

EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL EXPLOSIVO SÓLIDO
PENTOLITA (TNT: PETN) POR CEPAS Y CONSORCIOS DEFINIDOS.

DIEGO IVÁN GUTIÉRREZ GÓMEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2015

EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL EXPLOSIVO SÓLIDO
PENTOLITA (TNT: PETN) POR CEPAS Y CONSORCIOS DEFINIDOS.

DIEGO IVÁN GUTIÉRREZ GÓMEZ

Trabajo de grado en modalidad pasantía de investigación como requisito para
optar el título de

Biólogo

Director

PhD. Fabio Augusto Roldan García

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

BUCARAMANGA

2015

Dedicatoria

A mis padres por su amor y apoyo incondicional que a pesar de la dureza de la vida permanecen firmes como grandes forjadores de mi vida. Dos grandes maestros que me enseñaron que la educación es el instrumento más valioso para ser libre.

A mis hermanos Oscar, Mario y Andrés que son mis compinches y quiénes son los que celebran mis triunfos. A Cristian que por motivos de la vida no pude disfrutar su compañía, y que está ahí supervisándome y acompañándome en todo momento, esta meta cumplida se la dedico con mucho amor.

A Silvia, mi compañera incondicional de luchas durante mi carrera y por darme las mejores lecciones de vida.

A mi abuelita Carmen Tulia Gómez, quien partió antes de verme graduado como biólogo y que me enseñó el dulce placer de amar sin fronteras ni prejuicios, a ella con mucho cariño la llevo en mi corazón, por siempre...

Agradecimientos

A Fabio Roldan, director de mi pasantía en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental USBA por haber confiado en mí un gran proyecto; por su paciencia y entendimiento durante el desarrollo de mi trabajo de grado. Gracias por los consejos y reclamos cuando fueron necesarios. A Hernán Avellaneda, porque en él encontré un libro abierto ante cualquier duda o inconveniente en mi pasantía.

A mis compañeros de USBA quienes fueron una ayuda en tiempos de duda y que en ellos no solo encontré compañeros de laboratorio sino unos grandes amigos con quienes aprendí demasiado. En especial a Yaris Eulegelo, Yaneth Vásquez y María Escobar con quien más compartí buenos momentos.

A la señora Elsy María Rodríguez y al señor Hever Martín Barajas quienes me acogieron en su hogar en Bogotá y me brindaron cariño y apoyo durante mi pasantía, gracias por esos bonitos momentos.

A mis compañeros UIS, a Omar, Natalia, Jula, Andrés, Daniel y a los amigos de limnología.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	14
1. MARCO TEÓRICO.....	18
1.1 EXPLOSIVOS.....	18
1.1.1 Pentolita	19
1.1.2 Características del 2, 4, 6 trinitrotolueno (TNT).....	20
1.1.3 Características del Pentaeritritol tetranitrato (PETN).....	21
1.2 BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR EXPLOSIVOS.....	22
1.2.1 Parámetros de seguimiento, sustrato	24
1.2.2 Nutrientes.....	25
1.3 IMPACTO Y TOXICIDAD DEL TNT Y PETN.....	25
1.4 ESTRATEGIAS PARA LA REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON EXPLOSIVOS.....	28
1.5 BIOTRANSFORMACIÓN DEL TNT	29
1.5.1 Reducción anaeróbica del grupo nitro.....	31
1.5.2 Reducción aerobia del grupo nitro.....	33
1.5.3 Desnitrificación aerobia	36
1.5.4 Desnitrificación anaerobia	37
1.5.5 Remoción del grupo metilo.....	39

1.6 BIOTRANSFORMACIÓN DEL PETN.....	40
1.6.1 Biotransformación aerobia del PETN	40
1.6.2 Biotransformación anaerobia del PETN	40
2 METODOLOGÍA.....	42
2.1 QUÍMICOS Y REACTIVOS	42
2.2 MICROCOSMOS.....	42
2.3 Métodos Analíticos	45
3 RESULTADOS	47
3.1 MICROCOSMOS.....	47
3.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	51
3.2.1 Porcentaje de recuperación de Cepas	52
3.2.2 Porcentaje de recuperación de Consorcios.....	53
3.3 IDENTIFICACIÓN DE ADNTS.....	63
4 DISCUSIÓN.....	65
5 CONCLUSIONES.....	69
6 RECOMENDACIONES.....	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71
ANEXOS.....	90

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Producción del 2, 4, 6 trinitrotolueno por nitración secuencial del tolueno. El TNT se forma a partir de los intermediarios 2,4 y 2,6-dinitrotolueno con un rendimiento >90%. Tomado de (Spain <i>et al.</i> , 2000).....	20
Figura 2. Síntesis de PETN, PETriN y PEDN a partir del pentaeritritol. Reactivos y condiciones: i) Ácido nítrico (HNO ₃) al 100% 4-5 horas a 5-10°C; ii) Hidrato de hidracina (N ₂ H ₄ • H ₂ O), dioxano y etanol 3 horas y destilar; iii) Hidrato de hidracina, dioxano y etanol 6,5 horas y destilar. Tomado de (Lange <i>et al.</i> , 2009).....	22
Figura 3. Vías reductivas de degradación del TNT y la posterior formación de moléculas derivadas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Tomado de Bernstein & Ronen (2012).	35
Figura 4. Liberación aeróbica de nitrito seguido de la dimerización del complejo hidruro con HADNTs. Tomado de Bernstein & Ronen (2012).	38
Figura 5. Eliminación del grupo metilo del TNT. Tomado de Esteve-Núñez and Ramos (1998).	39
Figura 6. Reducción de dos grupos nitro por PETN nitrato reductasa. Modificado de Binks <i>et al.</i> (1996).	41

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Características de un Booster Pentolita. Tomado de < http://exsa.net/wp-content/fichas-tecnicas/BOOSTER-PENTOLITA.pdf >.....	19
Tabla 2. Propiedades físico-químicas del TNT y PETN.....	27

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Porcentaje de recuperación de TNT (a) y PETN (b) de las cepas: P215, T52, P208, T17, P214, T21, T217, CFCB, M1C241, T228c, CFCl, M1C227, CFCC y los controles abióticos 1 y 2.	54
Gráfica 2. Recuento de UFC/mL de las cepas: T52, T21, T17, P208, P214, P215, T109, T160, P234, P227, P231, T62, T12. T41, P233 y P229.....	57
Gráfica 3. Porcentaje de recuperación de TNT (a) y PETN (b) por los consorcios: C1T2m, C1T2, C2T2m, C2T2 y C3 a C13.	60
Gráfica 4. Recuento de UFC/mL de los consorcios: C1T2, C1T2m, C2T2, C2T2m, C3 a C18.....	62

LISTA DE IMÁGENES

	Pág.
Imagen 1. Microcosmos empleados para la evaluación de la degradación de pentolita	43
Imagen 2. Unidades experimentales: A) Cambio del color de medio; B) Siembra por microgota.	48
Imagen 3. Recuento en placa por técnica de microgota. A) Consorcio C1; B) Cepa T228c; C) Control C.	49
Imagen 4. Cromatograma con los tiempos de retención (minutos) de los estándares analíticos analizados por <i>HPLC</i> por el método 8330B de la EPA (2006): A) DANTs, 3,5min; B) ADNTs, 6,5min; C) DNTs, 8,4min; D) TNT, 8,8min y E) PETN, 15,5min.	52
Imagen 5. Identificación de ADNTs. Absorbencia 254nm.....	64

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Cepas empleadas en la evaluación de la degradación de las granallas.	90
Anexo B. Consorcios definidos seleccionados para evaluar la degradación de las granallas.	92
Anexo C. Cronograma del montaje y de los eventos de muestreo para evaluar la degradación de las granallas por 36 cepas y 19 consorcios definidos.	94
Anexo D. Curvas de calibración de los estándares analíticos. Intervalo de confianza del 95%.....	95

INTRODUCCIÓN

La gran versatilidad que poseen los compuestos nitroaromáticos y ésteres de nitrato permiten que sean ampliamente utilizados en la industria para la síntesis de pesticidas, colorantes, espumas de poliuretano, explosivos, tratamientos médicos, entre otros (Russek, 1966; Symons & Bruce, 2006; Muter *et al.*, 2012). El 2, 4, 6 trinitrotolueno (TNT) es el explosivo nitroaromático más utilizado en la industria militar desde 1902 ya que brinda un gran número de aplicaciones como la fabricación de bombas, granadas y artefactos explosivos improvisados (IEDs, por sus siglas en inglés) (Lewis *et al.*, 2004; Nyanhongo *et al.*, 2005; Zhuang *et al.*, 2012).

El TNT es un explosivo altamente contaminante para el ambiente, y presenta varios problemas durante la biorremediación (Rylott *et al.*, 2010). Es producto de la nitración secuencial del tolueno por una mezcla de ácido nítrico y ácido sulfúrico produciendo mono-, di- y finalmente trinitrotolueno (Lewis *et al.*, 2004). La Environmental Protection Agency (EPA) clasifica al TNT como un agente mutagénico y carcinogénico de clase C, que puede generar problemas en la salud pública como anemia, función anormal del hígado, catarata e irritación de la piel (Won *et al.*, 1976, Honeycutt *et al.*, 1996; Frische, 2002 & 2003). Aunque la degradación de este explosivo ha sido muy estudiado, aun no se conocen todas las rutas metabólicas para su degradación (Lewis *et al.*, 2004).

Otro explosivos altamente poderoso y muy empleado es el 2,2-bis [(nitrooxy)metil]-1,3-propanediol dinitrato (pentaeritritol tetranitrato o PETN), (Zhuang, 2007; Zhuang *et al.*, 2012). El PETN también es un explosivo contaminante pero este no

ha sido tan estudiado en comparación con otros explosivos (Lewis *et al.*, 2004; Nyanhongo *et al.*, 2005; Barreto-Rodrigues *et al.*, 2009a & 2009b; Muter *et al.*, 2012; Zhuang *et al.*, 2012). El TNT y el PETN (43.75: 56.25) hacen parte de la composición del explosivo sólido comercial Pentolita y ambos están clasificados por la EPA en la lista “K” ya que son compuestos fabricados por un sector industrial específico y por el cual se dictan regulaciones para su disposición, manejo y almacenamiento (EPA, 2005).

Con el fin de mitigar los impactos generados por la liberación de estos explosivos al ambiente, ya sea por la no detonación o por el vertimiento de los residuos industriales, se han implementado diferentes estrategias de tratamiento tanto fisicoquímicas (p.ej., incineración) como biológicas (p.ej. compostaje o *biolodos*) (Lewis *et al.*, 2004; Clark & Boopathy, 2007). Teniendo en cuenta que los tratamientos fisicoquímicos implementados para el tratamiento de explosivos, presentan grandes desventajas por sus altos costos y su potencial afectación al aire, suelo y aguas subterráneas (Simini *et al.*, 1995), se hace necesario implementar métodos y sistemas biológicos, como plantas, hongos o bacterias, para la remediación de sitios impactados, lo cual permiten degradar estos compuestos de forma eficiente (Spain, 1995; Atlas & Bartha, 2002; Clark & Boopathy, 2007; Rylott *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha demostrado que la biorremediación en comparación con los métodos fisicoquímicos es una alternativa con mayores ventajas no solo en el ámbito ambiental sino también en lo social (EPA, 1993; Atlas & Bartha, 2002; Brar *et al.*, 2006).

En Colombia, el uso de explosivos ha aumentado en gran medida, no solo con fines militares, sino también para los procesos de exploración y explotación minera y petrolera, así mismo, en la construcción de obras civiles e industriales. Por esta razón también aumentaron los problemas sociales y ambientales, debido a que algunos explosivos utilizados en dichas actividades no detonan y quedan en el

suelo convirtiéndose potenciales minas para la población civil. Es importante considerar que este explosivo por ser una mezcla de dos moléculas persistentes debido a sus propiedades físicoquímicas pueden permear en el suelo y contaminar aguas subterráneas (Brar *et al.*, 2006).

Estudios sobre la biodegradación de Pentolita son pocos, aunque se resalta el estudio realizado por Georgie (2011), en donde aisló e identificó bacterias aerobias degradadoras de TNT y PETN y además identificó genes involucrados en los procesos de biodegradación. En Colombia, se han realizado estudios relacionados sobre biodegradación de explosivos en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) en la Pontificia Universidad Javeriana y en la Universidad de la Salle (Ávila, 2011; García, 2011; Roza, 2011; Roldán *et al.*, 2013).

La Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) encontró que el TNT inhibió la degradación aerobia de PETN en cultivos de enriquecimiento (García, 2011; Roldán *et al.*, 2013), los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por Moshe *et al.* (2009) en donde el TNT inhibió la degradación de los explosivos hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX) y el octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina (HMX) presentes en la mezcla. Por otro lado, cuando cada molécula se analizaba por separado se observaba una rápida y marcada biodegradación. Finalmente, observaron que la presencia del TNT en la biodegradación del RDX y HMX disminuía la biomasa microbiana y la diversidad a medida que la concentración del TNT aumentaba en el medio. Moshe *et al.* (2009) al final concluye que el mecanismo de inhibición provocado por el TNT involucra un efecto citotóxico sobre la población microbiana degradadora de RDX y HMX. (Nativ & Adar, 2005).

El presente estudio se enfocó en continuar la evaluación de la biodegradación de explosivo sólido Pentolita por 36 cepas bacterianas y 19 consorcios definidos. El estudio se inició hace 939 días. Las cepas y consorcios fueron seleccionadas por su capacidad para degradar alguno de los explosivos (TNT/PETN) en medio líquido. Los consorcios definidos fueron establecidos por el origen de las cepas, método de aislamiento y sus características como el porcentaje de transformación, tasa de transformación, tasa de crecimiento, máximo crecimiento y producción de surfactantes.

Esta investigación hace parte del proyecto de investigación “Diseño de un sistema con microorganismos degradadores de PENT y TNT incorporado en el explosivo Pentolita” financiado por la Industria Militar de Colombia, Indumil. El monitoreo para la biodegradación de la pentolita se realizó por medio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC del inglés, *High Performance Liquid Chromatography*) empleando el método 8330B EPA (2006).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 EXPLOSIVOS

Según la EPA (2001), un explosivo se define como una sustancia o mezcla de sustancias, capaz por reacción química o activación física o química, de producir gas liberando grandes cantidades de energía en forma de calor y presión. Los explosivos son conocidos como materiales de alta energía, y en general contienen grandes cantidades de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno (Spain *et al.*, 2000; Agrawal, 2010; Georgie, 2011). Los explosivos a diferencia de los químicos, detonan en vez de quemarse; una detonación es una reacción química que sucede a gran velocidad (>1 km/s aproximadamente) (Agrawal & Hodgson, 2007; Georgie, 2011). Durante la detonación ocurre una rápida reacción de óxido-reducción en la cual los enlaces constituidos entre el oxígeno y el nitrógeno se liberan para formar moléculas como el nitrógeno (N_{2g}), hidrógeno (H_{2g}), agua (H_2O), monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO_2) (Agrawal & Hodgson, 2007).

Los explosivos son clasificados con base en sus velocidades de detonación, como explosivos primarios, secundarios y terciarios, siendo los primarios los explosivos más sensibles para detonar, por tanto se utilizan para activar explosivos tanto secundarios como terciarios ya que sus sensibilidades para detonar son más bajas y son los explosivos que hacen parte principal de la carga (Agrawal & Hodgson, 2007).

1.1.1 Pentolita

Según Indumil (2015), la pentolita es un explosivo constituido por TNT y PETN (50:50) y utilizado para fines militares y civiles. Es un explosivo de alta potencia, sensibilidad y seguridad y es destinado a la iniciación de agentes de voladura ya que actúa como iniciador de columna para explosivos de baja sensibilidad como ANFO, INDUGEL AV 800 y emulsiones explosivas; con el propósito de que la voladura alcance la máxima velocidad de detonación (**Tabla 1**). La Pentolita que se comercializa en Colombia se vende bajo el nombre Pentofex® (Indumil, 2015).

Tabla 1 Características de un Booster Pentolita.

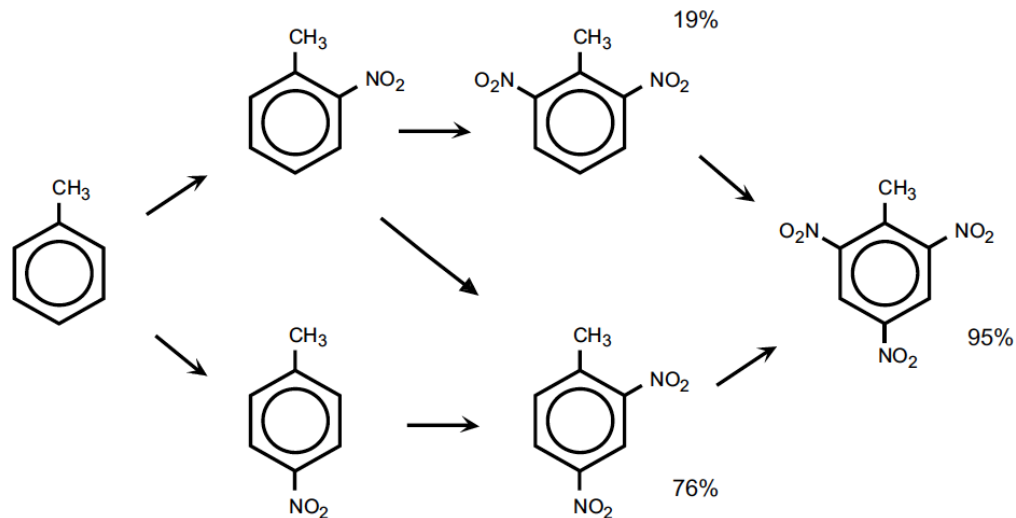
Propiedad	Valor
Densidad (g.cm ³⁻¹)	1.62 ± 3%
Velocidad (m.s ⁻¹)	7,200 ± 3%
Presión de detonación (Kbar)	216
Energía (Kj.Kg ⁻¹)	5,598
Resistencia al agua	Excelente
Volumen de gases (L.Kg ⁻¹)	692
Potencia relativa al ANFO	1.50 Peso 3.12 Volumen

Tomado de <<http://exsa.net/wp-content/fichas-tecnicas/BOOSTER-PENTOLITA.pdf>>.

1.1.2 Características del 2, 4, 6 trinitrotolueno (TNT)

El TNT es el explosivo nitroaromático más ampliamente utilizado en el planeta (Spain *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2004). El TNT es el producto final de la nitración secuencial del tolueno y su síntesis se realiza de la siguiente manera: la primera nitración produce 2-nitrotolueno y 4-nitrotolueno en cantidades casi iguales (**Figura 1**). La segunda nitración produce 76% para el 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT), 19% para el 2,6-dinitrotolueno (2,6-DNT) y el 5% restante para otro tipo de isómeros. La tercera tiene una eficiencia del 95% y al finalizar el TNT se encuentra mezclado con más de cuatro isómeros y debe purificarse con sulfito sódico (Na_2SO_3) (Parker, 1932).

Figura 1. Producción del 2, 4, 6 trinitrotolueno por nitración secuencial del tolueno. El TNT se forma a partir de los intermediarios 2,4 y 2,6-dinitrotolueno con un rendimiento >90%.



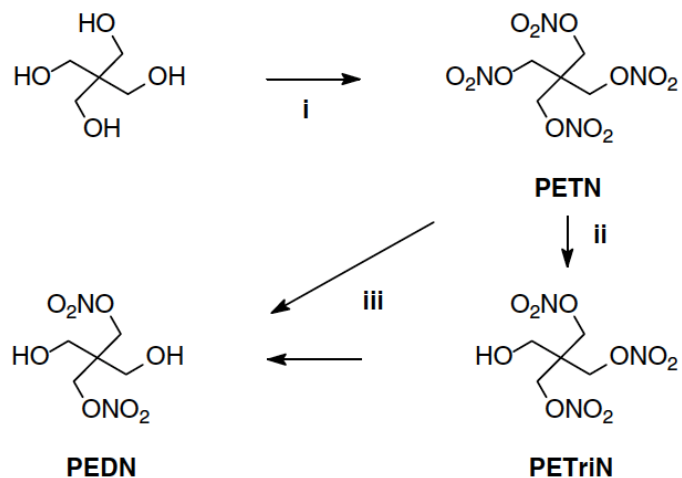
Tomado de (Spain *et al.*, 2000).

1.1.3 Características del Pentaeritritol tetranitrato (PETN)

El 2,2-bis [(nitrooxi) metil]-1,3-propanodiol dinitrato (tetranitrato de pentaeritritol; PETN), es un éster nitrato similar a otros ésteres de nitrato derivados de alcoholes alifáticos como el glicerol trinitrato (GTN), El PETN, es producto de la nitración secuencial del pentaeritritol con ácido nítrico (**Figura 2**) (Gorontzy *et al.*, 1994, Hess, 1997). Se utiliza como detonador ya que es un explosivo primario por su alta sensibilidad, sin embargo, para poderlo manipular en muchos casos es necesario estabilizarlo y por esta razón se utiliza en mezcla con el TNT en el explosivo Pentolita (García, 2014); además, en mezcla con el explosivo hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX) se produce el explosivo plástico Semtex y se elaboran también artefactos explosivos improvisados (IEDs) (Ballesteros Rueda *et al.*, 2006; Lange *et al.*, 2009).

El PETN y sus moléculas precursoras (PETriN, PEDN y PEMN) son utilizadas en concentraciones muy bajas para tratar enfermedades coronarias, como el control de la angina (Binks *et al.*, 1996), estos actúan como moléculas vasodilatadoras, y su potencia depende de la cantidad de grupos nitro que el pentaeritritol posea, siendo el PETN la molécula con mayor capacidad de vasodilatación (Lange *et al.*, 2009). La estructura de los enlaces éster nitrato del PETN rara vez se encuentran en la naturaleza (White *et al.*, 1996), debido a que es una molécula sintetizada (xenobiótica), presenta grandes desafíos para la biorremediación, de hecho, según el Departamento de Defensa de E.E.U.U. (2004) es considerado una molécula recalcitrante y de bajo conocimiento sobre su movilidad en el ambiente.

Figura 2. Síntesis de PETN, PETriN y PEDN a partir del pentaeritritol. Reactivos y condiciones: i) Ácido nítrico (HNO₃) al 100% 4-5 horas a 5-10°C; ii) Hidrato de hidracina (N₂H₄ • H₂O), dioxano y etanol 3 horas y destilar; iii) Hidrato de hidracina, dioxano y etanol 6,5 horas y destilar.



Tomado de (Lange *et al.*, 2009).

1.2 BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR EXPLOSIVOS

El uso indiscriminado y liberación accidental de químicos orgánicos e inorgánicos al ambiente, ha ocasionado la contaminación de los ecosistemas. Es por tanto, que desde hace más de casi cinco décadas se proponen y se evalúan estrategias para la remoción y degradación de los residuos producto de la síntesis de compuestos químicos de la industria. La biorremediación emplea sistemas biológicos (plantas, hongos y bacterias) para la remoción o degradación de los contaminantes, estas tecnologías no requieren grandes inversiones, siendo la

biorremediación un tratamiento más costo-eficiente y socialmente más amigable (Spain *et al.*, 2000).

La remediación microbiana ha sido el proceso biotecnológico más estudiado en la actualidad (Srivastava *et al.*, 2014). Según Boopathy (2000) la biorremediación se define como una estrategia que utiliza microorganismos para destruir, o reducir la concentración de residuos peligrosos en un sitio contaminado. Las bacterias y los hongos debido a su capacidad intrínseca de adaptación al cambio son capaces de crecer empleando diferentes compuestos contaminantes como aceptores finales de electrones o como fuente principal de carbono, nitrógeno o fósforo. Estos procesos dependen de las condiciones del ambiente y de las características de las bacterias. Estudios metagenómicos soportan esta idea revelando que la ecología microbiana como en las bacterias, trabajan de forma eficiente si estas actúan en comunidad (p.e. consorcios) (Srivastava *et al.*, 2014).

En la biorremediación se aplican los principios biológicos de las diferentes especies, para que la cinética y la efectividad de los procesos de biodegradación puedan ser mejoradas continuamente. Incluso los compuestos recalcitrantes pueden ser exitosamente biodegradados utilizando reactores especiales en donde se controlan los requerimientos nutricionales, oxígeno, temperatura y pH para el desempeño óptimo de las rutas metabólicas para el catabolismo de dicho sustrato (Hooker, 1917; Srivastava *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta lo anterior y utilizando la ley del mínimo de Liebig el cual afirma que el crecimiento no es controlado por la cantidad total de recursos que son disponibles, sino por el recurso más escaso (factor limitante), se debe condicionar el ambiente para promover y direccionar el metabolismo, siendo la biorremediación una tecnología que es capaz en teoría de tratar un amplio rango de contaminantes químicos (Hooker, 1917).

1.2.1 Parámetros de seguimiento, sustrato

El término sustrato se define como la fuente de alimento que se provee a los microorganismos para su degradación (Hooker, 1917); Por lo cual, para la biorremediación cualquier compuesto contaminante es definido como sustrato. Este sustrato debe ser biodegradable para cualquier uso por parte del microorganismo (Hooker, 1917; Srivastava *et al.*, 2014). Ciertos compuestos pueden ser extremadamente recalcitrantes y en algunos casos los metabolitos secundarios obtenidos pueden llegar a ser más tóxicos. Por esta razón es necesario monitorear y ajustar las condiciones ambientales, lo cual se hace inicialmente necesaria una rigurosa revisión de la literatura ya que la biodegradabilidad de un compuesto depende de su estructura química, concentración, bioresistencia y toxicidad (Hooker, 1917; Srivastava *et al.*, 2014). La toxicidad de un compuesto químico debe referirse como una dosis, porque puede determinar si el compuesto químico puede representarse como un sustrato biodegradable o como un veneno para el organismo. Algunas veces la concentración toxica del compuesto puede disminuirse con un pre-tratamiento (dilución, adición de carbono, aumento de los sustratos, bioaumentación) o una mezcla de ellos (Srivastava *et al.*, 2014). Estas medidas correctivas son fáciles de realizar en condiciones de laboratorio pero en procesos a gran escala o *in situ* pueden llegar a ser muy complicadas (Spain, 2000; Spain *et al.*, 2000; Srivastava *et al.*, 2014).

1.2.2 Nutrientes

Existen elementos que son necesarios en grandes cantidades para la síntesis celular como el nitrógeno, carbono y el fósforo. En algunas plantas de tratamiento de aguas industriales se añaden ácido fosfórico y amonio líquido para proveer al medio de estos elementos esenciales. Además, otros elementos aparte del nitrógeno y fósforo son necesarios pero en menores cantidades, estos son: azufre, potasio, magnesio, calcio y elementos metálicos en los que se incluye oro, hierro, boro y otros elementos traza (Hooker, 1917). Un inadecuado balance adición de nutrientes puede llevar a la ralentización de las tasas de crecimiento y en la restricción del metabolismo de dichos compuestos, llevando a una tasa de remoción del sustrato significativamente bajas (Spain, 2000). Elementos esenciales como el calcio, hierro, boro y otros metales pueden encontrarse en la mayoría de los suelos, pero se recomienda que es más prudente asumir que estos micronutrientes no se encuentran en el sitio y añadirlos para garantizar óptimas condiciones para el crecimiento bacteriano (Srivastava *et al.*, 2014).

1.3 IMPACTO Y TOXICIDAD DEL TNT Y PETN

Diferentes estudios han demostrado los efectos tóxicos del TNT para humanos (Tabla 2), El TNT causa daños renales, hepatitis, vomito, dermatitis, anemia, necrosis hepática, cirrosis, desarrollo incompleto o defectuoso de las líneas celulares de la médula ósea (anemia aplásica), anemia hemolítica y

metahemoglobinemia (Fernando *et al.*, 1990; Marshall, 1932; Rosenblatt *et al.*, 1991). Durante la primera guerra mundial, los trabajadores que fueron expuestos al TNT durante su fabricación en las plantas de municiones se conocieron como "canarios" ya que su coloración en su piel (amarillo) era debido a la intoxicación dérmica con TNT (Rosenblatt *et al.*, 1991). EL TNT posee una Dosis Letal media (DL_{50}) de 0,8 a 1,3g.kg⁻¹ en ratones (Johnson *et al.*, 2000). En organismos en general, como en gusanos, plantas y ratones es un fuerte agente mutagénico. A diferentes niveles tróficos en general, causa efectos tóxicos en sus sistemas reproductivos, sistemas inmunes, reducción de la biomasa y pérdida de la equitatividad en las comunidades microbianas. Además, el uso del suelo se ve alterado, perdiendo así su propósito agropecuario, industrial, recreativo o residencial (Drzyzga *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2000; Letzel *et al.*, 2003; Best *et al.*, 2008; Erkelens *et al.*, 2012).

El PETN por sus características recalcitrantes, xenobióticas y el riesgo para la salud del hombre y el ambiente fue agregado al Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP's) (Durán *et al.*, 2013), el contacto por manipulación o exposición a esteres de nitrato causan, nauseas, vomito, espasmos abdominales y metahemoglobinemia, el cual reduce la capacidad de transportar el oxígeno por los eritrocitos (Stokinger *et al.*, 1982), EL PETN posee una Dosis Letal media (DL_{50}) de 1,660g. kg⁻¹ en ratones (Titanobel, 2010). Sin embargo Quinn *et al.* (2009) muestra en su estudio con ratones que el PETN no presenta efectos negativos en el desarrollo embrionario o en los sistemas reproductivos y que solo el tratamiento afectó el consumo de alimentos y el peso de los roedores, pero concluye que esta afectación pudo deberse a la gran variación en la dosificación de los alimentos de los ratones. Este estudio además sugiere que es poco probable que el PETN se transporte o se bioacumule en el

ambiente debido a su baja solubilidad en agua, tasas de degradación y su coeficiente Octanol/Agua (**Tabla 2**).

Tabla 2. Propiedades físico-químicas del TNT y PETN.

Propiedad Físico-química	TNT	PETN
Formula molecular	$C_7H_5N_3O_6$	$C_5H_8N_4O_{12}$
Peso molecular (g.mol ⁻¹)	227,1	316,17
Punto de fusión (°C)	80-82	141,3-143,3
Densidad (g.cm ³⁻¹)	1,65	1,78
Solubilidad en agua a 25°C (mg.l ⁻¹)	120-130	43
Constante de Henry (Atm.m ³ .mol ⁻¹)	$4,57 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-11}$ - $1,7 \times 10^{-9}$
Presión de vapor a 25°C (mmHg)	$1,99 \times 10^{-4}$	$1,34 \times 10^{-11}$ - $1,035 \times 10^{-10}$
Coeficiente Octanol/Agua (Log K _{ow})	1,6-1,86	1,61-3,71
Apariencia	Hojuelas amarillas	Cristales blancos tetragonales
Olor	Almendras amargas	Inodoro

Por otro lado, la no detonación de esta mezcla de explosivos (TNT: PETN) genera un alto riesgo para la población civil dado que la Pentolita puede permanecer activa en el suelo y explotar en cualquier momento. Además, el explosivo puede infiltrarse en el suelo y contaminar grandes volúmenes de agua subterránea y movilizarse a zonas donde el explosivo no fue utilizado, extendiéndose así el riesgo a poblaciones aledañas y aumentando el riesgo ya que puede ser consumido por los humanos por la ingesta del agua contaminada (Zhuang, 2007; Georgie, 2011; Zhuang, 2012).

1.4 ESTRATEGIAS PARA LA REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON EXPLOSIVOS

Para la selección de la estrategia de remediación debe tenerse en cuenta diferentes aspectos: características físico-químicas del compuesto, toxicidad del compuesto, tipo de suelo, acceso al sitio, nivel de riesgo para los humanos, costos, infraestructura, entre otros. De esto depende la selección del proceso más eficiente y específico para que cada caso, ya que no existe un proceso tecnológico generalizado que actúe para todos los contaminantes y ambientes (Georgie, 2011; García, 2014).

Según Boopathy (2000) las diferentes tecnologías para la biorremediación pueden clasificarse en dos grandes clases: Tratamientos *ex situ* e *in situ*. En los tratamientos *ex situ* es necesaria la remoción del área contaminada y su traslado a sitios especializados para su remediación. Caso contrario, con los tratamientos *in situ* en donde los procesos son aplicados en el sitio afectado:

- Bioaumentación, es la adición de cultivos bacterianos y o fúngicos a un medio contaminado; puede utilizarse *ex situ* e *in situ*.
- Bioestimulación, es la adición o modificación del factor limitante de la biodegradación.
- *Bioventing*, Adición de oxígeno por medio de tuberías en el suelo para estimular la actividad microbiana.
- Biorremediación intrínseca (proceso que es parte de la atenuación natural), es aquella en la que no se interviene el sitio contaminado, permitiendo que los

procesos de oxidación-reducción se lleven a cabo sin manipulación alguna de las condiciones del sitio, solo se debe monitorearse.

- **Biorreactores**, son elementos que reproducen las condiciones nutricionales, temperatura y pH para que los microorganismos degraden el sustrato eficientemente.
- **Biofiltros**, Son filtros microbianos para la reducción de emisiones contaminantes al aire.
- **Compostaje**, Proceso en el que se emplean residuos orgánicos mezclados con el contaminante los cuales son susceptibles a reacciones cometabólicas.
- *Pump and treat*, Es el bombeo de agua que es tratada y es de vuelta inyectada al sistema.
- *Land farming*, El suelo contaminado se extiende como en los cultivos y se realiza arado, permitiendo el ingreso de oxígeno al sistema.
- *Biopilas*, Es una tecnología de biorremediación ex situ en la cual el suelo contaminado es extraído y dispuesto en un área de tratamiento o piscina previamente excavada para su descontaminación con microorganismos. Se utiliza cuando la sustancia contaminante es demasiado volátil como para ser tratada con la técnica de *landfarming*.

1.5 BIOTRANSFORMACIÓN DEL TNT

El TNT puede ser transformado bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas teniendo cada proceso sus propias vías metabólicas de degradación. La biodegradación del TNT principalmente involucra la reducción o eliminación de uno o más de los grupos nitro, mientras que el anillo aromático no

sufre ninguna alteración en su estructura molecular (Hawari *et al.*, 2000; Zhuang, 2012). Esto se debe a la estabilidad del anillo aromático, la cual es resultado de las propiedades de los grupos nitro, quienes por ser fuertes aceptores de electrones, crean una alta deficiencia de electrones ya que atraen los electrones π del anillo, provocando que el anillo tenga una carga positiva y adquiera características electrofílicas mientras, por otro lado, los grupos nitro son polarizados debido a que el oxígeno es más electronegativo que el nitrógeno ocasionando que la carga parcialmente positiva del nitrógeno en combinación con la del oxígeno permiten que el grupo nitro y el anillo aromático sean más susceptibles a reducción por nitroreductasas o hidruro transferasas en vez de reacciones oxidativas (Rieger & Knackmuss 1995; Esteve-Nuñez *et al.*, 2001).

Por lo general, la biotransformación del TNT es iniciada por la reducción de los grupos nitro o el rompimiento del enlace C-NO₂ y posterior desnitrificación como también pueden ocurrir aeróbicamente como anaeróbicamente teniendo cada proceso sus propias vías metabólicas de degradación (Stenuit *et al.* 2005; Stenuit & Agathos, 2010). A menudo la reducción del grupo nitro se sugiere que también puede ocurrir de forma cometabólica. El cometabolismo es la degradación accidental de la molécula por acción de enzimas inespecíficas durante la degradación de un sustrato primario. El cosustrato o cometabolito no aporta energía, carbono, nitrógeno o algún beneficio, por lo cual es incapaz de mantener la replicación celular. El cosustrato no tiene la capacidad de inducir la síntesis de las enzimas involucradas en su transformación, es el sustrato quien induce la síntesis enzimática para el catabolismo de los compuestos (Hawari *et al.*, 2000; Stenuit *et al.* 2005). Sin embargo, Esteve-Núñez *et al.* (2000), demuestra que ya que los microorganismos no pueden beneficiarse energéticamente por esta vía reductiva, pueden utilizar estos cometabolitos como aceptores finales de electrones en las cadenas respiratorias, así como lo sustenta con su estudio

realizado con *Pseudomonas sp.* cepa JLR11. Stenuit *et al.* (2005) expone que en contraste al cometabolismo vía reductiva, la desnitrificación del grupo nitro permite a los microorganismos beneficiarse utilizando el nitrógeno originario del grupo nitro y que queda biodisponible para incorporación por la célula para las reacciones anabólicas. En estos procesos normalmente el grupo metil no desempeña un importante papel en la degradación, sino los grupos nitro quienes generan el fuerte carácter electrofílico a la molécula (Hawari *et al.*, 2000; Spain, 2000; Stenuit *et al.* 2005).

1.5.1 Reducción anaeróbica del grupo nitro

La vía metabólica de transformación del TNT más común es la reducción secuencial de sus grupos nitro (Figura 3), atreves de la transferencia por pasos de pares de electrones para la formación de derivados mononitroso, monohidroxilamino y monoamino del TNT (Spain, 2000). La reducción de los derivados monoaminos puede posteriormente producir derivados diaminos, por muchas cepas y un gran grupo de enzimas: nitrorreductasas, aldehído oxidasas, amida di-hidrofílica deshidrogenasa, diaforasas, hidrogenasas, xantina oxidasa, la citocromo b5 reductasa y monóxido de carbono deshidrogenasa (Esteve-Núñez *et al.*, 2000; Hawari *et al.*, 2000; Stenuit *et al.* 2005). También, se ha observado una reducción del grupo nitro por una vía simple de transferencia de un solo electrón, generando inicialmente radicales nitro-aniones y luego su correspondiente derivado nitroso; estos son catalizados por enzimas nitroreductasas oxígeno-sensibles (Spain, 2000; Nyanhongo *et al.*, 2005).

Las enzimas de este grupo convierten los grupos nitro a hidroxilaminas o aminas por la adición de pares de electrones donados por la reducción de nucleótidos de pirimidina como NADPH o NADH (Nyanhongo *et al.*, 2005). La alta reactividad de estos derivados nitroso e hidroxilamino son responsables de la toxicidad atribuida a los compuestos nitroaromáticos, por que las moléculas derivadas pueden llegar a ser más peligrosas que las moléculas parentales (Spain, 2000). Debido a la alta deficiencia de electrones de los grupos nitro del TNT, su degradación en su mayoría se da por procesos reductivos más que oxidativos (Vorbeck *et al.*, 1998).

El producto resultante de la reducción de los tres grupos nitro del TNT es el triaminotolueno (TAT), que exclusivamente se genera en condiciones anaerobias (Figura 3), donde el potencial redox es inferior a -200mV (Hawari *et al.* 2000; Spain *et al.*, 2000). Pocos estudios se han realizado con el fin de identificar las subsiguientes transformaciones del TAT, pero cabe destacar el estudio realizado por Funk *et al.* (1993), en su estudio identificaron la formación de *para*-hidroxitolueno (*p*-cresol) y metilfloroglucinol (2, 4, 6-trihidroxitolueno) en cultivos mixtos sugiriendo que estos productos fueron formados a partir del TAT (figura 3). Hawari *et al.*, (1998) identifica la transformación del TAT a derivados azo y tetra aminos en un lodo anaerobio que posteriormente no se encontraron en la solución y el que se sospechó que pudo deberse a su polimerización (Hawari *et al.*, 1998). Boopathy & Kulpa (1992), identificaron tolueno como producto de la degradación del TNT por *Desulfovibrio sp.* cepa B, la ruta involucra propuesta fue por vía de eliminación reductivo de los grupos nitro pero esta ruta nunca fue verificada. Los derivados amino y principalmente el triaminotolueno presentan una alta sorción incluso más que el TNT mismo, pero posee una menor toxicidad y mutagenicidad (Drzyzga *et al.*, 1995; Lachance *et al.*, 1999; Spain, 2000; Neuwoehner *et al.*, 2007).

Hughes *et al.* (1998) indica que la reducción anaerobia del TNT no produce estrictamente TAT, sino también pueden generarse monohidroxilaminas parcialmente reducidos a dihidroxilaminas que luego pueden ser transformados a amino-fenoles por vía rearreglo de Bamberger del 2,4-dihidroxilamino-6-nitrotolueno, esta ruta fue observada en extractos celulares de *Clostridium acetobutylicum* (Figura 3). Estos mismos resultados se obtuvieron con la enzima monóxido deshidrogenasa purificada a partir de *Clostridium thermoaceticum* (Huang *et al.* 2000).

1.5.2 Reducción aerobia del grupo nitro

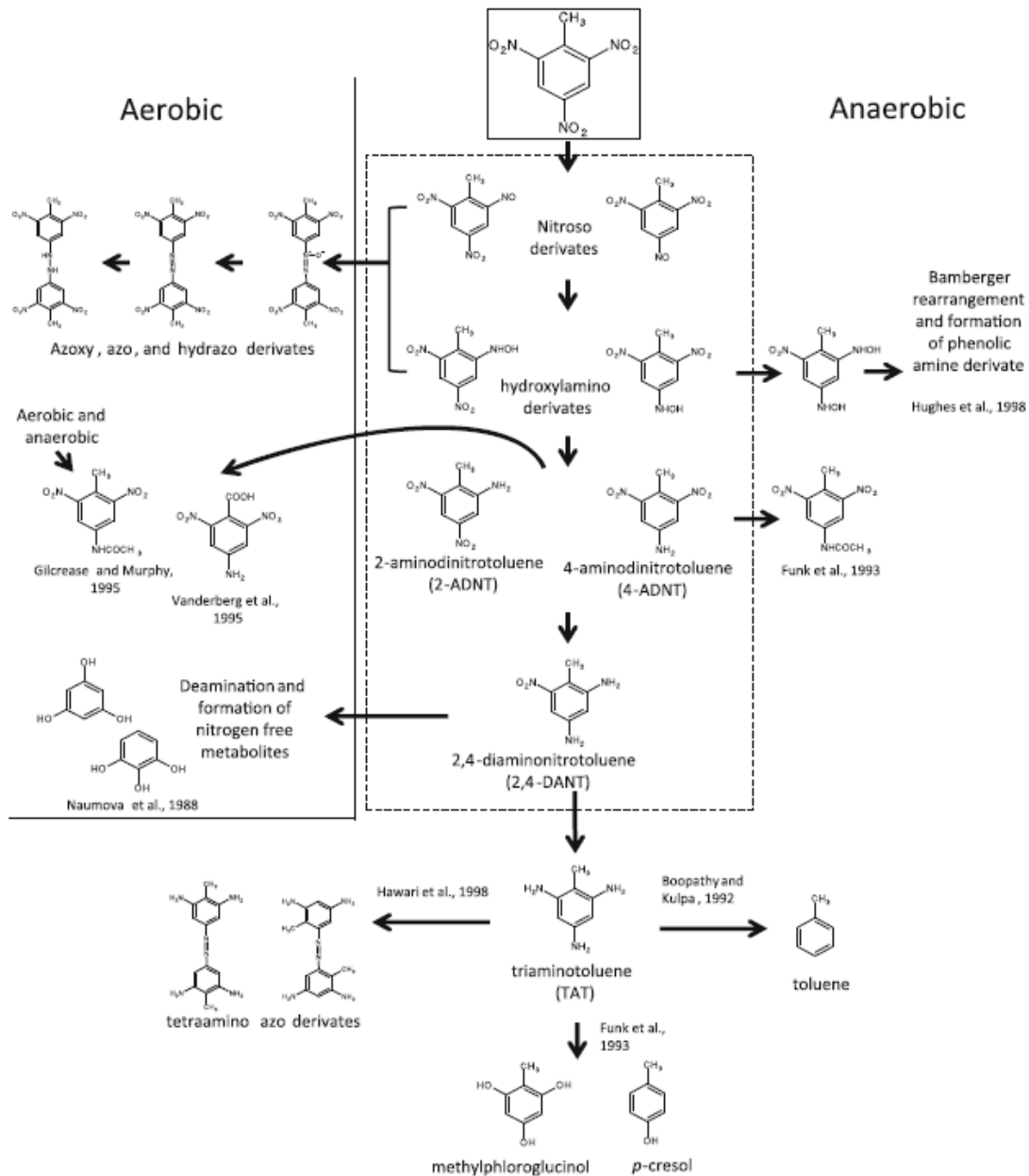
Moléculas intermediarias de la degradación reductiva del TNT también pueden ser identificadas en condiciones aerobias. Bajo condiciones aerobias los derivados amino puede sufrir desaminación y ser transformados a ácido benzoico o derivados N-acetilamino (Naumova *et al.*, 1988; Gilcrease & Murphy, 1995; Vanderberg *et al.*, 1995) aunque los derivados aminoácidos se acumulen en condiciones aerobias, no pueden interpretarse como metabolitos sin salida o "*dead ends*" ya que no son tóxicos para el microorganismo (Stenuit & Agathos, 2010).

Esteve-Núñez *et al.* (2001) indica que bajo estas condiciones no se produce TAT y los intermediarios mono y diaminonitrotolueno son acumulados en el medio. Sin embargo, se ha demostrado que en presencia de oxígeno los intermediarios nitros e hidroxilamino pueden continuar una vía de transformación abiótica alternativa para dar a la formación de azoxitetranitrotoluenos (**Figura 3**) (McCormick *et al.* 1976; Haidour y Ramos 1996). George *et al.*, en (2001) determinó, de acuerdo a

sus bioensayos realizados con *Salmonella* que dichos compuestos causan una tasa de mutación mucho más alta que el TNT y que además pueden según Moshe *et al.* (2009) inhibir la degradación de los explosivos RDX y HMX quienes pueden coexistir con el TNT.

Con base en lo anterior, sería altamente riesgoso encontrar en el ambiente estos derivados azoxi. Sin embargo, se han realizado diferentes experimentos en los cuales es posible la degradación de estos derivados, como es el estudio de Hawari *et al.* (1999) en el que en experimentos de microcosmos se utilizó el hongo *Phanerochaete chrysosporium* o cultivos mixtos (Moshe *et al.*, 2009), observando que la degradación del azoxitetranitrotoluenos puede llevarse a cabo en pocas semanas indicando así la no-recalcitrancia del compuesto y la formación de compuestos de tipo azo como el azotetranitrotolueno que a su vez forma derivados hidrazo (hidrazotetranitrotolueno), la sorción de los compuesto azoxi puede ocurrir pero en cantidades traza (Moshe *et al.*, 2009).

Figura 1. Vías reductivas de degradación del TNT y la posterior formación de moléculas derivadas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.



Tomado de Bernstein & Ronen (2012).

1.5.3 Desnitrificación aerobia

Diferentes estudios han indicado que bajo condiciones aerobias la desnitrificación del TNT se lleva a cabo vía adición nucleofílica de un ión hidruro al anillo aromático con presencia de NADPH y la posterior formación del complejo hidruro-Meisenheimer que luego puede ser transformado al complejo dihidruro-Meisenheimer con la subsecuente liberación de un grupo nitro (Lenke & Knackmuss, 1992; Vorbeck *et al.*, 1994; Rieger & Knackmuss, 1995; French *et al.*, 1998; Pak *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2004; Stenuit *et al.*, 2006; Van Dillewijn *et al.*, 2008; Wittich *et al.*, 2008; Chien *et al.*, 2014). La formación del complejo Meisenheimer promueve la desnitrificación del TNT (Figura 4) y fue reportada por Vorbeck *et al.* en 1994 con la cepa *Mycobacterium sp.* HL 4-NT-1 (Vorbeck *et al.*, 1994). Muchas de estas enzimas hidruro transferasas de tipo II son capaces de realizar la adición nucleofílica de los iones hidruro (Van Dillewijn *et al.*, 2008) como la reductasa xenobiótica B (XenB) aislada de *Pseudomonas fluorescens* I-C (Pak *et al.*, 2000), N-etilmaleimida (NEM) reductasa de *Escherichia coli* (Williams *et al.*, 2004) y la Pentaeritritol tetranitrato reductasa a partir de *Enterobacter cloacae* PB2 (French *et al.*, 1998).

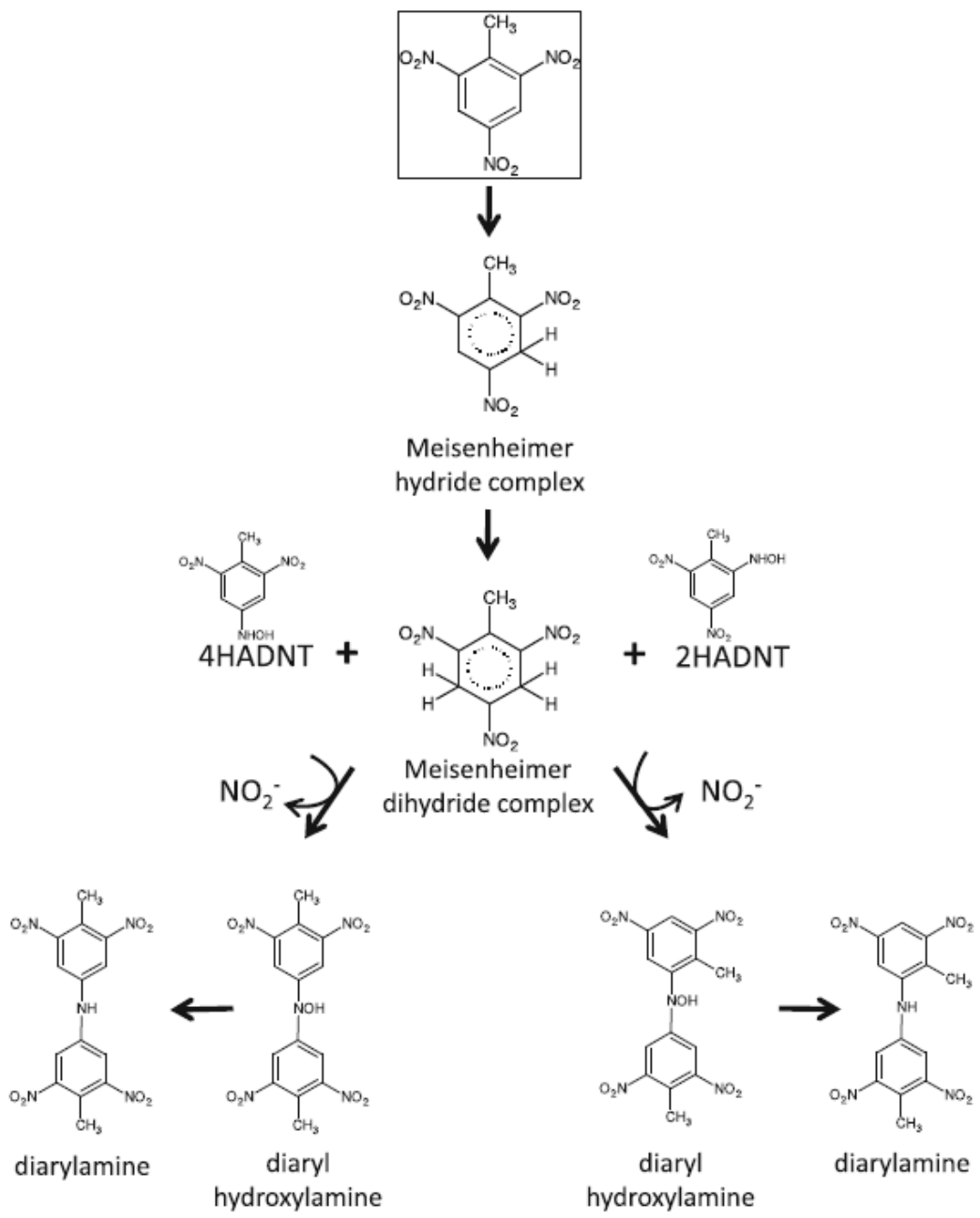
Rieger & Knackmuss (1995) sugieren que una vez el complejo Meisenheimer es formado, se pierde la aromaticidad del anillo y solo su aromaticidad es restaurada una vez se libere el nitrito de la molécula, esta hipótesis fue adoptada por Kim & Song (2000) para explicar la detección de 2,4-dinitrotolueno como producto derivado del complejo Meisenheimer del TNT durante la incubación con el hongo *Irpex lacteus*. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que la liberación de nitrito del TNT se realiza después de la dimerización del complejo

dihidruro con la coexistencia de HADNTs (**Figura 4**), para la formación de diarilaminas y nitritos (Pak *et al.*, 2000; Stenuit *et al.*, 2006;. Van Dillewijn *et al.*, 2008; Wittich *et al.*, 2008), la condensación de los diarilamidas se dan por reacciones químicas más que por reacciones enzimáticas y además el nitrito liberado al medio proviene del complejo dihidruro-Meisenheimer en lugar de los HADNTs (Wittich *et al.*, 2009).

1.5.4 Desnitrificación anaerobia

Esteve-Núñez & Ramos (1998) observaron que en condiciones anaerobias, la desnitrificación del TNT se lleva a cabo de forma similar a la desnitrificación aerobia, esta desnitrificación del grupo nitro en el anillo aromático puede ocurrir en ausencia de una fuente alternativa de nitrógeno. Esteve-Núñez & Ramos implementaron la cepa *Pseudomonas sp.* JLR11 para estudiar el metabolismo del TNT, en el que se utilizó como única fuente de nitrógeno en condiciones de anaerobiosis, observando que la cepa incorporó en sus células el 85% del nitrógeno proveniente del TNT degradado, pero esta ruta metabólica involucrada en dicha transformación, aún no ha sido definida (Esteve-Núñez & Ramos, 1998).

Figura 2. Liberación aeróbica de nitrito seguido de la dimerización del complejo hidruro con HADNTs.

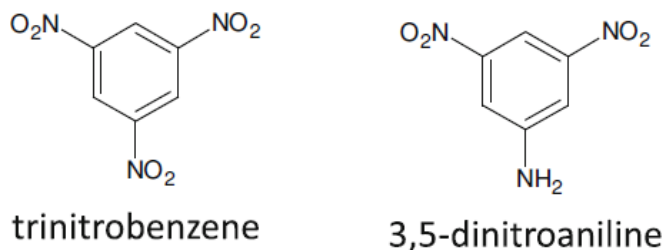


Tomado de Bernstein & Ronen (2012).

1.5.5 Remoción del grupo metilo

Poco estudios indican la remoción del grupo metilo en las reacciones de degradación del TNT, ya que no es normal que esta eliminación suceda en la primeras etapas de catabolismo del TNT; Sin embargo, Esteve-Núñez & Ramos (1998) en su estudio, diferente de los metabolitos de la degradación anaerobia de TNT, identificó además 1,3,5-trinitrobenzeno y 3,5-dinitroanilina (**Figura 5**), concluyendo así la remoción de grupo metilo puede darse en similares condiciones como las descritas en el apartado anterior (Esteve-Núñez & Ramos, 1998).

Figura 5. Eliminación del grupo metilo del TNT.



Tomado de Esteve-Núñez & Ramos (1998).

1.6 BIOTRANSFORMACIÓN DEL PETN

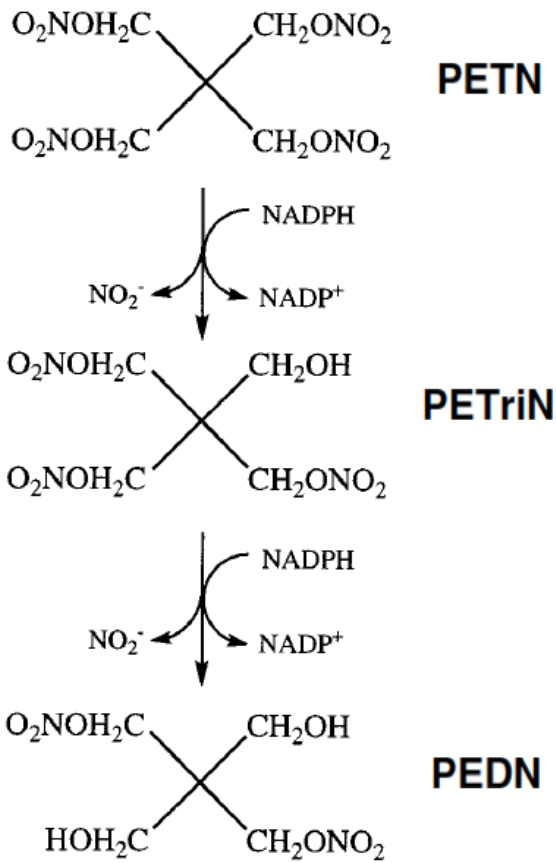
1.6.1 Biotransformación aerobia del PETN

La ruta de degradación del pentaeritritol tetranitrato (PETN) fue propuesta por Blinks *et al.* (1996), en la que en condiciones aerobias la cepa *Enterobacter cloacace* PB2 elimina dos de los cuatro grupos nitro de forma secuencial del pentaeritritol (**Figura 6**) por la enzima PETN reductasa perteneciente a la familia de las OYE (*Old yellow enzyme*), dando así, lugar al pentaeritritol dinitrato (PEDN), con enzima además, se observó que no solo actúa en la degradación incompleta del PETN si no también en la reducción del TNT .

1.6.2 Biotransformación anaerobia del PETN

La biotransformación de PETN en condiciones anaerobias es poco conocida, aunque se destaca el estudio realizado por Zhuang *et al.* (2012), en el cual se estudió el papel que pueden desempeñar las bacterias sulfato reductoras en la desnitrificación del PETN. En la evaluación de la degradación del PETN se aislaron bacterias sulfato reductoras presentes en un suelo contaminado con PETN en Louviers, Colorado, Estados Unidos y se utilizaron nitrito y sulfato como

Figura 3. Reducción de dos grupos nitro por PETN nitrato reductasa.



Modificado de Binks *et al.* (1996).

aceptores de electrones y acetato como fuente de carbono, los resultados obtenidos muestran que bajo diferentes aceptores de electrones el PETN fue secuencialmente degradado a pentaeritritol vía formación de intermediarios tri-, di- y pentaeritritol mono nitrato (PETriN, PEDN y PEMN respectivamente), el uso del nitrito como aceptor de electrones fue quien más estimuló la actividad microbiana, pero también, se observó que altas concentraciones de nitrito (350 mg.l^{-1}) pueden ralentizar e incluso auto-inhibir la degradación del PETN (Zhuang *et al.*, 2012).

2 METODOLOGÍA

2.1 QUÍMICOS Y REACTIVOS

Se utilizaron estándares químicos marca AccuStandard® para los análisis cromatográficos de los compuestos 2,4,6 trinitrotolueno (TNT), 2-amino-4,6 dinitrotolueno (2amDNT), 4-amino-2,6 dinitrotolueno (4amDNT), 2,4 dinitrotolueno (2,4-DNT), 2,6 dinitrotolueno (2,6-DNT), 2,6-diamino-4 nitrotolueno (2,6 DANT) y 2,4-diamino-6 nitrotolueno (2,4 DANT). El explosivo Pentolita fue proporcionado por la Industria militar colombiana (INDUMIL), el acetonitrilo fue de grado HPLC y los demás reactivos fueron de grado químico.

2.2 MICROCOSMOS

Para la evaluación de la degradación de las granallas de Pentolita se utilizaron 36 cepas transformadoras de TNT y PETN obtenidas por Ávila (2011) y evaluadas por Roldán *et al.* (2011) en la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) que fueron aislados de varios suelos contaminados de una fábrica de explosivos y a partir de estos se establecieron 19 consorcios definidos (Anexo A). El montaje de los microcosmos se realizó de la siguiente manera: Con el fin de aumentar la biomasa y estimular la degradación del explosivo sólido, se modificó el medio T2 propuesto por Villegas (2009) y Fajardo (2009) incrementando la concentración de la fuente de carbono (1%) y adicionando extracto de levadura y

nitrate de amonio como fuente de nitrógeno (184.0 y 70.8 mg/L, respectivamente). El pre-inoculo se preparó reactivando las cepas en 20 mL de medio T2 modificado a 30°C, 200 rpm por 48 horas. Posteriormente, se transfirieron 6 mL del pre-inoculo a 54 mL de medio T2 modificado (n=2) incubando bajo las mismas condiciones hasta alcanzar un crecimiento abundante ($DO > 0.6 \pm 0.025$). El cultivo se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos, se realizó un lavado a las células con solución salina (0.85%) y se resuspendió en medio T2 modificado fresco. La densidad óptica (DO) del inoculo se ajustó (0.6 ± 0.025) y se colocaron 5 mL de este inoculo en frascos de 25 mL con dos granallas de pentolita previamente pesadas y fueron luego sellados con tapón de caucho y agrafe (n=18 para cada cepa). Los microcosmos fueron incubados a temperatura ambiente ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), en oscuridad y sin agitación como se observa en la **Imagen 1**. Para el montaje de los consorcios se realizó la misma metodología, pero calculando el volumen del inoculo necesario de cada cepa que conformaba el consorcio, para un volumen final de 5 mL en cada frasco (Anexo B).

Imagen 1. Microcosmos empleados para la evaluación de la degradación de pentolita.



Se planteó realizar el monitoreo a la degradación del explosivo y la concentración de microorganismo se durante 14 meses con 5 eventos de muestreo (6, 10 y 14 meses, los dos últimos eventos de muestreo fueron definidos de acuerdo a los resultados previos y realizados en este trabajo de grado (Anexo C) . Durante el primer año de la fase II del proyecto sólo se alcanzó a realizar la evaluación de la degradación de las granallas para las cepas individuales durante 10 meses (n=2) y para los consorcios definidos durante 6 meses.

Para determinar la concentración del explosivo, las granallas fueron solubilizadas siguiendo el protocolo establecido por USBA. Para la extracción del explosivo se adicionaron 10mL de acetonitrilo a cada unidad experimental, se agitó con vortex por 1 minuto hasta disolver completamente el explosivo, posteriormente se tomaron 50 µL de la muestra y se diluyeron en 2450 µL de acetonitrilo y 2500 µL de agua tipo I, en un frasco de vidrio estéril (25 mL), luego se agitó con la jeringa (10 veces), y no se empleó vortex. Se tomaron 2 mL de la muestra y se filtraron (Filtros de Nylon 0,22 micras) a viales de cromatografía debidamente marcados y se analizaron finalmente por HPLC. Se establecieron tres controles abióticos por triplicado para cada evento muestral (n=15 en total para cada control).

También se realizó monitoreo al crecimiento bacteriano durante el ensayo, para lo cual se hicieron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) de cada unidad experimental con solución salina al 0,85% antes de cada extracción y se sembraron en agar nutritivo por medio de la técnica de microgota, en la cual por cada dilución se tomaron tres gotas, cada una de un volumen de 20µL y se sembraron de forma equidistante, se incubaron las cajas por 48 horas a 30°C y posteriormente se realizó el recuento de microorganismos. La fórmula utilizada para el cálculo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) consistió

de la siguiente fórmula:

$$\frac{\sum \# \text{de colonias en las 3 microgotas (20}\mu\text{L cada una)}}{\# \text{ de microgotas}} \times 50 \times \text{f. d}$$

Donde

f.d = Factor de dilución (i.e. 1×10^2)

50 = Factor de conversión a ml

2.3 Métodos Analíticos

Se realizó el análisis de la concentración de TNT y PENT y sus productos de degradación por medio de HPLC con un cromatógrafo Shimadzu (Prominence 20A) equipado con detector PDA de arreglo de diodos y un auto-muestreador. El volumen de inyección fue de 10 μL y se estableció la lectura de la absorbencia a 210 y 254 nm. Se utilizó una columna Pinnacle II C18 (5 μm , 250 mm x 4.6 mm) (Restek) y como a fase móvil agua-acetonitrilo 57:43 a un flujo de 1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Se construyeron las curvas de calibración para cada estándar cromatográfico en concentraciones de 1, 10, 20, 50, 100 y 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y se les determinó sus tiempos retención como también el coeficiente de determinación (R^2). En los análisis en HPLC se corrieron muestras contenían todos los estándares analíticos para observar el orden de elución de los analitos y sus respectivos tiempos de retención (Imagen 4), con el fin garantizar una correcta interpretación de los resultados

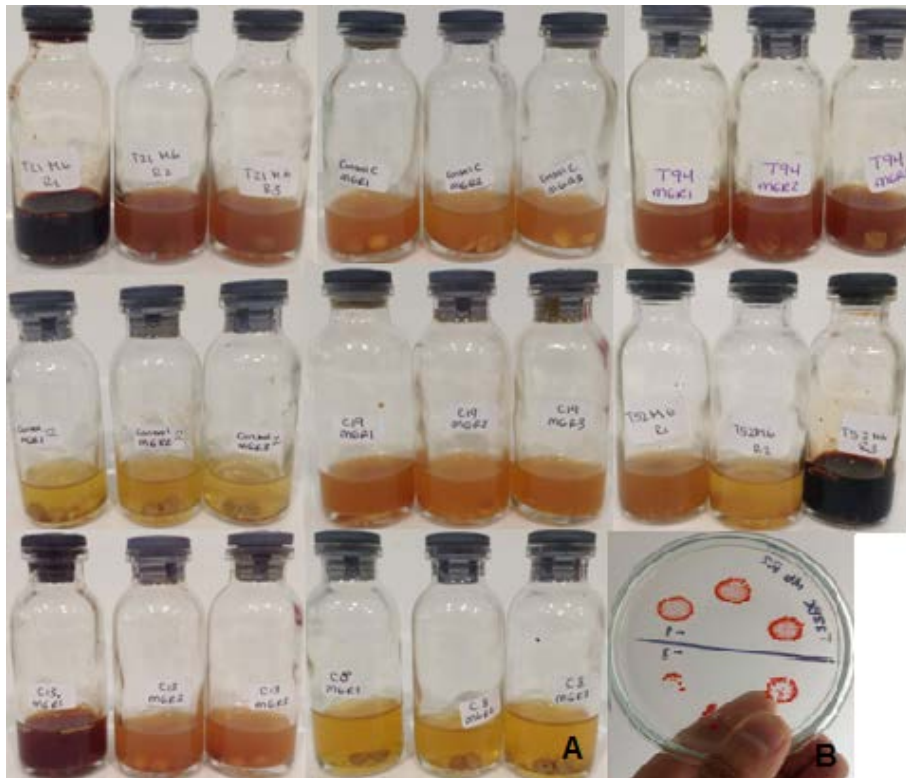
obtenidos para cada microcosmos. Los ADNTs, DNTs y el TNT absorben a 254nm y los DANTs y el PETN absorben a 210nm y sus órdenes de elución y tiempos de retención se muestran en la Imagen 4. Cabe resaltar que durante los análisis de las muestras, los isómeros 2amDNT, 4amDNT, 2,6 DANT y 2,4 DANT no pudieron separarse para observar un pico individual para cada isómero por lo que se presentan los resultados de los compuestos aminodinitrotoluenos (ADNTs) y dinitrotoluenos (DNTs), sin hacer énfasis de sus isómeros (Anexo D). Para graficar los resultados se usó el software SigmaPlot 12.0.

3 RESULTADOS

3.1 MICROCOSMOS

El tiempo de incubación para cada microcosmos fue de 180, 300, 420 días y los tiempos de los dos últimos muestreos variaron debido a que los microcosmos fueron montados en diferentes momentos pero analizados en una misma fecha (Anexo C). Transcurrido el tiempo, de los 360 microcosmos analizados, un 90% cambiaron su coloración amarilla característica del medio T2 modificado a colores naranja (80%), rojo (9%), y en algunos (<1%) a un color vino tinto, como se puede observar para las cepas T21, T52 y el consorcio C13 en la **Imagen 2**.

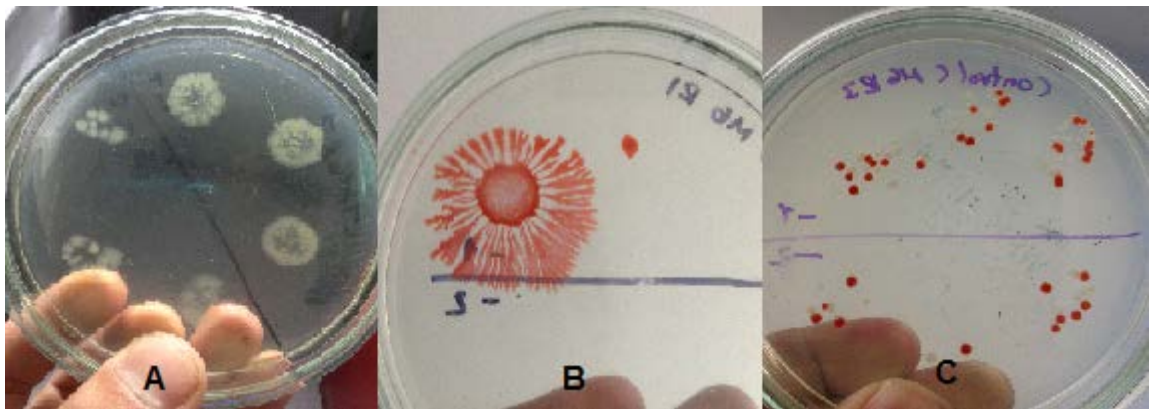
Imagen 2. Unidades experimentales: A) Cambio del color de medio; B) Siembra por microgota.



Previo a la extracción del explosivo para su análisis por HPLC, se sembraron cada uno de los microcosmos en agar nutritivo en diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} por la técnica de microgota (Imagen 2, B) y pasadas las 48 horas se obtuvieron distintas morfologías en las que se destacó la cepa T228c (Imagen 3, B), que inicialmente presentaba una coloración blanquecina y a medida que pasaba el tiempo fue irradiando a través del agar cambiando a una coloración rojiza. La mayoría de los morfotipos encontrados lucen de la misma manera como el consorcio C1, color blanco y el mismo patrón de crecimiento. Sin embargo, con el

Control C (**Imagen 3**, C) se observaron dos morfotipos distintos, unas colonias tenían una coloración blanquecina y las otras presentaban una coloración rojiza y las colonias poseían tamaños similares.

Imagen 3. Recuento en placa por técnica de microgota. A) Consorcio C1; B) Cepa T228c; C) Control C.



Los resultados obtenidos de las UFC son expresados utilizando el logaritmo en base diez más uno de cada microcosmos y calculando el promedio de las tres replicas (Gráficas 2 y 4).

El monitoreo del crecimiento bacteriano mostró que las cepas y consorcios disminuyeron de 3 a 4 órdenes durante los primeros 180 días. Entre los 600 y 700 días de nuevo hubo una disminución de los recuentos en 2 y 3 órdenes de magnitud más. Esto pudo deberse a factores como la carencia o desbalance de

nutrientes, oxígeno, acumulación de subproductos tóxicos, entre otros. La tendencia observada entre los días 200 y 800 es a la adaptación por parte de las cepas y consorcios (i.e. consorcios C1T2 a C8), esto puede deberse a que se encuentran inmersas en una matriz con una alta presencia de TNT y PETN (43.75 y 56.25% respectivamente) y en los días iniciales los explosivos pudieron afectar el crecimiento. Debe tenerse en cuenta que los recuentos graficados no son suficientemente explicativos ya que no describen el comportamiento de las cepas y consorcios en el microcosmos sino que solo exponen la cantidad de bacterias en un momento específico.

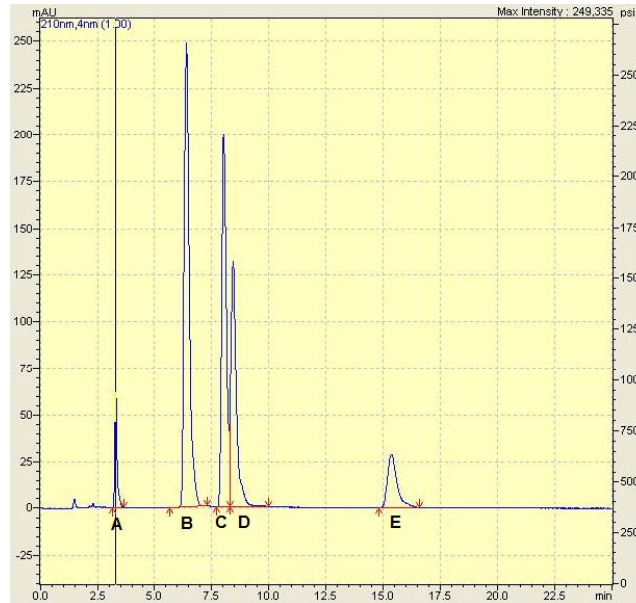
Se observó una disminución en los recuentos en 14 cepas (P227, P231, T12, T41, P229, P233, T71, T43a, CFCB, M3C320, M1C241, M1C227, CFCC, CFCI) a través del tiempo (Grafica 2), este mismo comportamiento se observó también para los consorcios C10, C11 y C12 (Grafica 4); los controles abióticos 1 y 2 no presentaron crecimiento, sin embargo con el control C se observó un notorio crecimiento al pasar de no presentar crecimiento en los días iniciales a pasar a órdenes de magnitud de 3 y 4 entre los 600 y 800 días. Lo que se puede inferir que esta contaminación es proveniente del explosivo comercial sólido (Grafica 4). Estos datos observados para el recuento de cepas y consorcios son indispensables para su correlación de los análisis de la concentración de los explosivos y sus porcentajes de recuperación que se analizarán más adelante. Las cepas y consorcios que presentaban un crecimiento superior a tres órdenes de magnitud fueron crioconservadas a -80°C utilizando el protocolo establecido en USBA para posteriores análisis.

3.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

Se calcularon los porcentajes de recuperación de los explosivos obteniendo valores superiores al teórico (100%) calculado gravimétricamente para el día 180. Según la Roldán (2013), el porcentaje de recuperación debe comprender entre el 70 y 130% de porcentaje recuperación, lo cual implica que los valores obtenidos se encuentran dentro de este rango y presenten altas desviaciones estándar. Esta sobreestimación de los porcentajes de recuperación de TNT y PETN están relacionados por la sumatoria de las variaciones como la técnica de montaje, extracción, análisis y cuantificación de los explosivos por HPLC. Análisis por Cromatografía de gases permiten un resultado más cercano al 100% de recuperación, sin embargo, el PETN no puede ser analizado debido a que en cromatografía de gases implica la utilización de altas temperaturas y que afectan la estructura molecular del PETN.

En general, los porcentajes de recuperación obtenidos para el TNT y PETN para las cepas y consorcios se correlacionan con los recuentos (Graficas 1 y 3), ya que se observa una tendencia a la disminución de los porcentajes de recuperación y un leve aumento en los recuentos de las bacterias (Graficas 2 y 4), esto puede deberse a que las bacterias pueden estar utilizando el TNT y/o PETN como fuente de nitrógeno o carbono ya que estos compuestos son limitantes en el medio T2 modificado.

Imagen 4. Cromatograma con los tiempos de retención (minutos) de los estándares analíticos analizados por HPLC por el método 8330B de la EPA (2006): A) DANTs, 3,5min; B) ADNTs, 6,5min; C) DNTs, 8,4min; D) TNT, 8,8min y E) PETN, 15,5min.



3.2.1 Porcentaje de recuperación de Cepas

En algunas las cepas T62, CFCB, T21, M1C241, P231, P227, T41, T12, P234, M3C320, T160, T71, P229, P2, P233, P174, P10, M2C220 y T109, se observó TNT y PETN porcentajes de recuperación cercanos al 100% tanto para el TNT como para el PETN, concluyendo la no degradación de estos compuestos por parte de estas bacterias (Grafica 1, b);. Por otro lado, se evidenció una marcada

disminución de la recuperación de los explosivos por parte de las cepas T30 que alcanzó valores de recuperación para el TNT y PETN de 62,1 y 49% respectivamente a los 678 días. La cepa T52 cuyo color del medio viró a vino tinto, se observó una disminución en las concentraciones de TNT y PETN cercanas al 89.3 y 75% respectivamente.

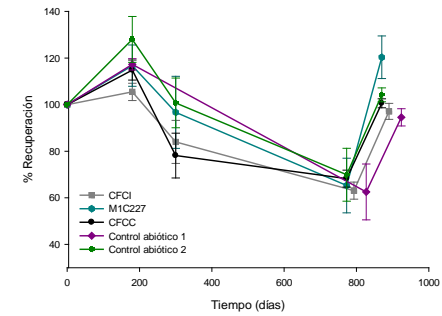
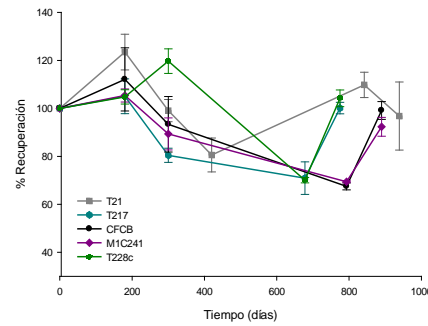
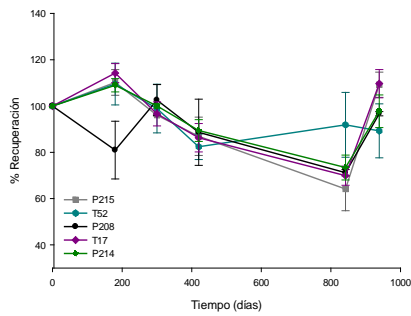
3.2.2 Porcentaje de recuperación de Consorcios

En los consorcios se observó una leve disminución de los porcentajes de recuperación tanto del TNT como del PETN (Grafica 3). Sin embargo los consorcios C15 y C16 presentaron una mayor disminución en estos porcentajes (68% TNT, 23% PETN); el consorcio C16, fue conformado por bacterias aisladas por cultivos anaerobios, siendo las condiciones de los microcosmos similares a las presentes durante su aislamiento, incentivando la transformación tanto de TNT y PETN. Por otro lado, los consorcios C1T2m, C1T2, C2T2 y C3 no mostraron transformación de los explosivos con porcentajes superiores al 90% (Grafica 3, a y b). Cabe destacar que en los consorcios y teniendo en cuenta los recuentos de UFC de los mismos, los resultados obtenidos indican una mayor actividad en cuanto a la degradación de la pentolita y además se puede observar la disminución de este porcentaje de recuperación por el Control C, cuyo indicio de actividad es debido a la presencia de bacterias inmersas en el explosivo provenientes de la fábrica y que poseen un histórico de permanencia, incentivando la degradación de este explosivo más que el consorcio C19 el cual está constituido por todas las cepas.

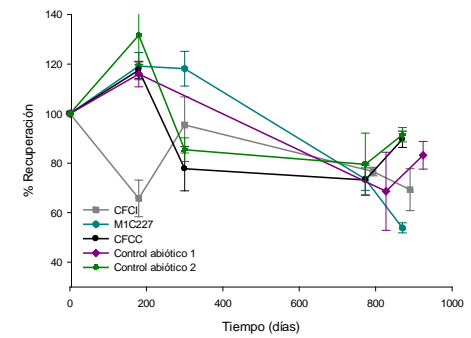
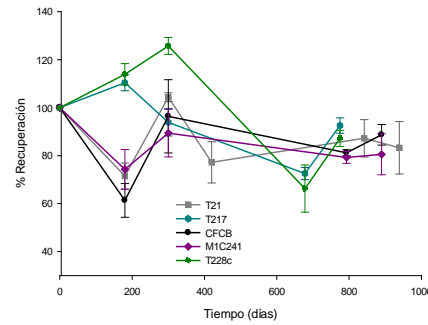
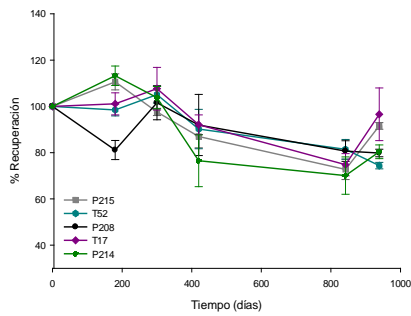
Porcentaje de Recuperación Cepas

Gráfica 1. Porcentaje de recuperación de TNT (a) y PETN (b) de las cepas: P215, T52, P208, T17, P214, T21, T217, CFCB, M1C241, T228c, CFCI, M1C227, CFCC y los controles abióticos 1 y 2.

TNT (a)

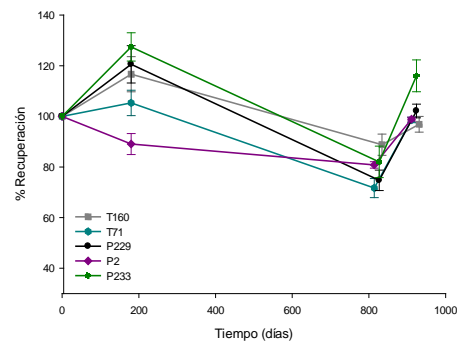
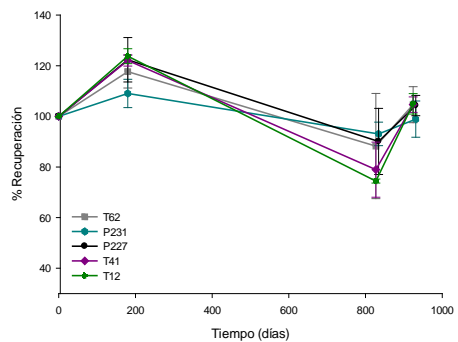
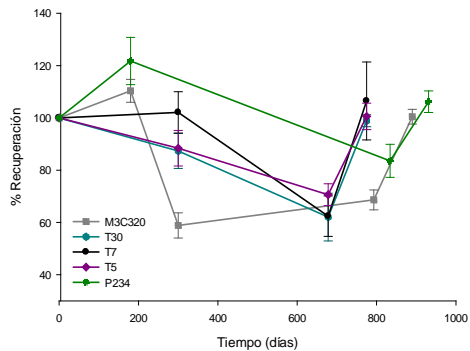


PETN (b)

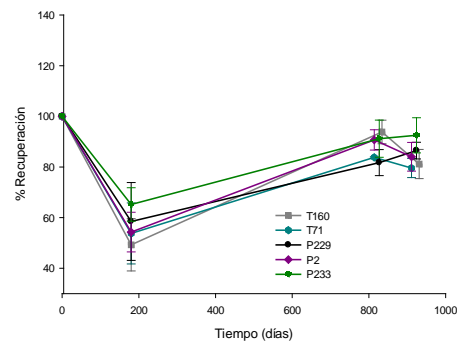
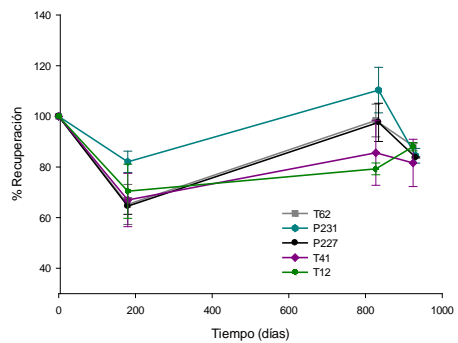
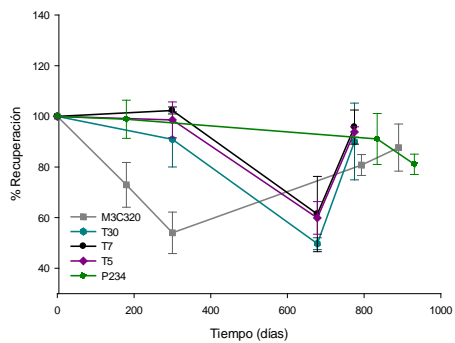


Grafica 1 a. Porcentaje de recuperación de TNT (c) y PETN (d) de las cepas: M3C320, T30, T7, T5, P234, T62, P231, P227, T41, T12, T160, T71, P229, P2 y P233.

TNT(c)

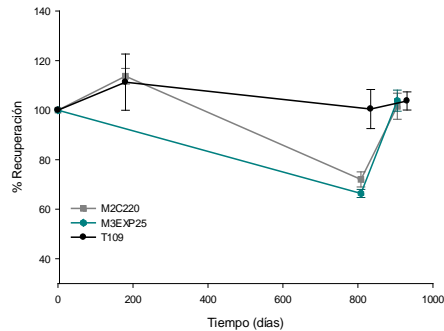
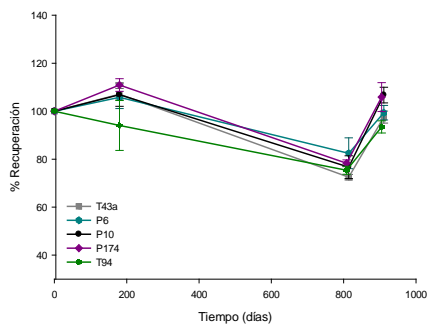


PETN (d)

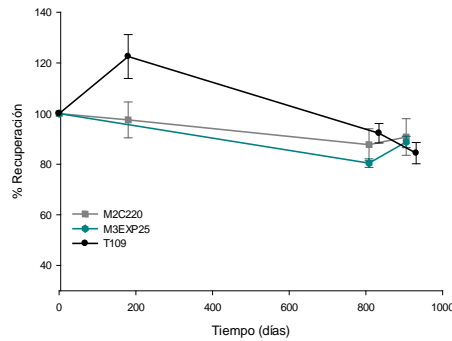
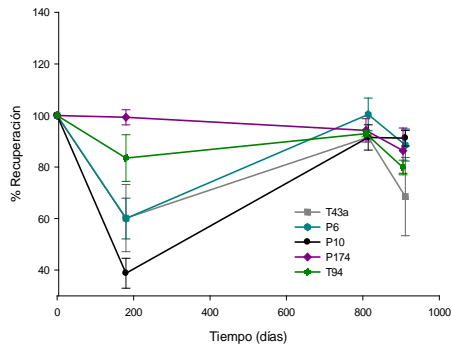


Grafica 1 b. Porcentaje de recuperación de TNT (e) y PETN (f) de las cepas: T43a, P6, P10, P174, T94, M2C220, M3EXP25 y T10.

TNT (e)

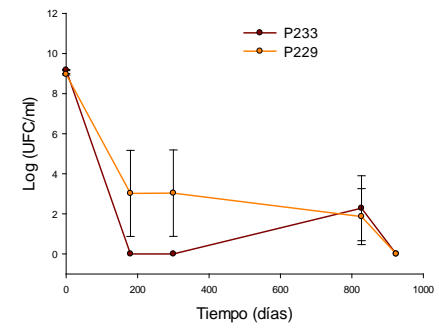
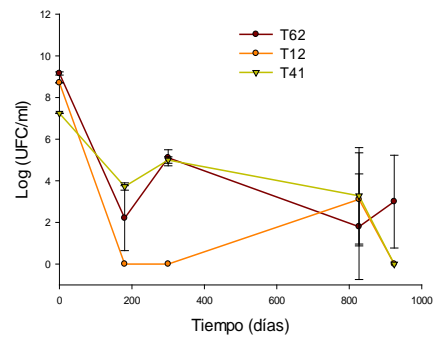
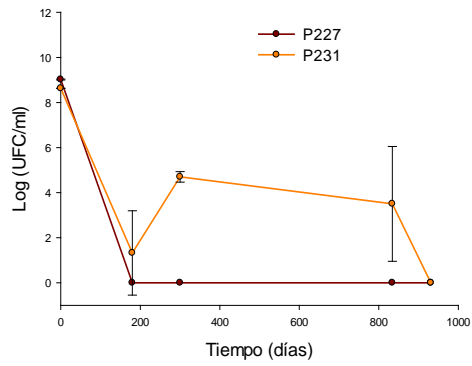
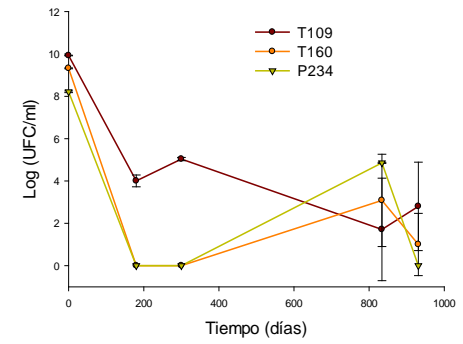
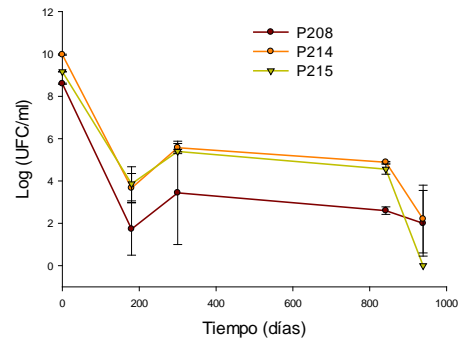
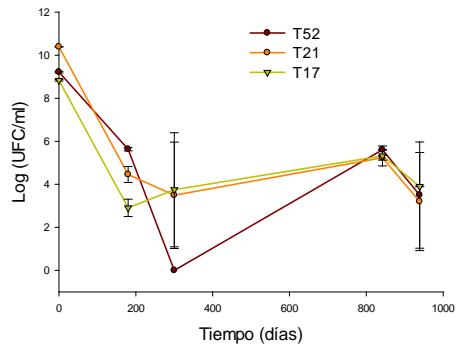


PETN (f)

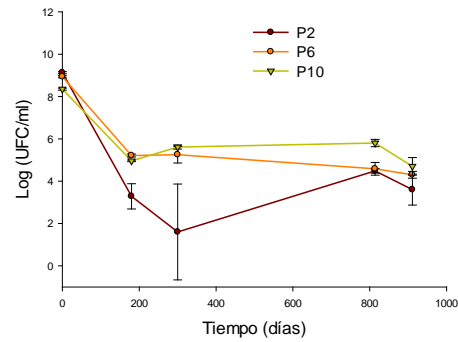
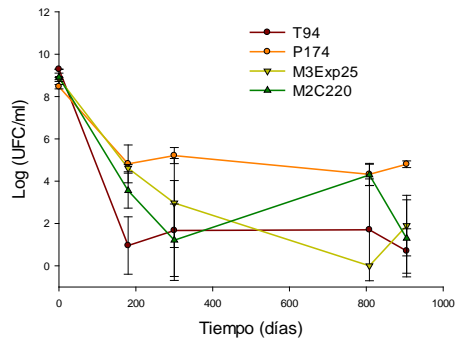
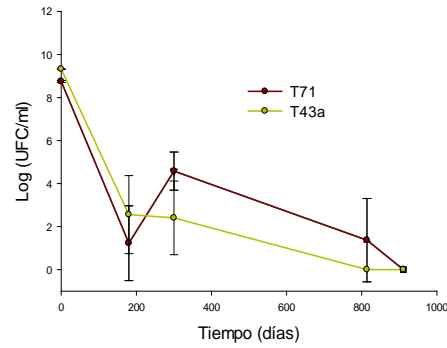
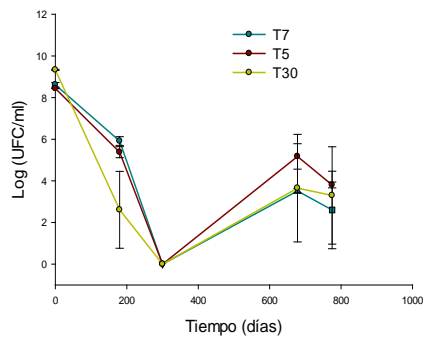


Recuentos Cepas UFC/mL

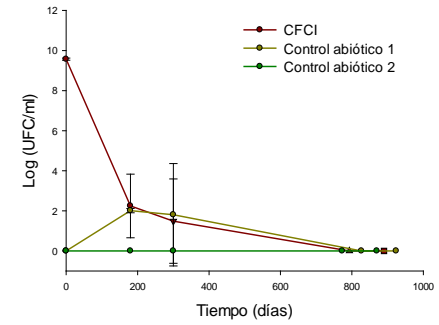
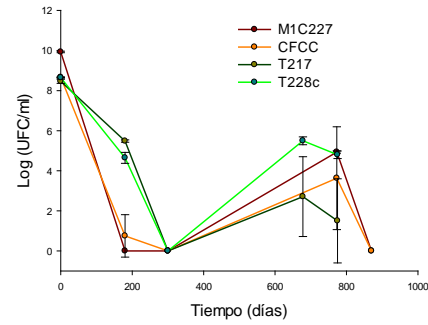
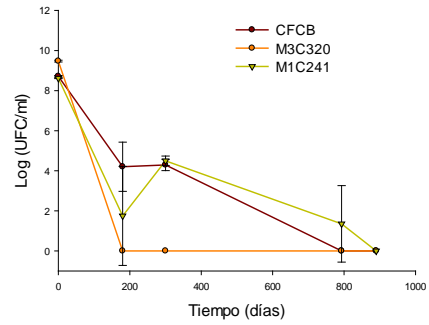
Gráfica 2. Recuento de UFC/mL de las cepas: T52, T21, T17, P208, P214, P215, T109, T160, P234, P227, P231, T62, T12, T41, P233 y P229.



Grafica 2 a. Recuento de UFC/mL de las cepas: T7, T5, T30, T71, T43a, T94, P174, M3EXP25, M2C220, P2, P6 y P10.



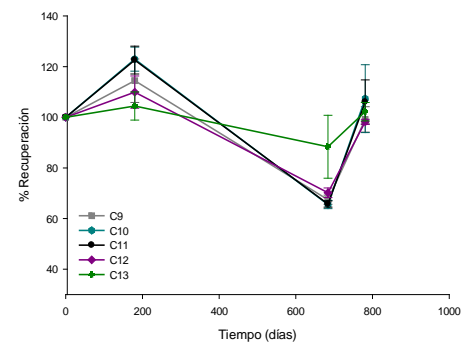
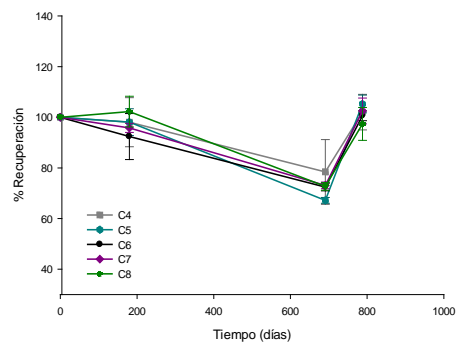
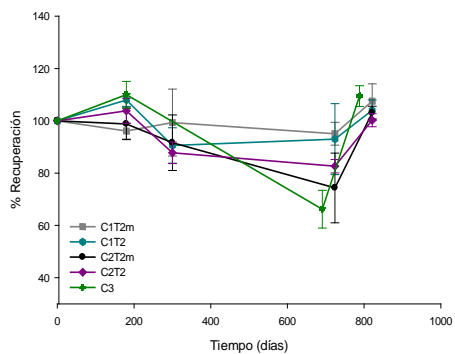
Grafica 2 b. Recuento de UFC/mL de las cepas: CFCB, M3C320, M1C241, M1C227, CFCC, T217, T228c, CFCI y los controles abióticos 1 y 2.



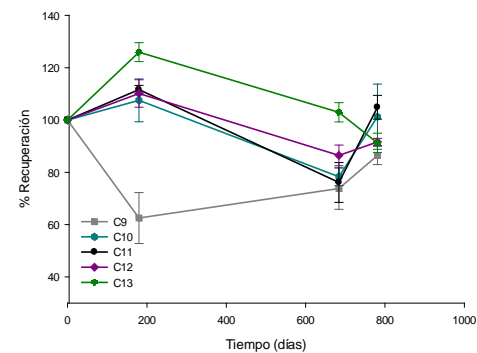
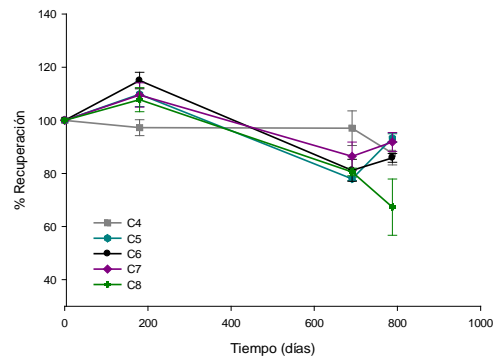
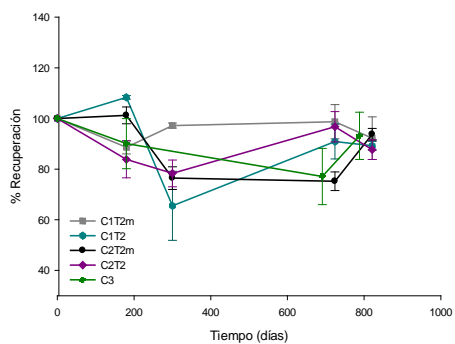
Porcentaje de Recuperación Consorcios

Gráfica 3. Porcentaje de recuperación de TNT (a) y PETN (b) por los consorcios: C1T2m, C1T2, C2T2m, C2T2 y C3 a C13.

TNT (a)

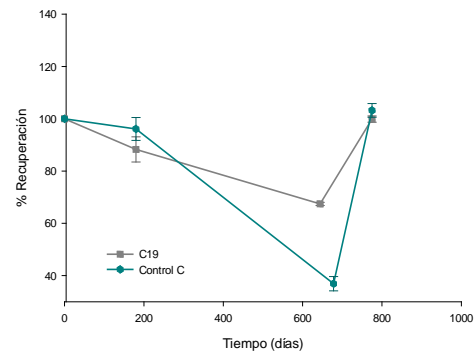
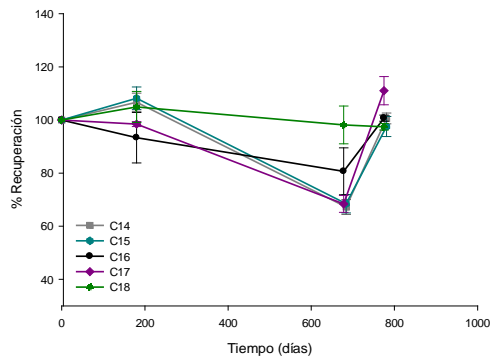


PETN (b)

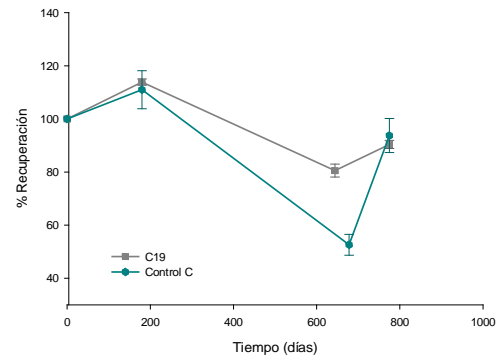
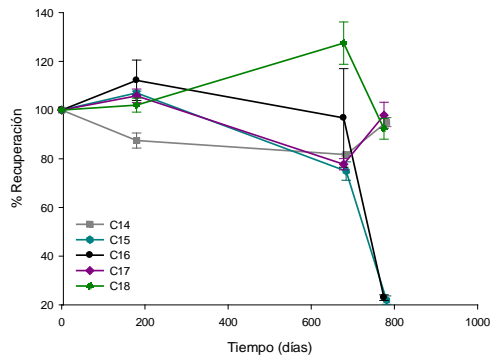


Grafica 3 a. Porcentaje de recuperación de TNT (c) y PETN (d) por los consorcios: C14 a C19 y Control C.

TNT(c)

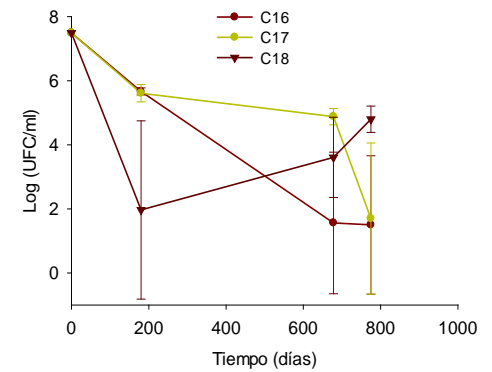
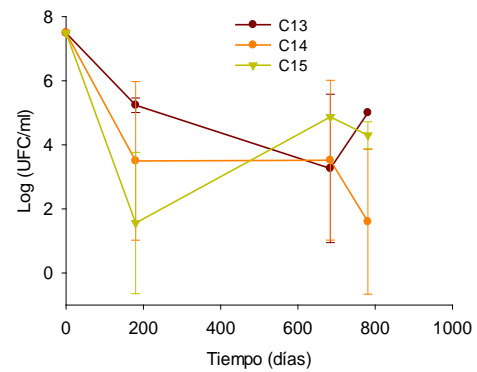
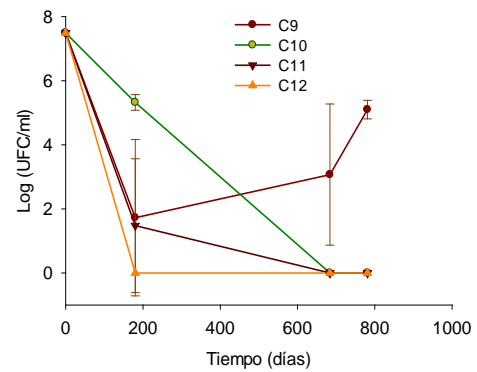
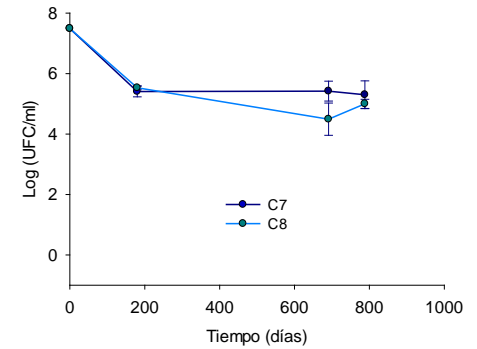
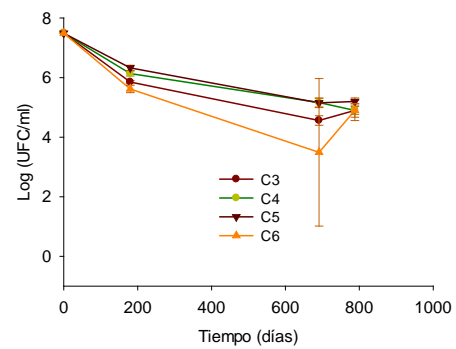
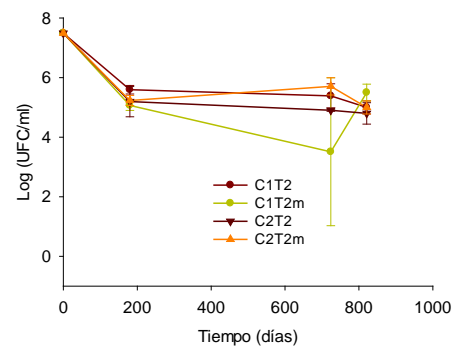


PETN (d)

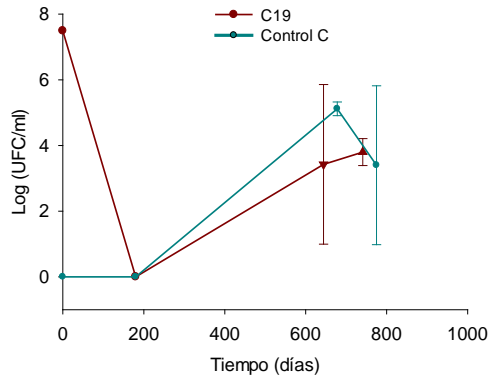


Recuentos Consorcios UFC/mL

Gráfica 4. Recuento de UFC/mL de los consorcios: C1T2, C1T2m, C2T2, C2T2m, C3 a C18.



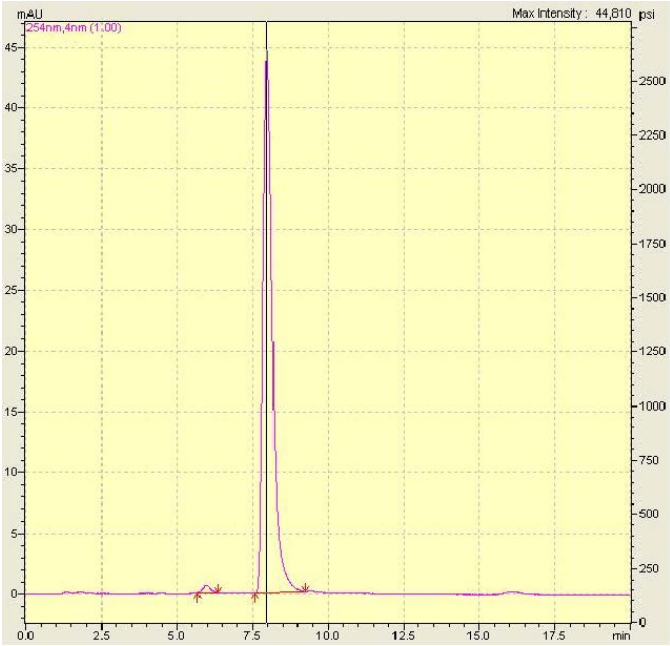
Grafica 4 a. Recuento de UFC/mL de los consorcios: C19 Y Control C.



3.3 IDENTIFICACIÓN DE ADNTS

En los análisis por HPLC se pudieron identificar ADNTs aparte de los analitos principales (TNT y PETN), sin embargo no fue posible su cuantificación ya que el área de estos picos estaba fuera del límite de detección de la curva (1mg/L), sin embargo son reportadas las siguiente cepas en los cuales se observó la presencia de ADNTs (**Imagen 5**): CFCB, CFCI, M2C220, M3C320, M3EXP25, P10, P174, P208, P214, P215, P229, P231, P2, P6, T109, T160, T17, T21, T228c, T30, T52, T62, T5, T7 y T94. Mientras que para los consorcios, todos presentaron formación de ADNTs.

Imagen 5. Identificación de ADNTs. Absorbencia 254nm.



4 DISCUSIÓN

El cambio en la coloración de los microcosmos observada se debe a la formación de subproductos de la transformación de TNT (Vorbeck, 1994; French, 1998, Nyanhongo *et al.*, 2009). Según Nyanhongo *et al.* (2009), los subproductos formados como el 2 amino, 4,6 dinitrotolueno y el 4 amino 4,6 dinitrotolueno producen un cambio en la coloración del medio en presencia de explosivos a una coloración rojiza. Estos resultados se reafirman con los porcentajes de recuperación obtenidos para cada cepa y consorcio que presentó este cambio en la coloración del medio. Además, se puede observar la tinción de las bacterias debido a la acumulación de estos subproductos en la biomasa bacteriana (Nyanhongo *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos son consistentes con estudios realizados por Vorbeck (1994), French (1998) y Nyanhongo *et al.* (2009).

No se pudo determinar cuál de los dos isómeros de ADNT se produjo, sin embargo, teniendo en cuenta lo propuesto por Spain *et al.* en (2000), en condiciones de anaerobiosis, la molécula más probable que puede ser identificada es el 2-amino- 4,6-dinitrotolueno ya que esta molécula hace parte del primer paso de la transformación vía reducción de grupos nitro del TNT y también esto es posible ya que los grupos nitro generan una alta deficiencia de electrones al TNT, la reducción es la principal ruta de transformación del TNT más que por vías oxidativas (Lewis, 1997; Spain, 2000; Srivastava 2014). La formación de subproductos puede generar una mayor toxicidad que su molécula parental, debido a que aumentan su reactividad, sin embargo, Bernstein & Ronen (2012) indican que los subproductos derivados de la reducción de los grupos nitro del TNT que posean grupos amino, presentan una menor toxicidad que otros compuestos como por ejemplo los azoxy, azo e hidrazo derivados, por lo que se

puede inferir que estos subproductos no interfieren en la transformación del explosivo, así este se mantenga presente en el sistema. Se ha observado que los ADNTs puede llegar a ser altamente recalcitrantes, pero pueden ser transformados por bacterias aerobias que posean enzimas dioxigenasas (Stenuit *et al.*, 2006).

Cabe resaltar los resultados obtenidos para el consorcio C16, ya que este consorcio fue establecido por cepas obtenidas mediante aislamiento en condiciones anaerobias y fue el que mayor presento una reducción significativa de su porcentaje de recuperación que los demás consorcios. También es de resaltar los resultados obtenidos para el Control C, en el cual se observó disminución de los explosivos pasados los 180 días de establecido el microcosmos, esto puede deberse a bacterias presentes en las granallas presentan un crecimiento muy lento y/o también como lo sustenta Boopathy (2000), la presencia del explosivo y en este caso la presencia de una mezcla solida de dos explosivos puede ralentizar significativamente el crecimiento bacteriano y disminuir la equitatividad de la comunidad en el caso de los consorcios.

A pesar que el explosivo no se encontraba en dilución y que esto lo hacía menos biodisponible para su transformación, ya que el TNT y PETN presentan una muy alta insolubilidad en agua (120-130 y 43 mg.l⁻¹ a 25°C respectivamente) (Nyanhongo *et al.*, 2009) y no estaba en agitación, pudo observarse una disminución de ambos explosivos, sugiriendo que la presencia de TNT y PETN no provocaron auto inhibición de su transformación. Este resultado difiere a los resultados obtenidos por Moshe (2009), donde el TNT actuó como inhibidor de la degradación de los explosivos RDX y HMX.

Los resultados obtenidos en los recuentos, mostraron una fase de estabilidad, esto puede deberse a la disminución de la fuente de carbono, nitrógeno, azufre o algún nutriente el cual se convierte en un factor limitante y en la cual las bacterias afrontan esta limitación entrando en una fase *lag* o fase estacionaria donde ralentiza su metabolismo con el fin de garantizar el mantenimiento de la comunidad (Bernstein & Ronen, 2012).

Finalmente, la transformación tanto de TNT y PETN dependen del sinergismo de diferentes factores, como la concentración del explosivo, temperatura, oxígeno disuelto, pH, presencia de cosustratos y de las capacidades degradadoras de las cepas. Estudios han demostrado que en comunidad una bacteria puede utilizar el explosivo como fuente de nitrógeno o carbono si se encuentra en el sistema una bacteria o grupo de bacterias que sinteticen compuestos necesarios para su metabolismo, como aminoácidos, sustratos para la estimulación de las enzimas inespecíficas involucradas en la transformación cometabólica del cosustrato, aceptores finales de electrones, entre otros (Hooker, 1917, Spain *et al.*, 2000; Stenuit *et al.*, 2005; Stenuit & Agathos, 2010; Srivastava, 2014).

Además, podría pensarse que el comportamiento observado en las cepas y consorcios en los porcentajes de recuperación y UFC/mL que son inversamente proporcionales, puede ser realizado por medio de *quorum sensing*, que es la inducción en el cambio del fenotipo de las especies involucradas en el catabolismo de un sustrato y que es regulado por medio de auto-inductores sintetizados por una o varias especies de microorganismos con el fin de estimular, promover o ralentizar o inhibir la degradación de un compuesto de interés y de censar la densidad celular, el *quorum sensing* controla la expresión de genes en las actividades que son benéficas cuando son desempeñadas por un grupo de bacterias que actúan en sincronía (Rutherford & Bassler, 2012), sin embargo la

metodología implementada en el presente estudio no permite soportar dicho comportamiento por parte de la comunidad bacteriana.

5 CONCLUSIONES

Las condiciones de anaerobiosis permitieron la biotransformación del TNT y PETN por las cepas y consorcios utilizados, que se adaptaron a su exposición ante el explosivo sólido, presentando una etapa estacionaria, sin inhibición del metabolismo bacteriano.

A pesar de la baja solubilidad y que el explosivo no se encontraba en solución, fue posible la transformación del TNT, PETN y formación de subproductos de la transformación reductiva del TNT.

En la transformación del TNT por lo consorcios, se observó producción de ADNTs, sugiriendo así, que la ruta metabólica utilizada por los consorcios fue de la transformación reductiva anaerobia de los grupos nitro.

Este es el primer estudio donde se reporta la evaluación de la transformación del explosivo sólido pentolita, el cual a futuro se podrá implementar para fabricar un explosivo sólido biodegradable y reducir su impacto al ambiente, evitando detonaciones no controladas.

6 RECOMENDACIONES

Continuar el monitoreo de los microcosmos, analizando aquellos microcosmos que no fueron utilizados y asignándoles una nueva fecha para su recuento y cuantificación de TNT, PETN y sus subproductos.

A pesar que se observó la transformación de la pentolita a través del tiempo, es necesario generar nuevos estudios en donde se establezcan las condiciones óptimas de anaerobiosis, como también evaluar diferentes aceptores finales de electrones.

Es necesario evaluar la capacidad de transformación de pentolita por parte de las bacterias presentes en el Control C provenientes del explosivo en condiciones anaerobias.

BIBLIOGRAFÍA

AGRAWAL, Jai & HODGSON, Robert. Organic chemistry of explosives. Primera edición. ISBN: 978-0-470-02967-1 Jhon Wiley & Sons Limited. England, UK. 2007, 414p.

AGRAWAL, Jai. High Energy Materials: Propellants, Explosives and Pyrotechnics. ISBN: 978-3-527-32610-5, Wiley-VCH, 2010, 498p.

ATLAS, Ronald. & BARTHA, Richard. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Cuarta edición. Pearson Educación, S.A. España, 2002, 553-587p.

ÁVILA, Francy. Estudio de la degradación aeróbica de 2, 4, 6-Trinitrotolueno y pentaeritritol tetranitrato por bacterias aisladas de suelos contaminados. Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia, 2011.

BARRETO-RODRIGUES, Marcio, SILVA, Flavio. & Paiva, T. Characterization of wastewater from the Brazilian TNT industry. En: Journal of Hazardous Materials. 2009, 164, 385-388p.

BARRETO-RODRIGUES, Marcio., SILVA, F. & PAIVA, Teresa. Optimization of Brazilian TNT industry wastewater treatment using combined zero-valent iron and fenton processes. En: Journal of Hazardous Materials. 2009, 164, 1065-1069p.

BERNSTEIN, Anat. & RONEN, Zeev. Chapter 5. Biodegradation of the Explosives TNT, RDX and HMX. Microbial Degradation of Xenobiotics. En: Environmental Science and Engineering, 2012, 135-176p.

BEST, Elly, TATEM, Henry, GETER, Kaaren, WELLS, Melissa, LANE, Brian. Effects, uptake, and fate of 2, 4, 6-trinitrotoluene aged in soil in plants and worms. En: Environmental Toxicology and Chemistry. 2008, 27, 2539-2547p.

BINKS, Peter, FRENCH, Christopher, NICKLIN, Stephen, BRUCE, Neil. Degradation of pentaerythritol tetranitrate by *Enterobacter cloacae* PB2. En: Applied and Environmental Microbiology. 1996, 62, 1214-1219p.

BOOPATHY, Ramaraj, KULPA, Charles. Trinitrotoluene as a sole nitrogen source for a sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio sp.* (B strain) isolated from an anaerobic digester. En: Current Microbiology. 1992, 25, 235–241p.

BOOPATHY, Ramaraj, GURGAS, Michele, ULLIAN, Jeff, MANNING, Jhon. Metabolism of explosive compounds by sulfate-reducing bacteria. En: Current Microbiology. 1998, 37, 127-131p.

BOOPATHY, Ramaraj, MANNING, Jhon, KULPA, Charles. Biotransformation of explosives by anaerobic consortia in liquid culture and in soil slurry. En: International Biodeterioration & Biodegradation. 1998, 41, 67-74p.

----- A laboratory study of the bioremediation of 2, 4, 6-trinitrotoluene-contaminated soil using aerobic/anoxic soil slurry reactor. En: Water Environmental Research. 1998, 70, 80-86p.

BOOPATHY, Ramaraj. Factors limiting bioremediation technologies. En: Bioresource Technology. 2000, 74, 63–67p.

BOOPATHY, Ramaraj. Anaerobic Metabolism and Bioremediation of Explosives-Contaminated Soil. En: Advances in Applied Bioremediation. Springer Berlin Heidelberg, 2009, 151-172p.

BRAR, Satinder, VERMA, Manish, SURAMPALLI, Rao, MISRA, Kashipra, TYAGI, Rajeshwar, MEUNIER, Nathalie, BLAIS, Jean. Bioremediation of hazardous wastes: a review. En: Practice periodical of hazardous, toxic and radioactive waste management. 2006, 10, 59-72p.

CHIH-CHING, Chien, CHIH-MING, Kao, DE-YU, Chen, CHING, Ssu, Chien-Cheng, Chen. Biotransformation of trinitrotoluene (TNT) by *Pseudomonas* spp. isolated from a TNT-contaminated environment. En: Environmental Toxicology and Chemistry. 2014, 33, 1059–1063p.

CLARK, Benjamin. & BOOPATHY, Ramaraj. Evaluation of bioremediation methods for the treatment of soil contaminated with explosives in Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana. En: Journal of hazardous Materials. 2007, 143, 643-648p.

DRZYZGA, Oliver, GORONTZY, Thomas, SCHMIDT, Arnold, BLOTEVOGEL, Karl. Toxicity of explosives and related compounds to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177. En: Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 1995, 28, 229-235p.

DURÁN, Yerson, ANDRADE, Christian, MARTÍNEZ, Armando, SÁNCHEZ, Tito, DE LA CRUZ, Fernando, RAMÍREZ, Pablo. Biodegradación del explosivo tetranitrato de pentaeritritol (PETN) por bacterias aisladas de ambientes mineros. En: Revista Peruana de Biología. 2013, 20, 145-150p.

ERKELENS, Mason, ADETUTU, Eric, TAHA, Mohamed., TUDARARO-AHEROBO, Laureta, ANTIABONG, Jhon, PROVATAS, Arthur, BALL, Andrew. Sustainable remediation-The application of bioremediated soil for use in the degradation of TNT chips. En: Journal of Environmental Management. 2012, 110, 69-76p.

ESTEVE-NÚÑEZ, Abraham, RAMOS, Juan. Metabolism of 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. JLR11. En: Environmental Science Technology. 1998, 32, 3802–3808p.

ESTEVE-NUÑEZ, Abraham, LUCCHESI, Gloria, PHILIPP, Bodo, SCHINK, Bernhard, RAMOS, Juan. Respiration of 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JLR11. En: Journal of Bacteriology. 2000, 182, 1352–1355p.

ESTEVE-NÚÑEZ, Abraham, CABALLERO, Antonio, RAMOS, Juan. Biological degradation of 2, 4, 6 trinitrotoluene. En: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001, 65, 335–352p.

EXA. Booster de Pentolita. [On line]. <<http://exsa.net/wp-content/fichas-tecnicas/BOOSTER-PENTOLITA.pdf>> [Consultado: 06 de Marzo de 2015].

FAJARDO, Carlos. Aislamiento, evaluación y selección de microorganismos degradadores de pentaeritritol tetranitrato (PETN) a partir de ambientes impactados. Pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia, 2009.

FERNANDO, Tudor, BUMPUS, Jhon, AUST, Steven. Biodegradation of TNT (2, 4, 6-Trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. En: *Applied Environmental Microbiology*. 1990, 56, 1666-1671p.

FRENCH, Christopher, NICKLIN, Stephen, BRUCE, Neil. Aerobic degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. En: *Applied Environmental Microbiology*. 1998, 64, 2864–2868p.

FRISCHE, Tobias. Screening for soil toxicity and mutagenicity using luminescent bacteria-a case study of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). En: *Ecotoxicology. Environmental Safety*. 2002, 51, 133–44p.

FRISCHE, Tobias. Ecotoxicological evaluation of in situ bioremediation of soils contaminated by the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Environmental Pollution*. 2003, 121, 103–113p.

FUNK, Stephen, ROBERTS, Deborah, CRAWFORD, Don, CRAWFORD, Ronald. Initial-phase optimization for bioremediation of munition compound-contaminated soils. En: *Applied Environmental Microbiology*. 1993, 59, 2171–2177p.

GARCÍA, Erika. Degradación del pentaeritritol Tetranitrato (PETN) por bacterias aisladas de ambientes con presencia de explosivos. Maestría en Diseño y Gestión de procesos. Facultad de ingeniería. Universidad de la Sabana. Bogotá. Colombia, 2013.

GARCÍA, Luisa. Determinación del potencial de degradación anaeróbica de 2, 4, 6-trinitrotolueno (TNT) y tetranitrato de pentaeritritol (PETN) en suelos impactados con explosivos. Maestría en Ciencias Microbiología. Posgrado Interfacultades de Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Colombia, 2014.

GEORGE, Sam, HUGGINS-CLARK, George, BROOKS, Larry. Use of a *Salmonella* microsuspension bioassay to detect the mutagenicity of munitions compounds at low concentrations. En: *Mutation Research*. 2001, 490, 45–56p.

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

GILCREASE, Patrick & MURPHY, Vincent. Bioconversion of 2, 4-diamino-6-nitrotoluene to a novel metabolite under anoxic and aerobic conditions. En: Applied Environmental Microbiology. 1995, 61, 4209–4214p.

GLOBAL SECURITY. (On line). Military explosives: PETN [Pentaerythritol tetranitrate] <<http://www.globalsecurity.org/military/systems/munitions/explosives-nitrate-petn.htm>> [Consultado: 06 de Marzo de 2015].

GORONTZY, Thomas, KÜVER, Jhon, BLOTEVOGEL, Karl. Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. En: Journal of General Microbiology. 1993, 139, 1331-1336p.

HAÏDOUR, Arnold, RAMOS, Juan. Identification of products resulting from the biological reduction of 2, 4, 6-trinitrotoluene, 2, 4-dinitrotoluene and 2, 6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. En: Environmental Science Technology. 1996, 30, 2365–2370p.

HAWARI, Jalal, HALASZ, Asnr, PAQUET, Louis, ZHOU, Esteven, SPENCER, Bim, AMPLEMAN, George, THIBOUTOT, Sam. Characterization of metabolites in the biotransformation of 2, 4, 6-trinitrotoluene with anaerobic sludge: role of triaminotoluene. En: Applied Environmental Microbiology. 1998, 64, 2200–2206p.

HAWARI, Jalal, HALASZ, Asnr, BEAUDET, Sam, PAQUET, Louis, AMPLEMAN, George, THIBOUTOT, Steven. Biotransformation of 2, 4, 6-trinitrotoluene with

Phanerochaete chrysosporium in agitated cultures at pH 4.5. En: Applied Environmental Microbiology. 1999, 65, 2977–2986p.

HAWARI, Jalal, BEAUDET, Sam., HALASZ, Asnr, THIBOUTOT, Steven, AMPLEMAN, George. Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization. En: Applied Environmental Biotechnology. 2000, 54, 605–618p.

HESS, Utriel. Pentaerythritol derivatives, their production and use and intermediates for their synthesis. U.S. Patent 6,180,664. (514/506; 514/509; 558/483; 558/484) 1997, 10p.

HONEYCUTT, Michael, JARVIS, Susan, MCFARLAND, Victor. Cytotoxicity and mutagenicity of 2, 4, 6-trinitrotoluene and its metabolites. En: Ecotoxicology. Environmental Safety. 1996, 35, 282-287p.

HOOKER, Heney. Liebig's Law of the minimum in relation to general biological problems. En: Science. 1917, 46, 197-204p.

HUANG, Shouqin, LINDAHL, Paul, WANG, Chanyue, BENNETT, George, RUDOLPH, Frederick, HUGHES, Joseph. 2, 4, 6-Trinitrotoluene reduction by carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. En: Applied Environmental Microbiology. 2000, 66, 1474–1478p.

HUGHES, Joseph, WANG, Christopher, YESLAND, Karl, RICHARDSON, Adam, BHADRA, Raj, BENNET, George, RUDOLPH, Frederick. Bamberger rearrangement during TNT metabolism by *Clostridium acetobutylicum*. En: Environmental Science Technology. 1998, 32, 494–500p.

INDUMIL. Pentofex. [On line]. Enigmid.

<<https://www.indumil.gov.co/producto/explosivos/564-pentofex>> [Consultado: 06 de Marzo de 2015].

HOUNG, Kim, HONG-GYU, Song. Comparison of 2, 4, 6-trinitrotoluene degradation by seven strains of white rot fungi. En: Current Microbiology. 2000, 41, 317–320p.

LANGE, Kathrin, KOENIG, A., ROEGLER, C., SEELING, A., LEHMANN, J. NO donors. Part 18: Bioactive metabolites of GTN and PETN—Synthesis and vasorelaxant properties. En: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2009, 19, 3141–3144p.

LENKE, Hiltrud, KNACKMUSS, Hans-Joaquim. Initial hydrogenation during catabolism of picric acid by *Rhodococcus erythropolis*. HL 24–2. En: Applied Environmental Microbiology. 1992, 58, 2933–2937p.

JOHNSON, Mark, FERGUSON, Jennifer, HOLLADAY, Steven. Immune effects of oral 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) exposure to the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. International Journal of Toxicology. 2000, 19, 5-11p.

JOHNSON, Mark, MCATEE, Michael. Wildlife toxicity assessment for 2, 4, 6-trinitrotoluene. Report 39-EJ-1138-00. U.S. Army Center for Health Promotion and Preventative Medicine, Maryland, 2000.

LACHANCE, Bernard, ROBIDOUX, Piere, HAWARI, Jalal, AMPLEMAN, Guy, THIBOUTOT, Sonia, SUNAHARA, Geoffrey. Cytotoxic and genotoxic effects of energetic compounds on bacterial and mammalian cells in vitro. En: Mutation Research. 1999, 444, 25–39p.

LANGE, Kathrin, KOENIG, Andreas, ROEGLER, Carolin, SEELING, Andreas, LEHMANN, Jochen. NO donors. Part 18: Bioactive metabolites of GTN and PETN—Synthesis and vasorelaxant properties. En: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2009, 19, 3141–3144p.

LATORRE, Nelsy. Evaluación de medios de cultivo altos y bajos en nutrientes para la recuperación de heterótrofos edáficos en la ecorregión cafetera de los andes. Tesis de Pregrado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, 2007.

LETZEL, Stephan, GÖEN, Tomas, BADER, Michael, ANGERER, Jim., KRAUS, T. Exposure to nitroaromatic explosives and health effects during disposal of military waste. En: Occupational and Environmental Medicine. 2003, 60, 483-488p.

LEWIS, Thomas, NEWCOMBE, David, CRAWFORD, Ronald. Bioremediation of soils contaminated with explosives. Journal of Environmental Management. 2004, 70, 291–307p.

MARSHALL, Arthur. Explosives: their history, manufacture, properties and tests, III edition Churchill London, 1932.

MCCORMICK, Neil, FEEHERRY, Florence, LEVINSON, Hillel. Microbial transformation of 2,4,6-TNT and other nitroaromatic compounds. En: Applied Environmental Microbiology. 1976, 31, 949–958p.

MOSHE, Sagi, RONEN, Zeev, DAHAN, Oskar, WEISBROD, Neil, GROISMAN, Louis, ADAR, Ender, NATIV, Rick. Sequential biodegradation of TNT, RDX and HMX in a mixture. En: Environmental pollution. 2009, 157, 2231-2238p.

MUTER, Olga, POTAPOVA, K, LIMANE, B, SPROGE, K, JAKOBSONE, I, CEPURNIEKS, G, BARTKEVICS, V. The role of nutrients in the biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid and soil. En: Journal of Environmental Management. 2012, 98, 51–55p.

NATIV, Rick & ADAR, Ender. Soil and Groundwater Contamination in the Ramat Hasharon Area. En: Annual Scientific Report Submitted to the Water Authority. Ministry of Infra Structure, Tel Aviv, 2005.

NAUMOVA, Ru, SELIVANOVSKAYA, Sonia, MINGATINA, Franz. Possibilities for the deep bacterial destruction of 2,4,6-trinitrotoluene. En: Mikrobiologia. 1988, 57, 218–222p.

NEUWOEHNER, Jim, SCHOFER, Arnold, ERLINKAEMPER, Ben, STEINBACH, Kim, HUND-RINKE, Karl, EISENTRAEGER, Amber. Toxicological characterization of 2,4,6-trinitrotoluene, its transformation products, and two nitramine explosives. *Environmental Toxicology Chemistry*. 2007, 26, 1090–1099p.

NYANHONGO, Gutz., SCHROEDER, Max., STEINER, William., GÜBITZ, George. Biodegradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT): An enzymatic perspective. En: *Biocatalysis and Biotransformation*. 2005, 23, 53-69p.

NYANHONGO, Gutz, AICHERNIGA, Nick, ORTNERA, Marcus, STEINER, William, GUEBITZA, Gill. Incorporation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transforming bacteria into explosive formulations. *Journal of Hazardous Materials*. 2009, 285–290p.

PAK, Jim, KNOKE, Kim, NOGUERA, Darren, FOX, Bernard, CHAMBLISS, Gilbert. Transformation of 2,4,6- trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. En: *Applied Environmental Microbiology*. 2000, 66, 4742–4750p.

Parker, George. Purification of trinitrotoluene. U.S., 1,975,598. (Cl. 260-142), July 8 1932 Serial No. 621,515 July 27 1931. 3p.

Perry, Jim. Microbial co-oxidations involving hydrocarbons. En: *Microbiology Reviews*. 1979, 43, 59-72p.

QUINN, Michael, CROUSE, Lauren, MCFARLAND, Charles, LaFIANDRA, Endrik, JOHNSON, Maurice. Reproductive and developmental effects and physical and chemical properties of pentaerythritol tetranitrate (PETN) in the rat. Birth defects research. E: Part B, Developmental and reproductive toxicology. 2009, 86, 65-71p.

RIEGER, Patrick & KNACKMUSS, Hill. Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6- trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil. En: Spain JC (ed.) Biodegradation of Nitroaromatic Compounds. Plenum Press, New York, 1985, 1–18p.

ROJAS, Alejandra. Evaluación de biocebos de carbón activado y explosivo solido, como nueva metodología para la recuperación de microorganismos degradadores de pentolita. Pregrado en Microbiología Ambiental. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia, 2010.

ROLDAN, María, PÉREZ-REINADO Enrique, CASTILLO, Francisco, MORENO-VIVIÁN, Carlos. Reduction of polynitroaromatic compounds: The bacterial nitroreductases. En: FEMS Microbiology Reviews. 2008, 32, 474-500p.

ROLDÁN, Fabio, ARBELI, Ziv, BENAVIDEZ, Joaquin, PÉREZ, Luis, MANRIQUE, Miguel. Diseño de un sistema con microorganismos degradadores de PETN y TNT incorporado en un explosivo comercial. Informe técnico final. Fase I: Aislamiento, selección e identificación de microorganismos degradadores en el explosivo comercial. INDUMIL. Bogotá Colombia, 2011.

ROLDÁN, Fabio, ARBELI, Ziv, BENAVIDEZ, Joaquin, PÉREZ, Luis, MANRIQUE, Miguel. Diseño de un sistema con microorganismos degradadores de PETN y TNT

incorporado en el explosivo Pentolita. Informe técnico final. Fase II: diseñar y seleccionar la metodología que permita incorporar el sistema con microorganismos degradadores en el explosivo comercial. INDUMIL. Bogotá, Colombia, 2013.

ROSENBLATT, Donald, BURROWS, Enrik, MITCHELL, Walter, PARMER, Don. Organic explosives and related compounds. En: Hutzinger: The Handbook of environmental chemistry. Springer-Verlag, 1991.

ROZO, Liliana. Aislamiento y evaluación de bacterias degradadoras de pentolita, obtenidas a partir de muestras de suelos, agua y lodos con presencia de explosivos. Pregrado en Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Facultad de Ingeniería. Universidad De La Salle. Bogotá. Colombia, 2011.

RUSSEK, Hollman. The therapeutic role of coronary vasodilators: glyceryl trinitrate, isosorbide dinitrate, and pentaerythritol tetranitrate. The American Journal of the Medical Sciences. 1966, 252, 9-20p.

RUTHERFORD, Sam, BASSLER, Ben. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. En: Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2012, 1-26p.

RYLOTT, Ernest, LORENZ, Albert & BRUCE, Nick. Biodegradation and biotransformation of explosives. En: Current opinion in Biotechnology. 2010, 22, 1-7.

SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA).

SIMINI, Michael, WENTSEL, Rick, CHECKAI, Ronald, PHILLIPS, Charles, CHESTER, Neil, MAJOR, Marcus. Evaluation of soil toxicity at Joliet Army Ammunition Plant. En: Environmental Toxicology and Chemistry. 1995, 14, 623-630p.

SIMONS, Zeev, BRUCE, Neil. Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. En: Natural Product Reports. 2006, 23, 845-850p.

SPAIN, Jim. Biodegradation of nitroaromatic compounds. En: Annual Review of Microbiology. 1995, 49, 523-555p.

SPAIN, Jim, HUGHER, Jack, KNACKMUSS, Harris. Biodegradation of Nitroaromatic compounds and Explosives. First edition. Lewis Publishers. London. England. 2000, 435 p.

SRIVASTAVA, Jaramaj, NARAIAN, Ramaraj, KALRA, Song, CHANDRA, Hock. Advances in microbial bioremediation and the factors influencing the process. En: International Journal of Environmental Science and Technology. 2014, 11, 1787–1800p.

STENUIT, Bill, EYERS, Larry, EL FANTROUSSI, Samuel, AGATHOS, Sam. Promising strategies for the mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene. En: Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 2005, 4, 39–60p.

STENUIT, Bill, EYERS, Larry, ROZENBERG, Roger, HABIB-JIWAN, Jack, AGATHOS, Sam. Aerobic growth of Escherichia coli with 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) as the sole nitrogen source and evidence of TNT denitration by whole cells and cell-free extracts. En: Applied Environmental Microbiology. 2006, 72, 7945–7948p.

STENUIT, Bill & AGATHOS, Sam. Microbial 2,4,6-trinitrotoluene degradation: Could we learn from (bio)chemistry for bioremediation and vice versa? En: Applied Microbiology and Biotechnology. 2010, 88, 1043-1064p.

STOCKINGER, Harris. Aliphatic nitro compounds, nitrates and nitrites, pp. 4141-4208. In Clayton, G.D. and Clayton, F.E. (ed.). Patty's industrial hygiene and toxicology, Vol 2C. John Wiley and Sons, New York, 1982.

TITANOBEL. Pentex™. [On line].

<<http://www.titanobel.com/files/FDS/FDS%20Pentex.pdf>> [Consultado: 06 de Marzo de 2015].

US, Environmental Protection Agency. Handbook: Approaches for the Remediation of Federal Facility Sites Contaminated with Explosive or Radioactive Wastes. U.S. EPA, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio. 1993.

US, Environmental Protection Agency. Handbook on the management of ordnance and explosives at closed, transferring, and transferred ranges and other sites. Office of research and development. Washington, United States. 2001.

US, Environmental Protection Agency. Handbook: Approaches for the remediation of federal facility sites contaminated with explosive or radioactive wastes. Office of research and development. Washington, United States. 2005.

US, Environmental Protection Agency. Method 8330B. Nitroaromatics, Nitramines and Nitrate Esters by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). United States. 2006.

UNITED STATES. General Accounting Office. DOD Operational Ranges More Reliable Cleanup Cost Estimates and a Proactive Approach to Identifying Contamination Are Needed: Report to Congressional Requesters (GAO-04 610), Washington, DC. 2004.

VAN DILLEWIJN, Patrick, WITTICH, Rick, CABALLERO, A, RAMOS, Joel. Type II hydride transferases from different microorganisms yield nitrite and diarylamines from polynitroaromatic compounds. En: Applied Environmental Microbiology, 2008, 74, 6820–6823p.

VANDERBERG, Louis, PERRY, Jim, UNKEFER, Perl. Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995, 43, 937–945p.

VILLEGAS, Sonia. Aislamiento de microorganismos degradadores de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) a partir de ambientes contaminados con explosivos. Pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. 2009.

VORBECK, Charles, LENKE, Harris, FISCHER, Patrick, KNACKMUSS, Harris. Identification of a hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. En: *Journal of Bacteriology*. 1994, 176, 932–934p.

WILLIAMS, Rack, RATHBONE Daniel, SCRUTTON, Null, BRUCE, Neil. Biotransformation of explosives by the old yellow enzyme family of flavoproteins. En: *Applied Environmental Microbiology*. 2004, 70, 3566–3574p.

WHITE, Gill, SNAPE, Jersey, NICKLIN, Sam. Biodegradation of glycerol trinitrate and pentaerythritol tetranitrate by *Agrobacterium radiobacter*. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, 62, 637-642p.

WITTICH, Ronald, HAÏDOUR, Amber, VAN DILLEWIJN, Patrick, RAMOS, Jhon. OYE flavoprotein reductases initiate the condensation of TNT-derived

intermediates to secondary diarylamines and nitrite. En: Environmental Science Technology. 2008, 42, 734–739.

WON, Will, DI SALVO, Lance, Ng, Jonas. Toxicity and mutagenicity of 2, 4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. En: Applied Environmental Microbiology. 1976, 31, 576–580p.

ZHUANG, Li. Remediation of Pentaerythritol Tetranitrate (PETN) Contaminated Water and Soil. Doctoral thesis. University of Waterloo. Ontario, Canada. 2007.

ZHUANG, Li, GUI, Li, GILLHAM, Ran. Biodegradation of pentaerythritol tetranitrate (PETN) by anaerobic consortia from a contaminated site. En: Chemosphere. 2012, 89, 810–816p.

ANEXOS

Anexo A. Cepas empleadas en la evaluación de la degradación de las granallas.

EXPLOSIVO	CÓDIGO	IDENTIFICACIÓN
TNT	T52	<i>Pseudomonas geniculata</i> y <i>Pseudomonas japonica</i>
TNT	T21	<i>Pseudomonas antarctica</i>
TNT	T17	<i>Achromobacter spanius</i>
TNT	T109	<i>Achromobacter spanius</i> y <i>Pseudomonas knackmussii</i>
TNT	T7	<i>Pseudomonas veronii</i> y <i>Pseudomonas koreensis</i>
TNT	T160	<i>Pseudomonas monteilii</i> y <i>Methylopila capsulata</i>
TNT	T62	<i>Pseudomonas migulae</i> , <i>Pseudomonas nitroreducens</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Raoultella ornithinolytica</i>
TNT	T5	<i>Achromobacter spanius</i> y <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
TNT	T12	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>
TNT	T41	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>
TNT	T71	<i>Pseudomonas poae</i> , <i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>Achromobacter spanius</i>
TNT	T43A	<i>Pseudomonas koreensis</i> y <i>Pseudomonas nitroreducens</i>
TNT	T30	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>
TNT	T94	<i>Pseudomonas veronii</i>
PETN	P208	<i>Variovorax paradoxus</i> y <i>Variovorax boronicumulans</i>
PETN	P214	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
PETN	P215	<i>Rhodococcus qingshengii</i>
PETN	P234	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> y <i>Agrobacterium larrymoorei</i>

Anexo A. a. Cepas empleadas en la evaluación de la degradación de las granallas.

EXPLOSIVO	CÓDIGO	IDENTIFICACIÓN
PETN	P227	<i>Rhodococcus ruber</i> y <i>Mycobacterium fluoranthenvivorans</i>
PETN	P231	<i>Rhodococcus ruber</i> y <i>Cupriavidus basilensis</i>
PETN	P233	<i>Gordonia aichiensis</i> y <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
PETN	P229	<i>Methylobacterium adhaesivum</i> y <i>Leifsonia aquatica</i>
PETN	P2	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>
PETN	P6	<i>Arthrobacter defluvii</i> y <i>Pseudomonas hibiscicola</i>
PETN	P10	<i>Bosea minatitlanensis</i> y <i>Rhizobium daejeonense</i>
PETN	P174	<i>Rhizobium larrymoorei</i>
Biocebos - PETN	M3Exp25-P301	<i>Pseudomonas</i> sp.
Biocebos - TNT	M2C220-T301	<i>Pseudomonas</i> sp.
Biocebos - TNT	M3C320ss-T302	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
Biocebos - TNT	MIC241-T304	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
Biocebos - TNT	MIC227-T303	<i>Citrobacter</i> sp.
Anaerobios - PENTOLITA	CFCB-PT1	<i>Citrobacter freundii</i>
Anaerobios - PENTOLITA	CFCC-PT2	<i>Pseudomonas moravensis</i>
Anaerobios - PENTOLITA	CFCI- PT3	<i>Pseudomonas montrelli</i>
Salle - TNT	T217	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>
Salle - TNT	T228c	<i>Pseudomonas oleovorans</i>

Anexo B. Consorcios definidos seleccionados para evaluar la degradación de las granallas.

CLASIFICACIÓN	CÓDIGO	NOMBRE	CEPAS
Origen	C3	Exterior	T5, T7, T12, T17, T21, P2,P6,CP10
Origen	C4	Canal exterior	T30, T41, T43a, P208, P214, P215, P231
Origen	C5	Canal trampa	T71, P227, P229, P233
Categorías	C6	Azar paquete A	P227, T43a, P234, T17, T16, P6, P215
Categorías	C7	Azar paquete B	P214, P215, T7, P301, T1,P10, T109
Categorías	C10	Todas las de PETN	P208, P214, P215, P234, P227, P231, P233, P229, P2, P6, P10, P174, P301
Categorías	C9	Todas las de TNT	T52, T21, T17, T109, T7, T160, T62, T5, T12, T41, T71, T43A, T30, T94, T301, T302, T303, T304, T217, T228c
Categorías	C11	Uno de cada uno grupo A	T5, T41, P10, T1, T21
Categorías	C12	Uno de cada uno grupo B	T7, T62, P208, T2, T52
Categorías	C8	Uno de cada uno grupo F	T1, T109, P229, T17,T5
Key member	C13	Tasa degradación 3 y 1	T52, T62, T71, T94, T17, P233, P208, T160, T7, P234, P6, P10, P215, P229, P301, P234
Key member	C14	Tasa de crecimiento 3 y 1	P174, T62, T71, T12, P229, P214, P215, P208, T41, T43a, T52, P301, P234, T94
Key member	C15	Puntaje bajo	T160, P214, P234, P229
Key member	C1	Puntaje alto (4 cepas)	P174, T17, T94, T5
Key member	C2	Puntaje alto (5 cepas)	P174, T17, T94, T5, P2
Key member	C18	% degradación 3 Y 1	T52, T41, T94

Anexo B. Consorcios definidos seleccionados para evaluar la degradación de las granallas.

CLASIFICACIÓN	CÓDIGO	NOMBRE	CEPAS
Key member	C19	Todas las cepas	P208, P214, P215, P234, P227, P231, P233, P229, P2, P6, P10, P174, P301, T52, T21, T17, T109, T7, T160, T62, T5, T12, T41, T71, T43A, T30, T94, T301, T302, T303, T304, T217, T228c, PT1, PT2, PT3
Método de aislamiento	C16	Anaerobios	PT1, PT2, PT3
Método de aislamiento	C17	Biocebos	P301, T301, T302, T303, T304

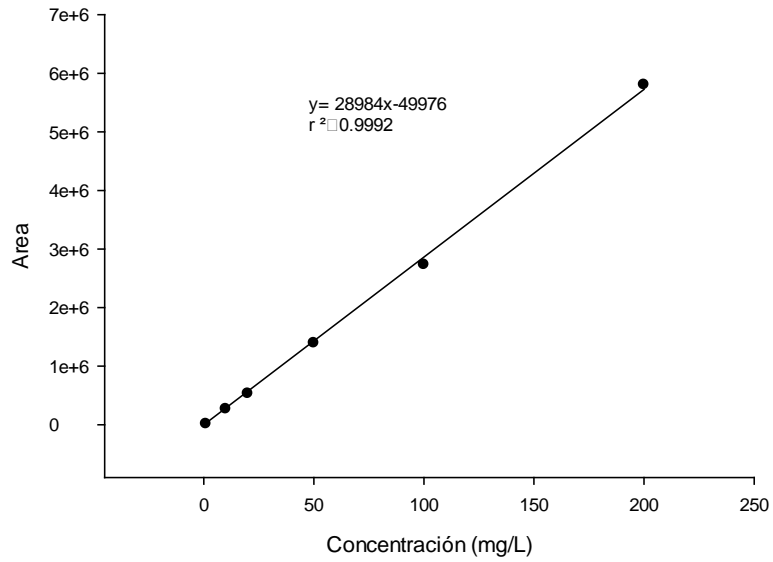
Anexo C. Cronograma del montaje y de los eventos de muestreo para evaluar la degradación de las granallas por 36 cepas y 19 consorcios definidos.

Unidades Experimentales	Fecha montaje	Muestreo 1: 180 días	Muestreo 2: 300 días	Muestreo 3: 420 días	Muestreo 4:	Muestreo 5:
					30-Oct-14 (días)	4-Feb-15 (días)
Cepas: T52, T21, T17, P208, P214, P215	28-Jun-12	28-Dic-12	28-Abr-13	28-Ago-13	842	939
Cepas: T109, T160, P234, P227, P231	6-Jul-12	6-Ene-12	6-May-13	6-Sep-13*	834	931
Cepas: T62, T12, T41, P233, P229, Control 1	13-Jul-12	13-Ene-12	13-May-13	13-Sep-13*	827	924
Cepas: T71, T43A, P10, P6, P2	26-Jul-12	26-Ene-12	26-May-13	26-Sep-13*	814	911
Cepas: P174, T94, M3Exp25, M2C220	2-Ago-12	2-Feb-13	2-Jun-13	2-Oct-13*	808	905
Cepas: M3C320ss, MIC241, CFCl, CFcB	17-Ago-12	17-Feb-13	17-Jun-13	17-Oct-13*	793	890
Cepas: MIC227, CFCC, Control 2	7-Ago-12	7-Mar-13	7-Jul-13	7-Nov-13*	773	870
Consortios: C1 y C2 en medio T2 y T2 modificado	26-Oct-12	26-Abr-13	26-Ago-13	26-Dic-13*	724	821
Consortios: C3 a C8	29-Nov-12	29-May-13	29-Sep-13*	29-Ene-14*	691	788
Consortios: C9 a C15	6-Dic-12	6-Jun-13	6-Oct-13*	6-Feb-14*	684	781
Consortios: C16 a C18, Control C, T30, T5, T7, T217, T228c	12-Dic-12	12-Jun-13	12-Oct-13*	12-Feb-14*	678	775
Consortio: C19	16-Ene-13	16-Jul-13	16-Nov-13*	16-Mar-14*	644	741

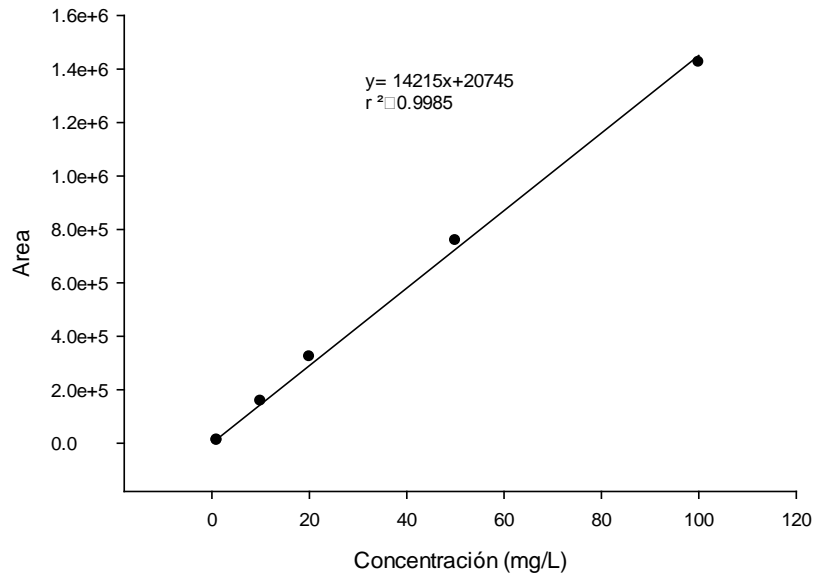
* Análisis no realizado.

Anexo D. Curvas de calibración de los estándares analíticos. Intervalo de confianza del 95%.

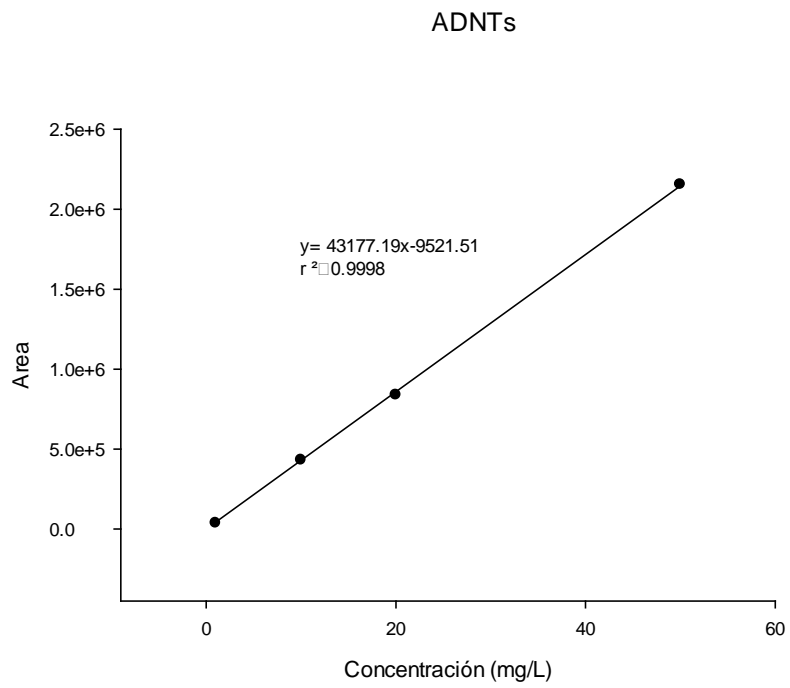
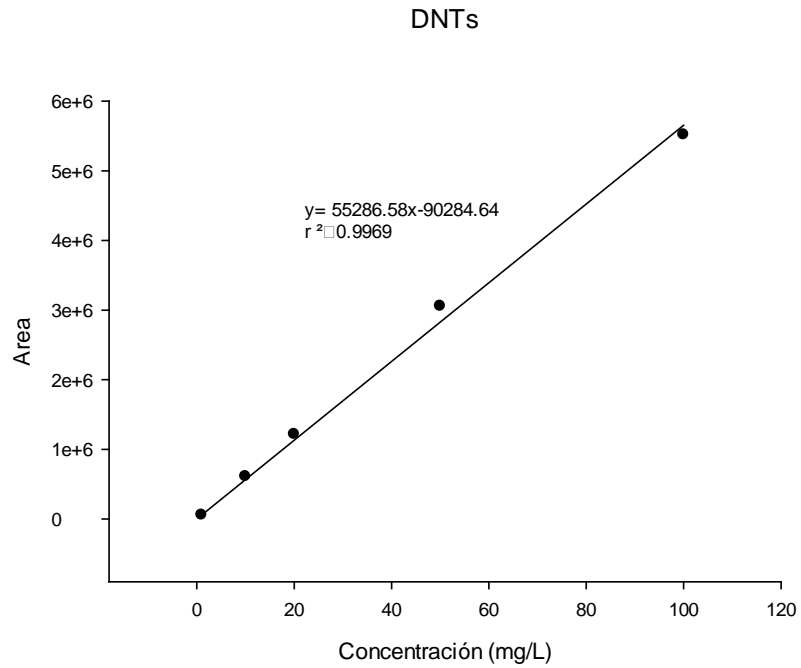
TNT



PETN



Anexo D. a. Curvas de calibración de los estándares analíticos. Intervalo de confianza del 95%.



Anexo D. b. Curvas de calibración de los estándares analíticos. Intervalo de confianza del 95%.

