

## Información Importante

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

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

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

**BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA**  
UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
Chía - Cundinamarca



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

<b>TITULO</b>	Efecto del pH y la temperatura en la degradación del 2, 4,6 Trinitrotolueno, por bacterias aisladas de sitios con presencia de explosivos		
<b>SUBTITULO</b>			
<b>AUTOR(ES)</b> Apellidos, Nombres (Completo) del autor(es) del trabajo	Varón López, Hoover		
<b>PALABRAS CLAVE</b> (Mínimo 3 y máximo 6)	2, 4,6 Trinitrotolueno		Temperatura
	Biodegradación		Morfotipo.
	pH		
<b>RESUMEN DEL CONTENIDO</b> (Mínimo 80 máximo 120 palabras)	<p>La fabricación, uso y disponibilidad de explosivos causa problemas sociales y ambientales, por sus características recalcitrantes, mutagénicos y carcinogénicos. En Colombia, la industria militar ha incentivado la búsqueda de estrategias ambientalmente amigables que permitan la degradación de explosivos biológicamente hablando. Es así, como el objetivo principal de la investigación fue establecer si aislamientos bacterianos obtenidos de sitios con presencia de explosivos pueden degradar TNT in vitro, para luego determinar valores de pH y temperatura en las cuales se mejora dicha capacidad. Como resultado se aislaron dos cepas con capacidad de degradar el 100% de TNT y con capacidad de crecimiento hasta en 500 mg/L de explosivo. Se estableció pH 8,0 y 35°C como las mejores condiciones para la degradación.</p>		

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

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

**Efecto del pH y la temperatura en la degradación del 2, 4,6  
Trinitrotolueno, por bacterias aisladas de sitios con presencia de  
explosivos**

**Hoover Varón López**

**Universidad de la Sabana  
Facultad de Ingeniería  
Maestría en Diseño y gestión de Procesos  
Noviembre 30 de 2012**

Efecto del pH y la temperatura en la degradación del 2, 4,6 Trinitrotolueno,  
por bacterias aisladas de sitios con presencia de explosivos

Hoover Varón López

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial  
para optar al título de  
Magister en Diseño y Gestión de procesos con énfasis en Bioprocesos

Director

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

Codirector(a).

Dra. Ligia Consuelo Sánchez  
Magister en microbiología  
Docente investigador Universidad de la Sabana.

Universidad de la sabana  
Facultad de ingeniería  
Maestría en Diseño y Gestión de procesos  
Noviembre 30 de 2012

*“Negar un hecho es lo más fácil del mundo,  
mucha gente lo hace, pero el hecho sigue siendo un hecho.”*

*Isaac Asimov*

*“Nada es real hasta que se experimenta; aun un  
proverbio no lo es hasta que la vida no lo haya  
ilustrado.”*

*John Keats.*

*A mi familia.*

*A mi madre y a mi Padre, incansables luchadores.*

*A mis hijos, Mildred Leandra y Bryan Yadid,  
porque son la esperanza de mi existencia*

*Andrea García, persona especial,  
motivadora y un apoyo incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

Cuando se toma la decisión de realizar una investigación de carácter científico, se hace necesario, además de la motivación y los conocimientos previos, la orientación de un amigo y de personas que a través del tiempo se van acercando y apersonándose de dicho proceso. Aun mas, es muy dignificante, conocer personas que te colaboran en el desarrollo de la investigación, sin pedir nada a cambio, esto deja experiencias, recuerdos y lecciones para toda la vida. Por lo que no queda más, que expresar mi gratitud por estar ahí, tan cerca a:

Dr. Joaquín Lorenzo Benavidez López de mesa, por permitirme adquirir la responsabilidad de pertenecer a su grupo de investigación y haberme formado en dicho ambiente, por la confianza depositada en mí, la cual me comprometía a persistir y seguir hacia adelante.

Dra. Clementina Cueto, Universidad de la Sabana, por su inestimable apoyo en todos los sentidos durante el tiempo que se realizó el proyecto.

Dra. Ligia Sánchez, Universidad de la Sabana, por sus grandes aportes conceptuales y sugerencias asertivas e importantes para la elaboración y ejecución del proyecto.

Dr. Fabio Roldan, Universidad Javeriana, por las autoreflexiones y socializaciones que se realizaban alrededor de los avances de los resultados obtenidos y la forma en los cuales eran analizados.

Dr. Ziv Arveli, Universidad Javeriana, por sus grandes aportes conceptuales que direccionaban o replanteaba las metodologías para la ejecución del proyecto.

Ing. Andrea García, Universidad de la Salle, por permitir trabajar en conjunto con ella, aportando ideas para la ejecución y finalización del proyecto.

Dr. Ricardo Montealegre, Universidad de la Salle, por su disponibilidad y paciencia en el préstamo de los laboratorios del Departamento de Ciencias Básicas, que hizo posible la finalización de la investigación

Dra. Patricia Jiménez de Borray, Universidad de la Salle, por su comprensión al permitir el préstamo de los espacios del Departamento de Ciencias Básicas para la ejecución del proyecto.

A los laboratorios de la Unidad de Saneamiento y Biorremediación Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana (UPJ), por su compromiso para con el grupo de investigación de la cual se hizo parte.

A todas aquellas personas que de una forma directa o indirecta aportaron su granito de arena para llevar a feliz termino el proyecto de investigación.

Y por último, a mi familia y amigos por su paciencia y comprensión durante el desarrollo de este proceso.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	I
TABLA DE CONTENIDO.....	III
INDICE DE FIGURAS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCION.....	1
2. MARCO TEORICO.....	4
2.1. Biodegradación del TNT .....	6
2.2. Rutas metabólicas.....	10
2.2.1. Vía I. Reducción del TNT por enzimas nitroreductasas.....	12
Dioxigenasas.....	13
Reordenamiento Bemberger-Likede hidroxilaminos.....	16
Formación de azoxytetranitrotoluenos.....	17
2.2.2. Vía II. Formación del complejo Meisenheimer.....	19
Denitración del complejo Meisenheimer.....	21
2.2.3. Vía III. Oxigenolítica.....	22
2.3. Microorganismos degradadores de TNT.....	23
2.3.1. Aislamientos.....	23
2.3.2. Crecimiento.....	24
pH.....	24
Temperatura.....	25
Nutrientes.....	26
Nitrógeno.....	26
Trinitrotolueno como sustrato.....	26
2.3.3. Tolerancia a la toxicidad de sustancias químicas.....	27
2.4. Consorcios.....	29

3. CONTEXTO Y JUSTIFICACION DEL PROBLEMA.....	32
4. OBJETIVO.....	35
4.1. Objetivo General.....	35
4.2. Objetivos específicos.....	35
5. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	36
FASE I. Selección de cepas.....	36
5.1. Aislamiento de microorganismos.....	36
5.2. Conservación de microorganismos.....	36
5.3. Pruebas de degradación.....	37
5.3.1. Criterios de inclusión.....	37
5.3.2. Métodos y Técnicas aplicadas.....	37
5.3.3. Obtención del inóculo.....	37
5.3.4. Ensayo de biodegradabilidad.....	38
FASE II. Crecimiento de las cepas a altas concentraciones de TNT.....	39
5.4. Ensayos preliminares.....	39
5.4.1. Acetonitrilo.....	39
5.4.2. Acetona.....	40
5.5. Curvas de crecimiento.....	40
5.5.1. Criterios de inclusión.....	40
5.5.2. Preparación concentración de TNT.....	41
5.5.3. Crecimiento a diferentes concentraciones de TNT.....	41
FASE III. Degradación del TNT por las cepas seleccionadas según parámetros de pH y temperatura.....	42
5.6. Criterios de inclusión.....	42
5.6.1. Ensayo de biodegradabilidad según pH.....	42
5.6.2. Ensayo de biodegradabilidad según valores de temperatura.....	43
FASE IV. Determinación de la degradación del TNT a partir de la combinación de las bacterias en estudio.....	43

5.7. Criterios de inclusión.....	43
5.8. Pruebas de antagonismo.....	44
5.8.1. técnica de Gauze modificada.....	44
5.9. Mezcla de cepas bacterianas.....	45
5.9.1. Ensayo de biodegradabilidad.....	45
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	45
FASE I. Selección de cepas.....	45
6.1. Aislamiento de microorganismos.....	45
6.2. Evaluación de la capacidad degradadora de los microorganismos obtenidos.....	51
FASE II. Crecimiento de las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones de TNT.....	55
6.3. Ensayos preliminares.....	55
6.4. Crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de TNT.....	61
FASE III. Biodegradación de TNT según parámetros de pH y temperatura.....	67
6.5. Degradación de TNT según parámetros de pH.....	67
6.6. Degradación de TNT según parámetros de temperatura.....	78
6.7. Degradación de TNT por la combinación de las cepas en estudio.....	90
6.7.1. Combinación de cepas.....	90
6.7.2. Biodegradación de TNT.....	90
7. CONCLUSIONES.....	93
8. RECOMENDACIONES.....	95
9. REFERENCIAS.....	96
10. ANEXOS.....	106

## INDICE DE FIGURAS

1. Vía 1. Reducción de TNT mediante enzima nitroreductasas.....	14
2. Oxidación e hidroxilación de isómeros aminodinitrotoluenos.....	15
3. Reordenamiento Bamberger-Like de hidroxilaminos con liberación de amonios y la subsecuente absorción a través de la ruta sintetasa-glutamato.....	17
4. Formación de dímeros azoxytetranitrotoluenos de la reacción de subproductos nitroso e hidroxilamino de la nitroreducción del TNT.....	18
5. Vía 2. Transformación del complejo Meisenheimer mediante enzimas de la familia Old Yellow Enzyme.....	20
6. Denitración del complejo Meisenheimer.....	22
7. Ruta oxigenolítica del TNT.....	23
8. Respuesta celular a compuestos tóxicos que pueden producir tolerancias.....	30
9. Formación de morfotípos a través del tiempo.....	46

<b>10.</b> Porcentaje de degradación de los aislamientos obtenidos.....	54
<b>11. a.</b> curvas de crecimiento de la cepa t28, con recuento en placa (ufc/ml) y densidad óptica (D.O) para cada uno de los tratamientos establecidos.....	56
<b>11 b</b> Curvas de crecimiento de la cepa t29, con recuento en placa (ufc/ml) y densidad óptica (D.O) para cada uno de los tratamientos establecidos.....	57
<b>12.</b> crecimiento de la cepa t28 a 100 mg/l de TNT diluido con diferentes solvente (acetona y acetonitrilo).....	59
<b>13.</b> Crecimiento de la cepa t29 a 100 mg/l de TNT diluido con diferentes solvente (acetona y acetonitrilo).....	59
<b>14. a.</b> crecimiento a 100 y 200 mg/l TNT. b. crecimiento a 300, 400 y 500 mg/l TNT.....	63
<b>14 C.</b> Crecimiento a las diferentes concentraciones de TNT. d. crecimiento a las diferentes concentraciones de TNT incluido la concentración control (0 mg/lTNT).....	64
<b>15 a.</b> crecimiento a 100 y 200 mg/l TNT. b. crecimiento a 300, 400 y 500 mg/l TNT.....	66

<b>15. C.</b> Crecimiento a las diferentes concentraciones de TNT incluido la concentración control (0 mg/l TNT).....	67
<b>16. A.</b> Degradación de TNT por la cepa T28 y producción de metabolitos a pH 6.0.....	70
16.B. Degradacion de TNT por la cepa T29 y produccion de metabolitos a pH 6.0.....	71
<b>17. A.</b> Degradacion de TNT por las cepa T28 y producción de metabolitos a pH 7.0.....	72
17B. Degradación de TNT por la cepa T29 y produccion de metabolitos a pH 7.0.....	73
<b>18. A.</b> Degradación de TNT por las cepas T28 y producción de metabolitos a pH 8.0.....	74
18B. degradacion de TNT por la cepa T29 y p`roduccion de metabolitos a pH 8.0.....	75
<b>19. A.</b> Degradación de TNT por las cepas T28 y producción de metabolitos a la temperatura de 20°C.....	80
19B. Degradación de TNT por las cepas T29 y producción de metabolitos a la temperatura de 20°C.....	81
<b>20.</b> Degradación de TNT por las cepa T28 y producción de metabolitos a la temperatura de 25°C.....	82

20B. Degradación de TNT por la cepa T29 y producción de metabolitos a la temperatura de 25°C.....	83
<b>21. A.</b> Degradación de TNT por las cepas T28y producción de metabolitos a la temperatura de 30°C.....	85
21B. Degradación de TNT por la cepa T29 y producción de metabolitos a la temperatura de 30°C.....	86
<b>22. A.</b> Degradación de TNT por la cepa T28 y producción de metabolitos a la temperatura de 35°C.....	87
22B. Degradación de TNT por la cepa T29 y producción de metabolitos a la temperatura de 35°C.....	88
<b>23.</b> Prueba de enfrentamiento dual de las cepas estudio.....	91
<b>24.</b> Degradación de TNT por la combinación de cepas y producción de metabolitos.....	92
<b>25.</b> Comparación de los porcentajes de degradación obtenidos entre las cepas y su combinación.....	93

## INDICE DE TABLAS

1. Microorganismos en los cuales se ha encontrado enzimas nitroreductasas.....	12
2. Acción de las dioxigenasas sobre el TNT.....	16
3. Estudios que reportan microorganismos con presencia de enzimas OYE.....	22
4. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas.....	47
5. Porcentajes de degradación de TNT, por cada morfotipo.....	52
6. Tiempos de crecimiento de las cepas en estudio.....	58
7. Porcentaje de degradación de los controles abióticos a diferentes pHs.....	68
8. Porcentaje de degradación de los controles abióticos a diferentes temperaturas.....	79

## RESUMEN.

En la actualidad la fabricación del explosivo TNT es permanente debido a su gran uso en las diferentes áreas industriales, a nivel militar, se utiliza como materia prima en la elaboración de otros tipos de municiones, en el área de obra civil, se emplea para el fraccionamiento de grandes rocas y en la minera durante la exploración de pozos petroleros. Esta demanda ha causado problemas sociales y ambientales, debido a que sus residuos tienen efectos recalcitrantes, mutagénicas y carcinogénicos. Ya que en Colombia, la normatividad establece responsabilidades para el generador de este tipo de sustancias, incluyendo emisiones, afluentes, productos y subproductos durante la manufactura, y el manejo y la disposición de residuos y/o desechos peligrosos, la industria militar ha incentivado la búsqueda de estrategias ambientalmente amigables que permitan la degradación de explosivos mediante la mineralización completa, de ser posible. Es así, como el objetivo principal de esta investigación fue establecer si aislamientos bacterianos obtenidos de sitios con presencia permanente de explosivos podían degradar TNT *in vitro*, para luego determinar las mejores condiciones de pH y temperatura en las cuales dichos aislamientos presentaron una alta degradación del compuesto. Para ello, aislamientos de bacterias aerobias provenientes de suelos con TNT y con capacidad de crecer en medios de cultivo con concentraciones de TNT de 50 mg/L fueron seleccionadas. Estas cepas luego fueron sembradas en medios con 100 mg/L de TNT con el fin de aumentar la presión selectiva. La capacidad degradadora de las cepas fue determinada mediante HPLC (del inglés High Performance Liquid Chromatography); y las bacterias con mayor porcentaje de degradación fueron

seleccionadas para estudiar el crecimiento a diferentes concentraciones del explosivo (0 – 500 mg/L) y para determinar su capacidad degradadora en diferentes pHs y temperaturas. Finalmente las cepas fueron combinadas y la degradación del explosivo a un pH y una temperatura específica fue evaluada. Estos estudios dieron como resultado el aislamiento de dos cepas identificadas como T28 (*Pseudomonas oleovorans*) y T29 (*Shinella Kummerowae*) con un porcentaje de degradación del TNT del 100% para cada una, y una capacidad de crecimiento en concentraciones de explosivo hasta de 500 mg/L. Se estableció el pH 8,0 y la temperatura de 35°C como las mejores condiciones para obtener los mayores porcentajes de degradación y la combinación de las cepas en estas mismas condiciones, no superaron la capacidad degradadora que las cepas poseen individualmente. En conclusión, bacterias provenientes de muestras de suelos con explosivos tienen la capacidad de degradar dichos sustratos y por lo tanto tienen el potencial de ser bioremediadores de su propio nicho.

## ABSTRACT

Currently, the manufacture of the explosive TNT is continuous due to its wide use in different industries. At the military level, it is used as raw material in the production of other types of ammunitions. In the construction area, it is used in the fragmentation of large boulders, and in mining it is used during oil drilling. This demand has caused social and environmental problems due to TNT residues have recalcitrant, mutagenic and carcinogenic effects. Because Colombian legislature makes responsible the manufacturers for emissions, waste waters, products, and byproducts during the manufacture process and the management and disposal of residues and/or hazardous waste, the military industry has incentivized the search for friendly environmental strategies that allow the degradation of explosives through total mineralization, if possible. Thus, the main objective of this research was to establish whether bacterial isolates obtained from sites with permanent presence of explosives could degrade TNT *in vitro*, and then to determine the best pH and temperature conditions in which such isolates show a high degradation of the compound. For this, aerobic bacterial isolates derived from TNT containing soils and with the capacity to grow in media containing TNT at 50 mg/L were selected. These strains were further grown in media with 100 mg/L TNT to increase selective pressure. The degradation capacity was determined by HPLC (High Performance Liquid Chromatography), and bacteria with the greatest percent of degradation were chosen to study the growth at different explosive concentrations (0-500 mg/L) and to determine the degradation capacity at different pHs and temperatures. Finally, stains were combined and the degradation of the explosive was evaluated at a specific pH and temperature. These

studies resulted in the isolation of two bacterial strains identified as T28 (*Pseudomonas oleovorans*) and T29 (*Shinella Kummerowae*) with a 100% TNT degradation and were capable to grow in concentrations of explosive up to 500 mg/L. pH 8.0 and 35°C were established as the best conditions to generate the highest percentages of degradation. The combination of these strains under the latter conditions did not improve the degradation capacity obtained by individual stains. In conclusion, bacteria isolated from samples of soils containing explosives have the capacity to degrade such substrates and therefore, they have the potential to be bioremediators of their own niche.

## INTRODUCCIÓN

Una de las situaciones más relevantes del presente, es proteger el ambiente de la contaminación de sustancias antropogénicas que se acumulan en los organismos vivos afectando sus procesos metabólicos (Zaripov S.A., N., A.V., Suvorova, E. S., Garusov, A. V. & Naumova, R. P. 2004), es el caso de los compuestos nitroaromáticos, xenobióticos a los que se les han encontrado múltiples aplicaciones en síntesis de espumas, productos farmacéuticos, pesticidas, fertilizantes y explosivos (Esteve A, Caballero A y Ramos J, 2001). Sin importar el uso que se les dé a estos compuestos, ya sea para beneficio industrial o para la actividad bélica, los residuos generados durante su fabricación y utilización son peligrosos para el ser humano y para el medio ambiente.(Ministerio de Ambiente, 2005)

El explosivo de mayor uso mundial es el 2,4,6 Trinitrotolueno (TNT), tuvo su mayor auge en manufactura y uso durante las dos guerras mundiales; incluso después de 50 años de contaminación es encontrado en suelos en grandes concentraciones por encima de 9600 a 10000 mg/kg (Zaripov et al. 2004). Debido a su poder explosivo y a sus propiedades fisicoquímicas que le confieren una estabilidad térmica y química, el TNT es un compuesto de gran uso en la industria minera y aún en la industria militar como parte esencial de otras municiones. Por tal razón, en la actualidad su fabricación, uso y disponibilidad continua en curso, aumenta el impacto ambiental negativo que afecta los ecosistemas terrestres y acuáticos (Spain, J., Hughes, J., y Knackmuss, H. (2000)), constituyendo un riesgo para la salud debido a sus propiedades mutagénicas, carcinogénicas (Kulkarni, M., y Chaudhari, A, 2007; Ramos, J. L., Duque, E., Godoy,

P., & Segura, A. 1998) y recalcitrantes que son degradadas muy lentamente por los microorganismos que se encuentran en el ambiente (Esteve et al., 2001).

Colombia no es país ajeno a esta problemática, ya que posee en el territorio nacional plantas de producción de explosivos y esta actividad es una constante, debido a su uso no solo por parte de la industria militar, sino también por la explotación minera. Aunque se han estandarizado diferentes técnicas para la remediación de los sitios con presencia de este compuesto, como la incineración, excavación, compostaje entre otros, no son suficientes para contrarrestar la situación ya que siguen quedando residuos de estos compuestos, además de los altos costos que estos representan. En los últimos años, las investigaciones se han centrado en técnicas de biorremediación por medio de agentes biológicos, ya sea con microorganismos o plantas. Sin embargo, no existen reportes nacionales sobre aislamientos, caracterización o estudios de biodegradación de explosivos, razón por la cual, esta investigación se centra en la biodegradación del TNT como alternativa biológica que permita desarrollar e implementar métodos para la eliminación de este contaminante.

La biorremediación es una técnica viable, ya que gracias a la característica del TNT de permanecer por mucho tiempo en el ambiente, brinda en gran parte, las condiciones propicias para hallar microorganismos con capacidad degradadora de explosivos. (Hurst., J.C. y Crawford. L. R. 2002). Los aislamientos bacterianos (cultivables bajo condiciones de laboratorio) que se obtienen en los sitios con presencia permanente de explosivos, permiten evaluar su capacidad degradadora de TNT y por lo tanto estudiar la degradación biológica de los explosivos. En este proyecto, se evaluó el

efecto del pH y la temperatura en la degradación del 2, 4,6 Trinitrotolueno por bacterias aisladas de sitios con presencia de explosivos mediante cambios en los valores de las variables; se establecieron los parámetros en los cuales los microorganismos con mayor capacidad degradadora de TNT la mejoran en términos de tiempo y porcentaje de reducción; también se determinó la máxima concentración de explosivo en que dichos microorganismos crecen; por último se conformó y evaluó la capacidad degradadora de las bacterias elegidas en combinación.

Los resultados obtenidos en esta investigación, establecerán las bases que permitirán realizar a mediano plazo, el diseño de un dispositivo biológico que facilite la degradación o inactivación de explosivos comerciales; así mismo, se podrá implementar su aplicación en la biorremediación de ambientes contaminados con este tipo de compuestos, como alternativa biológica en respuesta a la problemática ambiental planteada, encontrando de esta manera métodos y técnicas ambientalmente amigables.

Igualmente, los resultados aumentan el conocimiento básico en la búsqueda de una solución eficiente en la disposición de los productos, usos y residuos de los explosivos, cuya materia prima son compuestos nitroaromáticos.

## 2. Marco Teórico.

Alrededor del año 1830, se inició el desarrollo de la química orgánica y por lo tanto la síntesis de una gran diversidad de compuestos nitrogenados, dentro de los cuales se destacaron aquellos que exhibían propiedad explosiva y que fueron útiles en la industria civil y militar (Lewis, T. A., Newcombe, D. A., y Crawford, R. L. 2004). Desde 1902, comenzó la producción industrial de estos tipos de compuesto, los cuales alcanzaron su mayor auge durante las dos guerras mundiales (Nyanhongo, G. S., Aichernig, N., Ortner, M, Steiner, W. & Guebitz, G.M. 2009; Smets, B., Yin, H & Esteve-Nuñez, A. 2007).

El 2,4,6 Trinitrotolueno (TNT) más conocido como dinamita, es el compuesto nitroaromático explosivo de mayor uso en el mundo, debido a sus propiedades fisicoquímicas como, bajo punto de fusión, estabilidad química y térmica, insensibilidad a la fricción, al impacto, la agitación, altas temperaturas y no reacciona con metales ni absorbe agua, por lo que se puede almacenar por largos periodos de tiempo sin exposición a la luz solar ya que es altamente fotoreactivo y posee disponibilidad de métodos seguros de manufacturas. (Chulhwan, P. Tak-Hyun, K., Sangyong, K.Seung-Wook, K., Jinwon, L., and Sun-Hwan K., 2003; Villegas., P., S.. (2009);Villegas., P. S. (2009).).

También ha sido conocido como material explosivo “primario o estándar” ya que se encuentra como parte activa en la fabricación de minas, bombas, granadas,

propulsores y dispositivos detonantes de demolición (Chulhwan, P. et al. 2003; Nyanhongo, et al. 2009; Villegas., P. S. (2009).).

Durante los años en que el TNT fue inventado se ha llevado a gran escala la producción de artefactos explosivos y el desmantelamiento de los antiguos. Es así como en 1945, la capacidad de producción de TNT en los Estados Unidos fue de 65 toneladas diarias, mientras que la producción alemana fue de  $2,36 \times 10^4$  toneladas por mes. Esta producción en masa y su uso continuo, contaminó rigurosamente el medio ambiente con explosivos y productos relacionados.(Hampton, M. S., W.E. 1997). El ejército de los Estados Unidos, estima que más de 1,2 millones de toneladas de suelo han sido contaminadas con estos compuestos. (Lewis, et al. 2004).

El TNT por su naturaleza recalcitrante porque se resiste al ataque biológico (Duque, E., Haidour, A., Godoy, F y Ramos, J. (1993)), mutagénica y carcinogénica (J. Rodgers, and Bunce J., 2001) representa un alto potencial tóxico intrínseco sobre el ecosistema, incluyendo humanos, organismos acuáticos y terrestres (Smets, et al. 2007). Se ha comprobado que la exposición a este compuesto durante largos periodos de tiempo, ocasiona anemia, mal funcionamiento del hígado e irritación en la piel, (Chemical Abstracts Service: 118-96-7, 2001), razón por la cual ha sido clasificado por la USEPA (del inglés *United States Environmental Protection Agency*) como un contaminante de mayor prioridad (Villegas., P. S. (2009).) y está enlistado como clase C por la EPA (del inglés *Environmental Protection Agency*) (Smets, et al. 2007).

Por esta razón se implementaron diversos métodos para remediar suelos contaminados con explosivos o sus residuos, la mayoría de estos incluyen alternativas fisicoquímicas como la incineración, detonación y vertimiento al mar o en grandes extensiones de tierra. Sin embargo, el impacto ambiental generado es alto, debido a que estos compuestos pueden llegar a contaminar ambientes como agua subterránea, suelo y aire, afectando plantas, animales y humanos (Boopathy, R., Manning, J., Kulpa C. F. (1997); Clark., B., R. (2007); Kulkarni, et al. 2007)

Actualmente la recuperación de las áreas contaminadas por explosivos es responsabilidad de salud pública, en las cuales se han invertido considerables esfuerzos en la búsqueda de tecnologías económicas de remediación, en este aspecto la degradación biológica para el tratamiento de compuestos orgánicos están siendo considerado (Lewis, et al. 2004), debido a que es ambientalmente amigable, económico, efectivo, ya que permiten eliminar estos compuestos y sus subproductos de manera eficiente y controlada buscando la degradación completa (mineralización) de los explosivos a través del metabolismo microbiano (Atlas, R., y Bartha, R. (2002); Eweis, 1999; J. Rodgers, and Bunce J., 2001)

## **2.1.Biodegradación del TNT**

Para efectos de la investigación, es necesario definir los conceptos de biodegradabilidad y biodegradación. “Biodegradabilidad” involucra las características

que representa la susceptibilidad de las sustancias a la transformación por procesos microbianos. Esta puede ser provocada por:

- Ataque enzimático intra o extracelular que es esencial para el crecimiento de los microorganismos. Las sustancias atacadas se son utilizadas como fuente de carbono, energía, nitrógeno u otros nutrientes ó como aceptor final de electrones.
- Ataque enzimático que es beneficioso, ya que tiene un objetivo protector. Se presenta en la movilización de tóxicos lejos de las células.
- Ataque enzimático que se detecta como de ningún beneficio para los microorganismos. Son aquellas reacciones cometabólicas en el que un sustrato primario induce la producción de enzimas que altera la estructura molecular de otro compuesto.
- Reacciones no enzimáticas de subproductos de la fisiología microbiana que causan el cambio químico en el exterior. Se presenta en el consumo de oxígeno, producción de productos de fermentación o en una alteración en el pH.

La “biodegradación” de compuestos orgánicos es la simplificación parcial o destrucción completa de su estructura molecular por reacciones fisiológicas catalizadas por microorganismos. La biodegradación se mide comúnmente mediante la aplicación de ensayos químicos y fisiológicos en los laboratorios, a partir de la incubación de

cultivos puros de microorganismos, mezcla de cultivos o muestras ambientales (suelo, agua, sedimentos o residuos industriales). En este caso, el investigador define el contexto ambiental de modo que los reactivos potenciales, reactantes y productos puedan ser identificados. (Madsen, E. L. 1997)

Para llevar a cabo el proceso de biodegradación es necesario aislar microorganismos con capacidad degradadora que se encuentren adaptados metabólicamente a las condiciones ambientales y a la presencia permanente de explosivos. (French, P. D., Nicklin, S., y Bruce, N.C. 1998; Rosser., S. J., French., C. E. & Bruce., N.C. 2001).

Numerosos estudios han logrado cultivar y conservar estos tipos de microorganismos, es así como en investigaciones realizadas por los grupos de Binks en 1996 y French en 1998, lograron aislar *Enterobacter cloacae*, que es un microorganismo con capacidad degradadora de PETN y TNT. (Binks., P. R., French. et al. 1996)

Por otro lado y teniendo en cuenta la gran diversidad metabólica que presentan los microorganismos, el equipo de investigación de White en 1995, realizaron una investigación con el fin de aislar bacterias de diferentes géneros con capacidad degradadora de explosivos como esteres de nitrato y de glicerol trinitrato, e identificar los posibles intermediarios y productos finales generados durante la biodegradación. En este estudio, los investigadores lograron cultivar dos diferentes microorganismos

provenientes de aguas residuales, suelos y ríos, las cuales fueron respectivamente *Pseudomonas sp* y *Agrobacterium radiobacter*.

Se ha encontrado que los microorganismos con mayor capacidad degradadora de TNT, son las del género *Pseudomonas*, especialmente, *P. putida* y *P. pseudoalcaligenes* (Fiorella., D. P. S. (1997).; Spain, J. C. 1995).

La biodegradación de TNT ocurre por la remoción de los grupos nitro de la molécula, por medio de reacciones de reducción realizadas por enzimas nitroreductasas más que por reacciones de oxidación (Barrows, S. E., Cranner, C.J., y Truhal, D.G. (1996)). La biodegradación se considera completa solo cuando todos los grupos nitro han sido removidos y el anillo benzoico ha sido roto a subproductos anfibólicos, que pueden ser oxidados a CO<sub>2</sub>. (Duque, et al. 1993)

El uso de los nitroaromáticos como el TNT, no es usado como fuente de carbono por parte de los microorganismos, por lo que la biodegradación no es completa ya que parte del compuesto permanece sin atacar y es convertido a formas reducidas parciales. Para el biotratamiento de estas sustancias es necesaria la acción coordinada de una serie de microorganismos para lograr la degradación completa. (Duque, et al. 1993)

Estudios realizados recientemente, han demostrado que la degradación de TNT a altas densidades celulares, pueden activar diferentes modelos de biodegradación, fenómeno importante para la biorremediación de este compuesto, porque requiere

bacterias específicas con alta actividad de degradación que facilite la descontaminación más rápida en sitios con presencia de estos residuos (Kubota, A., Maeda, T., Nagafuchi, N., Kadokami, K., y Ogawa, H.I. 2008)

## **2.2.Rutas metabólicas**

Se conocen principalmente dos vías metabólicas por las cuales se da la biodegradación del TNT bajo condiciones aeróbicas, convirtiéndolo en compuestos intermediarios menos tóxicos. Estas vías ocurren en presencia de oxígeno, aun cuando una de ellas no lo utiliza como aceptor final de electrones. Y es la primera vía (Vía I), en la que el TNT actúa como un aceptor de electrones, debido a la gran facilidad que existe para reducir los grupos nitro formados por los enlaces nitrógeno-oxígeno altamente electrofílicos (Villegas., P. S. 2009).

La segunda vía (Vía II) es una ruta compleja que se caracteriza por la formación de un complejo híbrido llamado Meisenheimer, que se genera cuando el microorganismo es capaz de atacar directamente los enlaces que conforman el anillo aromático.

Y últimamente, se habla de una tercera vía (Vía III), que consiste en la reducción oxigenolítica del TNT, que resulta en la producción de 3-Metil-4,6-Dinitrocatecol a partir de la remoción de un grupo nitro. (Smets, et al. 2007)

Bajo condiciones de anaerobiosis, se documenta una última vía (Vía IV), que para efectos de la investigación no es de interés, pero es necesario precisarla, consiste en una transformación secuencial de los grupos nitro unido al anillo aromático hacia la correspondiente amina. (Villegas., P. S. (2009).).

Cada una de las vías aeróbicas, se encuentra complementadas por “sub-rutas” que terminan llevando la molécula de TNT hasta subproductos finales menos tóxicos, con la intervención de diferentes tipos de enzimas. Las rutas aeróbicas principales con sus “sub-rutas” se relacionan a continuación:

- **Vía I. Reducción de TNT por enzimas nitroreductasas.**
  - Acción de las dioxigenasas
  - Reordenamiento Bamberger-like
  - Formación de dímeros azoxytetranitrotoluenos
  
- **Vía II. Formación del complejo Meisenheimer.**
  - Denitración del complejo Meisenheimer.
  
- **Vía III. Reducción oxigenolítica.**

### 2.2.1. Vía I. Reducción de TNT por enzimas Nitroreductasas.

Esta familia de enzimas reduce un gran rango de compuestos nitroaromáticos incluido el TNT. En la Tabla No 1, se encuentran relacionados los microorganismos en los cuales se han encontrado enzimas nitroreductasas.

Tabla No 1. Microorganismos en los cuales se ha encontrado enzimas nitroreductasas

<i>Microorganismo</i>	<i>Enzima nitroreductasas</i>	<i>fuentes</i>	<i>Microorganismo</i>
<i>Escherichia coli</i>	NfsA y NfsB	Zenno et al 1996	Conversion of Nfsb, a minor <i>Escherichia coli</i> nitroreductase, to a flavin reductase similar in biochemical properties to Frase I, the major flavin reductase in <i>Vibrio fischeri</i> , by a single amino acid substitution
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	SnrA y Cnr	Watanabe M et al 1990	Nucleotide sequence of <i>Salmonella typhimurium</i> nitroreductase gene.
<i>Enterobacter cloacae</i>	NfsI	Bryant and DeLuca et al 1991	Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from <i>Enterobacter cloacae</i> .
<i>Helicobacter pylori</i>	RdxA	Goodwin et al 1998	Metronidazole resistance in <i>Helicobacter pylori</i> is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase
<i>Vibrio harveyi</i>	Flavin reductase P	Lei et al, 1994	<i>Vibrio harveyi</i> NADPH-flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme
<i>Vibrio fischeri</i>	Frase I	Zenno et al 1994	Identification of the gene encoding the major NAD(p)H-flavin oxidoreductase of the bioluminescent bacterium <i>Vibrio fischeri</i> ATCC 7744
<i>Thermus thermophilus</i>	NADH oxidase	Park et al 1992	Purification and characterization of a NADH oxidase from the thermophile thermophilus HB8
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Nitrobenzeno Nitroreductasa	Somerville et al 1995	Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> JS45
<i>Pseudomonas putida</i>	PnrA y PnrB	Park and Kim 2000	Identification and characterization of the nitrobenzene catabolic plasmids pNB1 and pNB2 in <i>Pseudomonas putida</i> HS12
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	NitA y NitB	Kutty and Bennett 2005	Biochemical characterization of trinitrotoluene transforming oxygen-insensitive nitroreductasas from <i>Clostridium acetobutylicum</i>

Estas enzimas contienen flavo mononucleótido (FMN) como cofactor, usan el NAD(P)H o NADH como el donador de electrones y realizan una reducción secuencial de uno o dos grupos nitro de la molécula de TNT a grupos hidroxilamino o aminos para producir diferentes isómeros de compuestos aminonitroaromáticos (Esteve-Nuñez, A., Caballero, A. y Ramos, J. (2001), aunque los intermediarios de nitroso no son detectados, el grupo nitro es reducido solo a estos dos grupos funcionales no más allá, incluso así, se encuentren en exceso de un poder reductor. (Figura No 1) (Smets, et al. 2007). En este caso se ha observado que el TNT es reducido mucho más rápido que el di- y mono-nitrotolueno o sus productos de transformación reducidos. (Caballero, Lazaro, J.J., Ramos, J.L., & Esteve-Nuñez, A., 2005).

Se ha reportado la presencia de nitroreductasas en la membrana asociada con respiración que confieren a la cepa de *Pseudomonas putida JLR11* la capacidad para usar grupos nitro del TNT como único aceptor de electrones, mientras que bajo condiciones anaeróbicas el donador de electrones es el acetato. Este microorganismo reduce el TNT a 4-amino-2,6-dinitrotolueno (4ADNT). (Smets, et al. 2007)

### **Dioxigenasas.**

El TNT es fácilmente reducido a una mezcla de isómeros de 2-amino-4,6-dinitrotolueno (2ADNT) y 4-ADNT bajo condiciones ambientales (Spain, J. et al 2000). Diferentes estudios se han enfocado en el posible ataque oxidolítico del isómero aminodinitrotolueno (ADNT). Estos son oxidados por dioxigenasas para formar

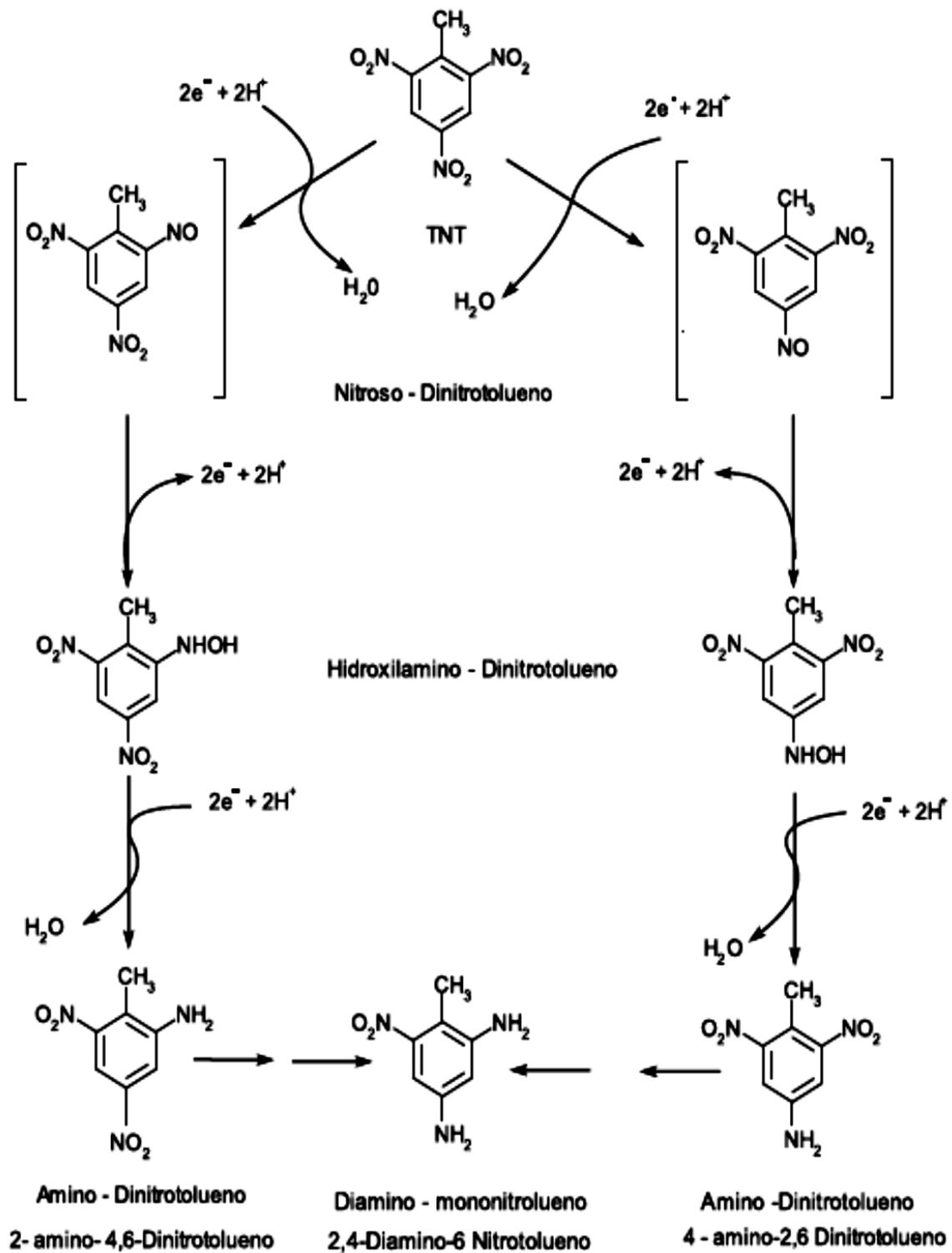


Figura No 1. Vía 1. Reducción de TNT mediante enzimas Nitroreductasas  
 (Tomado de: (Smets, et al. 2007; Villegas., P. S. (2009).)

Aminometilnitrocatecol con liberación de nitrito o son hidroxilatados en el grupo metil para formar alcohol aminodinitrobencil. Figura No 2. En la Tabla No 2, se plasma la acción de las dioxigenasas y los microorganismos en las que se han localizado.

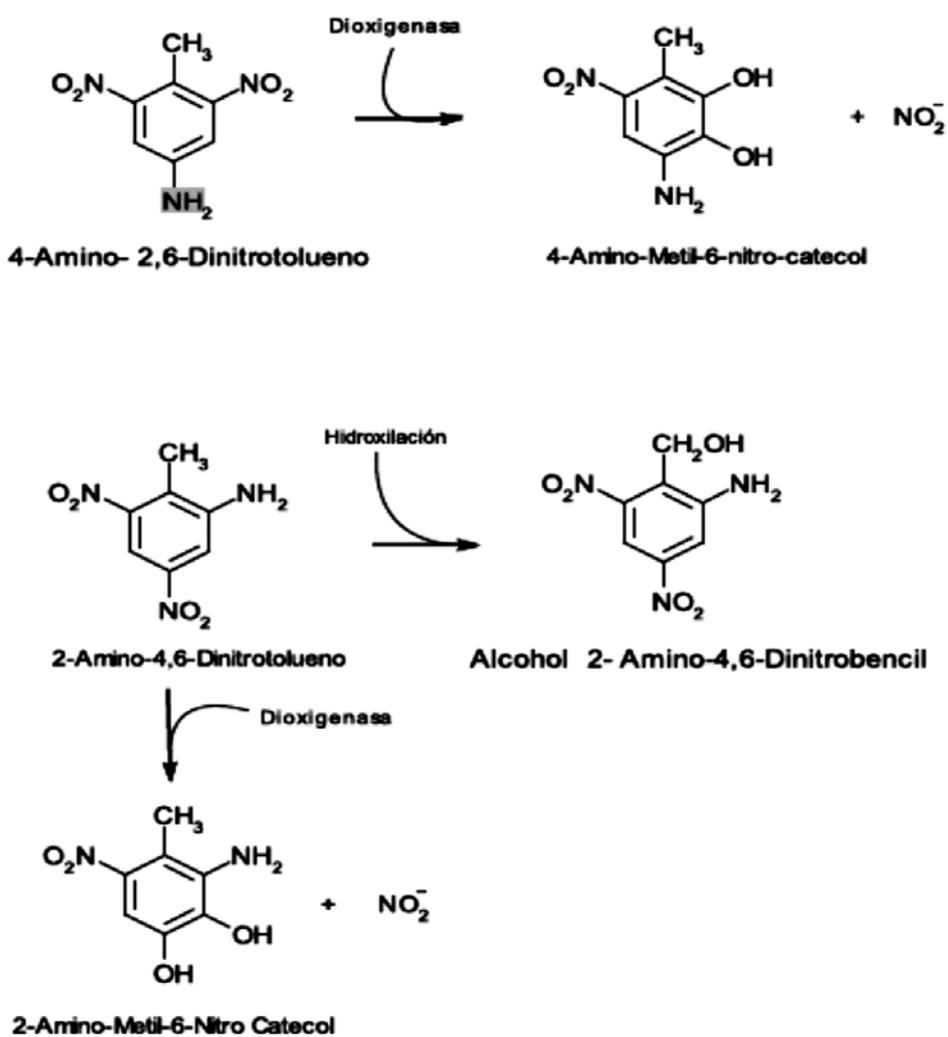


Figura No 2. Oxidación e hidroxilación de los isómeros Aminodinitrotoluenos

*Tomado de(Smets, et al. 2007)*

Tabla No 2. Acción de las dioxigenasas sobre el TNT.

<i>Microorganismo</i>	<i>Enzima Dioxigenasas</i>	<i>Modo de acción</i>
<i>Escherichia coli recombinante</i>	2,4-dinitrotolueno (DNT) dioxigenasa	Capacidad de oxidar 2ADNT en la posición 3,4 liberando nitrito para formar 3-amino-4-metil-5-nitrocatecol, mientras también hidroxilatando el grupo metil forman el alcohol 2-amino-4,6-dinitrobencil
<i>Comamonas sp Cepa JS765</i>	Nitrobenceno dioxigenasas (NBDO)	Puede oxidar 4ADNT en la posición 2,3 liberando nitrito y generando 3-amino-6-metil-5-nitrocatecol

### **Reordenamiento Bamberger-like de hidroxilaminos. (Liberación de amonios)**

Las bacterias transforman el TNT a través de reducciones parciales de los grupos nitro llevándolos a ADNT (Amino Dinitrotolueno), pero ocasionalmente, también a través de la reducción completa a triaminotolueno (TAT) cuando el potencial redox es bajo y en condiciones anaerobias (Smets, et al. 2007). Además, es conocido que el anillo aromático de TNT puede ser microbiológicamente reducido al complejo híbrido Meisenheimer (Park, H. S., & Kim, H.S. 2000)

Actualmente, el uso de TNT como fuente de nitrógeno ha sido documentado en cultivos mixtos y puros (Popescu, J. T., Singh, A., Zhao, J.S., Hawari, J., & Ward, O.P. 2003). *Pseudomonas putida JLR11* uso TNT como única fuente de nitrógeno, con liberación de nitrito o amonio, y con participación de la síntesis de glutamina vía glutamato sintetasa. (Caballero, R, y Antonio Fernando., 2005). Mientras que la liberación de nitritos está dado por una o dos vías de denitrificasas, la liberación de amonio está dada después de la reducción de uno de los grupos nitro a hidroxilamino mediado por la enzima PnrA, seguido por el reacomodamiento de Bamberger-like, donde el

grupo hidroxilamino funcional es redirigido para producir amino e hidroxilamino sustituyentes (Smets, et al. 2007)Figura No 3.

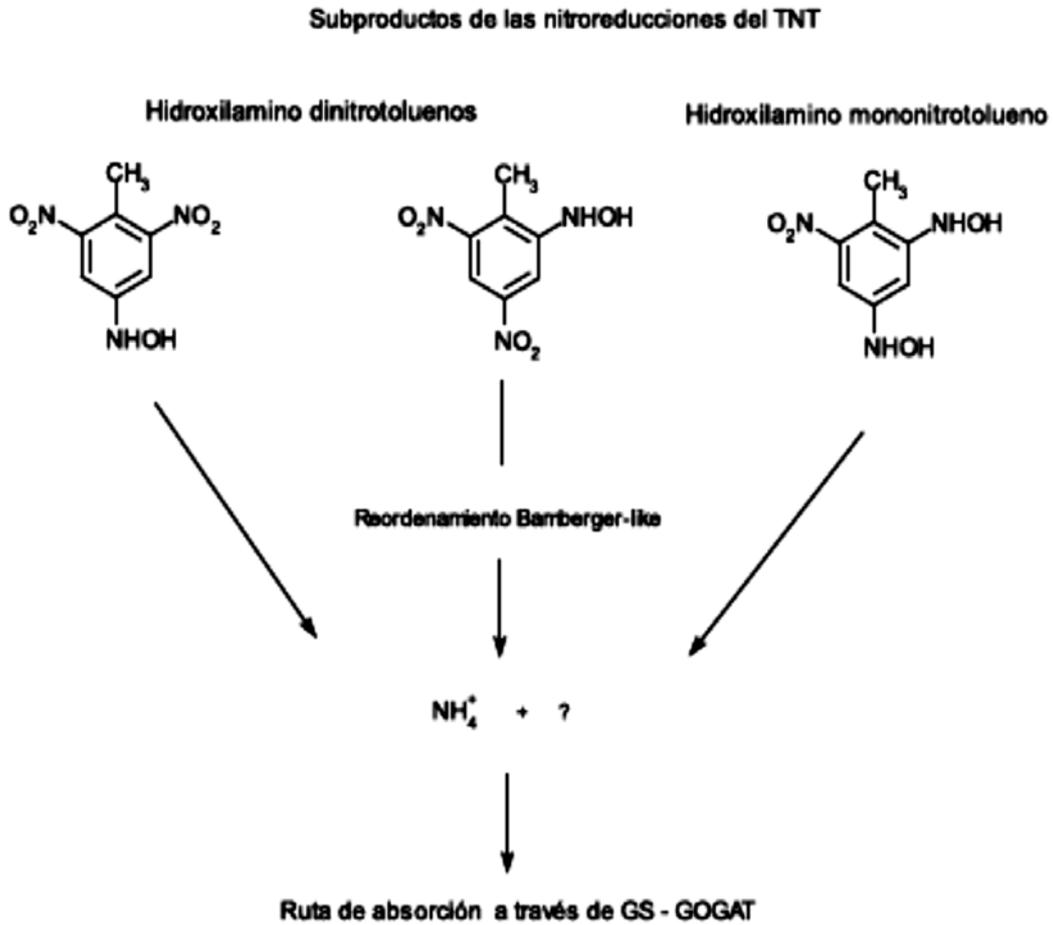


Figura No 3. Reordenamiento Bamberger-like de hidroxilaminos con liberación de amonios y la subsecuente absorción a través de la ruta sintetasa-glutamato. Tomado de (Smets, et al. 2007)

### Formación de azoxytetranitrotoluenos

Esta ruta se presenta en las tecnologías de remediación, como son, el compostaje, procesos con lodos activados y Fitorremediación. El compostaje y los lodos activados están basados en el nitro-reducción co-metabólico del TNT por

microorganismos no definidos (TThorn, K. A., Pennington, K.C. & Hayes, C.A. 2002) cuyo resultado final de este proceso es que los grupos hidroxilamina y amina del anillo nitro-areno reaccionan con los grupos funcionales quinonas y carbonil de la fracción húmica del suelo, dando lugar a la inmovilización covalente de los derivados de TNT que no son biodisponibles y así exhiben un decrecimiento en la toxicidad. (Lewis, et al. 2004). Por lo tanto, este enfoque se basa en el hecho que las reacciones intermedias durante la nitroreducción tienen una alta reactividad química, el balance de masas indica frecuentemente un alto grado de inmovilización o dimerización durante la transformación del TNT (Figura No 4).

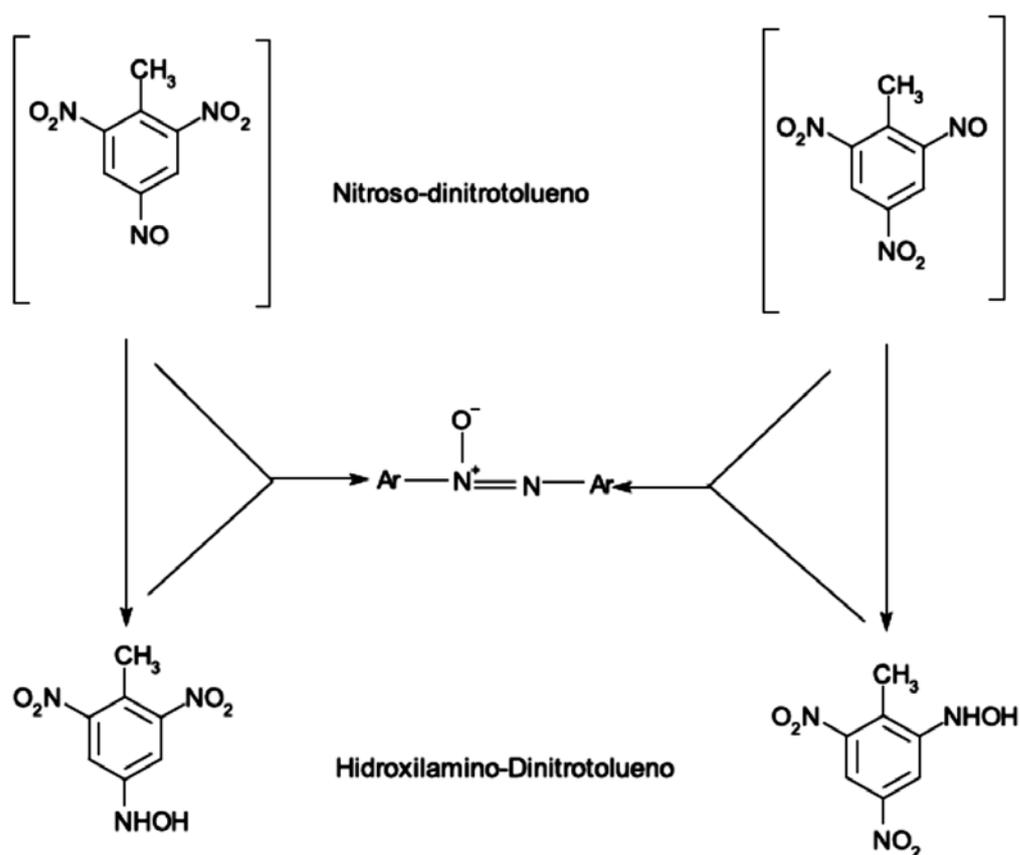


Figura No 4. Formación de dímeros azoxytetranitrotoluenos de la reacción de subproductos nitroso e hidroxilamino de la nitroreducción del TNT  
Tomado de (Smets, et al. 2007)

Ejemplos de este proceso se han encontrado en *Raoultella terrigena* cepa *HB*, convierte rápidamente el 80 – 90% de TNT soluble (10 a 100 mg/L) por una fracción de células agrupadas, principalmente a azoxy-dimeros (Clauss, H.B. et al. 2007). Así mismo, *Pseudomonas aeruginosa* *MX*, acumula el 71% del TNT en células pellet (antes que todo en 2,2-azoxytolueno) dejando el 21% (principalmente en 2ADNT) en los sobrenadantes (Oh, B.-T., Shea, P. J., Drijber, R.A., Vasilyeva, G.K., & Sarath, G. 2003) y *Pseudomonas putida* *JLR11* convierte el 45% de el TNT inicial en células agrupadas bajo condiciones anaerobias (Esteve-Nuñez, et al. 2001).

### **2.2.2. Vía II. Formación del complejo Meisenheimer.**

Algunas de enzimas, además de ser capaz de transformar el TNT por la vía de la nitroreducción (sección 2.1), tienen la capacidad de liberar nitrito del TNT por denitrificación. La ruta de nitroreducción es catalizada por todas las enzimas, mientras la denitración es solamente catalizada por la PENT reductasas, XenB y NemaA vía la formación del complejo híbrido Meisenheimer (HTNT) y complejo di-híbrido Meisenheimer (2HTNT), aunque este último ha sido reportado como un complejo inestable (Park, 2000), también se ha demostrado que puede ser enzimáticamente transformado por enzimas OYE, con una posterior liberación de nitritos. (Williams, R. T., Rathbone, D.A. Scrutton, NS & Bruce, N.C. 2004).

La formación de dicho complejo implica la pérdida de las propiedades aromáticas del benceno, como las oxidativas, debido a la presencia de los grupos nitro unidos a sus carbonos 2,4 y 6, en consecuencia, el potencial redox del TNT disminuye,

llevándose a cabo un ataque reductivo que trae consigo la formación de  $\text{NO}_2^-$  y del complejo en mención. (Villegas., P. S. (2009).). Figura No 5.

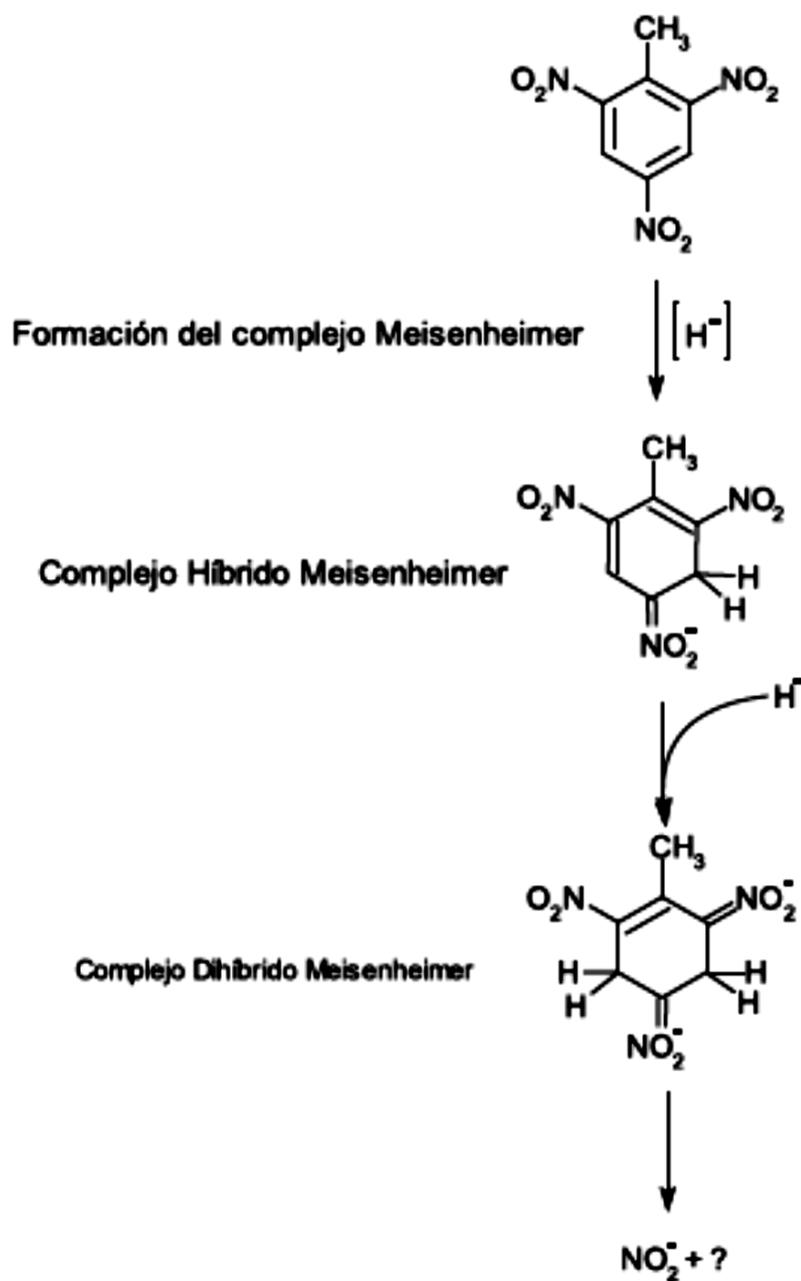


Figura No 5. Vía 2. Transformación del complejo Meisenheimer mediante enzimas de la familia Old Yellow Enzyme.

Tomado de: (Smets, et al. 2007; Villegas., P. S. (2009).)

Este tipo de metabolismo, es uno de los más complejos y menos conocidos, no se ha determinado con seguridad todos los metabolitos producidos, pero se cree que la etapa final es la mineralización total del TNT (Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., & Knackmuss, H-J. 1994). En la Tabla No 3. Se mencionan los microorganismos que contienen flavoproteínas.

Tabla No 3. Estudios que reportan microorganismos con presencia de enzimas OYE

<i>Microorganismo</i>	<b>Enzima</b> <b>Familia OYE</b>	<b>Fuente</b>	<b>Investigación</b>
<i>Escherichia coli</i>	N-etilmaleimida reductasa (NemA)	Park et al 2000	Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from <i>Pseudomonas fluorescences</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>YqjM</i>	Fitzpatrick et al 2003	Characterization of YqjM, and old yellow enzyme homolog from <i>Bacillus subtilis</i> involved in the oxidative stress response
<i>Enterobacter cloacae</i>	Pentaerythritol tetranitrate (PETN)reductase	Khan et al 2002	Kinetic and structural basis of reactivity of pentaerythritol tetranitrate reductase with NADPH, 2-cyclohexenone, nitroesters, and nitroaromatic explosives
<i>Pseudomonas putida</i>	Morphinone reductase	Williams et al 2004	Biotransformation of explosives by the old yellow enzymes family of flavoproteins.

### **Denitración del complejo Meisenheimer.**

Esta vía es común en levaduras y hongos, los cuales presentan una capacidad de mineralización del TNT mayor al 20%, esto en gran parte debido a su sistema ligninolítico (Nyanhongo, G. S., Schroeder, M., Steiner, W. y Gubitz G.M. 2005). En

este orden de ideas, tenemos que la *Saccharomyces sp.* reduce TNT a la mezcla de isómeros de HADNT, con ADNT y H-TNT como productos menores. En el sentido contrario *Candida sp.* transforma TNT casi cuantitativamente a H-TNT o produce una mezcla equimolar de HADNT y H-TNT (Zaripov, S. A., Naumov, A.V., Nikitina, E.V., & Naumova, R.P. 2002)

Esto nos indica que la ruta está dada en dos pasos, primero la reducción del anillo aromático del TNT, vía complejo Meisenheimer y a partir de este complejo por una secuencia de desnitrición finaliza en 2,4 Dinitrotolueno (2,4-DNT) Figura No 6.

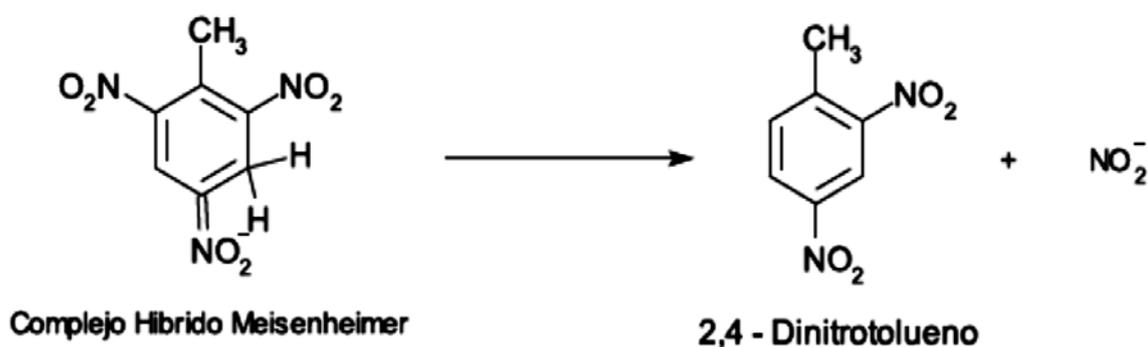


Figura No 6. Desnitrición del complejo Meisenheimer.  
Tomado de: (Smets, et al. 2007; Villegas., P. S. (2009).)

### 2.2.3 Vía III. Oxigenolítica.

La transformación bacteriana del TNT, está dada por sucesivas reducciones del grupo nitro, la posibilidad de una vía oxigenolítica ha sido recientemente reactivada por la detección de 3-metil-4,6-dinitrocatecol así como la liberación significativa de nitritos durante las transformaciones aerobias de TNT por un cultivo mixto sostenido en una

mezcla de TNT y 2,4-DNT como fuente de Carbono y Nitrógeno (Tront, J. M. H., J.B. 2005). Patrones de isotopos estables confirman que el catecol es derivado del TNT y es potencialmente el resultado de una desnitración del anillo benzoico por la dihidroxilación de TNT. (Figura No 7). (Smets, et al. 2007)



Figura No 7. Ruta oxigenolítica del TNT.  
Tomado de: (Smets, et al. 2007; Villegas., P. S. (2009).)

### 2.3. Microorganismos Degradadores de TNT.

#### 2.3.1. Aislamientos.

Se han reportado que los microorganismos nativos de ambientes con presencia de explosivos, son los microorganismos que presentan mejor potencial degradador de compuestos nitrogenados como el TNT. (Villegas., P. S. (2009).)

La búsqueda de estos microorganismos implica la localización de áreas con presencia permanente de estos compuestos, para poder aislar microorganismos que han conseguido adaptarse a estos ambientes, y que desarrollan su potencial degradador que

le permite aprovecharlo en su metabolismos como fuente de nitrógeno o de carbono.(Villegas., P. S. (2009).)

Para el aislamiento de dichos microorganismos, es necesario utilizar medios de cultivo que le brinde las condiciones nutricionales para efectuar el respectivo metabolismo, para el caso del explosivo, además de TNT, debe contar con una fuentes de carbono, bien sea de materia orgánica presente naturalmente en el suelo o carbohidratos simples de fácil degradación como glucosa, succinato y acetato, (Villegas., P. S. (2009).), además, ya que varias investigaciones reportan que el explosivo es tomado como única fuente de nitrógeno y que las bacterias Gram negativas son más resistentes al TNT entre concentraciones de 100 a 200 mg/L y de 15 a 100 mg/L para bacterias Gram positivas.(Zaripov S.A.,et al. 2004)

### **2.3.2. Crecimiento.**

El crecimiento bacteriano de las cepas degradadoras de explosivos, al igual que las demás bacterias está influenciado por la naturaleza química y física de su ambiente. El conocimiento de estas influencias ambientales permite controlar el crecimiento microbiano. Los factores que pueden tener influencia sobre el crecimiento bacteriano y que son de interés para la investigación, son:

**pH:** Cada microorganismo posee un intervalo amplio definido pero con tolerancia limitada y un óptimo para su crecimiento. Las variaciones intensas en el pH pueden

dañar a los microorganismos alterando la membrana plasmática o inhibiendo la actividad de las enzimas y proteínas transportadoras. En las bacterias los sistemas de transporte de sodio y de potasio posiblemente corrigen pequeñas variaciones de pH. Si este se vuelve demasiado ácido, se activan otros mecanismos. Cuando el pH baja a valores de 6,0, algunas bacterias como *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* sintetizan un grupo de proteínas nuevas como parte de la denominada respuesta de tolerancia en medio ácido. La ATPasa translocadora de proteínas contribuye a esta respuesta protectora, produciendo más ATP o bombeando protones fuera de la célula. Pero si el pH baja a 4.5 o inferior, se sintetizan proteínas de respuesta al shock ácido. Probablemente estas sustancias evitan la desnaturalización de las proteínas y facilitan de nuevo el pliegue de las desnaturalizadas (Eduardo, A. J. S. (2007))

**Temperatura:** Es el factor más importante de los componentes ambientales que afectan la viabilidad y el desarrollo microbiano. El factor que más influye sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento es la sensibilidad de las reacciones catalizadas por enzimas a determinadas temperaturas. En condiciones de baja temperatura, un aumento eleva la velocidad de crecimiento, porque la velocidad de una reacción catalizada por enzimas, como de cualquier reacción química, casi se duplica por cada incremento de 10°C. Como la velocidad de cada reacción aumenta, el metabolismo en general es más activo a temperaturas altas y el microorganismo crece más rápidamente. Pero a partir de cierto punto un incremento de la temperatura disminuye la velocidad de crecimiento y temperaturas lo suficientemente altas son letales ya que las enzimas se desnaturalizan al igual que las proteínas transportadoras entre otras.

Todos los microorganismos tienen una temperatura mínima por debajo de la cual no se producen un crecimiento prolongado, así como una temperatura óptima en el cual el crecimiento es mucho más rápido y una temperatura máxima por encima de la cual el crecimiento no es posible.(Eduardo,et al. 2007)

### **Nutrientes.**

**Nitrógeno:** Otro factor es el nitrógeno. Los microbios, como flora viviente requieren sustratos específicos y otros nutrientes para su actividad. Los sustratos son normalmente una fuente de carbono y nutrientes como nitrógeno y fósforo que deben provenir de mismo sustrato o de una fuente externa. Si el nitrógeno está presente en poca cantidad en el medio de cultivo, la bacteria no produce las enzimas necesarias para usar el carbón, y en el caso contrario, mucha cantidad de nitrógeno, particularmente en forma de amonio, puede inhibir el crecimiento de la bacteria, la concentración óptima de nitrógeno asegura el metabolismo bacteriano.(Boopathy, et al. 1997)

**Trinitrotolueno como sustrato:** Cuando se usa TNT como sustrato, se ha afirmado que las altas concentraciones de explosivo son tóxicas para muchos microorganismos (Spain, J. C. 1995), pero existen reportes de bacterias que tiene la capacidad de crecer en medio sólido con exceso de TNT adicionado en forma de cristales en el medio de cultivo, es el caso de la *Pseudomonas spCISI* reportado por Duque en 1993, que creció a concentraciones de 1 a 10g/L de TNT y alcanzó densidades celulares similares a las observadas cuando se usa la concentración de saturación de TNT (100 mg/L). es

necesario aclarar, que esto se logró por la aplicación de una fuente adicional de Carbono diferente al explosivo como fue el ácido acético (Duque, et al. 1993).

Otras investigaciones reportan el crecimiento de bacterias en presencia de 200 a 500 mg/L de TNT, como es el caso de la *Klebsiella sp* cepa *CI*, aislada por Chang en 2002, a partir de muestras de lodo en sitios contaminado con explosivo en la planta de Chuncheon, Korea. Así mismo las cepas aisladas en esta investigación, tuvieron la capacidad para crecer medio sólido a las mismas concentraciones de TNT (en un rango de 100 a 500 mg/L), planteadas en la investigación anterior, dichas bacterias fueron identificadas mediante secuenciación molecular y corresponde a *Pseudomonas oleovorans* y *Shinella kummerowiae*. En el **Anexo 1**, se encuentra el protocolo de identificación de los microorganismos en estudio.

### **2.3.3. Tolerancia a la toxicidad de sustancias químicas.**

La tolerancia de los microorganismos a sustratos químicos se presenta mediante complejos rasgos multigénicos que son afectados por parámetros como: pH, temperatura, presión osmótica, tamaño molecular y presión. La tolerancia puede ser controlada desde el interior de la célula por un solo gen o por varios genes. El fenotipo tolerante es el resultado de diferentes mecanismos simultáneos de acción, que incluye, bombas moleculares, cambios en las propiedades de la membrana, cambios en la composición de la pared celular, alteración de la energía metabólica y cambios celulares en términos morfológicos. Estos mecanismos son independientes del uno al otro e

involucra genes o grupos de genes dispersos en cromosomas o en plásmidos localizados. (Bernal, P., Segura, A. y Ramos, J.L. (2007)).

Estudios han demostrado que los compuestos químicos afectan a las células de dos formas (Ramos, J. L., Duque, E., Godoy, P., & Segura, A. 1998):

- Mediante el deterioro y desnaturalización biológica de las moléculas incluyendo el desdoblamiento de proteínas; daños en el DNA y lípidos por mecanismos oxidativos; desdoblamiento y degradación del RNA, que ocasiona la muerte celular.
  
- Cambios fisiológicos en la membrana celular, afectando sus procesos de generación de energía y transporte.

Las células responden a estos efectos pleiotrópicamente, mediante:

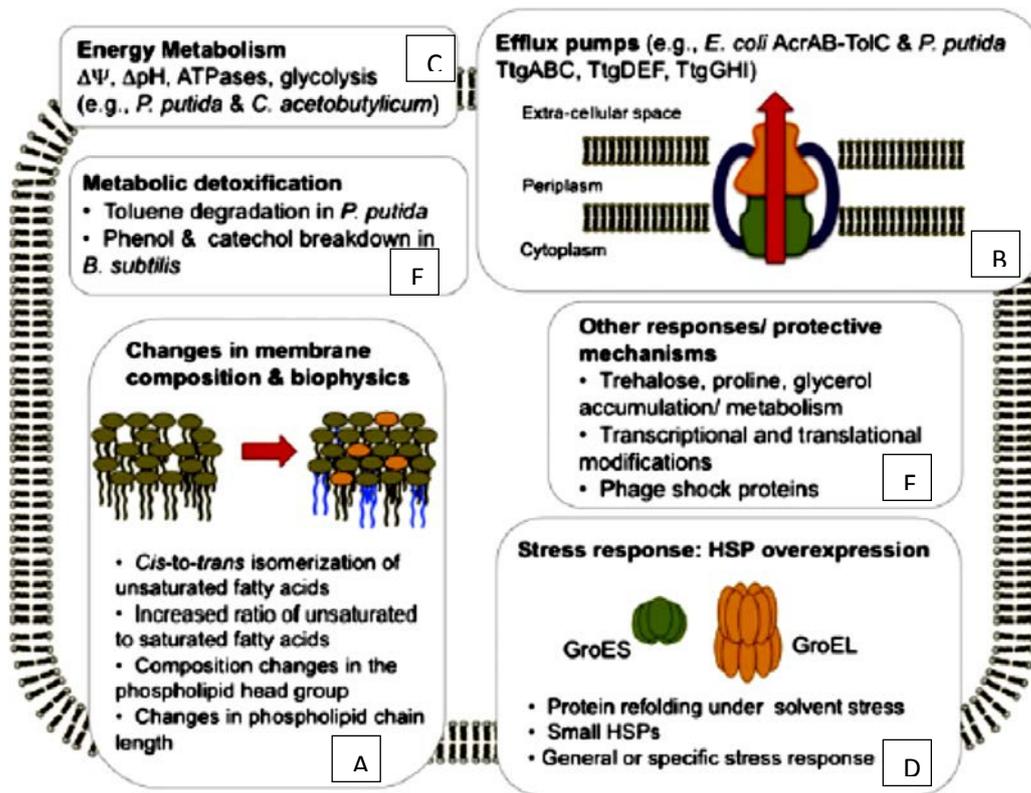
- La estimulación a los componentes principales del sistema general y específico de respuesta al estrés celular (choque-térmico (HSP) y de proteínas relacionadas.
  
- Inducción metabólica al transporte, basada en mecanismos de desintoxicación incluyendo procesos para metabolizar el compuesto tóxico a un subproducto

menos tóxico. La activación y el empleo de bombas de transporte moleculares que expulsan los productos químicos tóxicos. Alteraciones en programas biosintéticos para producir metabolitos, como ciertos aminoácidos y azúcares que contrarrestan los efectos tóxicos.

- La obtención de respuestas a largo plazo de adaptación para superar la toxicidad del sustrato mediante la alteración en los programas de diferenciación biosintéticas y morfogenética para contrarrestar la toxicidad del compuesto e incluye alteraciones en la composición de la membrana y de la pared celular.
- Y por último la inducción de cambios complejos en el nivel de transcripcional de proteínas (Nicolaou, S. A., Gaida, s. M., y Papoutsakis, E.T. 2010).En la Figura No 8 se proporciona un resumen visual de estas respuestas celulares.

#### **2.4. Consorcios.**

En los ecosistemas, no existen organismos individuales sino poblaciones microbianas con diferentes adaptaciones para sobrevivir en diversos ambientes, donde cada población de microorganismos desempeña un papel funcional (nicho) que permite su supervivencia. Dentro de esta población, lo microorganismos cooperan cuando las densidades celulares son bajas, pero compiten cuando son altas. Estas interacciones pueden ser benéficas (sinergia) o competitivas (antagónicas), las primeras tienden a optimizar la utilización de recursos disponibles y las segundas actúan como controles de



**Figura No 8.** Respuesta celular a compuestos tóxicos que pueden producir tolerancias.

**A.** Cambios en la composición de la membrana celular y biofísicos para contrarrestar los efectos fluidizantes de los compuestos tóxicos, incluyendo las cortas isomerizaciones cis a trans de fosfolípidos y los grandes cambios en los ácidos grasos insaturados a saturados.

**B.** Bombas moleculares de eflujo (se muestra la expansión del periplasma de una célula Gram-negativa) expulsando la sustancia toxica del citoplasma dentro del espacio extracelular con el fin de desintoxicar el citoplasma.

**C.** Proceso de membrana interrumpido, tal como la fuerza motriz de protones asociada a la producción de energía, cambios provocados en el metabolismo celular para aumentar la producción de ATP necesaria para sobrevivir y reparar procesos celulares.

**D.** Proteínas de estrés HSP para ayudar en el plegamiento y re-plegamiento de proteínas para evitar la agregación bajo estrés químico.

**E.** Desintoxicación catabólica para remover compuestos tóxicos convirtiéndolos en menos químicos menos perjudiciales.

**F.** Otras respuestas transcripcionales y traslacionales que pueden mejorar la viabilidad bajo estrés que conduce a la producción de trealosas , o por regulación del sistema especializado del estrés, tal como el sistema proteico de shock.

Tomado de Nicolaou, et al. 2010.

retroalimentación, ya que impiden el agotamiento de los recursos y la consiguiente desaparición de la población. (Atlas, R., y Bartha, R. (2002))

Por lo tanto, estas comunidades microbiológicas poseen una increíble versatilidad fisiológica y potencial catabólico para la ruptura de una gran cantidad de moléculas orgánicas. La mayoría de los productos naturales o sintéticos, independientemente de su peso molecular o complejidad estructural, es degradado por uno o más especies microbianas (Atlas, R., y Bartha, R. (2002)), en esta degradación la biomasa y las actividades catabólicas aumentan por un proceso autocatalítico hasta un nutriente esencial, por ejemplo, cuando las fuentes de carbono y energía se convierten en limitantes (Knackmuss, H.-J. 1996).

La tasa de transformación de un compuesto xenobiótico y el número de células viables en la población permanecerá constante si la degradación es incompleta y no produce energía para el crecimiento, bajo estas condiciones la degradación total de los compuestos xenobióticos está esencialmente determinado por procesos que se denominan cometabolismo (Knackmuss, 1996).

Es así, como el TNT es cometabolizado por bacterias del suelo a productos de reducción, sin un aparente rompimiento del anillo aromático. Los grupos nitro son reducidos de forma escalonada a través de los grupos hidroxilamino al grupo amino. La susceptibilidad de los grupos nitro en la molécula de TNT para reducción, son las posiciones para y orto, la reducción de estos grupos nitro están dados por bacterias aerobias y por algunos extractos celulares (In B., P. J., Namkoong W., Hwang E. y Kim J. 2008), pero para reducir el tercer grupo nitro (meta) se requieren condiciones anaerobias (Vanderberg, L. A., Perry, J.J. & Unkefer, P.J. 1995) por lo que es necesario

para la degradación completa la combinación de dos microorganismos aerobios y anaerobios.

Por eso en esta investigación, se combinó las cepas en estudio para determinar si interactúan de manera positiva entre ellas o no (Prueba de antagonismo) y si lo hacen, determinar si la degradación del TNT mejora en términos de tiempo y porcentaje, con respecto a la degradación individual.

### **3. CONTEXTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.**

Entre los explosivos utilizados por la industria militar y minera a nivel mundial, se destaca el uso de los compuestos nitroaromáticos en especial el TNT, debido a estabilidad térmica, química y su alto poder de detonación (Halasz *et al.*, 2002). Sin embargo, durante su fabricación y uso se genera un impacto ambiental negativo, constituyendo un riesgo para la salud humana debido a sus propiedades recalcitrantes, mutagénicas y carcinogénicas (Rodgers y Bunce, 2001; Kulkarni, et al. 2007).

Se ha reportado un gran número de sitios contaminados con compuestos nitroaromáticos. (Rodgers et al 2001; Rosser, French y Bruce, 2001; Zaripov et al 2004), y se han evaluado diferentes tratamientos físicos, químicos y biológicos para eliminar descontaminar estos sitios (Hannink et al 2003; Kulkarni et al 2007), como es la excavación, incineración o vertimientos en el mar, pero estos métodos son poco amigables para el medio ambiente ya que los residuos persisten y generan un alto costo

económico. La aplicación de métodos económicos como el compostaje, se evidencian dos problemas, su implementación es más limitada que aplicar directamente el microorganismo y los datos que existen no son fiables (Lewis, et al. 2004).

Actualmente las investigaciones en remediación se han centrado en el uso de procesos biológicos donde se utilizan microorganismos, plantas, otros organismos vivos o productos obtenidos de ellos, que tienen la propiedad de eliminar compuestos xenobióticos y sus subproductos de manera eficiente y controlada; durante este proceso se busca la degradación completa (mineralización) de dichos compuestos a través del metabolismo microbiano cuyo producto final pueda ser utilizado por la naturaleza (Eweis *et al.*, 1999; Rodgers et al., 2001; Atlas y Bartha, 2002). Con los compuestos explosivos como el TNT, la biorremediación se enfoca actualmente, solo en los residuos propios de la fabricación y uso; en relación con las cargas que no estallan y que persisten mucho después del tiempo previsto en el suelo, aún no se ha considerado este tipo de proceso; esta situación, agrava más el problema tanto en lo ambiental como en salud pública, ya que sus residuos se dispersan por grandes distancias sin poderlas identificar.

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

Hasta el momento, en Colombia solo la Universidad Javeriana en convenio con la Universidad de la Salle, ha realizado reportes sobre aislamientos, caracterización y estudios de biodegradación del 2, 4,6 Trinitrotolueno, por parte de microorganismos aerobios que poseen dicha capacidad y el propósito de estas investigaciones es el de implementar alternativas biológicas que den respuesta a la problemática planteada a través de nuevos métodos y técnicas, ambientalmente amigables.

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

Para dar respuesta a este problema, el objetivo de este proyecto fue establecer los valores de pH y temperatura en los cuales fuera más eficiente la degradación biológica del TNT por parte de bacterias aisladas de suelos con explosivos y lograr con el tiempo algún nivel de degradación de explosivos en el tiempo. Con los resultados de este proyecto se reportan los primeros estudios en Colombia sobre la degradación biológica en este tipo de compuestos.

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

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

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General**

Establecer el efecto del pH y la temperatura en la degradación del 2, 4,6 Trinitrotolueno por bacterias aisladas de sitios con presencia de explosivos

### **4.2. Objetivos Específicos.**

- Evaluar la capacidad degradadora de las bacterias aisladas, sobre el 2,4,6 Trinitrotolueno.
- Identificar la concentración máxima de 2, 4,6 Trinitrotolueno a la cual las bacterias seleccionadas crecen.
- Conocer según parámetros de pH y temperatura, la capacidad degradadora de las bacterias seleccionadas, mediante la degradación del 2,4,6, Trinitrotolueno.
- Determinar bajo valores seleccionados de pH y temperatura la capacidad degradadora de la mezcla de las cepas seleccionadas, mediante la degradación del 2, 4,6 Trinitrotolueno.

## **5. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS**

### **Fase I. Selección de cepas con capacidad degradadora de 2, 4,6 Trinitrotolueno.**

#### **5.1. Aislamiento de microorganismos.**

Los microorganismos en estudio, fueron aislados a partir del screening realizado por Bravo Carolina y Diana Aldana(2010). Con el ánimo de conocer si los microorganismos con posible capacidad degradadora de explosivos utilizaban el TNT como única fuente de Nitrógeno y de Carbono, se usaron tres diferentes medios de cultivo, donde el TNT fue el sustrato y solo se agregaban fuentes adicionales de carbono o de nitrógeno. Estos medios de cultivo fueron llamados “T1 (el cual contenía Nitrato de amonio como fuente adicional de nitrógeno pero ninguna fuente adicional de carbono) -T2 (contenía fuentes adicionales de carbono pero no de nitrógeno) y T3 (No contenía ninguna fuente adicional de nitrógeno ni de carbono)” se encontró que el medio de cultivo T2, presento mayor diversidad de morfotipos. En el **Anexo 2**, se plasman los componentes de cada uno de los medios empleados.

El crecimiento bacteriano fue monitoreado por observación directa de colonias en placa. Se registró la forma, elevación textura y pigmentación de las mismas. La morfología de la pared celular se identificó por Tinción de Gram.

#### **5.2. Conservación de microorganismos.**

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

### **5.3.Pruebas de degradación.**

#### ***5.3.1. Criterios de inclusión.***

Para la prueba de degradación de los microorganismos en estudio, se utilizaron los siguientes criterios:

- Presentar crecimiento en T2 líquido a una temperatura de 30°C y a 200 rpm.
- Alcanzar una densidad óptica mínima de 0.125 de absorbancia a 600 nm de longitud de onda.

#### ***5.3.2. Métodos y Técnicas aplicadas.***

La capacidad degradadora de los microorganismos fue determinada mediante la aplicación del método 8330B, utilizado en el tratamiento de muestras nitroaromáticos y nitroamidas establecido por la EPA (del inglés, Environmental Protection Agency)(Agency, 2007) el cual incluyó monitoreo del TNT residual por la técnica de HPLC (del inglés, High Performance Liquid Chromatography)

#### ***5.3.3. Obtención del inóculo.***

Para cada uno de los ensayos realizados en esta investigación, los inóculos de las cepas en estudio eran obtenidos así: a partir de cultivos masivos, se preparó un pre inóculo en 5 mL de medio T2 líquido, se incubó a 30°C y a 200 rpm (Husain I., A. M., Alam Z. y Muyibi S.A. 2011) durante 12 horas (overnight); Para la obtención del

inóculo, el pre inóculo era sembrado en 45 mL de medio T2 líquido, el cual se incubó sin variar las condiciones, hasta cuando alcanzó una absorbancia mínima de 0,125 a 600 nm de longitud de onda. Las absorbancias del ensayo fueron tomadas con base en la curva de calibración previa realizada por los investigadores.

#### **5.3.4. Ensayo de biodegradabilidad.**

Los ensayos de biodegradabilidad se hicieron por triplicado. Para ello, se sembraron 10 mL del inóculo en 90 mL de medio T2 líquido, se incubaron a 30°C y a 200 rpm por 14 días (tiempo en el cual los microorganismos tardaron en crecer). Durante este periodo, se monitoreo la cantidad de TNT residual por medio de HPLC (En el **Anexo 3**, se encuentran las condiciones de corrida de las muestras), haciendo extracciones de muestra según el método 8330B modificado de la EPA (**Anexo 4**) en tres tiempos: tiempo inicial ( $t_0$ =en el momento de inocular las réplicas), tiempo intermedio ( $t_1$ = a los 7 días de incubación) y tiempo final ( $t_2$ = a los 14 días).

Sin variar la condiciones de incubación, tiempo y de extracción de muestra, se hizo un control abiótico por triplicado con medio T2 líquido. Así mismo, se realizaron curvas patrón con soluciones estándares de TNT, 4amDNT y 2,6 DNT, con concentraciones conocidas (**Anexo 5**), lo cual, permitió trazar un punto de comparación para determinar la concentración explosivo y la de sus metabolitos en los diferentes cultivos a través del tiempo.

La tasa de degradación (%) fue expresada en términos de porcentaje de degradación de explosivo aplicando la fórmula:

$$\%TNT = \frac{(TNT_o - TNT_t)}{(TNT_o)} \times 100(1)$$

Dónde:

$TNT_o$  = Concentración inicial del explosivo.

$TNT_t$  = Concentración del explosivo en el tiempo establecido.

**Fase II. Crecimiento de las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones de 2, 4,6 Trinitrotolueno.**

#### **5.4. Ensayos preliminares.**

Para observar la interferencia de los solventes en el que se encontraba diluido las soluciones de TNT, en relación a la curva y tiempo de crecimiento de las cepas en estudio, se realizaron ensayos preliminares, en los cuales se usaron dos patrones de 20000 mg/L de TNT diluidos en acetonitrilo y acetona respectivamente. Esto con el fin de conocer si el nitrógeno que posee el acetonitrilo interfiere con el crecimiento de las cepas.

##### **5.4.1. Acetonitrilo**

A 90 mL de T2 líquido sin explosivo, se le adicionó el volumen necesario de la solución patrón diluida en acetonitrilo para obtener una concentración final de 100 mg/L de TNT. Al medio de cultivo así preparado, se le agregó 10 mL de inóculo de la cepa seleccionada, se incubó a 30°C y a 200 rpm por 90 horas; se tomaron mediciones de absorbancia cada cuatro horas durante las primeras 48 horas y después cada 24 horas a

una longitud de onda de 600 nm; para los mismos tiempos, se sembraron diluciones de ( $10^{-4}$ - $10^{-6}$ ) según el método de conteo de células viables (Madigan T M, y Parker J., B. 2004) en T2 sólido, sin variar la temperatura fueron incubados. El recuento de las colonias se efectuó a las 72 horas.

#### **5.4.2. Acetona.**

En esta prueba, a tres erlenmeyers estériles vacíos, se les agregó el volumen necesario de la solución patrón diluida en acetona para obtener una concentración final de 100 mg/L de TNT. La solución se dejó hasta evaporación total para eliminar el efecto tóxico que el solvente podía causar en el crecimiento. Posteriormente se agregaron 90 ml de T2 líquido sin explosivo.

Aplicando el mismo procedimiento del ensayo anterior (acetonitrilo), el medio de cultivo así preparado, fue inoculado con la cepa seleccionada y se monitoreó su crecimiento.

### **5.5. Curvas de crecimiento.**

#### **5.5.1. Criterios de inclusión.**

Con base en los resultados obtenidos durante los procedimientos de recuperación de los microorganismos, ensayos de biodegradabilidad y ensayos preliminares de crecimiento, se establecieron los siguientes criterios para la selección de las cepas y para la realización de las curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de explosivo:

- Densidad óptica mínima establecida (0,125) para los inóculos de las cepas, menor a 7 días.
- Cepas con capacidad degradadora de TNT mayor al 80%.
- Solución patrón de TNT a 20000 mg/L diluido en el solvente que no presente influencia en el crecimiento.
- Medición de absorbancia y conteo en placa en los tiempos establecidos en los ensayos preliminares.
- Diluciones  $10^{-3}$ - $10^{-4}$ - $10^{-5}$

#### ***5.5.2. Preparación concentraciones de TNT.***

A partir de la solución patrón de 20000 mg/L de TNT diluido en acetona y aplicando el procedimiento del numeral 2.1.2, se prepararon por triplicado los medios de cultivo T2 a las siguientes concentraciones de TNT 100 – 200 – 300 - 400 y 500 mg/L

#### ***5.5.3. Crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de TNT.***

Se sembraron los medios de cultivo T2 a las concentraciones de TNT establecidas con 10 mL de inóculo de las cepas seleccionadas. Sin variar las condiciones del ensayo preliminar fueron incubados y monitoreado su crecimiento. Bajo esta mismas condiciones, se hizo por triplicado un control, que consistió en sembrar el inóculo en medio T2 líquido sin adición de explosivo (0 mg/L TNT).

**Fase III. Establecerla degradación del TNT de las cepas seleccionadas, según parámetros de pH y temperatura.**

**5.6. Criterios de inclusión.**

Los criterios de inclusión para esta actividad fueron:

- Densidad óptica mínima establecida para los inóculos de las cepas, menor a 7 días.
- Cepas con capacidad degradadora de TNT mayor al 80%.
- Solución patrón de TNT a 20000 mg/L diluido en acetona.
- Los valores de pH se establecieron en 6.0 – 7.0– 8.0 a 30°C y a 200 rpm.
- Los valores de temperatura se establecieron a 20-25-30-35 °C en el pH donde se presentó la mayor degradación de TNT.

**5.6.1. Ensayo de biodegradabilidad según valores de pH.**

Para los ensayos de biodegradabilidad según los parámetros de pH establecidos, se conservándolas condiciones de inoculación, temperatura, agitación, extracción y cuantificación de muestra enunciadas en el numeral 1.3.3, (ensayo de biodegradabilidad).En este experimento el tiempo de incubación para los cultivos fue de 5 días y se tomaron mediciones de la concentración de TNT, de metabolitos como AMDNT-DNT y de acumulación de nitritos cada 24 horas a partir de la inoculación durante las primeras 72 horas y a las 120 horas.

Se utilizó un control abiótico por triplicado bajo las mismas condiciones del ensayo para cada uno de los valores de pH establecidos.

#### **5.6.2. Ensayo de biodegradabilidad según valores de temperatura.**

Una vez establecido el valor de pH en el cual se presentó mayor porcentaje de degradación de TNT por parte de las cepas seleccionadas, se realizaron los ensayos con las siguientes temperatura 20-25-30 y 35 °C. Para cada una de estas temperaturas se preparó por triplicado 90 mL de medio T2 líquido con pH ajustado según criterios de inclusión; se utilizaron las mismas condiciones de inoculación, agitación, extracción y cuantificación de muestras que en el ensayo anterior. En esta actividad el tiempo de incubación para los cultivos fue de 7 días y se tomaron mediciones de la concentración de TNT cada 24 horas durante las primeras 72 horas a partir de la inoculación, luego a las 120 horas y por último a las 168 horas.

Bajo las mismas condiciones del ensayo se usó un control abiótico por triplicado para cada una de las temperaturas establecidas.

**Fase IV. Determinar degradación del TNT a partir de la combinación de las bacterias en estudio.**

#### **5.7. Criterios de inclusión.**

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

- Las bacterias en estudio no sean antagónicas.
- La mezcla de las cepas alcancen una densidad óptica mínima de 0.125 de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.
- Los valores de pH y temperatura seleccionados, son aquellos en los que las bacterias de forma individual presentaron mayor capacidad de degradadora de TNT.

## **5.8. Pruebas de antagonismo.**

La prueba de antagonismo se realizó aplicando la técnica de Gauze modificada para evaluar la interacción bacterias.(Orjuela, P., Sandon, A., franco, M. y Martinez, M. (2003))

### **5.8.1. Técnica de Gauze modificada por enfrentamiento dual**

Se hizo una siembra masiva de cada una de las cepas a evaluar en medio de cultivo T2 sólido. Esta siembra se usó como control de crecimiento. Posteriormente, una caja con T2 sólido, se dividió en dos segmentos, en cada segmento se sembró una de las cepas a evaluar, de tal manera que el estriado quedara enfrentado con respecto a la otra. Y se utilizó un medio de cultivo T2 como control de esterilidad. Cada uno de las pruebas aplicadas se realizaron por triplicado. Los cultivos fueron incubados a 30°C, se monitoreo diariamente el crecimiento de las cepas y se midió el diámetro del posible halo de inhibición generado por las cepas antagónicas.

## **5.9. Mezcla de cepas bacterianas.**

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

### **5.9.1. Ensayo de biodegradabilidad.**

Para el ensayo de biodegradabilidad, no se variaron las condiciones de inoculación, agitación, tiempos de extracción y cuantificación de muestras enunciadas en el numeral 3.3. (Ensayos de biodegradabilidad según pH). El control que se utilizó fue un abiótico bajo las mismas condiciones fisicoquímicas del experimento.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Fase I. Selección de las cepas con capacidad degradadora.**

#### **6.1. Aislamiento de microorganismos.**

Se aislaron 32 cepas bacterianas en medio T2 sólido; la presencia de colonias se manifestó a las 120 horas de incubación, y sus características macroscópicas fueron similares: colonias pequeñas, circulares, translucidas y de borde liso, “Gotas de agua” (Figura No 9.).

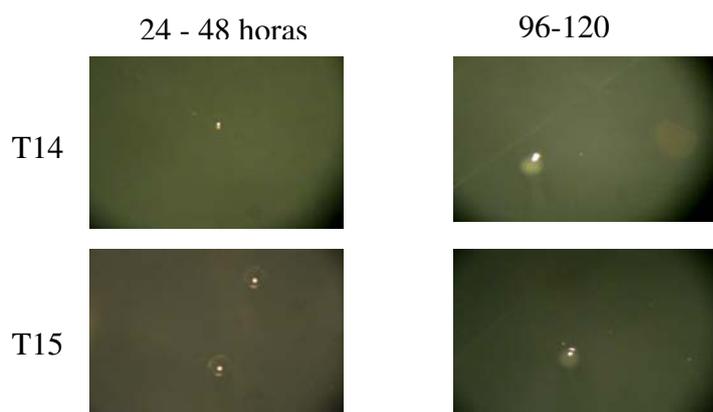
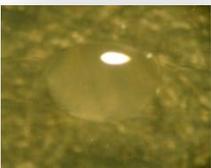


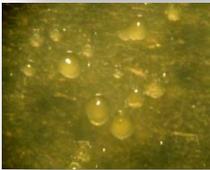
Figura No 9. Formación de morfotipos a través del tiempo.

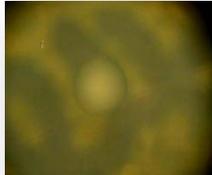
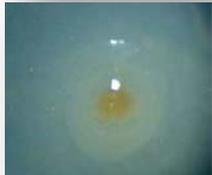
Después de este periodo de incubación, las colonias presentaron grandes diferencias morfológicas entre ellas, en las cuales se destacó la pigmentación en diferentes tonalidades rojizas, en la Tabla No 4, se plasman las características macroscópicas y microscopias de dichas colonias. Al parecer este cambio morfológico, se debió a la exposición continua de la cepas a los cristales de TNT (Avinash M. T, K. J. (2000)), ya que, cuando los microorganismos atacan dichos cristales forman colonias de color rojo oscuro y viran el color del medio a rojo o amarillo, dependiendo del metabolito que produzcan (Villegas., P. S. (2009).), esta característica macroscópica fue utilizada por Nyanhongo y col (2009) para identificar el potencial degradador de microorganismos como *Pseudomonas putida* y *Bacillus SF* (Termoalcalofílicos) en medio de cultivo sólido. En el caso de esta investigación, el cambio de pigmentación de las colonias no es indicador de degradación pero si de tolerancia.

Para el aislamiento de microorganismos potencialmente degradadores de explosivos, se utilizó el TNT como única fuente de nitrógeno, mas no como fuente de

Tabla No 4. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas

Cepas	Colonia	Características	
		Macroscópicas	Microscópicas
T1		Forma: Circular. Borde: Entero. Elevación: Plana Color: Amarillo	Diplococos Gram positivos
T2		Forma: Circular. Borde: Entero. Elevación: Convexa Color: Blanco	Bacilos Gram Positivos Extremos Redondos
T3		Forma: Irregular. Borde: Ondulado. Elevación: Plana Color: Blanco opaco	Bacilos cortos Gram Positivos extremos redondos
T4		Forma: Circular. Borde: Entero. Elevación: Pulvinada Color: Rojo	Bacilos Gram Positivos Extremos Redondos
T5		Forma: Circular. Borde: Entero. Elevación: Convexa Color: Rojo Claro	Bacilos Gram Negativos
T6		Forma: Circular. Borde: Entero. Transparente Elevación: Convexa Color: Centro Rosado Otra: Brillante	Bacilos Gram Positivos Extremos Redondos
T7		Forma: Circular. Borde: Entero. Transparente Elevación: Papilada Color: Centro amarillo	Bacilos Gram Negativos Extremo redondo
T8		Forma: Circular. Borde: Entero. Transparente Elevación: Convexa Color: Transparente	Bacilos cortos Gram Negativos extremos redondos

Cepas	Colonia	Características	
		Macroscópicas	Microscópicas
T9		Forma: Irregular. Borde: Ondulado Elevación: Convexa Color: Centro Rojo Claro.	Bacilos cortos Gram Negativos. Extremos redondos
T10		Forma: Circular. Borde: Entero. Transparente Elevación: Convexa Color: Centro crema.	Bacilos cortos Gram Negativos extremos redondos
T11		Forma: Circular. Borde: Entero. Elevación: Convexa Color: Café Claro	Bacilos Gram Negativos Largos Extremos redondos
T12		Forma: Circular. Borde: Entero. Elevación: Convexa Color: Amarillo	Bacilos Gram Negativos Largos Extremos redondos
T13		Forma: Circular. Borde: Entero. Elevación: Convexa. Color: Transparente. Otra: Brillante	Bacilos Gram Negativos
T14		Forma: Circular. Borde: Entero. Elevación: Convexa. Color: Caramelo. Otra: Brillante	Bacilos cortos Gram Negativos extremos redondos
T15		Forma: Circular. Borde: Entero. Elevación: Convexa. Color: Ocre. Otra: Brillante	Cocos bacilos Gram Negativos
T16		Forma: Circular. Borde: Entero. Elevación: Elevada. Color: Blanco. Otra: Brillante	Bacilos Gram Negativos Largos Extremos redondos

Cepas	Colonia	Características	
		Macroscópicas	Microscópicas
T17		<p>Forma: Irregular.          Borde: Ondulado.          Elevación: Umbonada.          Color: Amarillo.          Otra: Opaco</p>	<p>Bacilos cortos Gram          Negativos extremos          redondos</p>
T18		<p>Forma: Irregular.          Borde: Entero.          Elevación: Plana.          Color: Blanco.          Otra: Opaco</p>	<p>Bacilos Gram Negativos          Cortos</p>
T19		<p>Forma: Puntiforme          Borde: Entero.          Elevación: Convexa.          Color: Transparente          Otra: Brillante</p>	<p>Cocos bacilos Gram          Positivos</p>
T20		<p>Forma: Circular.          Borde: Entero.          Elevación: Convexa.          Color: Rosado Claro          Otra: Brillante</p>	<p>Estreptococos Gram          Negativos</p>
T21		<p>Forma: Circular.          Borde: Entero.          Transparente          Elevación: Plana.          Color: Amarillo          Otra: Opaca</p>	<p>Estafilococos Gram          Negativos</p>
T22		<p>Forma: Circular          Borde: Entero.          Transparente          Elevación: Papilada          Color: Centro Marrón</p>	<p>Bacilos cortos Gram          Negativos extremos          redondos</p>
T23		<p>Forma: Circular.          Borde: Entero.          Elevación: Convexa.          Color: Rosado Claro          Otra: Opaca</p>	<p>Cocos bacilos Gram          Negativos</p>
T24		<p>Forma: Circular.          Borde: Entero.          Elevación: Elevada.          Color: Amarillo Claro          Otra: Opaca</p>	<p>Bacilos cortos Gram          Negativos extremos          redondos</p>

Cepa	Colonia	Características	
		Macroscópicas	Microscópicas
T25		<p>Forma: Circular          Borde: Entero. Transparente          Elevación: Acuminada          Color: Centro - Rojo</p>	<p>Bacilos Gram          Negativos Largos          Extremos          redondos</p>
T26		<p>Forma: Circular          Borde: Entero.          Elevación: Umbonada          Color: Ocre</p>	<p>Bacilos cortos          Gram Negativas          extremos          redondos</p>
T27		<p>Forma: Circular          Borde: Entero.          Elevación: Plana          Color: Transparente</p>	<p>Cocobacilos Gram          Negativas</p>
T28		<p>Forma: Irregular          Borde: Erosionado.          Elevación: Umbonada          Color: Café Claro</p>	<p>Bacilos cortos          Gram Negativos          extremos          redondos</p>
T29		<p>Forma: Circular          Borde: Entero.          Elevación: Elevada          Color: Blanco cremoso</p>	<p>Bacilos cortos          Gram Negativos          extremos          redondos</p>
T30		<p>Forma: Circular          Borde: Ondulado Blanco          Elevación: Elevada          Color: Amarillo</p>	<p>Cocobacilos Gram          Positivos</p>
T31		<p>Forma: Puntiforme.          Borde: Entero.          Elevación: Convexa.          Color: Crema          Otra: Pequeñas-Brillantes</p>	<p>Bacilos cortos          Gram Postivos          extremos          redondos</p>
T32		<p>Forma: Circular          Borde: Entero.          Elevación: Convexa.          Color: Blanco crema          Otra: Pequeñas – Opacas</p>	<p>Bacilos Gram          Positivos          Extremos          Redondos</p>

carbono, por lo cual se recomienda adicionar una fuente de carbono fácilmente asimilable como la glucosa o el acetato al medio de cultivo, para generar un balance de nutrientes favorables para la degradación (Villegas., P. S. (2009).). Esto se comprobó en estudios con *Pseudomonas sp*, donde el tipo de fuente carbono estimuló el tiempo de crecimiento de las cepa y la tasa de degradación del explosivo. (Avinash M. T, K. J. (2000)). Más sin embargo, es necesario aclarar, que el uso del explosivo y de las fuentes de carbono como sustrato en el medio de cultivo, no garantiza la obtención de microorganismos potencialmente degradadores de TNT.

Con respecto a la pared celular, la mayoría de las cepas recuperadas fueron Gram negativas, encontrar microorganismos de estas características es una tendencia normal cuando se utiliza como sustrato un compuesto xenobiótico, esto también fue reportado por Zaripov y colaboradores (2004), al observar que las bacterias Gram positivas son más susceptibles al TNT y por lo tanto menos activas en la transformación del mismo.

## **6.2.Evaluación de la capacidad degradadora de los microorganismos obtenidos, sobre el 2, 4,6 Trinitrotolueno.**

Según sus cromatogramas, de las curvas de la calibración del TNT y de los estándares 4amDNT y 2,6 DNT (**Anexo 6**) los tiempos de retención para el TNT fue de 7.5 minutos, el 4amDNT fue de 8.0 minutos y el 2,6 DNT fue de 9,5 minutos. En este orden de ideas, los porcentajes de degradación del explosivo obtenidos para cada de los morfotipos aislados se encuentran relacionados en la Tabla No 5.

Tabla No 5. Porcentajes de degradación de TNT, por cada morfotipo aislado

Cepa	TNT inicial (mg/L)	TNT final (mg/L)	% degradación	4amDNT (mg/L)	2,6 DNT (mg/L)
T1	**	**	**		
T2	74.06	76.09	-2.74		
T3	22.00	17.30	19.74		
T4	**	**	**		
T5	62.47	51.20	18.05		55.42
T6	30.0	27.30	8.89		
T7	46.61	34.09	26.86		
T8	50.69	35.56	29.84		
T9	46.75	72.00	-54.04		
T10	77.84	64.37	17.30		2.63
T11	120.83	18.92	84.34		2.64
T12	42.103	42.797	-1.648		
T13	54.26	52.55	3.15		2.65
T14	68.75	66.57	3.17		2.66
T15	128.98	18.92	85.33	41.80	5.61
T16	66.25	70.06	-5.75		2.71
T17	100.78	28.96	71.26		5.67
T18	**	**	**		
T19	41.37	29.90	27.73		
T20	32.50	26.15	19.53		
T21	18.69	18.67	0.11		
T22	106.11	0.00	100	45.80	
T23	128.49	25.39	80.24		5.34
T24	54.31	41.94	22.76	10.71	
T25	61.52	36.77	40.23		2.65
T26	**	**	**		
T27	51.78	57.02	1.47		
T28	89.89	0.00	100	5.59	35.77
T29	115.26	0.00	100		5.35
T30	61.83	56.57	8.51		
T31	**	**	**		
T32	54.41	34.05	37.41		5.35

De los morfotipos aislados, se encontró que el 15.63 % (5 colonias) no presentaron crecimiento en medio líquido T2, lo que indicó, que dichas colonias no son tolerantes a la toxicidad del explosivo y por lo tanto, no poseen la capacidad para producir enzimas nitroreductasas que permitan la degradación del TNT (Boopathy, et al. 1997).

Otro porcentaje igual de morfotipos 15.63% (5 colonias) crecieron en medio líquido T2, pero no se evidenció ninguna reducción en la concentración inicial del explosivo, por lo que podemos decir, que a pesar de ser tolerantes a la toxicidad del TNT, no poseen la capacidad de expresar enzimas nitroreductasas que permitan la degradación del mismo. Según estudios con *Pseudomonas putida*, la tolerancia a explosivo está dada por dos tipos de estrategias: la inducción de genes que codifican nitroreductasas que están relacionadas con la desintoxicación, como son las enzimas (PNRA, Xend, ACPD) (Fernandez, et al. 2009); la inducción y el empleo de transportadores / bombas moleculares que expulsan las sustancias químicas tóxicas.(Nicolaou, et al. 2010).

El 31.25 % (10 colonias) de los morfotipos mostraron degradación de TNT hasta en un 24%, este grupo de colonias, exhibe dos características importantes, tolerancia al explosivo y degradación del mismo.

Otro 15.63% (5 colonias) de las cepas aisladas, presentaron degradación de TNT entre el 24 y el 50%, aunque este grupo presenta las mismas características del anterior su porcentaje de degradación de TNT no supera el 50% y por lo tanto, no fueron seleccionadas para los estudios de la investigación, ya que, se estableció como criterio de inclusión aquellos morfotipos que presenten una capacidad degradadora de explosivo superior al 50%.

El 3.13% (1 colonia) lo hizo entre el 51 y el 75% y el 18.75% (6 colonias) presentaron degradación del explosivo entre el 76 y el 100%, estos dos grupos de colonias, se encontraron dentro de los criterios de inclusión establecidos y con dos características especiales: tolerancia al explosivo y alta capacidad de degradación de TNT. En la Figura No 10, se encuentran plasmados los grupos de morfotipos con la capacidad degradadora de TNT correspondiente.

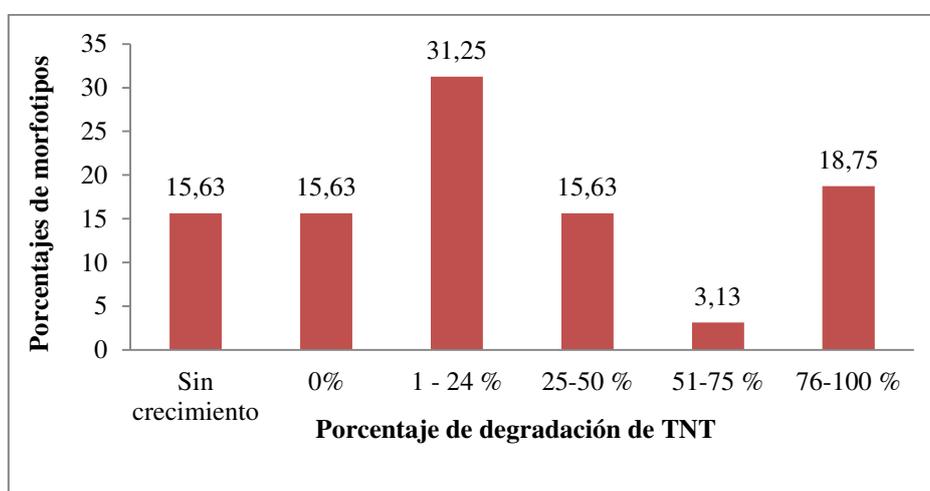


Figura No 10. Porcentaje de degradación de los aislamientos obtenidos

Las cepas que presentaron degradación de explosivo por encima del 50%, fueron la T11, T15, T17, T22, T23, T28 y T29. Donde las dos últimas presentaron durante el proceso de transformación de TNT 2,6 DNT y 4amDNT como metabolitos de degradación respectivamente. Por lo tanto, se infiere, que una de las rutas metabólicas utilizadas por los microorganismos en estudio, es la reducción del grupo 4-nitro del TNT al correspondiente 4-amino-2,6 Dinitrotolueno (4amDNT), como se citó en el marco referencial, dicha reacción es catalizada por reductasas no específicas que involucran formación de intermediarios nitrosos e hidroxilaminos. (Spain, P. D. F. a. J. C. 1997).

La otra ruta metabólica de las cepas podría ser, la metabolización del nitroaromático por medio del ataque nucleofílico de dioxigenasas para producir una estructura no aromática llamado el complejo Meisenheimer. Este complejo puede ser rearomatizado después de liberar nitritos, con la formación final de dinitrotoluenos (DNT). (Esteve-Nuñez, et al. 2001). De este grupo se seleccionaron la cepa T28 (*Pseudomonas oleovorans*) y T29 (*Shinella Kummerowae*) para continuar con los siguientes objetivos de la investigación.

## **Fase II. Crecimiento de las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones de 2,4,6 Trinitrotolueno.**

### **6.3. Ensayos preliminares.**

Los resultados de los ensayos preliminares establecieron que a pesar que los valores de absorbancia (D.O) son bajos, y aparentemente existe una relación proporcional entre la medida de esta y el recuento en placa (ufc/mL), lo mejor es desconfiar de esta información, ya que, existe muchas variables que interfieren con la medición O.D, como es por ejemplo, la producción de metabolitos, la acumulación de células no viables, la fotooxidación que genera color, entre otras. Mas sin embargo en la Figura No 11A – 11B se presentan las gráficas de crecimiento de biomasa por los dos técnicas de conteo en cada uno de los tratamientos establecidos. Estas graficas permitieron determinarlos tiempos de iniciación, estabilización y terminación de cada fase de crecimiento (Tabla No 6)

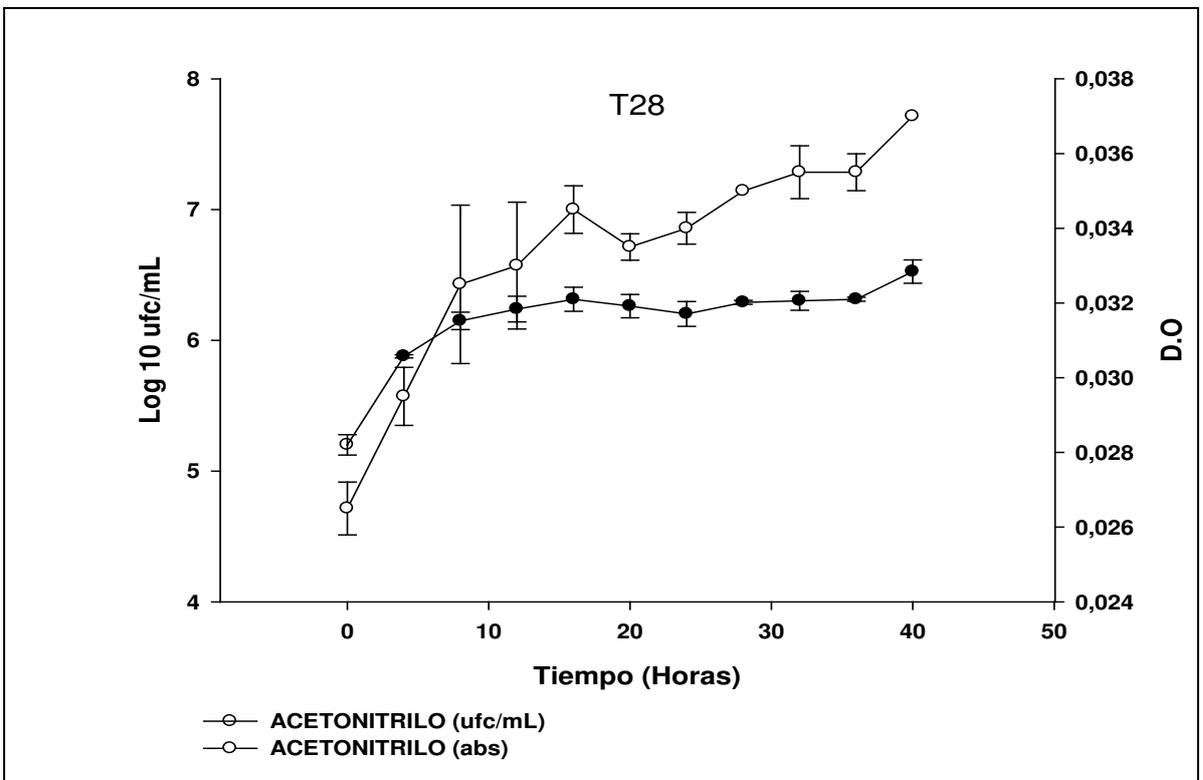
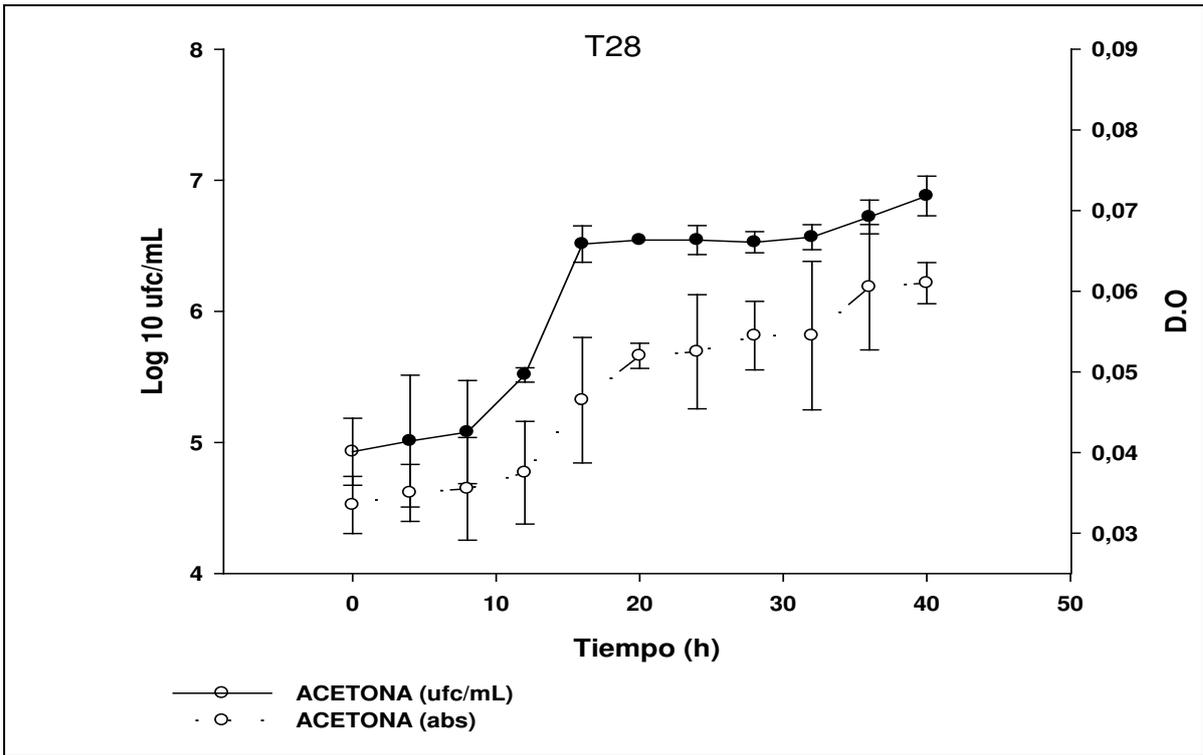


Figura No 11. A. Curvas de crecimiento de la cepa T28, con recuento en placa (ufc/mL) y densidad óptica (D.O) para cada uno de los tratamientos establecido.

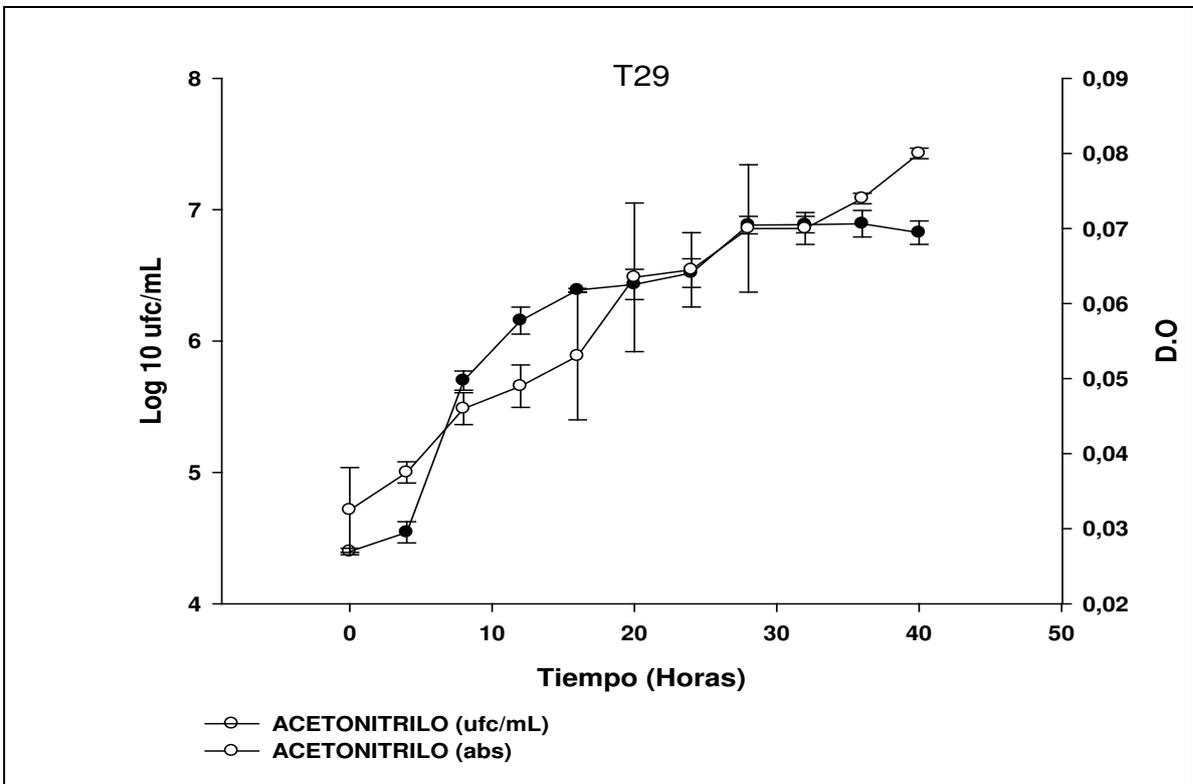
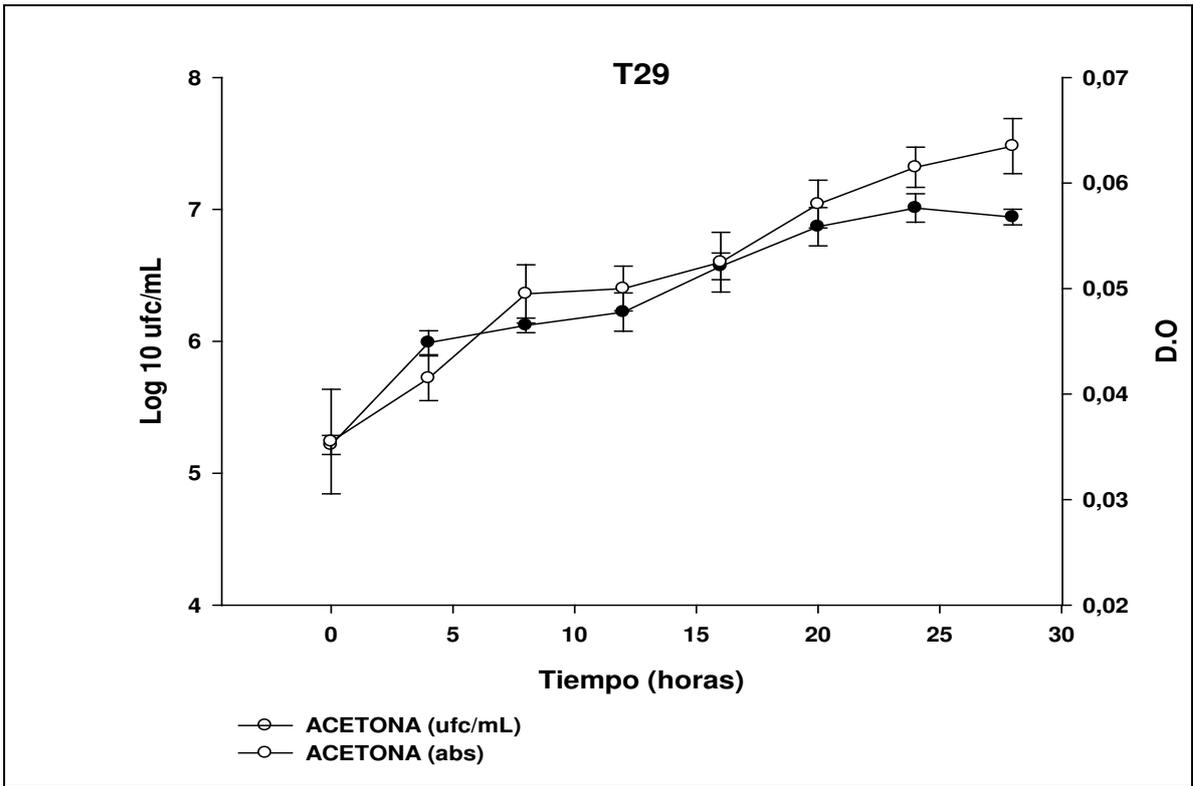


Figura No 11B. Curvas de crecimiento de la cepa T29, con recuento en placa (ufc/mL) y densidad óptica (D.O) para cada uno de los tratamientos establecidos

Tabla No 6. Tiempos de crecimiento de las cepas en estudio.

Fase de crecimiento	T28		T29	
	Acetona	Acetonitrilo (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N)	Acetona	Acetonitrilo (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N)
Adaptación	0 - 10 horas	No se evidenció	No se evidenció	0 – 4 horas
Exponencial	10 - 16 horas	0 – 16 horas	0 – 24 horas	4 – 28 horas
Estacionaria	16 – 40 horas	16 – 40 horas	24 – 40 horas	28 – 40 horas

En las curvas de crecimiento obtenidas, se observó que para la cepa T28 no hubo diferencias en el aumento de ufc/mL, en los tratamientos establecidos (Figura No 12). Mientras que la cepa T29 presentó se observó aumento en el número de ufc/ml cuando se utilizó acetonitrilo como diluyente del explosivo. (Figura No 13)

Para corroborar lo observado en las gráficas de crecimiento y determinar si existen diferencias entre los tratamientos aplicados para cada una de las cepas en estudio (T28-T29), se plantearon las siguientes hipótesis:

- a. El crecimiento de las cepas en los dos tratamientos establecidos (Acetona / Acetonitrilo) son similares en términos de ufc/ml.

$$H_0: \mu c(C_2H_3N) = \mu c(C_3H_6O)$$

- b. El crecimiento de las cepas en los dos tratamientos establecidos (Acetona / Acetonitrilo), son diferentes en términos de ufc/ml.

$$H_a: \mu c(C_2H_3N) \neq \mu c(C_3H_6O)$$

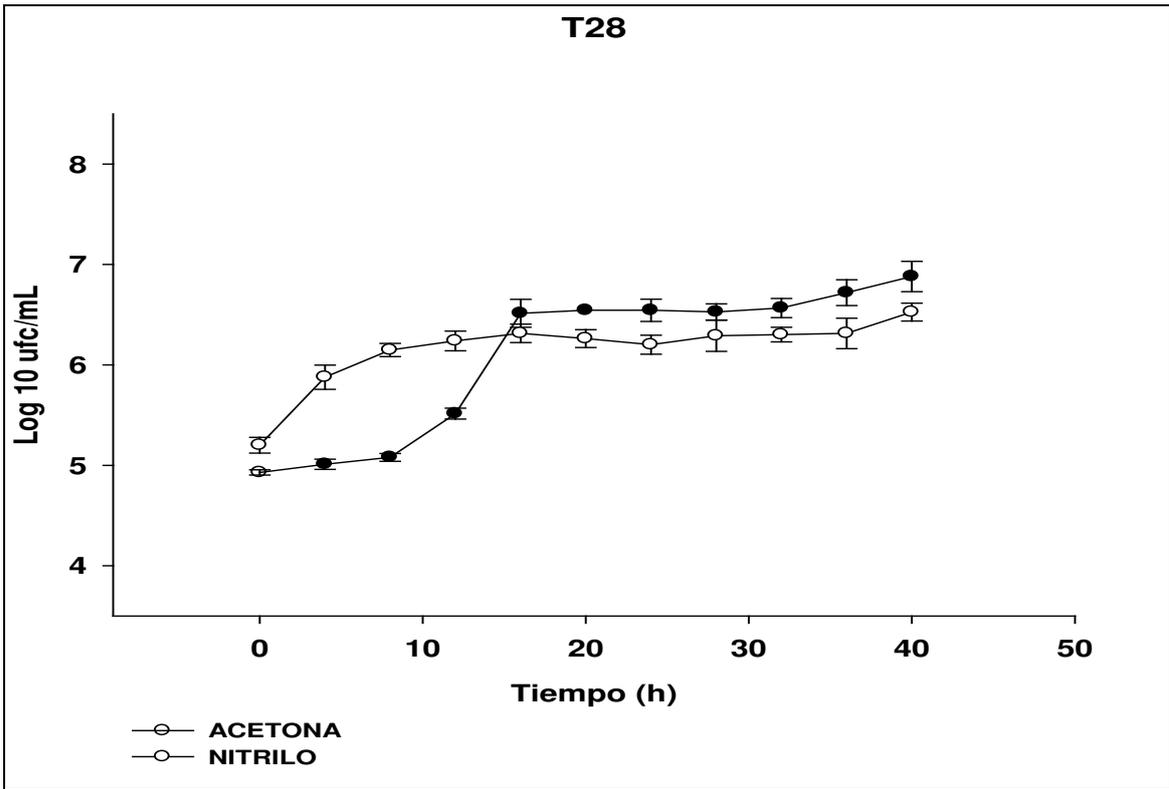


Figura No 12. Crecimiento de la cepa T28 a 100 mg/L de TNT diluido en diferentes solventes (acetona-acetonitrilo)

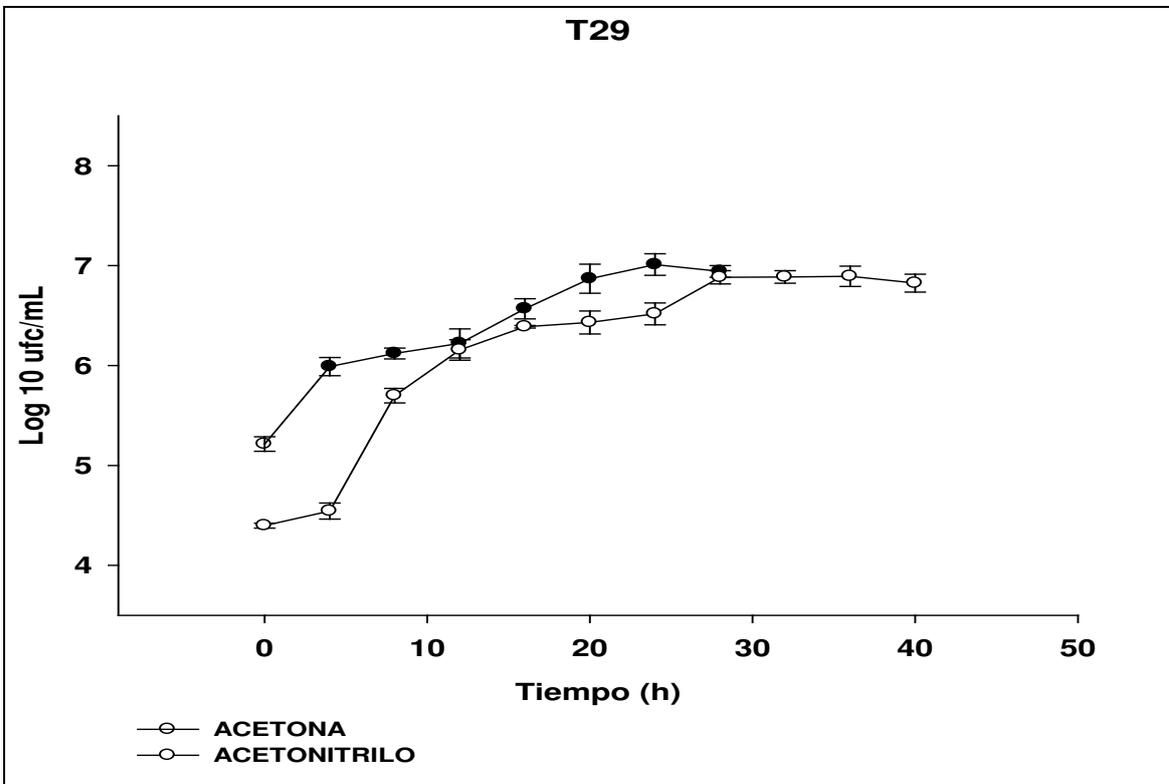


Figura No 13. Crecimiento de la cepa T29 a 100 mg/L de TNT diluido en diferentes solventes (acetona-acetonitrilo)

Se realizó una prueba t para medias, los resultados se encuentran expresados en el **Anexo 7**, e indican que no hay diferencia al 5 % de significancia en el crecimiento de cada una de las cepas para los dos tratamientos establecidos, ya que, el p-valor para las dos microorganismos fue mayor del 0.05 (T28 p = 0.65; T29 p = 0,40).

Se puede decir que la aplicación de una fuente adicional de nitrógeno (como es el caso de la traza de nitrógeno que aporta el acetonitrilo) no es necesaria para el crecimiento de los microorganismos, y por lo tanto se infiere, que la cantidad de nitrógeno que aporta el TNT es suficiente para el desarrollo de la población microbiana.

Esta afirmación es soportada por la investigación de Boopathy (1997), quien aseveró que “si muy poco nitrógeno está presente en el medio de cultivo, la bacteria no tiene la capacidad de producir las enzimas necesarias para utilizar el carbón, pero por lo contrario, si existe un exceso de nitrógeno, particularmente en forma de amonio, este puede inhibir el crecimiento de las bacterias, por lo tanto, la concentración óptima de nitrógeno asegura el funcionamiento eficaz de la célula”(Boopathy, et al.1997)

Más sin embargo, es necesario aclarar, que la aplicación de una fuente de nitrógeno diferente al explosivo, como el cloruro de amonio o nitrato de sodio, mejoraría el crecimiento de los microorganismos, ya que, estos nuevos nutrientes son más sencillos para degradar, que el mismo explosivo, esto ha sido demostrado por investigadores de USBA (Unidad de Saneamiento y Biorremediación Ambiental) de la PUJ (Pontificia Universidad Javeriana), quienes ratifican lo reportado por otros autores. ((Esteve-Nuñez, et al. 2001); (Chulhwan, et al. 2003)).

Con relación al uso de los solventes utilizados, los resultados demostraron que no existe ninguna influencia de los mismos sobre el crecimiento de las cepas, pero se optó para ensayos posteriores, el uso de la acetona como único solvente en el cual se debe diluir el explosivo, esto debido a que su evaporación rápida.

#### **6.4. Crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de TNT.**

Aunque las altas concentraciones de TNT son tóxicas para muchos microorganismos(Chang, C.-S., Kim, H-Y., Kang, Y-M., Bae, K-S y Song, H-G. (2000), las cepas seleccionadas crecieron en medio solido T2, en presencia de explosivo en concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L, así mismo, se observó crecimiento en medio de cultivo T2 sin explosivo, el cual se usó como control. El crecimiento a diferentes concentraciones de TNT, coinciden con los resultados reportados por Chang en el 2002, el cual reportó que una cepa de *Klebsiella sp.* aislada a partir de lodos activados obtenidos de la planta de tratamiento de Chuncheon en Korea, creció rápidamente en medio de cultivo mínimo en presencia de 200 a 500 mg/L de TNT.

Para conocer si existe diferencias en el numero de celulas viables de las cepas en estudio para cada una de las concentraciones de TNT establecidas, se utilizaron las siguientes hipotesis:

- a. Es posible que la concentrcaión de TNT en el medio de cultivo no influya en el numero de celulas viables de las cepas en estudio.

$$H_0: \mu_0 = \mu_{100} = \mu_{200} \dots = \mu_{500}$$

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

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

Para comprobar las hipótesis planteadas para cada una de las cepas en estudio, se aplicó la prueba de Duncan y Dunnett (tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos), los resultados para la cepa T28 se encuentran plasmados en el **Anexo 8**.

Se encontró que se formaron dos subconjuntos de concentraciones donde no hubo diferencias en el número de ufc/ml al interior de ellos, (Figura No 14A, 14B), pero sí hubo diferencia entre los dos subconjuntos (Figura No 14C), además se estableció que en el medio control (T2 sin explosivo) se presentó el mayor número de células viables (14D).

Esta diferencia en el conteo de células viables, pudo ser debido a la aglomeración de células o a una reducción de la división celular de las mismas debido a la toxicidad del TNT o sus metabolitos (French, et al. 1996). Por lo que se infiere, para este microorganismo que a pesar que el explosivo puede ser usado como única fuente de nitrógeno, la aplicación de una fuente adicional como el Cloruro de Amonio o Nitrato de Sodio podría mejorar el número de ufc/mL.(Boopathy,etal.1997)

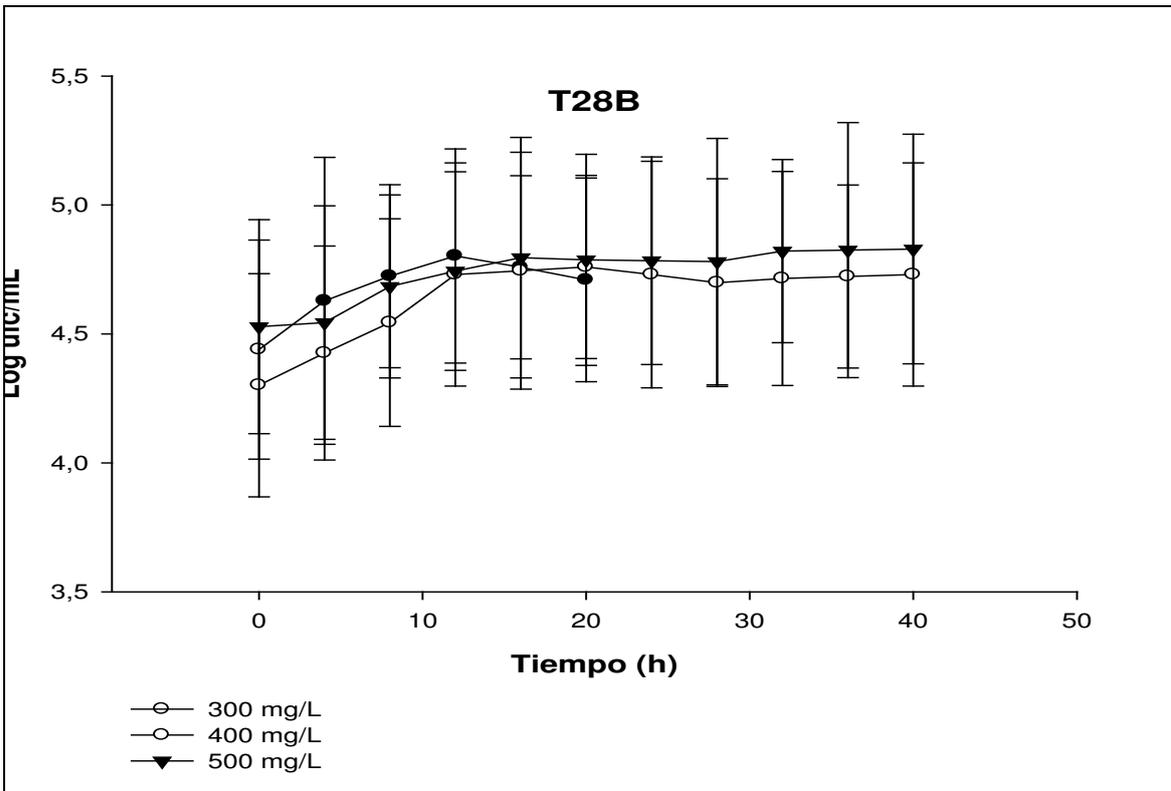
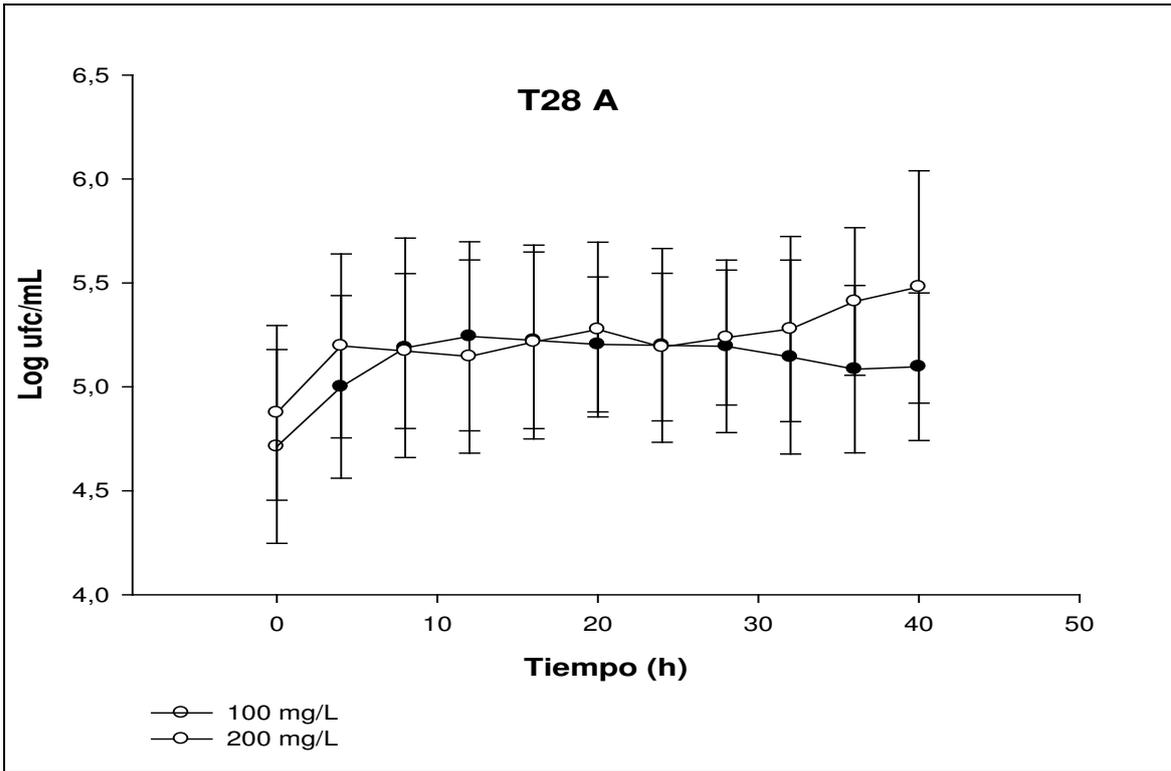


Figura No 14. A. Crecimiento a 100 y 200 mg/L TNT. B. Crecimiento a 300, 400 y 500 mg/L TNT

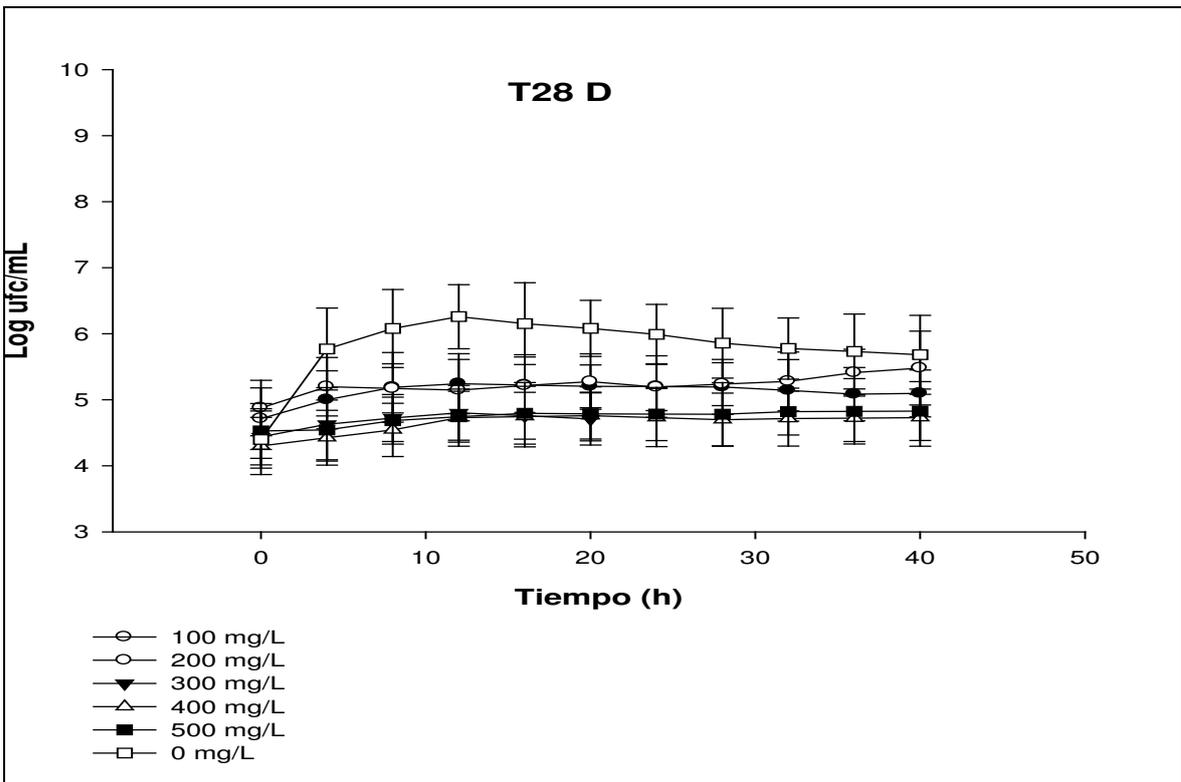
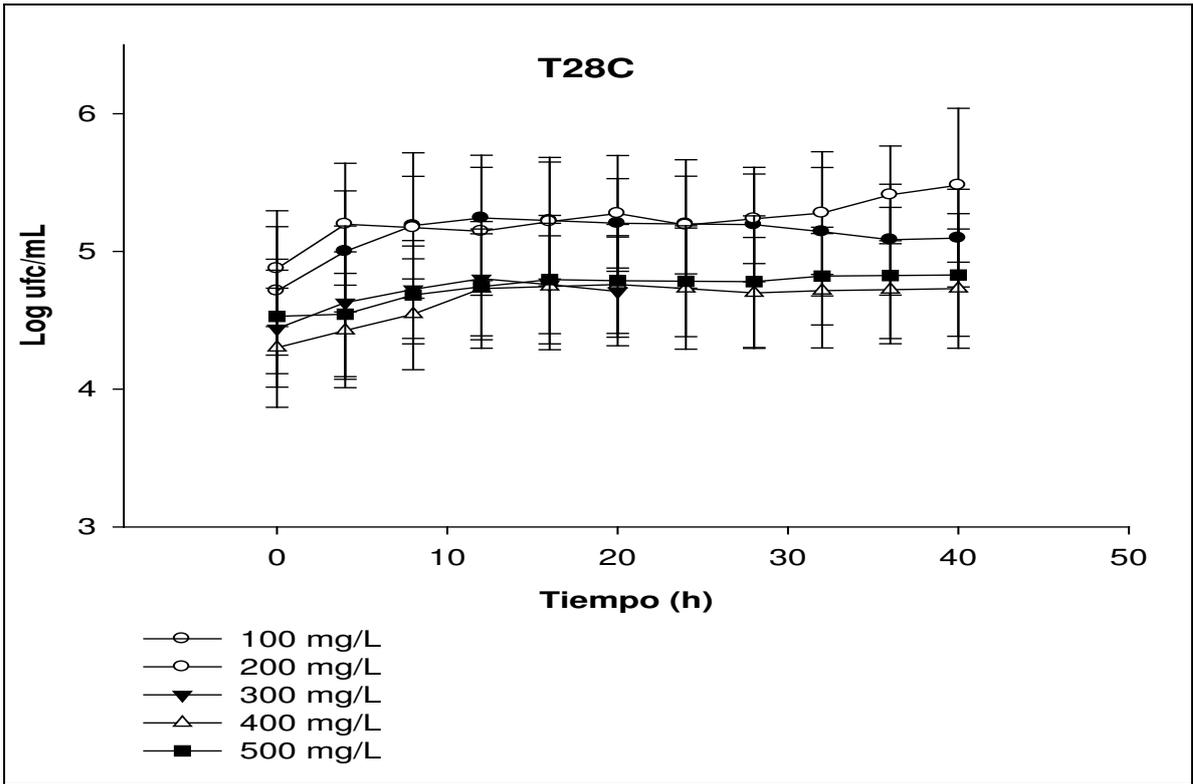


Figura No 14. C. Crecimiento a las diferentes concentraciones de TNT. D. Crecimiento a las diferentes concentraciones de TNT incluido la concentración control (0 mg/L TNT)

Los resultados de la cepa T29, se encuentran en el **Anexo 9**, lo cual nos indicó que entre la concentración de 0 -100 y 400 mg/L no se presentaron diferencias en el número de ufc/mL, lo mismo sucedió entre las concentraciones de 200 y 300 mg/L de TNT (Figura No 15A y 15B). Por último, se observó que en la máxima concentración de explosivo 500 mg/L de TNT, se presentó el mayor número de células viables (Figura No 15C).

Por lo que inferimos para este caso que el TNT es utilizado como única fuente de nitrógeno y no es necesario añadir una fuente adicional. Las concentraciones de fuentes de carbono utilizadas en el medio de cultivo son viables para el crecimiento de la cepa, pero la ausencia del TNT reduce su crecimiento. En este orden de ideas, podemos decir, que a mayor concentración de explosivo (500 mg/L) se da un aumento en el número de células viables de la cepa en estudio.

Estos resultados coinciden con los reportados por Duque en 1993, que con un clon de la familia Pseudomonadaceae a la cual llamaron *Pseudomonas sp. C1S1*, lograron un crecimiento eficientemente en el medio mínimo basal a una concentración de saturación de TNT en agua (100 mg/L) y alcanzó mayores densidades de células viables, cuando se adicionó al medio de cultivo un exceso del explosivo en forma de cristales (1 a 10 g/L). Encontraron que en concentraciones por debajo de 20 mg/L TNT la cepa inhibió su crecimiento, por lo que infirieron que la absorción del explosivo ocurrió a concentraciones mayores de 20 mg/L y utilizó el TNT y sus subproductos de degradación como 2,4 - dinitrotolueno, 2,6 - dinitrotolueno y 2 nitrotolueno como única fuente de Nitrógeno (Duque, et al. 1993). Indicando de esta manera, que la

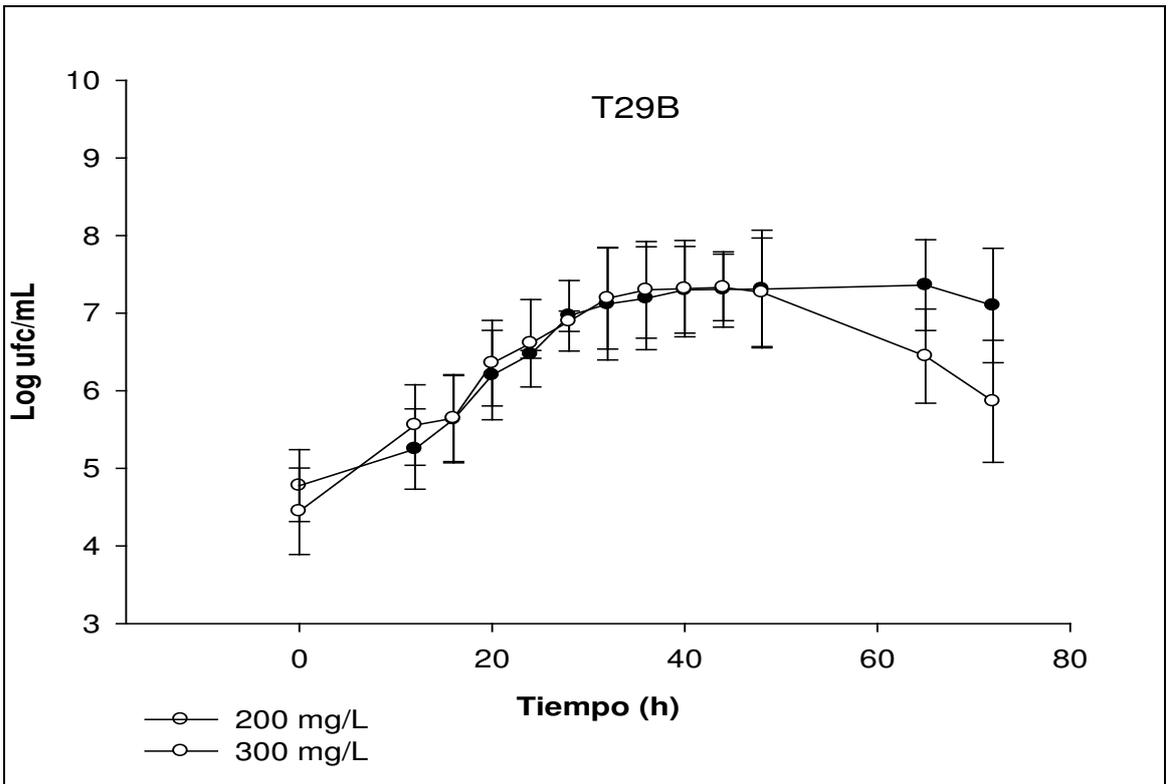
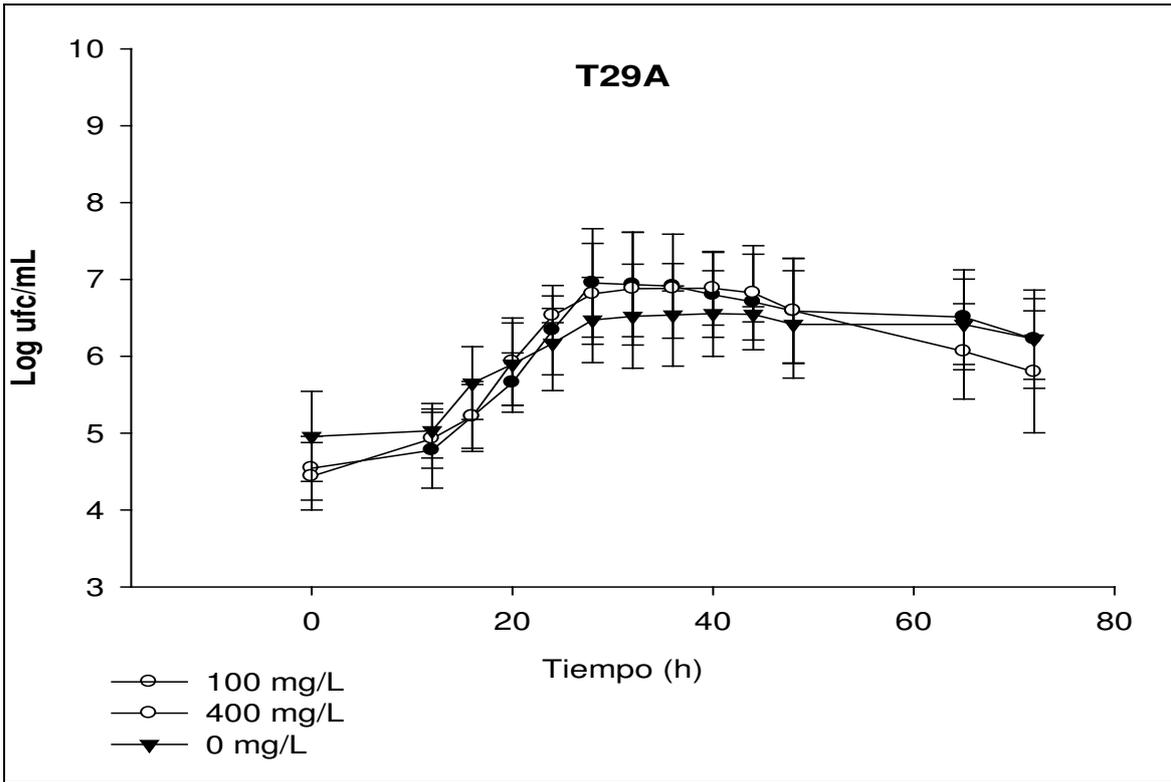


Figura No 15. A. Crecimiento a 100 y 200 mg/L TNT. B. Crecimiento a 300, 400 y 500 mg/L TNT

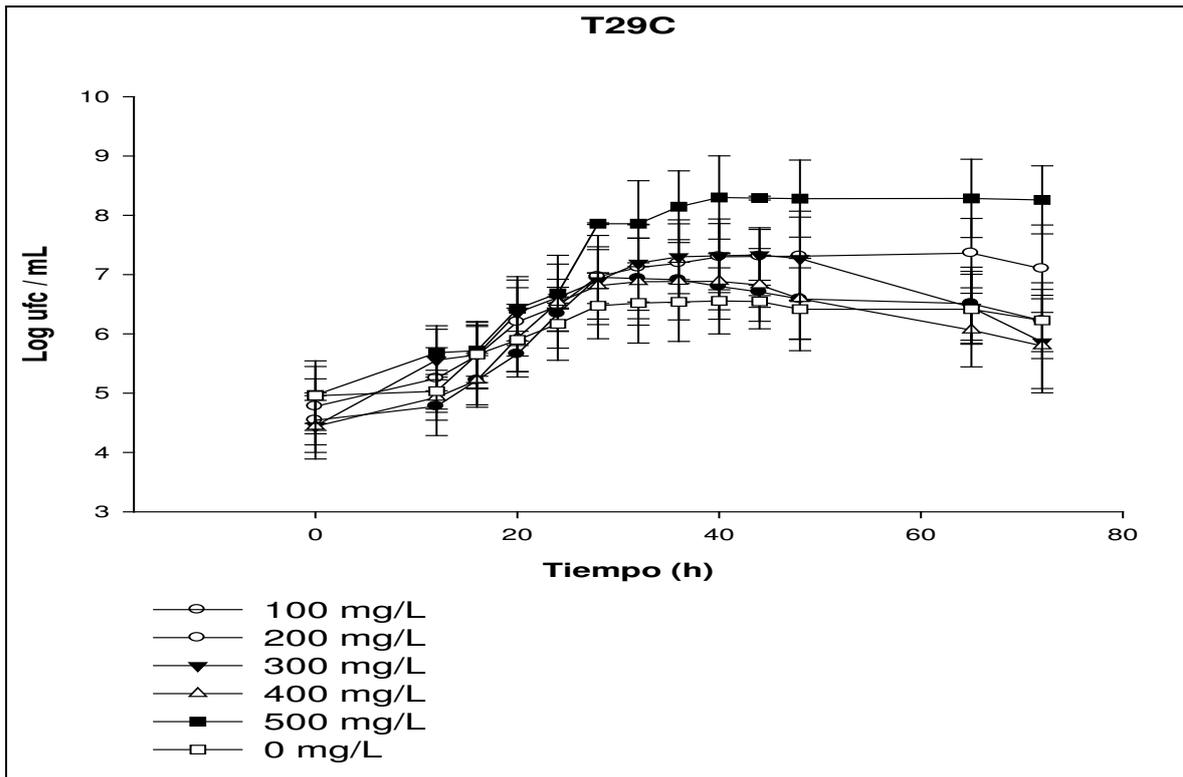


Figura No 15. C. Crecimiento de la cepa T29 a diferentes concentraciones de TNT, incluida a 0 mg/L TNT

inhibición en el crecimiento fue por falta de nutriente, la cantidad exacta que el microorganismo necesita para su crecimiento esta por encima de 20 mg/L de TNT.

**Fase III. Biodegradación del 2,4,6 Trinitrotolueno según parámetros de pH y temperatura.**

**6.5. Degradación de TNT según parámetros de pH.**

Se evidenció degradación de TNT durante las 120 horas de incubación, a una temperatura de 30°C y a 200 rpm, por parte de las cepas en estudio para cada uno de los

pHs establecidos (6,0 ( $\pm 0,03$ ) -7.0 ( $\pm 0,04$ ) – 8.0 ( $\pm 0,03$ )). Esta degradación se cuantifico a partir de tres variables que fueron: reduccion de la concentracion inicial del explosivo (Concentracion inicial – Concentracion final de TNT), produccion de subproductos propios de la degradación del explosivo (AMDNT-DNT) y acumulacion de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ).

Los controles abioticos para cada uno de los pHs establecidos presentaron degradaciones muy bajas (menores al 12%) pero diferentes en terminos de porcentaje para cada uno de ellos. Asi mismo, se observó que cuando el pH tiende a la alcalinidad la solubilidad del explosivo aumenta. En la Tabla No 7, se muestra el porcentaje de degradación de los controles abioticos para cada uno de los pH establecidos.

Tabla No 7. Porcentaje de degradación de los controles abioticos a diferentes pHs

pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
2.34	11.28	12.12

Esta baja degradacion en los controles abioticos se presentó debido a que el TNT, al igual que la mayoría de los compuestos nitroaromaticos son resistente a la oxidacion quimica y a la hidrólisis, esto por su carácter de aceptor de electrones de los grupos nitro que generan una deficiencia de electrones y, por tanto hacen que estos compuestos sean menos susceptibles a la oxidacion catabolica y los procesos de fotooxidación.(Knackmuss, H.-J. 1996; J. Rodgers, . and Bunce, N., 2001)

Las cepas en estudio, presentaron su menor porcentaje de degradación a pH 6.0, dentro de esta variable, la cepa T29 exhibio baja degradación (36,55%) con respecto a la concentracion inicial de explosivo, mientras que la cepa T28 expreso un porcentaje de degradacion del 69.69 %. Asi mismo, para cada una de las cepas se observó una acumulacion de nitritos y produccion de 2,6-2,4 AMDNT. (Figura No 16A – 16 B)

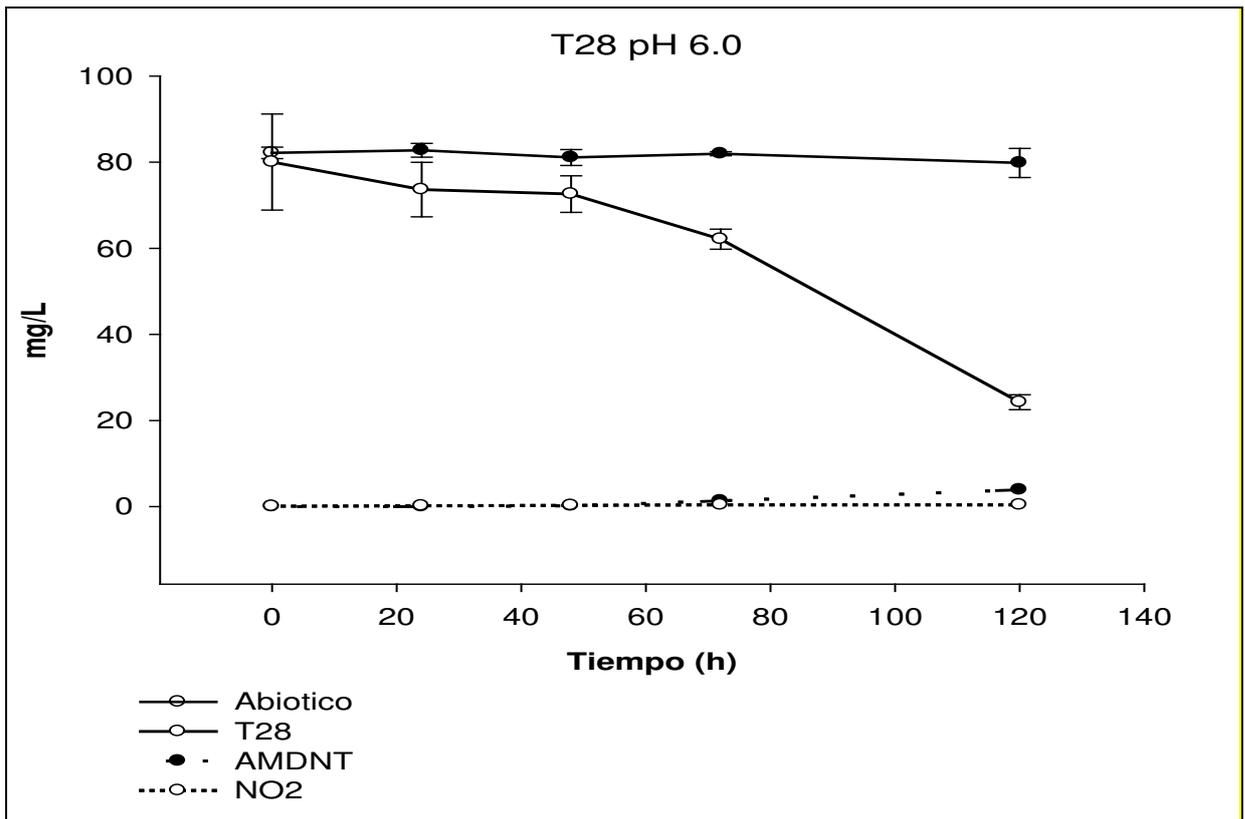
A pH 7,0 las cepas presentaron porcentajes de degradacion altos, T29 (77.26%) y T28 (74,46%), al igual que a pH 6,0, se presentó acumulacion de nitritos y produccion de 2-4, 2-6 AMDNT a través del tiempo (Figura No17A – 17B).

Asi mismo para el pH 8.0, las cepas manifestaron durante el proceso de biodegradacion del TNT, acumulación de nitritos y produccion de 2,4-2,6 AMDNT, tambien se presentaron los mas altos porcentaje de degradación de TNT 76,56% para T28 y 80,92 para T29, con respecto a los demas pHs (Figura No 18A – 18B).

Con base en los resultados obtenidos el pH 8,0, se puede considerar como recomendable para la degradacion de TNT, sin embargo, es necesario saber si existe diferencias entre cada uno de los pHs para cada una de las cepas en estudio, por tal razón se plantearon las siguientes hipótesis:

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

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



Tiempo	Abiótico	TNT	AMDNT	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
0	82,16	80,03	0	0,06
24	82,76	73,63	0	0,17
48	81,08	72,59	0,15	0,27
72	81,97	62,12	1,32	0,39
120	79,82	24,25	3,89	0,40

Figura No 16A. Degradación de TNT por las cepas T28 y producción de metabolitos a pH 6.0.

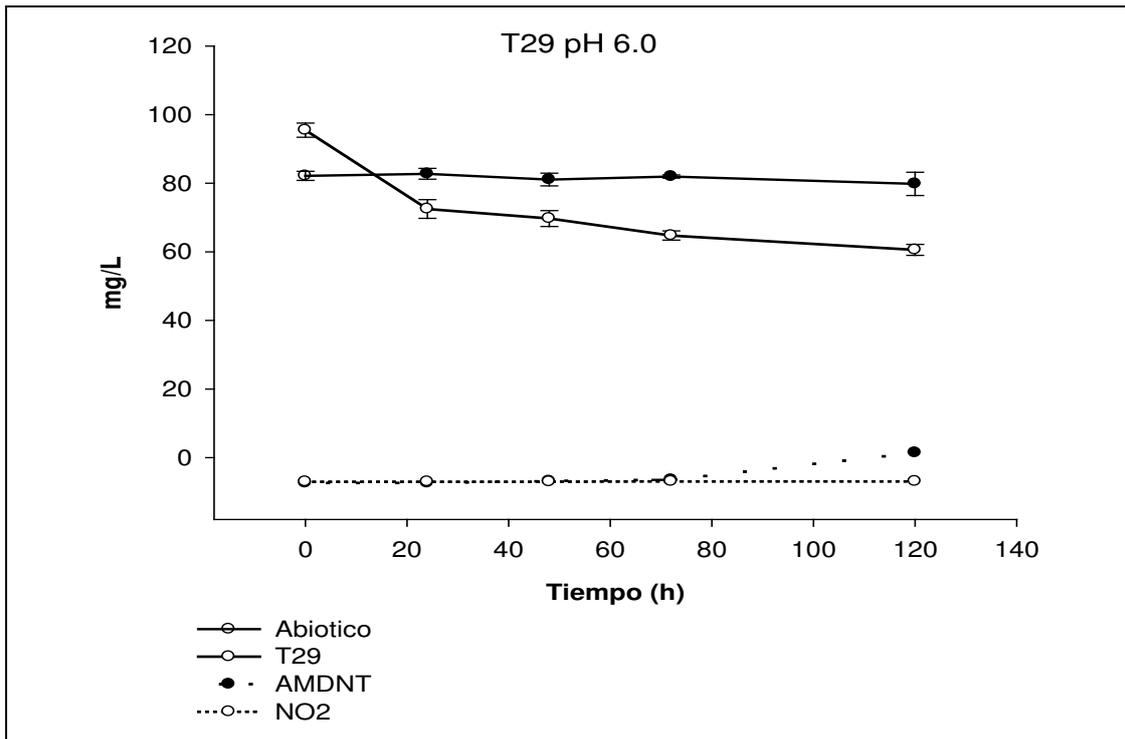


Figura No 16B. Degradación de TNT por las cepas T29 y producción de metabolitos a pH 6.0.

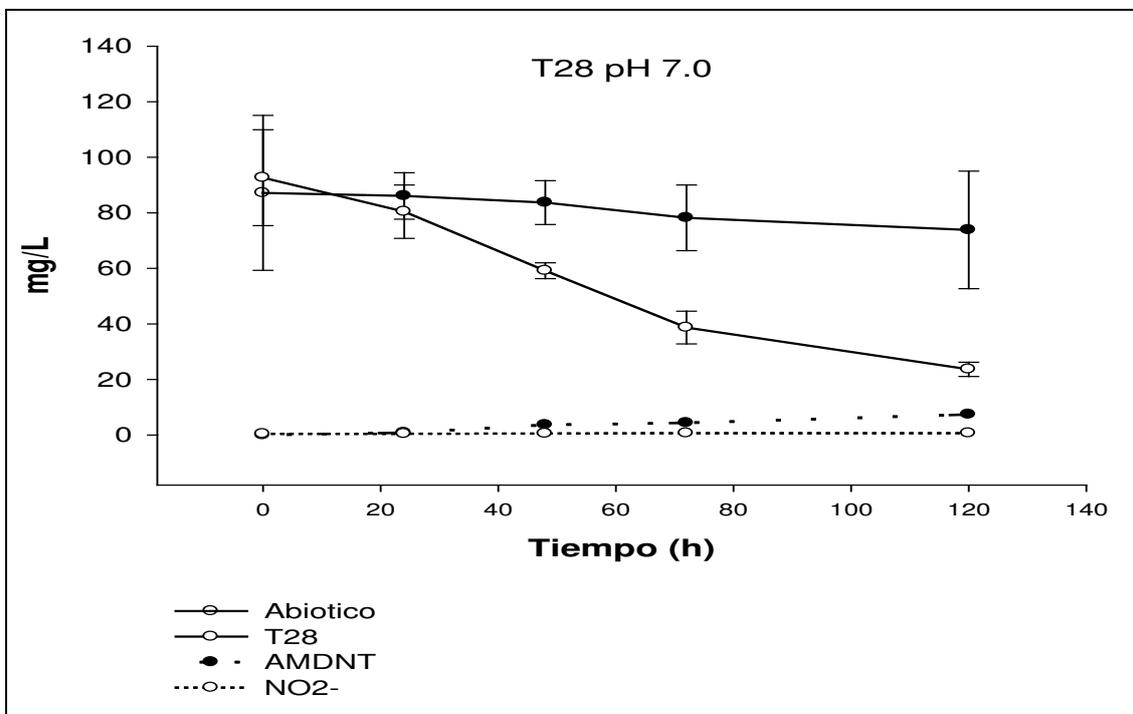
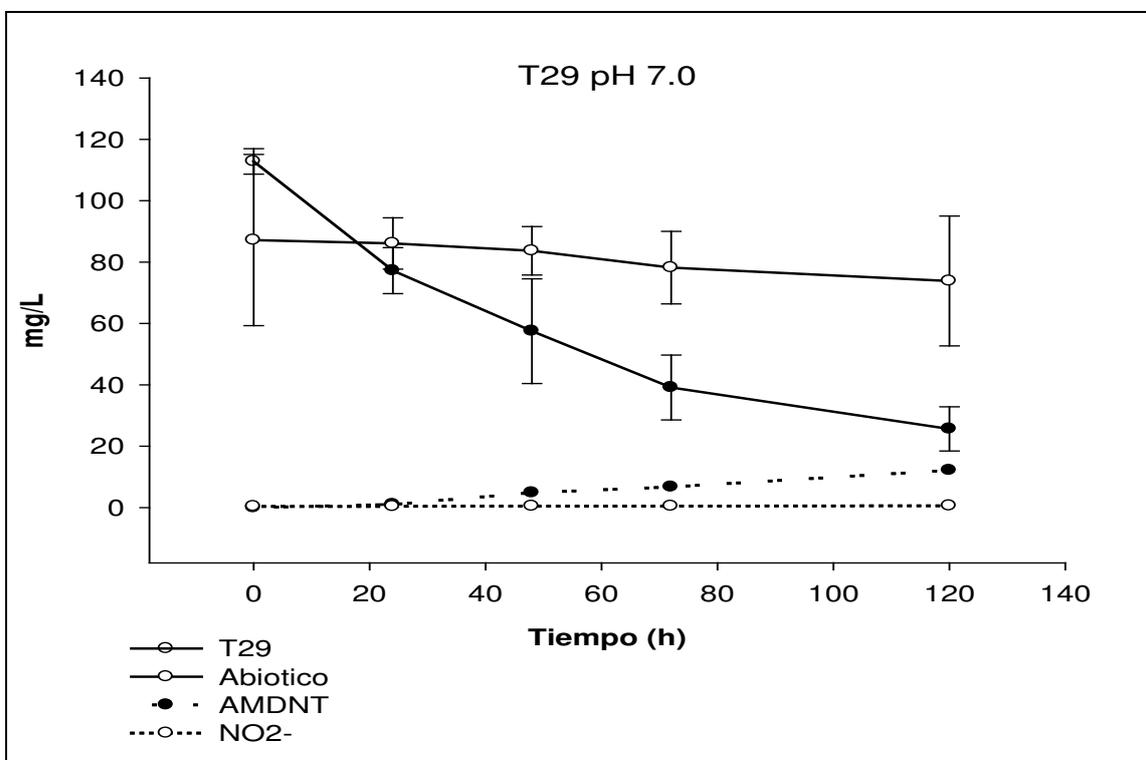
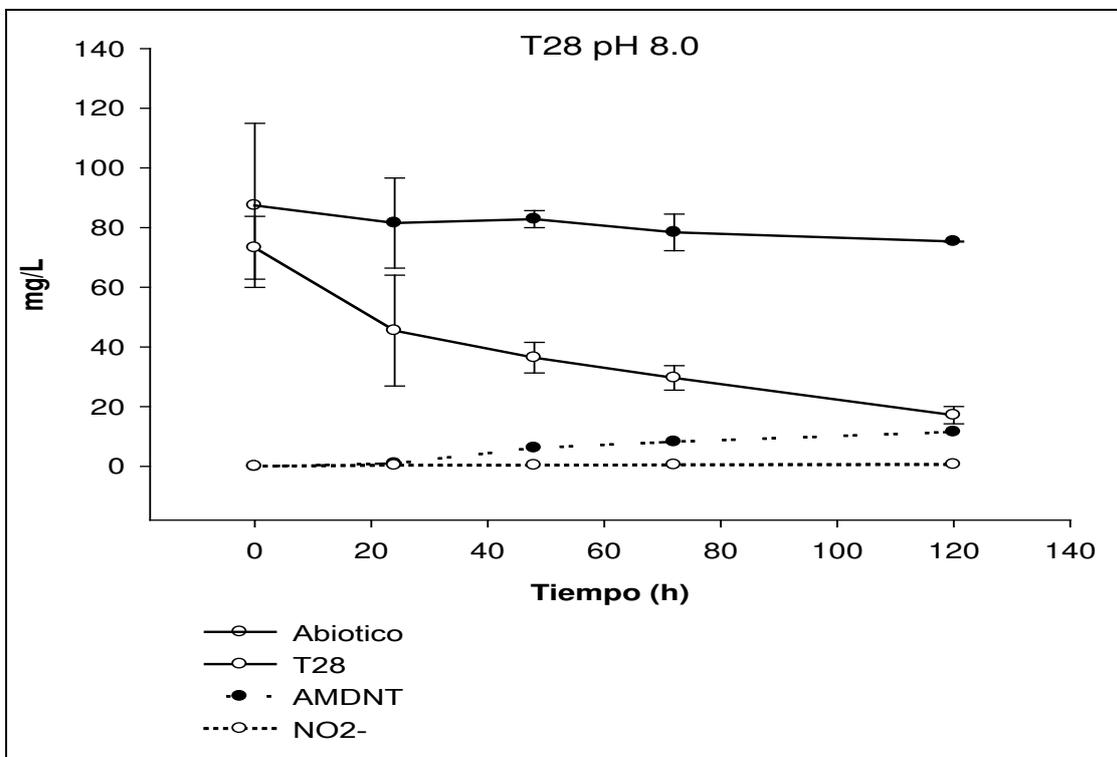


Figura No 17A. Degradación de TNT por las cepa T28 y producción de metabolitos a pH 7.0.



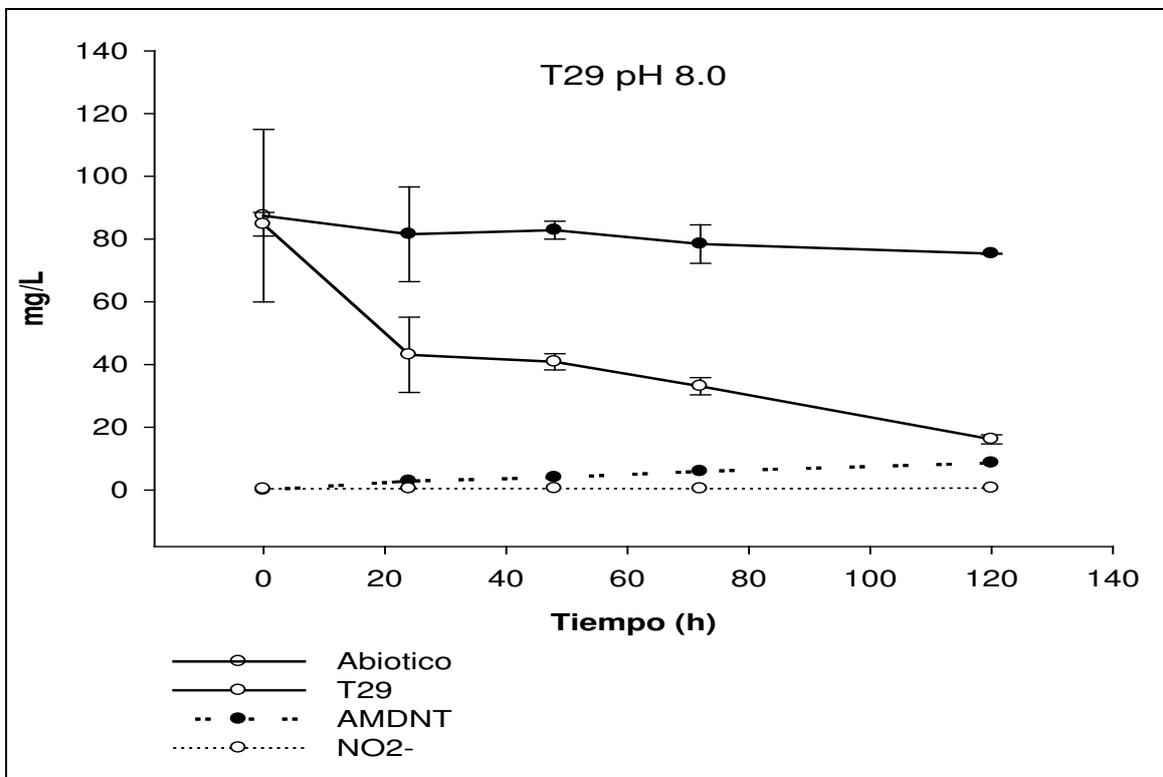
Tiempo	Abiótico	TNT	AMDNT	NO2-
0	111,13	112,81	0,00	0,40
24	108,03	77,22	1,06	0,41
48	100,81	57,51	4,88	0,49
72	95,85	39,15	6,72	0,47
120	99,48	25,65	12,16	0,62

Figura No 17A. Degradacion de TNT por las cepa T28 y produccion de metabolitos a pH 7.0.



Tiempo	Abiótico	TNT	AMDNT	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
0	102,82	73,26	0,00	0,09
24	98,75	45,50	1,00	0,39
48	92,52	36,42	6,20	0,42
72	95,29	29,66	8,25	0,51
120	84,61	17,17	11,55	0,67

Figura No 18A. Degradación de TNT por las cepa T28 y producción de metabolitos a pH 8.0



Tiempo	Abiótico	TNT	AMDNT	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
0	102,82	84,74	0,00	0,37
24	98,75	43,12	2,83	0,45
48	92,52	40,89	4,00	0,48
72	95,29	33,10	5,92	0,39
120	84,61	16,16	8,65	0,62

Figura No 18B. Degradación de TNT por las cepa T28 y producción de metabolitos a pH 8.0

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

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

Para comprobar las hipótesis se aplicó la prueba de Duncan, la cual se realizó de dos maneras, en la primera se cuantificó la cantidad de TNT residual que se obtuvo después de 120 horas de incubación y en la segunda, se cuantificó la cantidad de TNT residual en cada uno de los tiempos donde se realizó la extracción de muestra ( 0 horas – 24 horas - 48 horas - 72 horas y 120 horas)

Los resultados estadísticos obtenidos para la cepa T28 se encuentran plasmados en el **Anexo 10**, e indica que por el primer método no existe diferencia significativa en el porcentaje de degradación de TNT para cada uno de los pHs establecidos, pero por el segundo método se observó que a partir de las 72 horas el porcentaje de degradación en los pHs 7,0 y 8,0 no son diferentes pero si lo son con respecto al pH 6,0, esta tendencia se sostuvo hasta las 120 horas. A pesar de que no existe diferencia significativa entre los pHs 7.0 y 8.0, lo que si cierto es que en este último el porcentaje de degradación es mayor con respecto a los otros dos.

Para la cepa T29, los resultados se encuentran en el **Anexo 11**, e indican que por el primer método, el porcentaje de degradación en el pH 8.0 es totalmente diferente y mayor con respecto a los otros dos pHs planteados; por el segundo método se

observó que a partir de las 24 horas el porcentaje de degradación a pH 8,0 es diferente y mayor con respecto a pH 6,0 y 7,0; esta tendencia se sostiene hasta las 72 horas, donde el pH 8,0 y 7,0 no tienen diferencias entre ellos, pero sí con respecto al pH 6,0 y esta tendencia se sostiene hasta las 120 horas. Al igual que en la cepa T28, en el pH 8,0 es donde se presenta un mayor porcentaje de degradación.

Estos resultados coinciden con los reportados por Clauss, quien confirma que para una cepa de *Raoultella terrigena* HB, aislada a partir de muestras de agua y suelo de una planta de producción de TNT en Alemania y que degrada el explosivo por medio de la reducción del grupo nitro, encontraron que el pH 8,0 fue óptimo con respecto a la velocidad de transformación del compuesto. Similares condiciones fueron encontradas para la biodegradación de TNT por *Pseudomonas putida* (Clauss, H.B. et al. 2007).

Para cada uno de los pHs establecidos, las cepas en estudio evidenciaron la presencia de AMDNT como subproducto de degradación, además de la acumulación de nitritos. Con base en el tiempo en que se presentó el metabolito, 24 horas para los pHs 7,0 y 8,0, y 48 horas para el pH 6,0, podemos decir, dentro de los parámetros de la investigación, que la alcalinidad reduce el tiempo de inicio del proceso de degradación del explosivo e incita a la producción de AMDNT, estos resultados coinciden con los reportados por Clauss en 2007, con la cepa de *R. terrigena HB*, la cual presentó producción AMDNT en el rango de pH de 5,0 a 8,0, pero esta fue mayor a pH alcalino. (Clauss, H.B. et al. 2007)

De la misma manera podemos decir que el mecanismo aerobio que las bacterias en estudio usan para la degradación de TNT es la reducción de los grupos nitro a la amina correspondiente vía intermediarios nitroso e hidroxilaminos, (Fiorella., D. P. S. (1997)) el grupo nitroso es inestable, mientras que el compuesto hidroxilamino puede ser aislado aunque es muy sensible hacia la oxidación y reducción, los grupos hidroxilaminos y nitroso pueden reaccionar el uno con otro y condensarse para formar un azoxi-dimero ((Krôger, 2004), este mecanismo se encuentra mediado por enzimas nitroreductasas que contiene flavoproteínas que usan el NAD(P)H y/o NADH como donador de electrones (Smets, et al. 2007), la reducción del segundo grupo nitro no inicia hasta que el primer grupo nitro se ha convertido a la amina correspondiente.(Fiorella., D. P. S. (1997)) (Marco teórico literal 2.1.)

#### **6.6. Degradación del TNT según parámetros de temperatura.**

Se evidenció degradación de TNT durante las 120 horas de incubación, a pH 8.0 ((±0,3) y a 200 rpm, por parte de las cepas en estudio para cada uno de las temperaturas establecidas (20°C (±0,5) -25°C (±0,4) – 30°C (±0,3) – 35°C (0,4)). Esta degradación se cuantifico a partir de tres variables que fueron: reducción de la concentración inicial del explosivo (Concentración inicial – Concentración final de TNT), producción de subproductos propios de la degradación del explosivo (AMDNT-DNT) y acumulación de nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>).

Los controles abióticos para cada uno de las temperaturas establecidas presentaron degradaciones muy bajas (menores al 11.5%) pero diferentes en términos de

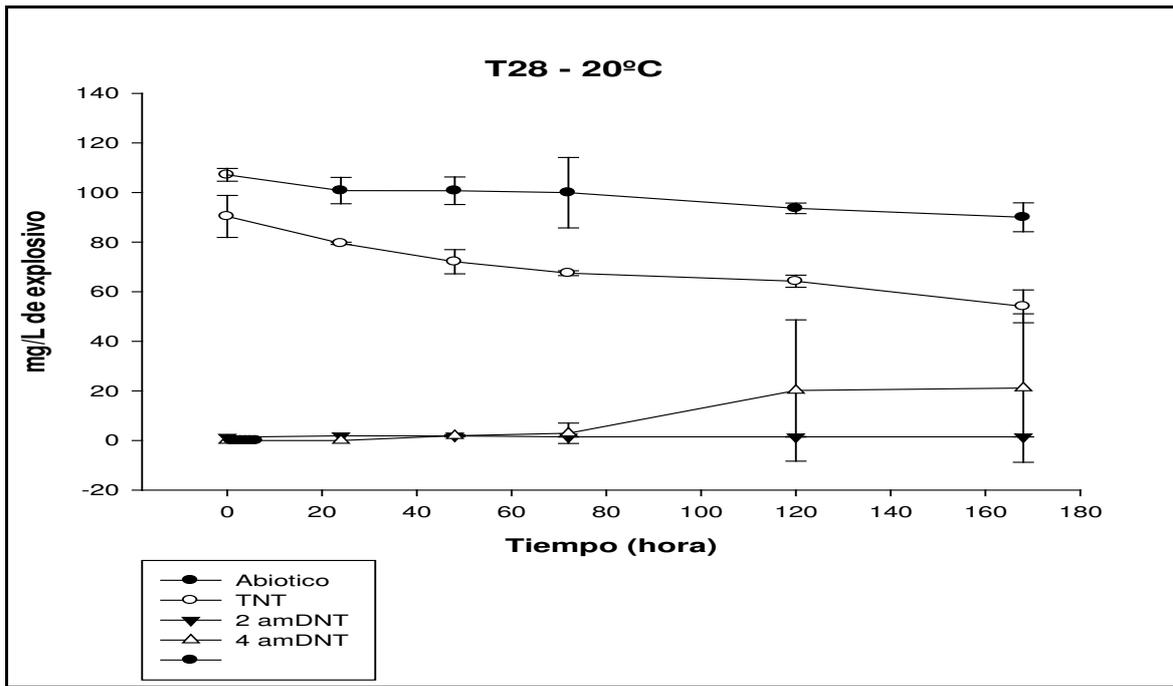
porcentaje para cada uno de ellos. Así mismo, se observó que cuando el porcentaje de degradación es proporcional a la temperatura, cuando esta aumenta es mayor el porcentaje de degradación. En la Tabla No 8, se muestra el porcentaje de degradación de los controles abióticos para cada uno de las temperaturas establecidos. La baja degradación de los controles abióticos se debe a la misma razón expresada en el literal 3.1 de este documento.

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

Temperaturas			
20°C	25°C	30°C	35°C
7,09	8,46	10,49	11,42

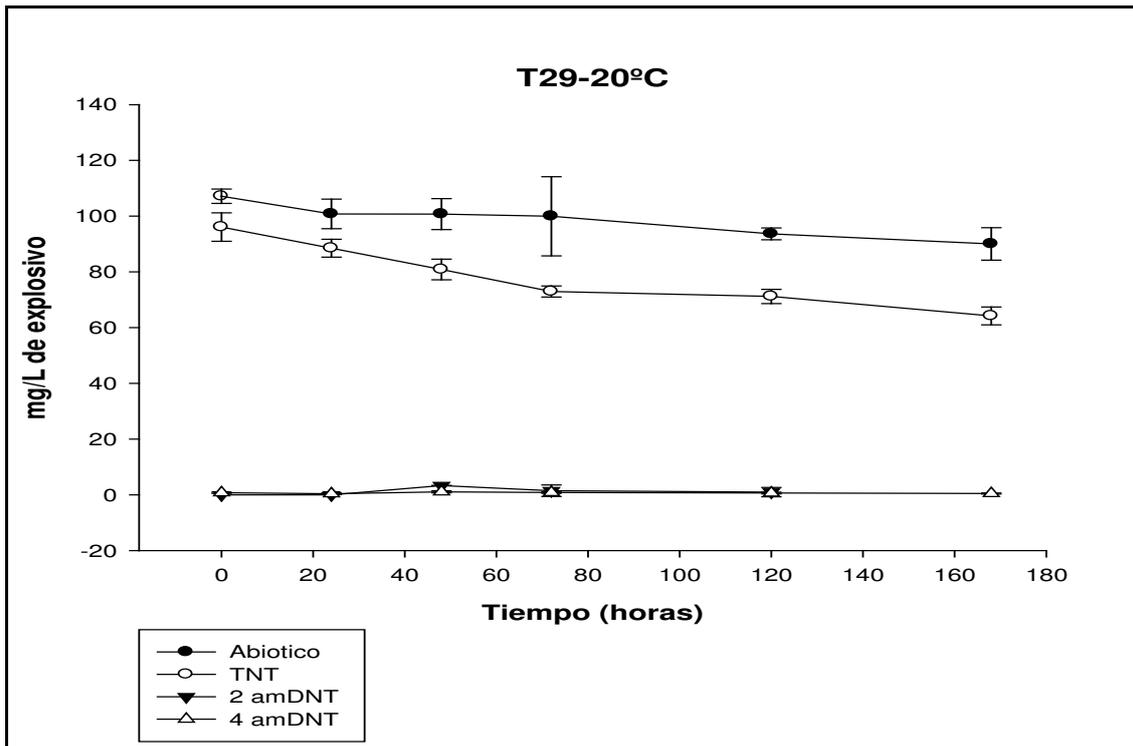
Las cepas en estudio, presentaron su menor porcentaje de degradación a 20°C, dentro de esta variable, la cepa T28 exhibió una degradación del 40,15% con respecto a la concentración inicial de explosivo, mientras que la cepa T29 expreso un porcentaje del 33,16 % (Figura No 19A – 19B). Así mismo, para cada una de las cepas en cada una de las temperaturas se observó una producción de 2,6-2,4 AMDNT.

A 25°C se observó un aumento en el porcentaje de degradación de las dos cepas con respecto a la temperatura anterior, no fueron muy altos pero si muy similares entre las dos cepas para la T29 se reportó un porcentaje del 59,20% y para la T28 del 30,37 %, también hubo producción de subproductos de degradación (Figura No 20A – 20B)



TIEMPO	TNT	Abiótico	2 amDNT	4 amDNT
0	90,37	100,80	1,356	0
24	79,52	107,15	1,89	0
48	72,10	100,74	1,8447	1,9435
72	67,48	90,02	1,4713	2,912
120	64,26	99,95	1,495	20,15
168	54,09	93,65	1,4593	21,164

Figura No 19A. Degradación de TNT por la cepa T28 y producción de metabolitos a la temperatura de 20°C.



TIEMPO	TNT	Abiótico	2 amDNT	4 amDNT
0	96,07	100,80	0	0,755
24	88,48	107,15	0	0,384
48	80,86	100,74	3,323	1,08
72	72,96	90,02	1,478	0,837
120	71,18	99,95	0,9687	0,66
168	64,22	93,65		0,466

Figura No 19B. Degradación de TNT por la cepa T29 y producción de metabolitos a la temperatura de 20°C.

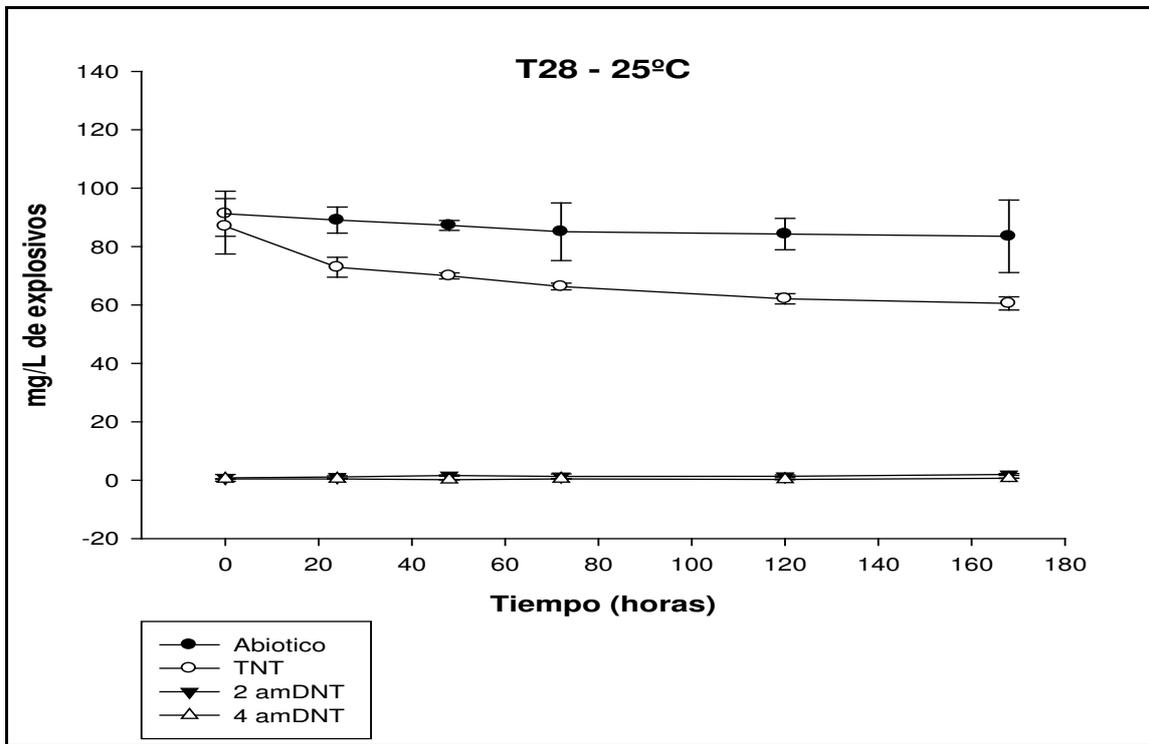
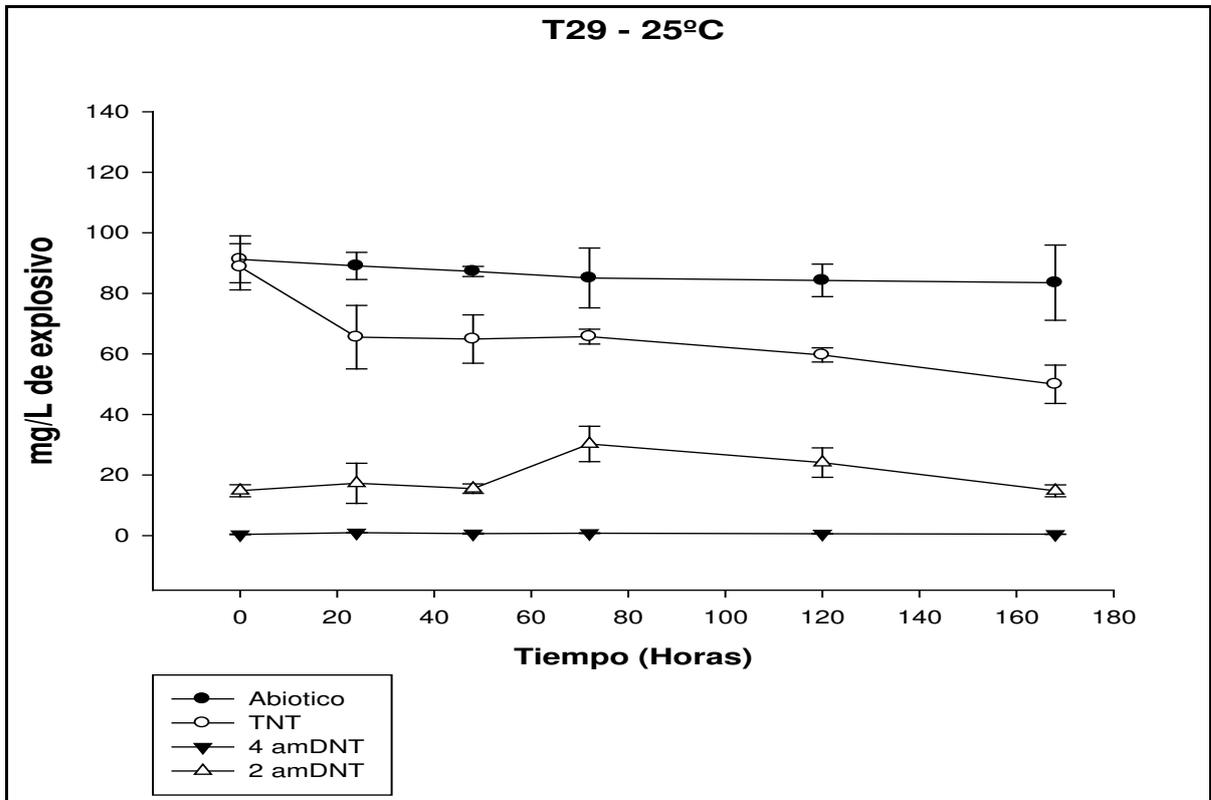


Figura No 20A. Degradación de TNT por la cepa T28 y producción de metabolitos a la temperatura de 25°C.



TIEMPO	TNT	Abiótico	2 amDNT	4 amDNT
0	88,78	91,25	14,83	0,40
24	65,55	89,09	17,28	0,99
48	64,92	87,26	15,51	0,65
72	65,74	85,10	30,29	0,82
120	59,68	84,30	24,12	0,62
168	49,98	83,53	14,79	0,46

Figura No 20B. Degradación de TNT por la cepa T29 y producción de metabolitos a la temperatura de 25°C.

Así mismo a 30°C se observó un aumento mayor con respecto a los dos temperaturas anteriores, se destaca la cepa T29 con un porcentaje del 70,97%, mientras que la cepa T28, solo reportó el 49,58%, lo que comprueba que la cepa T29 posee mayor capacidad degradadora a través del tiempo que la cepa T28, mas sin embargo, los porcentajes son altos, durante la degradación se manifestó la presencia de subproductos (Figura No 21A -21B)

A 35°C se observó los más altos porcentajes de degradación de todas las temperaturas establecidas, la cepa T29 reporto un porcentaje del 84,82%, mientras que la cepa T28 lo hizo en un 54,61%. También se manifestó la producción de subproductos propios de la degradación del TNT. (Figura No 22A – 22B). Para confirmar si la temperatura de 35°C es donde ocurre la mayor degradación del TNT, por parte de las cepas en estudio, se plantearon las siguientes hipótesis:

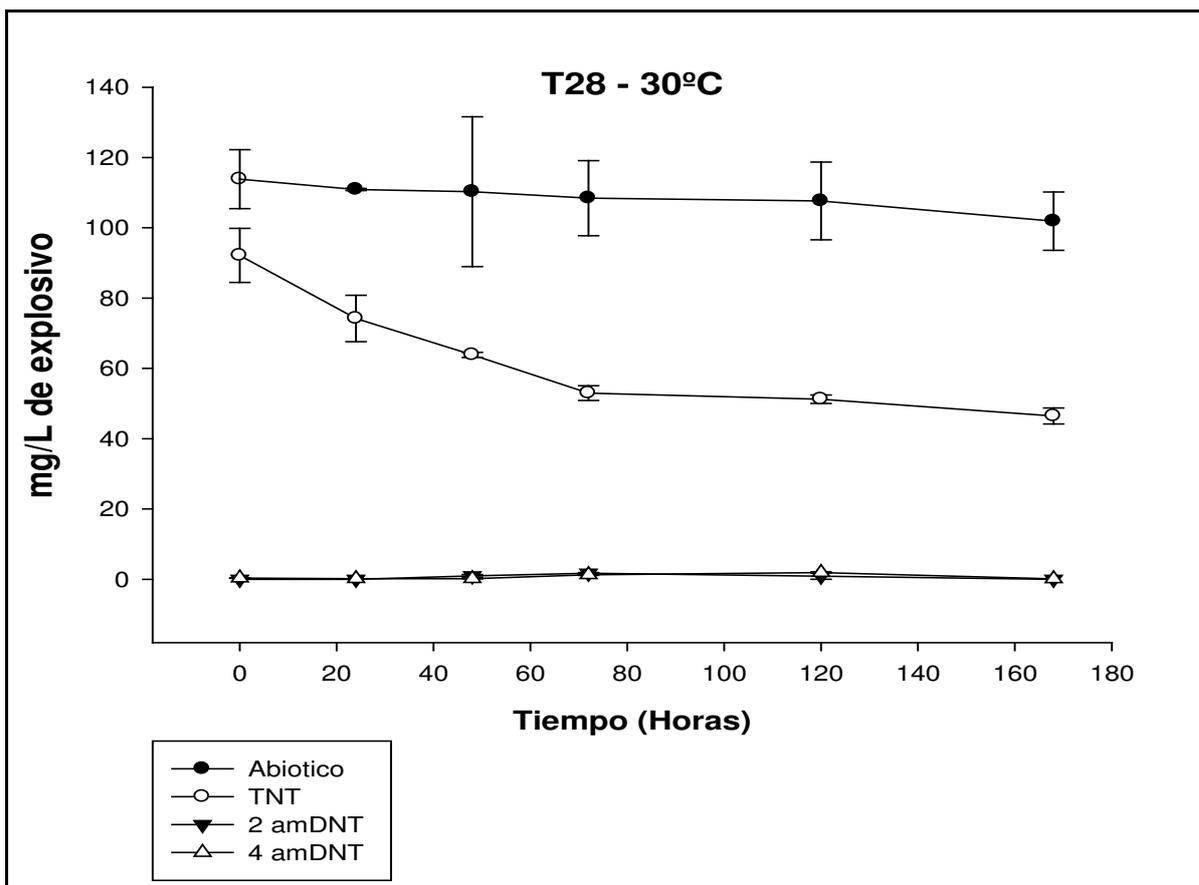
- a. El porcentaje de degradación del explosivo para cada una de las temperaturas establecidas es constante.

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

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

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





TIEMPO	TNT	Abiótico	2 amDNT	4 amDNT
0	92,14	113,84	0,00	0,34
24	74,19	110,91	0,00	0,18
48	63,84	110,29	0,98	0,19
72	52,98	108,43	1,71	1,30
120	51,22	107,66	0,90	1,92
168	46,46	101,90	0,00	0,15

Figura No 21A. Degradación de TNT por la T28 y producción de metabolitos a la temperatura de 30°C.

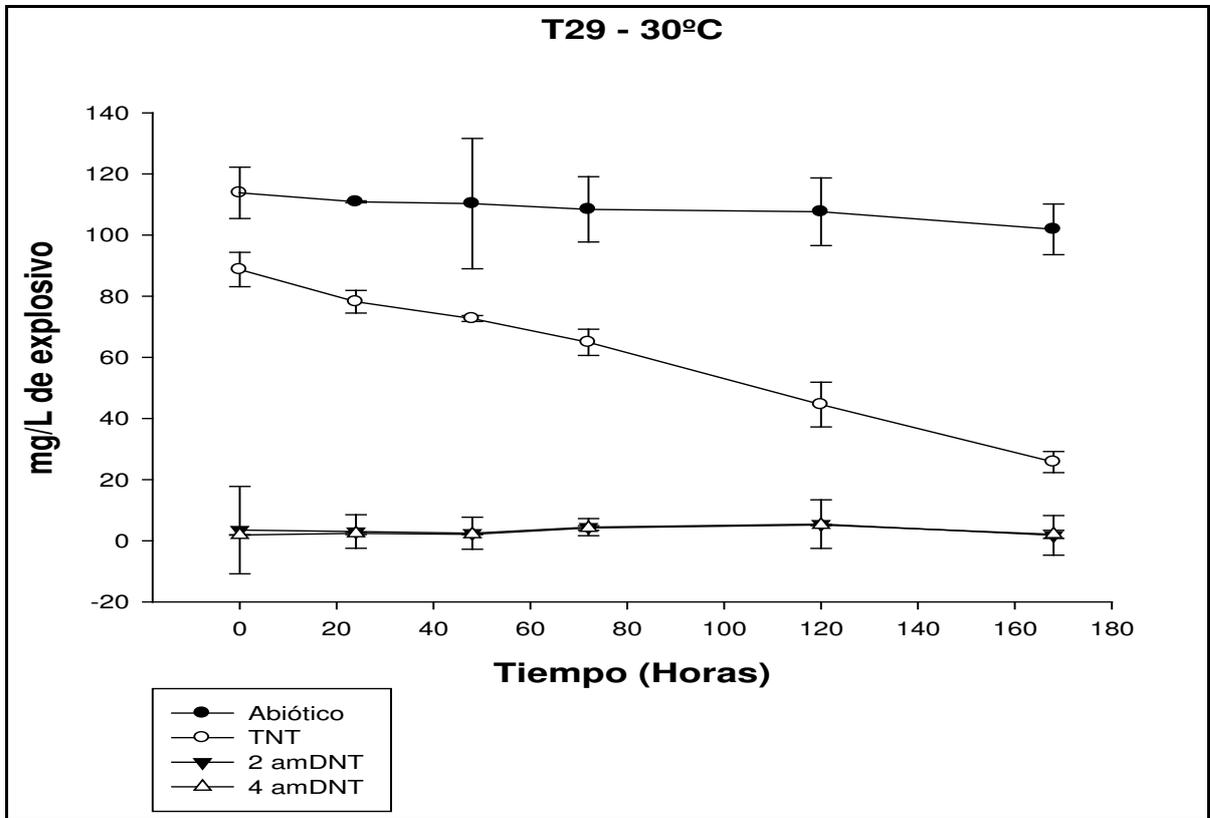


Figura No 21B. Degradación de TNT por la T28 y producción de metabolitos a la temperatura de 30°C.

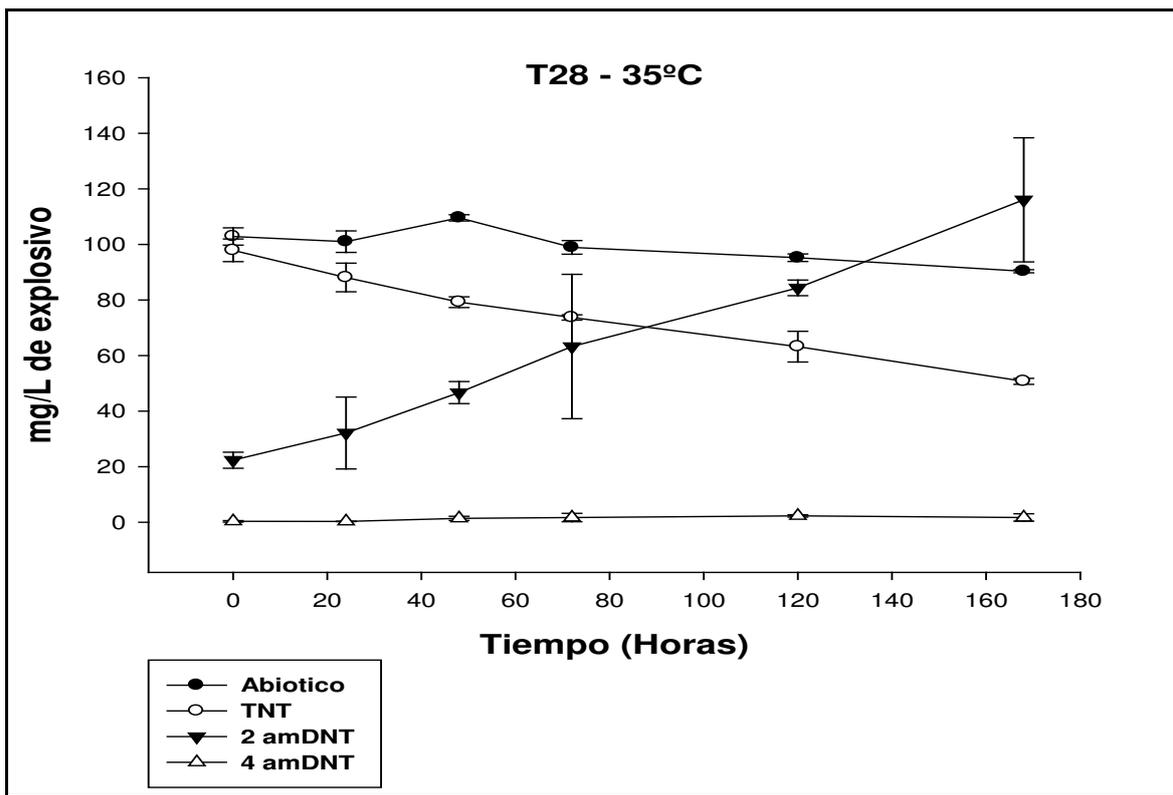


Figura No 22A. Degradación de TNT por la cepa T28 y producción de metabolitos a la temperatura de 35°C

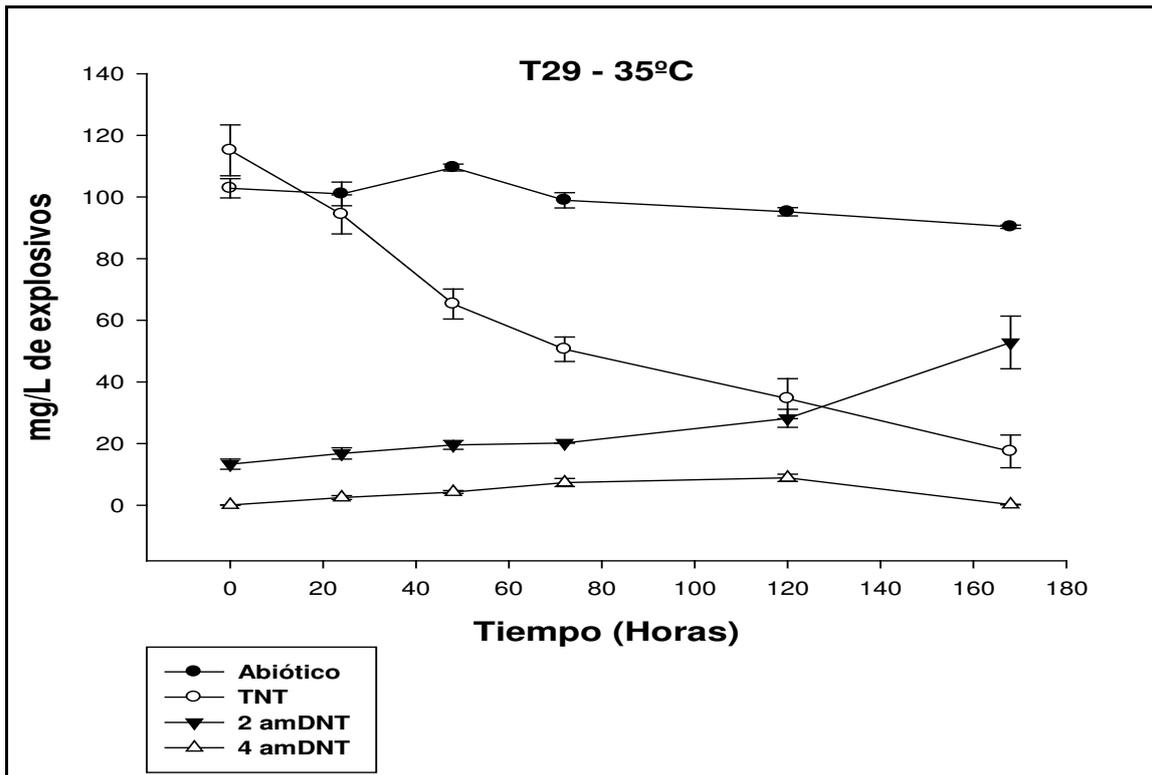


Figura No 22B. Degradación de TNT por la cepa T29 y producción de metabolitos a la temperatura de 35°C

Para comprobar las hipótesis se aplicó la prueba de Duncan, la cual se realizó mediante la cuantificación de la cantidad de TNT residual que se obtuvo después de 168 horas de incubación. Los resultados estadísticos obtenidos para la cepa T28 se encuentran plasmados en el **Anexo 12**. Los cuales demostraron que, entre los valores de 20 y 25°C no existe diferencia significativa en la degradación del explosivo durante las 168 horas de incubación, pero si con respecto a las temperaturas de 30 y 35°C, siendo la de 35°C donde se presentó la más alta degradación. Para la cepa T29, los resultados se encuentran plasmados en el **Anexo 13**, los cual demostraron que existe diferencia significativa entre todas las temperatura establecidas, pero donde se presentó la mayor degradación del explosivo fue a 35°C.

Estos resultados, donde a altas temperaturas mayor degradación de TNT coinciden con los reportados por Herald Clauss, quien afirmó que la máxima tasa de transformación de la cepa *R. terrigena HB*, es a 37 °C, y que esta favorece la producción de subproductos de degradación (Clauss, H.B. et al. 2007). Para este caso, la temperatura óptima para la degradación del TNT coincidió en las dos cepas en estudio, pero por lo general, dicho factor depende del microorganismo, ya que es la portadora de la enzima que cataliza la reacción de degradación y esta posee un a temperatura específica para su activación.

Con respecto a la ruta metabólica, se observó la presencia de subproductos aminos e hidroxilaminos, similares a los identificados en los subproductos identificados con el ensayo de pHs, por lo que se infiere que estas cepas poseen enzimas nitroreductasas, que reducen los grupos nitro de la molécula de TNT a metabolitos hidroxilaminos y aminos.

## **6.7. Degradación del 2,4,6 Trinitrotolueno por la combinación de las cepas en estudio**

### **6.7.1. Combinación de las cepas.**

Al realizar el confrontamiento dual, se observó que las bacterias en estudio, no producen sustancias tóxicas para competir entre ellas ya que no se evidenció ningún tipo de inhibición, demostrando que no son antagónicas y por lo tanto son susceptibles a ser combinadas (Figura No 23). Esta prueba da una aproximación a la posible formación de consorcios, en donde una puede tomar como sustrato los metabolitos de la degradación del primero, para continuar con esta y posiblemente completarla o llevarla a la siguiente ruta de degradación. (Antolinez, N., Acero, S., Martínez-Nieto P. y Bernal-Castillo J. (2001))

### **6.7.2. Biodegradación del TNT.**

Las condiciones de pH y temperatura a las cuales se realizó el ensayo, se establecieron a 8,0 y a 35°C respectivamente, y a 200 rpm. Se evidenció degradación de TNT durante las 120 horas de incubación, esta se cuantificó bajo los mismos parámetros establecidos en el literal 3.1.

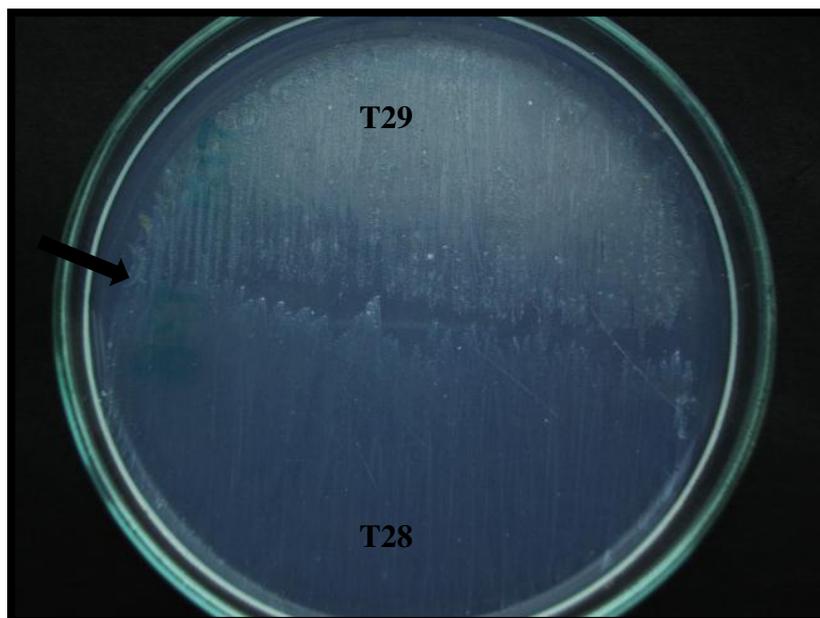


Figura No 23. Prueba de enfrentamiento dual de las cepas en estudio.

El control abiótico presento una degradación baja (10,49%), mientras que la degradación de TNT fue del 61,70% con respecto a la concentración inicial de explosivo, Así mismo, se observó una producción de amDNT y acumulación de  $\text{NO}_2^-$  (Figura No 24).

La mezcla microbiana presento un porcentaje de degradación de TNT mayor a la reportada por la cepa T28 a 35°C pero menor a la T29. La combinación de las cepas no superó el 62% de degradación del TNT pero esta si fue constante en el tiempo. Esta mezcla presento un promedio del porcentaje de degradación de las dos cepas en su estado individual.

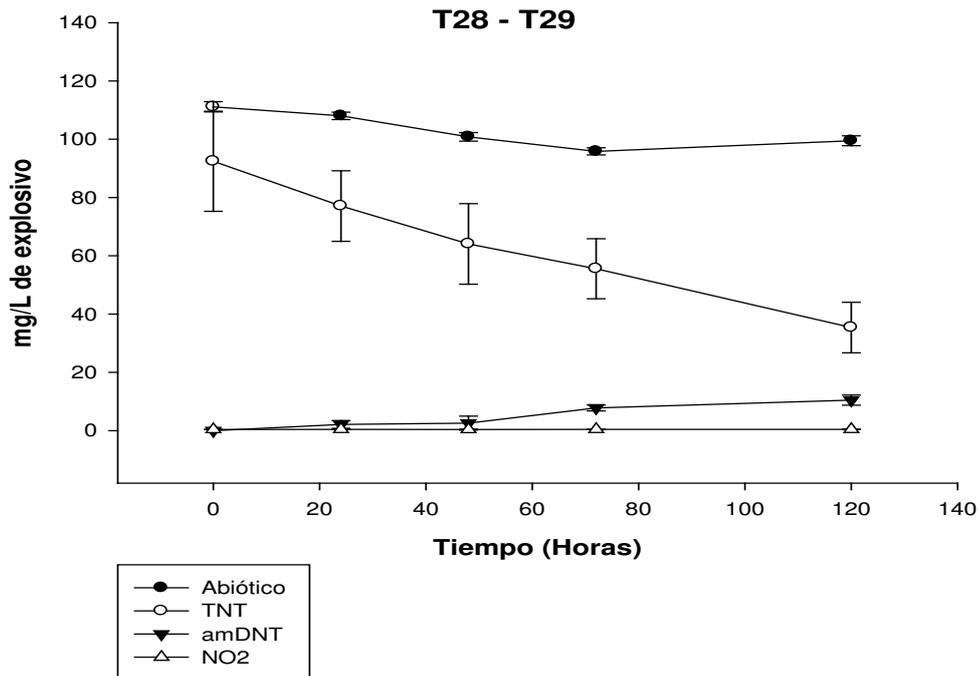
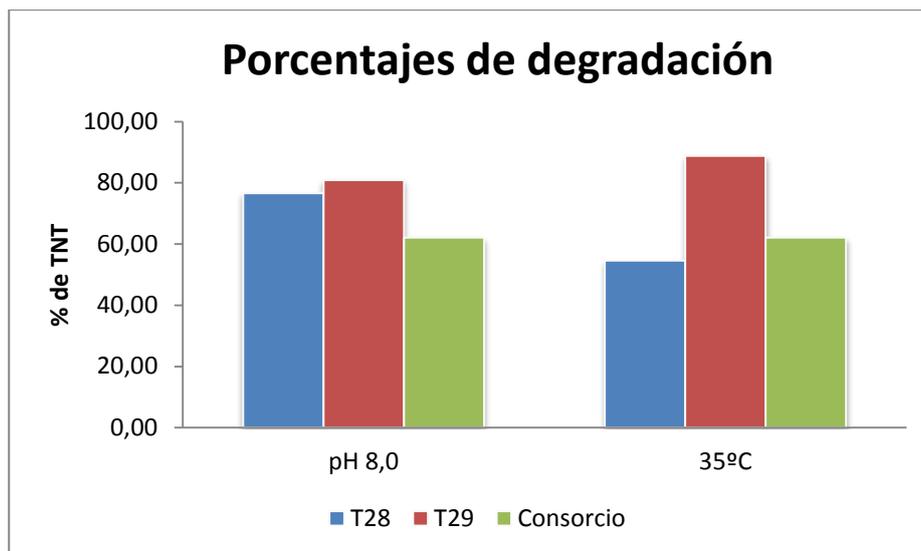


Figura No 24. Degradación de TNT por la combinación de cepas y producción de metabolitos

Aunque existen reportes que afirman que la degradación en consorcios es mejor en términos de porcentaje de degradación y reducción de tiempo (Antolínez, et al. 2001), para este caso, no se evidenció. Esto muy posiblemente se debió a que a pesar que las cepas se encontraban en el pH y temperatura en la cual los dos microorganismos presentaron la mayor degradación del explosivo (pH 8,0), la combinación de las mismas hizo que se afectara la capacidad de degradación de cada una de ellas, aumentando la capacidad de la T28 y disminuyendo la de la T29. (Figura No 25). Con respecto a la ruta metabólica y con base en los metabolitos producidos, se infiere que es la misma utilizada por las bacterias de forma individual, es una reducción del grupo nitro de la molécula de TNT a metabolitos hidroxilaminos y aminos, catalizada por enzimas reductasas.



Figura

No 25. Comparación de los porcentajes de degradación obtenidos entre las cepas y su combinación.

## 7. CONCLUSIONES

- Las bacterias aisladas (32) en presencia de 100 mg/L de TNT, definen sus morfotipos después de 120 horas de incubación a 30°C, destacándose colonias con tonalidades rojizas. Pero este crecimiento no garantiza que tengan la capacidad de degradar explosivo, ya que tan solo el 20% de los aislamientos, lograron degradaciones de TNT mayores al 50% con respecto a la concentración inicial.
- Los solventes en los cuales se diluye el explosivo, no influyen en el crecimiento de las cepas con capacidad degradadora de estos compuestos, pero la concentración del TNT si influye en dicho crecimiento y esto depende de la ruta metabólica que tome el microorganismo, ya que, si el TNT se encuentra en la

proporción necesaria puede ser usado como única fuente de nitrógeno, de lo contrario, es necesario la aplicación de una fuente adicional.

- Las bacterias seleccionadas muestran degradación de TNT en cada uno de los valores de pH y temperatura establecidos, pero las condiciones que favorecen la degradación en términos de porcentaje y de reducción de tiempo son pH 8 y 35°C. En este caso, los valores coincidieron para las dos cepas en estudio, pero pudo no haber sido así, ya que, las enzimas que cataliza la reacción de degradación poseen valores específicos de pH y temperatura para su activación.
- Las cepas seleccionadas no presentaron antagonismos entre ellas por lo que se puede conformar un consorcio, mas sin embargo, bajo las mejores condiciones de pH (8.0) y temperatura (35°C) la combinación de las bacterias seleccionadas, mostraron un porcentaje de degradación de TNT menor con respecto a la degradación presentada por la cepa T29 pero mayor con respecto a la cepa T28 y la degradación fue constante en el tiempo lo que nos permitirá predecir la reducción de la molécula de TNT a futuro.

## 8. RECOMENDACIONES.

Para poder medir velocidades de degradación, se sugiere estandarizar una técnica para obtener el peso seco de los microorganismos degradadores de explosivos en cada uno de los tiempos de la fase de crecimiento, ya que debido a la poca producción de biomasa esta se pierde durante los lavados correspondientes.

Las medidas de Densidad Óptica, no es suficiente criterio para cuantificar biomasa, es necesario estandarizar una técnica que permita relacionarla con ufc/mL o peso seco, para cada uno de los microorganismos seleccionados.

Para realizar cinéticas de degradación, se sugiere la extracción, purificación e identificación de las enzimas que producen las cepas seleccionadas o estandarizar técnicas que permitan cuantificar la biomasa de las bacterias en estudio, ya que, debido al lento crecimiento y poca biomasa es difícil obtener datos fiables.

Para mediciones de degradación de TNT en el laboratorio, se deben usar solo concentraciones que no superen su solubilidad (105 mg/L), ya que el exceso de TNT, muestra datos no fiables, debido a que los cristales que se precipitan interfieren con la medición por HPLC.

## 9. Referencias

1. Agency, E. P. (2007). Method 8330B, Nitroaromatics, Nitramines and Nitrate esters by High Performance liquid Chromatography (HPLC).
2. Antolinez, N., Acero, S., Martinez-Nieto P., & Bernal-Castillo J. (2001). Degradación del Malathion por Bacterias aisladas de la Bahía de Cartagena. Paper presented at the IV Simposio Internacional de Desarrollo Sustentable/Regulación de la Fertilidad en Agroecosistemas de los Andes Tropicales.
3. Atlas, R., y Bartha, R. (2002). Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. España: Pearson Educacion, S.A.
4. Avinash M. T, K. J. (2000). Isolation of TNT tolerant Pseudomonas Species (strain KA) from TNT Contaminated Soil-Biotransformation of TNT. 141 - 145.
5. Barrows, S. E., Cranner, C.J., & Truhal, D.G. (1996). Factor controlling regioselectivity in the reduction of polynitroaromatic in aqueous solution. . Environmental Science Technology, 30, 3028 - 3038.
6. Bernal, P., Segura, A. & Ramos, J.L. (2007). Compensatory role of the cis-trans isomerase and cardiolipin synthase in the membrane fluidity of *Pseudomonas putida* DOT-T1 E.

7. Binks., P. R., French., C.E., Nicklin, S. & Bruce., N.C. (1996). Degradation of Pentaerythritol Tetranitrate by **Enterobacter cloacae PB2**. Applied and Environmental Microbiology, 1214-1219.
8. Boopathy, R., Manning, J., & Kulpa C. F. (1997). Optimization of Environmental Factors for the Biological Treatment of Trinitrotoluene-Contaminated Soil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 32 94–98.
9. Bravo P, C. y Aldana L, D. (2010). Remoción de Trinitrotolueno (TNT) en agua residual sintética mediante bacterias aisladas de ambiente con presencia de explosivos., Universidad de la Salle, Bogotá D.C.
10. Caballero, A., Ramos, J.L., & Esteve-Nuñez, A. (2005). PnrA, a new nitroreductase-family enzyme in the TNT-degrading strain *Pseudomonas putida* JLR11.
11. Caballero, R., Antonio Fernando. (2005). Bases Genéticas y Bioquímicas del Metabolismo del Nitrògeno del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) en *Pseudomonas putida* JLR11 Universidad de Granada.
12. Clark., B., 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, 643-648.

13. Clauss, H., Perret, N., Bausinger, T., Fels, G., Preub, J., & Konig, H. (2007). TNT transformation products are affected by the growth conditions of *Raoultella terrigena*. *Biotechnology Letter*, 29, 411-419.
14. Chang, C.-S., Kim, H-Y., Kang, Y-M., Bae, K-S & Song, H-G. (2002). Transformation of 2,4,6 -Trinitrotoluene in various conditions by *Klebsiella* sp. Strain C1 Isolated from Activated Sludge. *The Journal of Microbiology*, 193-198.
15. Chulhwan, P., Tak-Hyun, K., Sangyong, K., Jinwon, L., & Seung-Wook, K. (2002). Biokinetic Parameter Estimation for Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) with *Pseudomonas putida* KP-T201. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, 94(1), 57-61.
16. Chulhwan, P., Tak-Hyun, K., Sangyong, K., Seung-Wook, K., Jinwon, L., & Sun-Hwan K. (2003). Optimization for Biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) by *Pseudomonas putidas*. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*, 95(6), 567 - 571
17. Doran, M. P. (1998). *Principios de Bioprosesos*. Zaragoza (España).

18. Duque, E., Haidour, A., Godoy, F & Ramos, J. (1993). Construction of a *Pseudomonas* Hybrid Strain that mineralizes 2,4,6-Trinitrotoluene. *Journal of Bacteriology*, 175(8), 2278-2283.
19. Eduardo, A. J. d. S. (2007). Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Doctor en Veterinaria, UAB, Barcelona, España.
20. Esteve-Núñez, A., Caballero, A. & Ramos, J. . (2001). Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(3), 335–352.
21. Eweis, J., Ergas, S., Chang, D., & Schroeder, E.(1999). Principios de Biorrecuperación (1 ed.). Madrid España: Mc Graw Hill.
22. Fernandez, M., Duque, E., Pizarro-Tobias, P., Van Dillewijn, P., Wittich, RM., & Ramos, JI. (2009). Microbial responses to xenobiotic compounds. Identification of genes that allow *Pseudomonas putida* KT2440 to cope with 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiology Biotechnology*, 2, 287-294.
23. Fiorella., D. P. S. (1997). Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS52. *Applied and environmental microbiology*, 3(5), 2007-2015.

24. French, P. D., Nicklin, S., & Bruce, N.C. 1998. Aerobic degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by Pentaerythritol Tetranitrate Reductase. *Apply Environmental Microbiology*, 64(8), 2864-2868.
25. Garcia, B. 2011. Recuperación y evaluación de la capacidad degradadora de consorcios bacterianos aislados de ambientes impactados en TNT y PETN. Universidad Nacional de Colombia. Bogota.
26. Hampton, M. S., W.E. (1997). Environmental stability of windrow composting of explosives-contaminated soils.
27. Hurst., J.C.& Crawford. L. R. (2002). *Manual of environmental microbiology* (2da Edición ed.). USA.
28. Husain I., A. M., Alam Z.& Muyibi S.A. (2011). Kinetic Study of a Bacterial Consortium Isolated from Soil Contaminated with Crude Oil. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(6), 925-930.
29. In B., P. J., Namkoong W., Hwang E. & Kim J. (2008). Efecct of co-substrate on anaerobic slurry phase biorremediation of TNT-cotaminated soil. *Korean Journal Chemistry Engineer*, 25(1), 102-107.
30. Knackmuss, H.-J. (1996). Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds. *Journal of Biotechnology*, 51, 287-295.

31. Kröger, M., Schumacher, M. E., Risse H, & Fels, G. (2004). Biological reduction of TNT as part of a combined biological–chemical procedure for mineralization. *Biodegradation*, 15, 241-248.
32. Kulkarni, M., & Chaudhari, A. (2007). Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. *Journal of Environmental Management*(85), 496-512.
33. Kubota, A., Maeda, T., Nagafuchi, N., Kadokami, K., & Ogawa, H.I. (2008). TNT biodegradation and production of dihydroxylamino-nitrotoluene by aerobic TNT degrader ***Pseudomonas sp.*** strain TM15 in an anoxic environment. *Biodegradation*(19), 795 - 805.
34. Lewis, T. A., Newcombe, D. A., & Crawford, R. L. (2004). Bioremediation of soils contaminated with explosives. *Journal of Environmental Management*, 70, 291-307.
35. Madigan T M, y Parker J., B. (2004). *Biología de los Microorganismos*. Madrid: Pearson-Prentice-Hall.
36. Madsen, E. L. (1997). *Methods for determining biodegradability*.
37. Maier, R. M. P., I.L & Gerba, C.P. (2009). *Environmental Microbiology*. United States.

38. Nefso, E. K., Burns, S.E., & McGrath, C.J. (2005). Degradation kinetics of TNT in the presence of six mineral surfaces and ferrous iron. *Journal of Hazardous Materials*, B123 79-88.
39. Nicolaou, S. A., Gaida, S. M., & Papoutsakis, E.T. (2010). A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing from biofuels and chemicals, to biocatalysis and biorremediation *Metabolic Engineering*, 12, 307-331.
40. Nyanhongo, G. S., Aichernig, N., Ortner, M., Steiner, W. & Guebitz, G.M. (2009). Incorporation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transforming bacteria into explosive formulations. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 285-290.
41. Nyanhongo, G. S., Schroeder, M., Steiner, W. & Guebitz G.M. (2005). Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT): An enzymatic perspective.
42. 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.
43. Orjuela, P., Sandon, A., Franco, M. y Martinez, M. (2003). Evaluación de cepas antagónicas de actinomicetos y de *Trichoderma* spp. aislados a partir de suelos de cultivo de arroz (*Oryza sativa*) para el control de *Rhizoctonia solani*. *Revistas Mundo Microbiológico. Asociación Colombiana de Microbiología.*, 2(2), 9-14.

44. Park, H. S., & Kim, H.S. (2000). Identification and characterization of the nitrobenzene catabolic plasmids pNB1 and pNB2 in *Pseudomonas putida* HS12. *Journal Bacteriology*, 182, 573-580.
45. Popescu, J. T., Singh, A., Zhao, J.S., Hawari, J., & Ward, O.P. (2003). High TNT-transforming activity by a mixed culture acclimated and maintained on crude-oil-containing media.
46. Ramos, J. L., Duque, E., Godoy, P., & Segura, A. (1998). Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E.
47. Rodgers, J., & Bunce J. (2001). Treatment Methods for the Remediation of nitroaromatic explosives *Water Residual*, 35(9), 2101-2111.
48. Rosser., S. J., French., C. E. & Bruce., N.C. (2001). Special Symposium: Phytoremediation engineering plants for the phytodetoxification of explosives. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 37(3), 330.
49. Smets, B., Yin, H & Esteve-Nuñez, A. (2007). TNT biotransformation: when chemistry confronts mineralization. *Application Microbiology Biotechnonology*, 76, 267-277.
50. Spain, J. C. (1995). Bacterial degradation of nitroaromatic compound under aerobic conditions, in *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. *Environmental Science Research*, 49, 19-35.

51. Spain, P. D. F. a. J. C. (1997). Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS52. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 63(5), 2007–2015.
52. Spain, J., Hughes, J., y Knackmuss, H. (2000). Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. CRC Press.
53. Thorn, K. A., Pennington, K.C. & Hayes, C.A. (2002). M-15 NMR investigation of the reduction and binding of TNT in an aerobic bench scale reactor simulating windrow composting.
54. Tront, J. M. H., J.B. (2005). Oxidative microbial degradation of 2,4,6-trinitrotoluene via 3-methyl-4,6 dinitocatecol.
55. Vanderberg, L. A., Perry, J.J. & Unkefer, P.J. (1995). Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*. *Application Microbiology Biotechnonology*, 43, 937-945.
56. Villegas., P., S.. (2009). Aislamiento de microorganismos degradadores de 2-4-6-Trinitrotolueno (TNT) a partir de ambientes contaminados con explosivos. *Microbiologia Industrial*, Pontificia Universidad Javeriana, Bogota.

57. White, F. G., Snape, R.J. & Nicklin, S. (1996). Biodegradation of Glycerol Trinitrate and Pentaerythritol Tetranitrate by *Agrobacterium radiobacter*. *Applied and environmental microbiology* 637-642.
58. Williams, R. T., Rathbone, D.A. Scrutton, NS & Bruce, N.C. (2004). Biotransformation of explosives by the old yellow enzyme family of flavoproteins. *Apply Environmental Microbiology*, 70, 3566 - 3574
59. Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., & Knackmuss, H-J. (1994). Identification of a Hydride-Meisenheimer Complex as a Metabolite of 2,4,6-Trinitrotoluene by a *Mycobacterium* Strain. *Journal of Bacteriology*, 176(3), 932-934.
60. Zappi, M. E., Gunnison, D., Pennington, J., Teeter, C., Coyle, C., & Rope, C. (1993). Evaluation of bioslurry systems for treating explosives contaminated soils from the hastings east industrial park. *Waterways Experiment Station*, 567 - 571.
61. Zaripov, S. A., Naumov, A.V., Nikitina, E.V., & Naumova, R.P. (2002). Alternative pathways of the initial transformation of 2,4,6-trinitotoluene by yeasts. *Mikrobiologiya*, 71(5), 648-653.
62. Zaripov S.A., N., A.V., Suvorova, E. S., Garusov, A. V. y Naumova, R. P. (2004). Initial stages of 2,4,6 Trinitrotoluene transfromation by microorganisms. *Microbiology*, 73(4).

## 10. ANEXOS

## ANEXO 1. Identificación molecular de las cepas en estudio

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

De los microorganismos degradadores de TNT se obtuvieron PI de 98% con microorganismo de referencia de la base de datos del RDP.

Cepa	Microorganismo	PI	Filum	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
T15	Stenotrophomonas maltophilia	99	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	maltophilia
T17	Pseudomonas psychrotolerans	99	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	psychrotolerans
T22	Methylopila capsulata	97	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	Methylopila	capsulata
T23	Pantoea agglomerans	98	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pantoea	agglomerans
T28	Pseudomonas oleovorans	99	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	oleovorans
T29	Shinella kummerowiae	99	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Shinella	Kummerowiae

## ANEXO 2. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Composición de los medios de cultivo

Sustancias	Tipo y Cantidad	Concentración
<b>Sales</b>	HCl (3 ml)	1 M
	NaCl (12.5 g)	8,5 mM
	MgSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O (5 g)	0,81 mM
	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (1g)	0,27 mM
<b>Buffer</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (17,5 g)	4,02 mM
	K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7,5 g)	2,2 mM
<b>Vitaminas</b>	Clorhidrato de piridoxina (0,05 g)	
	Ácido p-aminobenzoico (0,025 g)	
	Ácido nicotínico (0,025g)	
	Pantotenato de calcio (0,025 g)	
	Riboflavina (0,025 g)	
	Vitamina B <sub>12</sub> (0,025 g)	
	Tiamina-HCl (0,025 g)	
	Biotina (0,01 g)	
	Ácido fólico (0,01 g)	
α-lipoico (0,01 g)		
<b>Trazas</b>	HCl (20 ml)	18 -19%
	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (0,2 g)	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (0,1g)	
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (0,1 g)	
	CaSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O (0,05 g)	
	CoCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O (0,05 g)	
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O ( 0,01 g)	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (0,01 g)	
NiSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O		
<b>Explosivo</b>	TNT (2,5 ml)	
<b>Hierro</b>	HCl (3 ml)	1 M
	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O ( 0,3 g)	10, 8 μM

Cantidades para la elaboración de los medios.

<b>Preparación del medio mineral para 1L de medio</b>	
Solución de Buffer	10 ml
Solución de Sales	10 ml
Fuente de carbono	10 ml
Fuente de nitrógeno	10 ml
<b>Después de estéril</b>	
Solución de Hierro	1 ml
Elementos de trazas	1 ml
Solución de vitaminas	1 ml
Solución de explosivo	2,5 ml

Composición Fuentes adicionales

FUENTES	COMPOSICIÓN Y CANTIDAD			
Fuente de Carbono	Glucosa 2,5 g	Citrato 2,5 g	Glicerol 2 ml	Acetato 2,5 g
Fuente de Nitrógeno	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1g			

Autores: Bravo Carolina y Diana Aldana (2010)

### ANEXO 3. Condiciones de corrida HPLC (del inglés, High Performance Liquid Chromatography)

Las condiciones cromatografías empleadas fueron:

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

Coefficientes de determinación obtenidos en las curvas de calibración

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

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

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

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

## ANEXO 4. MODIFICACIONES AL METODO 8330B

El método describe diferentes procedimientos para la determinación de explosivos por HPLC en muestras de suelo y acuosas; si embargo no describe el método de extracción para sedimentos. Es importante destacar que este método reporta que los valores de precisión y exactitud para el análisis de TNT son < 14% y 70 – 130%, respectivamente.

### *Descripción del método:*

El procedimiento descrito en el método para el análisis de suelo indica que antes de realizar la extracción de explosivos se debe someter la muestra a un tratamiento. Este consiste en secar la muestra a temperatura ambiente en oscuridad (hasta alcanzar pesos constante), tamizar y realizar un submuestreo aleatorio. Durante el procedimiento de extracción se toman 10 g de muestra de la submuestra, se mezclan con 20 mL de acetonitrilo y se sónica por 18 horas a una temperatura <30°C, se decanta por 30 min y finalmente, el sobrenadante se filtra para su análisis por HPLC.

En cuanto al análisis de muestras acuosas el método describe tres procedimientos de extracción de explosivos. El primer procedimiento se emplea para muestras con baja concentración de explosivos (<1 – 50 mg/L), el segundo (*salting-out*) se emplea para muestras con baja concentración de explosivos (<1 mg/L) y el tercero es un procedimiento de extracción en fase sólida para muestras con bajas concentraciones de explosivos (<1 mg/L).

El método para determinar altas concentraciones de explosivos consiste en tomar 5 mL de la muestra y adicionar 5 mL de acetonitrilo, agitar y filtrar para su cuantificación por HPLC. Por otro lado, en el método *salting-out* se toman mayores volúmenes de muestra (770 mL) y se realizan varias extracciones con cloruro de sodio (NaCl) y acetonitrilo. El objetivo de adicionar NaCl es desplazar el explosivo de la muestra hacia la fase de acetonitrilo, aumentando la eficiencia de la extracción.

Para el desarrollo de la investigación se evaluó el procedimiento descrito para el análisis de muestras acuosas con altas concentraciones de explosivos realizando algunas modificaciones, las cuales se describirán más adelante.

### **Curvas de calibración.**

El primer paso para poder realizar la puesta a punto de los métodos de extracción fue realizar las curvas de calibración para determinar la concentración de los explosivos.

Inicialmente las curvas de calibración se realizaron con estándares secundarios (material comercial) obteniendo coeficientes de determinación  $>0.9900$ . Esto permitió analizar TNT durante los ensayos preliminares.

Posteriormente se adquirieron los estándares primarios certificados (Accustandar; New Haven, CT), lo cual permitió la determinación y cuantificación no solo de los explosivos sino también de algunos subproductos de la degradación de TNT. De estos resultados se resalta el alto coeficiente de determinación ( $R^2 \geq 0.9898$ ) obtenido en las curvas de calibración indicando correlación lineal entre el rango de concentración y la respuesta obtenida. Se pudo separar claramente TNT, así como, la mayoría de los metabolitos de degradación de TNT. Sin embargo, los isómeros dinitrotoluenos (2,4-DNT y 2,6-DNT) y aminodinitrotoluenos (2am-DNT y 4am-DNT) presentaron tiempos de retención muy cercanos, generando un solapamiento de los picos, lo cual limitaba su identificación. Por tal razón, se reportan el par de compuestos como dinitrotolueno y aminodinitrotolueno. (Tabla 1)

Tabla 1. Curvas de calibración realizadas con estándares primarios a 100 mg/L (Accustandar; New Haven, CT) (n=3), utilizando columna C-18

<b>Estándares evaluados</b>	<b>No Referencia Comercial</b>	<b>Lote</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Coefficiente de determinación</b>
<b>2,4,6-TNT</b>	M-8330-11	209091176	7.038	0.9898
<b>4am-DNT</b>	M-8330-14	B4020312	7.292	0.9972
<b>2am-DNT</b>	M-8330-13	B9040135	7.430	0.9916
<b>2,6-DNT</b>	M-8330-03	B3090172	7.942	0.9930
<b>2,4-DNT</b>	M-8330-02	B9020221	8.011	0.996
<b>PETN</b>	M-8330-ADD-2-10X	209091072	11.923	0.9978

### **Análisis de explosivos en muestras de suelo.**

Los análisis realizados utilizando el procedimiento de extracción en muestras de suelo mostraron una exactitud (porcentajes de recuperación) dentro del rango reportado por el Método 8330B (70-130%) (Tabla 2). Por lo anterior, este método fue empleado para analizar diferentes muestras de suelo provenientes de la planta FEXAR, así como de muestras de laboratorio.

Tabla 2. Evaluación del método 8330 para el análisis de explosivos en muestras de suelo

Muestra	Suelos	
	TNT (mg/L)	PETN (mg/L)
	124.71	117.2
	122.85	111.0
	112.69	105.3
<b>Promedio</b>	120.1	111.2
<b>DS</b>	6.5	6.0
<b>%CV(Precisión)</b>	5.4	5.4
<b>%R(Exactitud)</b>	120.1	111.2

-Ds: desviación estándar, %C: Porcentaje del coeficiente de variación y %R: Porcentaje de recuperación

### **Análisis de explosivos en muestras de sedimentos y acuosas.**

Es importante mencionar que el método 8330B no describe la metodología para el análisis de muestras de sedimentos ni para el análisis de muestras acuosas con concentraciones > 50 mg/L. Por esta razón fue necesario realizar modificaciones de los métodos para el análisis de muestras en la investigación.

Para poner a punto la extracción de explosivos a partir de muestras de sedimentos (suelo: medio de cultivo 20:80 p/v) y acuosas (medio de cultivo), se adiciono una concentración conocida de TNT (20,000 mg/L) para lograr una concentración final de 100 mg/L. Esta solución de explosivos fue analizada por HPLC para conocer su concentración real, valor que fue utilizado para calcular los porcentajes de recuperación.

Se evaluaron diferentes metodologías con el fin de obtener datos con mayor precisión (CV% < 14%) y exactitud, donde los porcentaje de recuperación se encontraran en el rango reportado (70-130%).

Para verificar la precisión y exactitud de los métodos modificados se utilizó el porcentaje de coeficientes de variación (%CV) y el porcentaje de recuperación (%R), respectivamente. Inicialmente, se evaluó la distribución normal de los datos usando Shapiro Wilk y homogeneidad de varianzas empleando la prueba de Levene. En los casos donde los datos no presentaban una distribución normal, se transformaron con logaritmo natural para emplear pruebas paramétricas. En el que caso que no fuera

posible la transformación se empleó estadística no paramétrica. Para el análisis se utilizaron pruebas ANOVA (análisis de varianza) y Tukey o Kruskal-Wallis. Para todas las pruebas se empleó un  $p < 0.05$ . Se usaron los programas SPSS V. 18 y Statistix V.9.

Es así, como se utilizaron diferentes volúmenes (2,5 10 y 20 mL) de muestra con el fin de determinar su efecto sobre la precisión y exactitud del método. De igual forma se evaluó el efecto de la presencia de microorganismos en el proceso de extracción. Para este fin se empleó medio de cultivo líquido con un cultivo microbiano.

Se tomó la decisión de realizar el proceso de extracción de explosivos utilizando 2 mL de muestra porque la precisión y exactitud estaban dentro del rango del método de la EPA (Tabla 3). El menor volumen de muestra facilita los ensayos de biodegradación a escala de laboratorio e implica un ahorro en reactivos y tiempo. Así mismo, no se observó un efecto significativo de los microorganismos en el medio de cultivo utilizando diferentes volúmenes de muestra. Adicionalmente, la presencia de microorganismos no afectó la precisión ni la exactitud en el volumen (2mL) seleccionado.

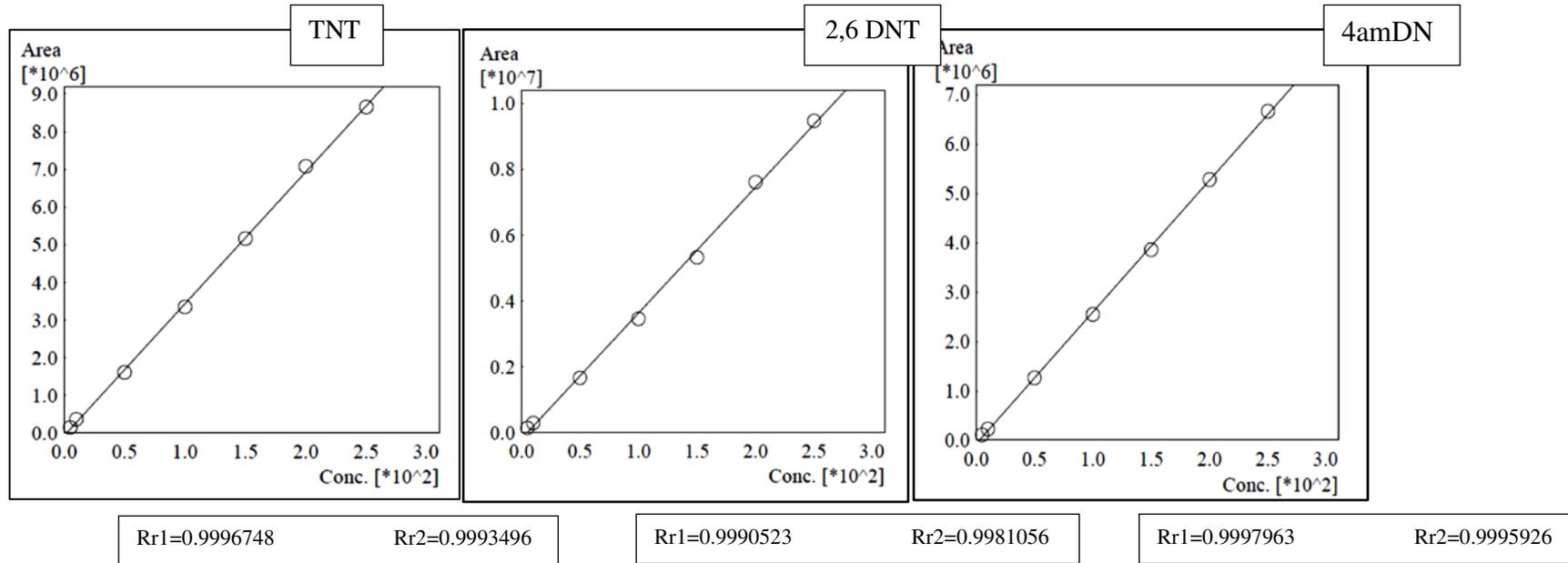
Tabla 3. Evaluación del efecto de volumen de muestra en la extracción de explosivos para muestras de sedimentos, acuosas y acuosas con microorganismos con altas concentraciones de explosivo (100 mg/l) (n=3)

TNT mg/L												
Volumen	2 mL			5 mL			10 mL			20 mL		
Muestra	Acuosa	Sedimentos	Acuo +mic									
	107.1	83.5	119.2	140.9	84.7	141.0	96.2	44.5	89.1	123.6	117.9	162.7
	130.4	81.5	109.9	145.0	68.9	132.5	81.1	50.0	103.9	105.9	99.8	147.6
	105.6	80.3	11.7	150.1	76.2	143.1	91.8	43.3	117.1	118.2	95.3	154.4
	105.5	79.8	114.5	130.4	76.3	113.5	87.8	51.8	95.9	134.6	124.7	91.3
<b>Promedio</b>	112.2	81.3	113.8	141.6	76.5	132.5	89.2	47.4	101.5	120.6	109.4	139.0
<b>DS</b>	12.2	1.6	4.1	8.4	6.5	13.5	6.4	4.1	12.0	11.9	14.1	32.4
<b>%CV (Precisión)</b>	10.9	2.0	3.6	5.9	8.4	10.2	7.2	8.7	11.9	9.9	12.9	23.3
<b>%R (Exactitud)</b>	118.6	85.9	120.3	149.7	80.9	140.1	94.3	50.1	107.3	127.5	115.7	146.9

Acuo+mic: acuosa + microorganismo. DS: Desviación estándar. %CV: Porcentaje del coeficiente de variación y %R: Porcentaje de recuperación. ( $p < 0.05$ ).

Tomado del Segundo Informe Semestral Proyecto “Diseño de un sistema con microorganismo degradadores de PETN y TNT incorporado en el explosivo Pentolita”  
Enero 25 de 2011. Universidad Javeriana-Universidad de la Salle.

## ANEXO 5. Curvas patrón de TNT, 4amDNT y 2,6 DNT

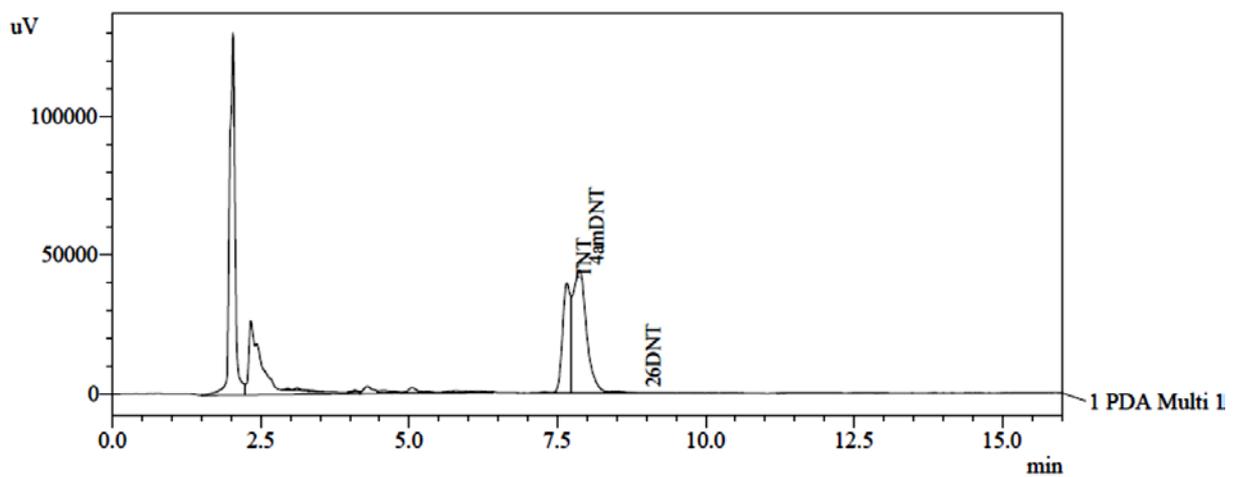
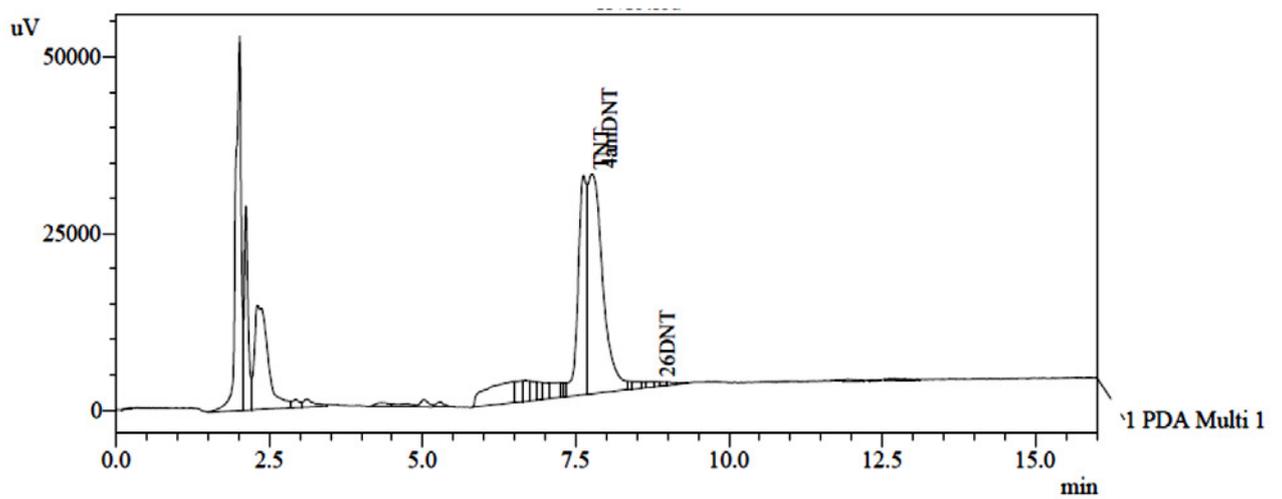
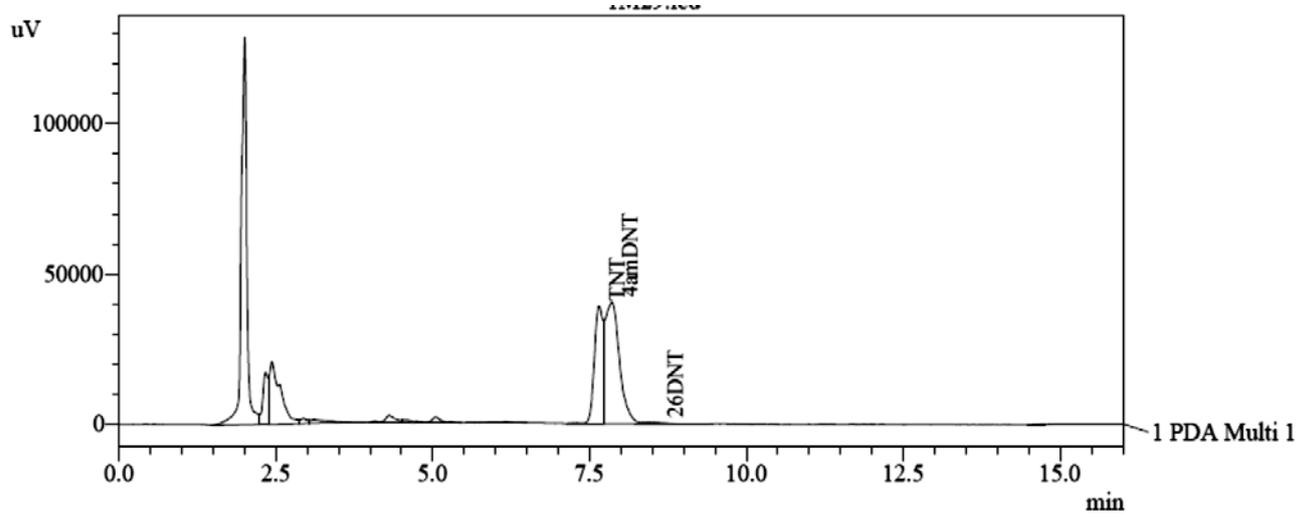


No	Concentración	Área
1	5.0000	150302.2
2	10.0000	362364.6
3	50.0000	1611413.5
4	100.000	3347475.6
5	150.000	5165412.5
6	200.000	7081261.2
7	250.000	8652527.6

No	Concentración	Área
1	5.0000	149456.6
2	10.0000	296830.1
3	50.0000	1670100.1
4	100.000	3459527.3
5	150.000	5318154.2
6	200.000	7612094.2
7	250.000	9460791.3

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

## ANEXO 6. Cromatogramas de TNT y sus subproductos de degradación



**ANEXO 7. Datos estadísticos, para comprobar la influencia de los solventes (Acetona/Acetonitrilo) en el crecimiento de las cepas en estudio T28 – T29**

<b>Prueba t para medias (cepa T28)</b>		
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	6,152654545	6,075581818
Varianza	0,123701531	0,589426424
Observaciones	11	11
Coefficiente de correlación de Pearson	0,749940037	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	0,460504681	
P(T<=t) una cola	0,327502717	
Valor crítico de t (una cola)	1,812461123	
P(T<=t) dos colas	0,655005434	
Valor crítico de t (dos colas)	2,228138852	

<b>Prueba t para medias (cepa T29)</b>		
	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	6,1474182	6,3266
Varianza	0,821063	0,2968646
Observaciones	11	11
Coefficiente de correlación de Pearson	0,6636326	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	10	
Estadístico t	-0,873703	
P(T<=t) una cola	0,2013869	
Valor crítico de t (una cola)	1,8124611	
P(T<=t) dos colas	0,4027738	
Valor crítico de t (dos colas)	2,2281389	

**ANEXO 8. Prueba Dunnet para el crecimiento a diferentes concentraciones de la cepa T28**

	Concentración (mg/L TNT)	N	Subconjunto			
			2	3	1	
Duncan(a ,b,c)	400,00	11	4,6458			
	300,00	6	4,6770			
	500,00	11	4,7385			
	100,00	11		5,1175		
	200,00	11		5,2256		
	,00	11			5,7978	
	Significación			,313	,212	1,000

**ANEXO 9. Prueba Dunnet para el crecimiento a diferentes concentraciones de la cepa T29**

	Concentración (mg/l)	N	Subconjunto				
			2	3	4	1	
Duncan (a,b)	100,00	9	6,0152				
	400,00	9	6,0560	6,0560			
	,00	9	6,0609	6,0609			
	200,00	9		6,3233	6,3233		
	300,00	9			6,4806		
	500,00	9				6,9586	
	Significación			,747	,061	,239	1,000

**ANEXO 10. Prueba Duncan para la cepa T28 en la degradación de TNT a diferentes valores de pHs**

**TNT**

Duncan<sup>a,b</sup>

PH	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
8,00	30	39,7117
6,00	24	55,5385
7,00	26	55,6139
Sig.		,086

**A**

**Tiempo=,00**

Duncan<sup>a,b</sup>

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
6,00	4	72,153
8,00	6	73,257
7,00	4	92,646
Sig.		,509

**Tiempo=24,00**

Duncan<sup>a,b</sup>

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
8,00	6	45,502
6,00	4	73,636
7,00	4	80,433
Sig.		,140

**Tiempo=48,00**

Duncan<sup>a</sup>

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
8,00	6	32,966
6,00	6	51,616
7,00	6	59,152
Sig.		,069

**Tiempo=72,00**

Duncan<sup>a</sup>

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
8,00	6	29,664	
7,00	6	42,797	42,790
6,00	6		56,850
Sig.		,071	,055

**Tiempo=120,00**

Duncan<sup>a</sup>

pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
8,00	6	17,168	
7,00	6	23,658	23,658
6,00	6		24,254
Sig.		,055	,851

**B**

Datos estadísticos del porcentaje de degradación de la cepa T28. A. Prueba de Duncan para el porcentaje de degradación en 120 horas de incubación. B. Prueba de Duncan para el porcentaje de degradación en cada uno de los tiempos muestreados.

## ANEXO 11. Pruebas Duncan para la cepa T29 en la degradación de TNT a diferentes valores de pHs

**TNT**

Duncan<sup>a,b</sup>

PH	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
8,00	26	40,356	
7,00	28		62,804
6,00	24		70,951
Sig.		1,000	,319

**A**

<b>tiempo=,00</b>	<b>tiempo=24,00</b>	<b>tiempo=48,00</b>	<b>tiempo=72,00</b>	<b>tiempo=120,00</b>
-------------------	---------------------	---------------------	---------------------	----------------------

Duncan <sup>a,b</sup>			Duncan <sup>a,b</sup>			Duncan <sup>a,b</sup>			Duncan <sup>a</sup>			Duncan <sup>a</sup>		
ph	N	Subconjunto para para alfa = 0.05	ph	N	Subconjunto para alfa = 0.05	ph	N	Subconjunto para alfa = 0.05	pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05	pH	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1			1			2			1			2
8,00	4	84,736	8,00	4	43,124	8,00	6	40,887	8,00	6	33,103	8,00	6	15,647
6,00	4	95,477	6,00	4		7,00	4	57,506	7,00	6	39,064	7,00	6	25,654
7,00	6	112,810	7,00	6	72,492	6,00	4		6,00	6		6,00	6	
Sig.		,158	Sig.		77,220	Sig.		69,728	Sig.		64,758	Sig.		60,580
			Sig.		1,000	Sig.		,197	Sig.		,516	Sig.		,208
					,693			,334			1,000			1,000

**B**

Datos estadísticos del porcentaje de degradación de la cepa T29. A. Prueba de Duncan para el porcentaje de degradación en 120 horas de incubación. B. Prueba de Duncan para el porcentaje de degradación en cada uno de los tiempos muestreados.

**ANEXO 12. Datos estadísticas que describen el comportamiento de la cepa T28 frente al TNT en diferentes temperaturas (Análisis de varianza univariante)**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: TNT

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	29441,600 <sup>a</sup>	23	1280,070	40,749	,000
Intersección	700615,315	1	700615,315	22302,865	,000
tiempo	24475,048	5	4895,010	155,824	,000
temperatura	2292,456	3	764,152	24,325	,000
tiempo *	2674,095	15	178,273	5,675	,000
temperatura					
Error	3769,643	120	31,414		
	733826,55	144			
Total	7				
Total corregida	33211,243	143			

a. R cuadrado = ,886 (R cuadrado corregida = ,865)

**Temperatura. Subconjuntos homogéneos**

Duncan<sup>a,b</sup>

temperatura	N	Subconjunto		
		1	2	3
30,00	36	63,4698		
25,00	36		69,8144	
20,00	36		71,3037	
35,00	36			74,4213
Sig.		1,000	,262	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 31,414.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 36,000

b. Alfa = 0,05.

**Pruebas post hoc**

**Tiempo**

**Subconjuntos homogéneos**

Duncan<sup>a,b</sup>

tiempo	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
168,00	24	51,3787					
120,00	24		60,2067				
72,00	24			65,1268			
48,00	24				71,2862		
24,00	24					78,6813	
,00	24						91,8342
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 31,414.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 24,000

b. Alfa = 0,05.

**Factores inter-sujetos**

	N
tiempo	,00
	24
	24,00
	24
	48,00
	24
	72,00
	24
	120,00
	24
	168,00
	24
temperatura	20,00
	36
	25,00
	36
	30,00
	36
	35,00
	36

**ANEXO 13. Datos estadísticas que describen el comportamiento de la cepa T29 frente al TNT en diferentes temperaturas (Análisis de varianza univariante)**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente:TNT

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	59028,936 <sup>a</sup>	23	2566,475	75,911	,000
Intersección	569289,995	1	569289,995	16838,458	,000
tiempo	40187,928	5	8037,586	237,736	,000
temperatura	6637,147	3	2212,382	65,438	,000
tiempo * temperatura	11137,571	15	742,505	21,962	,000
Error	3685,172	109	33,809		
Total	631980,893	133			
Total corregida	62714,108	132			

a. R cuadrado = ,941 (R cuadrado corregida = ,929)

**Factores inter-sujetos**

		N
tiempo	,00	19
	24,00	21
	48,00	24
	72,00	24
	120,00	24
	168,00	21
temperatura	20,00	34
	25,00	34
	30,00	36
	35,00	29

**Pruebas post hocTiempo Subconjuntos homogéneos**

**TNT**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

tiempo	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
168,00	21	39,5879					
120,00	24		52,5009				
72,00	24			63,5557			
48,00	24				67,2732		
24,00	21					80,0481	
,00	19						94,1591
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 33,809.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 21,989
- b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.
- c. Alfa = 0,05.

**Temperatura Subconjuntos Homogéneos**

**TNT**

Duncan<sup>a,b,c</sup>

temperatur	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
35,00	29	52,8823			
30,00	36		62,4813		
25,00	34			66,7038	
20,00	34				77,9544
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 33,809.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 33,035
- b. Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.
- c. Alfa = 0,05.