ⁺	,19587
	72	0	2,7841 ⁺	,20387

P31 Comparaciones múltiples^b

Variable dependiente:Inconteo

	(I)Tiempo (horas)	(J)Tiempo (horas)	Sig.
t de Dunnet (bilateral) ^a	6	0	,040
	12	0	,000
	15	0	,000
	18	0	,000
	24	0	,000
	48	0	,000
	72	0	,000

ANOVA^a

Inconteo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6,418	7	,917	7,848	,000
Intra-grupos	4,439	38	,117		
Total	10,858	45			

a. Bacteria = P29, Concentración explosivo PETN = 0

Inconteo^c

Duncan^{a,b}

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
12	4	14,3546			
18	6	14,7306	14,7306		
15	6		14,8989		
0	6		15,0604	15,0604	
72	6			15,4258	15,4258
48	6			15,4295	15,4295
25	6			15,4522	15,4522
6	6				15,5446
Sig.		,072	,134	,085	,601

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Inconteo^c

Duncan^{a,b}

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
12	4	14,3546			
18	6	14,7306	14,7306		
15	6		14,8989		
0	6		15,0604	15,0604	
72	6			15,4258	15,4258
48	6			15,4295	15,4295
25	6			15,4522	15,4522
6	6				15,5446
Sig.		,072	,134	,085	,601

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,647.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Bacteria = P29, Concentración explosivo PETN = 0

ANOVA^a

Inconteo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	50,730	7	7,247	24,885	,000
Intra-grupos	11,066	38	,291		
Total	61,796	45			

a. Bacteria = P29, Concentración explosivo PETN = 100

Inconteo^c

Duncan^{a,b}

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
0	4	14,8817			
6	6		15,8881		
12	6		16,3196	16,3196	
15	6			16,6791	
18	6			16,9761	
25	6				17,9075
72	6				18,0142
48	6				18,3486
Sig.		1,000	,187	,060	,203

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Inconteo^c

Duncan^{a,b}

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
0	4	14,8817			
6	6		15,8881		
12	6		16,3196	16,3196	
15	6			16,6791	
18	6			16,9761	
25	6				17,9075
72	6				18,0142
48	6				18,3486
Sig.		1,000	,187	,060	,203

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,647.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Bacteria = P29, Concentración explosivo PETN = 100

ANOVA^a

Inconteo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	55,712	7	7,959	51,625	,000
Intra-grupos	5,858	38	,154		
Total	61,571	45			

a. Bacteria = P29, Concentración explosivo PETN = 300

Inconteo^c

Duncan^{a,b}

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	6	14,8728				
6	6		15,5332			
12	6			16,5472		
15	6			16,6264		
18	6				17,5458	
72	6				17,8236	17,8236
25	6				17,8811	17,8811
48	4					18,0850
Sig.		1,000	1,000	,736	,184	,299

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Inconteo^c

Duncan^{a,b}

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	6	14,8728				
6	6		15,5332			
12	6			16,5472		
15	6			16,6264		
18	6				17,5458	
72	6				17,8236	17,8236
25	6				17,8811	17,8811
48	4					18,0850
Sig.		1,000	1,000	,736	,184	,299

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,647.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Bacteria = P29, Concentración explosivo PETN = 300

ANOVA^a

Inconteo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	82,187	7	11,741	34,141	,000
Intra-grupos	13,756	40	,344		
Total	95,943	47			

a. Bacteria = P29, Concentración explosivo PETN = 600

Inconteo^b

Duncan^a

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
0	6	14,8145		
6	6	15,2183		
12	6		16,2493	
15	6		16,6562	
18	6			17,6579
72	6			18,0311
48	6			18,2970
25	6			18,3946
Sig.		,240	,236	,052

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

b. Bacteria = P29, Concentración explosivo PETN = 600

ANOVA^a

Inconteo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	30,595	7	4,371	2,329	,044
Intra-grupos	71,310	38	1,877		
Total	101,905	45			

a. Bacteria = P29, Concentración explosivo PETN = 1000

Inconteo^c

Duncan^{a,b}

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
0	6	14,4586	
25	4	14,4606	
6	6	14,5325	
12	6	14,8536	
15	6	14,8674	
18	6	15,0136	15,0136
48	6	16,3268	16,3268
72	6		16,6858
Sig.		,052	,059

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,647.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Bacteria = P29, Concentración explosivo PETN = 1000

ANOVA^a

Inconteo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	14,736	7	2,105	3,425	,006
Intra-grupos	23,356	38	,615		
Total	38,092	45			

a. Bacteria = P31, Concentración explosivo PETN = 0

Inconteo^c

Duncan^{a,b}

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
6	6	14,6964		
0	6	15,1139	15,1139	
18	6	15,4816	15,4816	15,4816
12	6		15,7401	15,7401
15	6		15,9480	15,9480
72	4		16,0898	16,0898
24	6		16,1400	16,1400
48	6			16,5365
Sig.		,120	,059	,052

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,647.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Bacteria = P31, Concentración explosivo PETN = 0

ANOVA^a

Inconteo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	43,233	7	6,176	19,780	,000
Intra-grupos	11,865	38	,312		
Total	55,098	45			

a. Bacteria = P31, Concentración explosivo PETN = 100

Inconteo^c

Duncan^{a,b}

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
0	6	14,9956			
6	6		16,0934		
72	6		16,1458		
15	6		16,6103		
12	6		16,6441		
18	6			17,3708	
24	4			17,4101	
48	6				18,3830
Sig.		1,000	,138	,907	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,647.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Bacteria = P31, Concentración explosivo PETN = 100

ANOVA^a

Inconteo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	48,931	7	6,990	96,116	,000
Intra-grupos	2,618	36	,073		
Total	51,549	43			

a. Bacteria = P31, Concentración explosivo PETN = 300

Inconteo^c

Duncan^{a,b}

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0	6	15,0000					
6	6		15,7169				
12	6			16,5830			
15	6			16,8165			
18	6				17,1696		
24	6					17,5251	
48	4						18,1999
72	4						18,4091
Sig.		1,000	1,000	,166	1,000	1,000	,213

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,333.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Bacteria = P31, Concentración explosivo PETN = 300

ANOVA^a

Inconteo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	103,045	7	14,721	60,597	,000
Intra-grupos	9,231	38	,243		
Total	112,276	45			

a. Bacteria = P31, Concentración explosivo PETN = 600

Inconteo^c

Duncan^{a,b}

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
0	6	14,7957			
6	6	15,0015			
12	6		16,3048		
15	4		16,8328		
18	6			17,4545	
24	6				18,2175
48	6				18,6819
72	6				18,8181
Sig.		,487	,080	1,000	,059

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,647.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Bacteria = P31, Concentración explosivo PETN = 600

ANOVA^a

Inconteo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	86,113	7	12,302	44,748	,000
Intra-grupos	9,897	36	,275		
Total	96,010	43			

a. Bacteria = P31, Concentración explosivo PETN = 1000

Inconteo^c

Duncan^{a,b}

Tiempo (horas)	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	4	13,9042				
6	6		15,2245			
12	6			15,8798		
15	6			16,4956		
18	6			16,5105		
24	6				17,6616	
48	6					18,3364
72	4					18,6989
Sig.		1,000	1,000	,070	1,000	,266

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 5,333.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Bacteria = P31, Concentración explosivo PETN = 1000

ABSORBANCIA

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,268	4	,067	,486	,746
Intra-grupos	1,377	10	,138		
Total	1,645	14			

a. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = ,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
,00	3	,0227
300,00	3	,0340
600,00	3	,1900
100,00	3	,2320
1000,00	3	,3817
Sig.		,300

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = ,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,110	4	,028	,795	,555
Intra-grupos	,347	10	,035		
Total	,457	14			

a. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 6,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
1000,00	3	,0270
,00	3	,0300
600,00	3	,0447
300,00	3	,0467
100,00	3	,2507
Sig.		,205

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 6,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,027	4	,007	6,342	,008
Intra-grupos	,011	10	,001		
Total	,038	14			

a. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 12,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
1000,00	3	,0193	
,00	3	,0270	
100,00	3	,0643	,0643
600,00	3		,1107
300,00	3		,1250
Sig.		,140	,056

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 12,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,080	4	,020	4,008	,034
Intra-grupos	,050	10	,005		
Total	,129	14			

a. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 15,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
,00	3	,0300	
1000,00	3	,1080	,1080
100,00	3	,1257	,1257
600,00	3		,2143
300,00	3		,2277
Sig.		,143	,081

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 15,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,354	4	,089	28,920	,000
Intra-grupos	,031	10	,003		
Total	,385	14			

a. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 18,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1000,00	3	,0297		
,00	3	,0320		
100,00	3		,2173	
300,00	3			,3640
600,00	3			,3837
Sig.		,960	1,000	,673

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 18,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,709	4	,177	29,710	,000
Intra-grupos	,060	10	,006		
Total	,768	14			

a. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 25,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1000,00	3	,0183		
,00	3	,0987		
100,00	3		,3483	
300,00	3			,5143
600,00	3			,5617
Sig.		,231	1,000	,470

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 25,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,060	4	,265	5,447	,014
Intra-grupos	,486	10	,049		
Total	1,546	14			

a. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 48,00

Absorbancia^c

Duncan^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
,00	3	,0630	
1000,00	3	,1790	
100,00	4		,5995
300,00	2		,6335
600,00	3		,7300
Sig.		,544	,515

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,857.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 48,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,126	4	,282	7,035	,006
Intra-grupos	,400	10	,040		
Total	1,527	14			

a. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 72,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
,00	3	,1117		
1000,00	3	,2903	,2903	
100,00	3		,5197	,5197
600,00	3			,7750
300,00	3			,8237
Sig.		,300	,191	,106

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P29, Tiempo = 72,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,001	4	,000	2,082	,158
Intra-grupos	,001	10	,000		
Total	,001	14			

a. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = ,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
100,00	3	,0103
1000,00	3	,0110
600,00	3	,0140
,00	3	,0210
300,00	3	,0273
Sig.		,053

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = ,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,003	4	,001	22,159	,000
Intra-grupos	,000	10	,000		
Total	,004	14			

a. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 3,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1000,00	3	,0006		
600,00	3	,0050		
,00	3		,0260	
300,00	3		,0263	
100,00	3			,0417
Sig.		,411	,949	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 3,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,004	4	,001	4,159	,031
Intra-grupos	,002	10	,000		
Total	,006	14			

a. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 6,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
1000,00	3	,0133	
600,00	3	,0193	
,00	3	,0427	,0427
300,00	3	,0433	,0433
100,00	3		,0573
Sig.		,052	,296

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 6,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,011	4	,003	8,957	,002
Intra-grupos	,003	10	,000		
Total	,014	14			

a. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 9,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1000,00	3	,0147		
600,00	3	,0413	,0413	
,00	3		,0530	
300,00	3		,0747	,0747
100,00	3			,0940
Sig.		,094	,051	,210

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 9,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,043	4	,011	48,038	,000
Intra-grupos	,002	10	,000		
Total	,045	14			

a. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 12,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1000,00	3	,0337		
600,00	3		,0740	
,00	3		,0757	
300,00	3			,1570
100,00	3			,1733
Sig.		1,000	,894	,210

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 12,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,116	4	,029	37,319	,000
Intra-grupos	,008	10	,001		
Total	,124	14			

a. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 15,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1000,00	3	,0470		
,00	3		,1000	
600,00	3		,1407	
100,00	3			,2490
300,00	3			,2790
Sig.		1,000	,105	,217

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 15,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,278	4	,070	16,691	,000
Intra-grupos	,042	10	,004		
Total	,320	14			

a. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 18,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
,00	3	,1157	
1000,00	3	,1320	
600,00	3		,3427
100,00	3		,3623
300,00	3		,4623
Sig.		,763	,055

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 18,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,360	4	,090	23,470	,000
Intra-grupos	,038	10	,004		
Total	,398	14			

a. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 24,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
,00	3	,1413		
1000,00	3		,3490	
100,00	3			,4890
600,00	3			,5120
300,00	3			,5760
Sig.		1,000	1,000	,131

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 24,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,749	4	,437	64,437	,000
Intra-grupos	,068	10	,007		
Total	1,817	14			

a. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 48,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
,00	3	,2257			
100,00	3		,6063		
1000,00	3			,9233	
600,00	3			1,0190	
300,00	3				1,1907
Sig.		1,000	1,000	,185	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

b. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 48,00

ANOVA^a

Absorbancia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2,551	4	,638	55,757	,000
Intra-grupos	,114	10	,011		
Total	2,665	14			

a. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 72,00

Absorbancia^b

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
,00	3	,2523			
100,00	3		,5767		
1000,00	3			1,0873	
600,00	3			1,2723	1,2723
300,00	3				1,2907
Sig.		1,000	1,000	,060	,838

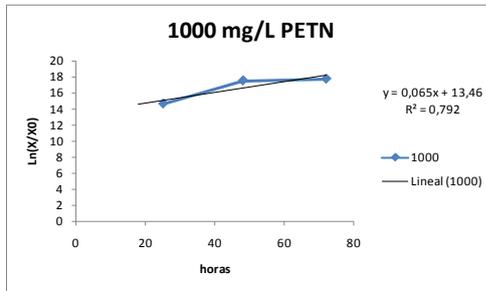
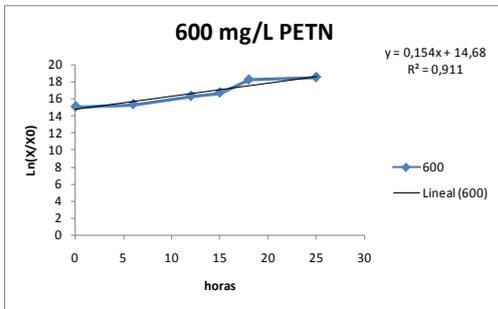
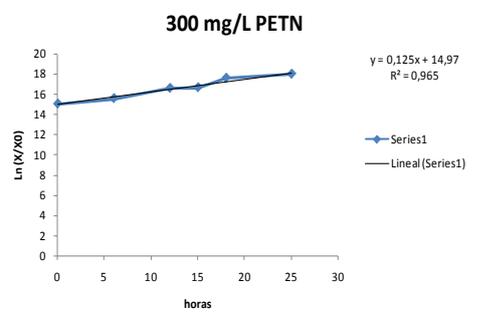
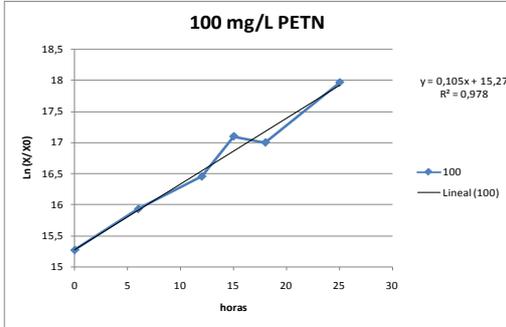
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

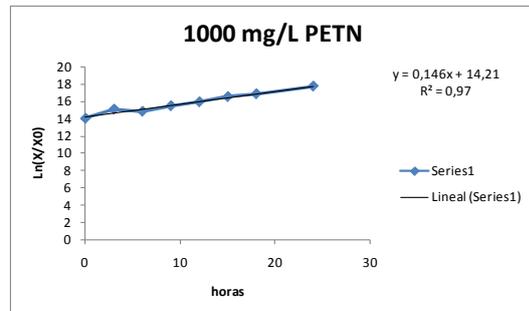
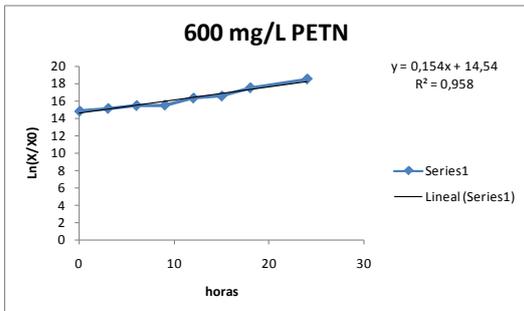
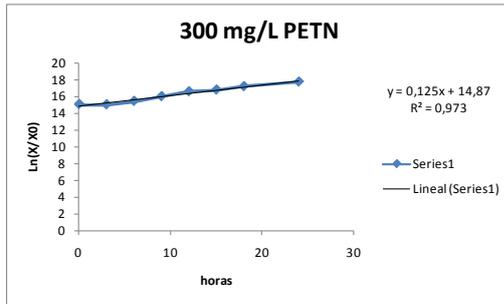
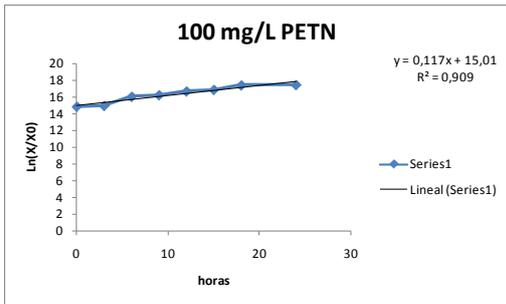
b. Bacteria = Bacteria P31, Tiempo = 72,00

ANEXO 5. Regresión lineal para parámetros cinéticos cepas P29 y P31 a las diferentes concentraciones de explosivo

Cepa P29



Cepa P31



ANEXO 6. Análisis estadístico en la degradación de las cepas P29 y P31 a diferentes ph

Estadísticos de grupo

ph	bacteria	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
6,00	degradación 1,00	30	37,3687	30,07917	5,49168
	2,00	29	40,2445	26,85120	4,98614
7,00	degradación 1,00	29	37,6428	26,84301	4,98462
	2,00	28	43,5396	29,95792	5,66151
8,00	degradación 1,00	29	33,7783	27,30522	5,07045
	2,00	28	40,8725	30,65865	5,79394

Prueba de muestras independientes

			Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	
			F	Sig.
ph				
6,00	degradación	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	,274	,603
7,00	degradación	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	,774	,383
8,00	degradación	Se han asumido varianzas iguales No se han asumido varianzas iguales	,039	,845

Prueba de muestras independientes

			Prueba T para la igualdad de medias	
			Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
ph				
6,00	degradacion	Se han asumido varianzas iguales	-2,87585	7,43203
		No se han asumido varianzas iguales	-2,87585	7,41756
7,00	degradacion	Se han asumido varianzas iguales	-5,89687	7,52844
		No se han asumido varianzas iguales	-5,89687	7,54316
8,00	degradacion	Se han asumido varianzas iguales	-7,09419	7,68346
		No se han asumido varianzas iguales	-7,09419	7,69930

ANEXO 7. Análisis estadístico en la degradación de las cepas P29 y P31 a diferentes temperaturas

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: degradación

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	53887,226 ^a	8	6735,903	41,656	,000
Intersección	1203272,892	1	1203272,892	7441,308	,000
Bacteria	223,715	1	223,715	1,384	,241
Temperatura	6645,223	3	2215,074	13,699	,000
tiempo	46750,010	4	11687,503	72,278	,000
Error	37029,714	229	161,702		
Total	1297766,930	238			
Total corregida	90916,940	237			

a. R cuadrado = ,593 (R cuadrado corregida = ,578)

degradación

Duncan^{a,b,c}

Temperatura	N	Subconjunto	
		1	2
30,00	60	66,5620	
25,00	60	68,6917	
20,00	59	69,3242	
35,00	59		80,3817
Sig.		,268	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 161,702.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 59,496

b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c. Alfa = 0,05.

Estadísticos de grupo

Bacteria	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
degradación 1,00	120	70,1499	20,19165	1,84324
2,00	118	72,2871	18,97560	1,74685

Prueba de muestras independientes

		Prueba T para la igualdad de medias		
		Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
			Inferior	Superior
degradación	Se han asumido varianzas iguales	2,54082	-7,14278	2,86838
	No se han asumido varianzas iguales	2,53949	-7,14021	2,86581

Estadísticos de grupo

Temperatura	Bacteria	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	
20,00	degradación	1,00	30	68,4583	20,27418	3,70154
		2,00	29	70,2200	15,65359	2,90680
25,00	degradación	1,00	30	65,8663	17,03817	3,11073
		2,00	30	71,5170	19,14695	3,49574
30,00	degradación	1,00	30	63,3067	15,63884	2,85525
		2,00	30	69,8173	20,81685	3,80062
35,00	degradacion	1,00	30	82,9683	22,06144	4,02785
		2,00	29	77,7059	19,72391	3,66264

Prueba de muestras independientes

			Prueba T para la igualdad de medias	
			Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia
20,00	degradación	Se han asumido varianzas iguales	-1,76167	4,72706
		No se han asumido varianzas iguales	-1,76167	4,70647
25,00	degradación	Se han asumido varianzas iguales	-5,65067	4,67941
		No se han asumido varianzas iguales	-5,65067	4,67941
30,00	degradación	Se han asumido varianzas iguales	-6,51067	4,75365
		No se han asumido varianzas iguales	-6,51067	4,75365
35,00	degradación	Se han asumido varianzas iguales	5,26247	5,45461
		No se han asumido varianzas iguales	5,26247	5,44412

ANEXO 8. Prueba de estadística de comparación de las cepas individuales (P29 y P31) y la combinación

ANOVA de un factor

Descriptivos

PETN									
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	Varianza entre componentes
					Límite inferior	Límite superior			
0	15	29,135	31,3277	8,0888	11,787	46,484	3,6	103,1	
29	15	55,755	7,6684	1,9800	51,508	60,001	42,3	70,7	
30	15	69,818	20,3507	5,2545	58,548	81,087	42,7	106,4	
Total	45	51,569	27,4558	4,0929	43,321	59,818	3,6	106,4	
Modelo			22,0180	3,2823	44,945	58,193			
Efectos fijos									
Efectos aleatorios				11,9289	,243	102,895			394,5767

ANOVA

PETN					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	12806,888	2	6403,444	13,209	,000
Intra-grupos	20361,319	42	484,793		
Total	33168,207	44			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: PETN

	(I) CEPA	(J) CEPA	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	0	29	-26,6194 [*]	8,0398	,005	-46,152	-7,087
		30	-40,6820 [*]	8,0398	,000	-60,215	-21,149
	29	0	26,6194 [*]	8,0398	,005	7,087	46,152
		30	-14,0627	8,0398	,199	-33,595	5,470
	30	0	40,6820 [*]	8,0398	,000	21,149	60,215
		29	14,0627	8,0398	,199	-5,470	33,595

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

		PETN	
CEPA	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
HSD de Tukey ^a	0	15	29,135
	29	15	55,755
	31	15	69,818
	Sig.		1,000
Duncan ^a	0	15	29,135
	29	15	55,755
	31	15	69,818
	Sig.		1,000
			,199
			,088

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 15,000.