



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE DEGRADACIÓN ANAEROBICA DE 2,4,6-TRINITROTOLUENO (TNT) Y TETRANITRATO DE PENTAERITRITOL (PETN) EN SUELOS IMPACTADOS CON EXPLOSIVOS

Luisa Alejandra García Galindo

Universidad Nacional de Colombia
Posgrado Interfacultades de Microbiología
Bogotá, Colombia

2014

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE DEGRADACIÓN ANAEROBICA DE 2,4,6-TRINITROTOLUENO (TNT) Y TETRANITRATO DE PENTAERITRITOL (PETN) EN SUELOS IMPACTADOS CON EXPLOSIVOS

Luisa Alejandra García Galindo

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

Magister en Ciencias Microbiología

Director:

Ziv Arbeli, PhD.

Codirectora:

María Consuelo Díaz Báez, PhD.

Línea de Investigación:

Microbiología Ambiental

Universidad Nacional de Colombia
Posgrado Interfacultades de Microbiología
Bogotá, Colombia

2014

A Dios porque puso en mi corazón este sueño y me dio las alas, la fuerza, la paciencia y la determinación para vivirlo.

A mi mamá, mi hermana Juanita y a Nati por darme tanto amor, ser mi apoyo incondicional y mis compañeras de aventuras.

A Camilo, porque marcó esta etapa de mi vida

.... Se vienen nuevos retos...No importa lo que diga el mundo... Seguiré soñando muy alto.

Agradecimientos

A Ziv Arbeli y Fabio Roldán por permitirme hacer parte del grupo de investigación de Biorremediación y Biodegradación de ambientes contaminados, por acompañarme durante este proceso y por sus aportes a este trabajo que me ayudaron a crecer como persona y profesionalmente. Así como a María consuelo Díaz Báez por brindarme sus enseñanzas, corregir con paciencia mis errores y recordarme que en investigación todas las experiencias son valiosas.

Al posgrado Interfacultades de Microbiología y a la Universidad Nacional de Colombia, especialmente a la profesora Martha Fontanilla, por sus gran amor, consejos y enseñanzas. A Socorro Prieto por su paciencia, su ternura y por siempre estar dispuesta a ayudarme. Al profesor Jairo Leonardo Cuervo, por compartir conmigo la pasión por la microbiología, la agronomía y darme tanto apoyo en tan poco tiempo.

A mis amigos de la maestría Diana Garzón, Karol Rodríguez, Daniel Prada, Sergio Latorre, Julián Prato, Jorge Valencia, Ricardo Zapata y Julio Ríos, así como mis compañeritos Agrónomos Juan Pablo Calderón y Felipe Montejó por todos los momentos que compartimos, las discusiones científicas, las enseñanzas, las anécdotas y los consejos que hicieron de esta etapa algo inolvidable.

A todos mis compañeros de USBA, especialmente a Diana Tamayo por ayudarme siempre, no dejarme desfallecer y ser una de mis amigas más especiales. A Johan Sáenz y Carolina Rubiano, por su colaboración y su apoyo y porque aunque nunca se los he dicho los admiro y quiero mucho.

A mis compañeros de BERING INTERNATIONAL, Carolina Vargas, Esteban Vargas, Julián Granados, Nina Monroy y Paola Arias por su infinita comprensión, por los consejos, el apoyo y el tiempo brindado para llevar a cabo la tesis.

A Carlos Bejarano y Clemencia Martínez por enseñarme a ver el mundo de una manera diferente, por creer en mí, en mis sueños y apoyarme en mis proyectos en microbiología.

A mi mamá, mi hermanita, mi papá, a Camilo y mis amigos de la vida Natalia Rincón, Aura Hernández, Diana Sánchez, Viviana García, Jaime Cháves, Miguel Salas, Mario Aguirre, Diego Flores, Daissy Díaz, Carlos Villegas y Javier Soacha por hacerme reír y darme ánimo en momentos difíciles, aún en la distancia.

A INDUMIL y COLCIENCIAS, por haber apoyado económicamente este proyecto

Resumen

Este estudio evaluó el potencial de degradación anaeróbica de TNT y PETN por cultivos de enriquecimiento y cepas obtenidos a partir de tres suelos impactados con estos explosivos. Para la obtención de los cultivos de enriquecimiento se realizaron pases periódicos en medio mineral suplementado con una mezcla de TNT y PETN (50 mg/L c/u) con y sin fuentes de carbono bajo condiciones de anaerobiosis. Se evaluó la degradación monitoreando las concentraciones de los dos explosivos durante cinco pases sucesivos. Los resultados obtenidos mostraron que, la técnica de enriquecimiento selectivo permitió obtener cultivos que degradaban TNT y/o PETN en el tiempo, y a partir de ellos se obtuvieron cepas y consorcios degradadores. Se observó que en anaerobiosis, la presencia de carbono es necesaria para la degradación de TNT mientras que el PETN continúa degradándose incluso en los tratamientos sin fuentes de carbono. Este es el primer estudio que reporta la degradación de PETN sin la adición de una fuente externa de carbono y el aislamiento de cepas anaerobias degradadoras de este explosivo lo que abre nuevas posibilidades a estudios en esta área.

Palabras clave: Biodegradación, TNT, PETN, anaerobiosis, cultivos de enriquecimiento

Abstract

The current investigation assesses the potential of anaerobic degradation of TNT and PETN by enrichment cultures and bacterial strains obtained from three soils impacted by these explosives. In order to establish the degrading enrichment cultures there were performed periodical passages on mineral medium supplemented with a mix of TNT and PETN (50 mg/L each one) with or without carbon sources in anaerobiosis. Both explosives concentrations were monitored during five successive passages to assess their degradation; strains were isolated from these cultures and evaluated as potential degraders. Results showed that, the selective enrichment technic was useful to establish degrading cultures of TNT and/or PETN and to obtain degrading consortia and strains. It was observed that in anaerobiosis the presence of Carbon is needed for TNT degradation, although PETN is degraded in treatments without carbon sources. This is the first study that reports PETN degradation without adding and external source of Carbon, which opens new possibilities for research in this area.

Key Words: Biodegradation, TNT, PETN, anaerobic, enrichment cultures.

Contenido

	<u>Pág.</u>
Resumen	VII
Abstract	VIII
Lista de figuras	XII
Lista de tablas	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas	15
Introducción	16
1. Marco Teórico	20
1.1 Explosivos	20
1.1.1 Características del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)	21
1.1.2 Características del tetranitrato de pentaeritritol (PETN).....	22
1.2 Impacto ambiental de TNT y PETN.....	24
1.3 Métodos empleados para el tratamiento de ambientes contaminados con explosivos	27
1.3.1 Atenuación Natural.....	28
1.3.2 Tratamientos fisicoquímicos	28
1.3.3 Tratamientos biológicos para la remediación de explosivos	30
1.4 Biotransformación y biodegradación bacteriana de TNT	35
1.4.1 Biodegradación bacteriana aeróbica del TNT.....	39
1.4.2 Biodegradación bacteriana anaeróbica del TNT.....	43
1.5 Biodegradación y biotransformación bacteriana de PETN	46
1.5.1 Biodegradación bacteriana aeróbica del PETN	46
1.5.2 Biodegradación bacteriana anaeróbica del PETN	47
2. Problema y Justificación	49
3. Objetivos	51
3.1 Objetivo General.....	51
3.2 Objetivos Específicos.....	51
4. Materiales y métodos	52
4.1 Materiales	52

4.2	Métodos.....	54
4.3	Metodología para la evaluación de la degradación de TNT y PETN	58
4.4	Comparación de la degradación de TNT y PETN en condiciones de Anaerobiosis y Aerobiosis.....	60
4.5	Obtención de cultivos de enriquecimiento anaerobios con capacidad degradadora de TNT y PETN.....	61
4.6	Evaluación de la degradación de TNT y PETN por bacterias anaerobias	63
4.6.1	Siembra de bacterias anaerobias degradadoras	63
4.6.2	Obtención de biomasa para las pruebas de degradación.....	64
4.6.3	Evaluación de la capacidad degradadora de las bacterias obtenidas..	64
4.7	Afiliación filogenética de las cepas.....	65
4.7.1	Extracción y purificación de ADN	65
4.7.2	Amplificación del gen 16s rRNA	66
4.7.3	Secuenciación de los productos de PCR y análisis bioinformáticos ...	66
4.8	Análisis de datos.....	67
5.	Resultados.....	69
5.1	Metodología de extracción de explosivos en muestras con la mezcla de suelo y medio de cultivo T2	69
5.2	Selección de la metodología de muestreo durante el proceso de biodegradación.....	70
5.3	Comparación de la degradación de TNT y PETN en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis.....	71
5.4	Establecimiento de cultivos de enriquecimiento anaerobios con capacidad degradadora de TNT y PETN.....	74
5.5	Evaluación de la degradación de TNT y PETN por bacterias anaerobias	84
5.5.1	Obtención de las bacterias anaerobias potencialmente degradadoras	84
5.5.2	Evaluación de la capacidad degradadora de las cepas obtenidas a partir de muestras antes del primer pase	86
5.5.3	Evaluación de la capacidad degradadora de las cepas y consorcios obtenidos a partir de los cultivos enriquecimiento con 5 pases.....	91
5.6	Identificación de las cepas	96
6.	Discusión de resultados.....	98
6.1	Metodologías empleadas para la evaluación de la degradación de TNT y PETN	98
6.2	Degradación de TNT y PETN en condiciones aerobias y anaerobias	100
6.3	Efecto de los tratamientos con fuente de carbono y sin fuente de carbono sobre la degradación de TNT y PETN.....	102
6.4	Selección e identificación de cepas y consorcios anaerobios degradadores de TNT y/o PENT.....	105
7.	Conclusiones y recomendaciones.....	110
7.1	Conclusiones	110
7.2	Recomendaciones	112
A.	Anexo: Preparación del medio T2.....	113
B.	Anexo: Curvas de calibración	115

	116
C. Anexo: Ensayo preliminar de comparación de la degradación de TNT y PETN en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis.....	117
D. Características macroscópicas de los microorganismos degradadores obtenidos.....	119
E. Análisis estadísticos.....	121
8. Bibliografía.....	150

Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Ilustración 1-1. Estructura química del 2,4,6-Trinitrotolueno	21
Ilustración 1-2. Estructura química del Tetranitrato de pentaeritritol (2,2-bis[(nitrooximetil]-1,3-propanodiol dinitrato).....	23
Ilustración 1-3. Vías de reducción del TNT por bacterias.....	39
Ilustración 1-4. Esquema de las vías metabólicas para la biotransformación de TNT por microorganismos aeróbicos.....	42
Ilustración 1-5. Esquema de las vías metabólicas para la biotransformación de TNT por bacterias en condiciones de anaerobiosis.	45
Ilustración 1-6. Catálisis del PETN por la enzima PETN reductasa de <i>Enterobacter cloacae</i> PB2	47
Ilustración 4-1. Protocolo empleado para la extracción de TNT y PETN a partir de muestras sólidas (USEPA, 2006)	55
Ilustración 4-2. Protocolo empleado para la extracción de TNT y PETN a partir de muestras líquidas (USEPA, 2006)	56
Ilustración 4-3. Nuevo protocolo propuesto para la extracción de TNT y PETN a partir de muestras con fase líquida y sólida.....	57
Ilustración 4-4. Descripción del montaje y Unidades experimentales empeladas durante el estudio.	59
Ilustración 4-5. Diseño experimental empleado para el monitoreo de los cultivos de enriquecimiento anaerobios degradadores de TNT y PETN.....	62
Ilustración 5-1. Degradación de TNT y PETN en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis en los tres suelos evaluados	72
Ilustración 5-2. Monitoreo de la degradación de TNT y PETN en presencia de carbono durante el establecimiento del cultivo de enriquecimiento a partir del suelo campo de prueba (CP).....	77
Ilustración 5-3. Monitoreo de la degradación de TNT y PETN en presencia de carbono durante el establecimiento del cultivo de enriquecimiento a partir del suelo Fitorremediación (F)	78
Ilustración 5-4. Monitoreo de la degradación de TNT y PETN en presencia de carbono durante el establecimiento del cultivo de enriquecimiento a partir del suelo planta de cristalización (PC)	79

Ilustración 5-5. Monitoreo de la degradación de TNT y PETN en ausencia de carbono durante el establecimiento del cultivo de enriquecimiento a partir del suelo Campo de prueba (CP).....	80
Ilustración 5-6. Monitoreo de la degradación de TNT y PETN en ausencia de carbono durante el establecimiento del cultivo de enriquecimiento a partir del suelo Fitorremediación (F)	81
Ilustración 5-7. Monitoreo de la degradación de TNT y PETN en ausencia de carbono durante el establecimiento del cultivo de enriquecimiento a partir del suelo planta de cristalización (PC)	82
Ilustración 5-8. Degradación de TNT y PETN en los cultivos de enriquecimiento CFC y SFC partiendo de 100 mg/L.....	83
Ilustración 5-9. Pruebas de degradación realizadas a las cepas aisladas sin realizar enriquecimiento selectivo	87
Continuación Ilustración 5-9. Pruebas de degradación realizadas a las cepas aisladas sin realizar enriquecimiento selectivo.....	88
Continuación Ilustración 5-9. Pruebas de degradación realizadas a las cepas aisladas sin realizar enriquecimiento selectivo.....	89
Continuación Ilustración 5-9. Pruebas de degradación realizadas a las cepas aisladas sin realizar enriquecimiento selectivo.....	90
Continuación Ilustración 5-9. Pruebas de degradación realizadas a las cepas aisladas sin realizar enriquecimiento selectivo.....	91
Ilustración 5-10. Pruebas de degradación realizadas a los aislamientos a partir de los cultivos de enriquecimiento CFC	93
Ilustración 5-11. Pruebas de degradación realizadas a los aislamientos a partir de los cultivos de enriquecimiento SFC	94
Ilustración 5-12. Dendograma de relación filogenética de cepas aisladas empleando el 16s rRNA.....	97

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 1-1. Propiedades fisicoquímicas del TNT.....	22
Tabla 1-2. Propiedades fisicoquímicas del PETN.....	24
Tabla 1-3. Toxicidad de TNT y sus metabolitos de degradación.....	26
Tabla 1-4. Principales tratamientos fisicoquímicos empleados para la remediación de explosivos	29
Tabla 1-5. Principales tratamientos biológicos empleados para la remediación de TNT y PETN	33
Tabla 4-1. Caracterización de las muestras de suelo provenientes de la planta de INDUMIL (Abril, 2011).	53
Tabla 5-1. Resultados obtenidos al realizar la extracción de explosivos sobre muestras lodosas completas y separando las fracciones. La concentración de TNT y PETN fue de 50 mg/L. (n = 6).....	70
Tabla 5-2. Resultados obtenidos al probar dos metodologías de muestreo con concentraciones iniciales de 50 mg/L de TNT y 50 mg/L PETN	70
Tabla 5-3. Porcentajes de degradación de TNT y PETN en condiciones anaerobias y anaerobias	73
Tabla 5-6. Número de cepas recuperadas en Agar nutritivo a partir de cada cultivo de enriquecimiento tras cinco pases	85
Tabla 5-7. Concentraciones en mmol/L de TNT, PETN y los metabolitos de su degradación	96

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
2-ADNT	2-amino-dinitrotolueno
4-ADN	4-amino-dinitrotolueno
2,4DANT	2,4- diamino-nitrotolueno
2,6-DANT	2,6- diamino-nitrotolueno
ADNTs	2 y 4-amino-dinitrotoluenos (Aminodinitrotolueno)
AZTs	Azoxitetranitrotoluenos
CFC	Con fuentes de carbono
CM	Cultivo madre
CP	Suelo de campo de prueba
DNTs	2,4- y 2,6-dinitrotolueno (Dinitrotoluenos)
EPA	<i>Environmental protection agency</i> (Agencia de protección ambiental de los Estados unidos)
F	Suelo de fitorremediación
GNT	Glicerol trinitrato
HADNTs	Hidroxiaminodinitrotoluenos
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
MNT	2 y 4-mononitrotolueno (Mononitrotoluenos)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO ₂ ⁻	Grupo nitro
PC	Suelo de planta de cristalización
PETN	Tetranitrato de pentaeritritol (2,2-bis[(nitrooximetil]-1,3-propanodiol dinitrato)
RDX	Hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina
SFC	Sin fuentes de carbono
TAT	Triaminotolueno
TNT	2,4,6-trinitrotolueno
UEs	Unidades Experimentales
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

Introducción

El uso de explosivos implica riesgo de vida o muerte, y así mismo genera una problemática ambiental. Estos compuestos, sus subproductos y residuos, que en su gran mayoría se consideran tóxicos y persistentes debido a la presencia de múltiples grupos nitro, llegan al ambiente durante su producción y por su uso a gran escala. **(Stenuit & Agathos, 2010; Lima *et al.*, 2011; Juhasz & Naidu, 2007; Lewis *et al.*, 2004; Spain *et al.*, 2000)**. Debido a que Colombia, no es ajena a la problemática por el uso civil y militar de estos compuestos, se ha considerado necesario realizar estudios que busquen entender su comportamiento ambiental y busquen soluciones para la remediación de ambientes impactados con explosivos.

El TNT es uno de los nitroaromáticos más utilizado como explosivo comercial y militar **(Lima *et al.*, 2011; Yinon, 1999; Yinon & Zitrin, 1993)**. Al ser empleado de forma frecuente y al haberse comprobado su toxicidad, este se ha convertido en un contaminante de gran prioridad motivando numerosas investigaciones dirigidas hacia la búsqueda de tratamientos que permitan recuperar las zonas afectadas con este compuesto. En tanto, el éster de nitrato PETN, no tienen un uso tan amplio y por lo mismo, los estudios realizados con este compuesto son mucho menos frecuentes con respecto a los realizados con TNT.

En Colombia, una de las formulaciones explosivas más empleadas es la Pentolita, la cual es una mezcla de los explosivos 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) y tetranitrato de pentaeritritol (PETN) (50:50), razón por la cual es importante estudiar la degradación de estos dos compuestos en conjunto. La biodegradación de la mezcla TNT y PETN de la pentolita ha

sido poco estudiada, y los únicos estudios reportados encontrados fueron el de **Georgie (2011)**, quien aisló y caracterizó bacterias aerobias degradadoras de TNT y/o PETN e identificó genes responsables de la degradación y los realizados por la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Universidad Javeriana (**Roldán et al., 2013; García, 2011, Ávila, 2011**).

En estos estudios se encontró que en aerobiosis la presencia de TNT inhibió la degradación de PETN por cultivos de enriquecimiento (**García, 2011**) y que dos cepas podían degradar PETN únicamente cuando no había TNT en el medio (**Roldán et al., 2013**), similar a lo encontrado por **Moshe et al., (2009)**, en el cual la presencia de TNT inhibió la degradación de los explosivos RDX y HMX. Es interesante continuar los estudios para determinar si bajo condiciones anaeróbicas también se presenta este fenómeno o si por el contrario se potencia la degradación, pues se han encontrado enzimas como la PETN reductasa pueden utilizar como sustrato tanto PETN como TNT (**Blinks et al., 1996**).

La biodegradación de TNT y PETN depende de las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, especialmente de la presencia de los grupos nitro los cuales son muy electronegativos ocasionando que se favorezcan las vías reductivas para estos compuestos sobre las oxidativas. Para el caso de PETN, la vía reportada consiste en reducciones consecutivas de los grupos nitro de este compuesto, liberando dos grupos nitro en condiciones aeróbicas (**Blinks et al., 1996**) y tres e incluso cuatro grupos nitro en condiciones anaerobias (**Zhuang, 2007**). Para TNT, se han reportado diversas rutas metabólicas dependiendo de factores como la preparación del cultivo (extractos celulares, células en latencia, células en crecimiento), de si se utilizan cepas puras o cultivos mixtos y de las condiciones ambientales, ya que estos factores pueden determinar cuáles enzimas se expresaran y por tanto cuales rutas metabólicas y mecanismos se utilizaran para la biotransformación y/o biodegradación de estos explosivos, sin embargo todos coinciden en que el primer paso es la reducción de al menos un grupo nitro (**Hong-yan et al., 2013; González-Pérez et al., 2007; Neal & Clint, 2007; Ye et al., 2004; Pennington & Brannon, 2002; Huang et al., 2000; Esteve-**

Núñez & Ramos, 1998; Hawari *et al.*, 2000; Boopathy *et al.*, 1998a; Tim *et al.*, 1998; Razo-Flores *et al.*, 1997; krumholz *et al.*, 1997; Preuss *et al.*, 1993).

Una de las condiciones ambientales más relevantes para los procesos biológicos de degradación de explosivos es la presencia o ausencia de oxígeno, pues este factor determinará que rutas metabólicas de degradación se seguirán lo cual, es clave para diseñar estrategias eficientes de biorremediación (**Hong-yan *et al.*, 2013; Smets *et al.*, 2007; Esteve-Núñez *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 1996**). En presencia de oxígeno, los productos parcialmente reducidos provenientes de la degradación de los explosivos como TNT, son propensos a reaccionar unos con otros y/o con otros compuestos orgánicos generando compuestos más complejos (polímeros), más tóxicos, menos solubles y menos biodisponibles que los compuestos iniciales. Bajo condiciones anaeróbicas se lleva a cabo una rápida reducción, lo que minimiza la polimerización oxidativa y se logran mayores tasas de degradación de los explosivos (**Stenui & Agathos, 2010; Esteve-Núñez *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 1997; Haïdour & Ramos, 1996**). Además, debido al carácter oxidado de los grupos nitro del TNT y del PETN, bajo condiciones anaerobias estos compuestos pueden ser degradados, porque son usados como aceptores de electrones para proveer energía para el crecimiento. (**Zhuang, 2007; Esteve-Núñez *et al.*, 2001**).

Otra variable importante, es el uso de cepas puras o de cultivos mixtos. Hasta el momento, no se ha reportado una cepa silvestre, capaz de emplear ya sea TNT o PETN como única fuente de carbono, sin embargo en estos estudios se señalan que la degradación se ve favorecida cuando se utilizan varias cepas o consorcios microbianos, dado que las diferencias fisiológicas de cada grupo microbiano que constituye un consorcio pueden potenciar la degradación (**Stenuit & Agathos, 2010; Wittich *et al.*, 2009; Zhuang, 2007; Caballero & Ramos, 2006; Lewis *et al.*, 1997; Blinks *et al.*, 1996; White *et al.*, 1996; Duque *et al.*, 1993**), como ya ha sido demostrado para TNT por **Robertson & Jjemba (2005)**.

La presente investigación se enfocó en evaluar la degradación anaeróbica de TNT y PETN por bacterias obtenidas de cultivos de enriquecimiento con y sin la adición de fuentes de carbono adicionales. Lo anterior, teniendo en cuenta las ventajas antes

mencionadas de la degradación en condiciones anaerobias y de la presión selectiva a través de pases en el tiempo en presencia de los dos explosivos.

1. Marco Teórico.

1.1 Explosivos

Un explosivo se define como una sustancia o mezcla de sustancias, líquidas o sólidas, que por choques químicos o físicos (fricción, impacto, chispa o llama, por ejemplo), se descomponen rápidamente liberando grandes cantidades de energía en forma de calor y presión, en la mayoría de las ocasiones como gases, a tasas capaces de causar daño en los alrededores (**Agrawan & Hodgson, 2007; Juhasz & Naidu, 2007; EPA, 2001**).

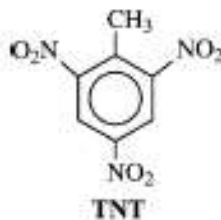
Los explosivos son un amplio grupo de compuestos conocidos como materiales energéticos, los cuales en su mayoría están conformados por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. (**Sunahara et al., 2009; Agrawan & Hodgson, 2007**). Algunos de los carbonos se unen covalentemente a grupos altamente oxidados tales como nitro, nitrosaminas y ésteres de nitrato. Estos grupo tienen enlaces N-N y N-O, los cuales cuentan con dos o más átomos covalentemente unidos a través de sus electrones libres presentes en los orbitales *para*, lo que genera repulsión electrostática entre los átomos (**Agrawan & Hodgson, 2007**). Durante la explosión, ocurre una reacción redox interna en la cual, los enlaces entre el nitrógeno y el oxígeno se rompen, para unirse posteriormente con los componentes combustibles (C y H), formando compuestos como agua, hidrógeno gaseoso (H₂), nitrógeno gaseoso (N₂), monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO₂), en los cuales los electrones que estaban libres se encuentran ahora en enlaces π estables (**Agrawan & Hodgson, 2007**).

Los explosivos han sido clasificados en muchas formas y de acuerdo a diferentes criterios como la velocidad de detonación (**Agrawan & Hodgson, 2007; EPA, 2001**) o su estructura química y a los grupos moleculares que contienen y les confieren sus propiedades explosivas, siendo los más empleados aquellos que contienen un grupo nitro (NO_2^-) (**Agrawan & Hodgson, 2007**). Dentro de estos compuestos están: los nitroaromáticos (tienen grupos NO_2^- unidos a los átomos de carbono del anillo aromático, como el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)), las nitrosaminas (tienen NO_2^- unidos al átomo de nitrógeno del anillo de compuestos alicíclicos como el hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX)), y los ésteres de nitrato (el grupo NO_2^- se une al átomo de oxígeno unido al carbono alifático como nitroglicerina y el tetranitrato de pentaeritritol (PETN) (**Zhuang, 2007**).

1.1.1 Características del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)

El TNT (**Ilustración 1-1**) es obtenido mediante sustitución electrofílica por la nitración secuencial del tolueno con ácido nítrico en presencia de ácido sulfúrico, altamente concentrados (**Yinon, 1999**). Este proceso se realiza en tres pasos sucesivos en los que se introducen los grupos NO_2^- . En los dos primeros pasos se forman los intermediarios 2 y 4-mononitrotolueno (MNT), y 2,4- y 2,6-dinitrotolueno (DNT), respectivamente y en el tercer paso se forma el TNT (**Yinon & Zitrin, 1996**). Al final del proceso de producción el TNT (2,4,6-trinitrotolueno) se encuentra mezclado con otros 5 isómeros asimétricos (**Yinon, 1999**) y debe ser purificado con sulfito sódico (**Lewis et al., 2004**).

Ilustración 1-1. Estructura química del 2,4,6-Trinitrotolueno



Tomada de: Lewis *et al.*, 2004

El TNT es uno de los nitroaromáticos más utilizado como explosivo comercial y militar. Se caracteriza por ser un compuesto estable, poco soluble en agua, neutro y no corrosivo

(Unión Española de Explosivos, 1994) que forma cristales color amarillo pálido y bajo la luz solar se torna color rojizo. Sus características fisicoquímicas se encuentran resumidas en la **Tabla 1-1**

Tabla 1-1. Propiedades fisicoquímicas del TNT

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	
Fórmula Molecular ^{a b c}	C ₇ H ₅ N ₃ O ₆
Peso molecular (g mol ⁻¹) ^{b c}	227.1
Densidad (g/cm ³) ^b	1.65
Punto de Fusión ^{b c d}	80°– 82°C
Solubilidad en agua (mg/L a 25°C) ^{d e}	120-130
Coefficiente octanol/agua (Log K _{ow}) ^{d f}	1.6-1.86
Constante de Henry (Atm.m ₃ .mol ⁻¹) ^d	4.57 x 10 ⁻⁷
Presión de vapor a 25 °C (mm Hg) ^d	1.99 x 10 ⁻⁴
Apariencia y olor ^{a b c}	Escamas amarillas con olor a almendras amargas

^a HSDB Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine, Bethesda, MD, <http://toxnet.nlm.nih.gov/> (Acceso Agosto 2011).

^b Yinon, 1999

^c Yinon & Zitrin, 1996

^d Sunahara *et al.*, 2009

^e Unión Española de Explosivos, 1994

^f Byung-Hoon *et al.*, 2008

1.1.2 Características del tetranitrato de pentaeritritol (PETN)

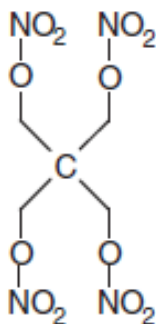
El 2,2-bis[(nitrooximetil]-1,3-propanodiol dinitrato o PETN (**Ilustración 1-2**) es sintetizado desde el año 1894. Se obtiene por la nitración de la molécula orgánica pentaeritritol empleando ácido nítrico concentrado (15-20°C) en presencia de ácido sulfúrico como catalizador (**Zhuang 2007; Yinon, 1999; Yinon & Zitrin, 1993**). Los cristales de PETN son separados de las impurezas por un proceso de filtrado al vacío y lavados con agua. Luego el PETN se disuelve en una solución de acetona y una pequeña proporción de carbonato de sodio (50°C), finalmente se neutraliza con amonio gaseoso y se vuelve a precipitar en agua. El rendimiento de este proceso es de alrededor del 95% (**Yinon 1999; Yinon & Zitrin, 1993**).

Este éster de nitrato simétrico se caracteriza por no ser un compuesto fácilmente alterado por la fricción, en tanto que es muy sensible al impacto y a la iniciación por explosión (**Yinon, 1999**), por lo que no es usado en su forma pura, sino que comúnmente se

emplea mezclado con TNT en partes iguales (50 % PETN y 50% TNT) dando lugar a un producto más estable llamado pentolita, el cual se emplea en la fabricación de granadas y detonadores (Akhavan, 2004)

El PETN, cuyas características fisicoquímicas se encuentran resumidas en la **Tabla 1-2**, presenta baja presión de vapor, baja constante de Henry, baja solubilidad en agua y un coeficiente octanol/agua relativamente alto, lo que contribuye a que permanezca por largos periodos de tiempo en suelos impactados (Zhuang, 2007; Akhavan, 2004, Yinon, 2004).

Ilustración 1-2. Estructura química del Tetranitrato de pentaeritritol (2,2-bis[(nitrooximetil]-1,3-propanodiol dinitrato)



Tomada de: Stenuit & Agathos, 2010

El PETN se fabrica para dos aplicaciones industriales: a) como explosivo secundario, ya que solo pueden detonar por la explosión originada por un explosivo primario o iniciador, utilizado en cordones detonantes, cuerdas explosivas e incluso como carga principal o agente de voladura en mezcla con TNT (Zhuang, 2007; Akhavan, 2004; Yinon, 1999) y b) como un vasodilatador para el tratamiento de la angina de pecho, que es una enfermedad cardíaca cuyos síntomas son similares a los de un infarto. Sin embargo, la exposición prolongada a este compuesto causa problemas como la disminución de la presión sanguínea (Zhuang, 2007; Török *et al.*, 2002).

Tabla 1-2. Propiedades fisicoquímicas del PETN

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	
Fórmula Molecular ^{a b c}	C ₅ H ₈ N ₄ O ₁₂
Peso molecular (g·mol ⁻¹) ^{a b c}	316.17
Densidad (g/cm ³) ^a	1.78
Punto de Fusión ^{a b c}	141.3°– 143.3°C
Solubilidad en agua (mg/L a 25°C) ^c	43
Solubilidad en agua (mg/L a 20°C) ^{a b d}	2-6
Coeficiente octanol/agua (Log K _{ow}) ^d	1.61-3.71
Constante de Henry (Atm·m ₃ ·mol ⁻¹) ^d	1.2 x 10 ⁻¹¹ - 1.7 x 10 ⁻⁹
Presión de vapor a 25 °C (mm Hg) ^{c d}	1.34 x 10 ⁻¹¹ - 1.035 x 10 ⁻¹⁰
Apariencia y olor ^a	Cristales blancos tetragonales

^a Yinon, 1999

^b Yinon & Zitrin, 1996

^c Sunahara *et al.*, 2009

^d Zhuang, 2007

1.2 Impacto ambiental de TNT y PETN

La producción a gran escala de los explosivos trajo consigo la llegada de residuos de los mismos y de sus sub productos al medio ambiente, (**Lewis *et al.*, 2004**), a través de los procesos de fabricación, transporte, almacenamiento, uso y disposición alcanzando suelos, sedimentos y cuerpos de agua (**Stenuit & Agathos, 2010; Sunahara *et al.*, 2009; Spain *et al.*, 2000; Yinon, 1999**). Aunque de PETN no se tienen datos de concentraciones en diferentes lugares, se cree que así como sucede con TNT, estas suelen ser muy variables. Por ejemplo, en suelos de una Planta productora de municiones en Louisiana Estados Unidos, se reportaron concentraciones de TNT de 4000-10000 mg/Kg (**Clark & Boopathy, 2007**), en suelos colectados de otra planta productora de explosivos y sus acuíferos, se encontraron concentraciones de 30 mg/kg y 19 µg/L de TNT respectivamente (**Bradley *et al.*, 1994**) y en suelos lodosos se han encontrado concentraciones hasta de 263 mg/Kg de TNT mezclado con otros explosivos como RDX y HMX (**Moshe *et al.*, 2009**).

Dependiendo de si el explosivo entra en contacto con el ambiente disuelto o en polvo y de las características fisicoquímicas de la matriz en el cual se encuentran los explosivos, así como las condiciones medioambientales, se ha observado que la vida media de estos

compuestos varía. Para el caso de una solución de TNT la vida media fue reportada como <1; 1,7; 1,9 y 140 días en arcilla, suelo franco arenoso, suelo limoso y suelo de acuífero a 22°C respectivamente (**Miyares et al., 1999**) y al evaluar la vida media de TNT aplicado como polvo (1 mg/Kg) esta fue de 1 año a 20°C (**Dubois & Bayto, 1991**). Para PETN se ha reportado en solución, una vida media que varía de 0,45-2,4 días a 22°C (**Jenkins et al., 2003**) mientras que aplicado como sólido al suelo su vida media alcanza los 92 días a 20°C (**Dubois & Bayto, 1991**).

La presencia en el ambiente de TNT y PETN representa no solo un riesgo de detonación accidental de las cargas abandonadas, sino también un riesgo para el ambiente y la salud humana (**Zhuang, 2007**). Por el carácter electrofílico de los grupos nitro de TNT, este oxida fácilmente moléculas biológicas causando mutaciones de forma directa o por la formación de productos reactivos como radicales aromáticos (**Stenuit & Agathos, 2010; Yinon, 1999; Lewis et al., 1997**), ejerciendo efectos tóxicos directos sobre plantas, vertebrados, invertebrados y microorganismos e indirectos, alterando las interacciones al interior de las comunidades, o las cadenas tróficas perturbando la regulación, flujo y ciclado interno del carbono y nutrientes en los ecosistemas terrestres y acuáticos (**Sarrazin et al., 2009**). En el caso de los efectos para el ser humano se ha observado que al estar en contacto directo con la manufactura de este explosivo, se pueden causar intoxicaciones fatales por la generación de anemia aplásica, hepatitis, afectaciones en el sistema nervioso como mareos, dolor de cabeza, fatiga o somnolencia y en casos severos, delirio, convulsiones, y comas (**Yinon, 2000; Kennel et al., 2000**). En el caso de los intermediarios de la degradación de TNT, se ha encontrado que estos pueden tener diversos efectos sobre plantas, vertebrados, invertebrados y microorganismos incluso superiores a los ocasionados por el TNT (**Tabla 1-3**). Para PETN por su parte no se han establecido los efectos sobre los ecosistemas en los cuales se presenta, pero se ha encontrado que este compuesto tiene efectos sobre la presión arterial y puede afectar la habilidad de los glóbulos rojos para transportar oxígeno (**Stokinger et al., 1982**).

Tabla 1-3. Toxicidad de TNT y sus metabolitos de degradación

Metabolitos	Toxicidad	Tiempo de exposición	Organismo probado	Toxicidad relativa	Fuente
4-HADNT	Mutación	24 h	<i>Cricetulus griseus</i>	TNT	Honeycutt <i>et al.</i> , 1996
2-HADNT	Crecimiento	12-36 h	<i>P. aeruginosa</i> cepa MX	< TNT	Oh <i>et al.</i> , 2003
2-ADNT	Mutación	24 h	<i>Cricetulus griseus</i>	< TNT	Honeycutt <i>et al.</i> , 1996
	Mortalidad	14 h	<i>Eisenia andrei</i>	TNT	Lachance <i>et al.</i> , 2004
	Sobrevivencia	96 h	<i>Hyalella azteca</i>	< TNT	Sims & Steevens, 2008
	Reproducción	30	<i>Acheta domesticus</i>	>TNT	Karnjanapiboonwong <i>et al.</i> , 2009
4-ADNT	Mutación	24 h	<i>Cricetulus griseus</i>	-TNT	Honeycutt <i>et al.</i> , 1996
	Mortalidad	14 h	<i>Eisenia andrei</i>	TNT	Lachance <i>et al.</i> , 2004
	Sobrevivencia	96 h	<i>Hyalella azteca</i>	<TNT	Sims & Steevens, 2008
	Reproducción	30 d	<i>Acheta domesticus</i>	>TNT	Karnjanapiboonwong <i>et al.</i> , 2009
2,4-DNT	Viabilidad celular	12-36 h	<i>P. aeruginosa</i> cepa MX	>TNT	Oh <i>et al.</i> , 2003
	Reproducción	30 d	<i>Acheta domesticus</i>	>TNT	Karnjanapiboonwong <i>et al.</i> , 2009
2,6-DANT	Sobrevivencia, Mutación	5 h	<i>Cricetulus griseus</i>	<TNT	Kennel <i>et al.</i> , 2000
2,4-DANT	Mutación	24 h	<i>Cricetulus griseus</i>	TNT	Honeycutt <i>et al.</i> , 1996
	Sobrevivencia, mutación	5 h	<i>Cricetulus griseus</i>	<TNT	Kennel <i>et al.</i> , 2000
	Sobrevivencia	96 h	<i>Hyalella azteca</i>	>TNT	Sims & Steevens, 2008
TAT	Sobrevivencia, mutación	5 h	<i>Cricetulus griseus</i>	<TNT	Kennel <i>et al.</i> , 2000
2,2',6,6'-TETRANITRO-4,4'-AZOXITOLUENO	Mutación	24 h	<i>Cricetulus griseus</i>	TNT	Honeycutt <i>et al.</i> , 1996
	Sobrevivencia, mutación	5 h	<i>Cricetulus griseus</i>	<TNT	Kennel <i>et al.</i> , 2000
	Viabilidad celular	12-36 h	<i>P. aeruginosa</i> cepa MX	<TNT	Oh <i>et al.</i> , 2003
2,4',6,6'-TETRANITRO-4,2'-AZOXITOLUENO	Sobrevivencia, mutación.	5 h	<i>Cricetulus griseus</i>	<TNT	Kennel <i>et al.</i> , 2000

Se ha encontrado que dentro de los principales procesos que influyen el transporte de los explosivos se encuentran la disolución, volatilización y adsorción, en tanto que los procesos que influyen la transformación se encuentran la fotólisis, la hidrólisis, la reducción y la biodegradación (Kalderis *et al.*, 2011). Bajo condiciones ambientales tanto TNT como PETN, presentan resistencia a estos procesos de atenuación natural, dando como resultado la presencia por largos periodos de tiempo de estos compuestos

en suelos y aguas subterráneas (Zhuang, 2007), de hecho, TNT ha sido clasificado como persistente en el ambiente (Stenuit & Agathos, 2010; Lima *et al.*, 2011; Juhasz & Naidu, 2007; Spain *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta lo anterior, para determinar el impacto ambiental de los explosivos, es clave determinar sus posibles destinos ambientales de acuerdo a los factores que afectan al cada explosivo. Por ejemplo, se ha encontrado que la lixiviación contribuye a la propagación de los explosivos hacia las aguas subterráneas de los suelos contaminados y estas a su vez los transportan a otros cuerpos de agua. El TNT y el PETN presentan solubilidad baja solubilidad en (100 mg/L y 6 mg/L a 20°C respectivamente) (Yinon, 1999), y aunque se ha visto que el TNT se adsorbe más al suelo en comparación con explosivos como RDX, el cual migra rápidamente a través de la matriz de suelo (Pennington *et al.*, 1999), se ha observado que TNT puede lixiviar contaminando fuentes hídricas (Georgie, 2011).

En cuanto a la volatilización a la atmósfera de TNT y PETN, este se considera un destino insignificante cuando se encuentran en fase sólida e incluso líquida pues presentan una baja constante de Henry (Yinnon, 1999). La alteración causada por la luz, o fotólisis, por otra parte, ejerce un efecto muy fuerte sobre el TNT pues lo descompone a otros compuestos como trinitrobenceno (TNB) generando lo que se conoce como aguas rosadas, las cuales tienen una composición compleja de varios compuestos aromáticos y sales orgánicas como sulfitos, sulfatos, nitritos y nitratos de sodio (Becker, 1995). Además, TNT y PETN están sujetos a reducciones abióticas, en las cuales el grupo nitro se reduce a grupo amino, siendo este proceso sensible al pH y al potencial redox. Tanto TNT como PETN pueden sufrir biotransformación en la cual se pueden reducir, transformar e incluso eliminar estos compuestos (Mulligan & Yong, 2004; Juhasz & Naidu, 2007).

1.3 Métodos empleados para el tratamiento de ambientes contaminados con explosivos

Existen diferentes tratamientos físicos, químicos y biológicos para remediar suelos contaminados con explosivos y sus residuos. Para la selección del tratamiento se debe

tener en cuenta, el tiempo requerido o disponible para la remediación, el tipo de compuesto, las condiciones del ambiente a remediar, los costos, la disponibilidad de equipos, entre otros, pues la idoneidad de cada tecnología debe ser evaluada antes de elegir e implementar la estrategia de remediación **(Talley, 2006)**.

1.3.1 Atenuación Natural

La atenuación natural, denominada también remediación intrínseca, es aquella en la que no se interviene el ambiente contaminado, dejando que los procesos naturales como la reducción u oxidación del compuesto ya sea por reacciones abióticas o catalizada por microorganismos propios del ambiente, reduzcan las concentraciones del contaminante, lo cual es monitoreado periódicamente **(Mulligan & Yong, 2004)**. Lo anterior implica que para implementar el monitoreo de la atenuación natural, los costos en los que se debe incurrir están relacionados directamente con la cuantificación y el seguimiento del destino ambiental del contaminante y sus subproductos.

La atenuación natural, ha sido aplicado de forma frecuente para la remediación de sitios contaminados, aunque en algunos países, este no sea aún reconocido como una técnica de remediación oficial (p.e., Finlandia) **(Declercq et al., 2012)**. Sin embargo, en países como Estados Unidos, organizaciones como El comando de operaciones industriales de la armada han diseñado programas como *Strategic Environmental Research and Development program* (SERDP) y *The Environmental Security Technology Certification Program* (ESTCP), dedicados a desarrollar una guía para la selección e implementación de la atenuación natural específicamente para explosivos (TNT y RDX) mostrando resultados alentadores **(Pennington et al., 1999)**, así como los obtenidos por **Miyares et al., (1999)** en suelos con diferentes características, por lo que se ha visto que la atenuación natural puede ser empleada como método para la remediación de explosivos como TNT, en tanto que para PETN esta metodología no ha sido reportada. Sin embargo, en la actualidad se emplean metodologías que buscan acelerar los procesos de degradación, ya sean fisicoquímicos o biológicos.

1.3.2 Tratamientos fisicoquímicos

Existen diferentes métodos fisicoquímicos, para la remoción de explosivos de sitios impactados con TNT y PETN tales como fotooxidación, incineración, oxidación química,

adsorción a carbón activado e hidrólisis, encontrando que cada uno de ellos exhibe tanto ventajas como sus propias limitaciones. En la **Tabla 1-4**, se resumen pros y contras de los métodos fisicoquímicos más empleados para la remediación de explosivos.

Tabla 1-4. Principales tratamientos fisicoquímicos empleados para la remediación de explosivos

TRATAMIENTO	CARACTERÍSTICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Incineración ^{a b}	Emplea altas temperaturas (>1,500°C) que destruyen los compuestos orgánicos	*Es el más utilizado en suelos *Es rápido y efectivo *Elimina prácticamente todos los explosivos	*Altos costos asociados a excavación, transporte y energía *Generación de gases tóxicos (p.e., NO _x) *No es útil para remediación de aguas *Puede ser incompleta la combustión
Adsorción ^{b c e}	Se emplea carbón activado para retener compuestos orgánicos	*Es muy utilizado en aguas *Concentra el contaminante en la superficie del carbón	*No destruye o transforma el contaminante *Para su disposición el carbón debe tener un tratamiento posterior el cual suele ser costoso
Oxidación ^{c e f}	Son procesos que requieren del efecto sinérgico de un agente catalítico (p.e., UV) y oxidantes químicos para la eliminación de compuestos orgánicos	*Destruye al contaminante *Efectiva para el tratamiento de aguas subterráneas	*Los agentes oxidantes químicos como H ₂ O ₂ y ozono son costosos *Se generan intermediarios tóxicos en el proceso
Reducción ^d	El compuesto de interés se reduce en presencia de compuestos donadores de electrones como hierro zero Valente	*Muy útiles para aguas *Reduce varios contaminantes *Utilizado <i>in situ</i>	*Requiere altos costos de implementación *La reducción puede ser parcial generando compuestos tóxicos

Adaptada de: ^aVan Ham *et al.*, 1997; ^bGarg *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2010; ^cKulkarni & Chaudhari, 2007; ^dZhuang, 2007; ^eTalley, 2006; ^fPark *et al.*, 2003^a

1.3.3 Tratamientos biológicos para la remediación de explosivos

En los procesos de biorremediación, es clave tener en cuenta tres conceptos fundamentales: la **biotransformación**, la **biodegradación**, y la **mineralización**.

La biotransformación se refiere a cualquier alteración química de la estructura molecular de compuestos orgánicos e inorgánicos. Al cambiar la estructura de un compuesto la biotransformación puede modificar la complejidad, toxicidad y movilidad del compuesto original (**Gunnison et al., 1993; Walter & Crawford, 1997**). A diferencia de la mineralización, la biotransformación puede ocurrir por acción directa del microorganismo o de forma fortuita sin que se obtengan nutrientes o energía en el proceso (**Spain et al., 2000**).

La biodegradación, se refiere a un proceso que involucra el catabolismo o ruptura de los compuestos orgánicos en componentes más simples y la mineralización es cuando la biodegradación implica el catabolismo completo del compuesto orgánico en sus componentes inorgánicos más simples como agua, dióxido de carbono, varias formas de nitrógeno inorgánico y metano. La mineralización es el fin último o meta deseada en los procesos de biorremediación (**Talley, 2006; Spain et al., 2000; Walter & Crawford, 1997; Madsen, 1997**).

Cuando se deriva energía de un proceso catabólico, la degradación es sostenible por sí misma tanto tiempo como el compuesto contaminante esté presente y da una ventaja selectiva al microorganismo que lo degrade (**Spain et al., 2000**). Los compuestos que tienen estructuras moleculares a las cuales los microorganismos no han sido expuestos (xenobióticos) son por lo general resistentes a la biodegradación (reclacitrantes) o se degradan de forma incompleta, este caso ocurre frecuentemente en compuestos como los explosivos, ya que tanto los nitroaromáticos como los ésteres de nitrato resultan ser mucho más recalcitrantes que sus análogos no nitrados (**Walter & Crawford, 1997**). Se ha encontrado, que para el caso de los explosivos, en la mayoría de los casos la biotransformación hasta compuestos del tipo aminodinitro, prima sobre la mineralización (**Spain et al., 2000**).

Las aproximaciones generales de la biorremediación son básicamente: a) **biorremediación intrínseca**, la cual hace parte de la atenuación natural (anteriormente

expuesta); b) **Bioestimulación**, la cual se refiere a optimizar las condiciones para el desarrollo de los procesos de biodegradación que han sido previamente identificadas como limitantes para la actividad degradadora de los microorganismos ubicuos (p.e. fuentes de nitrógeno, carbono, fósforo, aceptores de electrones); c) **Bioaumentación**, en el cual se incrementan las poblaciones existentes o incorporan microorganismos degradadores (nativos o exógenos) del contaminante al ambiente y d) **Fitorremediación**, en la cual se emplean plantas, ya sea nativas o modificadas genéticamente, que por sus características puedan tolerar, acumular e incluso metabolizar los contaminantes, **(Kulkarni & Chaudhari, 2007; Roldán et al., 2008; Lewis et al., 2004; Iwamoto & Natsu, 2001; Margesin et al., 2000)**. Los más destacados para la eliminación de explosivos se encuentran resumidos en la **Tabla 1-5**.

Aunque como cualquier alternativa para la remediación de ambientes contaminados, los tratamientos biológicos tienen ventajas y desventajas, en los últimos años se han incrementado los esfuerzos por investigar otros métodos para la remediación de explosivos, puesto que estudios como los de **Craig et al., (1995)** y **Lewis et al., (2004)** han demostrado que la degradación biológica de compuestos nitroaromáticos representa ventajas frente a las otras soluciones, debido a que presentan alternativas en muchos casos económicas, seguras para el personal que lo efectúa y efectivas una vez se han establecido las condiciones de manejo. Adicionalmente, en los casos en los que se realiza el tratamiento *in situ*, evitan contaminación cruzada debido a que no traslada el contaminante de un ambiente a otro, sino que puede fijarlos al suelo por ejemplo **(Symons & Bruce, 2006)**.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que cada sitio tiene características únicas que pueden favorecer una tecnología de tratamiento sobre otro ya sea esta biológica o fisicoquímica, o un lugar específico, puede requerir de la combinación de procedimientos físicos, químicos y biológicos que permitan una remediación que reduzca la contaminación a niveles seguros y aceptables **(Khan et al., 2004)**.

Tabla 1-5. Principales tratamientos biológicos empleados para la remediación de TNT y PETN

TRATAMIENTO	CARACTERÍSTICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Compostaje ^{b,d,e,g,h} j,k	Proceso de transformación en donde se emplean residuos orgánicos mezclados con contaminantes, los cuales por lo general susceptibles a la reducción cometabólica, como los explosivos.	<ul style="list-style-type: none"> *Viable económicamente *Se puede realizar <i>in situ</i> *Buenos resultados de remoción *Se emplean los microorganismos presentes en áreas contaminadas que toleran estos compuestos y los utilizan en su metabolismo, así como los microorganismos presentes en el material de aporte como el estiércol *El tratamiento disminuye la toxicidad de los compuestos en los suelos y lixiviados ya que las hidroxilaminas y los amino reaccionan con las quinonas y los grupos carboxilos de la materia orgánica uniéndose a esta, siendo menos biodisponibles. *El material compostado puede devolverse al lugar si cumple con la normatividad *EL material compostado para la eliminación de explosivos puede soportar el crecimiento vegetal tras el proceso *Ha sido reportado para TNT y PETN 	<ul style="list-style-type: none"> *Altos costos asociados a maquinaria y mano de obra *Tiempos de incubación relativamente altos *Se requieren grandes extensiones de tierra. *Puede no haber degradación sino fijación de los explosivos al material húmico *Durante el volteo el personal puede estar expuesto a vapores tóxicos *Se aumenta el volumen de material contaminado al mezclarlo con la materia orgánica necesaria para el proceso. *No se conoce muy bien qué tipo de microorganismos están involucrados en los procesos de descontaminación. *No se sabe muy bien que tan duradera es la fijación de TNT y sus metabolitos al suelo, y si pueden ser liberados luego, lentamente al ambiente.
Reactor de Lodos a,c, e,g i,j	Los suelos contaminados son mezclados con agua en reactores de varios diseños para crear un lodo al que se le pueden adicionar nutrientes, cofactores e incluso aceptores de electrones y que es luego agitado mecánicamente.	<ul style="list-style-type: none"> *Pueden ser aerobios o anaerobios o secuencias anaerobio/aerobio para mejores rendimientos. *Se pueden controlar parámetros como O₂, pH y Temperatura, entre otros. *Se da un mayor contacto entre el suelo contaminado, los nutrientes y los microorganismos, que permite mayor remoción. *El sistema de lodos promueve la reducción de los grupos nitro *Se presume que la fase anaeróbica produce TAT como metabolito final *Relativamente rápido 35-150 días para TNT, RDX y HMX. *La unión covalente de los explosivos a la materia orgánica reduce su disponibilidad *Aparentemente la adición de un paso aeróbico al final de la fase anaeróbica causa que los metabolitos se unan a la materia orgánica de 	<ul style="list-style-type: none"> *No puede ser realizado <i>In situ</i> *Luego del tratamiento el suelo debe ser separado del agua para su disposición. *De todos los tratamientos es el que presenta los mayores costos de operación *Tanto en condiciones aerobias como anaerobias puede no darse degradación completa y los metabolitos reducidos pueden unirse covalentemente a la materia orgánica * A la fecha no se han reportado estudios a gran escala por este método para PETN, sólo experimentos a escala de laboratorio o piloto

		<p>forma más fuerte.</p> <p>*La fase aerobia acelera el crecimiento de la biomasa y permite la mineralización del TNT</p>	
Biolabranza ^{f,e}	<p>El suelo contaminado se dispone en una capa delgada (menor a 1.5 m) y se hace arado</p>	<p>*Ampliamente usado desde hace muchos años</p> <p>*Es simple y relativamente económico de implementar</p> <p>*Buen contacto con el aire que mejora la degradación</p>	<p>*Requiere de la adición de nutrientes como nitrógeno y fósforo constante para garantizar la degradación</p> <p>*Se debe contar con sistemas que permitan controlar el drenaje del agua</p> <p>*Es el tratamiento que tiene el menor control para monitorear los procesos de degradación</p> <p>*Requiere grandes extensiones de tierra</p> <p>*En ocasiones se agregan microorganismos cuando las poblaciones autóctonas han disminuido por la toxicidad del contaminante, lo que incrementa los costos.</p> <p>*Para realizar el proceso a veces se traslada el suelo a un lugar más amplio</p> <p>*Puede no ser efectivo en concentraciones altas del contaminante</p>
Fitorremediación ^{f,g,l}	<p>Se emplean plantas específicas para remover contaminantes</p>	<p>*Funciona muy bien en suelos y humedales para detoxificarlos</p> <p>*Es un tratamiento relativamente económico y aceptada por el público.</p> <p>*Funciona en grandes extensiones con bajas concentraciones del contaminante</p> <p>*Para evitar los problemas de adsorción/desorción se han incorporado genes bacterianos (que codifican para nitrorreductasas) a las plantas empleadas haciendo que el TNT se reduzca más rápido y que las plantas sean más tolerantes a niveles más altos de explosivo.</p> <p>* Se ha reportado que funciona para PETN</p>	<p>*Por si solas las plantas detoxifican el ambiente contaminado secuestrándolo en vacuolas por ejemplo, pero no degradan como tal a los explosivos.</p> <p>* El ecosistema puede verse afectado ya que algunas plantas se han modificado genéticamente con enzimas producidas por microorganismos, para lograr de esta forma la degradación</p> <p>*Se ha encontrado que la remoción es eficiente a bajas concentraciones (4 ppm) y disminuye a medida que la concentración aumenta (20 ppm).</p>

Adaptada de: ^aWang *et al.*, 2010; ^bKulkarni & Chaudhari, 2007; ^cZhuang, 2007; ^dAlvarez & Illman, 2006; ^eTalley, 2006; ^fKhan *et al.*, 2004; ^gLewis *et al.*, 2004; ^hEsteve-Núñez *et al.*, 2001; ⁱBruns-Nagel *et al.*, 2000; ^jJerger & Woodhull, 2000; ^kCraig *et al.*, 1995; ^lVanek *et al.*, 2003

1.4 Biotransformación y biodegradación bacteriana de TNT

En el caso del TNT, los electrones π del anillo aromático son atraídos por la electronegatividad de los tres grupos nitro haciendo que el núcleo del anillo tenga carga positiva y por lo tanto sea electrofílico. A su vez el grupo nitro, está polarizado puesto que el oxígeno es más electronegativo que el nitrógeno ocasionando que la carga parcialmente positiva del N, combinada con esta alta electronegatividad permitan que el grupo nitro y el anillo sean fácilmente reducibles, es decir atacado por reductasas o hidruro transferasas, al mismo tiempo que imposibilita el ataque oxidativo de esta molécula en primera instancia **(Esteve-Nuñez et al., 2001)**. Por lo tanto, el primer paso en degradación del TNT **(Ilustración 1-3)** en forma aerobia y anaerobia involucra reacciones reductivas directas o por reacciones de condensación de moléculas de TNT para la eliminación de al menos uno de los grupos nitro del anillo **(Stenuit & Agathos, 2010)**.

Las nitroreductasas e hidruro transferasas está ampliamente distribuida en los organismos por lo que la mayoría de rutas para la biotransformación de TNT son inespecíficas y por lo tanto, muchas de estas rutas están caracterizadas de forma incompleta y algunas otras son especulativas **(Smets et al., 2007; Esteve-Núñez et al., 2001; Lewis et al., 1996)**.

Una vez eliminado un grupo nitro, la naturaleza electrofílica de la molécula decrece y permite a las dioxigenasas usar los compuestos di o mononitroaromáticos como sustratos **(Esteve-Nuñez et al., 2001)**. En tanto, la reducción abiótica de los grupos nitro a sus correspondientes aminas ocurre como un proceso natural en los sedimentos, suelos y acuíferos en donde se encuentran numerosos donadores de electrones potenciales como especies reducidas de hierro, azufre y materia orgánica **(Harderlein & Schwarzenbach, 1995)**.

La adición de uno o más grupos nitro a los compuestos aromáticos altera dramáticamente las propiedades químicas de la molécula y consecuentemente las vías metabólicas empleadas por los microorganismos, pues se conocen pocos

nitroaromáticos naturales y se estima que la liberación de estos compuestos al ambiente es relativamente reciente. No obstante, algunos microorganismos han desarrollado y evolucionado una variedad de estrategias, para que estos compuestos puedan ser tolerados e incluso empleados en su metabolismo (**Nishino & Spain, 2001**). Se ha reportado que bacterias como *Pseudomonas* activan bombas de eflujo en presencia de TNT, sugiriendo la importancia de un sistema de extrusión para mantener el TNT intracelular bajo para que no cause toxicidad (**Stenuit & Agathos, 2010**), ya que de acuerdo a lo que se sabe, la toma de TNT por un sistema de transporte dependiente de energía no ha sido reportado y por lo tanto, se considera que la difusión pasiva a través de las barreras celulares es el mecanismo predominante para la toma de TNT (flujo a través de la membrana de aprox. $0.037 \text{ mg.cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (**Stenuit & Agathos, 2010**).

Por otro lado, además de su toxicidad, la eficiencia del metabolismo del TNT depende de múltiples factores. A nivel experimental depende de las cepas, los cultivos mixtos involucrados y las condiciones ambientales y como fenómeno natural depende tanto de reacciones bióticas como abióticas propias del ambiente en donde se encuentre, lo cual trae como consecuencia que dependiendo de dichos factores, se expresen determinadas enzimas, razón por la que se han propuesto múltiples rutas metabólicas y mecanismos para la biotransformación y/o biodegradación de este explosivo (**Hong-yan et al., 2013; González-Perez et al., 2007; Neal & Clint, 2007; Pennington & Brannon, 2002; Huang et al., 2000; Esteve-Núñez & Ramos, 1998; Hawari et al., 2000; Boopathy et al., 1998a; Tim et al., 1998; Razo-Flores et al., 1997; Krumholz et al., 1997; Preuss et al., 1993**).

a) Reducción de los grupos nitro:

La reducción inicial de los grupos nitro puede ser llevada a cabo por varios tipos de enzimas:

- Nitrorreductasas de tipo I (independientes del oxígeno). Esta reducción ocurre en una serie de transferencia de dos pares de electrones donados por nucleótido reducidos de piridina como NAD(P)H y NADH (**Smets et al., 2007; Nyanhongo et al., 2005**)

- Nitrorreductasas de tipo II (sensibles al oxígeno). Que son producidas por microorganismos anaerobios o microaerofílicos y también requieren nucleótidos reducidos de piridina (**Smets et al., 2007; González-Pérez et al., 2007; Caballero et al., 2005; Nyanhongo et al., 2005; Paterson et al., 2002**)
- Flavopoteínas tipo 2 y 3 de la familia *old yellow enzyme* (OYE), enzimas dependientes de NAD(P)H y NADH (**Smets et al., 2007; González-Pérez et al., 2007; Symons & Bruce, 2006**)
- Otras enzimas que reducen los nitroaromáticos incluyen la aldehído oxidasa, la deshidrogenasa amida dihidrolípica, la citocromo b5 reductasa, diaforasas, hidrogenasas, xantin oxidasa y CO deshidrogenasa (**Nyanhongo et al., 2005**).

Caballero et al., (2005), observaron que la reducción del primer grupo nitro es generalmente mucho más rápida que la de los grupos nitro restantes debido a que la conversión de nitro a amino decrece la deficiencia de electrones del anillo aromático, y consecuentemente un menor potencial redox se requiere para que se reduzcan el resto de los grupos nitro de la molécula (**Nyanhongo et al., 2005**). Se ha reportado que en TNT la posición *para* es reducida más fácilmente que los grupos nitro de la posición *ortho* (**Stenuit & Agathos, 2010**). Esta primera reducción durante la biodegradación del TNT puede ocurrir con o sin presencia de oxígeno

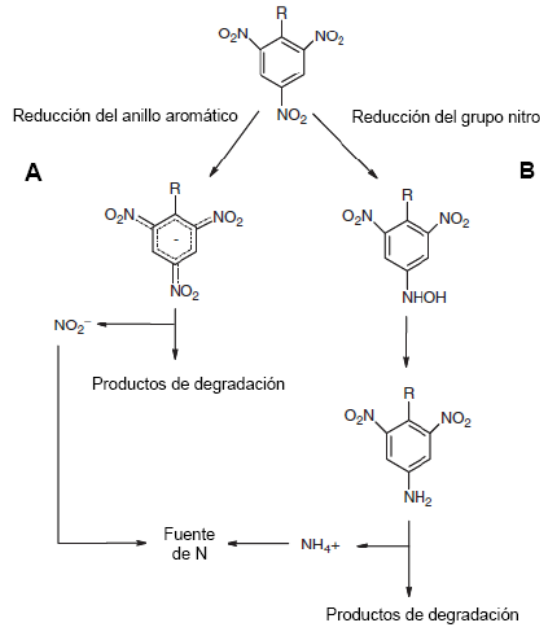
En la mayoría de los casos descritos a la fecha, estas reacciones de reducción conducen a la formación de nitroso, hidroxilamino y amino derivados como 2-amino-dinitrotolueno (2-ADNT), 4-amino-dinitrotolueno (4-ADN), 2,4- diamino-nitrotolueno (2,4DANT), 2,6-diamino-nitrotolueno (2,6-DANT) (**Bruns-Nagel et al., 2000; Haïrdour & Ramos, 1996**) Estos compuestos por lo general, se acumulan en el medio de cultivo sin poder ser metabolizadas posteriormente (**Stenuit & Agathos, 2010**). Además, se ha reportado que en presencia de oxígeno, las formas parcialmente reducidas del TNT pueden reaccionar entre si o con compuestos orgánicos formando por medio de enlaces covalentes compuestos azoxytetranitrotolueno, los cuales son menos solubles y por lo tanto con una menor disponibilidad biológica (**Stenuit & Agathos, 2010; Smets et al., 2007; Symons & Bruce, 2006; Esteve-Nuñez et al., 2001; Lewis et al., 1997**).

b) Reducción del anillo aromático:

La deficiencia de electrones en el núcleo del anillo aromático de TNT hace que el ataque nucleofílico sobre el anillo sea posible por medio de la transferencia de iones hidruro (H-) a partir de una piridina reducida catalizada por las OYE, generando intermediarios no-aromáticos denominados complejos Mono/dihidruro-Meisenheimer o compuestos σ -anionicos, de color rojo-naranja, con carga negativa. Específicamente, el complejo TNT-Meisenheimer se produce por la formación de enlaces covalentes entre nucleófilos (hidroxilos, iones hidruro, grupos amino de la anilina o cisteína) y los nitroaromáticos positivos deficientes en electrones como el TNT. La adición del ión hidruro ocurre preferencialmente en la posición C3, más que en la C1 del anillo aromático. Estos complejos son inestables y pueden ser rearomatizados luego de la liberación de nitrito (**Smets et al., 2007; González-Pérez et al., 2007; Nyanhongo et al., 2005; Vorbeck et al., 2008**). Se ha encontrado que la formación de los complejos de Meisenheimer es el proceso por el cual se libera de forma más frecuente Nitrato a partir de TNT (**Smets et al., 2007**), así como de la fusión de dos moléculas de N-(2-methyl-3,5-dinitrophenil)-4-methyl-3,5-dinitroanilina (**Van Dillewijn et al., 2008**).

En resumen, el TNT es reducido a nivel de hidroxilaminodinitrotolueno cuando las nitroreductasas o las enzimas OYE atacan directamente al grupo nitro, mientras sólo las enzimas OYE atacan el anillo y son capaces de llevar el TNT a complejos TNT-Mono/Dihidruro Meisenheimer (**Nyanhongo et al., 2005**)

Ilustración 1-3. Vías de reducción del TNT por bacterias



Tomado y adaptado de Roldan *et al.*, 2008

A. Reducción del anillo aromático a través de la adición de iones hidruro (H⁻) para generar complejos hidruro-Meisenheimer y dihidruro-Meisenheimer. B. Reducción de grupos nitro a través de la adición de electrones.

1.4.1 Biodegradación bacteriana aeróbica del TNT

Las bacterias aerobias inician la degradación del TNT, en primera instancia con reacciones reductivas que pueden ocurrir aún en presencia de oxígeno y posteriormente, se puede llevar a cabo el catabolismo oxidativo (en presencia obligada de oxígeno) de los subproductos mononitroaromáticos y dinitroaromáticos por monooxigenasas o dioxigenasas (Alvarez *et al.*, 1995).

Se han realizado numerosos experimentos de biodegradación del TNT en condiciones aerobias tanto *in situ* como *in vitro*, en los cuales se ha encontrado, algunas generalidades como:

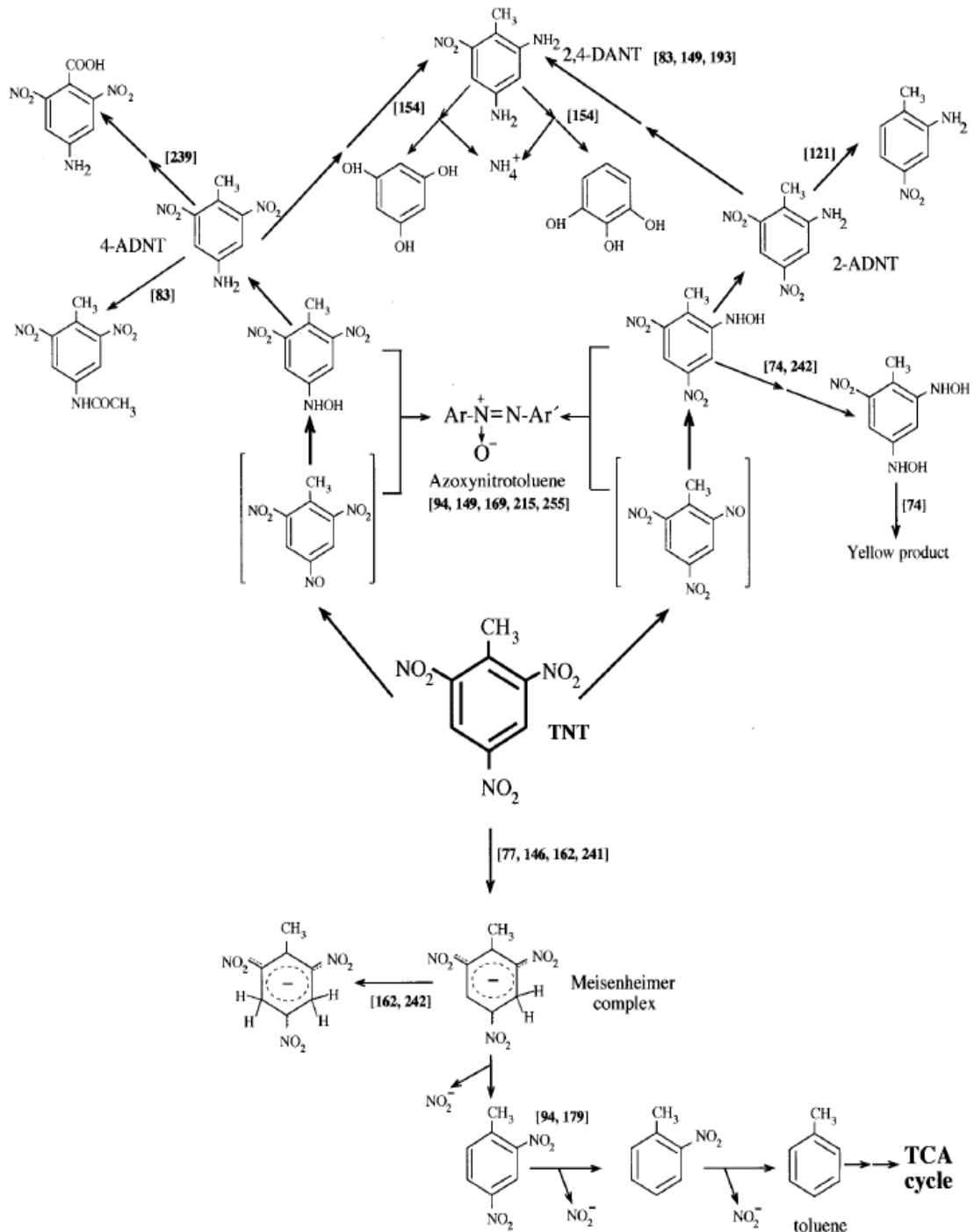
- El proceso requiere de la adición de sustratos como fuente de carbono, energía y en ocasiones nitrógeno, indicando la naturaleza cometabólica de este (Lewis *et al.*, 1997).

- Se ha encontrado que cepas puras pueden emplear TNT como sustrato de crecimiento (fuente de N), pero no como única fuente de Carbono y energía, pues no se han comprobado cantidades sustanciales de CO₂ a partir de TNT **(González-Pérez *et al.*, 2007; Naumova *et al.*, 1986)**
- Los balances de masas indican que los subproductos obtenidos más comunes son los isómeros Aminodinitrotolueno (ADNTs), Diaminonitrotoluenos (DNTs), Hidroxiaminodinitrotolueno (HADNTs) Azoxitetranitrotoluenos (AZTs), Nitritos (NO₂⁻), complejos Meisenheimer, y N-(2-metil-3,5-dinitrophenil)-4-metil-3,5-dinitroanilina **(Hong-yan *et al.*, 2013; Van Dillewijn *et al.*, 2008; Claus *et al.*, 2007; Stenuit *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2003b; Pennington & Brannon, 2002; Razo-Flores *et al.*, 1997; Duque *et al.*, 1993).**
- Los productos parcialmente reducidos, nitroso, hidroxilamino y aminonitrotoluenos son propensos a reaccionar unos con otros y/o con los compuestos orgánicos de los alrededores generando derivados unidos covalentemente, lo cual es promovido por la presencia de oxígeno (formación de AZTs o N-(2-metil-3,5-dinitrophenil)-4-metil-3,5-dinitroanilina) **(Stenuit & Agathos, 2010; Van Dillewijn *et al.*, 2008).**
- Poca o insignificante mineralización del TNT ha sido reportada en la mayoría de los estudios con radiomarcados realizados con cultivos mixtos aerobios, indicando que las vías para la utilización completa del TNT, sus productos parcialmente reducidos y el material polimérico son raras en estos sistemas. Así mismo, se observó que la mineralización disminuye cuando en el medio hay fuentes de carbono complejas y que el óptimo de mineralización ocurre bajo condiciones microaerófilas. **(Bae *et al.*, 1995; Bradley & Chapelle, 1995)**
- Por lo general en condiciones aerobias se da la acumulación de productos. En algunos estudios, en donde se suplementa con fuentes de carbono se han encontrado altas proporciones de productos polares que no se pueden extraer con solventes como dietileter. También se encuentra DANT y 4-acetil-ADNT. Se cree que la presencia de oxígeno es necesaria para la formación de los productos polares **(Alvarez *et al.*, 1995).**

El problema inherente de las rutas metabólicas del TNT es que estas no parecen desencadenar en una única ruta benéfica de degradación para este compuesto, dado

que los metabolitos del TNT que ya han sufrido la reducción de uno de los grupos nitro pueden ser transformados por (1) Condensación, para producir tetranitroazoxitoluenos o diarilaminas secundarias, (2) oxidación del grupo metilo o (3) acetilación del grupo amino. Estos metabolitos se denominan comúnmente como sin salida (*dead end*) debido a que no se degradan y se acumulan, siendo tóxicos (**Stenuit & Agathos, 2010**). En la **Ilustración 1-4** se muestra el esquema de las principales biotransformaciones aeróbicas bacterianas.

Ilustración 1-4. Esquema de las vías metabólicas para la biotransformación de TNT por microorganismos aeróbicos.



Tomado de Esteve-Núñez *et al.*, 2001

1.4.2 Biodegradación bacteriana anaeróbica del TNT

El proceso anaeróbico tiene las ventajas de que a bajos potenciales redox favorece la reducción de TNT, y que la ausencia de oxígeno minimiza la polimerización oxidativa de los sustratos para formar productos azoxinitrotolueno, por lo que las tasas de remoción del explosivo son más eficientes. Además, bajo estas condiciones el mismo TNT puede servir como aceptor de electrones (**Stenui & Agathos, 2010; Esteve-Núñez et al., 2001; Haïdour & Ramos, 1996; Boopathy et al., 1993a**). El proceso de degradación en condiciones de anerobiosis ha sido reportado en cepas puras de *Pseudomonas spp.*, *Clostridium sp.*, *Desulfovibrio sp.*, y metanogénicas así como consorcios anaerobios (**Neal & Clint, 2007; Symons & Bruce, 2006; Hawari et al., 2000; Boopathy et al., 1998; Krumholz et al., 1997; Preuss et al., 1993; Boopathy et al., 1993a; Boopathy et al., 1993b**).

La biotransformación anaeróbica del TNT consiste en una reducción secuencial de los grupos nitro del TNT hasta sus respectivas aminas (**Yin et al., 2005**) incluso hasta Tolueno (**Boopathy et al., 1993a**), aunque no en todos los casos se alcanza la reducción total de todos los grupos nitro del TNT (**Boopathy et al., 1998b; Preuss et al., 1993**).

Las reacciones iniciales son similares a las encontradas para los microorganismos aerobios, ya que la reducción del primer nitro-sustituido del TNT, puede darse bajo condiciones tanto de aerobiosis como anaerobiosis (**Symons & Bruce, 2006**). Cuando se lleva a cabo este paso se obtienen los isómeros 4-amino-2,6-dinitrotolueno (4-ADNT) y 2-amino-4,6-dinitrotolueno (2-ADNT). Una de las características de esta secuencia de reacciones, es que el segundo grupo nitrogenado no se reduce hasta que finaliza la reacción anterior, por lo cual el segundo paso está definido por la transformación de 4-ADNT y 2-ADNT a 2,4-diamino-6-nitrotolueno (DANT). La siguiente etapa es la reducción total del TNT, produciendo finalmente triaminotolueno (TAT). Esta reacción es catalizada por un conjunto de enzimas llamadas hidrogenasa, Piruvato: ferredoxin oxidoreductasa y monóxido de carbono dihidrogenasa, en presencia de un donador de electrones como el piruvato o el monóxido de carbono. La descripción de esta ruta metabólica es dada con claridad en el estudio realizado por **Preuss et al., (1993)**, donde

utilizaron bacterias sulfatoreductoras crecidas en un medio con sulfato y piruvato como fuente de energía y TNT como única fuente de nitrógeno.

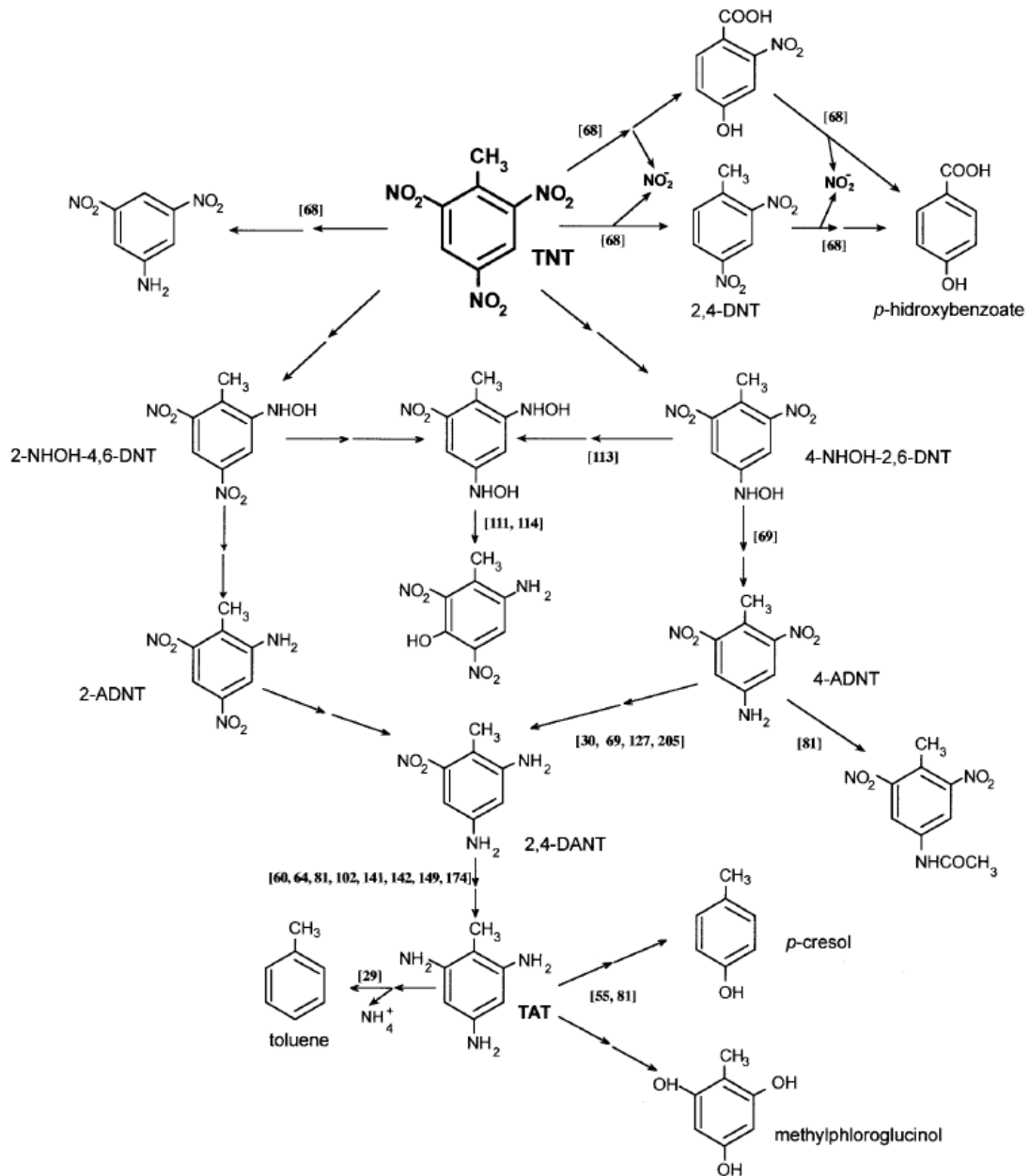
El anterior estudio, junto con otros realizados con *Clostridium* fermentativo han demostrado que también en condiciones anaerobias, se requiere fuente de carbono y poder reductor para mantener un suplemento constante de energía. Varias enzimas que degradan el TNT son inducibles y el TNT puede proveer energía (proceso de nitrorespiración) y/o N para el crecimiento microbiano, pero no como fuente de carbono (González-Pérez *et al.*, 2007; Caballero *et al.*, 2005). Se ha visto que tanto con el TNT (Stenuit *et al.*, 2006), como con ADNTs (Gorontzy *et al.* 1993), las reducciones pueden no ser específicas de los grupos nitro a sus correspondientes aminos por lo que los autores concluyeron que la reducción de los grupos nitro fue un mecanismo de detoxificación no específico para estos microorganismos.

Ederer *et al.*, (1997) probaron la degradación anaeróbica del TNT por enterobacterias (*E. coli* y *Salmonella entérica* serovar Typhimurium) y Lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, y *L.lactis*) encontrando que estas especies eran capaces de reducir el TNT pero no DANTs. Más recientemente, Esteve-Núñez *et al.*, (2001) y Esteve-Núñez & Ramos (1998), describieron diferentes mecanismos para la degradación anaeróbica de TNT, en estudios donde aislaron una *Pseudomonas* facultativa designada como la cepa JLR11, la cual es capaz de crecer en TNT como única fuente de N con glucosa como co - sustrato. Los ensayos de balance de masa con TNT revelan que cerca de 85% del nitrógeno total incorporado a la biomasa era del nitroaromático.

Hong-yan *et al.*, (2013) compararon las rutas metabólicas en anaerobiosis y aerobiosis de una cepa de *Bacillus mycooides*, encontrando que en los dos casos, los metabolitos 2ADNT y 4ADNT fueron los principales productos. Se observó que la biodegradación aerobia del TNT involucra la reducción de uno de los grupos nitro para formar el grupo hidroxilamino y la posterior reducción de otro grupo nitro a amino. En comparación, la biodegradación anaeróbica del TNT involucró la reducción de uno de los grupos nitro para formar hidroxilamino y la posterior reducción de los otros dos grupos nitro para formar dos grupos amino, por lo que se cree que finalmente se forma tolueno, aunque

este metabolito no fue identificado. La **Ilustración 1-5** muestra un esquema resumen de las reacciones anaeróbicas implicadas en el metabolismo bacteriano del TNT.

Ilustración 1-5. Esquema de las vías metabólicas para la biotransformación de TNT por bacterias en condiciones de anaerobiosis.



Tomado de Esteve-Núñez *et al.*, 2001

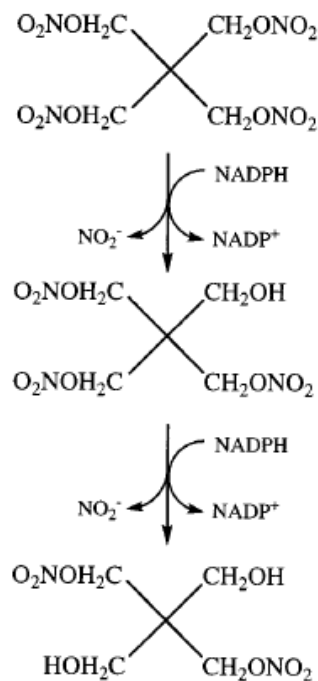
1.5 Biodegradación y biotransformación bacteriana de PETN

1.5.1 Biodegradación bacteriana aeróbica del PETN

La ruta metabólica más conocida de la degradación aerobia del PETN fue estudiada con el aislamiento de *Enterobacter cloacae* PB2, realizado por **Blinks et al. (1996)**. En esta investigación, se evidenció la presencia de bacterias con capacidad de utilizarlo como única fuente de nitrógeno en condiciones de aerobiosis. *E. cloacae* PB2 aparentemente elimina dos de los cuatro átomos de nitrógeno de cada molécula de PETN, produciendo pentaeritritol dinitrato, el cual puede llegar a ser oxidado hasta dialdehído. Este proceso de transformación de PETN fue atribuido a la actividad de una enzima de la familia de las OYE llamada PETN reductasa, la cual por medio de reacciones de reducción, libera nitrito a partir del PETN (**Ilustración 1-6**). En este estudio se comprobó que la PETN reductasa también actúa sobre el TNT.

Otra cepa reportada como degradadora aerobia de PETN es *Agrobacterium radiobacter*, obtenida a partir de investigaciones de **White et al., (1996)**. Esta cepa convirtió el GTN a glicerol dinitrato y glicerol mononitrato utilizando a este compuesto como única fuente de nitrógeno y carbono. A pesar que existen otros reportes de degradación microbiana de GNT en donde se demuestra la denitración secuencial de este compuesto hasta glicerol de forma eficiente como los de **White et al., (1996)** y **Meng et al., (1995)**, sólo con *Agrobacterium radiobacter* se probó este proceso con PETN, el cual fue empleado como fuente de nitrógeno, pero no como fuente de carbono.

Ilustración 1-6. Catálisis del PETN por la enzima PETN reductasa de *Enterobacter cloacae* PB2



Tomado de: Blinks *et al.*, 1996

1.5.2 Biodegradación bacteriana anaeróbica del PETN

Al igual que con el TNT el metabolismo anaeróbico en la degradación del PETN parece tener la ventajas potenciales de una rápida reducción a bajos potenciales redox, debido a la carencia de electrones de los grupos nitro de este compuesto, sin embargo, el único registro encontrado de la degradación de PETN en condiciones anaerobias fue realizado por **Zhuang (2007)**. En este, se lleva a cabo la biotransformación de PETN por consorcios bacterianos obtenidos por enriquecimiento a partir de suelos contaminados con este compuesto con la adición de nitrato y/o sulfato como aceptores de electrones y sin la adición de aceptores en presencia de acetato como fuente de carbono durante la respiración anaerobia. Se encontró que PETN fue degradado a una mayor tasa en presencia de nitrato y que la sola presencia de sulfato no ejercía efecto en la degradación. Se propuso que las bacterias denitrificantes eran las responsables de la degradación de PETN, ya que poseen nitrito reductasas capaces de emplear este

explosivo y a sus intermediarios como aceptores finales de electrones, aunque no hay evidencias prácticas de esta afirmación. Durante la degradación fueron detectados mono, di y trinitrato de pentaeritritol como productos intermediarios del proceso indicando así, que el PETN experimenta un proceso de denitración que genera la liberación de nitritos. A pesar que el estudio de **Zhuang (2007)** demuestra que el PENT puede ser biodegradado por bacterias denitrificantes, en presencia de una fuente de carbono adicional, a la fecha, la literatura a cerca del metabolismo de PETN es bastante limitada, por lo que realizar investigaciones en este tema se hace necesarios y relevantes para generar conclusiones basadas en un mayor número de observaciones al respecto.

2. Problema y Justificación

El empleo de explosivos en Colombia ha aumentado en los últimos años, no solo por su conocida aplicación con propósitos militares y de defensa, sino porque otras actividades económicas como construcción de túneles y carreteras, minería, perforaciones petroleras, construcción de presas, explotación de canteras y en estudios de prospección y efectos sísmicos han incrementado en el país. Lo anterior, sumado a la proliferación en el uso y comercio ilícito de sustancias explosivas por grupos al margen de la ley, ha generado un incremento de estos compuestos y sus residuos en el ambiente.

El TNT y el PETN, son empleados como agentes explosivos, siendo el primero uno de los explosivos más importantes debido a que detona con gran potencia y a que por su estabilidad es fácil de manipular. El PETN es menos empleado y por lo general se encuentra mezclado con otros explosivos. Estos dos compuestos, los cuales se ha encontrado pueden causar toxicidad, mutación, diversas patologías e incluso muerte en diversos organismos, así como perturbaciones en los ambientes, se encuentran ampliamente difundidos en los ecosistemas acuáticos y terrestres como resultado de su manufactura, uso, almacenamiento y disposición.

Debido a la importancia que ha cobrado este tema, se han realizado numerosas aproximaciones para la degradación de estos dos compuestos por métodos fisicoquímicos y biológicos. Dentro de las posibilidades de degradación de explosivos, se ha encontrado que el uso de microorganismos ha sido probablemente el más efectivo, aunque no en todos los casos la alternativa biológica es la mejor opción para la remediación de explosivos. Las investigaciones y metodologías desarrolladas han permitido aislar, identificar y emplear microorganismos con potencial degradador y a

partir de ellos, estudiar las reacciones bioquímicas que hacen posible la biotransformación e incluso la biodegradación de estos compuestos. Aunque hasta el momento, las rutas metabólicas de estos eventos no han sido caracterizadas en su totalidad.

Teniendo en cuenta lo anterior, el grupo de Biorremediación y Biodegradación de ambientes contaminados de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana, identificó la necesidad de profundizar acerca de este tema, convirtiéndose en el primer grupo en investigar acerca de la biodegradación de explosivos en nuestro país. Dado que el explosivo llamado Pentolita, el cual consiste en una mezcla de TNT y PETN (1:1), es uno de los más empleados en Colombia, pero la información existente acerca de la biodegradación de esta mezcla es escasa, se planteó estudiar el proceso de degradación de estos compuestos.

La mayoría de estudios de biodegradación tanto de la USBA como en otros grupos de investigación, se han realizado bajo condiciones aerobias, y en presencia de una fuente de carbono exógena ya sea con cepas puras o con cultivos de enriquecimiento. Sin embargo, se encontró que bajo estas condiciones, la degradación en conjunto del TNT y del PETN no se lleva a cabo, y que los cultivos de enriquecimiento pierden la capacidad degradadora con el tiempo. Además, hasta la fecha no se ha reportado la degradación de TNT o PETN sin la presencia de una fuente de carbono adicional.

El presente trabajo buscó evaluar el potencial de degradación anaeróbico de TNT y PETN por cultivos de enriquecimiento y cepas bacterianas, con y sin fuentes adicionales de carbono, con el ánimo de encontrar microorganismos más eficientes con respecto a aquellos reportados a la fecha, buscando de esta forma generar un aporte en esta área del conocimiento que permita la utilización de microorganismos para reducir su presencia en áreas impactadas con explosivos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar el potencial de degradación anaeróbica de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) y tetranitrato de pentaeritritol (PETN) en suelos impactados con explosivos

3.2 Objetivos Específicos

- Monitorear la degradación de TNT y PETN durante el establecimiento de cultivos de enriquecimiento anaeróbicos obtenidos a partir de tres suelos impactados con explosivos.
- Seleccionar e identificar a partir de los cultivos de enriquecimiento cepas capaces de degradar TNT y PETN bajo condiciones anaerobias.
- Evaluar la capacidad de los cultivos de enriquecimiento y las cepas seleccionadas de degradar TNT y PETN con y sin fuente de carbono.

4. Materiales y métodos

El estudio se realizó en el laboratorio de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana.

4.1 Materiales

- **Reactivos Químicos**

Los explosivos TNT y PETN empleados para realizar los ensayos de biodegradación fueron proporcionados por la Industria Militar de Colombia (INDUMIL). Para la preparación de estándares y para el análisis cromatográfico, se utilizaron los solventes acetonitrilo y acetona y estándares analíticos de TNT, PETN, 4-amino-2,6-dinitrotolueno, 2-amino-4,6-dinitrotolueno, 2,6-dinitrotolueno y 2,4-dinitrotolueno (AcccuStandard®) grado HPLC.

Para la preparación de la solución stock de TNT y PETN se pesaron los explosivos sólidos y se diluyeron en acetona. La solución stock consistía en la mezcla de los explosivos (1:1) con concentración de 20000 mg/L. A partir de esta solución se realizaron todos los ensayos, los cuales tenían una concentración final de 50 mg/L de cada explosivo. Para fijar la concentración final de los ensayos, y la preparación de la solución patrón se tuvo en cuenta que algunos estudios reportan que concentraciones de TNT y PETN por encima de 100 mg/L ejercen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los microorganismos con potencial degradador (**Gonnison et al., 1993**), e igualmente se tuvo en cuenta que la solubilidad del TNT en agua es de 120-130 mg/L a 20°C (**Sunahara et al., 2009; Esteve-Núñez et al., 2001**), y la del PETN que es de 43 mg/L a 25°C (**Sunahara et al., 2009**) y puede disminuir a valores entre 2-6 mg/L a 20°C (**Zhuan, 2007; Yinon, 1999**).

- **Muestras de suelo**

Las muestras de suelo se tomaron en una fábrica productora de explosivos ubicada en Bogotá, D.C. Se realizaron dos muestreos, el primero, en abril de 2011 y el segundo, en abril del año 2012. Se tomaron muestras en tres lugares que históricamente habían estado expuestos tanto al PETN como al TNT. Los lugares de muestreo se denominaron como:

- a) Campo de prueba (**CP**),
- b) Salida del canal de la planta de cristalización (**PC**) y
- c) Humedal artificial o fitorremediación (**F**).

La muestra tomada de CP correspondía a un suelo poroso con baja humedad y escasa cobertura vegetal, la muestra de PC era de un suelo con pasto como cobertura y más compacto debido a un mayor contenido de humedad sin estar completamente saturado. La muestra de F, correspondió a los lodos del humedal artificial en donde se realizaba la fitorremediación, estos tenían un alto contenido de humedad, raíces y restos vegetales. Sus características fisicoquímicas se muestran en la **Tabla 4-1**.

Tabla 4-1. Caracterización de las muestras de suelo provenientes de la planta de INDUMIL (Abril, 2011).

Muestra	pH	N (mg/Kg)		P (mg/Kg) Disponible	Material Orgánica		Explosivos (mg/Kg)		
		NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻		%C	%N	TNT	PETN	4amDNT
F	7,2±0,1	ND	360,0±24,1	2,5±0,2	11,2±0,3	0,5±0,01	8,3±14,3	6,3±10,9	9,6±8,3
PC	5,7±0,0	ND	309,0±33,5	44,7±2,0	5,3±0,1	1,1±0,03	ND	16.469,0±1343,2	83,4±9,0
CP	5,6±0,0	15,7±7,3	61,7±21,4	12,1±7,3	6,9±0,3	0,7±0,01	1,6±2,8	680,1±1125,7	5,93±10,27

ND: No detectado

Para el inóculo, se tomaron 5 sub-muestras de cada uno de los sitios de muestreo de la siguiente manera: se retiró los dos primeros centímetros de suelo que contenían pasto y raíces, y a continuación se enterró un tubo cilíndrico de plástico, previamente esterilizado para tomar un núcleo de suelo de 16 x4 cm. Obtenidas las sub-muestras, se taparon los extremos de cada tubo para disminuir la entrada de aire.

Adicionalmente, se tomaron en cada suelo, 2 muestras de aproximadamente 1 kg cada una, se colocaron en bolsas *ziplock*, las cuales fueron selladas y marcadas, para a partir de ellas llevar a cabo los análisis fisicoquímicos.

Todas las muestras se conservaron en refrigeración (aproximadamente 4°C) durante su transporte y almacenamiento hasta el análisis fisicoquímico, cuantificación de explosivos, o para su utilización como inóculo de los cultivos de enriquecimiento bajo condiciones de anaerobiosis.

4.2 Métodos

- **Extracción de explosivos**

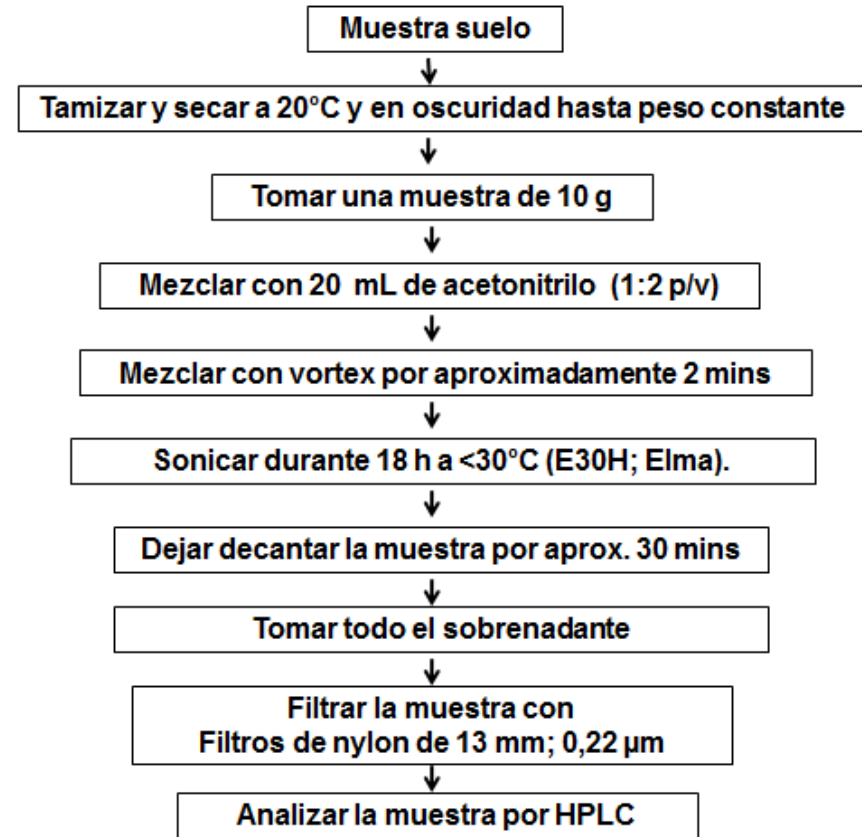
Las muestras a partir de las unidades experimentales a las que se les realizó la extracción para realizar el monitoreo de explosivos en el tiempo, contenían suelo mezclado con el medio de cultivo T2 (**Anexo 1**), por lo que presentaban dos fases. Sin embargo, los protocolos para extracción de explosivos dadas por la *Environmental protection agency* (USEPA) están establecidos ya sea para muestras líquidas o para muestras de suelo más no la mezcla de estos en donde se cuenta con las dos fases.

Aunque varios estudios, utilizan la extracción líquido/líquido para muestras con dos fases (**White et al., 1996; Krumholz et al., 1997; Boopathy et al., 1998a; In et al., 2008**) en los estudios anteriores realizados en USBA no se lograron obtener porcentajes aceptables de recuperación. Por este motivo, se decidió procesar las muestras de suelo y la fracción sólida de la mezcla con medio T2 de acuerdo al protocolo recomendado por la USEPA (2006) para muestras sólidas. Para la extracción de la fracción líquida obtenida por centrifugación se siguió el protocolo recomendado por la USEPA (2006) para muestras líquidas.

- a. **Metodología de extracción de explosivos en muestras de suelo**

Para la cuantificación de explosivos en muestras de suelo y la porción sólida de las muestras lodosas se utilizó el método 8330B (USEPA, 2006), como se describe en esquema de la **Ilustración 4-1**.

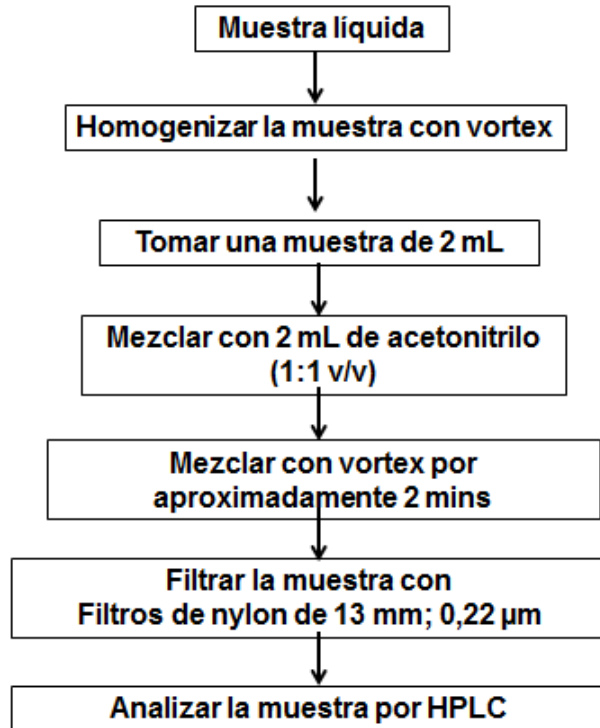
Ilustración 4-1. Protocolo empleado para la extracción de TNT y PETN a partir de muestras sólidas (USEPA, 2006)



b. Metodología de extracción de explosivos en muestras líquidas

Para la extracción de explosivos de la porción líquida de las muestras lodosas se utilizó el método 8330B para muestras acuosas (USEPA, 2006), con una modificación que consistió en tomar 2 mL de muestra en cambio de 5 mL. Esta modificación fue previamente validada en el laboratorio en el marco del proyecto “Diseño de un sistema con microorganismos degradadores de TNT y PETN incorporados en un explosivo comercial” (Roldán *et al.*, 2011). Para la extracción se siguieron los pasos que se muestran en la **Ilustración 4-2**.

Ilustración 4-2. Protocolo empleado para la extracción de TNT y PETN a partir de muestras líquidas (USEPA, 2006)



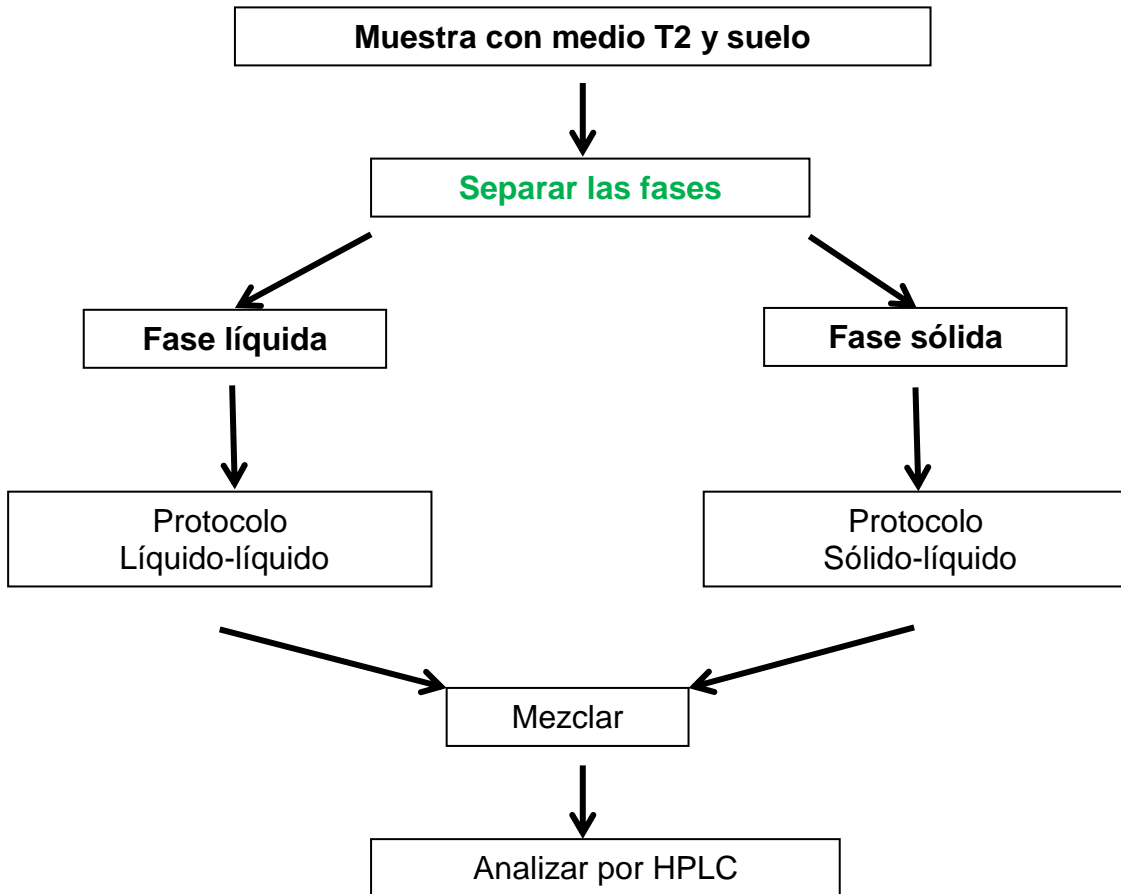
c. Metodología de extracción de explosivos en muestras con la mezcla de suelo y medio de cultivo T2

Teniendo en cuenta los bajos porcentajes de recuperación obtenidos en trabajos previos con muestras lodosas, es decir con dos fases (suelo mezclado con el medio de cultivo T2), se planteó la necesidad de optimizar el procedimiento de extracción de explosivos durante el seguimiento del proceso de degradación para obtener un mejor porcentaje de recuperación.

Para lograr esto, se realizó una nueva propuesta de extracción. Para esto se realizó un experimento que consistió en contaminar un suelo que nunca había estado en contacto con explosivos con la mezcla de TNT y PETN con concentraciones de 50 mg/L de cada explosivo, más caldo mineral T2. La mezcla se homogenizó con un vortex, y a continuación se procedió a realizar la extracción de los explosivos con dos protocolos: **1)** como si fuera una muestra líquida (extracción líquido-líquido), y **2)** haciendo la separación de la fracción sólida y líquida. Este experimento se realizó con seis muestras

(n=6). La **Ilustración 4-3** que se presenta a continuación describe la forma en la que se realizó la extracción de muestras con suelo y medio T2.

Ilustración 4-3. Nuevo protocolo propuesto para la extracción de TNT y PETN a partir de muestras con fase líquida y sólida



- **Cuantificación de explosivos**

La cuantificación de los explosivos en las muestras se realizó mediante Cromatografía líquida de Alta Eficiencia (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), utilizando un equipo Prominence 20A marca Shimadzu, acoplado a una columna Pinnacle DB C18 (Restec®) de 5 µm, 250 x 4,6 mm, y un detector de arreglo de diodos (UV 210 nm). Se siguió el método 8330B modificado (EPA, 2006).

Se construyeron las curvas de calibración utilizando estándares primarios de TNT, PETN, 4-amino-2,6-dinitrotolueno, 2-amino-4,6-dinitrotolueno, 2,6-dinitrotolueno y 2,4-dinitrotolueno, procedimiento que se hizo por triplicado. Se prepararon 5 estándares con las siguientes concentraciones: 5, 10, 50, 100, 150 mg/L. Para cada uno de los explosivos y metabolitos se determinó el coeficiente de determinación (R^2), así como los tiempos de retención para cada compuesto. Es importante mencionar que con los protocolos empleados, no se pudo separar los isómeros de los metabolitos, por esta razón en este documento solo se presentan las concentraciones de los compuestos aminodinitrotolueno (ADNT) y dinitrotolueno (DNT), sin hacer diferenciación de sus isómeros (**Anexo B**).

Inicialmente, se utilizó un flujo de 1,2 mL/min y una fase móvil metanol:agua (50:50). Posteriormente, se mantuvo el mismo flujo pero se cambió la fase móvil a acetonitrilo:agua (60:40) con temperatura de 40°C rampa de 7.5 min para la separación del PETN y finalmente se trabajó con un flujo de 1,5 mL/min.

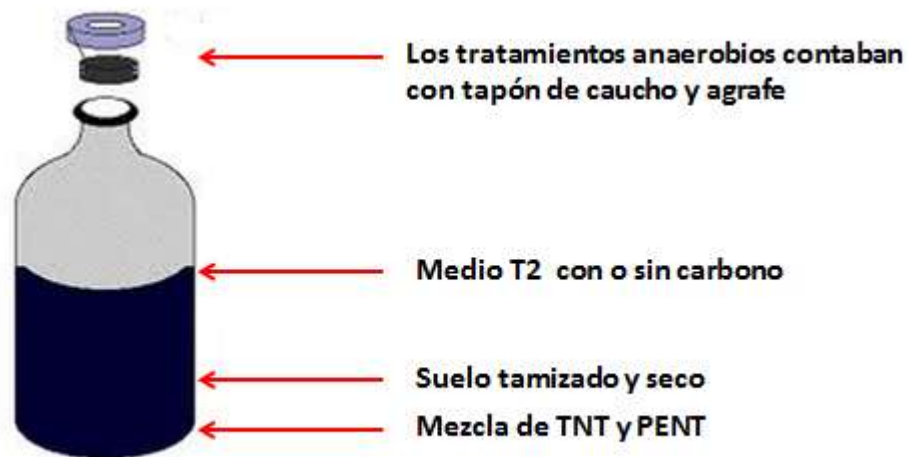
4.3 Metodología para la evaluación de la degradación de TNT y PETN

- **Descripción y montaje de las Unidades experimentales (UEs)**

Los ensayos de biodegradación se realizaron utilizando botellas de diferentes tamaños de acuerdo al experimento que se estuviera llevando a cabo. Las botellas se esterilizaron (121°C, 15 psi por 15 mins) y luego fueron purgadas con acetona.

A partir de la solución Stock de 20000 mg/L de la mezcla de TNT y PETN (1:1) se tomó la cantidad necesaria de explosivos para garantizar la concentración deseada de acuerdo al volumen final para cada experimento y se aplicó al fondo de la botella de vidrio. Esta se dejó en la cabina de flujo laminar hasta que el solvente (acetona) se evaporara (Aproximadamente 30 mins). Posteriormente, se adicionó el suelo y el volumen requerido de medio T2 de acuerdo a cada tratamiento y montaje, como se muestra en el siguiente diagrama de la **Ilustración 4-4**

Ilustración 4-4. Descripción del montaje y Unidades experimentales empeladas durante el estudio.



- **Selección de la metodología de muestreo durante el proceso de biodegradación**

Dado que los explosivos TNT y PETN no se distribuyen homogéneamente en el medio T2 y el suelo y que existe la necesidad de obtener resultados reales sobre la concentración de ellos en las muestras tomadas durante la biodegradación, se realizó un experimento para determinar si existía o no mayor precisión al tomar una alícuota del sistema (**Método B**), o montar para cada tiempo de muestreo una unidad experimental que se sacrificaría para realizar la extracción y cuantificación de los explosivos (**Método A**).

Para hacer esta comparación, se emplearon dos sets de 6 botellas de 50 mL en las que se colocó 1 g de suelo que nunca había estado en contacto con explosivo y se contaminó con una solución de concentración de 50 mg/L de cada explosivo y 10 mL de medio T2. Se realizó la mezcla por vortex de cada una de las botellas y se procedió de la siguiente manera.

Para el primer grupo de botellas (**Método A o Método por Sacrificio**) se realizó la extracción separando las fases de todo el contenido de la botella, es decir sacrificando toda la unidad experimental. Para el segundo grupo (**Método B o Método de alícuota**),

se tomaron 2 mL de muestra y a continuación se realizó la extracción, también separando las fases como se explicó anteriormente. Los extractos de los dos grupos de muestras se cuantificaron por HPLC.

4.4 Comparación de la degradación de TNT y PETN en condiciones de Anaerobiosis y Aerobiosis.

Esta comparación se llevó a cabo con las muestras colectadas en los tres sitios tanto en el 2011 como con las muestras del 2012, realizando dos ensayos complementarios. El ensayo preliminar con las muestras colectadas en 2011, cuya metodología y resultados se resumen en el **ANEXO C**, mostró una alta variabilidad entre réplicas por lo que se realizaron ajustes que permitieron concretar las condiciones para realizar un segundo ensayo más robusto en el cual se implementó el sistema de toma de muestras por sacrificio para el monitoreo de degradación de los explosivos descrito anteriormente empleando las muestras del 2012.

Este montaje se realizó empleando medio T2 suplementado con fuentes de carbono, se monitoreó la concentración durante 25 días y las unidades experimentales se incubaron a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) y en oscuridad. Los controles abióticos consistieron en suelo esterilizado durante tres días seguidos a 121°C, 15 psi por 20 mins, a los cuales se aplicó la solución de explosivos luego de su esterilización, puesto que si se realizaba antes el calor y la presión podían ocasionar la degradación de los explosivos.

Se unificó el volumen de los recipientes de las unidades experimentales (120 mL), la cantidad de suelo (20 g) y el volumen final fue de 80 mL. En total se montaron 216 botellas, de los cuales 72 correspondían al tratamiento aeróbico, 72 al tratamiento anaeróbico y 72 a controles abióticos. De las 72 botellas 24 correspondían a cada suelo y se sacrificaban 3 para cada tiempo de muestreo (0 h, 12 h, 1 d, 2 d, 5 d, 10 d, 15 d y 25 d).

Las muestras obtenidas en fueron analizadas por HPLC para cuantificar la concentración de TNT y PETN así como algunos de los posibles productos de degradación del TNT.

4.5 Obtención de cultivos de enriquecimiento anaerobios con capacidad degradadora de TNT y PETN.

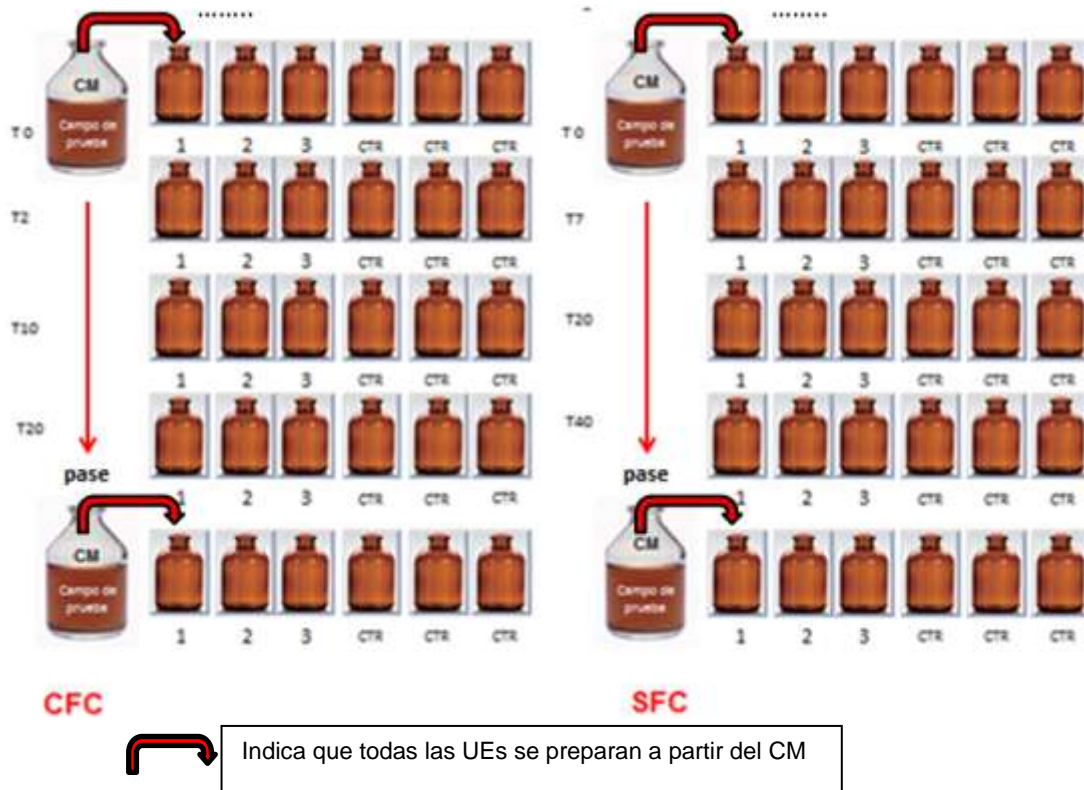
Para el diseño de este experimento se contó con un Cultivo madre (CM) de cada uno de los tratamientos, el cual consistía en muestra de suelo (20 g) y medio T2 con o sin fuentes de carbono hasta un volumen de 80 mL, preparados en botellas color ambar de 120mL, a las cuales habían sido adicionada la mezcla de TNT y PETN con concentración final de 50mg/L de cada uno. A partir de los Cultivos Madre, se realizaron los pases y se prepararon nuevas Unidades Experimentales que serían descartadas en cada tiempo de muestreo.

Cada una de las nuevas Unidades experimentales empleadas en este experimento consistió en un frasco de vidrio con capacidad de 8 mL con 1 g de suelo y 4 mL de medio T2 preparados de acuerdo al protocolo descrito previamente. Para cada uno de los tres suelos se montaron los tratamientos denominados: con fuente de carbono (CFC), sin fuente de carbono (SFC) y sus respectivos controles abióticos (n=3).

Para garantizar una atmósfera anaerobia el medio de cultivo se calentó hasta ebullición para eliminar el oxígeno y se sirvió en cada una de las Unidades Experimentales, ya suplementadas con los explosivos, bajo flujo de nitrógeno gaseoso. Finalmente se tapó cada botella con tapón de caucho y se le colocó agrafe. Durante el experimento todas las UEs y los CMs se dejaron en reposo (sin agitación), en oscuridad y a temperatura ambiente ($22,0 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Para realizar el enriquecimiento, se tomaron 20 mL del CM anterior acuerdo al tratamiento y se llevaron a 80 mL de medio T2 fresco con explosivos. Este procedimiento se denominó *pase*. Se realizaron pases sucesivos cada 20 días para los tratamientos CFC y cada 40 días en los tratamientos SFC. Como se mencionó anteriormente, a partir del cada set de nuevos CM establecidos con cada pase, se realizó la inoculación de las correspondientes Unidades Experimentales. **La ilustración 4-5** describe el montaje realizado para cada pase dando como ejemplo el suelo CP.

Ilustración 4-5. Diseño experimental empleado para el monitoreo de los cultivos de enriquecimiento anaerobios degradadores de TNT y PETN



La evaluación de la degradación de PETN y TNT en los cultivos de enriquecimiento después de cada pase se realizó por ensayos de descarte, utilizando los CM del pase anterior como inoculo: para eso 1 mL del cultivo de cada CM anterior se inoculo en 4 mL de medio T2 fresco con explosivos, con y sin fuente de carbono según el tratamiento del CM. En cada evento de muestreo (0, 2, 10 y 20 días para los tratamientos CFC y en los 0, 7, 20 y 40 días para los tratamientos SFC) se sacrificaron 3 UEs para la cuantificación de explosivos y algunos de los productos de la degradación del TNT.

Para los tratamientos CFC y SFC se monitorearon el cultivo original y 5 pases sucesivos conservando las concentraciones iniciales de los dos explosivos. Además, para evidenciar el efecto de la concentración inicial de explosivos sobre la degradación, así como la eficiencia de las metodologías analíticas empleadas para su cuantificación, se monitoreó el séptimo y el quinto pase en los tratamientos CFC y SFC respectivamente,

adicionando el doble de concentración de la mezcla inicial de explosivos (100 mg/L de cada uno), para un total de 7 monitoreos tanto para los tratamientos CFC como SFC, incluyendo el cultivo original

4.6 Evaluación de la degradación de TNT y PETN por bacterias anaerobias

4.6.1 Siembra de bacterias anaerobias degradadoras

Se obtuvieron bacterias anaerobias potencialmente degradadoras de TNT y PETN a partir de los cultivos de enriquecimientos de los 3 suelos, con y sin fuente de carbono en dos momentos:

- A)** Antes del primer pase, es decir a los 20 y 40 d después del inicio del enriquecimiento para CFC y SFC, respectivamente.
- B)** Después del quinto pase, tanto para los tratamientos CFC (100 d) y SFC (200 d).

Se realizaron diluciones seriadas en base diez (10^{-1} a 10^{-6}) en solución salina al 0,85% p/v de cada muestra, utilizando la metodología estandarizada en USBA por Latorre (2007). Se sembraron las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} en agar T2 suplementado con la mezcla de explosivos (n=2).

Las siembras se realizaron tanto en anaerobiosis como en aerobiosis, encontrando que los microorganismos obtenidos eran en su totalidad anaerobios facultativos ya que mostraron crecimiento bajo las dos condiciones. Sin embargo, todas las pruebas se realizaron en anaerobiosis.

Para favorecer el crecimiento de las siembras se aumentó la temperatura de incubación a $30,0 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ manteniendo las cajas de Petri en jarras de anaerobiosis con Anaerocult®, durante 14 días para realizar la selección de las colonias representativas de los diferentes morfotipos. Se tomó registro fotográfico de los aislamientos con ayuda de un estereoscopio para la descripción macroscópica de cada cepa y se realizó la coloración de Gram para evidenciar clasificación de acuerdo a la tinción de Gram, morfología y pureza.

4.6.2 Obtención de biomasa para las pruebas de degradación

A continuación se describen las condiciones de incubación establecidas para la obtención de biomasa necesaria para llevar a cabo la evaluación de la capacidad degradadora: 1) siembra masiva de cada cepa en agar T2, CFC o SFC, según el origen de la cepa, suplementado con la mezcla de PETN y TNT. Las cajas de Petri fueron incubadas por 2 semanas en oscuridad a 30 °C en jarras de anaerobiosis utilizando Anaerocult®. 2) Realización de los pre-inóculos tomando varias asadas de las siembras masivas y resuspendiendo en 5 mL de medio T2 con explosivos y N₂ para generar atmósfera anaerobia. 3) Realización de inóculos tomando una alícuota de 3 mL de cada pre-inoculo en 30 mL de medio T2 con explosivos. 4) Finalmente se centrifugaron las células (10,000 rpm por 15 mins), se descartó el sobrenadante y se lavaron con solución salina 0,85% centrifugándolas nuevamente en las mismas condiciones. El pellet obtenido fue resuspendido en la cantidad necesaria de medio T2 ajustando la absorbancia a una densidad óptica (DO) de $0,125 \pm 0,012$ (λ 600 nm). Usando estos inóculos se realizaron las pruebas de degradación.

4.6.3 Evaluación de la capacidad degradadora de las bacterias obtenidas

La degradación de TNT y PETN en condiciones de anaerobiosis por cada una de los aislamientos, fue evaluada por la metodología previamente descrita de muestreo por sacrificio (n=3), a partir una concentración de 50 mg/L de cada uno de los explosivos, empleando como UEs frascos de vidrio que contenían 4,5 mL de medio T2 y 0,5 mL de inóculo (DO $0,125 \pm 0,012$ (λ 600 nm)). Cada UE fue suplementada con N₂ y homogenizada con vortex para generar condiciones de anaerobiosis. En cada evento de muestreo (0 h, 6 h, 1 d, 2 d, 5 d, 10 d, 14 d) se midió la DO a 600 nm, así como concentración de nitritos empleando el reactivo de Griess, de acuerdo al protocolo estandarizado en USBA por **Tamayo & Torres (2011)**, y la concentración de TNT, PETN y algunos de sus subproductos de degradación siguiendo el protocolo 8330B modificado (**EPA, 2006**).

4.7 Afiliación filogenética de las cepas

Las cepas que presentaron la mayor degradación de TNT y PETN, se les determinó la secuencia del gen 16S rRNA para su afiliación taxonómica.

4.7.1 Extracción y purificación de ADN

La extracción de ADN a partir de cepa pura se llevó a cabo utilizando un método enzimático (**Andrews & Patel, 1996**). Se tomó una colonia aislada de cada cepa, se inoculó en 10 mL de caldo nutritivo y se dejó crecer por 2 días a temperatura ambiente y en agitación. La biomasa fue lavada dos veces con solución salina al 0,85% y posteriormente se concentró centrifugando a 10.000 rpm por 15 min para luego ser resuspendida en 487 μ L tampón de TE (Tris-Cl 25 mM - pH 8.0, EDTA 10 mM, sacarosa 10%) y 15 μ L de lizosima (50 mg/mL) e incubada a 37°C por 1 hora. Posteriormente, se le adicionaron 30 μ L de SDS (10%) junto con 30 μ L de Proteinasa K (20 mg/mL) y la biomasa fue incubada nuevamente durante 1 hora a 50°C, para lisar las células.

Posteriormente, para purificar el DNA, se adicionó NaCl 5M (100 μ L), se homogenizaron las muestras mediante vortex (Maxi Mix II; Thermolyne), se añadieron 80 μ L de CTAB/NaCl (10%/0,7M) y se incubó esta mezcla por 10 mins a 65°C. Luego se adicionaron 750 μ L de Cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó vigorosamente la mezcla y se centrifugó por 15 mins a 13.000 rpm. Se tomó el sobrenadante, se mezcló con 750 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó nuevamente por 15 mins a 13.000 rpm. El sobrenadante obtenido fue transferido a un eppendorf, se mezcló con 450 μ L de Isopropanol, se dejó en nevera durante al menos 30 mins y se centrifugó (15 mins a 13.000 rpm) para precipitar el DNA. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 200 μ L de Etanol al 70%. Las muestras fueron centrifugadas nuevamente, se retiró el etanol sobrenadante y el tubo con el pellet se dejó invertido a temperatura ambiente por 3 h, con el fin de permitir la evaporación completa del etanol sobrante. El DNA fue resuspendido en 50 μ L de solución tampón TE (Tris-Cl 10 mM - pH 8.0, EDTA 1mM - pH 8.0) estéril y almacenado a -20°C hasta su uso.

El producto de extracción fue examinado en un gel de agarosa (1% p/v) con SYBR® Safe (Invitrogen®) en un transiluminador (Gel Doc™ XR+System; BioRad) usando luz

ultravioleta. La corrida se realizó por 60 mins a 80V. Se utilizó como marcador de peso molecular HyperLadder IV (BIO-37045; Bionline).

4.7.2 Amplificación del gen 16s rRNA

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés polymerase chain reaction) utilizando los iniciadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3').

La reacción PCR se realizó en un volumen final de 70 µL que contenía: Go taq® Flexi buffer green (1X), MgCl₂ (3 mM), dNTP's (0,2 mM), iniciador universal (0,5 mM c/u), Taq DNA polimerasa (2,5 U) (GoTaq Flexi DNA polimerase; Promega) y 2 µL ADN molde. La reacción fue realizada en un termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, BioRad) utilizando el siguiente programa de PCR: denaturación por 3 min a 95°C; luego 30 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 40 s y 72°C por 1 min, y la fase de extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa (1,5% p/v) en TAE (Tris-Cl, Acetato, EDTA) 0.5 X teñido con SYBR® Safe (Invitrogen) para visualizar las bandas de ADN. La corrida se realizó durante 40 mins a 100 V. Se utilizó como marcador de peso molecular HyperLadder IV (BIO-33025; Bionline).

4.7.3 Secuenciación de los productos de PCR y análisis bioinformáticos

La purificación y secuenciación de los productos de PCR se realizó en Macrogen (Seúl, Corea del Sur). Los electroferogramas recibidos fueron editados y analizados utilizando el software *CLC Main Workbench V 6.1* ®.

Utilizando el programa *Blastn* (del inglés *National Center for Biotechnology Information*) (Altschul *et al.*, 1990), se realizó la comparación de las secuencias editadas con la base de datos RDP (del inglés *Ribosomal Database Project*, V.10) que contiene secuencias del gen 16S rRNA de bacterias, seleccionando las cepas de referencia que presentaban el mayor porcentaje de identidad de acuerdo a los parámetros *e value* y *max score* con las secuencias analizadas para realizar la afiliación filogenética de las cepas degradadoras.

Para la construcción de los dendogramas se realizó un alineamiento múltiple empleando el algoritmo *muscle* y posteriormente se realizó el agrupamiento por el método *neighbor joining*. A partir de las matrices de distancias generadas se realizaron los gráficos de los dendogramas con ayuda del software *Jalview* (Waterhouse et al., 2009)

Inicialmente, se realizó un dendograma por cada una de las secuencias de las cepas encontradas junto con las secuencias que presentaron porcentajes de identidad entre el 97 y el 99% a cada secuencia. De cada dendograma se seleccionaron las secuencias de las cepas tipo que dentro de las analizadas mostraban una mayor cercanía en los dendogramas con la cepa degradadora. Posteriormente se construyó un dendograma con todas las secuencias de las cepas degradadoras como con las cepas tipo seleccionadas por estar altamente relacionadas con las encontradas en este estudio, de esta forma fue posible establecer la relación de cercanía entre todas las cepas obtenidas durante el estudio. Se tomaron como grupos externos *Bacillus sp.* y *Streptomyces sp.*

4.8 Análisis de datos

Para evaluar la técnica de extracción de explosivos en matrices lodosas y la selección de la metodología de muestreo se tuvo en cuenta la desviación estándar, el coeficiente de variación y el porcentaje de recuperación (% recuperación)

Se realizaron análisis para determinar si los datos obtenidos en los experimentos en anaerobiosis y aerobiosis, el establecimiento de los cultivos de enriquecimiento, así como los aislamientos y los consorcios, presentaban una distribución normal y homocedasticidad, empleando las pruebas Shapiro Wilks y Levene ($p < 0,09$)

Posteriormente, para determinar si existían diferencias significativas en las concentraciones de explosivos en el tiempo y entre los suelos durante la evaluación de la degradación de TNT y PETN en condiciones anaerobias vs aerobias, se realizaron Análisis de varianza, análisis multifactoriales y pruebas de comparaciones múltiples de Sheffe.

En tanto que para los datos obtenidos durante el establecimiento de los cultivos de enriquecimiento se realizó un análisis factorial para determinar el efecto del suelo, los

pases, el tratamiento (con carbono, sin carbono y control abiótico) y el tiempo en la degradación de explosivos. Y finalmente, para determinar diferencias en la degradación de explosivos por las cepas y los consorcios estudiados se realizaron ANOVAs y pruebas de *Sheffe*.

Los programas estadísticos empleados fueron Statgraphic (**Versión 10.0**) y SPSS® (Versión 18.0). Las gráficas del comportamiento de los explosivos se realizaron en Sigmaplot (Versión 11.0).

5.Resultados

5.1 Metodología de extracción de explosivos en muestras con la mezcla de suelo y medio de cultivo T2

Teniendo en cuenta que las muestras a partir de las cuales se realizó el monitoreo de la degradación de los explosivos, contenían suelo mezclado con medio de cultivo T2, por lo que presentaban dos fases que les daba características lodosas, y que al ser estas matrices lodosas analizadas como si fueran muestras líquidas se venían presentando bajos porcentajes de recuperación de los explosivos y altas desviaciones estándar, se procedió a sugerir una nueva metodología de extracción de TNT y PETN a partir de muestras de tipo lodoso separando la fase de suelo y la fase de medio T2..

Los resultados obtenidos al emplear la nueva metodología de separación de fases y compararla con la metodología líquido-líquido se presentan en la **(Tabla 5-1)**. Como se puede observar, el porcentaje de recuperación (% R) para muestras con alto contenido de agua (lodo) es más alto cuando la extracción de los explosivos se realiza separando previamente cada fracción que cuando se hace procesando la muestra completa como si fuera una muestra líquida. De acuerdo a lo recomendado por la USEPA (2006), el porcentaje de recuperación deberá estar comprendido entre 70-130%, lo cual implica que los valores obtenidos se encuentran dentro de este rango. El % de recuperación de TNT superior al 100%, está relacionado con variaciones propias de la técnica de medición por HPLC y a la heterogeneidad de la matriz de suelo en las muestras.

Tabla 5-1. Resultados obtenidos al realizar la extracción de explosivos sobre muestras lodosas completas y separando las fracciones. La concentración de TNT y PETN fue de 50 mg/L. (n = 6)

TNT			
Método de extracción	Promedio (mg/L)	5 Coeficiente de variación	%Recuperación
Líquido- líquido	24,27 ± 4,88	20,10	48,55
Fracciones Separadas	53,27 ± 5,62	10,55	106,54
PETN			
Método de extracción	Promedio (mg/L)	Coeficiente de variación	%Recuperación
Líquido- líquido	40,68 ± 7,18	17,64	81,35
Fracciones Separadas	45,71 ± 13,21	28,89	91,41

5.2 Selección de la metodología de muestreo durante el proceso de biodegradación.

Como se especificó los explosivos TNT y PETN no se distribuyen homogéneamente en el medio T2 y el suelo y que existía la necesidad de obtener resultados reales sobre la concentración de ellos en las muestras tomadas durante la biodegradación, se comparó la precisión en las concentraciones obtenidas al tomar una alícuota del sistema o montar para cada tiempo de muestreo una unidad experimental que se sacrificaría para realizar la extracción y cuantificación de los explosivos (**Método por sacrificio**). Los resultados del porcentaje de recuperación de los explosivos se presentan en la **tabla 5-2**

Tabla 5-2. Resultados obtenidos al probar dos metodologías de muestreo con concentraciones iniciales de 50 mg/L de TNT y 50 mg/L PETN

TNT			
Método	Promedio (mg/L)	Coeficiente de variación	%Recuperación
Alícuota	40,0 ± 3,50	8,75	80,0
Sacrificio	25,0 ± 4.34	17,36	50,0
PETN			
	Promedio (mg/L)	Coeficiente de variación	%Recuperación
Alícuota	45,70 ± 9,70	21,22	91,4
Sacrificio	40,65 ± 11,65	28,65	81,3

Con base en estos resultados se seleccionó la metodología de sacrificio de la Unidad experimental para hacer el seguimiento de la degradación de los explosivos en el tiempo, pues este presentó el mayor porcentaje de recuperación (exactitud) y el menos coeficiente de variación (precisión), para los dos explosivos.

5.3 Comparación de la degradación de TNT y PETN en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis

Se realizaron dos comparaciones entre la degradación de TNT y PETN en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, una preliminar (**Anexo C**), que sirvió para estandarizar las condiciones para realizar un segundo experimento más robusto que permitiera confirmar las tendencias observadas en el ensayo preliminar.

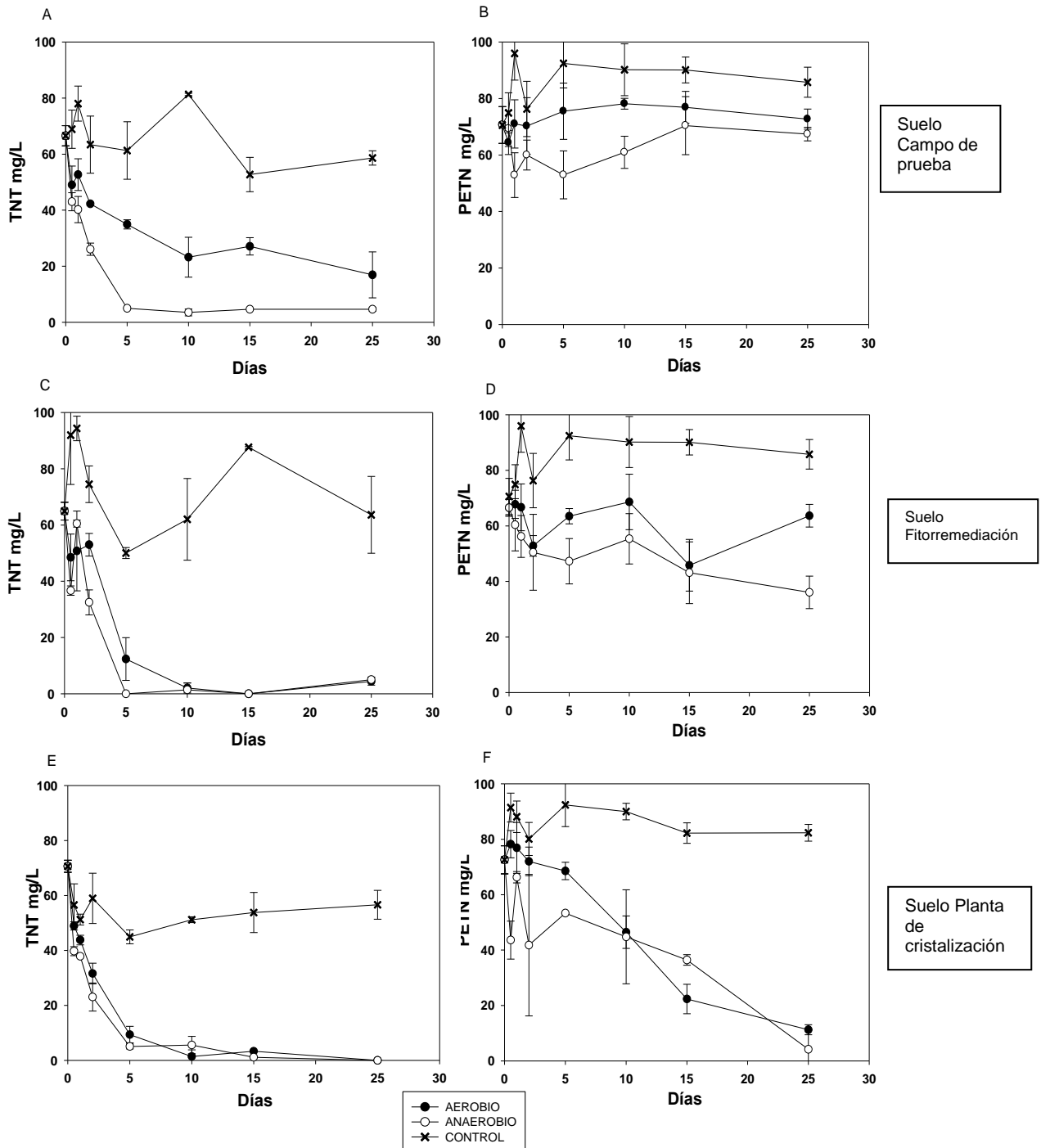
Esta segunda comparación se realizó siempre en medio con presencia de carbono (**Ilustración 5-1**). Así como se pudo observar en el ensayo preliminar, en este nuevo ensayo se corroboró en los tres suelos la tendencia tanto de TNT como de PETN a degradarse más rápido en condiciones anaerobias, comportamiento que se observa mejor al inicio del monitoreo.

Sólo en el suelo CP se encontraron diferencias significativas durante todo el tiempo de monitoreo entre los tratamientos aerobios y anaerobios, determinando que en CP las condiciones anaerobias favorecieron la degradación de TNT (**Ilustración 5-1A**) respecto a las condiciones aerobias, a pesar que en los dos casos se presentó degradación ($p < 0,05$). Lo mismo sucedió en este suelo respecto a la degradación de PETN (**Ilustración 5-1B**), durante los primeros 10 días de monitoreo, posteriormente no se observaron diferencias en la degradación del PETN entre las dos condiciones.

En el suelo F también se observó degradación en condiciones aerobias y anaerobias tanto de TNT como de PETN, pues se encontraron diferencias significativas de los tratamientos respecto al control abiótico ($p < 0,05$). A pesar que se no presentaron diferencias entre los tratamientos aerobio y anaerobio respecto a la degradación de TNT (**Ilustración 5-1C**) o PETN (**Ilustración 5-1D**), si fue posible observar la tendencia de los tratamientos anaerobios a favorecer la degradación de los dos explosivos respecto a

los tratamientos aerobios. El suelo PC mostró un comportamiento similar al de F en la degradación de TNT (Ilustración 5-1E) y de PETN (Ilustración 5-1F).

Ilustración 5-1. Degradación de TNT y PETN en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis en los tres suelos evaluados



El comportamiento de PETN en este experimento fue diferente al observado en el experimento previo, ya que en este en todos los suelos se presentó una disminución significativa de PETN, en tanto que durante el segundo experimento, sólo en el suelo PC se observó una disminución importante de este explosivo. Lo anterior pudo estar relacionado a la que las muestras de suelo empleadas en los experimentos fueron diferentes y por lo tanto el *pool* microbiano presente en los mismos.

Fue posible encontrar diferencias significativas ($p < 0,05$) en la degradación de los dos explosivos siendo en general, mayor la degradación de TNT respecto a PETN. Así mismo se observaron diferencias entre los tres suelos evaluados ($p < 0,05$), respecto a la degradación de PETN y TNT, siendo el suelo PC en el cual se observó la mayor degradación de los dos explosivos bajo las dos condiciones, seguido del suelo F en el cual se observa claramente que la anaerobiosis favoreció la degradación de los dos explosivos, especialmente de PETN respecto a la aerobiosis, mientras que la menor degradación se observó en general en el suelo CP, en el cual sólo se presentó degradación significativa de TNT, siendo mayor en anaerobiosis que en aerobiosis.

Se obtuvieron porcentajes de degradación de los dos explosivos en los tres suelos bajo las dos condiciones como se muestra en la **tabla 5-3**, en la que se resume bajo cuáles condiciones se presentó una mayor degradación. Sin embargo los porcentajes de degradación, no son lo suficientemente informativos, pues sólo muestran un dato puntual de degradación y no permiten observar el proceso de degradación de forma detallada, a diferencia de la **Ilustración 5-1**.

Tabla 5-3. Porcentajes de degradación de TNT y PETN en condiciones anaerobias y anaerobias

SUELO	TNT			PETN		
	ANAROBIO	AEROBIO	CONTROL	ANAROBIO	AEROBIO	CONTROL
CP	93,0	74,6	11,9	4,5	-3,0	-21,5
F	92,3	91,2	2,0	45,8	4,3	-52,7
PC	100,0	100,0	19,8	94,2	84,5	-13,4

Se observó una variación relativamente alta, especialmente en los controles abióticos que fueron los que presentaban mayores concentraciones de los dos explosivos, lo cual fue atribuido a errores analíticos del método de cuantificación, por lo que para los ensayos posteriores se cambiaron las condiciones de corrida del HPLC buscando minimizar errores de lectura.

5.4 Establecimiento de cultivos de enriquecimiento anaerobios con capacidad degradadora de TNT y PETN

Durante el establecimiento de los cultivos de enriquecimiento, fue posible observar que en los tratamientos CFC (**Ilustraciones 5-2, 5-3 y 5-4**), tanto TNT como PETN se degradaron de forma constante pase tras pase, sin que los cultivos perdieran la capacidad de degradación de ninguno de los dos explosivos en el tiempo. Adicionalmente, se observó la tendencia a que la mayor disminución en la concentración de los explosivos se presentaba durante los primeros 2 días seguida de una disminución más lenta con el tiempo, independiente de la muestra de origen (CP, F o PC). A excepción del primer pase para TNT, los controles abióticos no mostraron disminución significativa de estos explosivos en el tiempo ($p < 0,05$)

Por otro lado, no se observó un aumento considerable en la tasa de degradación de los explosivos a medida que se realizaron los pases, siendo el primer pase en el que PETN, se degradó en mayor proporción. De igual forma, en este mismo pase se observó la mayor degradación de TNT, aunque como se mencionó, en este caso la concentración de TNT disminuyó también en el control abiótico y este primer pase para TNT no fue concluyente.

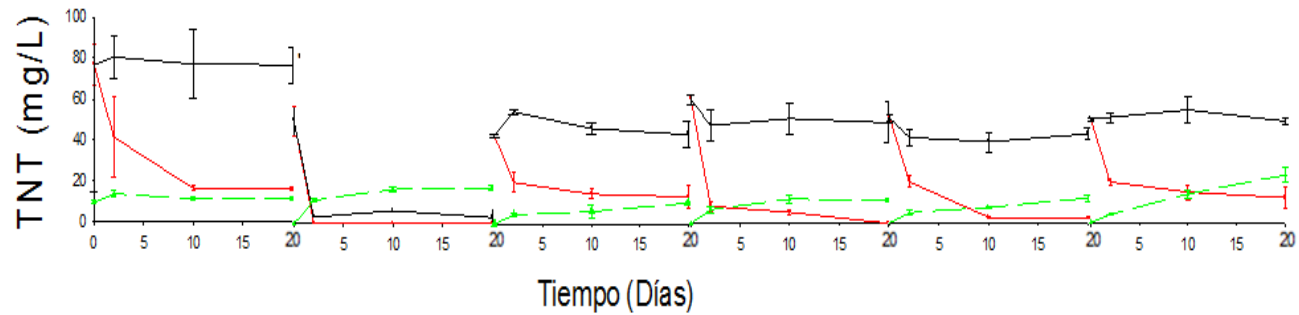
Con relación a los tratamientos SFC (**Ilustraciones 5-5, 5-6 y 5-7**), se observó que en los dos primeros pases se presentó degradación tanto de TNT como de PETN en todos los cultivos de enriquecimiento (CP, F y PC), siendo esta mayor durante los primeros días. Sin embargo, a partir del tercer pase, ya no se observó degradación de TNT ($p < 0,05$). En tanto, el PETN continuó disminuyendo en los pases 3 al 5, aunque en menor proporción que en los primeros dos pases.

Las concentraciones iniciales de PETN en los tres suelos evaluados, fueron siempre superiores que las encontradas para TNT, pues además a las concentraciones de explosivo que se adicionaban durante los experimentos, estos suelos ya se encontraban contaminados con estos explosivos. El suelo PC, presentó la mayor concentración inicial de PETN, mientras que el suelo F presentó las mayores concentraciones iniciales de TNT. Sin embargo, estadísticamente, la mayor degradación de PETN, en el tiempo se presentó en el suelo F, en tanto que la mayor degradación de TNT en el tiempo se presentó en el suelo PC. Lo anterior podría dar indicios de que en el suelo PC se presenta una mayor concentración de PETN al mismo tiempo que el TNT se degrada de forma más veloz, debido al potencial de degradación del *pool* microbiano presente en este suelo que contaría con los microorganismos y por lo tanto, las enzimas que hacen posible una mayor degradación de TNT pero no para PETN y viceversa con el suelo F.

Las comparaciones se realizaron siempre con los tres suelos seleccionados, ya que se buscaba obtener microorganismos degradadores a partir de suelos con características fisicoquímicas diferentes, al mismo tiempo que se buscaba poder realizar generalizaciones acerca de los procesos de biodegradación de TNT y PETN por bacterias anaerobias independientemente del origen de los microorganismos, observando que en general, tanto la degradación de PETN como de TNT presenta un patrón de degradación en el tiempo similar independiente del suelo de origen y que a partir de los tres suelos es posible obtener microorganismos degradadores de los dos explosivos.

Ilustración 5-2. Monitoreo de la degradación de TNT y PETN en presencia de carbono durante el establecimiento del cultivo de enriquecimiento a partir del suelo campo de prueba (CP)

TNT CAMPO DE PRUEBA CON FUENTE DE CARBONO



PETN CAMPO DE PRUEBA CON FUENTE DE CARBONO

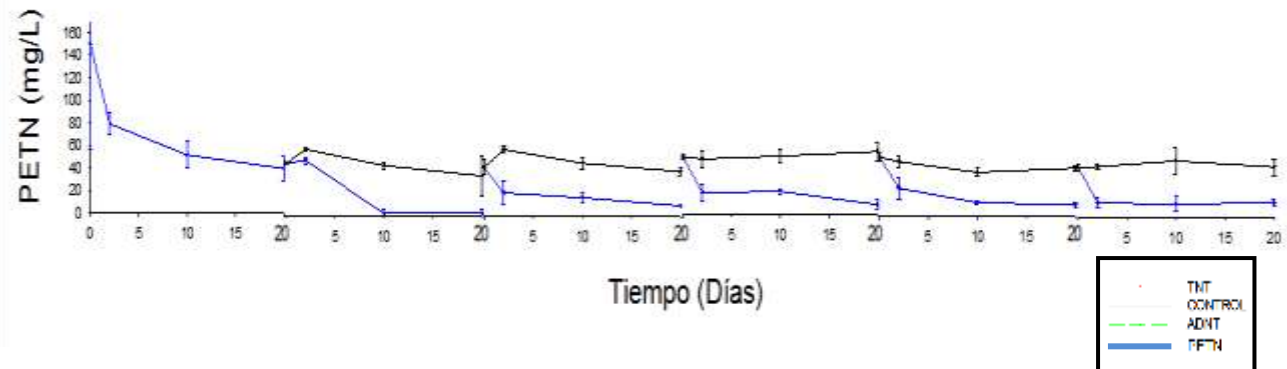


Ilustración 5-3. Monitoreo de la degradación de TNT y PETN en presencia de carbono durante el establecimiento del cultivo de enriquecimiento a partir del suelo Fitorremediación (F)

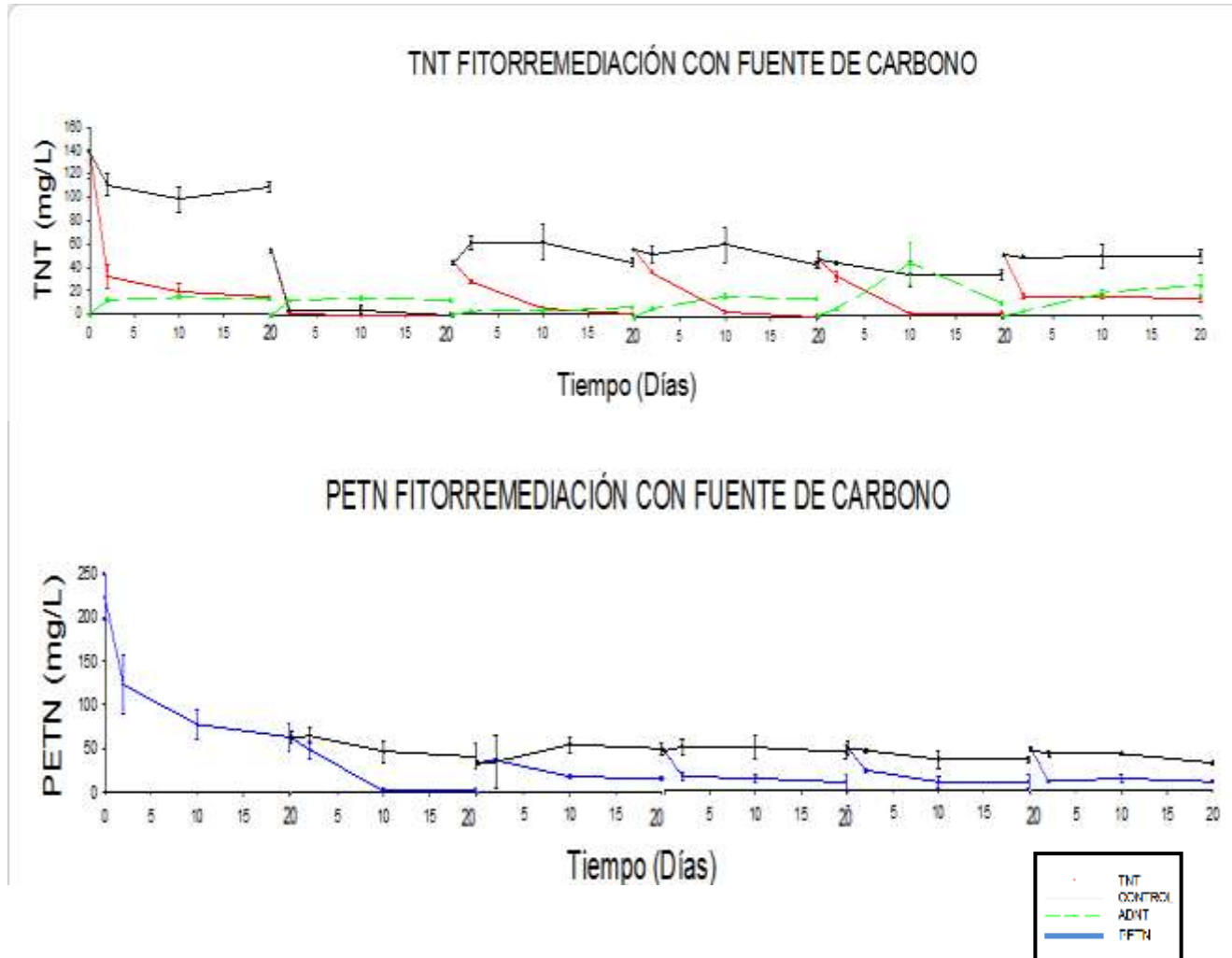
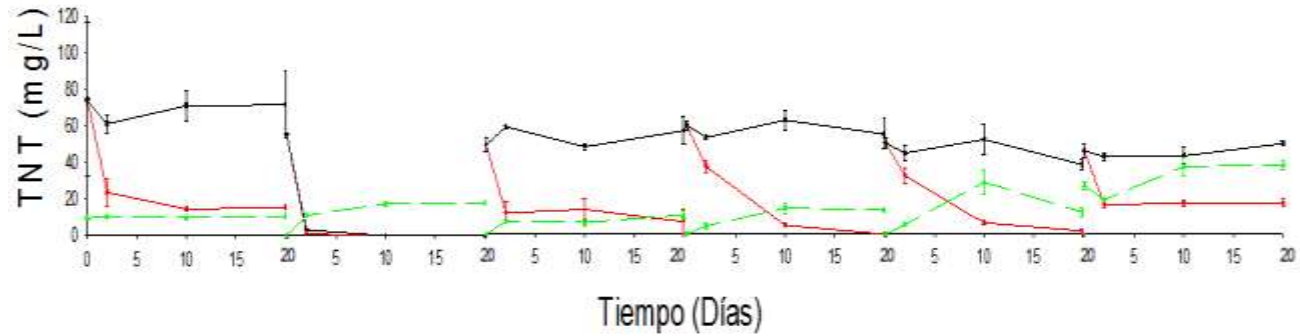


Ilustración 5-4. Monitoreo de la degradación de TNT y PETN en presencia de carbono durante el establecimiento del cultivo de enriquecimiento a partir del suelo planta de cristalización (PC)

TNT PLANTA DE CRISTALIZACIÓN CON FUENTE DE CARBONO



PETN PLANTA DE CRISTALIZACIÓN CON FUENTE DE CARBONO

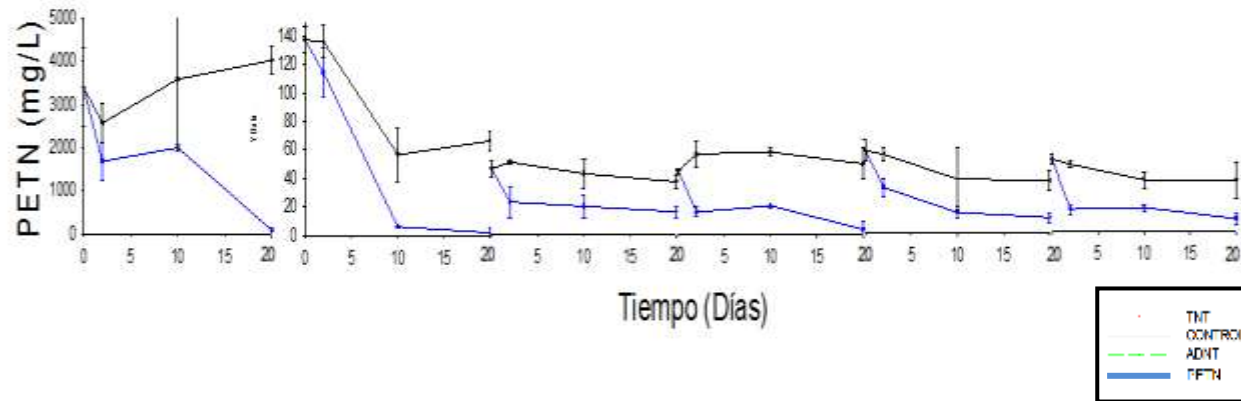


Ilustración 5-5. Monitoreo de la degradación de TNT y PETN en ausencia de carbono durante el establecimiento del cultivo de enriquecimiento a partir del suelo Campo de prueba (CP)

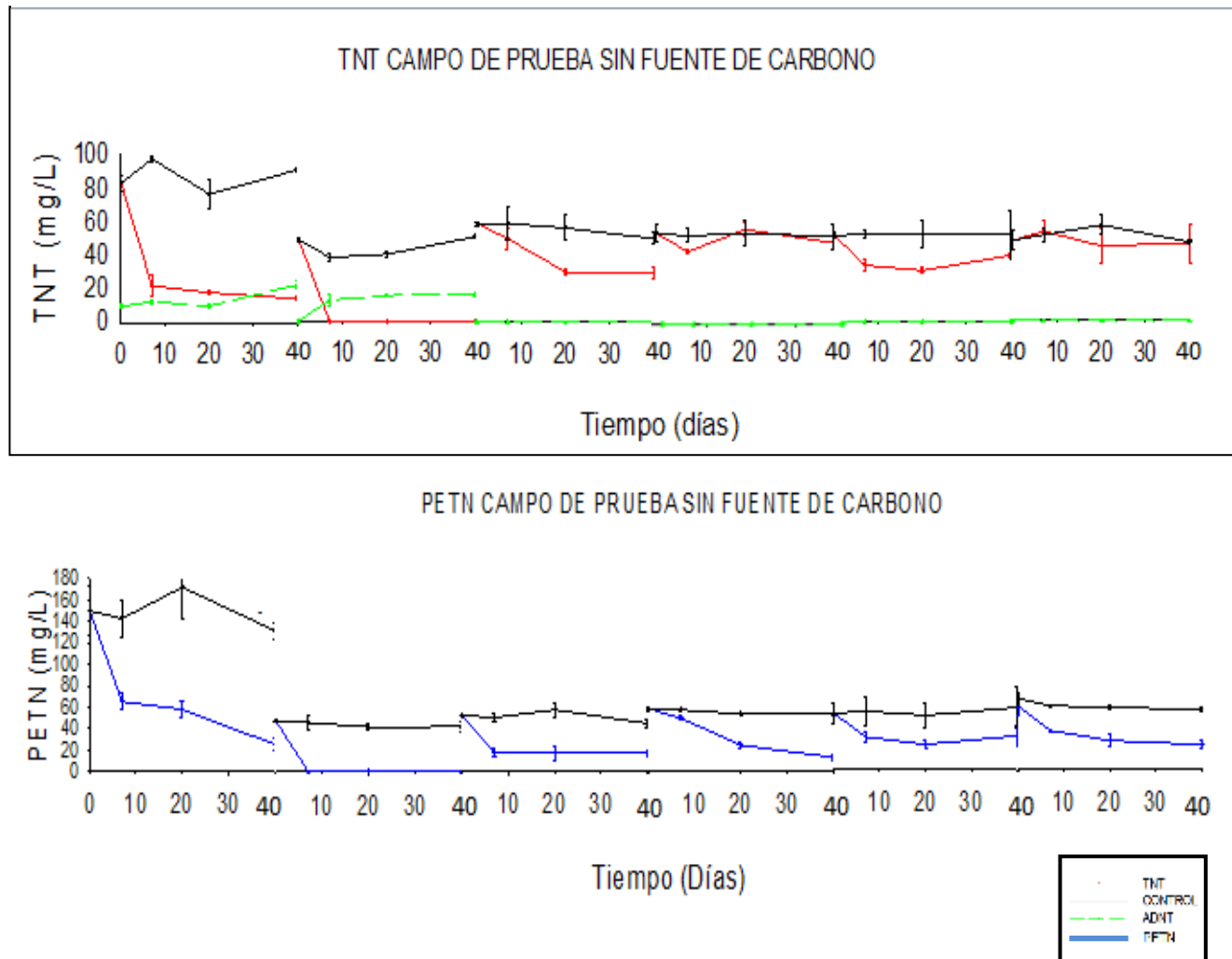


Ilustración 5-6. Monitoreo de la degradación de TNT y PETN en ausencia de carbono durante el establecimiento del cultivo de enriquecimiento a partir del suelo Fitorremediación (F)

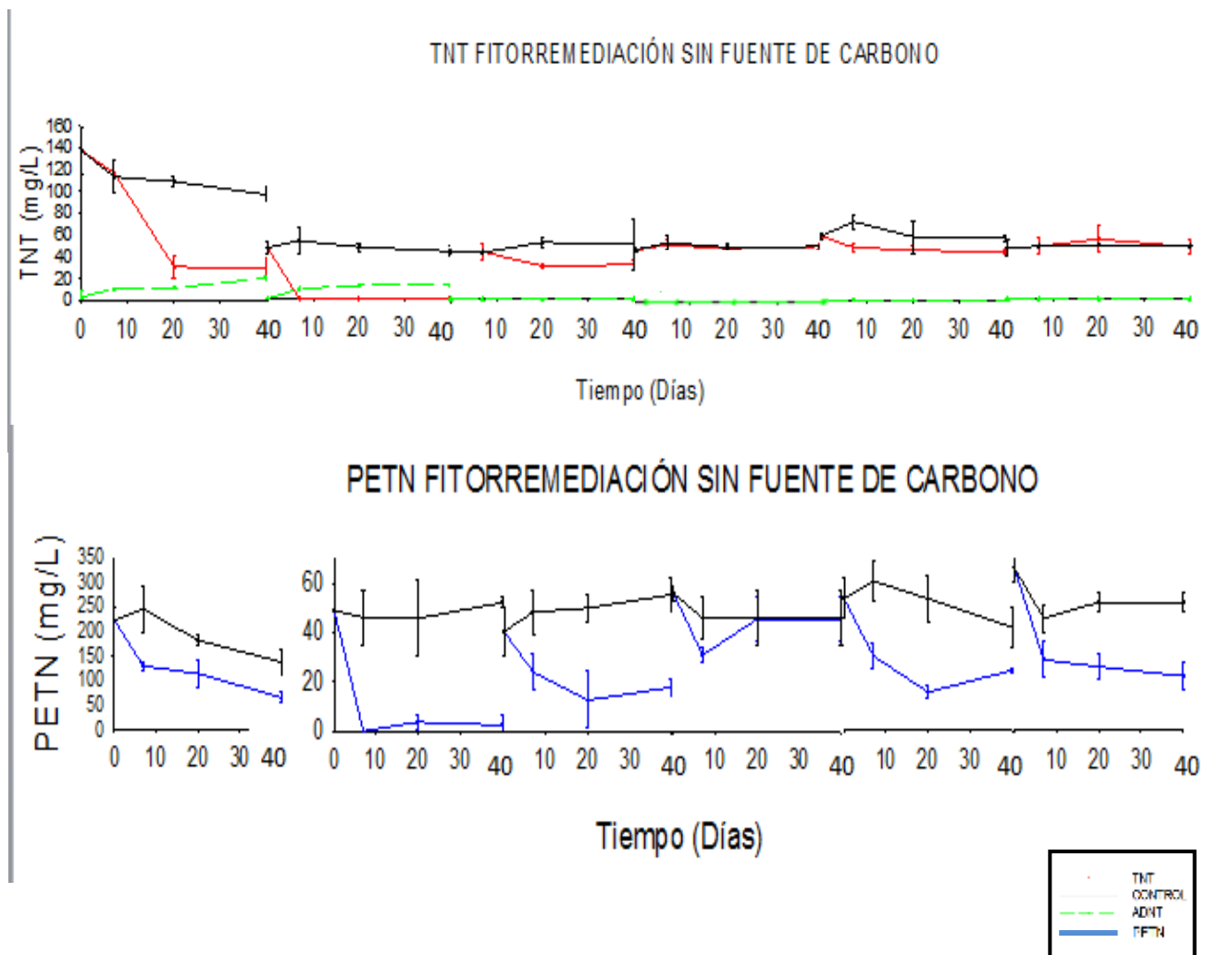
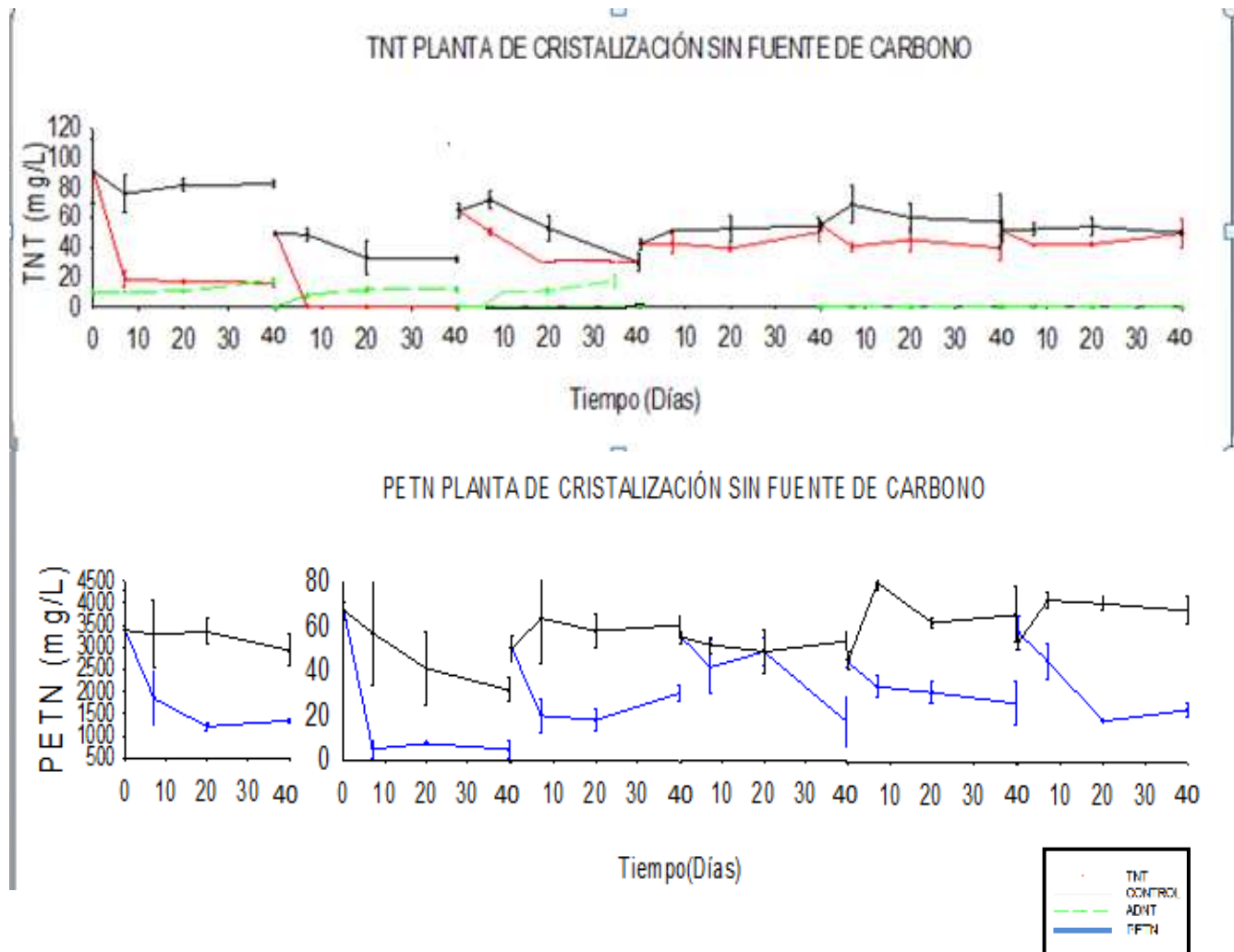
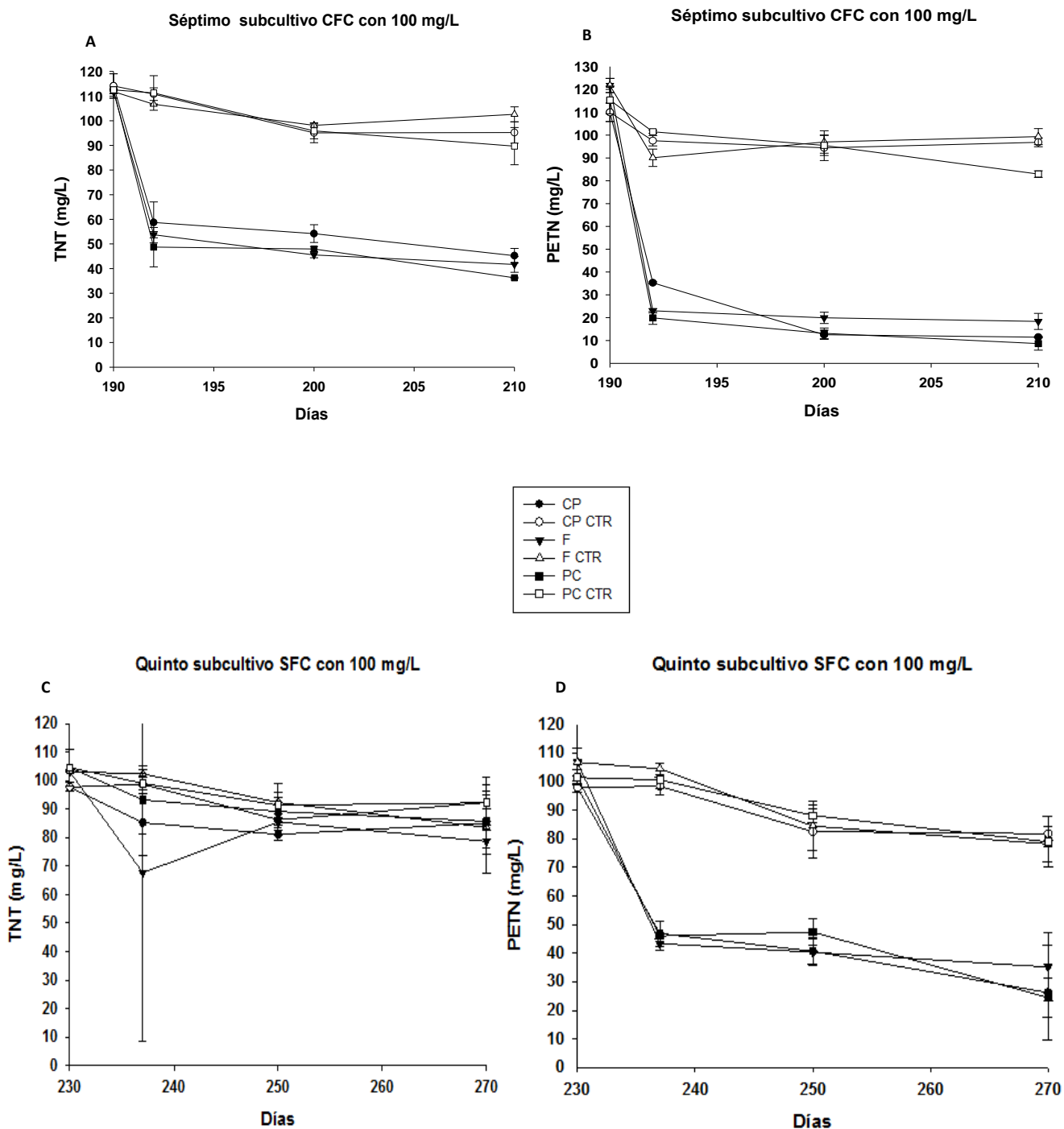


Ilustración 5-7. Monitoreo de la degradación de TNT y PETN en ausencia de carbono durante el establecimiento del cultivo de enriquecimiento a partir del suelo planta de cristalización (PC)



Se confirmaron los resultados de degradación obtenidos con los cultivos de enriquecimiento duplicando las concentraciones de TNT y PETN empleadas de 50 mg/L a 100 mg/L de cada explosivo. Los resultados mostraron que independiente de la concentración inicial la mayor degradación es observada al inicio del pase y además se corroboró la capacidad degradadora de TNT y PETN de los cultivos CFC y de PETN de los cultivos SFC, así como la ausencia de degradación de TNT sin presencia de carbono (**Ilustración 5-8**)

Ilustración 5-8. Degradación de TNT y PETN en los cultivos de enriquecimiento CFC y SFC partiendo de 100 mg/L



5.5 Evaluación de la degradación de TNT y PETN por bacterias anaerobias

5.5.1 Obtención de las bacterias anaerobias potencialmente degradadoras

Se obtuvieron bacterias anaerobias potencialmente degradadoras de TNT y/o PETN a en dos momentos: **a)** Antes del primer pase, es decir a los 20 y 40 d después del inicio del enriquecimiento para CFC y SFC, respectivamente, y **b)** Después del quinto pase, tanto para los tratamientos CFC (100 d) y SFC (200 d).

A partir de las muestras de los cultivos de enriquecimiento antes del primer pase, sólo fue posible obtener bacterias a partir de los tratamientos CFC de los cuales se recuperaron 8 cepas, mientras que de los tratamientos SFC no fue posible obtener aislamientos. Las características macroscópicas de las ocho cepas obtenidas se describen en la **Tabla 1** del **Anexo D**.

Por otro lado, también fueron obtenidos microorganismos en medio T2 a partir de los cultivos de enriquecimiento tras 5 pases en presencia de los explosivos. Inicialmente, por medio de la observación macroscópica y microscópica en medio T2 se reportó la recuperación de cepas provenientes de todos los suelos bajo las dos condiciones (CFC y SFC), para un total de 6, cuyas características se describen en la **Tabla 2** del **Anexo D**.

Sin embargo, como se explicará posteriormente, en medio T2 el aislamiento no resultó ser definitivo, por lo que al hacer siembras en agar nutritivo, se encontró que en algunos casos lo que macroscópicamente se observaba como una cepa aislada eran consorcios. El número de cepas final encontradas para cada tratamiento durante el segundo momento de aislamiento se resumen en la **Tabla 5-6**

Tabla 5-4. Número de cepas recuperadas en Agar nutritivo a partir de cada cultivo de enriquecimiento tras cinco pases

CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO	N° DE CEPAS EN AGAR NUTRITIVO
CP CFC	1
F CFC	2
PC CFC	1
CP SFC	2
F SFC	3
PC SFC	2

En resumen, a partir de las muestras obtenidas de los cultivos sin pases fueron aisladas 8 cepas individuales de los cultivos CFC, mientras que de los cultivos de enriquecimiento tras cinco pases sólo se obtuvieron cepas puras a partir de los cultivos CP y PC de los tratamientos CFC, en tanto que todos los cultivos a partir de los tratamientos SFC y el cultivo F del tratamiento CFC estaban constituidas por dos o más cepas y por lo tanto se consideraron como consorcios.

La evaluación de la capacidad degradadora, se realizó con los consorcios, en los casos en que las cepas no hubieran sido separadas (tratamientos: F CFC, CP SFC, F SFC y PC SFC) o con las cepas aisladas (A,B,C,D,E,F,I,J, CP CFC y PC CFC), para todos los casos bajo las mismas condiciones.

5.5.2 Evaluación de la capacidad degradadora de las cepas obtenidas a partir de muestras antes del primer pase

De las 8 cepas obtenidas a partir de las muestras sin realización de pases, sólo 3 mostraron crecimiento y una degradación significativa de TNT y/o PETN durante los 14 días de la evaluación (**Ilustración 5-9 de la A a la I**). La cepa que presentó la mayor degradación de los dos explosivos fue la cepa inicialmente denominada como B, seguida de la cepa C. En tanto, la cepa I alcanzó la mayor Densidad Óptica a pesar de sólo mostrar degradación de TNT y no de PETN. Por esta razón sólo estas tres cepas fueron seleccionadas para su posterior identificación.

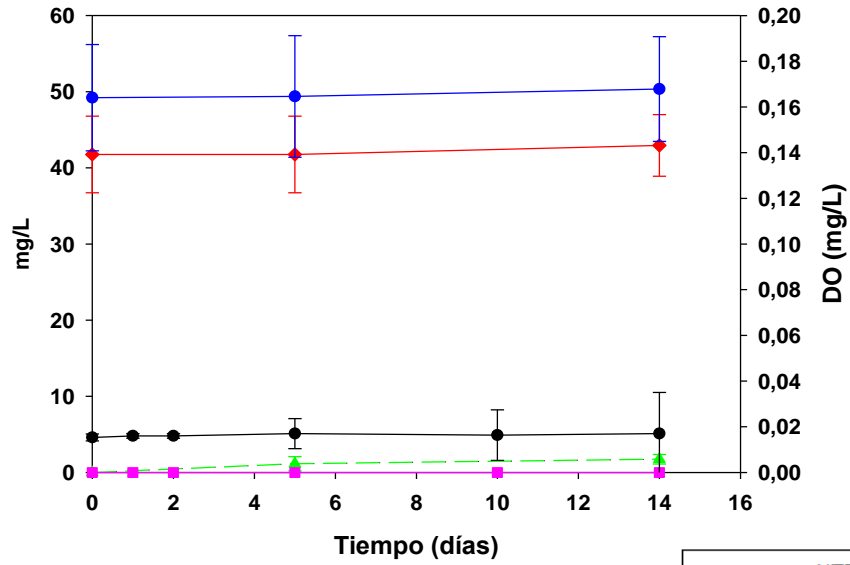
En las cepas que presentaron degradación fue posible evidenciar que tanto la degradación como el crecimiento fue mayor en los primeros dos días de monitoreo. Así mismo, fue posible observar que los nitritos mostraron aumento sólo en los dos primeros días del seguimiento, para luego disminuir sus concentraciones a pesar que la degradación continuaba presentándose. En tanto, los ADNT aumentaron a medida que las concentraciones de los explosivos disminuyeron, acumulándose en el medio de cultivo sin ser consumidos.

En las cepas que no se presentó degradación durante los 14 días de monitoreo tampoco se observó crecimiento significativo, como se observa en el comportamiento de la Cepa E, el cual ejemplifica el comportamiento de todas las otras cepas no degradadoras.

Ilustración 5-9. Pruebas de degradación realizadas a las cepas aisladas sin realizar enriquecimiento selectivo

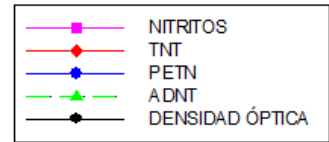
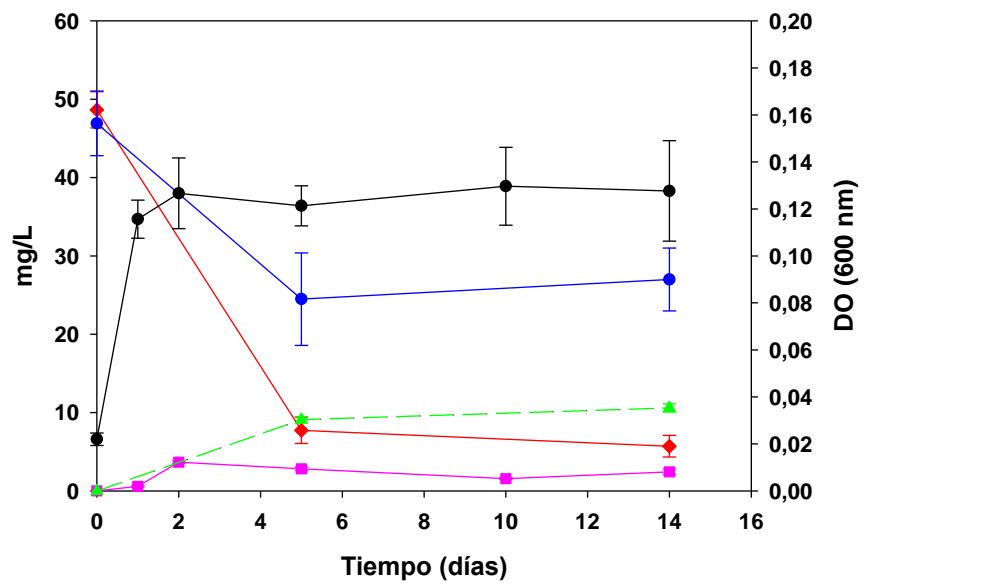
A.

COMPORTAMIENTO CEPA A



B.

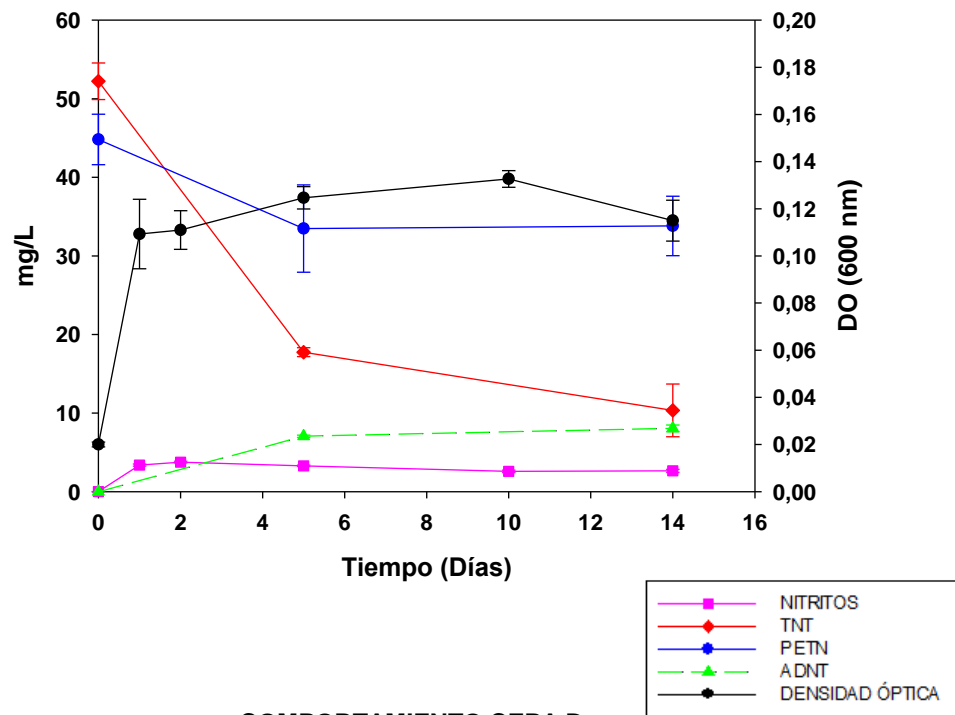
COMPORTAMIENTO CEPA B



Continuación Ilustración 5-10. Pruebas de degradación realizadas a las cepas aisladas sin realizar enriquecimiento selectivo

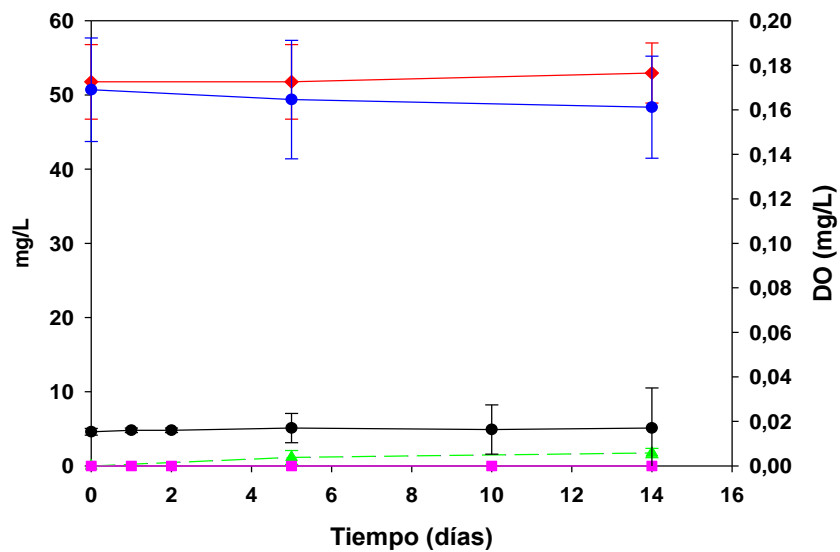
C.

COMPORTAMIENTO CEPA C



D.

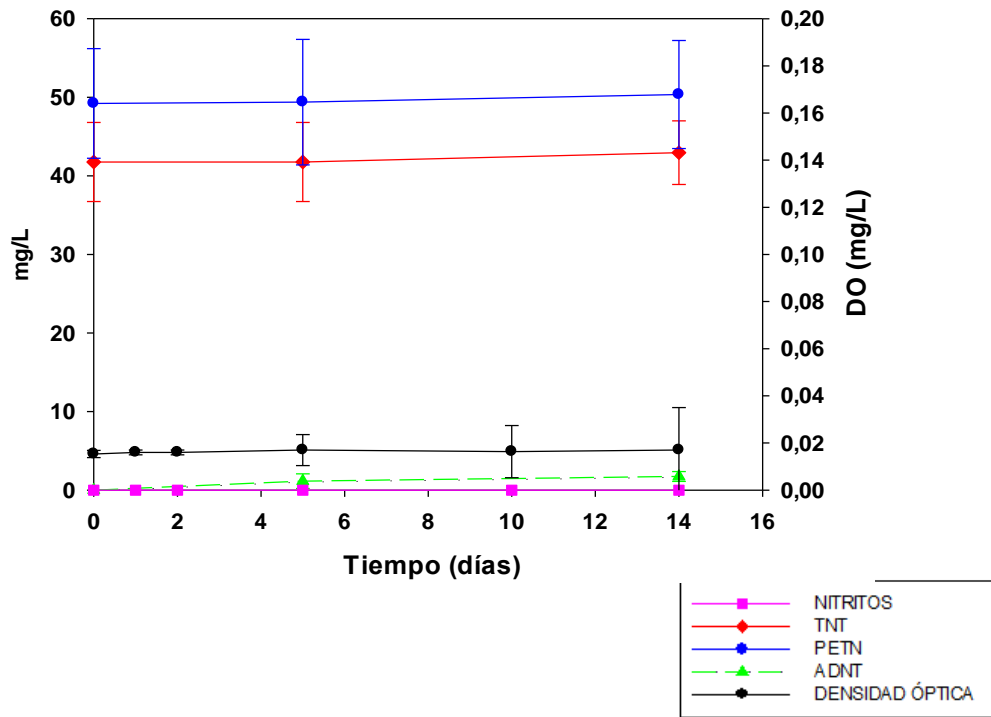
COMPORTAMIENTO CEPA D



Continuación Ilustración 5-11. Pruebas de degradación realizadas a las cepas aisladas sin realizar enriquecimiento selectivo

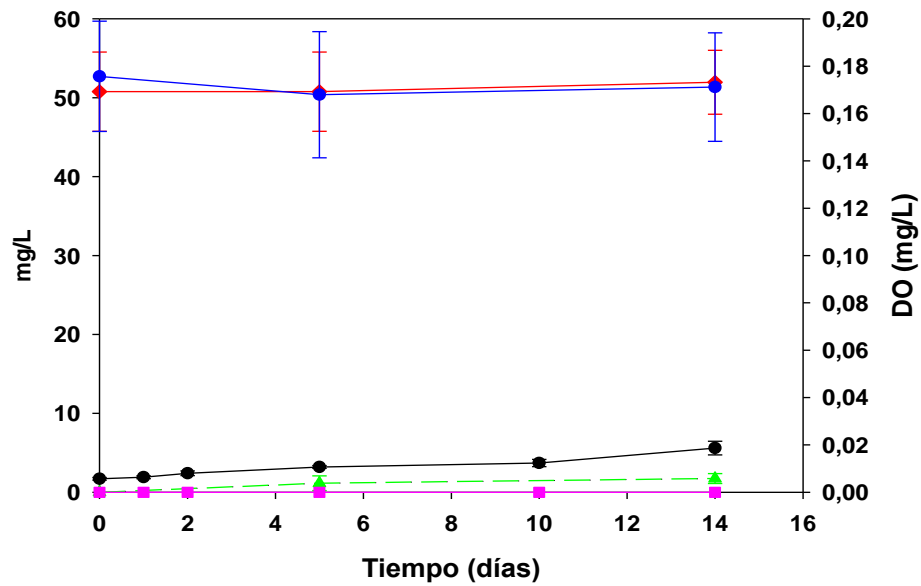
E.

COMPORTAMIENTO CEPA E



F.

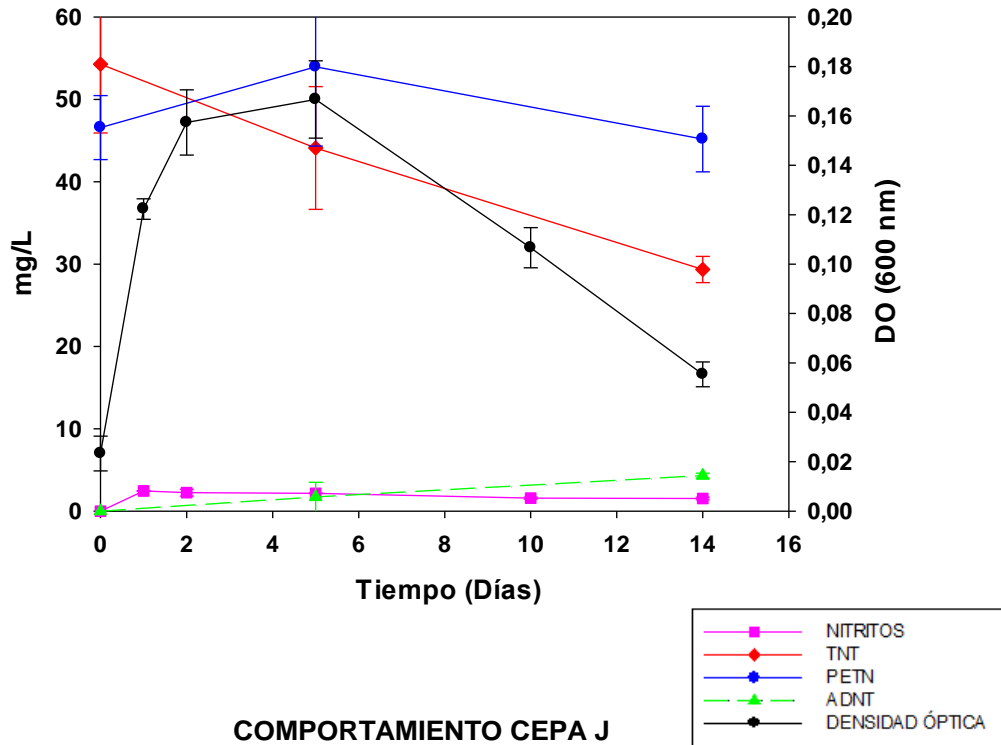
COMPORTAMIENTO CEPA F



Continuación Ilustración 5-12. Pruebas de degradación realizadas a las cepas aisladas sin realizar enriquecimiento selectivo

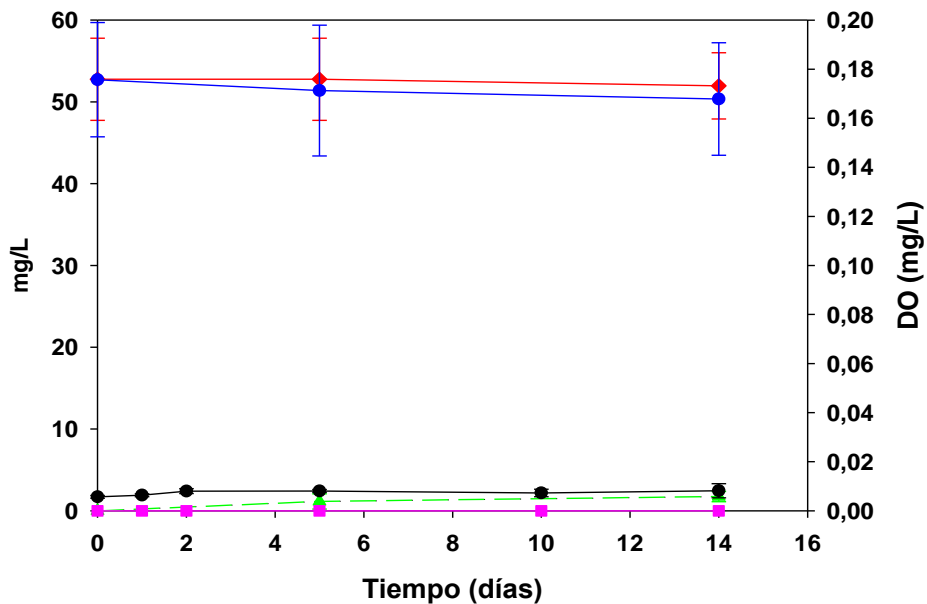
G.

COMPORTAMIENTO CEPA I



H.

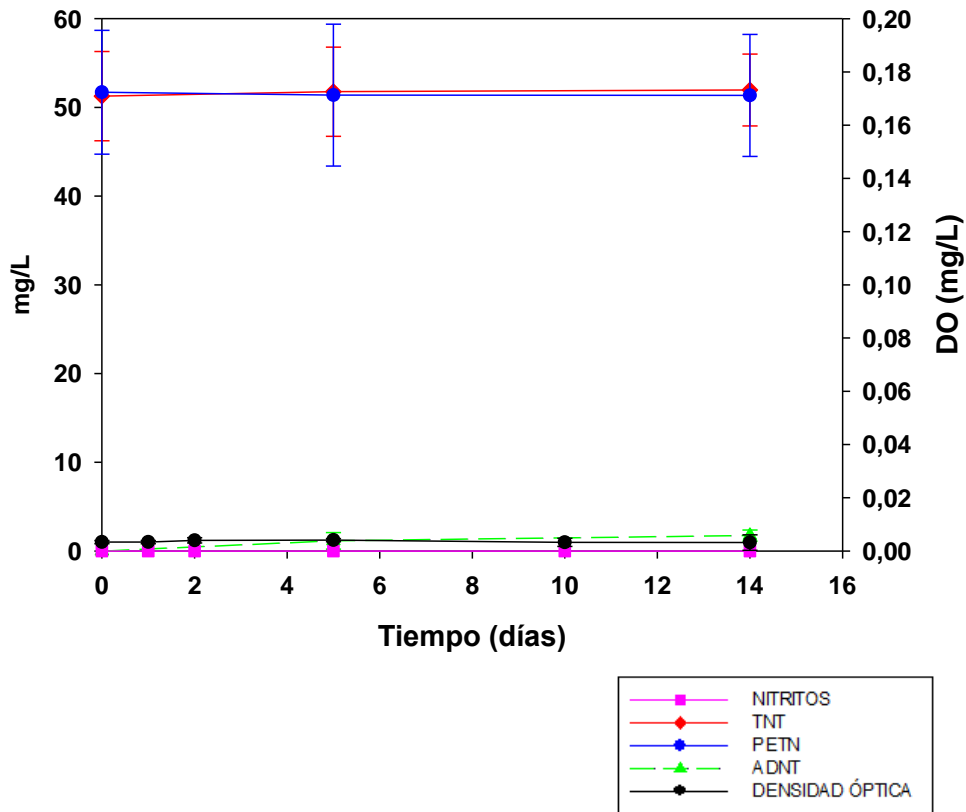
COMPORTAMIENTO CEPA J



Continuación Ilustración 5-13. Pruebas de degradación realizadas a las cepas aisladas sin realizar enriquecimiento selectivo

I.

CONTROLES ABIÓTICOS



5.5.3 Evaluación de la capacidad degradadora de las cepas y consorcios obtenidos a partir de los cultivos enriquecimiento con 5 pases

Se contaban con microorganismos obtenidos a partir de muestras tras cinco pases de todos los suelos con y sin fuente de carbono. Como se explicó previamente, de algunos de los tratamientos se obtuvieron cepas puras, mientras que de otros se obtuvieron consorcios con dos o más cepas. Con estos microorganismos ya fueran solos o en consorcio, se realizaron los ensayos de degradación obteniendo los resultados que se muestran a continuación.

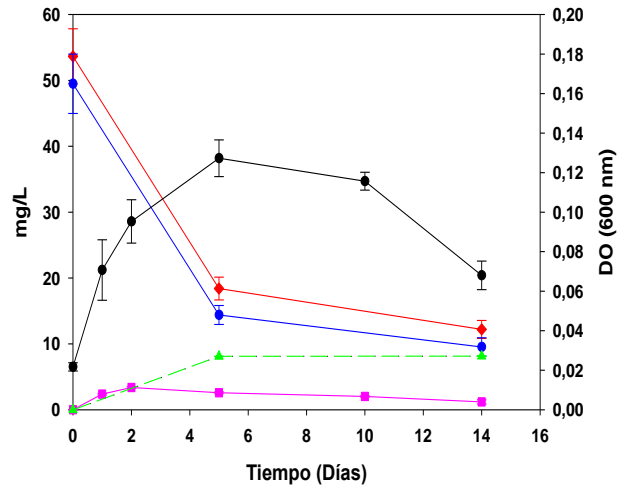
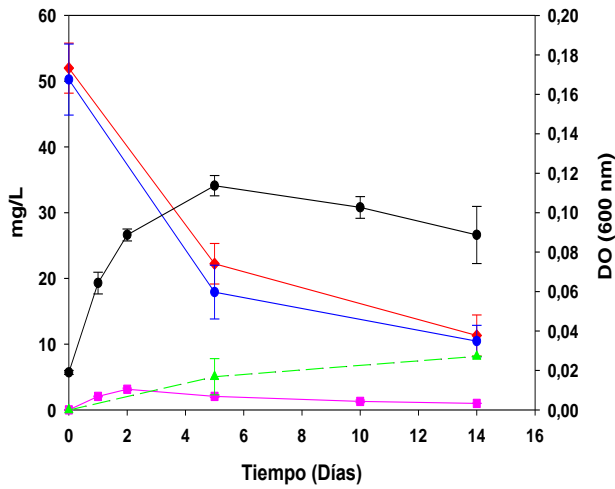
Los ensayos de degradación con las cepas y/o consorcios mostraron que el patrón de degradación de TNT y PETN, se encontraba relacionado con el comportamiento del cultivo de enriquecimiento de origen. Por lo que los microorganismos provenientes de los tratamientos CFC degradaron TNT y PETN simultáneamente, mientras que los microorganismos obtenidos de los tratamientos SFC sólo degradaron PETN (**Ilustraciones 5-10 y 5-11**, respectivamente). A diferencia de lo encontrado en los cultivos de enriquecimiento, la degradación de PETN sin la adición de carbono sólo fue observada en los suelos F y PC, más no en CP. No obstante, este hallazgo es importante ya que antes no había sido reportada la degradación de PETN por microorganismos sin la adición de fuentes de carbono.

Así como en el análisis de las cepas obtenidas a partir de los tratamientos antes del primer pase, la mayor degradación y velocidad de crecimiento se presentó al inicio del monitoreo, señalando que el crecimiento microbiano se encontraba relacionado con la utilización de TNT y/o PETN ya fuera como fuente de nitrógeno en los casos CFC o como posible fuente de carbono y nitrógeno como en el caso de PETN en los caso SFC.

En general, el comportamiento de los nitritos fue similar al descrito anteriormente, puesto que la mayor concentración de los nitritos se observa en los primeros días y disminuye en el tiempo. Por otra parte, al no presentarse degradación de TNT en los tratamientos SFC, tampoco en estos tratamientos se detectó ADNT.

Ilustración 5-14. Pruebas de degradación realizadas a los aislamientos a partir de los cultivos de enriquecimiento CFC

COMPORTAMIENTO CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO CP CON CARBONO COMPORTAMIENTO CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO F CON CARBONO



COMPORTAMIENTO CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO PC CON CARBONO

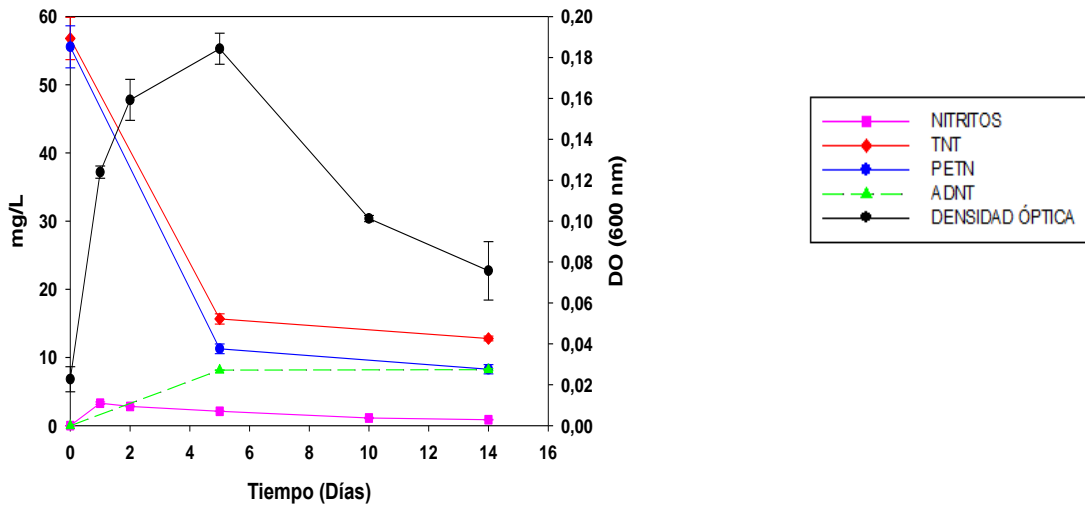
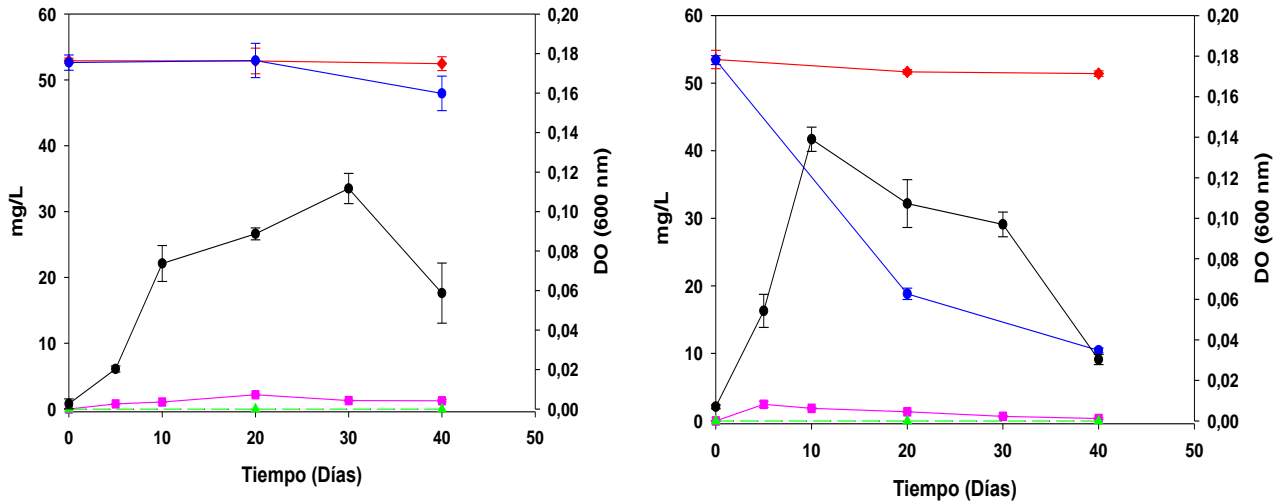
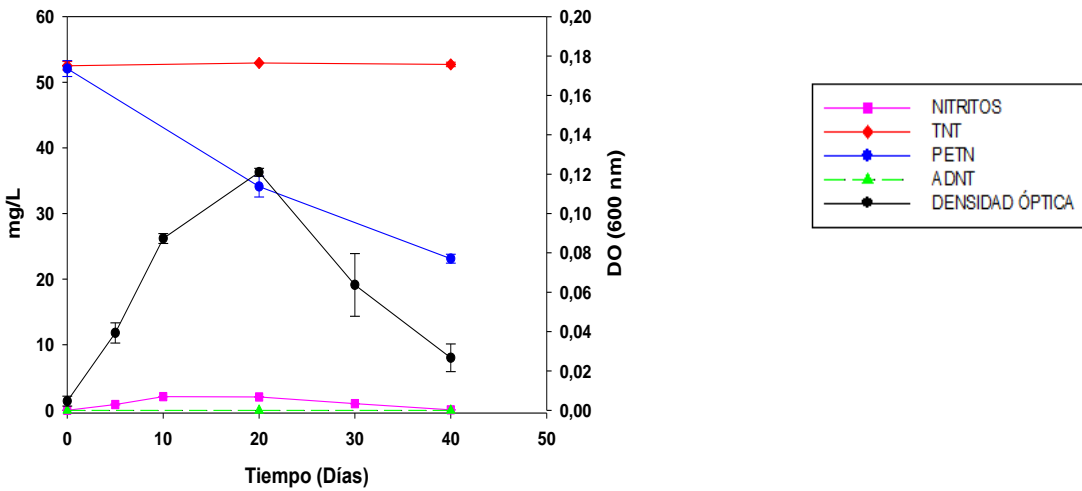


Ilustración 5-15. Pruebas de degradación realizadas a los aislamientos a partir de los cultivos de enriquecimiento SFC

COMPORTAMIENTO CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO CP SIN CARBONO COMPORTAMIENTO CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO F SIN CARBONO



COMPORTAMIENTO CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO PC SIN CARBONO



La **Tabla 5-4**, muestra la cantidad de mmol/L consumidos ya sea por las cepas individuales o por los consorcios, tanto de TNT como de PETN por cada uno de los aislamientos o consorcios, así como la concentración máxima de los productos de degradación nitritos y ADNT, que fueron identificados en este estudio.

Fue posible observar que los consumos de TNT fueron similares entre las cepas B y C y las cepas y/o consorcios obtenidos a partir de los tratamientos CFC analizados. Adicionalmente, se encontró que las cepas y/o consorcios de CFC junto con el consorcio F SFC fueron los que más consumieron PETN, a pesar que los tratamientos CFC consumieron este explosivo en menor tiempo.

Por otra parte, mientras que en todas las cepas (provenientes de tratamientos CFC) y los cultivos CFC la mayor concentración de nitritos en el medio se presentó en los primeros días, en los cultivos SFC los tiempos en los cuales se presentó la máxima concentración de nitritos fueron variables entre los tipos de suelo.

Adicionalmente fue posible observar que mientras que el consorcio PC CFC fue el que presentó el mayor consumo de TNT, no necesariamente fue al que más moles de ADNT se le cuantificaron en el medio (1 mmol de TNT generó 0,22 de ADNT), mientras que la cepa B que consumió una cantidad menor de TNT fue a la cual se le cuantificó la mayor cantidad de ADNT (por cada mmol de TNT consumida se cuantificaron 0,28 mmol de ADNT).

La proporción de mmoles de NO_2 cuantificados no se puede relacionar con las moles consumidas de TNT o de PETN directamente, pues estos dos explosivos liberan este compuesto durante su degradación.

Tabla 5-5. Concentraciones en mmol/L de TNT, PETN y los metabolitos de su degradación

MICROORGANISMO	mmol/L de TNT consumidas (TNTi-TNTf)	mmol/L de PETN consumidas (PETNi-PETNf)	ADNT Max (mmol/L) (Tiempo (d))	Nitritos Max (mmol/L) (tiempo (d))
CEPA B	0,189	0,063	0,053 (14)	0,079 (2)
CEPA C	0,184	0,035	0,040 (14)	0,081 (2)
CEPA I	0,110	0,005	0,020 (14)	0,053 (1)
CEPA CP CFC	0,179	0,125	0,041 (14)	0,068 (2)
CONSORCIO F CFC	0,183	0,127	0,041 (14)	0,073 (2)
CEPA PC CFC	0,194	0,149	0,041 (14)	0,0614 (2)
CONSORCIO CP SFC	0,001	0,015	NC	0,0474 (20)
CONSORCIO F SFC	0,009	0,135	NC	0,053 (7)
CONSORCIO PC SFC	0,000	0,091	NC	0,045 (10)

NC: No cuantificable

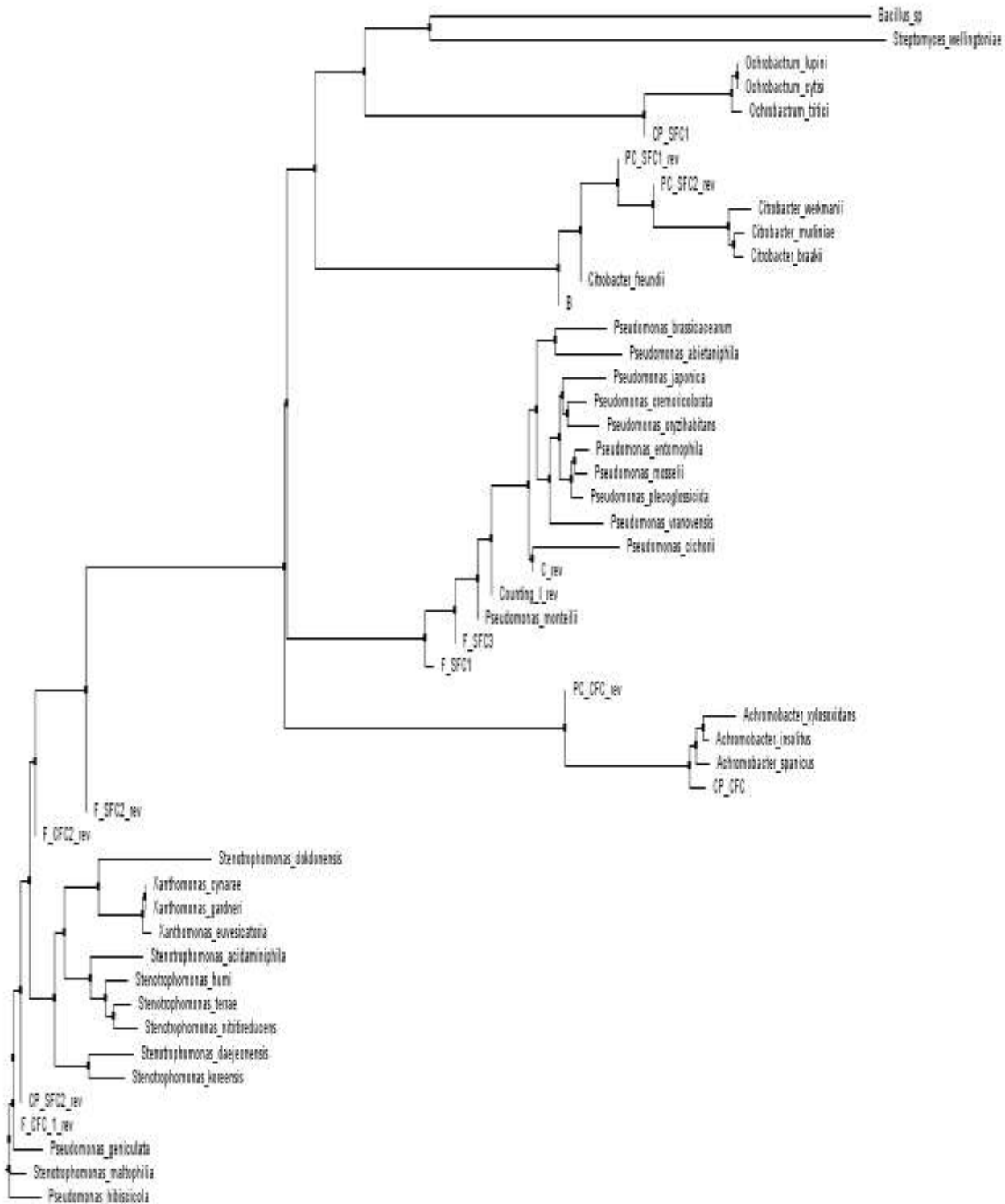
5.6 Identificación de las cepas

Tras extraer el DNA genómico de las cepas aisladas y de realizar PCR se lograron obtener secuencias a partir de las cuales se realizó la afiliación taxonómica mediante la herramienta BLAST. Se realizó un dendograma en el cual es posible observar la similitud a nivel de 16s rRNA entre los aislamientos, así como las cepas tipo con las que se encuentran relacionadas

En los suelo CP y PC se encontraron cepas relacionadas con los géneros *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Ochrobactrum*. Mientras que todas las cepas aisladas a partir del suelo F presentaron similitud sólo con el género *Pseudomonas* como se observa en la **Ilustración 5-13**.

La ilustración permite observar que las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* poseen características diferentes entre ellas pues se generan dos grandes grupos del género, en uno de las cuales *Pseudomonas* se encuentra más estrechamente relacionado con *Stenotrophomonas*.

Ilustración 5-16. Dendograma de relación filogenética de cepas aisladas empleando el 16s rRNA



6. Discusión de resultados

6.1 Metodologías empleadas para la evaluación de la degradación de TNT y PETN

Las muestras a partir de las cuales se llevó a cabo a la extracción de explosivos contenían suelo y medio mineral T2, por lo que eran lodosas. En varios estudios en los que se extrajo TNT o PETN a partir de muestras similares (lodosas) no se especificó la metodología de extracción de explosivos para este tipo de muestras (**Krumholz *et al.*, 1997; Robertson & Jjemba, 2005**), en otros casos se consideraba como una muestra de suelo (**In *et al.*, 2008**) o como una muestra líquida (**Boopathy *et al.*, 1998; García, 2011**). Sólo en una ocasión se evaluó la cantidad de TNT presente en el sobrenadante de una muestra lodosa (explosivos solubles) y en la totalidad de la muestra de lodo tras secarla en horno (explosivos totales extraíbles) (**Fuller & Manning Jr, 2004**). En ninguno de estos estudios se reportaron valores de recuperación previos al empleo de la metodología empleada.

Además, en estudios previos realizados en USBA con muestras lodosas en las que se empleó la extracción líquido-líquido se observaron altas desviaciones estándar en los valores cuantificados de los explosivos especialmente en las concentraciones de PETN (incluso de 160 mg/L) (**García, 2011**), así como al inicio del presente estudio se encontraron bajos porcentajes de recuperación y altas desviaciones estándar especialmente de TNT (%R:48,5 y %CV:20,1). Esto pudo deberse a las metodologías empleadas para realizar la extracción de los explosivos y de tomar la muestra para monitorear la degradación.

La puesta a punto de una metodología de extracción de explosivos a partir de muestras lodosas, separando las fases sólida y líquida de la muestra y realizando la extracción de explosivos en cada una de ellas de acuerdo a su naturaleza, así como del muestreo por descarte permitió obtener mayores porcentajes de recuperación (TNT: $80 \pm 3,50\%$ y PETN: $91,4 \pm 9,70\%$).

Los porcentajes superiores obtenidos empleando la metodología de muestreo por descarte puede deberse, en primer lugar a que estos dos explosivos se adicionan disueltos en un solvente volátil (acetonitrilo o acetona) y al evaporarse este solvente, los explosivos quedan en el vidrio de las unidades experimentales **(Nishino & Spain, 2001)** y a que adicionalmente, tanto TNT como PETN son moléculas de poca solubilidad en agua y tienden a adsorberse a los suelos y sedimentos **(Juhasz & Naidu, 2007; Zhuang, 2007; Akhavan, 2004; Yinon, 2004)**, especialmente a los ácidos húmicos **(Robertson & Jjemba, 2005)**. Por lo tanto cuando se toma una submuestra de la Unidad experimental, se pierde la porción de los explosivos pegada al vidrio y además, dado que es difícil obtener submuestras homogéneas de lodos se genera variabilidad en la proporción de suelo lo que reduce la precisión y exactitud en la cuantificación de los explosivos.

En tanto, al realizar la extracción de todo el contenido de la UE y aplicar nuevamente acetonitrilo para realizar el proceso, los explosivos se disuelven nuevamente, permitiendo recuperar aquellas cantidades que no fueron degradadas y se evita la obtención de submuestra homogénea.

De igual manera, este estudio sugiere que la extracción líquido-líquido no logra recuperar todos los explosivos ni los subproductos de los mismos adsorbidos al suelo y por medio de la separación de fases se logró aumentar la recuperación de esta fracción mostrando valores más cercanos a los reales en las muestras.

La puesta a punto de estas técnicas, fue útil no solo para mejorar la confiabilidad de los datos presentados en este estudio, sino para los estudios que se lleven a cabo en el futuro relacionados con ambientes impactados con explosivos pues presentó mejoras en la extracción y posterior cuantificación de los mismos de este tipo de matrices.

6.2 Degradación de TNT y PETN en condiciones aerobias y anaerobias

Este es el primer estudio en el cual se evalúan de forma paralela las comunidades microbianas de tres suelos en condiciones aerobia y anaerobia en presencia de TNT y PETN. Los resultados obtenidos sugieren que los procesos de degradación de los dos explosivos se ven favorecidos por las condiciones anaerobias (**Ilustración 5-1**).

A pesar de que **Zhuang (2007)** propuso que las condiciones anaerobias podrían favorecer la degradación de PETN por los bajos potenciales redox, este es el primer estudio en el cual se evalúa la degradación de este explosivo en condiciones aerobias y anaerobias simultáneamente. Se encontró que a pesar que la degradación de PETN varió entre el primer y el segundo ensayo aerobio vs anaerobio, siendo superior la degradación en el primero que en el segundo, fue posible corroborar el efecto positivo de la ausencia de oxígeno en el proceso al observar que PETN presentó una tendencia no sólo a degradarse más rápido sino a ser degradado en mayores proporciones respecto a los tratamientos aerobios a lo largo de los ensayos planteados en condiciones anaerobias.

Para el caso de TNT, por lo general los estudios en los que se comparan las dos condiciones se han realizado con cepas puras y algunos de ellos reportan resultados contradictorios. Para el caso de *Bacillus mycoides* en condiciones aerobias la reducción de TNT fue más veloz degradándose el 93% del explosivo presente en el medio luego de 16 h, mientras que para degradar una proporción similar en condiciones anaerobias la cepa necesitó de 24 h (**Hong-Yon et al., 2013**). En tanto, en el estudio realizado con la bacteria anaerobia facultativa *Klebsiella sp. C1* se encontró que el TNT se consumió en los cultivos en condiciones aerobias y anaerobias, aunque al igual que como se observó en el presente estudio, la tasa inicial de reducción del TNT en condiciones anaerobias fue superior a la observada en condiciones aerobias (**Chong-Suk et al., 2002**), resultados similares se encontraron al comparar una cepa aerobia de *Serratia sp.*, y una anaerobia de *Desulfovibrio sp.*, en donde a pesar que la cepa aerobia presentó un crecimiento más veloz, el TNT fue reducido e incorporado a la biomasa de la cepa anaerobia más rápido (**Drzyzga et al., 1998**). De hecho, para este explosivo ha sido probado que los procesos secuenciales anaerobio/aerobio tienen mucho éxito dado que la reducción inicial suele

ser más favorable en condiciones anaerobias (**Roberts et al., 1996; Knicker et al., 1999**). A pesar que durante los ensayos planteados no se realizaron muestreos en tiempos más cortos al inicio del monitoreo, lo cual habría permitido describir con mayor exactitud el momento de mayor consumo, esta reducción inicial más veloz, se observó como característica general en los primeros días de monitoreo, tanto en los pases de los cultivos de enriquecimiento como al evaluar las cepas individuales, en los casos en que se presenta ya sea degradación de los dos explosivos o solamente de PETN. La reducción más veloz en condiciones anaerobias, de estos explosivos está estrechamente relacionada con las características químicas de estos compuestos, los cuales siempre se reducen como el paso inicial de su biotransformación (**Roberts et al., 1996**).

Varios autores han encontrado que además de la rápida reducción observada en anaerobiosis, estas condiciones pueden tener otras ventajas, pues ha sido demostrado que el TNT puede ser usado como fuente de nitrógeno por cepas como *Desulfovibrio*, otras cepas sulfato reductoras y *Pseudomonas* JLR11 (**Esteve-Núñez & Ramos, 1998; Preuss et al., 1993; Boopathy & Kulpa, 1993a**), y que en otros casos pueden ser llevados a compuestos totalmente reducidos como TAT con cepas de *Clostridium spp*, *E. coli* y *Lactobacillus* (**Ederer et al., 1997**).

Para el caso de este estudio, se encontró que al evaluar la degradación en conjunto de TNT y PETN (pentolita), la anaerobiosis proporcionó una ventaja adicional, pues bajo esta condición la presencia de TNT no inhibió la degradación de PETN en ninguno de los tratamientos, a diferencia de lo observado en estudios realizados en condiciones aerobias. En estos estudios se encontró que en aerobiosis la presencia de TNT inhibió la degradación de PETN por cultivos de enriquecimiento (**García, 2011**) y que al evaluar la degradación por dos cepas sólo con TNT, sólo con PETN y con la mezcla Pentolita, se encontró que podían degradar PETN únicamente cuando no había TNT en el medio (**Roldán et al., 2013**), lo cual es similar a lo encontrado en el estudio realizado por **Moshe et al (2009)**, en el cual la presencia de TNT inhibió la degradación de los explosivos RDX y HMX. Adicionalmente, en el estudio realizado por **Georgie (2011)**, quien aisló y caracterizó bacterias aerobias degradadoras de TNT y/o PETN, se encontró que la cantidad de cepas degradadoras de PETN era mayor en lugares en los que este explosivo no estaba junto con TNT (30 y 4 cepas respectivamente).

Lo anterior es importante, ya que pocos trabajos han analizado la degradación de TNT y PETN en conjunto (pentolita) y en ninguno de ellos se había comparado la degradación de la pentolita en condiciones anaerobias y aerobias, por lo que no se tenía conocimiento que las condiciones anaerobias favorecían la degradación en conjunto de estos dos los explosivos.

6.3 Efecto de los tratamientos con fuente de carbono y sin fuente de carbono sobre la degradación de TNT y PETN

Al estudiar el efecto de la presencia o ausencia de carbono en la degradación de TNT y PETN, fue posible observar que durante todas las etapas de este estudio (comparación aerobiosis vs anaerobiosis, establecimiento de cultivos de enriquecimiento, obtención de cepas y consorcios degradadores) la adición de la solución con fuentes de carbono al medio (Glucosa, glicerol, citrato y acetato) en la concentración empleada (1%) mostró un efecto positivo en la degradación de los dos explosivos.

Durante, los ensayos para evaluar la degradación de TNT y PETN en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis, se encontró la tendencia en los tres suelos evaluados a presentar mayor degradación de los dos explosivos cuando se combinaban las condiciones anaerobio y adición de carbono (**Ilustración 5-1 y ANEXO C**).

Posteriormente, durante el establecimiento de cultivos anaerobios degradadores de TNT y PETN empleando enriquecimiento selectivo, se encontró nuevamente un efecto positivo de la adición de carbono ya que en los tratamientos con fuente de carbono (CFC), tanto TNT como PETN presentaron disminución en sus concentraciones en la todos los pases evaluados (**Ilustraciones 5-2, 5-3 y 5-4**), es decir que en estos cultivos no se perdió la capacidad degradadora con el tiempo, permitiendo afirmar que la aproximación anaeróbica mantuvo la degradación de TNT y PETN en presencia de carbono a diferencia de lo observado por **García (2011)**, quien reportó que los cultivos de enriquecimiento en condiciones aerobias presentaron disminución en su capacidad degradadora de los dos explosivos a partir del segundo pase, aún con carbono.

Por otra parte, en los cultivos de enriquecimiento anaerobios sin fuente de carbono (SFC) tras el tercer pase la degradación de TNT se detuvo en todos los suelos, mientras que la degradación de PETN continuó pase tras pase aunque en menor proporción que en presencia de carbono (**Ilustración 5-5, 5-6 y 5-7**).

La ausencia de degradación de TNT en los últimos pases sin adición de carbono coincide con lo reportado, pues se ha encontrado que este proceso aún en condiciones anaerobias, requiere de la presencia de fuente de carbono, indicando su naturaleza cometabólica (**Preuss et al., 1992**). De hecho, aunque se ha demostrado que el TNT en ausencia de oxígeno puede ser empleado como fuente de nitrógeno para el crecimiento (**Esteve-Núñez & Ramos, 1998**) y como aceptor de electrones (**Esteve-Núñez, 2000**), no ha sido posible obtener cantidades sustanciales de CO₂ a partir de TNT en los estudios con isótopos radiomarcados, ni degradación de este explosivo cuando no se suplementa con fuentes de carbono (**González-Pérez et al., 2007; Adrian y Arnett, 2007; Kitts et al., 2000; Boopathy et al., 1998; Young et al., 1997; Duque et al., 1993; Naumova et al., 1986**). Es por esta razón, que probablemente la degradación de TNT observada en los dos primeros pases SFC, se deba a materia orgánica y nutrientes presentes en el suelo, los cuales fueron agotados al realizar los pases limitando la degradación de este compuesto.

Los resultados obtenidos para PETN en los cultivos SFC mostraron ser prometedores ya que se evidenció degradación de este explosivo aun tras cinco pases sin la adición de fuentes de carbono, lo cual hasta la fecha no había sido reportado, pues los ensayos realizados tanto en aerobiosis como en anaerobiosis con cepas o cultivos mixtos en los cuales se demostró degradación de PETN se realizaron siempre en medios suplementados con fuentes de carbono.

Hasta el momento se han encontrado cepas que en aerobiosis emplean PETN como fuente de nitrógeno más no de carbono como *Enterobacter cloacae* PB2 (**Binks et al., 1996**), y la cepa *Agrobacterium radiobacter*, capaz de obtener nitrógeno a partir de PETN y trinitrato de glicerol (GTN) (**White et al., 1996**), así como consorcios bacterianos anaeróbicos enriquecidos a partir de suelos contaminados con este compuesto también en presencia de carbono (**Zhuang, 2007**). El único reporte cercano hasta el momento es de *Arthrobacter sp.*, cepa JBH1 estudiada por **Husserl et al., (2010)**, quienes

encontraron que este microorganismo es capaz usar en condiciones aerobias como fuente de carbono, energía y nitrógeno la nitroglicerina; un compuesto muy similar estructuralmente a PETN (el nitroglicerina contiene solo 3 grupos nitro mientras que el PETN contiene 4 grupos). Es por esto que de acuerdo a los resultados obtenidos se podría sugerir que en los últimos pases SFC, la degradación de PETN en condiciones anaerobias pudo ayudar a una rápida reducción de los grupos nitro de este compuesto dejando libre el esqueleto carbonado el cual podría estar siendo empleado como fuente de carbono para el crecimiento microbiano en los cultivos de enriquecimiento y los consorcios obtenidos. Sin embargo, para afirmar que PETN está siendo empleado como fuente única de Carbono y Nitrógeno se deben hacer más estudios, por ejemplo, de tipo isótopos radiomarcados o espectrofotometría de masas, que permitan confirmar esta información.

El efecto del carbono fue evidenciado también en las cepas aisladas, puesto que a partir de las muestras antes del primer pase, sólo fue posible obtener cepas de los tratamientos CFC, pues las cepas provenientes de los tratamientos SFC no presentaron crecimiento ni degradación significativa de TNT y/o PETN. Adicionalmente se encontró que en los aislamientos realizados a partir de las muestras con enriquecimiento selectivo durante 5 pases, en los tratamientos CFC de los suelos CP y PC la degradación fue llevada a cabo en cada caso por una cepa, mientras que en los tratamientos SFC y el tratamiento F CFC se encontraron al menos dos cepas en estos cultivos.

Así como en ocasiones, una sola cepa puede llevar a cabo la degradación de compuestos de interés, en otros casos para que los procesos de degradación se lleven a cabo se requiere del consorcio de dos o más microorganismos en los cuales cada miembro del consorcio desempeña un rol. Esto es especialmente cierto en condiciones nutricionales limitantes, cuando los sustratos son complejos o tóxicos (**Ghazali et al., 2004**). Teniendo en cuenta que en todos los aislamientos provenientes de los tratamientos SFC se encontraron más de dos cepas, es posible que en la ausencia de carbono el establecimiento de consorcios fuera esencial para llevar a cabo la degradación de PETN. Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado la capacidad degradadora de cada una de ellas por separado, por lo que no se puede afirmar si este fue el caso.

6.4 Selección e identificación de cepas y consorcios anaerobios degradadores de TNT y/o PENT

Todas las cepas obtenidas durante este estudio fueron Gram negativas, lo cual coincide con los reportes de bacterias degradadoras tanto de PETN (Binks *et al.*, 1996; White *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 2004) y la mayoría de bacterias degradadoras de TNT en concentraciones superiores a 50 mg/L (Fuller & Manning Jr, 1997; Hawari *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2006; Claus *et al.*, 2007). Fuller & Manning Jr (1997), realizaron un estudio en el cual probaron la habilidad de diferentes géneros para transformar TNT, demostrando que las bacterias Gram positivas aerobias son mucho más sensibles a TNT que las Gram negativas. Se sugieren tres razones principales para la mayor resistencia de las Gram negativas hacia el TNT: a) la estructura y composición de la pared celular y la presencia de una membrana externa en las Gram negativas las hacen menos permeables al TNT; b) Estas bacterias tienen un sistema de transporte activo para reducir la concentración de TNT intracelular; y c) poseen la capacidad de sintetizar enzimas que ayudan a detoxificar el TNT.

Las cepas obtenidas presentaron similitud con 4 géneros: *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Achromobacter* y *Ochrobactrum*, y se encuentran relacionadas entre ellas y con cepas tipo de estos géneros de acuerdo a como se mostró en la **Ilustración 5-13**. Como se observa, las cepas aisladas relacionadas con el género *Pseudomonas*, se separan en dos grandes ramas, en una de las cuales, se observó que las *Pseudomonas* estaban más estrechamente relacionadas con *Stenotrophomonas*.

Los miembros del género *Pseudomonas* habitan una amplia variedad de hábitats, lo cual se refleja en su versatilidad metabólica y su amplio potencial para adaptarse, por lo que se ha observado al interior de este género dificultades referentes a su clasificación. De hecho, de acuerdo a la revisión realizada por Silby *et al.*, (2010), basados en una gran cantidad de datos obtenidos a partir de estudios moleculares, se observó como cepas que se consideraban como *Pseudomonas (sensu stricto)*, han sido separadas del género y colocadas en otros géneros pertenecientes incluso otras subclases. Un estudio puntual

sobre el tema fue realizado por **Anzai et al., (2000)**, en el que se evaluaron 128 secuencias de 16s rRNA de cepas consideradas como pertenecientes a *Pseudomonas*, comparándolas con secuencias de otras especies de Proteobacterias, se encontró que solo 57 pertenecían al género *Pseudomonas (sensu stricto)* y que internamente estas cepas se separaban generando 7 *clusters* o grupos. Sin embargo, autores como **Yamamoto et al., (2000)**, afirman que el grado de resolución obtenido para este género con el análisis del 16s rRNA no discrimina lo suficiente para permitir resolver las relaciones al interior del género, por lo que plantearon que es necesaria la utilización de otras secuencias como las de los nucleótidos de los genes para la subunidad B de la DNA girasa (*gyrB*) y el factor σ^{70} . Probablemente debido a las razones anteriormente expuestas, es que se observan las dos grandes ramas del género en el dendograma elaborado.

Respecto a la capacidad degradadora de los géneros encontrados, se ha reportado ampliamente la degradación tanto de PETN (**Spain et al., 2000; Ye et al., 2004**), como de TNT por microorganismos del género *Pseudomonas*, ya sea por cepas puras (**Ávila, 2012; Oh et al., 2003; Maeda et al., 2006; Nyanhongo et al., 2009**) o en consorcios con microorganismos de otros géneros o con otras *Pseudomonas* (**Ávila, 2012; Hudcova et al., 2011**). Como se mencionó previamente, esto es debido a que este género es muy diverso y con capacidades metabólicas muy amplias, incluyendo la producción de biosurfactantes (**Garzón & Rodríguez, 2011**) que les permiten participar activamente en los ciclos de casi todos los elementos, así como en la degradación de contaminantes, por lo que son bastante empleados en áreas como la biorremediación y la biocatálisis (**Nelson et al., 2002; Silby et al., 2010**).

En el caso de *Achromobacter*, estos microorganismos también han sido reportados como degradadores de TNT tanto por cepas puras (**Ávila, 2012**) como en consorcios (**Muter et al., 2012; García, 2011**), así como los microorganismos del género *Citrobacter*, los cuales fueron reportados como degradadores de TNT en el estudio realizado por **Gunnison et al., (1993)** y de otros explosivos como RDX (**kitts et al., 1994**).

Sin embargo, este es el primer reporte de la degradación de PETN en presencia de carbono por microorganismos del género *Achromobacter*, y de este mismo explosivo

tanto en presencia como en ausencia de carbono por microorganismos del género *Citrobacter*. Esto no es del todo sorprendente, puesto que se ha comprobado que la enzima PETN reductasa, reportada inicialmente para la degradación de PETN, también puede reducir TNT (**Blinks et al., 1996**).

Por su parte la cepa relacionada con el género *Ochrobactrum*, sólo se encontró en el consorcio obtenido a partir suelo CP SFC acompañada de otra cepa del género *Pseudomonas*. Este consorcio sólo degradó un 14% de PETN.

Por otra parte, al evaluar los subproductos de la degradación del TNT, en ningún caso se detectaron dinitrotoluenos (DNTs), pero los Aminodinitrotoluenos (ADNTs), se encontraron en todos los casos en los que se presentó degradación de TNT y durante la evaluación de los cultivos de enriquecimiento así como de las cepas y consorcios obtenidos, se acumularon estos compuestos. Se ha reportado que los ADNTs pueden ser recalcitrantes (**Stenuit et al., 2006; Maeda et al., 2006**), pero también existen reportes de su transformación por algunas bacterias aeróbicas pues son sustrato para las enzimas dioxigenasas (**Johnson et al., 2001**), por lo que como se expuso anteriormente, en muchos casos las reacciones anaerobias se acoplan con reacciones aeróbicas posteriores permitiendo mejorar la eficiencia de la transformación del TNT. Para el caso de los ensayos las concentraciones de ADNT presentes en el medio al parecer no inhibieron la degradación de TNT o PETN en ninguno de los tratamientos o microorganismos evaluados, pues la degradación se continuo presentándose aun cuando las concentraciones de ADNT en el medio se incrementaban. También, es necesario recalcar que dichas concentraciones nunca llegaron a ser altas debido a que al realizar los pases, se diluían estos compuestos a concentraciones mínimas en el medio de forma periódica.

A pesar que el protocolo empleado para la cuantificación de ADNTs no permitió separar completamente los picos de los dos isómeros que se pueden generar de este compuesto, se ha encontrado que en anaerobiosis el nitro en la posición *para* se reduce más fácil que en la posición *orto*, por lo que en la mayoría de los casos se obtiene una mayor proporción de 4ADNT que de 2ADNT (**Maeda et al., 2006; Claus et al., 2007**). De

acuerdo a la revisión realizada por **khan et al., (2013)** respecto al potencial tóxico del TNT y sus intermediarios de degradación, en la que se encontró que el 4ADNT es menos tóxico que su isómero 2ADNT y estos a su vez menos tóxicos que el TNT, lo cual podría explicar que no se presentara inhibición de la degradación aún con su acumulación en el medio.

Por otro lado, al evaluar la producción de nitritos durante la degradación de TNT y PETN tanto en las cepas aisladas como en los cultivos de enriquecimiento fue posible observar que al inicio de la degradación aumentaron los nitritos cuantificados y luego disminuyeron probablemente al ser consumidos. A pesar de que en estudios como los de **Oh et al. (2003)** y **Maeda et al., (2006)**, se ha encontrado que la degradación de TNT está relacionada directamente con el incremento de Nitrito en el medio de cultivo en el tiempo, en otros estudios como los de **Rahal & Lobna (2011)**, **Tamayo & Torres (2011)** y **Ávila (2012)** se ha observado que la cuantificación de los nitritos en el medio no es necesariamente un indicativo directo de la capacidad de los microorganismos para liberar este compuesto, puesto que en el caso en que el explosivo este siendo asimilado y empleado como fuente de nitrógeno, los nitritos liberados estarían siendo consumidos a diferentes tasas dependiendo de las condiciones de cultivo, las concentraciones iniciales, los metabolitos resultantes y por supuesto del microorganismo o consorcio estudiado, impidiendo que estos se acumulen en el medio y puedan ser cuantificados (**Hong-yan et al., 2013; González-Perez et al., 2007; Neal & Clint, 2007; Pennington & Brannon, 2002**).

Por la metodología empleada en este estudio, en los cultivos en donde se observa disminución en las concentraciones de los dos explosivos, es difícil saber si los nitritos cuantificados, provienen del TNT o de PETN, pues la liberación de este compuesto sucede durante la degradación de los dos explosivos. Sin embargo, en aquellos en los que sólo se observa la degradación de PETN, puede esperarse que los nitritos acumulados provengan del PETN, indicando que la tasa de liberación de nitrito del explosivo por parte de los microorganismos fue mayor a la de su consumo, causando la acumulación de estos compuestos durante un tiempo superior al observado durante la degradación de TNT, ya que los mayores valores de nitritos en los cultivos

degradadores de PETN se dieron incluso al día 20, mientras que para TNT las mayores concentraciones se observaron alrededor del segundo día y en los siguientes disminuían.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

- Las condiciones anaerobias favorecen la degradación tanto de TNT como de PETN permitiendo que este proceso sea más eficiente que al ser realizado en condiciones aerobias. Lo anterior implica que las condiciones anaerobias pueden ser recomendadas en tratamientos de biorremediación tanto *in situ* como *ex situ*.
- Para el caso puntual de este estudio, se concluyó que al comparar la degradación de TNT y PETN en los tres suelos evaluados tanto en condiciones aerobias como anaerobias, los factores que en conjunto mostraron la mayor degradación fueron: anaerobiosis, en el suelo planta de cristalización y a los 25 días.
- Fue posible obtener cultivos de enriquecimiento con capacidad de degradar TNT y PETN con la adición de fuentes de carbono, así como de cultivos degradadores de PETN sin la adición de fuentes de carbono adicionales, pues la presión selectiva por pases periódicos permitió favorecer el desarrollo de poblaciones capaces de crecer en presencia de explosivos y biotransformarlos en condiciones anaerobias.
- Este es el primer reporte de la obtención de microorganismos capaces de degradar PETN sin la adición de carbono permitiendo suponer que en condiciones anaerobias y de cultivo mixto, este explosivo podría estar siendo empleado directamente como fuente de carbono, aunque es necesario hacer evaluaciones adicionales que permitan verificar esta afirmación.

- Las condiciones anaerobias empleadas durante este estudio, permitieron la degradación tanto de TNT como de PETN, a diferencia de lo encontrado en condiciones aerobias, en las que se ha observado que la presencia de TNT puede inhibir la degradación de PETN.
- Ya fuera al ser empleados por cepas puras o por cultivos de enriquecimiento. Tanto TNT y PETN mostraron la tendencia a presentar la mayor degradación en los primeros días en contacto con los explosivos, mostrando la efectividad del muestreo en lugares previamente impactados con explosivos, pues las poblaciones se encuentran adaptadas a la presencia de estos compuestos.

7.2 Recomendaciones

- A pesar que se observó que en condiciones anaerobias se presenta la tendencia de TNT y PETN a ser degradados de forma más eficiente, sería prudente establecer las condiciones óptimas de degradación de TNT, PETN y pentolita en anaerobiosis, utilizando diferentes aceptores de electrones, distintas concentraciones de estos, así como de los explosivos a degradar, entre otros.
- Es necesario evaluar la capacidad degradadora de cada una de las cepas presentes en los consorcios de dos o más cepas, buscando generar conclusiones más completas, respecto a la degradación de estos explosivos.
- Es necesario realizar estudios más profundos que permitan determinar si se está llevando a cabo la utilización de PETN como única fuente de carbono y nitrógeno en las condiciones y por los microorganismos reportados en este estudio.

A. Anexo: Preparación del medio T2

Para el aislamiento de las cepas degradadoras de TNT y PETN a partir de las muestras de suelo contaminado con éste, se definió el medio de cultivo agar T2, cuya composición es:

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN	CANTIDAD
Tampón Llevada a 250 mL con agua destilada.	K_2HPO_4	17,5 g
	KH_2PO_4	7,5 g
Sales Llevada a 250 mL con agua destilada.	HCl	3 mL
	NaCl	12,5 g
	$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	5 g
	$CaCl_2$	1 g
Hierro Llevada a 100 mL con agua destilada.	HCl	3 mL
	$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,3 g
Elementos trazas Llevada a 1000 mL con agua destilada.	HCl (18 – 19%)	20 mL
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,2 g
	H_3BO_4	0,1 g
	$CaSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,05 g
	$CoSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,01 g
	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0,01 g
	$NiSO_4 \cdot 6 H_2O$	0,01 g

Fuente de carbono Llevada a 100 mL con agua destilada.	Glucosa	2,5g
	Glicerol	2 mL
	Citrato	2,5 g
	Acetato	2,5 g

Por cada 1000 mL de medio de cultivo T2 se utiliza antes de esterilizar:

Solución	Cantidad
Tampón	10 mL
Sales	10 mL
Fuente de carbono	10 mL
Agar (medio sólido)	15g/L

Se ajusta el pH a un pH 7,2 \pm 0,2 antes de esterilizar por autoclave. Después de esterilizar se adiciona:

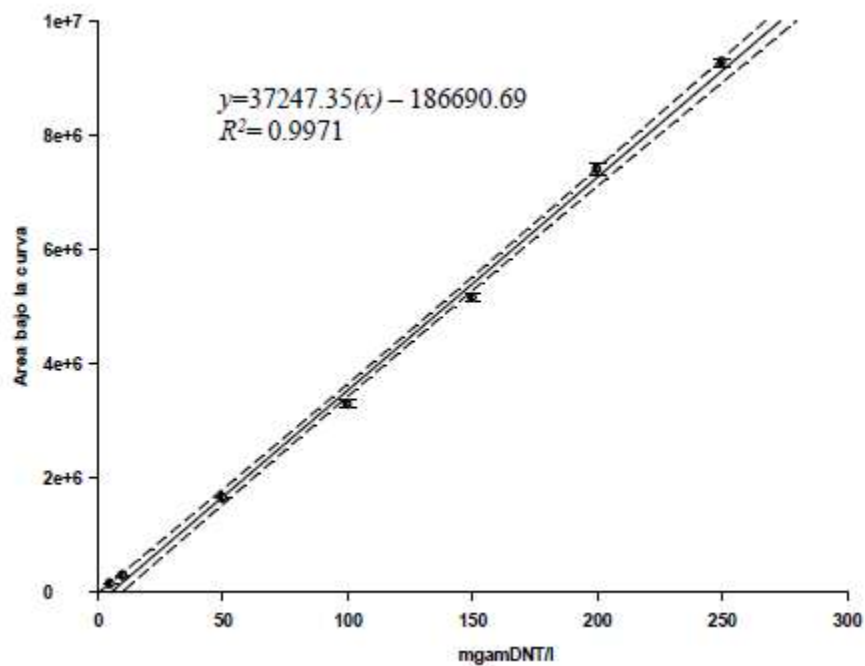
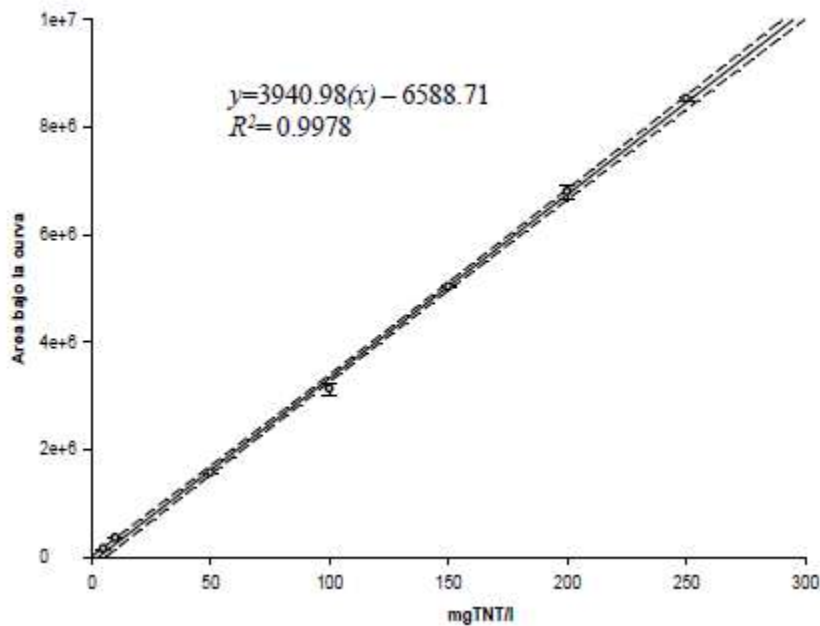
Solución	Cantidad
Hierro	1 mL
Trazas	1 mL
Solución Stock de la mezcla de explosivos	2,5 mL (cf:50 mg/L)

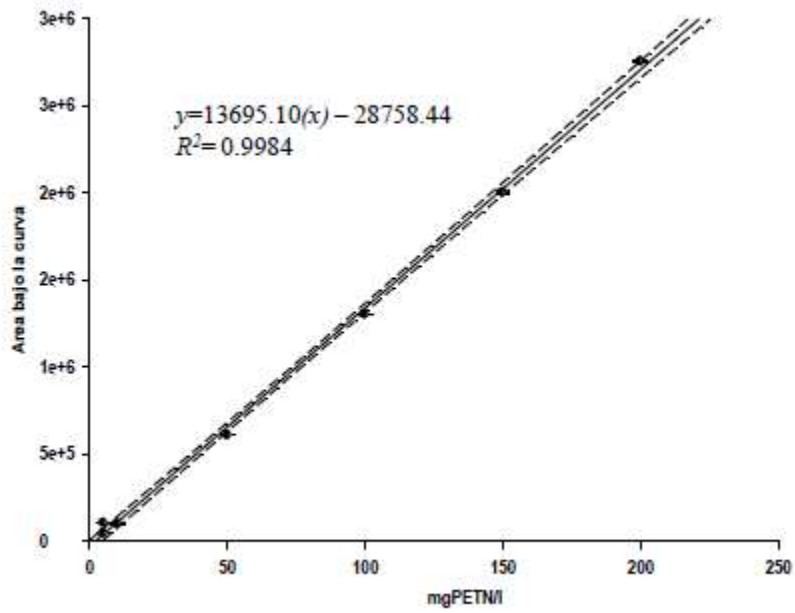
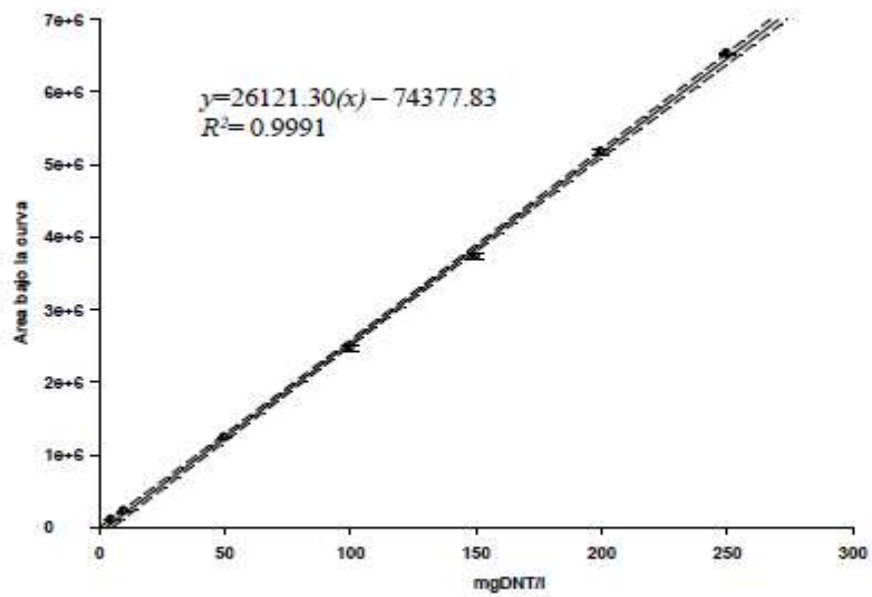
Solución Stock de explosivos

Se disuelven 2 g de cada uno de los explosivos: 2, 4, 6 -trinitrotolueno (TNT) y tetranitrato de pentaeritritol (PETN) en 100 mL acetona para tener una solución stock de concentración final de 20000 mg/L.

B. Anexo: Curvas de calibración

Curvas de calibración obtenidas a partir de estándares de referencia. Se muestra el promedio ± 1 ds y el intervalo de confianza (n=3).





C. Anexo: Ensayo preliminar de comparación de la degradación de TNT y PETN en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis

Condiciones del ensayo preliminar de degradación en condiciones aerobias y anaerobias

CONDICIÓN	TRATAMIENTO ANAEROBIO	TRATAMIENTO AEROBIO
Características de las UEs	Botellas (ambar) de 120 mL de capacidad con tapón de caucho	Erlenmeyer de 250 mL
Cantidad de suelo	10 g	20 g
Volumen final	50 mL	100 mL
N₂	Si	No
Agitación	No	Si (150 rpm)
Concentración explosivos	50 mg/L de cada uno	50 mg/L de cada uno
Repeticiones	2	2

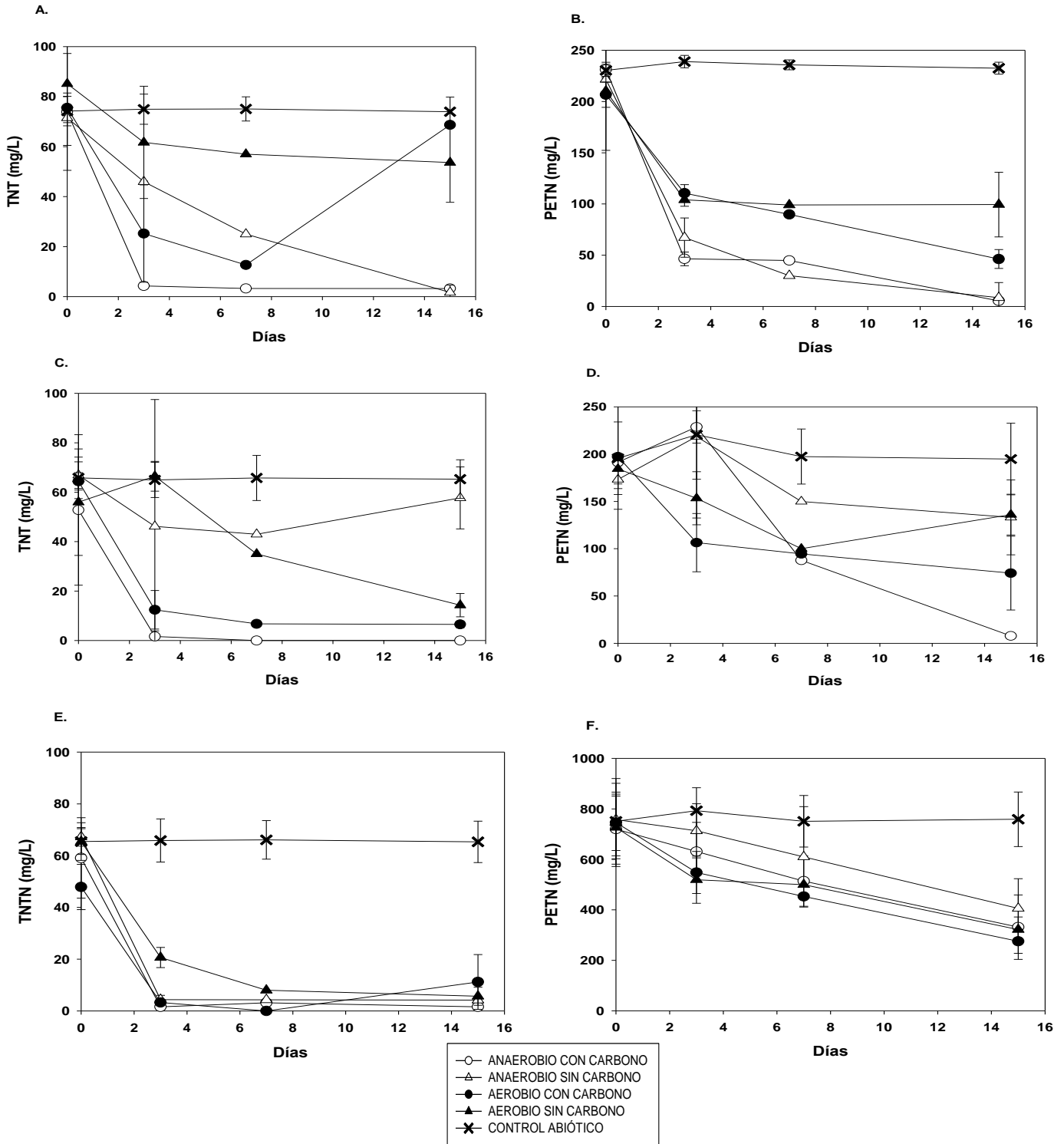
Condiciones:

-Temperatura ambiente de incubación, con oscuridad durante 20 días

.-Se tomaron muestras los días: 0, 3 y 15 de todos los tratamientos y controles. El día 7 se tomó muestra sólo de los tratamientos con fuente de carbono y el respectivo control abiótico.

-Muestreo: por alícuota de 2 mL

Resultados de la Degradación de TNT y PETN en condiciones de anaerobiosis vs aerobiosis con y sin fuente de carbono



A. y B. en Suelo campo de prueba. C. y D. Suelo Fitorremediación. E. y F. Suelo Planta de cristalización

D. Características macroscópicas de los microorganismos degradadores obtenidos.

Características macroscópicas apreciables en las colonias de los morfotipos aislados de muestras los cultivos de enriquecimiento sin pases

MORFOTIPO	FUENTE	DIÁMETRO (mm)	ELEVACIÓN	BORDE	FORMA	TEXTURA	COLOR
A 	CP	1,5	Convexa	Ondulado	Irregular	Cremosa	Beige
B 	CP	<1	Convexa	Ondulado	Irregular	Gota	Transp.
C 	CP	1	Umblicada	Entero	Puntual	Gota	Transp.
D 	CP	10	Plana	Entero	Puntual	Gota	Transp.
E 	F	12	Acuminada	Entero	Rizoide	Seca	Crema
F 	F	7	Plana	Ondulado	Filamentosa	Seca	Crema
I 	PC	8	Plana	Entero	Circular	Blanda	Transp.
J 	PC	2 tamaños	Umblicada	Ondulada	Circular/ Irregular	Blanda	Beige

***Transp.:** Transparente. **CP:** Campo de prueba. **F:** Fitorremediación. **PC:** Planta de cristalización

Características macroscópicas apreciables en las colonias de los morfotipos aislados de los cultivos de enriquecimiento tras cinco pases

MORFOTIPO	FUENTE	DIÁMETRO (mm)	ELEVACIÓN	BORDE	FORMA	TEXTURA	COLOR
1 	CPCFC	1	Acuminada	Ondulado	Irregular Cadena de colonias	Gota	Borde transp. Centro blanco
2 	FCFC	4,2	Convexa	Entero	Irregular	Cremosa	Beige
3 	PCCFC	5	Convexa	Entero	Irregular	Cremosa	Beige
4 	CPSFC	2	Acuminada	Entero	Puntual	Gota	Transp.
5 	FSFC	<1	Plana	Ondulada	Regular	Gota	Transp.
6 	PCSFC	6,3	Convexa	Entero	Irregular	Cremosa	Beige

*Transp.: Transparente. CFC: Con fuente de carbono. SFC: Sin fuente de carbono CP: Campo de prueba. F: Fitorremediación. PC: Planta de cristalización

E. Análisis estadísticos

FASE 1

ANÁLISIS DEL FACTOR AERÓBICO O ANAERÓBICO SOBRE LA DEGRADACIÓN DE EXPLOSIVOS EN SUELOS IMPACTADOS

MODELO DE DISEÑO EXPERIMENTAL:

$$[E]_i = \mu + C_j + S_k + T_s + (CS)_{jk} + (CT)_{js} + (ST)_{ks} + (CST)_{jks} + \varepsilon_{jksr}$$

$i=1,2,3.$ (Explosivos)

$j=1,2,.$ (Condición)

$k=1,2,3.$ (Suelos)

$s=1,2,3,4,5,6,7,8.$ (Tiempos)

$r=1,2,3.$ (Repeticiones)

EXPLOSIVO: TNT

ANÁLISIS DE VARIANZA

Analysis of Variance for TNT - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: CONDICIÓN	83113,0	2	41556,5	1632,53	0,0000
B: SUELO	2128,7	2	1064,35	41,81	0,0000
C: TIEMPO	68604,2	7	9800,59	385,01	0,0000
INTERACTIONS					
AB	1114,02	4	278,504	10,94	0,0000
AC	17593,7	14	1256,69	49,37	0,0000
BC	2819,19	14	201,371	7,91	0,0000
ABC	5177,67	28	184,917	7,26	0,0000
RESIDUAL	3309,18	130	25,4552		
TOTAL (CORRECTED)	185487,0	201			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

COMPARACIONES MÚLTIPLES DE SCHAFEE:**CONDICIÓN**

CONDICIÓN	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	68	24,0718	0,618875	X
2	69	31,573	0,612896	X
3	65	71,4223	0,636477	X
Contrast			Difference	+/- Limits
1 - 2			*-7,50119	0,0
1 - 3			*-47,3505	0,0
2 - 3			*-39,8493	0,0

* denotes a statistically significant difference.

SUELO

SUELO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	69	38,1697	0,612896	X
2	66	42,7626	0,630664	X
1	67	46,1349	0,624798	X
Contrast			Difference	+/- Limits
1 - 2			*3,3723	0,0
1 - 3			*7,96521	0,0
2 - 3			*4,59291	0,0

* denotes a statistically significant difference.

TIEMPO

TIEMPO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
7	26	23,3209	0,997578	X
4	25	24,7729	1,02349	X
6	26	25,5993	0,997578	X
5	24	25,7454	1,04877	X
3	26	45,0391	0,997578	X
1	25	59,261	1,02349	X
0	27	67,3829	0,970971	X
2	23	67,7241	1,07345	X

Contrast	Difference	+/-	Limits
0 - 1	*8,12185	0,0	
0 - 2	*-0,341185	0,0	
0 - 3	*22,3438	0,0	
0 - 4	*42,61	0,0	
0 - 5	*41,6375	0,0	
0 - 6	*41,7836	0,0	
0 - 7	*44,062	0,0	
1 - 2	*-8,46304	0,0	
1 - 3	*14,222	0,0	
1 - 4	*34,4881	0,0	
1 - 5	*33,5157	0,0	
1 - 6	*33,6617	0,0	
1 - 7	*35,9402	0,0	
2 - 3	*22,685	0,0	
2 - 4	*42,9512	0,0	
2 - 5	*41,9787	0,0	
2 - 6	*42,1247	0,0	
2 - 7	*44,4032	0,0	
3 - 4	*20,2662	0,0	
3 - 5	*19,2937	0,0	
3 - 6	*19,4397	0,0	
3 - 7	*21,7182	0,0	
4 - 5	*-0,972474	0,0	
4 - 6	*-0,826444	0,0	
4 - 7	*1,45204	0,0	
5 - 6	*0,14603	0,0	
5 - 7	*2,42451	0,0	
6 - 7	*2,27848	0,0	

* denotes a statistically significant difference.

EXPLOSIVO: PETN

3399,78	40,19	0,0000				
C:TIEMPO			7879,83	7	1125,69	13,31
						0,0000
INTERACTIONS						
AB			519,892	4	129,973	1,54
AC			10608,2	14	757,729	8,96
BC			9998,78	14	714,198	8,44
ABC			10942,1	28	390,788	4,62
RESIDUAL			10573,1	125	84,585	

TOTAL (CORRECTED)			88222,9	196		

All F-ratios are based on the residual mean square error.

COMPARACIONES MÚLTIPLES DE SCHAFEE:

CONDICIÓN

Multiple Range Tests for PENT by CONDICIÓN

Method: 95,0 percent Scheffe				
CONDICIÓN	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	67	53,4656	1,13893	X
2	67	63,4779	1,13893	X
3	63	86,4628	1,18113	X
Contrast			Difference	+/- Limits
1 - 2			*-10,0123	0,0
1 - 3			*-32,9971	0,0
2 - 3			*-22,9848	0,0

* denotes a statistically significant difference.

SUELO

Multiple Range Tests for PENT by SUELO

Method: 95,0 percent Scheffe				
SUELO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	67	61,2785	1,13893	X
2	63	66,561	1,18113	X
1	67	75,5667	1,13893	X
Contrast			Difference	+/- Limits
1 - 2			*9,00568	0,0
1 - 3			*14,2882	0,0
2 - 3			*5,2825	0,0

* denotes a statistically significant difference.

TIEMPO

Multiple Range Tests for PENT by TIEMPO

 Method: 95,0 percent Scheffe

TIEMPO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
7	24	58,3385	1,91178	X
6	23	59,9767	1,95677	X
3	26	64,4818	1,81847	X
4	25	66,476	1,86571	X
0	27	69,9198	1,76997	X
5	24	70,8553	1,91178	X
1	25	72,3711	1,86571	X
2	23	79,9976	1,95677	X

Contrast	Difference	+/-	Limits
0 - 1	*-2,4513	0,0	
0 - 2	*-10,0778	0,0	
0 - 3	*5,438	0,0	
0 - 4	*3,44378	0,0	
0 - 5	*-0,935556	0,0	
0 - 6	*9,94304	0,0	
0 - 7	*11,5813	0,0	
1 - 2	*-7,62652	0,0	
1 - 3	*7,8893	0,0	
1 - 4	*5,89507	0,0	
1 - 5	*1,51574	0,0	
1 - 6	*12,3943	0,0	
1 - 7	*14,0326	0,0	
2 - 3	*15,5158	0,0	
2 - 4	*13,5216	0,0	
2 - 5	*9,14226	0,0	
2 - 6	*20,0209	0,0	
2 - 7	*21,6591	0,0	
3 - 4	*-1,99422	0,0	
3 - 5	*-6,37356	0,0	
3 - 6	*4,50504	0,0	
3 - 7	*6,14326	0,0	
4 - 5	*-4,37933	0,0	
4 - 6	*6,49926	0,0	
4 - 7	*8,13748	0,0	
5 - 6	*10,8786	0,0	
5 - 7	*12,5168	0,0	
6 - 7	*1,63822	0,0	

 * denotes a statistically significant difference.

METABOLITO: ADNT**ANÁLISIS DE VARIANZA**

MODELO DE DISEÑO EXPERIMENTAL:

Analysis of Variance for ADNT - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:CONDICIÓN	2436,23	2	1218,11	156,70	0,0000
B:SUELO	462,354	2	231,177	29,74	0,0000
C:TIEMPO	3316,61	7	473,802	60,95	0,0000
INTERACTIONS					
AB	587,106	4	146,776	18,88	0,0000
AC	1418,95	14	101,353	13,04	0,0000
BC	3042,87	14	217,348	27,96	0,0000
ABC	1863,85	28	66,5661	8,56	0,0000
RESIDUAL	963,943	124	7,77373		
TOTAL (CORRECTED)	13784,3	195			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

COMPARACIONES MÚLTIPLES DE SCHAFEE:**CONDICIÓN**

Multiple Range Tests for ADNT by CONDICIÓN

Method: 95,0 percent Scheffe

CONDICIÓN	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	65	1,14017	0,35173	X
1	64	8,20829	0,354913	X
2	67	9,17876	0,345276	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*-0,970475	0,0
1 - 3	*7,06812	0,0
2 - 3	*8,0386	0,0

* denotes a statistically significant difference.

SUELO

Multiple Range Tests for ADNT by SUELO

Method: 95,0 percent Scheffe				
SUELO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	68	4,21842	0,342003	X
2	66	6,26412	0,348518	X
3	62	8,04468	0,361195	X

Contrast	Difference	+/-	Limits
1 - 2	*-2,04571	0,0	
1 - 3	*-3,82626	0,0	
2 - 3	*-1,78056	0,0	

* denotes a statistically significant difference.

TIEMPO

Multiple Range Tests for ADNT by TIEMPO

Method: 95,0 percent Scheffe				
TIEMPO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	27	0,0	0,536578	X
7	26	2,04548	0,551282	X
1	25	2,11852	0,565603	X
6	25	5,23922	0,565603	X
3	25	7,63056	0,565603	X
4	24	10,1887	0,579571	X
5	24	10,4685	0,579571	X
2	20	11,7149	0,632363	X

Contrast	Difference	+/-	Limits
0 - 1	*-2,11852	0,0	
0 - 2	*-11,7149	0,0	
0 - 3	*-7,63056	0,0	
0 - 4	*-10,1887	0,0	
0 - 5	*-10,4685	0,0	
0 - 6	*-5,23922	0,0	
0 - 7	*-2,04548	0,0	
1 - 2	*-9,59637	0,0	
1 - 3	*-5,51204	0,0	
1 - 4	*-8,07021	0,0	
1 - 5	*-8,35	0,0	
1 - 6	*-3,1207	0,0	
1 - 7	*0,073037	0,0	
2 - 3	*4,08433	0,0	
2 - 4	*1,52616	0,0	
2 - 5	*1,24637	0,0	
2 - 6	*6,47567	0,0	
2 - 7	*9,66941	0,0	
3 - 4	*-2,55818	0,0	
3 - 5	*-2,83796	0,0	
3 - 6	*2,39133	0,0	
3 - 7	*5,58507	0,0	
4 - 5	*-0,279785	0,0	
4 - 6	*4,94951	0,0	
4 - 7	*8,14325	0,0	

5 - 6	*5,2293	0,0
5 - 7	*8,42304	0,0
6 - 7	*3,19374	0,0

* denotes a statistically significant difference.

RESUMEN Y CONCLUSIÓN

RESUMEN			
Explosivo	Condición	Suelo	Tiempo
TNT	1	3	7
PENT	1	3	7
ADNT	3	1	0

Se concluye que los factores que mejor degradan los explosivos son: anaeróbico, en planta de cristalización y en 25 días.

FASE 2

ANÁLISIS DE LOS FACTORES SUELO, PASE, FUENTE, TIEMPO Y TRATAMIENTO EN CONDICIONES ANAERÓBICAS SOBRE LA DEGRADACIÓN DE EXPLOSIVOS EN SUELOS IMPACTADOS.

MODELO DE DISEÑO EXPERIMENTAL:

$$[E]_i = \mu + F_p + P_t + C_j + S_k + T_s + (CS)_{jk} + (CT)_{js} + (ST)_{ks} + (CST)_{jks} + \varepsilon_{jksr}$$

i=1,2,3. (Explosivos)

p=1,2. (Fuente de Carbono)

t=1,2,3,4,5,6. (pases)

j=1,2,3. (Suelos)

k=1,2. (Tiempos)

s=1,2. (Tratamientos)

r=1,2,3. (Repeticiones)

EXPLOSIVO: TNT

ANÁLISIS DE VARIANZA

Analysis of Variance for TNT - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:FUENTEC	7345,18	1	7345,18	35,42	0,0000
B:PASE	68869,8	5	13774,0	66,42	0,0000
C:SUELO	3197,82	2	1598,91	7,71	0,0006
D:TIEMPO	55333,3	1	55333,3	266,83	0,0000
E:tto	24815,1	1	24815,1	119,66	0,0000
INTERACTIONS					
AB	2395,65	5	479,131	2,31	0,0444
AC	3,65745	2	1,82872	0,01	0,9912
AD	8532,42	1	8532,42	41,15	0,0000
AE	864,083	1	864,083	4,17	0,0422
BC	21999,0	10	2199,9	10,61	0,0000
BD	18752,9	5	3750,58	18,09	0,0000
BE	6504,24	5	1300,85	6,27	0,0000
CD	353,388	2	176,694	0,85	0,4277
CE	13,8418	2	6,9209	0,03	0,9672
DE	24922,3	1	24922,3	120,18	0,0000
ABC	1285,49	10	128,549	0,62	0,7966
ABD	4743,79	5	948,758	4,58	0,0005
ABE	4020,08	5	804,017	3,88	0,0021
ACD	266,83	2	133,415	0,64	0,5263
ACE	18,1852	2	9,09262	0,04	0,9571

ADE	846,531	1	846,531	4,08	0,0443
BCD	6492,74	10	649,274	3,13	0,0008
BCE	1029,55	10	102,955	0,50	0,8917
BDE	6474,41	5	1294,88	6,24	0,0000
CDE	17,8204	2	8,9102	0,04	0,9579
ABCD	388,383	10	38,8383	0,19	0,9971
ABCE	348,842	10	34,8842	0,17	0,9982
ABDE	3992,62	5	798,523	3,85	0,0022
ACDE	17,456	2	8,72799	0,04	0,9588
BCDE	1038,2	10	103,82	0,50	0,8889
RESIDUAL	57027,1	275	207,371		

TOTAL (CORRECTED)	342810,0	408			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

COMPARACIONES MÚLTIPLES DE SCHAFEE:

FUENTE

Multiple Range Tests for TNT by FUENTEC

Method: 95,0 percent Scheffe				
FUENTEC	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	206	42,35	1,01317	X
0	203	50,9194	1,0231	X

Contrast			Difference	+/- Limits
0 - 1			*8,5694	0,0

* denotes a statistically significant difference.

PASE

Multiple Range Tests for TNT by PASE

Method: 95,0 percent Scheffe

PASE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	72	30,6469	1,6971	X
5	72	43,0572	1,6971	X
3	66	43,3002	1,80005	X
4	64	43,581	1,83308	X
6	69	45,1538	1,74877	X
1	66	74,0689	1,80005	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*43,422	0,0
1 - 3	*30,7687	0,0
1 - 4	*30,4879	0,0
1 - 5	*31,0117	0,0
1 - 6	*28,9151	0,0
2 - 3	*-12,6533	0,0
2 - 4	*-12,934	0,0
2 - 5	*-12,4102	0,0
2 - 6	*-14,5069	0,0
3 - 4	*-0,280743	0,0
3 - 5	*0,243056	0,0
3 - 6	*-1,85357	0,0
4 - 5	*0,523799	0,0
4 - 6	*-1,57282	0,0
5 - 6	*-2,09662	0,0

* denotes a statistically significant difference.

SUELO

Multiple Range Tests for TNT by SUELO

Method: 95,0 percent Scheffe

SUELO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	136	44,4872	1,24903	X
1	137	44,7838	1,24282	X
2	136	50,6329	1,24903	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*-5,84911	0,0
1 - 3	*0,296634	0,0
2 - 3	*6,14575	0,0

* denotes a statistically significant difference.

TIEMPO

Multiple Range Tests for TNT by TIEMPO

```

-----
Method: 95,0 percent Scheffe
TIEMPO      Count      LS Mean      LS Sigma      Homogeneous Groups
-----
20          207          34,8745      1,00987      X
0           202          58,3948      1,02635      X
-----
Contrast                Difference      +/- Limits
-----
0 - 20                    *23,5203      0,0
-----

```

* denotes a statistically significant difference.

TRATAMIENTO

Multiple Range Tests for TNT by TRATAMIENTO

```

-----
Method: 95,0 percent Scheffe
tto         Count      LS Mean      LS Sigma      Homogeneous Groups
-----
1           208          38,761       1,00649      X
0           201          54,5083      1,02943      X
-----
Contrast                Difference      +/- Limits
-----
0 - 1                    *15,7472      0,0
-----

```

* denotes a statistically significant difference

EXPLOSIVO: PENT ANÁLISIS DE VARIANZA

Analysis of Variance for PETN - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: FUENTE DE CARBOM	44099,2	1	44099,2	1,20	0,2735
B: PASE	7,8476E7	5	1,56952E7	428,47	0,0000
C: SUELO	1,45026E7	2	7,25131E6	197,96	0,0000
D: TIEMPO	15008,3	1	15008,3	0,41	0,5227
E: TRATAMIENTO	3,26303E6	1	3,26303E6	89,08	0,0000
INTERACTIONS					
AB	111694,0	5	22338,8	0,61	0,6924
AC	32015,8	2	16007,9	0,44	0,6464
AD	42335,0	1	42335,0	1,16	0,2833
AE	31551,0	1	31551,0	0,86	0,3542
BC	7,06471E7	10	7,06471E6	192,86	0,0000
BD	65617,0	5	13123,4	0,36	0,8767
BE	1,34196E7	5	2,68391E6	73,27	0,0000
CD	2,50831E6	2	1,25415E6	34,24	0,0000
CE	1,37116E6	2	685582,0	18,72	0,0000
DE	3,26328E6	1	3,26328E6	89,09	0,0000
ABC	223599,0	10	22359,9	0,61	0,8046
ABD	102797,0	5	20559,4	0,56	0,7297
ABE	147067,0	5	29413,4	0,80	0,5484
ACD	64803,4	2	32401,7	0,88	0,4141
ACE	34169,8	2	17084,9	0,47	0,6278
ADE	31725,5	1	31725,5	0,87	0,3529
BCD	1,16347E7	10	1,16347E6	31,76	0,0000
BCE	6,68235E6	10	668235,0	18,24	0,0000
BDE	1,34247E7	5	2,68494E6	73,30	0,0000
CDE	1,34974E6	2	674869,0	18,42	0,0000
ABCD	190844,0	10	19084,4	0,52	0,8748
ABCE	187266,0	10	18726,6	0,51	0,8816
ABDE	146802,0	5	29360,5	0,80	0,5494
ACDE	40560,0	2	20280,0	0,55	0,5755
BCDE	6,70003E6	10	670003,0	18,29	0,0000
RESIDUAL	9,63383E6	263	36630,5		
TOTAL (CORRECTED)	2,54762E8	396			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

COMPARACIONES MÚLTIPLES DE SCHAFEE:

FUENTE

Multiple Range Tests for PETN by FUENTE DE CARBOMO

Method: 95,0 percent Scheffe				
Level	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	202	236,467	13,6379	X
0	195	257,858	13,9345	X
Contrast		Difference		+/- Limits
0 - 1		*21,3911		0,0

* denotes a statistically significant difference.

PASE

Multiple Range Tests for PETN by PASE

Method: 95,0 percent Scheffe				
PASE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	65	37,5535	24,1378	X
5	69	41,3975	23,2498	X
6	65	43,1966	24,1378	X
2	72	44,2927	22,5556	X
4	62	44,634	24,7695	X
1	64	1271,9	24,3565	X
Contrast		Difference		+/- Limits
1 - 2		*1227,61		0,0
1 - 3		*1234,35		0,0
1 - 4		*1227,27		0,0
1 - 5		*1230,5		0,0
1 - 6		*1228,71		0,0
2 - 3		*6,73921		0,0
2 - 4		*-0,341275		0,0
2 - 5		*2,89515		0,0
2 - 6		*1,09613		0,0
3 - 4		*-7,08048		0,0
3 - 5		*-3,84406		0,0
3 - 6		*-5,64308		0,0
4 - 5		*3,23642		0,0
4 - 6		*1,4374		0,0
5 - 6		*-1,79902		0,0

* denotes a statistically significant difference.

SUELO

Multiple Range Tests for PETN by SUELO

```
-----
Method: 95,0 percent Scheffe
SUELO      Count      LS Mean      LS Sigma      Homogeneous Groups
-----
2           134         63,457       16,7535       X
1           130         163,865      17,0634       X
3           133         514,167      16,8298       X
-----
Contrast                Difference      +/-  Limits
-----
1 - 2                    *100,408      0,0
1 - 3                    *-350,302     0,0
2 - 3                    *-450,71      0,0
-----
```

* denotes a statistically significant difference.

TIEMPO

Multiple Range Tests for PETN by TIEMPO

```
-----
Method: 95,0 percent Scheffe
TIEMPO     Count      LS Mean      LS Sigma      Homogeneous Groups
-----
20          196         240,922      13,8924       X
0           201         253,403      13,6827       X
-----
Contrast                Difference      +/-  Limits
-----
0 - 20                    12,4808      0,0
-----
```

* denotes a statistically significant difference.

TRATAMIENTO

Multiple Range Tests for PETN by TRATAMIENTO

```
-----
Method: 95,0 percent Scheffe
TRATAMIENTO Count      LS Mean      LS Sigma      Homogeneous Groups
-----
1           199         155,171      13,7636       X
0           198         339,155      13,8088       X
-----
Contrast                Difference      +/-  Limits
-----
0 - 1                    *183,984      0,0
-----
```

* denotes a statistically significant difference.

METABOLITO: ADNT**MODELO DE DISEÑO EXPERIMENTAL:****ANÁLISIS DE VARIANZA**

Analysis of Variance for ADNT - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: FUENTE DE CARBOM	600,864	1	600,864	401,40	0,0000
B: PASE	2478,74	5	495,748	331,18	0,0000
C: SUELO	82,0621	2	41,031	27,41	0,0000
D: TIEMPO	2567,89	1	2567,89	1715,43	0,0000
E: TRATAMIENTO	2136,33	1	2136,33	1427,14	0,0000
INTERACTIONS					
AB	991,888	5	198,378	132,52	0,0000
AC	47,1399	2	23,57	15,75	0,0000
AD	368,403	1	368,403	246,11	0,0000
AE	337,364	1	337,364	225,37	0,0000
BC	306,079	10	30,6079	20,45	0,0000
BD	740,811	5	148,162	98,98	0,0000
BE	754,085	5	150,817	100,75	0,0000
CD	125,09	2	62,5449	41,78	0,0000
CE	0,813447	2	0,406724	0,27	0,7623
DE	2136,33	1	2136,33	1427,14	0,0000
ABC	159,781	10	15,9781	10,67	0,0000
ABD	338,923	5	67,7847	45,28	0,0000
ABE	619,768	5	123,954	82,81	0,0000
ACD	32,8402	2	16,4201	10,97	0,0000
ACE	9,08781	2	4,5439	3,04	0,0496
ADE	337,364	1	337,364	225,37	0,0000
BCD	324,111	10	32,4111	21,65	0,0000
BCE	17,3884	10	1,73884	1,16	0,3166
BDE	754,085	5	150,817	100,75	0,0000
CDE	0,813447	2	0,406724	0,27	0,7623
ABCD	159,166	10	15,9166	10,63	0,0000
ABCE	33,4353	10	3,34353	2,23	0,0161
ABDE	619,768	5	123,954	82,81	0,0000
ACDE	9,08781	2	4,5439	3,04	0,0496
BCDE	17,3884	10	1,73884	1,16	0,3166
RESIDUAL	435,607	291	1,49693		
TOTAL (CORRECTED)	17449,2	424			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

COMPARACIONES MÚLTIPLES DE SCHAFEE:

FUENTE

Multiple Range Tests for ADNT by FUENTE DE CARBOMO

Method: 95,0 percent Scheffe

Level	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	213	2,77733	0,0841108	X
1	212	5,16441	0,0843868	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 1	*-2,38708	0,0

* denotes a statistically significant difference.

PASE

Multiple Range Tests for ADNT by PASE

Method: 95,0 percent Scheffe

PASE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	72	1,09279	0,14419	X
5	72	1,43603	0,14419	X
4	72	3,92783	0,14419	X
6	71	4,14372	0,145634	X
2	72	4,58797	0,14419	X
1	66	8,63689	0,152936	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*4,04892	0,0
1 - 3	*7,5441	0,0
1 - 4	*4,70906	0,0
1 - 5	*7,20086	0,0
1 - 6	*4,49317	0,0
2 - 3	*3,49518	0,0
2 - 4	*0,660139	0,0
2 - 5	*3,15194	0,0
2 - 6	*0,444256	0,0
3 - 4	*-2,83504	0,0
3 - 5	*-0,343236	0,0
3 - 6	*-3,05092	0,0
4 - 5	*2,49181	0,0
4 - 6	*-0,215883	0,0
5 - 6	*-2,70769	0,0

* denotes a statistically significant difference.

SUELO

Multiple Range Tests for ADNT by SUELO

Method: 95,0 percent Scheffe				
SUELO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	142	3,38703	0,103014	X
1	142	4,07211	0,103014	X
3	141	4,45348	0,103521	X
Contrast			Difference	+/- Limits
1 - 2			*0,685083	0,0
1 - 3			*-0,381365	0,0
2 - 3			*-1,06645	0,0

* denotes a statistically significant difference.

TIEMPO

Multiple Range Tests for ADNT by TIEMPO

Method: 95,0 percent Scheffe				
TIEMPO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	216	1,50349	0,0832481	X
20	209	6,43825	0,085238	X
Contrast			Difference	+/- Limits
0 - 20			-4,93476	0,0

* denotes a statistically significant difference.

TRATAMIENTO

Multiple Range Tests for ADNT by TRATAMIENTO

Method: 95,0 percent Scheffe				
TRATAMIENTO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	210	1,72036	0,0849647	X
1	215	6,22139	0,083527	X
Contrast			Difference	+/- Limits
0 - 1			*-4,50103	0,0

* denotes a statistically significant difference.

RESUMEN Y CONCLUSIÓN

RESUMEN					
Explosivo	Fuente	Pase	Suelo	Tiempo	Tratamiento
TNT	1	2	3	20	1
PENT	1	3	2	20	1
ADNT	0	3	2	cualquiera	0

Se concluye que los factores que mejor degradan los explosivos son: anaeróbico, con carbono en el tercer pase, en planta de cristalización, en 20 días y con microorganismos.

FASE 3

COMPARACIÓN DE CEPAS PRIMER AISLAMIENTO

TNT

ANAVA

Analysis of Variance for TNT - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:CEPA	10589,2	7	1512,75	61,82	0,0000
B:TIEMPO	3085,26	2	1542,63	63,04	0,0000
INTERACTIONS					
AB	5375,46	14	383,961	15,69	0,0000
RESIDUAL	1394,9	57	24,472		
TOTAL (CORRECTED)	19819,1	80			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

SCHEFFE

TIEMPO

Multiple Range Tests for TNT by TIEMPO

Method: 95,0 percent Scheffe

TIEMPO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
14	27	36,6307	0,97772	X
5	27	39,0101	0,97772	X
0	27	51,1069	0,97772	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 5	*12,0968	0,0
0 - 14	*14,4762	0,0
5 - 14	*2,37946	0,0

* denotes a statistically significant difference.

CEPA

Multiple Range Tests for TNT by CEPA

Method: 95,0 percent Scheffe

CEPA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	9	20,6971	1,64897	X
3	9	26,7704	1,64897	X
6	9	42,5838	1,64897	X
1	9	44,1776	1,64897	X
5	9	46,216	1,64897	X
4	9	49,6262	1,64897	X
7	9	53,8558	1,64897	X
8	18	54,0669	1,166	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*23,4804	0,0
1 - 3	*17,4071	0,0
1 - 4	*-5,44867	0,0
1 - 5	*-2,03844	0,0
1 - 6	*1,59378	0,0
1 - 7	*-9,67822	0,0
1 - 8	*-9,88933	0,0
2 - 3	*-6,07333	0,0
2 - 4	*-28,9291	0,0
2 - 5	*-25,5189	0,0
2 - 6	*-21,8867	0,0
2 - 7	*-33,1587	0,0
2 - 8	*-33,3698	0,0
3 - 4	*-22,8558	0,0
3 - 5	*-19,4456	0,0
3 - 6	*-15,8133	0,0
3 - 7	*-27,0853	0,0
3 - 8	*-27,2964	0,0
4 - 5	*3,41022	0,0
4 - 6	*7,04244	0,0
4 - 7	*-4,22956	0,0
4 - 8	*-4,44067	0,0
5 - 6	*3,63222	0,0
5 - 7	*-7,63978	0,0
5 - 8	*-7,85089	0,0
6 - 7	*-11,272	0,0
6 - 8	*-11,4831	0,0
7 - 8	*-0,211111	0,0

* denotes a statistically significant difference.

PENT**ANAVA**

Analysis of Variance for PETN - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:CEPA	4203,06	7	600,437	19,74	0,0000
B:TIEMPO	363,556	2	181,778	5,98	0,0044
INTERACTIONS					
AB	1324,91	14	94,6363	3,11	0,0012
RESIDUAL	1733,54	57	30,413		
TOTAL (CORRECTED)	7656,69	80			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

SCHEFFE**CEPA**

Multiple Range Tests for PETN by CEPA

Method: 95,0 percent Scheffe

CEPA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	9	32,7978	1,83827	X
3	9	37,3802	1,83827	X
5	9	45,9804	1,83827	X
6	9	48,5798	1,83827	X
7	9	49,5664	1,83827	X
4	9	49,6398	1,83827	X
1	9	49,6523	1,83827	X
8	18	55,632	1,29985	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*16,8546	0,0
1 - 3	*12,2721	0,0
1 - 4	*0,0125556	0,0
1 - 5	*3,67189	0,0
1 - 6	*1,07256	0,0
1 - 7	*0,0858889	0,0
1 - 8	*-5,97967	0,0
2 - 3	*-4,58244	0,0
2 - 4	*-16,842	0,0
2 - 5	*-13,1827	0,0
2 - 6	*-15,782	0,0
2 - 7	*-16,7687	0,0
2 - 8	*-22,8342	0,0
3 - 4	*-12,2596	0,0
3 - 5	*-8,60022	0,0
3 - 6	*-11,1996	0,0

3 - 7	*-12,1862	0,0
3 - 8	*-18,2518	0,0
4 - 5	*3,65933	0,0
4 - 6	*1,06	0,0
4 - 7	*0,0733333	0,0
4 - 8	*-5,99222	0,0
5 - 6	*-2,59933	0,0
5 - 7	*-3,586	0,0
5 - 8	*-9,65156	0,0
6 - 7	*-0,986667	0,0
6 - 8	*-7,05222	0,0
7 - 8	*-6,06556	0,0

 * denotes a statistically significant difference.

TIEMPO

Multiple Range Tests for PETN by TIEMPO

 Method: 95,0 percent Scheffe

TIEMPO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
14	27	44,0598	1,08996	X
5	27	45,2478	1,08996	X
0	27	49,1531	1,08996	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 5	*3,90529	0,0
0 - 14	*5,09329	0,0
5 - 14	*1,188	0,0

 * denotes a statistically significant difference.

ADNT

ANAVA

Analysis of Variance for ADNT - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value

MAIN EFFECTS					
A:CEPA	353,639	7	50,5198	196,55	0,0000
B:TIEMPO	404,861	2	202,43	787,55	0,0000
INTERACTIONS					
AB	203,738	14	14,5527	56,62	0,0000
RESIDUAL	14,6512	57	0,257038		

TOTAL (CORRECTED)	909,412	80			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

SCHEFFE

CEPA

Multiple Range Tests for ADNT by CEPA

Method: 95,0 percent Scheffe				
CEPA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
8	18	0,0	0,119498	X
4	9	1,80822	0,168996	X
5	9	1,996	0,168996	X
6	9	2,01056	0,168996	X
1	9	3,624	0,168996	X
7	9	4,06333	0,168996	X
3	9	5,03356	0,168996	X
2	9	6,55467	0,168996	X

Contrast	Difference	+/-	Limits
1 - 2	*-2,93067	0,0	
1 - 3	*-1,40956	0,0	
1 - 4	*1,81578	0,0	
1 - 5	*1,628	0,0	
1 - 6	*1,61344	0,0	
1 - 7	*-0,439333	0,0	
1 - 8	*3,624	0,0	
2 - 3	*1,52111	0,0	
2 - 4	*4,74644	0,0	
2 - 5	*4,55867	0,0	
2 - 6	*4,54411	0,0	
2 - 7	*2,49133	0,0	
2 - 8	*6,55467	0,0	
3 - 4	*3,22533	0,0	
3 - 5	*3,03756	0,0	
3 - 6	*3,023	0,0	
3 - 7	*0,970222	0,0	
3 - 8	*5,03356	0,0	
4 - 5	*-0,187778	0,0	
4 - 6	*-0,202333	0,0	
4 - 7	*-2,25511	0,0	
4 - 8	*1,80822	0,0	
5 - 6	*-0,0145556	0,0	
5 - 7	*-2,06733	0,0	
5 - 8	*1,996	0,0	
6 - 7	*-2,05278	0,0	
6 - 8	*2,01056	0,0	
7 - 8	*4,06333	0,0	

* denotes a statistically significant difference.

TIEMPO

Multiple Range Tests for ADNT by TIEMPO

Method: 95,0 percent Scheffe

TIEMPO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	27	0,0	0,100203	X
5	27	3,97629	0,100203	X
14	27	5,43258	0,100203	X

Contrast	Difference	+/-	Limits
0 - 5	*-3,97629	0,0	
0 - 14	*-5,43258	0,0	
5 - 14	*-1,45629	0,0	

* denotes a statistically significant difference.

NO2**ANAVA**Analysis of Variance for NO₂ - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:CEPA	62,1141	7	8,87344	1029,32	0,0000
B:TIEMPO	19,2695	2	9,63476	1117,63	0,0000
INTERACTIONS					
AB	43,7701	14	3,12644	362,67	0,0000
RESIDUAL	0,491378	57	0,00862067		
TOTAL (CORRECTED)	122,448	80			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

SCHEFFE

CEPA

Multiple Range Tests for NO₂ by CEPA

Method: 95,0 percent Scheffe				
CEPA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
4	9	0,0	0,0309492	X
7	9	0,0	0,0309492	X
1	9	0,0	0,0309492	X
8	18	0,00311111	0,0218844	X
5	9	0,00333333	0,0309492	X
2	9	1,418	0,0309492	X
6	9	1,56222	0,0309492	X
3	9	2,37711	0,0309492	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*-1,418	0,0
1 - 3	*-2,37711	0,0
1 - 4	*0,0	0,0
1 - 5	*-0,00333333	0,0
1 - 6	*-1,56222	0,0
1 - 7	*0,0	0,0
1 - 8	*-0,00311111	0,0
2 - 3	*-0,959111	0,0
2 - 4	*1,418	0,0
2 - 5	*1,41467	0,0
2 - 6	*-0,144222	0,0
2 - 7	*1,418	0,0
2 - 8	*1,41489	0,0
3 - 4	*2,37711	0,0
3 - 5	*2,37378	0,0
3 - 6	*0,814889	0,0
3 - 7	*2,37711	0,0
3 - 8	*2,374	0,0
4 - 5	*-0,00333333	0,0
4 - 6	*-1,56222	0,0
4 - 7	*0,0	0,0
4 - 8	*-0,00311111	0,0
5 - 6	*-1,55889	0,0
5 - 7	*0,00333333	0,0
5 - 8	*0,000222222	0,0
6 - 7	*1,56222	0,0
6 - 8	*1,55911	0,0
7 - 8	*-0,00311111	0,0

* denotes a statistically significant difference.

TIEMPO

Multiple Range Tests for NO₂ by TIEMPO

Method: 95,0 percent Scheffe

TIEMPO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	27	0,00191667	0,0183506	X
5	27	0,801938	0,0183506	X
14	27	1,20756	0,0183506	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 5	*-0,800021	0,0
0 - 14	*-1,20565	0,0
5 - 14	*-0,405625	0,0

* denotes a statistically significant difference.

DO

ANOVA
Analysis of Variance for DO - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:CEPA	0,115518	7	0,0165026	496,56	0,0000
B:TIEMPO	0,027614	2	0,013807	415,45	0,0000
INTERACTIONS					
AB	0,0422879	14	0,00302057	90,89	0,0000
RESIDUAL	0,00189433	57	0,0000332339		
TOTAL (CORRECTED)	0,182689	80			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

SCHEFFE

CEPA

Multiple Range Tests for DO by CEPA

Method: 95,0 percent Scheffe

CEPA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
8	18	0,00222222	0,0013588	X
4	9	0,00666667	0,00192163	X
1	9	0,0177778	0,00192163	X
5	9	0,0183333	0,00192163	X
7	9	0,0223333	0,00192163	X
3	9	0,0801111	0,00192163	X
2	9	0,0881111	0,00192163	X
6	9	0,101	0,00192163	X

Contrast	Difference	+/- Limits
1 - 2	*-0,0703333	0,0
1 - 3	*-0,0623333	0,0
1 - 4	*0,0111111	0,0
1 - 5	*-0,000555556	0,0
1 - 6	*-0,0832222	0,0
1 - 7	*-0,00455556	0,0
1 - 8	*0,0155556	0,0
2 - 3	*0,008	0,0
2 - 4	*0,0814444	0,0
2 - 5	*0,0697778	0,0
2 - 6	*-0,0128889	0,0
2 - 7	*0,0657778	0,0
2 - 8	*0,0858889	0,0
3 - 4	*0,0734444	0,0
3 - 5	*0,0617778	0,0
3 - 6	*-0,0208889	0,0
3 - 7	*0,0577778	0,0
3 - 8	*0,0778889	0,0
4 - 5	*-0,0116667	0,0
4 - 6	*-0,0943333	0,0
4 - 7	*-0,0156667	0,0
4 - 8	*0,00444444	0,0
5 - 6	*-0,0826667	0,0
5 - 7	*-0,004	0,0
5 - 8	*0,0161111	0,0
6 - 7	*0,0786667	0,0
6 - 8	*0,0987778	0,0
7 - 8	*0,0201111	0,0

* denotes a statistically significant difference.

TIEMPO

Multiple Range Tests for DO by TIEMPO

Method: 95,0 percent Scheffe				
TIEMPO	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	27	0,015625	0,00113939	X
5	27	0,0514375	0,00113939	X
14	27	0,0591458	0,00113939	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0 - 5	*-0,0358125	0,0
0 - 14	*-0,0435208	0,0
5 - 14	*-0,00770833	0,0

* denotes a statistically significant difference.

RESUMEN Y CONCLUSIÓN

	Cepa	Tiempo
TNT	2	14
PENT	2	14
ADNT	8	0
NO ₂	4	0
DO	8	0

8. Bibliografía

Agrawan J., Hodgson R. 2007. *Organic chemistry of explosives*. Primera edición. Jhon Wiley & Sons Limited. England, UK. 384 p

Akhavan J. 2004. *The Chemistry of Explosives*. Segunda edición. RSC Paperbacks. England, UK. 196 p

Alvarez M.A., Kitss C.L., Botsford J.L., unkefer P.J. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* strain MA01 aerobically metabolizes the aminodinitrotoluenes produced by 2,4,6-trinitrotoluene nitro group reduction. *Canadian journal of microbiology*. 41:984-991.

Alvarez P.J., Illman W.A. 2006. *Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models*. Wiley-Interscience. 609 p.

Andrews K.T., Patel, B.K.C. 1996. *Fervidobacterium gondwanense* sp. nov., a New Thermophilic Anaerobic Bacterium Isolated from Nonvolcanically Heated Geothermal Waters of the Great Artesian Basin of Australia. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**(1):265–269

Anzai Y., Kim H., park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. 2000. Phylogenic affiliation of the Pseudomonads based on 16s r RNA sequence. *International journal of systematic and evolutive microbiology*. 4:1563-1589

Ávila F.H. 2011 Estudio de la degradación aeróbica de 2,4,6-Trinitrotolueno y pentaeritritol tetranitrato por bacterias aisladas de suelos contaminados. Maestría en

Ciencias Biológicas. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia

Bae B., Autenrieth R.L., Bonner J.S. 1995. Aerobic biotransformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene. P. 231-238. En: Hinchee R., Hoeppele E., Anderson D.B (Eds). *Bioremediation of Recalcitrant organics*. Battelle Press. Columbus, Ohio. USA.

Becker. N.M. 1995. Fate of selected high explosives in the environment: A literature review. Depleted Uranium Investigations Program. Los Alamos national Laboratory. University of California. USA

Blinks P.R., French C.E., Nicklin S & Bruce N.C. 1996. Degradation of pentaerythritol tetranitrate by *Enterobacter cloacae* PB2. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:1214-1219

Boopathy R., Wilson M., Kulpa C.F. 1993a. Anaerobic removal of 2,4,6-trinitrotoluene under different electron accepting conditions. Laboratory Study. *Water Environmental Research*. 65:271-275

Boopathy R., Kulpa C.F. 1993b. metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Desulfovibrio sp.* (Strain B). *Applied microbial biotechnology*. 39:270-275

Boopathy R., Manning J., Kulpa C.F. 1998a. Biotransformation of explosives by anaerobic consortia in liquid culture and in soil slurry. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 41(1):67-74

Boopathy R., Manning J., Kulpa C.F. 1998b. Anaerobic biodegradation of explosives and related compounds by sulfate-reducing and methanogenic bacteria: A review

Boopathy R. 2000. Bioremediation of contaminated soil. . *International Biodeterioration & Biodegradation*. 46:29-36

Bradley P.M., Chapelle F.H. Landmeyer J.E., Schumacher J.G. 1994. Microbial Transformation of Nitroaromatics in Surface Soils and Aquifer Materials. *Applied and environmental microbiology*. 60(6): 2170-2175.

Bradley P.M., Chapelle F.H. 1995. 2,4,6-trinitrotoluene mineralization in contaminated soil. *Environmental Sciences Techenology*. 29:802-806

Brenner K, You L, Arnold FH. 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*. 26(9):483-489.

Bruns-Nagel A., Knicker H., Drzygwa O., Butehorn U., Steinbach K., Gemsa D., Von Low E. 2000. Characterization of ¹⁵N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state ¹⁵N NMR spectroscopy. Systematic investigation of whole soil and different humic fractions. *Environmental Sciences technology*. 34(8):1549-1556

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

Caballero A., Ramos J.L. 2006. A double mutant of *Pseudomonas putida* JLR11 deficient in the synthesis of the nitroreductase PnrA and assimilatory nitrite reductase NasB is impaired for growth on 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Environmental Microbiology*. 8:1306-1310.

Chong-Suk C., Hyoun-Young K., Yong-Mi K., Kyung S.B., Hong-Gyus S. 2002. Transformations of 2,4,6-trinitrotoluene in various conditions by *Klebsiella sp.*, strain C1 isolated from activated sludge. *The journal of microbiology*. 40(3):193-198

Clark B., Boopathy R. 2007. Evaluation of bioremediation methods for the treatment of soil contaminated with explosives in Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana. *Journal of Hazardous Materials*. 143(3):543-648

Claus H., Bausinger T., Lehmler I., Perret N., Fels G., Dehner U., Preuss J., Köning H. 2007. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Raoultella terrigena*. *Biodegradation*. 18:27-35

Craig H.D., Marcos A., Lewis H., Thompson C. 1995. Bioremediation of explosives-contaminated soil: A status review. En: Proceedings, Tenth Annual Conference on Hazardous Waste Research, great plains rocky mountain hazardous substances research center. Manhattan, Kansas.

Declercq L., Cappuyns V., Duclos Y. 2012. Monitored natural attenuation (MNA) of contaminated soils: state of the art in Europe--a critical evaluation. *Sciences total Environment*. 426:393-405

Dubois F.W., Bayto J.F. 1991. Weathering of explosives for twenty years. Los Alamos national laboratory. University of California. USA.

Drzyzga O., Bruns-Nagel D., Gorontzy T., Blotevogel K-H., Gemsa D., Von Low E. 1998. Mass balance studies with ¹⁴C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) mediated by anaerobic *desulfovibrio* species and *Serratia* species. *Curent microbiology*. 37:380-386

Duque E., Haïdour A., Godoy F., Ramos J.L. 1993. Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6- trinitrotoluene. *Journal of Bacteriology*. 175:2278-2283.

Ederer M.M., Lewis T.A., Crawford R.L. 1997. 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) transformation by Clostridia isolated from a munition-fed bioreactor: comparison with non adapted bacteria. *Journal of industrial microbiology & Biotechnology*. 18: 82-88.

EPA- Environmental Protection Agency - Handbook on the management of ordnance and explosives at closed, transferring, and transferred ranges and other sites. 2001.

Esteve-Núñez A., Ramos J.L. 1998. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. JLR11. *Environmental Science & Technology*. 32:3802-3808

Esteve-Núñez A., Caballero A., Ramos J.L. 2001. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65:335-352.

Esteve-Núñez A., Lucchesi G., Philipp B., Schink B., Ramos J.L. 2000. Respiration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Strain JLR11. *Journal of bacteriology*. 182(5): 1352-1355

Fuller M.E., Manning Jr. 2004. Microbiological changes during bioremediation of explosives-contaminated soils in laboratory and pilot-scale bioslurry reactors. *Bioresource Technology*. 91(2):123-33.

García É. 2011. Recuperación y evaluación de la capacidad degradadora de consorcios bacterianos aislados de ambientes impactados con TNT y PETN. Trabajo de grado. Maestría Ciencias-Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Garzón V., Rodríguez G. 2011. Evaluación de la producción de biosurfactantes por cepas degradadoras de TNT. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Departamento de microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Georgie N.E. 2011. Biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT), Pentaerythritol tetranitrate (PETN) & Pentolite by environmental Microbes. Doctor of Philosophy in Sciences. Department of biotechnology & environmental biology. School of applied Sciences. RMIT University.

Ghazali F.M, Rahman R.N.Z.A., Salleh A.B., Basri M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 54(1):61-7.

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

Gorontzy T., Küver J., Blotevogel K-H. 1993. Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. *Journal of general microbiology*. 1993. 139:1331-1336

Gunnison D., Pennington J.C., Price C.B. Myrick G.B. 1993. *Screening Test and Isolation Procedure for TNT-Degrading Microorganisms*. Technical Report IRRP-93-2. Installation Resporatiom Research Program. 53 p.

Harderlein S.B., Schwarzenbach R.P. 1995. Environmental processes influencing the rate of abiotic reduction of nitroaromatic compounds in the subsurface. En: Spain J.C., Hughes J.B., Knackmuss H (Eds). *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. CRC Press, Boca Raton, Florida. USA.

Haïdour A., Ramos J.L., 1996. Identification of products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. *Environmental Sciences Technology*. 30:2365-2370

Hawari J., Beaudet S., Halasz A., Thiboutot S., Ampleman G. 2000. Microbial degradation of explosives: Biotransformation versus mineralization. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54: 605-618.

Hong-yan L., Chang-Ping Y., Zu-Liang C., 2013. Aerobic and anaerobic biodegradation of TNT by newly isolated *Bacillus mycoides*. *Ecological engineering*. 52:270-277

Husserl J., Spain J.C., Hughes J.B. 2010. Growth of *Arthrobacter* sp., Strain JBH1 on Nitroglycerin as the sole source of carbon and nitrogen. *Applied and environmental microbiology*. 76 (5):1689-1691.

HSDB Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine, Bethesda, MD, <http://toxnet.nlm.nih.gov/> (Acceso Agosto 2011).

Huang S., Lindahl P.A., Wang C., Bennett G.N., Rudolph F.D., Huges J.B. 2000. 2,4,6-Trinitrotoluene reduction by Carbon Monoxide Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(4):1474-1478

Hudcova T., Halecky M., Kozliak E., Stiborova M., Paca J. 2011. Aerobic degradation of 2,4-dinitrotoluene by individual bacterial strains and defined mixed population in submerged cultures. *Journal of Hazardous Materials*. 192: 605-613.

IGAC-INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. 2010. ¿Cómo realizar la toma de muestras para suelos? Métodos analíticos empleados por el Laboratorio Nacional de Suelos. Laboratorio de suelos. Bogotá. Colombia

In B-H., Park J-S., Namkoong W., Hwang E-Y., Kim J-D. 2008. Effect of co-substrate on anaerobic slurry phase bioremediation of TNT-contaminated soil. *Korean Journal of chemical Engineering*. 25(1):102-107.

Iwamoto T., Natsu M. 2001. Current Bioremediation Practice and Perspective. *Journal of bioscience and bioengineering*. 92(1):1-8

Jerger D.E., Woodhull P. 2000. Applications and cost for biological treatment of Explosives-Contaminated soils in the U.S. En: Spain J.C., Hughes J.B., Knackmuss H (Eds). *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. CRC Press, Boca Raton, Florida. USA.

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

Kalderis D., Juhasz A.L., boopathy R., Comfort R., 2011. Soils contaminated with explosives: Environmental fate and evaluation of state-of-the-art remediation processes (IUPAC technical report). *Pure applied chemistry*. 83(7):1407-1484

Khan F.I., Huzain T., Hejazi R. 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of environmental management*. 71: 95-122

Khan M.I., Jaejin L., Joonhong P. 2013. A toxicological review on potential microbial degradation intermediates of 2,4,6-trinitrotoluene, and its implications in bioremediation. *KSCE Journal of civil Engineering*. 17(6): 1223-1231

Kitts C.L., Cunningham D.P., Unkefer P.J. 1994. Isolation of three hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-triazine-degrading species of the family Enterobacteraceae from nitramine explosive-contaminated soil. *Applied and environmental microbiology*. 60(12):4608-4611

Krumholz L.R., Li J., Clarkson W.W. Wilber G.G., Sulfita J.M. 1997. Transformations of TNT and related aminotoluenes in groundwater aquifer slurries under different electron-accepting conditions. *Journal of industrial microbiology & Biotechnology*. 18: 161-169

Kulkarni M., Chaudhari A. 2007. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. *Journal of environmental Management*. 5: 496-512.

Latorre N.E. 2007. Evaluación de medios de cultivo altos y bajos en nutrientes para la recuperación de heterótrofos edáficos en la ecorregión cafetera de los andes. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Departamento de microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Lewis T.A., Goszczynski S., Crawford, R.L., Korus, R.A., Admassu, W. 1996. Products of anaerobic 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transformation by *Clostridium bifermentans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(12):669–4674.

Lewis T.A., Ederer M.M., Crawford R.L. Crawford D.L. 1997. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18:89-96

Lewis T.A., Newcombe D.A., Crawford R.L. 2004. Bioremediation of soils contaminated with explosives. *Journal of environmental management*. 70:291-230

Lima D.R.S., Bezerra M.L.S., Neves E.B & Moreira F.R. 2011. Impact of ammunition and military explosives on human health and the environment. *Reviews on Environmental Health* 26: 101-110.

Madsen E.L. 1997. Methods for determining Biodegradability. Capítulo 77. En: Hurst C.J., Knudsen G., McInerney M.J., Stetzenbach L.D., Walter M.V. *Manual of environmental microbiology*. Segunda Edición. American Society for microbiology. ASM press. Washington. USA. 894 p

Maeda T., Kadokami K., Ogawa I. 2006. Characterization of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)-Metabolizing Bacteria Isolated from TNT-Polluted Soils in the Yamada Green Zone, Kitakyushu, Japan. *Journal of Environmental Biotechnology* 6:33-39.

Moshe S.S-B., Ronen Z., Dahan O., Weisbrod N., Groisman L., Adar E., Nativ R. 2009. Secuential biodegradation of TNT, RDX and HMX in a mixture. *Environmental pollution*. 157:2231-2238

Mulligan C.N., Yong R.N. 2004. Natural attenuation of contaminated soils. *Environment international*. 30(4):587-601.

Miyares P.H., Reynolds C.M., Coffin R.B., Cifuentes L.C., Jenkins T.F., Pennington J.C. 1999. Use of carbon and nitrogen stable isotopes as in situ tracers for monitoring the

atural attenuation of explosives. USA Cold Regions Research and Engineering laboratory, Special Report 99-18.

Muter O., Potapova K., Limane B., Sproge K., Jakobsons I., Cepurnieks G., Bartkevics V. 2012. The role of nutrients in the biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid and soil. *Journal of Environmental Management* 98: 51-55.

Naumova P. R., Selivanovskaya S.Y., Mingatina, F.A. 1986. Possibility of deep bacterial destruction of 2,4,6-trinitrotoluene. *Mikrobiologiya*. 57: 218-222.

Neal R.A., Clint M.A. 2007. Anaerobic biotransformation of explosives in aquifer slurries amended with ethanol and propylene glycol. *Chemosphere*. 66 (10): 1849 – 1856

Nelson K.E., Weinel C., Paulsen I.T. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 4: 799-808.

Nishino S.F. Spain J. 2001. Biodegradation, transformation, and bioremediation of nitroaromatic compounds. En: Hurst C.J., Crawford R.L., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach L.D. (Eds). *Manual of Environmental Microbiology*. Segunda edición. ASM Press, Washington, DC. 987–996 p

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

Oh B.T., Shea P.J., Drijber R.A., Vasilyeva G.K., Sarath G. 2003. TNT biotransformation and detoxification by a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Biodegradation*.14:309-319.

Park C., Kim T.H., Kim S., Lee J., Kim S.W. 2003a. Bioremediation of 2,4,6-Trinitrotoluene Contaminated Soil in Slurry and Column Reactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96:429-433.

- Park C., Kim T.H., Kim S., Kim S.W., Lee J., Kim S.H. 2003b. Optimization for biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Pseudomonas putida*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95:567-571.
- Pennington J.C., Bowen R., Brannon J.M., Zakikhani M., Harreison D.W. 1999. Draft Protocol for Evaluating, Selecting, and Implementing Monitored Natural Attenuation at Explosives-Contaminated Sites. Army engineer waterways experiment station Vicksburg ms environmental lab.
- Pennington J.C., Brannon J.M. 2002. Environmental fate of explosives. *Thermochemica Acta*. 384:163-172
- Preuss A., Fimpel J., Diekert G. 1993. Anaerobic transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). *Archives of microbiology*. 159:345-353
- Rahal A.Gh., Lobna A.M. 2011. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by soil bacteria isolated from TNT contaminated soil. *Australian journal of basic and applied sciencies*. 5(2):6-17
- Rahal A.G., Moussa L.A. 2011. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by soil bacteria isolated from TNT contaminated soil. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 5: 8-17.
- Razo-Flores E., Donlon B., Lettinga G., Field J.A. 1997. Biotransformation and biodegradation of N-substituted aromatics in methagenomic granular sludge. *FEMS microbial review*. 20(3-4):525-538
- Robertson B.K., Jjemba P.K. 2005. Enhanced bioavility of sorbed 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by bacterial consortium. *Chemosphere*. 58:263-270.

Roldan M.D., Pérez-Reinado E., Castillo F., Moreno-Vivián C. 2008. Reduction of polynitroaromatic compounds: The bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiology Reviews* 32: 474-500.

Roldán F., Arbeli Z., Benavidez J., Pérez L., Manrique M. 2011. Diseño de un sistema con microorganismos degradadores de PETN y TNT incorporado en un explosivo comercial. Informe técnico final. Fase I: Aislamiento, selección e identificación de microorganismos degradadores en el explosivo comercial. INDUMIL. Bogotá Colombia

Roldán F., Arbeli Z., Benavidez J., Pérez L., Manrique M. 2013. Diseño de un sistema con microorganismos degradadores de PETN y TNT incorporado en el explosivo pentolita Informe técnico final. Fase II: diseñar y seleccionar la metodología que permita incorporar el sistema con microorganismos degradadores en el explosivo comercial. INDUMIL. Bogotá Colombia

Sarrazin M., Dodard S.G., Savard K., Lachance B., Robidoux P.Y., Kuperman R.G., Hawari J., Ampleman G., Thiboutot S., Sunahara G.I. 2009. Accumulation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine by the earthworm *Eisenia andrei* in a sandy loam soil. *Environmental toxicology and chemistry*. 28(10): 2125-2133.

Silby M.W., Winstanley C., Godfrey S.A.C. Levy S.B., Jackson R.W. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FMS Microbiology reviews*. 35:652-680

Smets B.F., Yin H., Esteve-Nuñez A. 2007. TNT biotransformation: When chemistry confronts mineralization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76: 267-277.

Spain J.C., Hugher J.B., Knackmuss H.J. 2000 *Biodegradation of Nitroaromatic compounds and Explosives*. Primera edición. Lewis Publishers. London. England. 435 p.

Stenuit B., Evers L., Rozenberg R., Habib-Jiwan J.L. Agathos S.N. 2006. Aerobic growth of *Escherichia coli* with 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) as the sole nitrogen source and

evidence of TNT denitration by whole cells and cell-free extracts. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 7945-7948.

Stenuit B.A., Agathos S.N. 2010. Microbial 2,4,6-trinitrotoluene degradation: Could we learn from (bio)chemistry for bioremediation and vice versa? *Applied Microbiology and Biotechnology* 88: 1043-1064.

Stokinger H.E. 1982. Aliphatic nitro compounds, nitrates and nitites. En: Clayton G.D & Clayton F.D (Eds). Patty's Industrial Higiene and toxicology. Vol 2C. John Wiley and Sons. New York. USA. 4141-4208

Sunahara G.I., Lotufo G., Kuperman R.G. Hawari J. 2009. *Ecotoxicology of Explosives*. CRC Press. Boca Raton, Florida. USA. 325 p.

Symons Z.C., Bruce N.C. 2006. Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. *Natural product reports* 23:845-850

Talley J.W. 2006. *Bioremediation of recalcitrant compounds*. CRC Press. University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana, USA. 328 p.

Tamayo D.P., Torres L.P. 2011. Evaluación de la degradación anaerobia de TNT por bacterias obtenidas con BIOCEBOS. Trabajo de grado. Microbiología industrial. Departamento de Microbiología. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad javeriana. Bogotá. Colombia.

Tope A.M., Jamil K. 2001. Isolation of TNT tolerant *Pseudomonas* species (strain KA) from TNT contaminated soil Biotransformation of TNT. *Indian institute of chemistry technology, Hyderabad*. 51:141-146

Török J., Babál P., Matúsková J., L'upták I., Klimes I, Simko F. 2002. Impaired endothelial function of thoracic aorta in the hereditary hypertriglyceridemic rats. *Annual NY Academy Sciences*. 967:469-475

Unión Española de Explosivos, 1994. Manual de empleo de explosivos. Primera edición. Madrid, España. U.E.E, S.A. 249 p

USEPA- Environmental Protection Agency. 2006. Method 8330B. Nitroaromatics, Nitramines and Nitrate Esters by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Revisión 3. United States. 31 p

Vanek T., Bepovim A., Podlipna R., Zeman S., Vágner M. 2003. Phytoremediation of selected explosives. *Water, air Soil pollution*. 3:259-267

Walter M.V., Crawford R. 1997. Overview: Biotransformation and biodegradation. Capítulo 76. En: Hurst C.J., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach L.D., Walter M.V. *Manual of environmental microbiology*. Segunda Edición. American Society for microbiology. ASM press. Washington. USA. 894 p

Wang Z., Ye Z., Zhang M., Bai X. 2010. Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by immobilized microorganism-biological filter. *Process Biochemistry* 45:993-1001.

White G.F., Snape J.R., Nicklin S. 1996. Biodegradation of glycerol trinitrate and pentaerythritol tetranitrate by *Agrobacterium radiobacter*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:637-642.

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

Yamamoto S., Kasai H., Arnold D.L. 2000. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gryB* and *rpoD* genes. *Microbiology*. 146:2385-2394

Ye J., Singh A., Ward O.P. 2004. Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20:117-135.

Yinon J. 1999. *Forensic and environmental detection of explosives*. John Wiley & Sons Ltd. England, UK. 285 p.

Yinon J. 2004. *Advances in Forensic Applications of Mass Spectrometry*. CRC Press LLC. Boca Raton, FL. 279 p.

Yinon J., Zitrin S. 1993. *Modern methods and applications in analysis of explosives*. John Wiley & Sons, Ltda. Chichester, England 286 p

Yinon J., Zitrin S. 1996. *Modern Methods and Applications in Analysis of Explosives*. John Wiley & Sons Ltda. England, UK. 305 p.

Zhuang L. 2007. Remediation of Pentaerythritol Tetranitrate (PETN) Contaminated Water and Soil. Tesis doctoral. University of Waterloo. Ontario, Canadá.