

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología

**Selección e identificación molecular de un consorcio bacteriano para
la degradación de TNT (2,4,6 - trinitrotolueno) aislados de
ambientes contaminados.**

TESIS

Presentada por:

Bach. CLAUDIA MARÍN CATAORA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL "JORGE BASADRE GROHMANN"

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología

Tesis N° 238

Título profesional de Biólogo Microbiólogo

El Secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias, certifica que por resolución de Facultad N° 7980-2014, el consejo de facultad designó como jurado para la sustentación de la Tesis: "Selección e identificación molecular de un consorcio bacteriano para la degradación de TNT (2,4,6 - trinitrotolueno) aislados de ambientes contaminados", el mismo que está conformado por:

Presidente : Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras

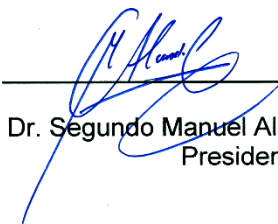
Secretario : Mgr. Roberto Castellanos Cabrera

Vocal : MSc. Isabel Ancco Oliva

Para examinar y calificar la sustentación del informe de tesis en acto público el día 17 de diciembre del 2014 a las 09:00 horas. Presentada por la Bachiller CLAUDIA MARÍN CATAORA, de la Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología.

El jurado calificador en forma secreta e individual se pronunció acerca de su calificativo sobre el informe expuesto y procedió a emitir el siguiente veredicto: APROBADO por UNANIMIDAD y con el calificativo de SOBRESALIENTE con nota (17)

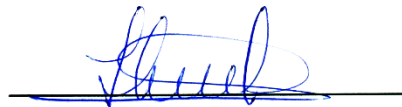
Para ratificar lo detallado firman:



Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras
Presidente



Mgr. Roberto Castellanos Cabrera
Secretario



MSc. Isabel Ancco Oliva
Vocal



Claudia Marín Catacora

Tesista



Mgr. Daladier Castillo Cotrina

Asesor

DEDICATORIA

Este trabajo quiero dedicarlo de manera muy especial a mi familia, a mi madre Fresia, mi padre Luis Alberto y mi hermano José Luis, que a pesar de las distancias me apoyaron en todo momento, cada uno de diferentes maneras influyeron positivamente en mí.

A mis amigos que siempre estuvieron a mi lado antes, durante y después de la culminación de esta investigación mostrándome su completo aprecio y ánimo.

A través de cada uno de Ustedes es que sentí la presencia de Dios durante el camino.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Pablo Ramirez Roca por haberme dado la oportunidad de desarrollar el proyecto con su asesoría y sobre todo por sus gestiones para culminarlo con éxito.

Al profesor Mgr. Daladier Castillo Cotrina por sus ánimos y consejos durante el desarrollo y culminación de la investigación.

Sin duda alguna ha sido muy enriquecedor trabajar al lado de un gran equipo humano en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología donde aprendí y disfruté de la calidez de la amistad de todos ustedes: Yerson, Omar, Anika, Robert, Gregory, Fernando, Armando.

Pero sobre todo quiero agradecer a las piedras en el camino, a los imprevistos, que me permitieron desarrollar nuevas habilidades para superarlos y sobre todo reafirmar mi convicción de ser constante y empeñosa para lograr mis objetivos.

CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

Lista de abreviaturas

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	3
1.2 Determinación de variables.....	3
1.2.1 Tipos de variables.....	4
1.2.2 Operacionalización de variables e indicadores.....	4
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
II. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Antecedentes.....	6
2.1.1 Compuestos explosivos.....	6
a) Explosivos primarios.....	6
b) Explosivos secundarios.....	7
c) Explosivos terciarios.....	7

2.1.2 TNT.....	10
2.1.2.1 Características fisicoquímicas.....	10
2.1.2.2 TNT y su impacto en la salud.....	11
2.1.2.3 TNT y sus impactos ambientales.....	14
2.1.3 Tratamiento de explosivos.....	15
2.1.4 Transformación biológica.....	20
2.1.4.1 Biodegradación.....	20
2.1.4.2 Microorganismos degradadores de TNT.....	22
2.1.4.3 Consorcios.....	24
2.1.4.4 Rutas metabólicas.....	25
2.1.4.5 Medición de la degradación de TNT.....	35
III. MATERIALES Y MÉTODO.....	37
3.1 Materiales y Equipos.....	37
3.1.1 Material biológico.....	37
3.1.2 Material químico.....	37
3.1.3 Material de biología molecular.....	38
3.1.4 Programas bioinformáticos.....	38
3.1.5 Equipos.....	39
3.2 Método.....	40
3.2.1 Preselección de cepas con capacidad degradadora de TNT.....	40

3.2.1.1	Obtención del inóculo bacteriano.....	40
3.2.1.2	Cultivo de las cepas bacterianas en M.M. con TNT.....	40
3.2.2	Selección de las cepas bacterianas degradadoras de TNT para la conformación del consorcio.....	41
3.2.3	Selección del consorcio degradador de TNT.....	45
3.2.4	Identificación molecular de las bacterias degradadoras de TNT seleccionadas.....	46
3.2.5	Determinación del porcentaje de degradación de TNT del consorcio y sus cepas componentes.....	48
3.2.6	Establecimiento de la bacteria seleccionada o consorcio con mayor capacidad de degradación de TNT.....	49
IV.	RESULTADOS	50
V.	DISCUSIÓN.....	71
VI.	CONCLUSIONES.....	78
VII.	RECOMENDACIONES.....	79
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
IX.	ANEXOS	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición de explosivos militares más comunes	8
Tabla 2: Tratamientos fisicoquímicos.....	17
Tabla 3: Tratamientos biológicos de explosivos.....	19
Tabla 4: Cepas bacterianas preseleccionadas subcultivadas en MM líquido con TNT	50
Tabla 5: Características microscópicas y macroscópicas de las cepas bacterianas preseleccionadas.....	52
Tabla 6: Población bacteriana a las 0 y 48 horas de las cepas pre- seleccionadas empleando 3 técnicas diferentes de recuento	53
Tabla 7: Valores de TNT residual y degradado en el medio de cultivo para cada cepa bacteriana preseleccionada a las 0 y 48 horas determinado HPLC	56
Tabla 8: Valores de nitrito (mg/l) producidos por cepa bacteriana a las 0 y 48 horas en el medio de cultivo.....	57
Tabla 9: Producción (mg/l) y productividad (mg/l.h) de las cepas y el consorcio en relación al nitrito evaluado.....	59
Tabla 10: Recuento poblacional bacteriano (ufc/ml) empleando cámara Petroff-Hausser.....	61

Tabla 11: Producción (ufc/ml) y productividad (ufc/ml.h) del crecimiento celular en medio de cultivo Mínimo.....	62
Tabla 12: TNT degradado por las cepas bacterianas y el consorcio seleccionado.....	63
Tabla 13: Análisis de varianza con un diseño completamente aleatorizados con un arreglo factorial de 4x3	65
Tabla 14: Grupos homogéneos para el factor cepa en la prueba de Tuckey.....	66
Tabla 15: Grupos homogéneos para el factor tiempo en la prueba de Tuckey.....	67
Tabla 16: Resultado del alineamiento múltiple de las cepas con pariente más cercano en BLASTN	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 : Explosivos militares mas utilizados y sus subproductos.....	9
Figura 2 : Reducción de TNT mediante enzimas nitroreductasas.....	27
Figura 3 : Oxidación e hidroxilación de los isómeros aminodinitrotoluenos	28
Figura 4 : Reordenamiento Bamberger - like de hidroxilaminos con liberación de amonios y la subsecuente absorción a través de la ruta sintetasaglutamato.....	29
Figura 5 : Formación de dímeros azoxytetranitrotoluenos de la reacción de subproductos nitroso e hidroxilamino de la nitroreducción del TNT.....	31
Figura 6 : Vía 2. Transformación del complejo Meisenheimer mediante enzimas de la familia Old Yellow Enzyme.....	33
Figura 7 : Denitración del complejo Meisenheimer.....	34
Figura 8 : Ruta oxigenolítica del TNT.	35
Figura 9 : Población para cada cepa bacteriana preseleccionada empleando la técnica de recuento con la Escala Mac Farland a las 0 y 48 horas	54
Figura 10: Población para cada cepa bacteriana preseleccionada empleando la técnica de recuento por espectrofotometría DO _{600 nm} a las 0 y 48 horas	55
Figura 11: Población para cada cepa bacteriana preseleccionada empleando la técnica de recuento por cámara Petroff Hausser a las 0 y 48 horas	55

Figura 12: Porcentaje de TNT degradado efectivo para cada cepa bacteriana preseleccionada.....	57
Figura 13: Valores de nitrito (mg/l) efectivos producidos por cepa bacteriana preseleccionada a las 0 y 48 horas en el medio de cultivo.....	58
Figura 14: Nitrito efectivo producido por las cepas y el consorcio	60
Figura 15: Recuento poblacional bacteriano (ufc/ml) empleando cámara Petroff Hausser.....	61
Figura 16: TNT residual en el medio de cultivo de las cepas bacterianas y el consorcio.....	64
Figura 17: Fotografía que muestra electroforesis de ADN.....	68
Figura 18: Árbol filogenético de UP1 en la que conforma un clado robusto con <i>Serratia marcescens</i>	70
Figura 19: Árbol filogenético de 3T412C que forma un clado con <i>Klebsiella oxytoca</i>	71

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Morfología microscópica según coloración Gram.....	97
Anexo 2: Morfología colonial en TSA de 3T412C y UP1 a 37 °C luego de 24 horas de incubación.....	98
Anexo 3: Comparación del crecimiento de 3T412C en medio sólido TSB a las 48 horas de incubación a temperatura ambiente (28 ± 2°C).....	99
Anexo 4: Curva estándar de nitrito de sodio.....	99
Anexo 5: Curva estándar de TNT.....	100
Anexo 6: Cultivo de 72 horas de incubación.....	100
Anexo 7: Cromatograma de HPLC del medio de cultivo.....	101
Anexo 8: Cromatograma de detección de TNT en 24 horas de incubación de 3T412C.....	101
Anexo 9: Cromatograma de detección de TNT en 24 horas de incubación de UP1.....	103
Anexo 10: Cromatograma de detección de TNT en 24 horas de incubación del consorcio 3T412C-UP1.....	104
Anexo 11: Datos de la comparación entre medias del porcentaje de degradación de los tratamientos según prueba de Tuckey.....	105

Anexo 12: Datos de la comparación entre medias del porcentaje de degradación de los tratamientos por intervalo de tiempo según la prueba de Tuckey.....	106
Anexo 13: Ausencia de halos de inhibición en la prueba de antagonismo entre las cepas bacterianas UP1 y 3T412C a las 48 horas en medio TSA.....	107
Anexo 14: Ausencia de halos de inhibición en la prueba de antagonismo entre las cepas bacterianas UP1 y 3T412C a las 48 horas en M.M.....	107

RESUMEN

El impacto ambiental generado por técnicas fisicoquímicas como la incineración o detonación para remediar suelos contaminados por explosivos es alto, debido a que estos compuestos pueden llegar a contaminar ambientes como agua subterránea, suelo y aire, afectando plantas, animales y humanos. En la presente investigación se ensayó una técnica de degradación biológica de una sustancia recalcitrante como el 2,4,6 trinitrotolueno (TNT) en condiciones *in vitro*. Se realizó una selección de cepas bacterianas degradadoras de TNT a partir de 18 cepas provenientes de suelo contaminado con derivados de hidrocarburo y de un sistema de tratamiento de relaves mineros. Se seleccionaron dos cepas: UP1 y 3T412C identificadas por análisis de la secuencia parcial del gen rRNA 16S como *Serratia marcescens* y *Klebsiella oxytoca* con los que se formó un consorcio evaluándose la degradación de 60 mg/l de TNT en medio Mínimo Modificado con succinato como fuente de carbono incubado a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) en agitación constante a 150 rpm por 72 horas. La concentración de TNT del medio de cultivo fue medida por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). El porcentaje de degradación de TNT para *Klebsiella oxytoca* 3T412C fue 97,87%, para el consorcio 95,81 % y para *Serratia marcescens* 42,94% tras 72 horas de incubación. En conclusión, estos resultados demuestran la presencia de bacterias degradadoras de TNT con potencial para ser empleadas en procesos de biorremediación.

Palabras clave: *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, consorcio, 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), degradación aeróbica.

ABSTRACT

Remediation of explosive contaminated soil by physicochemical techniques such as incineration or detonation involve a negative environmental impact, because these compounds could contaminate groundwater, soil and air and be harmful to plants, animals and human health. In this research, it was performed a biodegradation biological technique of a recalcitrant explosive like 2,4,6- trinitrotoluene (TNT) in vitro.

It was tested a screening from 18 bacterial strains isolated from hydrocarbon derivatives contaminated soil and tailing systems processing. Two strains were selected and identified as *Serratia marcescens* UP1 and *Klebsiella oxytoca* 3T412C by analysis of partial sequences of 16S rRNA gene and formed a consortium . Aerobic degradation of TNT was evaluated in minimal medium broth with succinate as a sole carbon source and TNT concentration of 60 mg/l at room temperature (28 ± 2 °C) and constant agitation at 150 rpm for 72 hours. TNT concentration in the medium was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC).

Klebsiella oxytoca 3T412C showed 97,87% of TNT degradation, *Serratia marcescens* UP1 showed 95,81 % of TNT degradation and a consortium formed by these two bacterial strains showed 42,94% of TNT degradation. In conclusion, these results demonstrate TNT degradation in aerobic conditions by microorganisms with potential to be used in bioremediation processes.

Keywords: *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, consortium, 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), aerobic degradation.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANFO	Ammonium Nitrate - Fuel Oil
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
amDNT	Aminodinitrotolueno
ANVA	Análisis de Varianza
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatos
EPA	Environmental Protection Agency
HMX	High Mix Explosive
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
M.M.	Medio Mínimo
NT	Nitrotolueno
PCR	Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés
RDX	Royal Demolition Explosive
TNP	Trinitrofenol
TNT	2,4,6-Trinitrotolueno
TSA	Tripticasa Soya Agar
TSB	Tripticasa Soya Broth
TETRIL	N-metil-2-4-6-trinitrofenilnitramina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV/Vis	Espectro ultravioleta y visible

I. INTRODUCCIÓN

El incremento de los contaminantes orgánicos que son desechados por las industrias pueden causar muchos problemas relacionados a la salud y al medio ambiente, esta preocupación ha incrementado la investigación de diversas estrategias que puedan emplearse para remediar el daño causado (Pandey & Rakesh, 2002).

En este contexto el TNT es un explosivo recalcitrante en el ambiente y tóxico para los seres vivos; sin embargo, los microorganismos han desarrollado estrategias para su degradación tanto en condiciones aerobias como anaerobias siendo los principales protagonistas en la remediación de lugares contaminados cuando se les suministra las condiciones favorables para tal cometido.

La existencia de microorganismos con actividad degradadora de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) ha sido descrita, entre ellos a bacterias como *Pseudomonas fluorescens* I-C (Pak *et al.*, 2000), *P. putida* (Cho *et al.*, 2008), *P. pseudoalcaligenes* JS52 (Fiorella & Spain, 1997), *Clostridium acetobutylicum* (Watrous *et al.*, 2003), *Escherichia coli* (Stenuit *et al.*, 2006) y la levadura *Yarrowia lipolytica* (Ziganshin *et al.*, 2007). Estos microorganismos han desarrollado mecanismos metabólicos para la degradación de 2,4,6-trinitrotolueno. Los principales subproductos son 2-amino-4,6-dinitrotolueno y 2,2-azoxy-tolueno que se acumulan como subproductos principales a través de sustancias intermedias como 2-hidroxilamino-4,6-dinitrotolueno (2HADNT), 2,4-diamino-6-nitrotolueno (2,4DANT); dinitrotolueno (DNT) y nitrotolueno (NT) y 3,5-dinitroanilino

(3,5DNA) lo que indica la existencia de varias rutas de degradación del TNT (Oh *et al.*, 2003).

Además, cuatro especies de *Pseudomonas* fueron aisladas de suelo contaminado con TNT, las mismas que transformaron exitosamente el explosivo a NO_2^- siendo la velocidad de degradación distintas entre ellas. Las cuatro cepas fueron Gram negativas identificados como (1)*Pseudomonas acidovorans*, (2) *P. fluorescens*, (3) *P. mendocina*, (4) *P. aeruginosa*, donde el TNT fue transformado por el aislado (4) en 4 días de incubación, mientras que los aislamientos (1), (2) y (3) necesitan 8 días para transformar el 100% de TNT (Boopathy, 1994).

Robertson y Jjemba en el 2005 evaluaron diferentes vías para aumentar la disponibilidad del TNT durante la degradación microbiana donde la mezcla de microorganismos potencializó la degradación de TNT por la producción de surfactantes que aumentan la disponibilidad del TNT para otros miembros del consorcio conformados por *Acinetobacter* sp., *Enterobacter cloacae* sp. y *Pseudomonas* sp.

La amplia distribución de microorganismos degradantes de TNT y la abundancia de las vías catabólicas que pueden conducir a su transformación y mineralización proporcionan una oportunidad para la optimización de las propiedades catabólicas de estos (Esteve-Nuñez *et al.*, 2001; Fritsche & Hofrichter, 2000).

En la presente investigación se planteó identificar molecularmente bacterias que degradan 2,4,6-trinitrotolueno y evaluar su capacidad de degradación y según estos resultados se conformó un consorcio cuya actividad fue comparado con las cepas originalmente aisladas esperando que la asociación formada muestre un mayor porcentaje de

biodegradación de TNT. Por lo cual se planteó la siguiente interrogante:
¿Se seleccionará e identificará molecularmente un consorcio de bacterias aisladas de ambientes contaminados para la biodegradación de TNT?.

1.1 Hipótesis

Se logrará seleccionar e identificar molecularmente un consorcio de bacterias aisladas de ambientes contaminados con mayor capacidad de biodegradación de TNT en relación a sus bacterias componentes.

1.2 Determinación de variables

1.2.1 Tipos de variable

- Variable independiente: Cepas bacterianas y consorcio bacteriano
- Variable dependiente : Biodegradación del TNT

1.2.2 Operacionalización de variables e indicadores

VARIABLE INDEPENDIENTE	DIMENSIÓN	INDICADORES
Cepas bacterianas	Ufc/ml	Turbidez, conteo en cámara Petroff-Hausser, McFarland, DO ₆₀₀
Consortio bacteriano	Ufc/ml	Turbidez, conteo en cámara Petroff-Hausser, McFarland, DO ₆₀₀
VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIÓN	INDICADORES
Biodegradación de TNT	mg/l	Cantidad de TNT residual
		Cambio de color a fucsia

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

- Seleccionar e identificar molecularmente un consorcio de bacterias aisladas de ambientes contaminados para la biodegradación de TNT.

1.3.2 Objetivos específicos

- Seleccionar bacterias biodegradadoras de TNT.
- Identificar molecularmente las bacterias seleccionadas biodegradadoras de TNT.
- Determinar el porcentaje de biodegradación de TNT para cada bacteria seleccionada y en consorcio.
- Establecer el mayor porcentaje de biodegradación de TNT entre las cepas y el consorcio.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades

2.1.1 Compuestos explosivos

Los compuestos explosivos son sustancias químicas que, cuando se exponen a estímulos físicos o químicos, se descomponen muy rápidamente con el cambio de energía a forma de llama, luz y calor. Además, la rápida liberación de este último hace que los gases productos de la reacción (por ejemplo, N₂, CO₂, H₂O) se expandan y generen altas presiones (Brannon & Pennington, 2002; Kalderis *et al.*, 2011; Pichtel, 2012). Además su uso se extiende tanto para fines de construcción (demolición, minería) como militares.

Los explosivos se clasifican como primarios, secundarios, o terciarios en base a su susceptibilidad de iniciación a la detonación (Pichtel, 2012; Global Security, 2014).

a) Explosivos primarios

Los explosivos primarios son altamente sensibles e incluyen azida de plata, estífnato de plomo, y el fulminato de mercurio. A menudo se denominan como el “inicio de explosivos”, ya que pueden ser utilizados para encender explosivos secundarios.

b) Explosivos secundarios

Los explosivos secundarios, son mucho más usados para fines militares que los explosivos primarios. Debido a que están formulados para detonar sólo en circunstancias específicas, a menudo se utilizan como carga principal o para reforzar explosivos. Incluyen los compuestos nitroaromáticos y nitraminas como TNT (2,4,6 trinitrotolueno), RDX (Royal Demolition Explosive), HMX (High Mix Explosive) y tetril (N-metil-2-4-6-trinitrofenilnitramina) (Tabla 1, Figura 1).

c) Explosivos terciarios

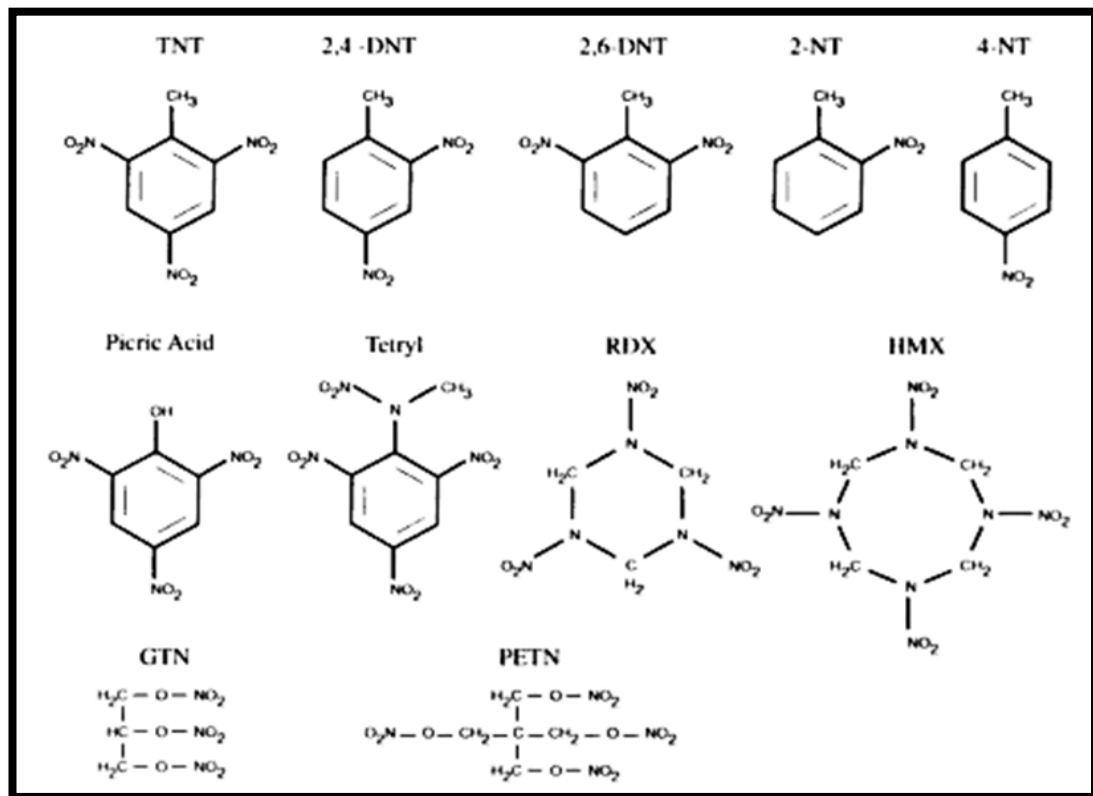
También denominados agentes de voladura, son insensibles a los golpes. El más común es la mezcla física de nitrato de amonio y aceite combustible (ANFO) y son muy utilizadas por las empresas mineras y de demolición debido a que son seguras, baratas y se pueden adquirir fácilmente.

Tabla 1: Composición de explosivos militares más comunes

Explosivos secundarios	Composición
Amatex	TNT, nitrato de amonio, RDX
Ammonal	TNT, nitrato de amonio, aluminio
Amatol	TNT, nitrato de amonio
Baratol	TNT, nitrato de bario
C-4	RDX (91%), plastificante (9%)
Composition A	RDX (91%), cera (9%)
Composition B	RDX (60%), TNT (39%), cera (1%)
Cyclotol	RDX, TNT
HTA-3	HMX, TNT, aluminio
Minol	TNT, nitrato de amonio, aluminio
Octol	HMX (70%–75%), TNT (25%–30%)
Pentolito	Picrato de amonio, TNT
Tetritol	Tetril, TNT
Torpex	RDX, TNT, aluminio
Tritonal	TNT (80%), aluminio (20%)

Fuente: Adaptado de Pichtel, 2012.

Figura 1: Explosivos militares más utilizados y sus subproductos: TNT (2,4,6 trinitrotolueno); 2,4-DNT(2,4-dinitrotolueno); 2,6-DNT (2,6-dinitrotolueno); 2-NT (2-nitrotolueno),4-NT (4-nitrotolueno); ácido pícrico (2,4,6 trinitrofenol); tetril (2,4,6 trinitrofenilmetilnitramina); RDX (hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina); HMX (octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina); GNT (nitroglicerina), PETN (pentaeritrol tetranitrato).



Fuente: Spain *et al.*, 2000.

2.1.2 TNT

2.1.2.1 Características fisicoquímicas:

El TNT es uno de los explosivos nitroaromáticos más utilizado debido a su estabilidad química y térmica así como sus propiedades fisicoquímicas tales como bajo punto de fusión y baja sensibilidad a la fricción, que reduce el riesgo de detonación accidental.

Es importante tener en cuenta que para mantener estables sus características a temperatura ambiente y trabajarla sin peligro de explosión, la muestra debe estar disuelta en compuestos como etanol, acetona o metanol (Ballesteros, 2006; Durán, 2013).

Cuando el TNT es puro, se conoce como TNT grado A y varía de blanco a amarillo pálido. Si la proporción de impurezas es mucho mayor, el color es más oscuro a menudo de color marrón y se le conoce como TNT de grado B.

Este explosivo fue utilizado por primera vez en gran escala durante la Primera Guerra Mundial. Es uno de los más comunes en uso hoy en día, tanto en los artefactos militares y en las operaciones de minería y canteras.

El TNT se puede mezclar con otros explosivos como RDX (Royal Demolition Explosive) y HMX (High Mix Explosive) y es un componente de otros explosivos, tales como amatol, pentolita, tetrytol, torpex, tritonal, picratol, ednatol, además forma parte activa en la fabricación de minas, bombas, granadas, propulsores

y dispositivos detonantes de demolición (Park *et al.*, 2003; Villegas, 2009).

En adición, el pentolito y el ANFO (mezcla de nitrato de amonio y petróleo diesel) son ampliamente usados en la minería a cielo abierto o canteras (Estudios Mineros, 2005) representada en nuestro país por las empresas mineras con las mayores utilidades registradas en los últimos años (ProInversion, 2007).

2.1.2.2 TNT y su impacto en la salud

La toxicidad de este compuesto ha sido ampliamente estudiado en los últimos años utilizando organismos acuáticos, terrestres y monocitos humanos (Ayoub *et al.*, 2010). La diversidad de los valores de toxicidad obtenidos muestra la distinta sensibilidad para los diferentes organismos probados es así que las dosis tóxicas pueden variar dependiendo de las condiciones y tiempo de exposición. Se sabe además que la dosis letal de (DL₅₀) oral en ratas es de 1 g/1 kg/ día (Caballero, 2005).

Su toxicidad ya ha sido reportada por la EPA (*Environmental Protection Agency*) y es considerado como un compuesto carcinogénico y mutagénico para animales, y posible carcinogénico para humanos. Adicionalmente, se encuentra clasificado como contaminante prioritario, por lo cual, los residuos generados durante su fabricación, transporte y almacenamiento deben tener una regulación especial (EPA, 2001).

Se ha reportado que tiene la capacidad de causar anomalías en los eritrocitos, destrucción del hígado y diferentes tipos de

cáncer (Symons & Bruce, 2006). En animales también se observaron dilatación del bazo y otros efectos nocivos al sistema inmunológico.

La OSHA (Occupational Safety and Health Administration) ha establecido un nivel máximo de 1,5 miligramos de 2,4,6-trinitrotolueno por metro cúbico de aire del trabajo ($1,5 \text{ mg/ m}^3$) en una jornada de 8 horas diarias o 40 horas a la semana (ATSDR, 1996).

Las formas en que las personas pueden estar expuestas al TNT son:

- ✓ Tomando agua contaminada que ha migrado de sitios donde se desechan residuos químicos.
- ✓ Respirando aire contaminado.
- ✓ Ingeriendo alimentos tales como frutas y hortalizas que han sido expuestas en suelos contaminados

La recomendación de la salud de la EPA es $1 \mu\text{g/l}$ de TNT en agua potable (Martel *et al.*, 2009). Otros efectos observados en seres humanos incluyen irritación a la piel después del contacto prolongado y cataratas después de exposición por largo tiempo.

Actualmente la recuperación de las áreas contaminadas por explosivos es responsabilidad de salud pública, en las cuales se han invertido considerables esfuerzos en la búsqueda de tecnologías económicas de remediación, en este aspecto la degradación biológica para el tratamiento de compuestos

orgánicos está siendo considerado (Lewis *et al.*, 2004), debido a que es ambientalmente amigable, económico, efectivo, ya que permiten eliminar estos compuestos y sus subproductos de manera eficiente y controlada buscando la degradación completa (mineralización) de los explosivos a través del metabolismo microbiano (Atlas & Bartha, 2002; Eweis, 1999; Rodgers & Bunce, 2001).

2.1.2.3 TNT y sus impactos ambientales

Los compuestos explosivos pueden entrar en el ambiente del suelo a través de numerosas vías (Best *et al.*, 1999; Martel *et al.*, 2009), incluyendo los siguientes:

- ✓ Instalaciones de producción de municiones, por ejemplo las aguas residuales, lagunas, pozos de filtración.
- ✓ Durante el empaque o almacenaje.
- ✓ Instalaciones de eliminación y destrucción de residuos, por ejemplo basurales a cielo abierto, quemadura pozos, incineradores.
- ✓ Zonas de tiro y otras con impacto de armas.

El ejército de los Estados Unidos, estima que más de 1,2 millones de toneladas de suelo han sido contaminadas con estos compuestos (Lewis *et al.*, 2009) y una sola fábrica de TNT puede producir hasta 1,9 millones de litros de aguas residuales al día (Yinon, 1990).

Numerosos estudios han identificado la presencia de TNT en suelos y aguas, por lo cual se considera recalcitrante y persistente en el ambiente (Robidoux *et al.*, 2000; Drzyzga *et al.*, 1995; George *et al.*, 2001; Lachance *et al.*, 1999).

Tras la entrada en el medio terrestre y acuático, el TNT se ve afectado por procesos abióticos y bióticos (Brannon & Pennington, 2002; Juhasz & Naidu, 2007). La velocidad y extensión del transporte y la transformación se ven influidas por

sus propiedades físicoquímicas, factores ambientales (condiciones climáticas, las propiedades del suelo, pH, estado redox) y factores biológicos (poblaciones de microorganismos energético - degradantes) (Pichtel, 2012).

Los procesos que influyen en el destino ambiental de compuestos explosivos pueden dividirse en:

- ✓ Las influencias sobre el transporte (disolución, volatilización, adsorción).
- ✓ Las influencias sobre la transformación (fotólisis, hidrólisis, reducción y degradación biológica).

2.1.3 Tratamiento de explosivos

Se han implementado diversos métodos para remediar suelos contaminados con explosivos o sus residuos, la mayoría de estos incluyen alternativas físicoquímicas como la incineración, detonación y vertimiento al mar o en grandes extensiones de tierra. Sin embargo, el impacto ambiental generado es alto, debido a que estos compuestos pueden llegar a contaminar ambientes como agua subterránea, suelo y aire, afectando plantas, animales y humanos (Ayoub *et al.*, 2010; Clark & Boopathy, 2007; Kulkarni & Chaudhari, 2007).

a) Fisicoquímico

Esta remediación se enfoca actualmente en los residuos propios de la fabricación y uso además del manejo de explosivos obsoletos, incautados y explosivos que son enterrados bajo tierra y que en algunas ocasiones no detonan (Varón, 2012; García, 2011). Por otro lado, la remediación química y la oxidación por aire húmedo (Tabla 2) son más empleados en la remediación de cuerpos de agua subterránea y subsuelos (EPA, 2001).

Tabla 2: Tratamientos fisicoquímicos

Tratamiento	Ventajas	Deventajas
Incineración a campo abierto	Bajo costo Eficiente	Riesgo del personal y de la población Ruido Material particulado
Incineración en horno rotatorio	Eficiente Aplicando a diversos sustratos contaminados	Costoso No transportable Subproductos peligrosos y alergénicos
Detonación a campo abierto	Bajo costo Eficiente Menos material particulado	Riesgo del personal y de la población Ruido
Detonación en cámara	Reduce el ruido y las emisiones Transportables	Costoso
Oxidación por aire húmedo	Muy efectivo en tratamiento RDX	Costoso Producción de gases y subproductos peligrosos
Remediación química	Bajo costo Tratamiento de agua subterránea	Riesgo del personal y comunidad
Lavado del suelo	Bajo costo	Posterior tratamiento del agua empleada

Fuente: Durán, 2013.

b) Biológico

Actualmente las investigaciones en remediación se han centrado en el uso de procesos biológicos donde se utilizan microorganismos, plantas, otros organismos vivos o productos obtenidos de ellos, que tienen la propiedad de eliminar compuestos xenobióticos y sus subproductos de manera eficiente y controlada; durante este proceso se busca la degradación completa (mineralización) de dichos compuestos a través del metabolismo microbiano cuyo producto final pueda ser utilizado por la naturaleza (Varón, 2012; Atlas & Bartha, 2002).

Por esta razón, es necesario orientar las investigaciones a encontrar, aislar y potencializar bacterias aerobias con capacidad degradadora de explosivos, como alternativa biológica en respuesta a la problemática ambiental planteada encontrando de esta manera métodos y técnicas ambientalmente amigables (Tabla 3).

Tabla 3: Tratamientos biológicos de explosivos.

Tratamiento	Ventajas	Desventajas
Compostaje	Bajo costo, efectivo	Tiempo prolongado de acción. No efectivo en altas concentraciones de explosivo
Lodos activados	Más efectivo que los demás tratamientos en suelos arcillosos	Relativamente costoso por los procesos de control, operación y mantenimiento
Biorremediación, (Bioaumentación)	Empleo de microorganismos nativos. Efectivo y de bajo costo.	No efectivo en suelos arcillosos. Dificultad para tratar compuestos clorinados.
Fitorremediación	Producción de enzimas microbianas por plantas. Incremento de porcentaje de remediación.	Relativamente costoso por procesos de control y mantenimiento

Fuente: Adaptado de Durán, 2013.

2.1.4 Transformación biológica

2.1.4.1 Biodegradación

La biodegradación de compuestos orgánicos es la simplificación parcial o destrucción completa de su estructura molecular por reacciones fisiológicas catalizadas por el metabolismo de los microorganismos.

Se mide comúnmente mediante la aplicación de ensayos químicos y fisiológicos en los laboratorios, a partir de la incubación de cultivos puros de microorganismos, mezcla de cultivos o muestras ambientales (suelo, agua, sedimentos o residuos industriales).

En este caso, el investigador define el contexto ambiental de modo que los reactivos potenciales, reactantes y productos puedan ser identificados (Varón, 2012).

Los microorganismos pueden ser indígenas de un área contaminada o pueden ser aislados de otra parte y llevado al sitio contaminado (Ayoub *et al.*, 2011).

La biodegradación de TNT ocurre por la remoción de los grupos nitro de la molécula, por medio de reacciones de reducción realizadas por enzimas nitroreductasas más que por reacciones de oxidación (Williams *et al.*, 2004). Se considera completa sólo cuando todos los grupos nitro han sido removidos y el anillo

benzoico ha sido roto a subproductos anfibólicos, que pueden ser oxidados a CO₂ (Varón, 2012).

La selección natural parece haber impulsado la evolución de los microorganismos que no sólo son capaces de tolerar estos contaminantes tóxicos, sino que han adaptado su metabolismo para aprovechar estas fuentes de carbono, nitrógeno y energía únicas para el crecimiento. El ejemplo más llamativo de esta rápida evolución se ve dentro de las cepas que utilizan vías oxidativas de nitrobenzeno y el catabolismo del nitrotolueno. En la mayoría de los casos, las bacterias aeróbicas tienden a transformar la molécula de TNT mediante la reducción de uno o dos grupos nitro a grupos amino o hidroxilamino y generar diferentes isómeros de compuestos nitroaromáticos amino que a su vez se acumulan generalmente en el medio de cultivo sin más degradación.

También se ha investigado que las formas parcialmente reducidas de TNT reaccionan entre sí en presencia de oxígeno para formar azoxy-tetranitrotoluenos (Haïdour & Ramos, 1996), lo que provoca una mayor tasa de mutaciones que el propio TNT. Por lo tanto se producen subproductos que no son metabolizables por la mayoría de estos microorganismos (Banarjee *et al.*, 1999).

Las bacterias aerobias son capaces de reducir dos de los tres grupos NO₂ pero reducir el tercer grupo requiere condiciones anaeróbicas.

Los procesos anaeróbicos tienen las ventajas potenciales de una reducción rápida en un bajo potencial redox, lo que minimiza la polimerización oxidativa de sustratos debido a la ausencia de oxígeno. Este tipo de transformación del TNT resulta en la acumulación de triaminotolueno (TAT), pero no es lo suficientemente eficaz para la biorremediación de sitios contaminados (Snellinx *et al.*, 2002).

En consecuencia los científicos y las industrias están tratando de encontrar procedimientos adecuados y eficaces para la eliminación de TNT. Por lo tanto, hay una necesidad de desarrollar mayor investigación en este sentido.

2.1.4.2 Microorganismos degradadores de TNT

La existencia de microorganismos con actividad degradadora de TNT ha sido descrita, entre ellos a bacterias como *Pseudomonas fluorescens* I-C (Pak *et al.*, 2000), *P. putida* (Cho *et al.*, 2008), *P. pseudoalcaligenes* JS52 (Fiorella & Spain, 1997), *Klebsiella* sp C1 (Chang *et al.*, 2002), *Serratia marcescens* (Montpas *et al.*, 1997) *Clostridium acetobutylicum* (Watrous *et al.*, 2003), *Escherichia coli* (Stenuit *et al.*, 2006) y la levadura *Yarrowia lipolytica* (Ziganshin *et al.*, 2007).

La amplia distribución de microorganismos degradantes de TNT y la abundancia de las vías catabólicas que pueden conducir a su transformación y mineralización proporcionan una oportunidad

para la optimización de los mismos (Esteve-Nuñez *et al.*, 2001; Fritsche & Hofrichter, 2000).

a) *Klebsiella oxytoca*

Son bacterias inmóviles, gram-negativas. Las colonias de *Klebsiella* pueden ser mucoides debido a su cápsula de polisacáridos (Bartram *et al.*, 2003). Es así que para esta misma cepa se ha reportado la presencia de nitroreductasa tipo I (Hyoun-Young *et al.*, 2005) lo que le permite degradar explosivos. *K. oxytoca* se distingue de *K. pneumoniae* por su capacidad para producir indol a partir de triptófano. Asimismo, puede ser resistente a múltiples antibióticos.

El género *Klebsiella* está presente de forma natural en muchos ambientes acuáticos y pueden multiplicarse y alcanzar concentraciones elevadas en aguas ricas en nutrientes, como residuos de fábricas de papel, plantas de acabado textiles y operaciones de procesado de caña de azúcar. Estos microorganismos pueden proliferar en sistemas de distribución de agua, también son excretados en las heces de muchas personas y animales sanos, y se detectan con facilidad en aguas contaminadas por aguas residuales, algunas especies del género *Klebsiella* son fijadoras de nitrógeno (Bagley, 1985).

b) *Serratia marcescens*

Es un bacilo móvil gram negativo que puede crecer a una temperatura que oscila entre 3,5 a 40 °C, en niveles de pH que varían entre 5 y 9. El ambiente en el cual predomina es en condiciones húmedas. Según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, *Serratia marcescens* puede presentar un color blanco, rosa o incluso rojo intenso en su morfología colonial ya que produce pigmentos no difusible insoluble en agua llamada prodigiosina (Williams *et al.*, 1967).

2.1.4.3 Consorcios

Al conocerse las diversas vías de catabolismo del TNT y dados los numerosos compuestos intermediarios durante su degradación, se propone que para el biotratamiento de estas sustancias es necesaria la acción coordinada de una serie de microorganismos para lograr la degradación completa

Estudios realizados recientemente, han demostrado que la degradación de TNT a altas densidades celulares, pueden activar diferentes modelos de biodegradación, que facilite la descontaminación más rápida en sitios con presencia de estos residuos (Kubota *et al.*, 2008). Además Páca *et al.*, (2008) observó que cultivos mixtos son más eficientes en la degradación de 2,4 y 2,6–dinitrotoluenos los cuales son intermediarios en la degradación del TNT.

Por otro lado, recientemente se ha reportado un estudio de degradación de TNT y PETN por consorcios microbianos aislados de suelos impactados por explosivos en el cual se evaluó la dinámica de la comunidad microbiana en un medio mínimo suplementado con TNT y PETN a una concentración final de 150 mg/l cada uno (García, 2011) y se determinó que durante los dos primeros subcultivos se produjeron niveles de hasta $35,2 \pm 11,4$ mg/l de aminodinitrotolueno (amDNTs) a partir de TNT.

2.1.4.4 Rutas metabólicas

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

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

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

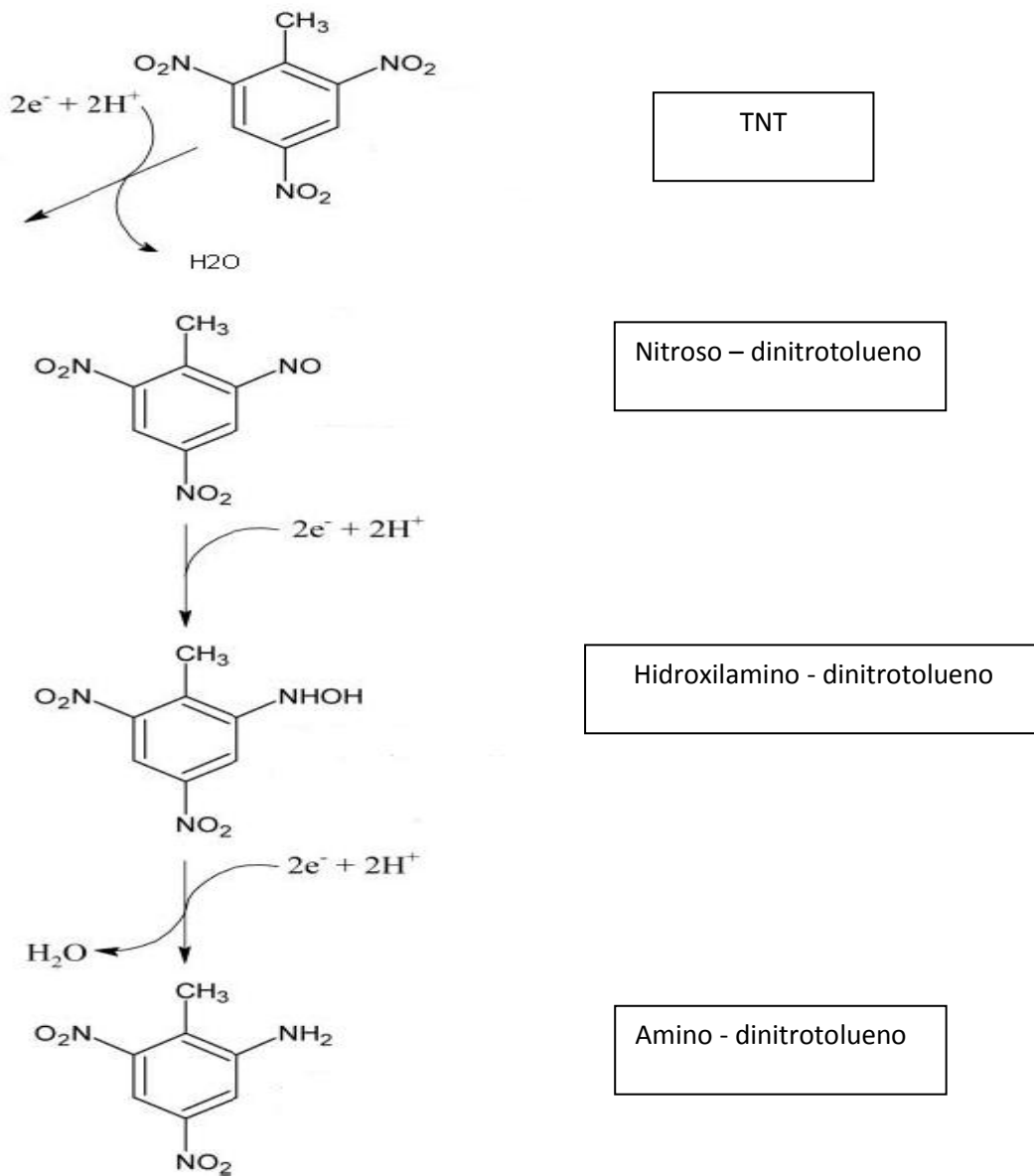
Bajo condiciones de anaerobiosis, se documenta otra vía (Vía IV), la cual consiste en una transformación secuencial de los grupos nitro unido al anillo aromático hacia la correspondiente amina (Villegas, 2009).

2.1.4.4.1 Vía I: Reducción del TNT por enzimas nitroreductasas

Estas enzimas contienen flavo mononucleótido (FMN) como cofactor, usan el NAD(P)H o NADH como el donador de electrones y realizan una reducción secuencial de uno o dos grupos nitro de la molécula de TNT a grupos hidroxilamino o aminos para producir diferentes isómeros de compuestos aminonitroaromaticos (Esteve-Nuñez *et al.*, 2001).

El grupo nitro es reducido solo a estos dos grupos funcionales no más allá, (Figura 2) (Smets *et al.*, 2007). En este caso se ha observado que el TNT es reducido mucho más rápido que el di- y mono-nitrotolueno o sus productos de transformación reducidos (Caballero *et al.*, 2005).

Figura 2: Reducción de TNT mediante enzimas nitroreductasas.

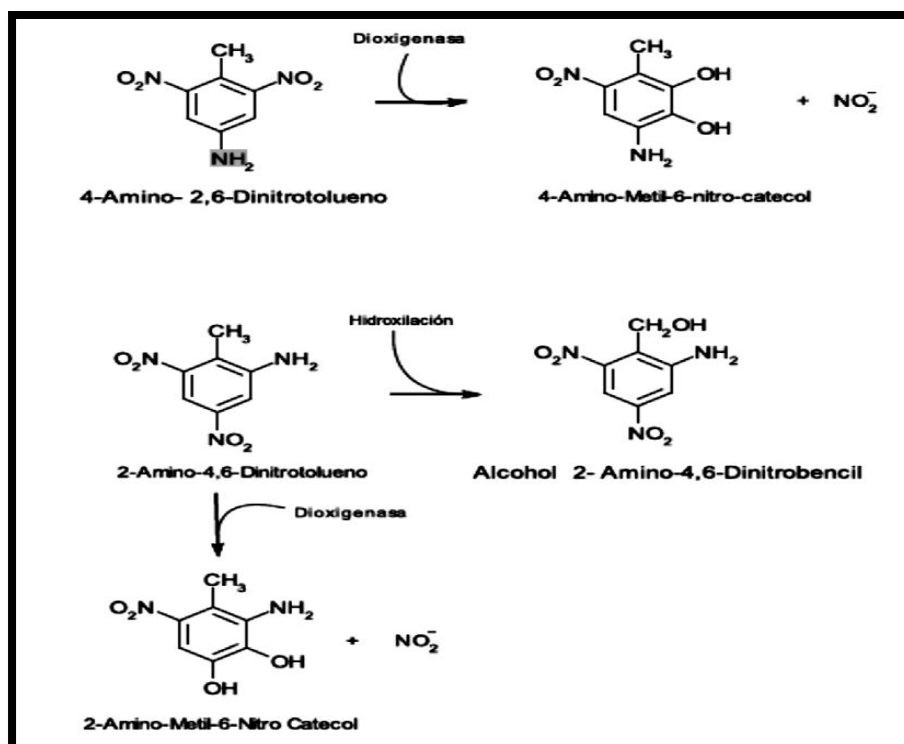


Fuente: Symons & Bruce, 2006.

a) Dioxigenasas

El TNT es fácilmente reducido a una mezcla de isómeros de 2-amino-4,6-dinitrotolueno (2ADNT) y 4-ADNT bajo condiciones ambientales (Spain *et al.*, 2000). Diferentes estudios se han enfocado en el posible ataque oxigenolítico del isómero aminodinitrotolueno (ADNT). Estos son oxidados por dioxigenasas para formar aminometilnitrocatecol con liberación de nitrito o son hidroxilados en el grupo metil para formar alcohol aminodinitrobencil (Figura 3).

Figura 3: Oxidación e hidroxilación de los isómeros aminodinitrotoluenos.

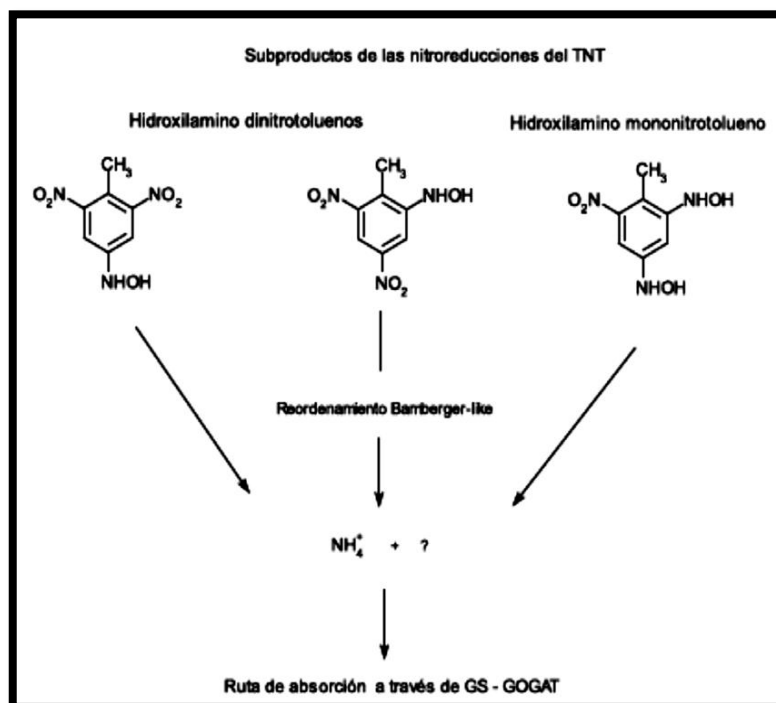


Fuente: Smets *et al.*, 2007.

b) Reordenamiento Bamberger-Like de hidroxilaminos (liberación de amonios)

Mientras que la liberación de nitritos está dado por una o dos vías de denitrinasas, la liberación de amonio está dada después de la reducción de uno de los grupos nitro a hidroxilamino mediado por la enzima *PnrA*, seguido por el reacomodamiento de Bamberger-like (Figura 4), donde el grupo hidroxilamino funcional es redirigido para producir amino e hidroxilamino sustituyentes (Smets *et al.*, 2007).

Figura 4: Reordenamiento Bamberger-like de hidroxilaminos con liberación de amonios y la subsecuente absorción a través de la ruta sintetasa glutamato.

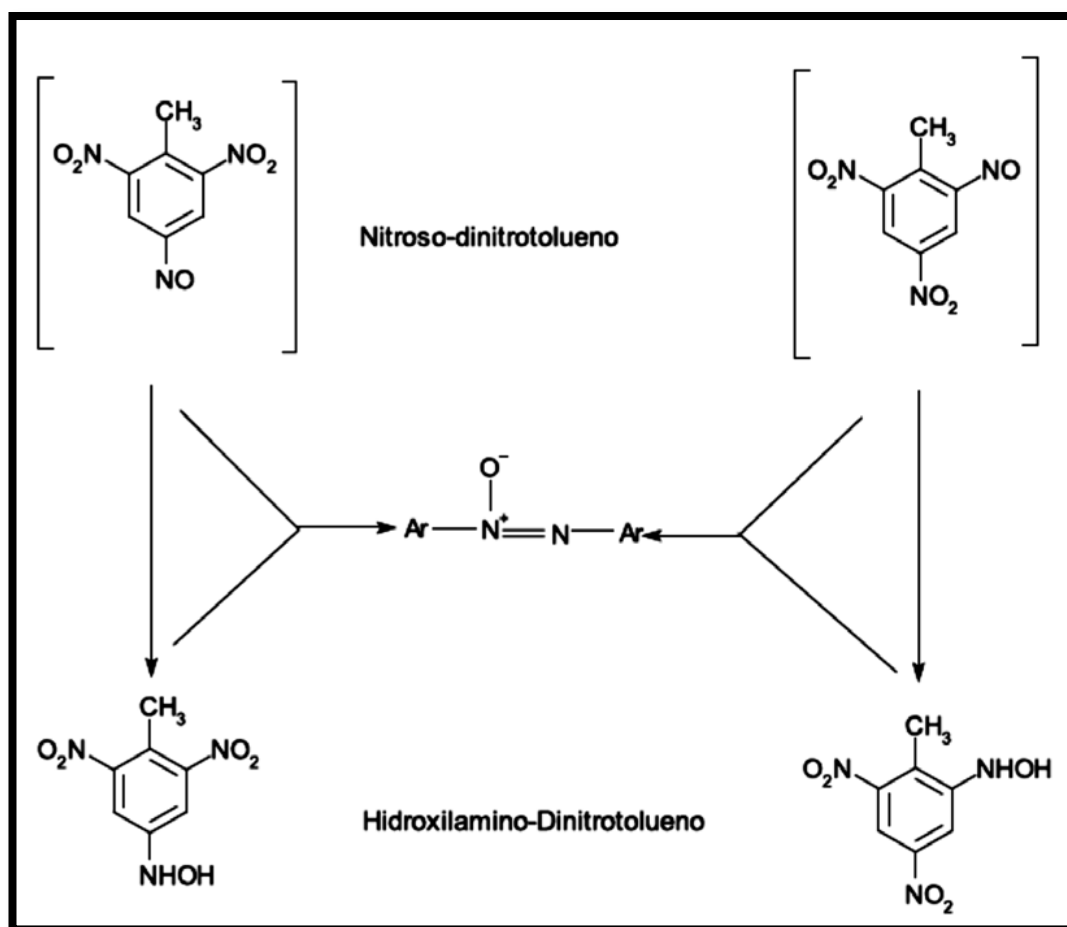


Fuente: Smets *et al.*, 2007

c) Formación de azoxytetranitrotoluenos

Esta ruta se presenta en las tecnologías de remediación, como son el compostaje, procesos con lodos activados y fitorremediación. El compostaje y los lodos activados están basados en el nitro-reducción co-metabólico del TNT por microorganismos no definidos (Thorn *et al.*, 2002) cuyo resultado final de este proceso es que los grupos hidroxilamina y amina del anillo nitro-areno reaccionan con los grupos funcionales quinonas y carbonil de la fracción húmica del suelo, dando lugar a la inmovilización covalente de los derivados de TNT que no son biodisponibles y así exhiben un decrecimiento en la toxicidad. (Lewis *et al.*, 2004). Por lo tanto, este enfoque se basa en el hecho que las reacciones intermedias durante la nitroreducción tienen una alta reactividad química, el balance de masas indica frecuentemente un alto grado de inmovilización o dimerización durante la transformación del TNT (Figura 5).

Figura 5: Formación de dímeros azoxytetranitrotoluenos de la reacción de subproductos nitroso e hidroxilamino de la nitroreducción del TNT.



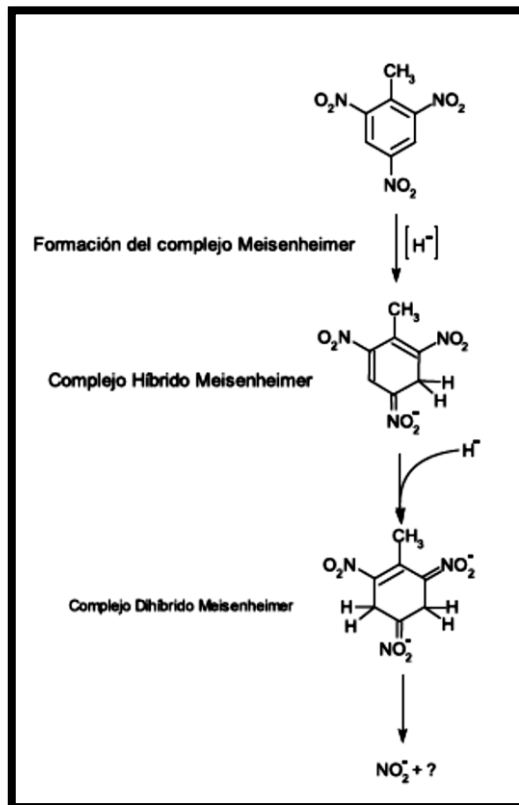
Fuente: Smets *et al.*, 2007)

2.1.4.4.2 Vía II: Formación del complejo Meisenheimer

Algunas de enzimas, además de ser capaces de transformar el TNT por la vía de la nitroreducción tienen la capacidad de liberar nitrito del TNT por denitrificación. La ruta de nitroreducción es catalizada por todas las enzimas, mientras la denitración es solamente catalizada por la PETN reductasas, *XenB* y *NemA* vía la formación del complejo híbrido Meisenheimer (H-TNT) y complejo di-híbrido Meisenheimer (2H-TNT), aunque este último ha sido reportado como un complejo inestable (Park, 2000), también se ha demostrado que puede ser enzimáticamente transformado por enzimas OYE, con una posterior liberación de nitritos (Williams *et al.*, 2004).

La formación de dicho complejo implica la pérdida de las propiedades aromáticas del benceno, como las oxidativas, debido a la presencia de los grupos nitro unidos a sus carbonos 2, 4 y 6, en consecuencia, el potencial redox del TNT disminuye, llevándose a cabo un ataque reductivo que trae consigo la formación de NO_2 y del complejo en mención (Villegas, 2009), como se observa en la Figura 6.

Figura 6: Vía 2- Transformación del complejo Meisenheimer mediante enzimas de la familia Old Yellow Enzyme.



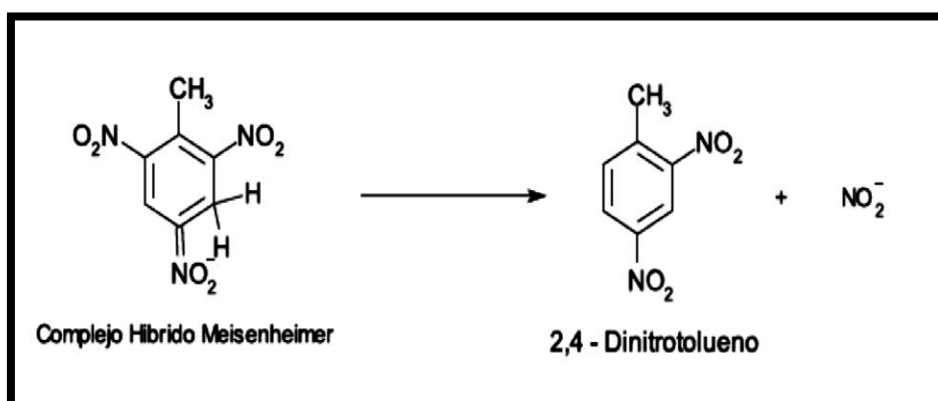
Fuente: *Smets et al., 2007*

Este tipo de metabolismo, es uno de los más complejos y menos conocidos, no se ha determinado con seguridad todos los metabolitos producidos, pero se cree que la etapa final es la mineralización total del TNT (*Vorbeck et al., 1994*).

a) Denitración del complejo Meisenheimer

Esta vía es común en levaduras y hongos, los cuales presentan una capacidad de mineralización del TNT mayor al 20%, esto en gran parte debido a su sistema lignolítico (Nyanhongo *et al.*, 2005). La ruta está dada en dos pasos, primero la reducción del anillo aromático del TNT vía complejo Meisenheimer y a partir de este complejo por una secuencia de desnitración finaliza en 2,4 dinitrotolueno (2,4-DNT) como se observa en la Figura 7.

Figura 7: Denitración del complejo Meisenheimer.



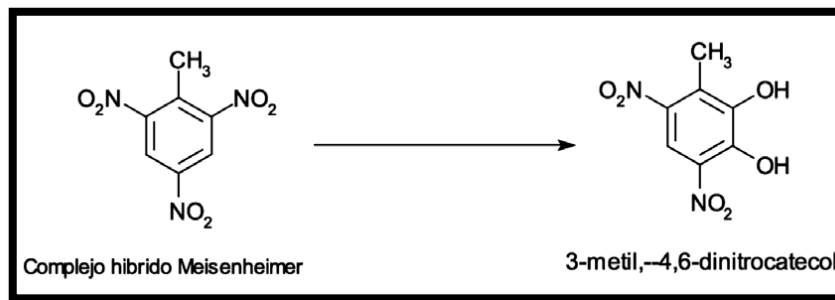
Fuente: Smets *et al.*, 2007.

2.1.4.4.3 Vía III: Oxigenolítica

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

sostenido en una mezcla de TNT y 2,4-DNT como fuente de carbono y nitrógeno (Tront *et al.*, 2005). Patrones de isótopos estables confirman que el catecol es derivado del TNT y es potencialmente el resultado de una desnitración del anillo benzoico por la dihidroxilación de TNT (Figura 8).

Figura 8: Ruta oxigenolítica del TNT.



Fuente: Smets *et al.*, 2007.

2.1.4.5 Medición de la degradación de TNT

Entre los métodos más utilizados para cuantificar explosivos y los metabolitos generados se encuentran:

a) Cromatografía

Es el método más reportado en la literatura, se caracteriza por su confiabilidad y permite identificar y cuantificar diferentes metabolitos. Es recomendado por la EPA para determinar estos compuestos en muestras acuosas y de suelo. Se puede utilizar cromatografía de gases o líquida; sin embargo, para conocer con mayor exactitud los compuestos generados durante la degradación,

se recomienda el uso de espectrofotometría de masas (EPA, 2006).

b) Métodos colorimétricos

Es un método rápido y sencillo para detectar explosivos en suelo y agua. Durante el procedimiento reaccionan los compuestos polinitroaromáticos con soluciones básicas generando un color en la solución que puede variar desde rojo, azul, morado o amarillo, según el compuesto detectado (Yinon, 1999).

c) Determinación de nitritos y amonio

Existen métodos colorimétricos para cuantificar la producción de subproductos nitrogenados durante la degradación de explosivos. Estos métodos son rápidos y económicos (en comparación a otras técnicas), y podrían indicar la ruta metabólica empleada durante el proceso de degradación. Los métodos más empleados son Griess y Berthelot, para cuantificar nitritos y amonio, respectivamente (Stenuit *et al*, 2009).

d) Métodos inmunoquímicos

Se basan en la reacción entre el metabolito blanco y un anticuerpo específico. La cuantificación se realiza a través del cambio de color o por radioactividad o por fluorescencia y es ampliamente utilizado para la detección rápida de TNT en agua o suelo (Yinon, 1999).

III. MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Materiales y equipos

3.1.1 Material biológico

- 18 cepas bacterianas: Aisladas de aguas y suelos de ambientes mineros de las regiones La Libertad, Lima y zonas petroleras de la región Ucayali (Pucallpa), pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.1.2 Material químico

- TNT (99% de pureza): Proporcionada por una industria nacional dedicada a la fabricación de dispositivos explosivos.
- K_2HPO_4
- $MgSO_4$
- NaCl
- KOH
- Ácido succínico
- Ácido acético glacial
- Ácido sulfanílico
- α naftilamina
- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Agua miliQ grado HPLC,
- Agua ultrapura (grado molecular),

- Agar agar
- Caldo soya tripticasa (TSB)
- Agarosa
- Tris base
- Isopropanol
- Etanol

3.1.3 Material de biología molecular

- Kit Wizard Promega®: Para la extracción de ADN
- Se emplearon los iniciadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') con 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT-3') y 518 F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG-3') con 800R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3') sintetizados por Invitrogen® para la amplificación parcial del gen rRNA 16S de bacteria
- Marcador molecular DNA Ladder (Promega®),
- KOD HOT start DNA polimerasa (Novagen®),

3.1.4 Programas bioinformáticos

- BlastN versión 2.0 (Altschul *et al.*, 1990): Para determinar la correspondencia de las secuencias obtenidas con las de la base de datos del GenBank/EMBL/DDBJ.
- BioEdit versión 7.1.3 (Hall *et al.*, 1999): Para el alineamiento y edición de las secuencias del gen rRNA 16S.

- Mega versión 5.0 (Kumar *et al.*, 2008): Para inferir el árbol filogenético de las cepas degradadoras de TNT con las respectivas secuencias del gen rRNA 16S.

3.1.5 Equipos

- Micropipetas Eppendorf®
- Microcentrífuga MIKRO®
- Potenciómetro HANNA® Instruments pH210
- Agitador rotatorio IKA® KS 260
- Refrigeradora y congeladora Bosch®
- Espectrofotómetro UNICO® UV-2100
- Microscopio BOECO®,
- HPLC VWR Hitachi Chromaster 5430 Diode Array Detector
- Portacolumna para HPLC Manu-CART®
- Columna cromatográfica Purospher® RP-18 HC (5µm)
- Cámara de electroforesis Biometra®
- Transiluminador Biometra®
- Cabina de flujo laminar Nuair®
- Termociclador Minicycler®
- Purificador de agua tipo 3 Merck®

3.2 Método

3.2.1 Preselección de cepas con capacidad degradadora de TNT

3.2.1.1 Obtención del inóculo bacteriano

Se reactivaron las cepas bacterianas en 1,5 ml de TSB (Caldo soya tripticasa), incubándose durante 24 horas a temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Para obtener los pellets, que constituyeron los inóculos, se centrifugaron las muestras a 10 000 rpm x 5 minutos y se lavaron 2 veces con solución salina al 0,85%.

3.2.4.2 Cultivo de las cepas bacterianas en M.M. con TNT

El inóculo de cada cepa bacteriana fue trasvasado a 10 ml de medio de cultivo Mínimo (M.M.) pH 7,05 conteniendo 20 mg/l de TNT como concentración final, luego incubado a temperatura ambiente sobre un agitador orbital a 150 rpm durante 10 días. Los cultivos obtenidos fueron centrifugados y lavados como en **4.2.1.1.** para obtener los inóculos de los siguientes subcultivos.

Se subcultivó el inóculo obtenido en 10 ml de caldo M.M. conteniendo 40 mg/l de TNT bajo las mismas condiciones anteriores por 5 días. Posteriormente, de estos subcultivos se obtuvieron nuevos inóculos que

fueron sembrados en medio M.M. fresco conteniendo 60 mg/l de TNT bajo las mismas condiciones durante 5 días.

Los cultivos obtenidos en M.M. conteniendo 20, 40 y 60 mg/l de TNT fueron caracterizados evaluando el cambio de color del medio de cultivo a amarillo y/o rojo y anotando la turbidez de cada uno.

Las cepas bacterianas cultivadas en el medio M.M. con 20, 40 y 60 mg/l de TNT que presentaron en estos 3 medios de cultivo cambio de color y principalmente turbidez fueron preseleccionados separándolas para la siguiente etapa de selección. Estas fueron conservadas en cepario con TNT a 4 °C.

3.2.5 Selección de las cepas bacterianas degradadoras de TNT para la conformación del consorcio

Las cepas preseleccionadas fueron reactivadas desde cepario en 1,5 ml de caldo TSB por triplicado, los cuales fueron incubados a temperatura ambiente durante 24 horas, luego centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos y lavado dos veces, los pellets resultante fueron mezclados en uno solo, el mismo que fue agregado a 100 ml de M.M. en una cantidad suficiente para que el medio tuviera una concentración bacteriana de 0,5 de la escala de McFarland.

El medio fue incubado a temperatura ambiente durante 48 horas sobre un shaker con 150 rpm a temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Se evaluó la concentración de nitritos por método químico, el TNT residual en HPLC y la concentración bacteriana al inicio y al final de la incubación. Como último criterio para la selección se tomó en cuenta si las cepas presentaban antagonismo.

a) Evaluación de nitritos (Fries & Getrost, 1977)

- Se tomó 2,5 ml de muestra del caldo de cultivo para ser colocado en un tubo de ensayo.
- Se adicionó al tubo 250 ul de ácido sulfanílico, homogenizándolo por agitación durante 2 a 4 minutos.
- Se agregó 250 ul de α -naftilamina, 250ul de acetato de sodio al 25 % y 2,5 ml de ácido acético glacial.
- Se esperó 10 minutos hasta que se estabilizó la reacción y se hizo la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 520 nm.
- Se comparó los resultados con la curva de calibración ajustada con soluciones estándar de nitrito de sodio a concentraciones de 0,5; 0,7; 1; 2 y 4 mg/l.

b) Evaluación de degradación de TNT

Se aplicó el método 8330B del EPA utilizado para el análisis de muestras de agua con nitroaromáticos, nitroamidas y ésteres de nitrato mediante la técnica de HPLC RP (fase reversa). Las condiciones de corrida fueron establecidas según el protocolo de Merck recomendado para el análisis de aguas.

El equipo utilizado fue un HPLC VWR Hitachi Chromaster 5430 Diode Array Detector. La fase inmóvil consistió en una columna cromatográfica de sílica Purospher® RP-18 HC y como fase móvil una mezcla formada por acetonitrilo y metanol (20:80 v/v) y como buffer sodiodihidrogenofosfato ($c = 0,01 \text{ mol/l}$, pH 4,5) con una velocidad de flujo de 0,8 ml/min con un tiempo de corrida de 70 minutos por muestra y leído en un detector de diodos (DAD) a 230 nm.

Los ensayos se hicieron previo preparado de curva patrón con soluciones estándares de TNT de concentraciones conocidas, lo cual, permitió trazar un punto de comparación para determinar la concentración del TNT a través del tiempo. Siendo estos de 5, 10, 20, 50 y 100 mg/l.

El porcentaje de degradación de TNT (%) se determinó aplicando la fórmula:

$$\% TNT = \frac{TNT_0 - TNT_t}{TNT_0} \times 100$$

Donde:

$TNT_0 =$ Concentración inicial del TNT

$TNT_t =$ Concentración del TNT en el tiempo evaluado

c) Evaluación del crecimiento microbiano

c.1) Espectrofotometría

Se tomó 3 ml de caldo de cultivo previamente homogenizado para luego distribuirlos en 3 cubetas del espectrofotómetro, 1 ml por cada cubeta para finalmente realizar su lectura de densidad óptica a 600 nm.

c.2) Escala McFarland

Se tomó 3 ml de caldo de cultivo previamente homogenizado para ser agregado en un tubo de ensayo el cual fue colocado en un turbidímetro de McFarland para determinar su concentración en términos de unidades de McFarland.

c.3) Cámara Petroff Hausser

Se tomó con una pipeta Pasteur 12 ul de caldo de cultivo para ser colocado en la cámara de Petroff Hausser, el cual fue observado al microscopio para realizar el conteo de bacterias presentes en la muestra y establecer su concentración.

3.2.6 Selección del consorcio degradador de TNT

A las cepas que presentaron mayor porcentaje de degradación se les realizó la prueba de antagonismo, considerando que para ser un consorcio no deben ser antagónicos, aplicando la técnica de Gauze modificada para evaluar la interacción entre las bacterias (Orjuela *et al.*, 2003; Varón, 2013). La prueba consistió en dividir en dos segmentos a una placa Petri con TSA y MM sólido en el cual se sembró cada cepa masivamente de tal manera que el estriado quedara enfrentada una con respecto a otra.

Cada una de las pruebas aplicadas se realizó por triplicado y se monitoreó cada 24 horas por tres días y se midió el halo de inhibición generado. Las condiciones de incubación fueron a temperatura ambiente.

3.2.4 Identificación molecular de las bacterias degradadoras de TNT

La identificación se realizó acorde a los siguientes procesos para cada cepa seleccionada:

- a) **Purificación de DNA genómico.** Las cepas fueron cultivadas en caldo TSB por 12 a 16 horas a 28 °C y el protocolo estuvo sujeto a las indicaciones del Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega®).
- b) **Electroforesis de DNA en gel de agarosa.** Se empleó geles de agarosa al 1% en tampón TAE al 0,5%, 1 Kb DNA *Ladder* (Promega®) como marcador de tamaño molecular, y se empleó 70 V durante una hora para la corrida electroforética. Para teñir el ADN se sumergió el gel en bromuro de etidio al 0,5% y se reveló las bandas de ADN en un transiluminador de luz UV.
- c) **Amplificación del rRNA 16S.** Se emplearon los iniciadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') con1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT-3') y 518 F (CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG) 800R (TAC CAG GGT ATC TAA TCC) el tamaño del producto de PCR esperado fue de 500 pb correspondiente al primer tramo del gen rRNA 16S (Abanto, 2008), y se siguió las indicaciones de la KOD HOT

start DNA polimerasa (Novagen®) para la reacción de PCR, la cual consistió en: desnaturalización inicial 94 °C por 2 minutos, 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación a 55 °C por 1 minuto, amplificación a 72 °C por 2 minutos y amplificación final a 72 °C por 10 min.

d) Secuenciación del gen rRNA 16S. Los amplificados fueron secuenciados por la empresa MACROGEN, para lo cual se envió 30-50 µl de amplicón por reacción y los iniciadores a una concentración de 20 pmol/µl (5 pmol/reacción).

e) Caracterización molecular. Las secuencias consenso del gen rRNA 16S de las cepas seleccionadas fueron alineadas con los iniciadores 27F, 1492R y 518 F, 800R con el programa BioEdit 7.0.9 con el fin de comprobar que no se encontraban en las secuencias. Luego, éstas fueron comparadas con la base de datos del GenBank/EMBL/DDBJ usando la plataforma del programa local de alineamiento de secuencias BlastN versión 2.0. Seguido, se realizó un alineamiento múltiple con el programa BioEdit 7.0.9 con secuencias que presentaron similitud mayor o igual a 97% y Valor E 0.0, además de secuencias de otras especies relacionadas obtenidas de la base de datos. Luego, los *gaps* fueron tratados con el mismo programa y finalmente se construyó el árbol filogenético con el programa Mega 5.0 empleando el método de Neighbor-Joining con un modelo Compuesto de Máxima Verosimilitud

3.2.7 Determinación del porcentaje de degradación de TNT de las cepas y el consorcio bacteriano seleccionados

Las cepas seleccionadas fueron reactivadas en 1,5 ml de caldo TSB por triplicado, los cuales fueron incubados a temperatura ambiente durante 24 horas, luego centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos y lavado por dos veces los pellets resultantes. Los tres pellets resultantes de una cepa fueron mezclados en uno solo. Los pellets de estas cepas finalmente fueron mezclados en partes iguales para formar el consorcio, de tal forma que en los tres tratamientos se ajustaron a la escala 0,5 de McFarland. Se incubó a temperatura ambiente a 150 rpm en un agitador orbital durante 72 horas.

Se evaluó el crecimiento celular con cámara Petroff Hausser, además de la liberación de nitritos y TNT residual como en **4.2.1.3** cada 24 horas por 72 horas.

3.2.8 Establecimiento de la mayor capacidad de degradación de TNT

Los valores de degradación de TNT mostrados por las bacterias seleccionadas y el consorcio fueron sometidos al análisis del ANVA, posteriormente a la prueba de Tuckey para establecer quien presentó el mayor porcentaje de degradación de TNT.

IV. RESULTADOS

4.1 Cepas bacterianas preseleccionadas

Tabla 4: Cepas bacterianas preseleccionadas subcultivadas en M.M. líquido con TNT.

PROCEDENCIA	CEPA	Primer subcultivo 20mg/l TNT		Segundo subcultivo 40 mg/ITNT	
		TURBIDEZ a las 48 horas	COLOR (10 días de incubación)	TURBIDEZ (48 horas)	COLOR (5 días de incubación)
Suelo contaminado con derivados de hidrocarburo (Región Ucayali – Pucallpa)	UP1*	+++	Amarillo	+++	Crema
	UP2	+++	Amarillo	++	Amarillo
	UP4	++	Amarillo	+	Amarillo
	UP5	+	Crema	+	Crema
	UP6	+	Crema	+	Crema
	UP8	++	Amarillo	+++	Amarillo
	UP9	+	Blanco	+	Blanco
	UP10*	+++	Amarillo	++	Crema
Suelo contaminado con derivados de hidrocarburo (Región Lima)	M1C	+	Crema	++	Crema
	M1A	+	Crema	++	Amarillo
Sistema de Tratamiento de Relave Minero (Región La Libertad)	3T412C*	+++	Crema	+++	Crema
	1T11	+	Amarillo	-	Transparente
	2T431*	++	Crema	+++	Amarillo
	3T11	++	Amarillo	+++	Crema
	3T32	-	Crema	-	Transparente
	3T412	++	Crema	+++	Crema
	3T422	+	Crema	+	Crema
	2T21	+	Crema	+	Crema

(Continúa en la siguiente página)

Tabla 4: Cepas bacterianas preseleccionadas subcultivadas en M.M. líquido con TNT.

PROCEDENCIA	CEPA	Tercer subcultivo 60mg/l TNT	
		TURBIDEZ (48 horas)	COLOR (5 días de incubación)
Suelo contaminado con derivados de hidrocarburo (Región Ucayali – Pucallpa)	UP1*	+++	Amarillo
	UP2	+	Naranja claro
	UP4	+	Amarillo
	UP5	-	Crema
	UP6	-	Crema
	UP8	+	Naranja claro
	UP9	-	Transparente
	UP10*	++	Naranja
Suelo contaminado con derivados de hidrocarburo (Región Lima)	M1C	+	Naranja claro
	M1A	+	Crema
Sistema de Tratamiento de Relave Minero (Región La Libertad)	3T412C*	+++	Naranja
	1T11	-	Transparente
	2T431*	+++	Amarillo
	3T11	+	Naranja claro
	3T32	-	Transparente
	3T412	+	Naranja claro
	3T422	+	Crema
	2T21	+	Crema

Fuente: Elaboración propia

+++ : Alta turbidez

++ : Media turbidez

+ : Baja turbidez

(*) : Cepas preseleccionadas

En la Tabla 4 se observa que las 18 cepas evaluadas mostraron divergencias en el crecimiento (alto, medio, bajo) y variabilidad en los

colores del medio de cultivo (crema, amarillo, naranja) sin embargo las cepas preseleccionadas corresponden a las que mostraron uniformidad en la turbidez en los 3 subcultivos a 20, 40 y 60 mg/ml, siendo estas las cepas UP1, UP10, 3T412C y 2T431.

4.2 Características microbiológicas de las cepas preseleccionadas

Tabla 5: Características microscópicas y macroscópicas de las cepas bacterianas preseleccionadas.

CEPA	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS		CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS COLONIALES
	FORMA	COLORACIÓN	
UP1	Bacilos	Gram negativo	Color blanco, borde regular redondo, colonias convexas
UP10	Bacilos	Gram negativo	Crema, borde aserrado, colonias planas
2T431	Coco bacilos	Gram negativo	Verde fosforescente, borde regular, colonias convexas
3T412C	Coco bacilos	Gram negativo	Crema, borde plano e irregular, centro convexo

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 5 se muestra que las cepas preseleccionadas corresponden a bacilos y coco bacilos gram negativos, cuya características macroscópicas se evaluaron en medio TSA tras 24 horas de incubación a 37°C (Anexo 1 y Anexo 2).

Tabla 6: Población bacteriana a las 0 y 48 horas de las cepas preseleccionadas empleando 3 técnicas diferentes de recuento.

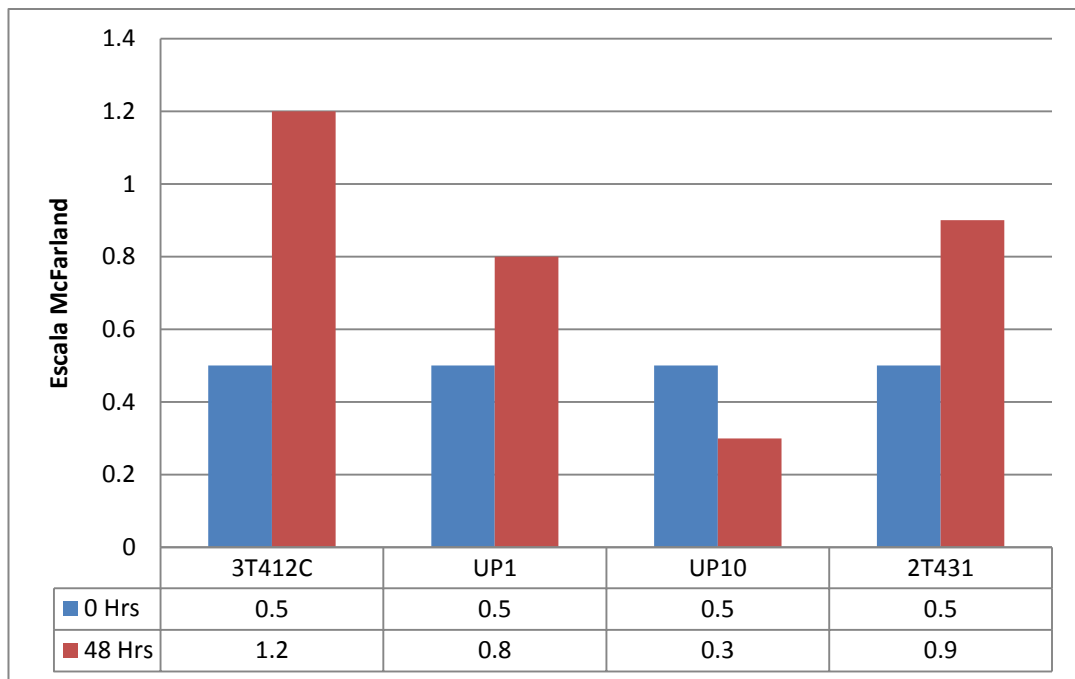
Técnica de recuento*	Cepa	Tiempo (horas)		Incremento poblacional
		0	48	
McFarland (Escala McFarland)	3T412C	0,5	1,2	0,7
	UP1	0,5	0,8	0,3
	UP10	0,5	0,3	-0,2
	2T431	0,5	0,9	0,4
Espectrofotometría (DO_{600nm})	3T412C	0,206	0,333	0,127
	UP1	0,149	0,287	0,138
	UP10	0,11	0,089	-0,021
	2T431	0,149	0,285	0,136
Cámara Petroff Hausser (ufc/ml)	3T412C	1,80E+08	3,90E+08	2,10E+08
	UP1	2,05E+08	3,30E+08	1,25E+08
	UP10	1,20E+08	3,50E+07	-8,50E+07
	2T431	2,50E+08	6,90E+08	4,40E+08

Fuente: Elaboración propia

*Los valores son el promedio de 3 repeticiones.

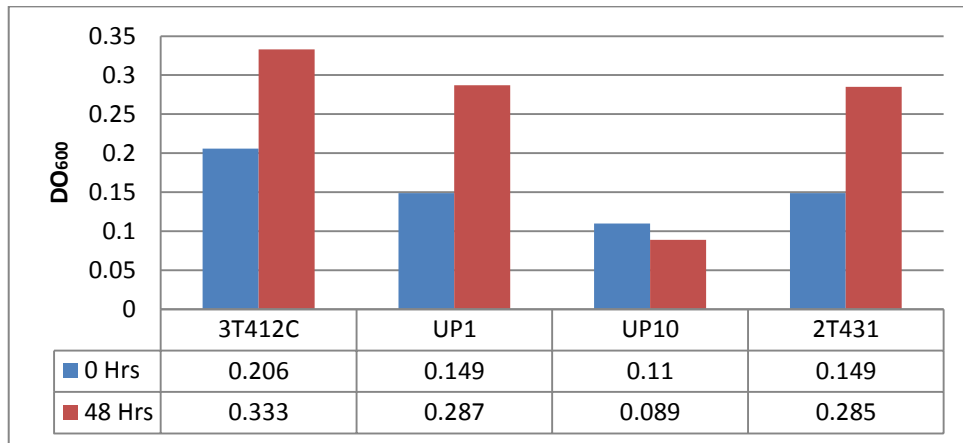
En la Tabla 6 se observa el mayor incremento poblacional en el método McFarland para la cepa 3T412C con 0,7 en el método de densidad óptica para la cepa UP1 con 0,138 y con el método de cámara Petroff Hausser para la cepa 2T431 con un incremento de 4,4 E+08 ufc/ml. Sin embargo las tres técnicas presentan una disminución de población bacteriana para la cepa UP10 (Figura 9, Figura 10, Figura 11).

Figura 9: Población para cada cepa bacteriana preseleccionada empleando la técnica de recuento con la Escala McFarland a las 0 y 48 horas



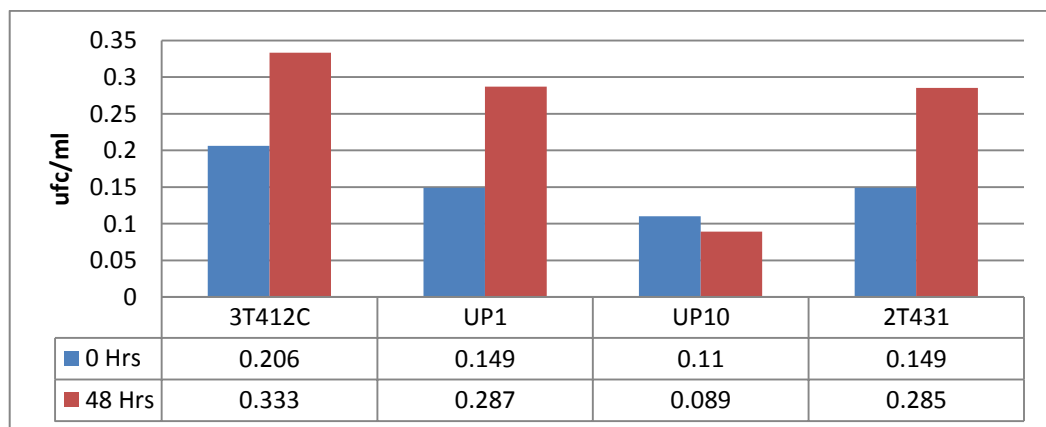
Fuente: Elaboración propia

Figura 10: Población para cada cepa bacteriana preseleccionada empleando la técnica de recuento por espectrofotometría $DO_{600\text{ nm}}$ a las 0 y 48 horas.



Fuente: Elaboración propia

Figura 11: Población para cada cepa bacteriana preseleccionada empleando la técnica de recuento por cámara Petroff Hausser a las 0 y 48 horas.



Fuente: Elaboración propia

4.3 Análisis de la degradación de TNT de las cepas preseleccionadas

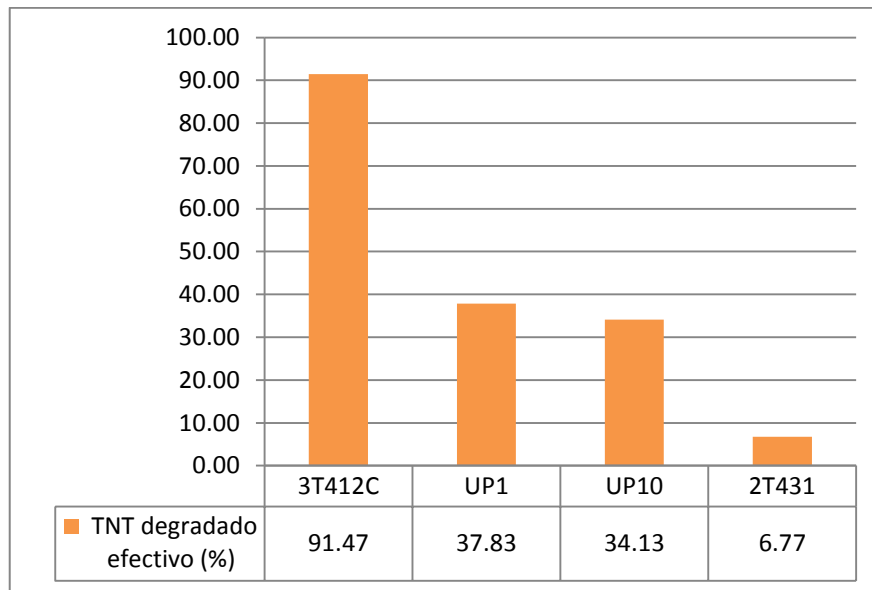
Tabla 7: Valores de TNT residual y degradado en el medio de cultivo para cada cepa bacteriana preseleccionada a las 0 y 48 horas determinado HPLC.

CEPA	0 Horas		48 Horas		TNT degradado efectivo (mg/l)	Porcentaje de TNT degradado efectivo (%)
	TNT Residual (mg/l)	TNT degradado (mg/l)	TNT Residual (mg/l)	TNT degradado (mg/l)		
3T412C	60	0	1,24	58,76	54,88	91,47
UP1	60	0	33,42	26,58	22,7	37,83
UP10	60	0	35,64	24,36	20,48	34,13
2T431	60	0	52,06	7,94	4,06	6,77
CONTROL	60	0	56,12	3,88	0	0

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 7 y Figura 12 se muestran los mayores valores de TNT degradado efectivo siendo para 3T412C 91,47% y UP1 con 37,83%, mientras que 2T431 obtuvo el menor porcentaje con 6,77%.

Figura 12: Porcentaje de TNT degradado efectivo para cada cepa bacteriana preseleccionada.



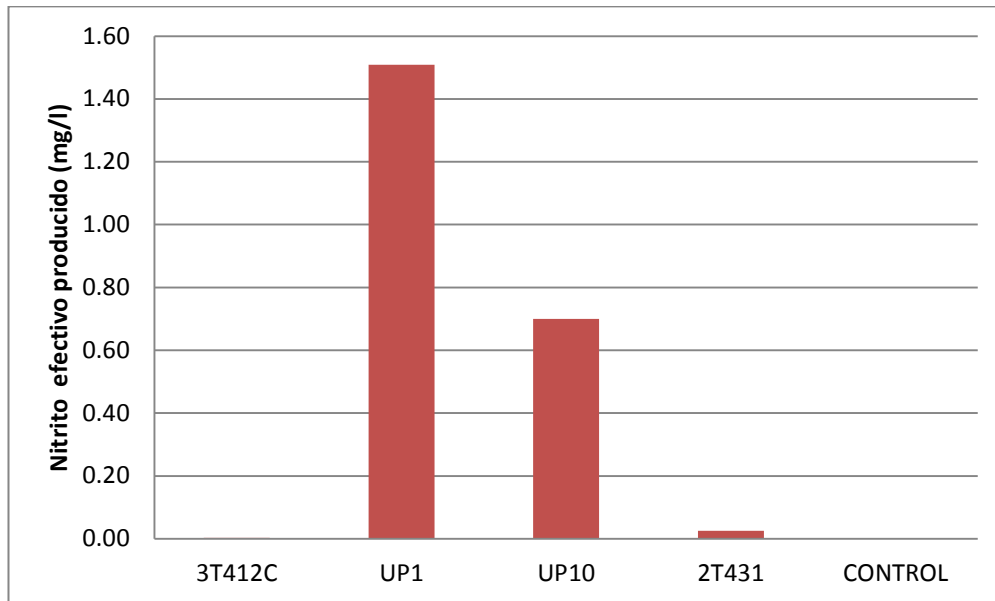
Fuente: Elaboración propia

Tabla 8: Valores de nitrito (mg/l) producidos por cepa bacteriana a las 0 y 48 horas en el medio de cultivo.

CEPA	TIEMPO		
	0 Horas	48 Horas	
	Concentración (mg/l)	Concentración (mg/l)	Nitrito efectivo producido (mg/l)
3T412C	0,23	0,23	0
UP1	0,23	1,74	1,51
UP10	0,23	0,93	0,70
2T431	0,23	0,26	0,03
CONTROL	0,23	0,23	0

Fuente: Elaboración propia.

Figura 13: Valores de nitrito (mg/l) efectivos producidos por cepa bacteriana preseleccionada a las 0 y 48 horas en el medio de cultivo



Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 8 y Figura 13 se muestra que el mayor valor de nitrito liberado fue para UP1 con 1,51 mg/l mientras que 3T412C no liberó nitrito tras 48 horas.

4.4 Cepas bacterianas seleccionadas y formación del consorcio

Las cepas seleccionadas fueron 3T412C y UP1 que no presentaron antagonismo tras la realización de la prueba de Gauze en medio TSA y M.M. sólido. Además en M.M. agarificado desarrollaron tenue crecimiento celular a comparación de en TSA (Anexo 13 y Anexo 14).

4.5 Producción y productividad celular

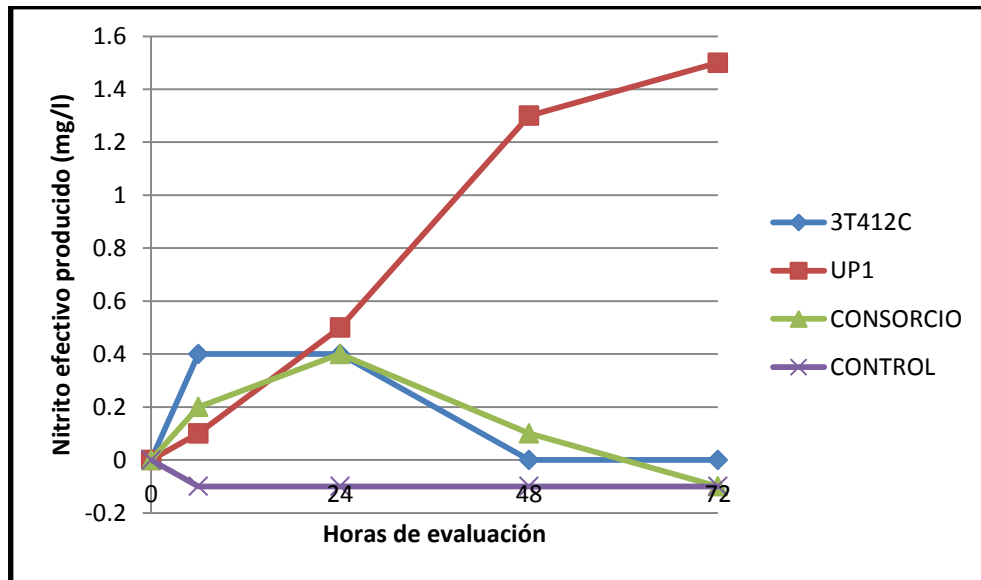
Tabla 9: Producción (mg/l) y productividad (mg/l.h) de las cepas y el consorcio en relación al nitrito evaluado.

Tiempo de evaluación (horas)	CEPA							
	CONTROL		3T412C		UP1		CONSORCIO	
	Produccion	Productividad	Produccion	Productividad	Produccion	Productividad	Produccion	Productividad
6	-0,1	--	0,4	0,07	0,1	0,02	0,2	0,03
24	-0,1	--	0,4	0,02	0,5	0,02	0,4	0,02
48	-0,1	--	0	0	1,30	0,03	0,10	0
72	-0,1	--	0	0	1,50	0,02	-0,10	0

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 9 se observa que UP1 presentó una producción creciente de nitrito hasta las 72 horas con un máximo de 1,5 mg/l y una productividad de 0,03 mg/l.h y la cepa 3T412C liberó un máximo de 0,4 mg/l de nitrito a las 6 horas pero con una mayor productividad de 0,07 mg/l.h.

Figura 14: Nitrito efectivo producido por las cepas y el consorcio



Fuente: Elaboración propia

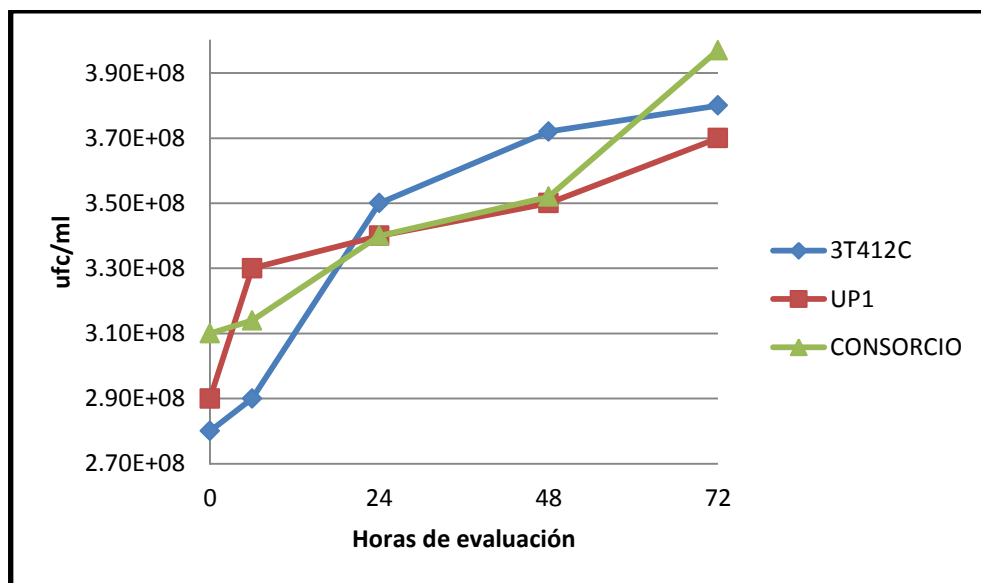
En la Figura 14 se observa que la cepa 3T412C liberó 0,4 mg/l de nitrito en 24 horas el que ya no se detectó a las 48 y 72 horas. El consorcio mostró un comportamiento similar pues 0,4 mg/l se produjeron a las 24 horas y 0,1 mg/l a las 48 horas.

Tabla 10: Recuento poblacional bacteriano (ufc/ml) empleando cámara Petroff-Hausser.

Tratamiento	Horas de evaluación				
	0	6	24	48	72
3T412C	2,80E+08	2,90E+08	3,50E+08	3,72E+08	3,80E+08
UP1	2,90E+08	3,30E+08	3,40E+08	3,50E+08	3,70E+08
CONSORCIO	3,10E+08	3,14E+08	3,40E+08	3,52E+08	3,97E+08

Fuente: Elaboración propia

Figura 15: Recuento poblacional bacteriano (ufc/ml) empleando cámara Petroff Hausser



Fuente: Elaboración propia

La Tabla 10 y Figura 15 muestran los recuentos poblacionales por cámara Petroff Hausser, en los que el equivalente para el 0,5 McFarland son valores entre 2,80E+08 y 3,10E+08 ufc/ml, los mismos que van aumentando progresivamente hasta las 72 horas.

Tabla 11: Producción (ufc/ml) y productividad (ufc/ml.h) del crecimiento celular en medio de cultivo Mínimo.

Tiempo de evaluación (horas)	CEPAS					
	3T412C		UP1		CONSORCIO	
	Produccion	Productividad	Produccion	Productividad	Produccion	Productividad
6	1,00E+07	1,67E+06	4,00E+07	6,67E+06	4,00E+06	6,67E+05
24	7,00E+07	2,92E+06	5,00E+07	2,08E+06	3,00E+07	1,08E+06
48	9,20E+07	1,92E+06	6,00E+07	1,25E+06	4,20E+07	2,50E+05
72	1,00E+08	1,39E+06	8,00E+07	1,11E+06	8,70E+07	6,25E+05

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 11 se observa que el mayor valor de productividad celular fue para UP1 con 6,67E+06 ufc/ml.h, en cambio los valores de producción registran un máximo a las 72 horas para los tres tratamientos, siendo la mayor producción para 3T412C con 1,00E+08.

4.6 Degradación del TNT

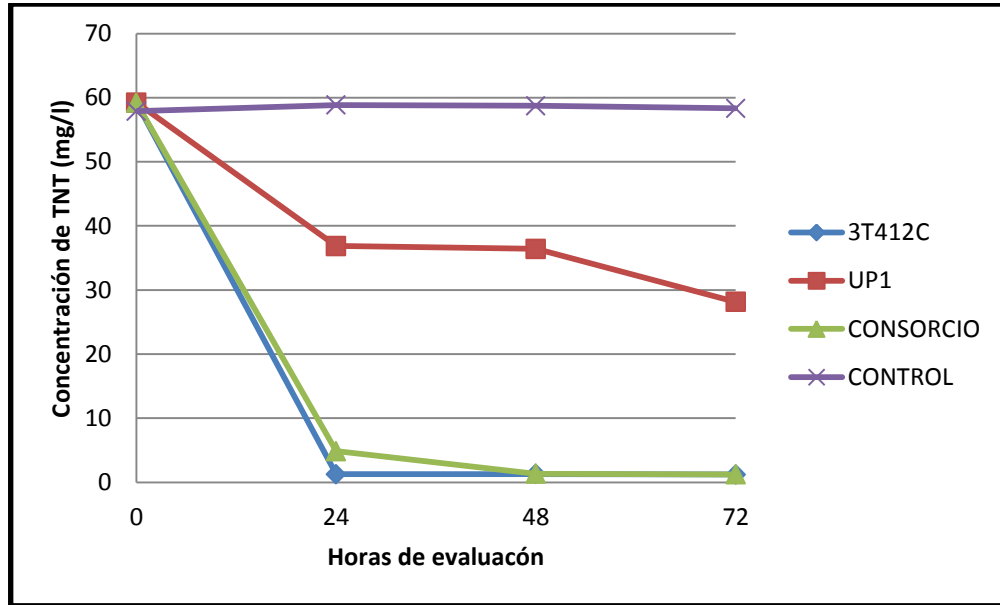
Tabla 12: TNT degradado por las cepas y el consorcio seleccionado.

CEPA	PARAMETRO	Tiempo evaluado (horas)			
		0	24	48	72
3T412C	TNT no degradado (mg/l)	59,23	1,27	1,28	1,22
	TNT degradado (mg/l)		57,96	57,95	58,01
	% TNT degradado (%)		97,86	97,84	97,94
	Tasa de degradación (mg/l.h)		2,42	1,21	0,81
UP1	TNT no degradado (mg/l)	59,23	36,85	36,42	28,16
	TNT degradado (mg/l)		22,38	22,81	3107
	% TNT degradado (%)		37,87	38,50	52,45
	Tasa de degradación (mg/l.h)		0,93	0,48	0,43
CONSORCIO	TNT no degradado (mg/l)	59,23	4,85	1,34	1,24
	TNT degradado (mg/l)		54,38	57,89	57,99
	% TNT degradado (%)		91,81	97,73	97,90
	Tasa de degradación (mg/l.h)		2,27	1,21	0,81
CONTROL	TNT no degradado (mg/l)	57,89	58,86	58,72	58,32

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 12 se muestran los datos en relación a la degradación de TNT por HPLC donde la mayor tasa de degradación fue para 3T412C en 24 horas con un valor de 2,42 mg/l.h, le continúa el consorcio con 2,27 mg/l.h y por último UP1 con 0,93 mg/l.h.

Figura 16: TNT residual en el medio de cultivo de las cepas bacterianas y el consorcio



Fuente: Elaboración propia

En la Figura 16 se observan las curvas de degradación del TNT por las cepas y el consorcio seleccionados siendo la cepa 3T412C y el consorcio los que presentaron mayor pendiente de degradación.

4.7 Análisis estadístico

Se procesaron los porcentajes de degradación obtenidos utilizando el diseño completamente aleatorizado con 3 repeticiones en un arreglo factorial de 4x3, al 0,05 de probabilidad (95% de confiabilidad).

Tabla 13: Análisis de varianza con un diseño completamente aleatorizados con un arreglo factorial de 4x3.

ANVA						
Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Fc	Ft	Nivel de significancia
CEPAS	3	58078,45	19359,48	1110,16	3,0	Altamente significativo
TIEMPO	2	153,66	76,83	4,40	3,4	Significativo
CxT	6	327,27	54,54	3,12	2,5	Significativo
ERROR EXP	24	418,52	17,43	-	-	-
TOTAL	35	58977,90	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia.

De la Tabla 13 del análisis de varianza (ANVA), para el “factor cepa” se comparó la razón Fcalculada con el F tabla de Fisher ($1110,16 > 3,00$), que indica que la diferencia de medias de porcentaje de degradación entre las cepas evaluadas y el consorcio son altamente significativas.

Con respecto al factor tiempo comparando la razón Fcalculada con el F tabla de Fisher ($4,4 > 3,40$) indica que las medias de porcentaje de degradación son diferentes significativamente por cada 24, 48 y 72 horas de medición.

En cuanto a la interacción Cepa x Tiempo, la tabla ANVA muestra que existe interacción entre cepa y tiempo, es decir las cepas se comportan de manera diferente en los tiempos evaluados.

Para determinar cuáles son los mejores tratamientos se realizó una comparación múltiple a posteriori entre las cepas y el consorcio utilizando la prueba de Tuckey, donde el valor crítico $T_{\alpha} = 5,4287$ se comparó con el promedio de la diferencia de medias para cada cepa (Anexo 11), esta evaluación nos muestra que el consorcio y la cepa 3T412C estadísticamente son similares y superiores a la cepa UP1 y el control (Tabla 14) en las 72 horas de evaluación.

Tabla 14: Grupos homogéneos para el factor cepa en la prueba de Tuckey

Orden de Mérito	CEPAS (TRATAMIENTOS)	PROMEDIOS (% de degradación)	GRUPOS HOMOGÉNEOS
1°	3T412C	97,87	a
2°	CONS	95,81	a
3°	UP1	42,94	b
4°	CONTROL	1,29	c

Fuente: Elaboración propia

*Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

Al haber interacción entre las cepas y el tiempo se realizó un análisis de efectos simples del porcentaje de degradación de las cepas a las 24, 48 y 72 horas (Tabla 15), cuyo valor crítico para la prueba de Tuckey fue $T_{\beta} = 4,91$. Encontrándose que a las 24 horas 3T412C, UP1 y el consorcio presentan una diferencia significativa entre sus promedios de medias, sin embargo a las 48 y 72 horas 3T412C y el consorcio no tienen diferencia significativa en el porcentaje de degradación (Anexo 12).

Tabla 15: Grupos homogéneos para el factor tiempo en la prueba de Tuckey

Tiempo=24 horas			
OM	CEPAS	PROMEDIOS	GRUPOS HOMOGÉNEOS
1°	3T412C	97,86	a
2°	CONSORCIO	91,81	b
3°	UP1	37,87	c
4°	CONTROL	1,7	d
Tiempo=48 horas			
OM	CEPAS	PROMEDIOS	GRUPOS HOMOGÉNEOS
1°	3T412C	97,84	a
2°	CONSORCIO	97,73	a
3°	UP1	38,50	b
4°	CONTROL	1,45	c
Tiempo=72 horas			
OM	CEPAS	PROMEDIOS	GRUPOS HOMOGÉNEOS
1°	3T412C	97,94	a
2°	CONSORCIO	97,90	a
3°	UP1	52,45	b
4°	CONTROL	0,75	c

Fuente: Elaboración propia

*Letras iguales no difieren estadísticamente $p < 0,05$

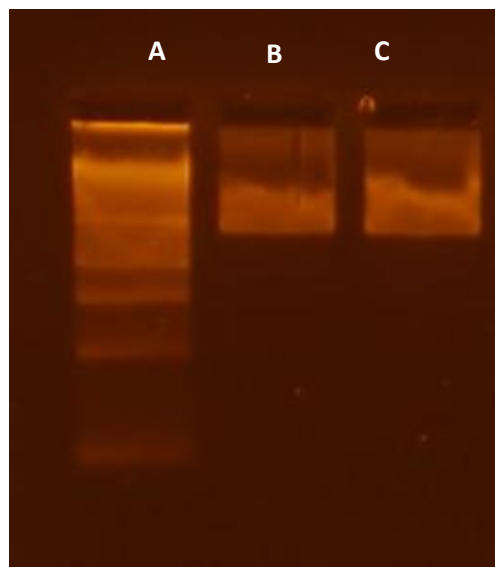
*OM: Orden de mérito

4.8 Identificación molecular de las cepas

4.8.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se visualizó en un gel de agarosa a través de un transiluminador como se observa en la Figura 17, donde las bandas marcadas pertenecen a los extractos de ADN purificados con el kit Wizard Promega.

Figura 17: Fotografía que muestra electroforesis de ADN. (A): Marcador molecular. (B): ADN de cepa 3T412C. (C): ADN de cepa UP1.



4.8.2 Análisis del secuenciamiento del ARNr 16S

Las secuencias de los productos de PCR de cada bacteria fueron alineadas satisfactoriamente con el programa BioEdit, luego comparadas con la base de datos de GenBank/EMBL/DDBJ usando la plataforma del programa local de alineamiento de secuencias

BlastN. Luego del alineamiento múltiple con secuencias que presentaron mayor similitud y valor E 0,0; se encontró que para 3T412C corresponde la especie *Klebsiella oxytoca* con 100 % de similitud y para UP1 *Serratia marcescens* con 99% de similitud (Tabla 16).

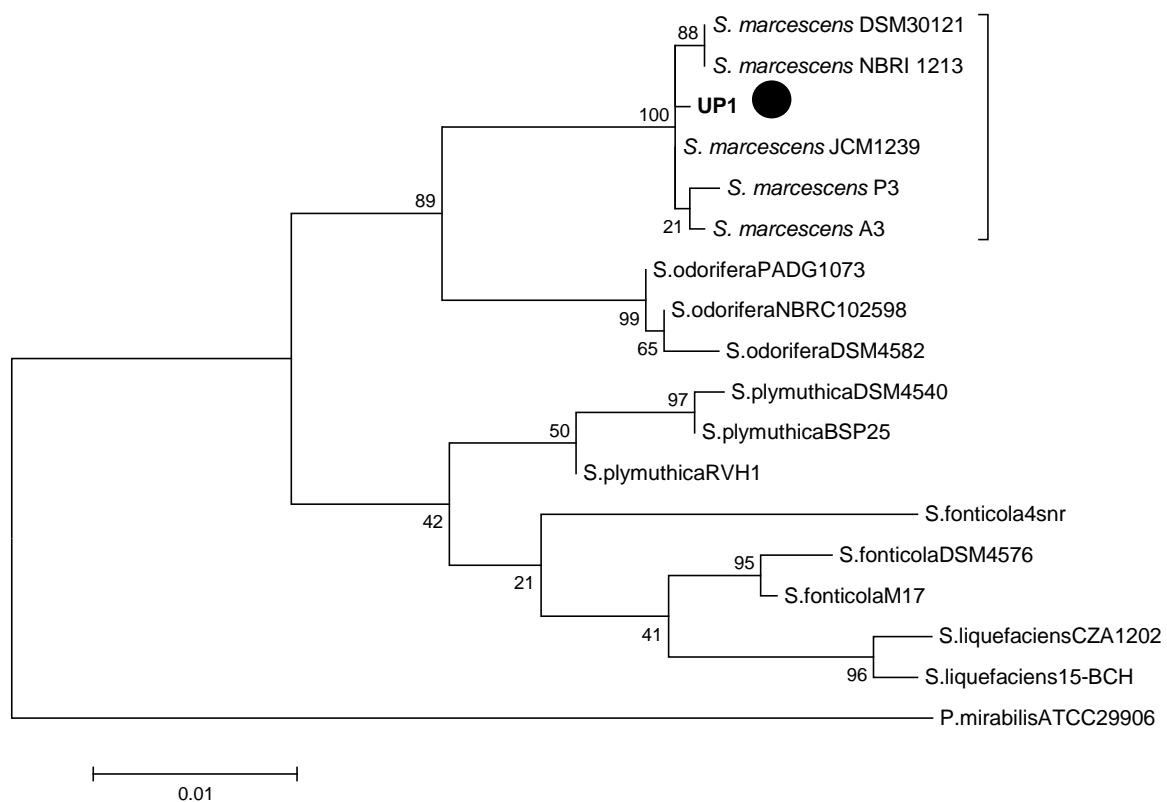
Posteriormente, se restringió las secuencias ya alineadas y se infirió el árbol filogenético con el programa Mega 5.0 empleando el método de Neighbor-Joining con un modelo Compuesto de Máxima Verosimilitud. Donde el árbol filogenético de UP1 (Figura 17) el valor de los nodos de las ramas representa el porcentaje de bootstraps y el valor 0,01 bajo la barra representa el porcentaje de sustituciones nucleotídicas, donde UP1 tiene un 100 % de probabilidad con las mismas especies de *Serratia marcescens*. Por otro lado, la secuencia parcial del gen rRNA ribosomal 16S de la cepa 3T412C permitió ubicarla dentro del clado de la especie *Klebsiella oxytoca*.

Tabla 16: Resultado del alineamiento múltiple de las cepas con pariente más cercano en BLASTN

Muestra Cepa	Pariente más cercano en BLASTN				
	Descripción	Cobertura %	E value	Identidad %	Acceso
3T412C	<i>Klebsiella oxytoca</i>	100	0,0	100	AB353045.1
UP1	<i>Serratia marcescens</i>	100	0,0	99	HG326223.1

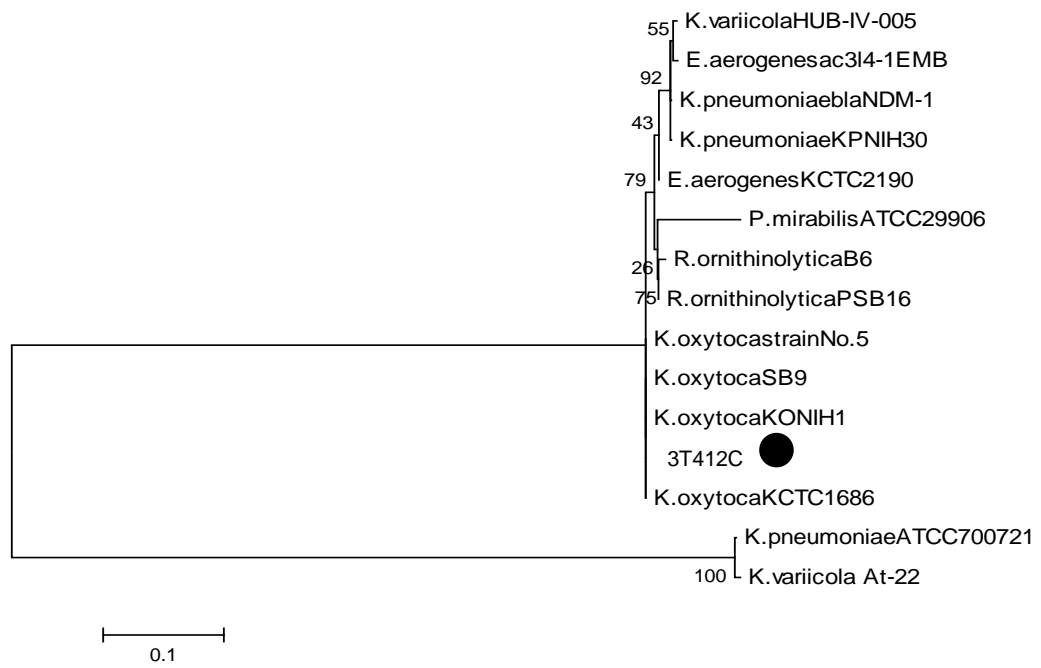
Fuente: Elaboración propia

Figura 18: Árbol filogenético de UP1 en la que conforma un clado robusto con *Serratia marcescens*.



Fuente: Elaboración propia

Figura 19: Árbol filogenético de 3T412C que forma un clado con *Klebsiella oxytoca*



Fuente: Elaboración propia

V. DISCUSIÓN

Identificación de las cepas

Del alineamiento del secuenciamiento del gen ARNr 16S con el Genbank se obtuvo un 100% de identidad de 3T412C con *Klebsiella oxytoca* y 99% de identidad para UP1 con *Serratia marcescens*, sin embargo esta última cepa no presentó pigmentación roja sino mas bien crema. Según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, *Serratia marcescens* puede presentar un color blanco, rosa o incluso rojo intenso en su morfología colonial ya que produce pigmentos no difusible insoluble en agua llamada prodigiosina (Williams *et al.*, 1967). Esta particularidad de ausencia de color la reporta también Denis (1971) que aisló cepas a partir de agua de mar que pertenecieron a biotipos de *Serratia marcescens* pigmentados y no pigmentados.

Ambos valores de identidad hallados entre genes ARNr 16S son mayores que 97%, lo cual es aceptado para ejercer relación entre las cepas a nivel de especie (Stackebrandt & Gobel, 1994). Además se obtuvo para ambos alineamientos un valor de E value menor a 0,02; lo cual nos indica que son un alineamientos muy confiables (Zapata, 2014). Por lo cual éstos análisis nos permiten reportar a 3T412C como *Klebsiella oxytoca* y UP1 *Serratia marcescens*.

Crecimiento en Medio Mínimo con TNT

En esta investigación se usó la formulación de un medio mínimo acorde con Durán (2013) teniendo como fuente única de carbono a succinato ya que Zaripov *et al.*, (2004) y Oh *et al.*, (1998) reportan que el TNT es usado por los microorganismos como fuente de nitrógeno por lo cual necesitan un compuesto adicional para usarla como fuente de carbono (Gonnison *et al.*, 1993). Esto se sustenta en los valores de producción celular obtenido para 3T412C, UP1 y el consorcio pues cada cepa presentó una producción de $1,0 \text{ E}+08$ ufc/ml, $8,0\text{E}+07$ ufc/ml y $8,7 \text{ E}+07$ ufc/ml respectivamente tras 72 horas. Esta formulación compuesta sólo por 6 componentes permitiría un ahorro de costos en un escalamiento del proceso.

Evaluación del potencial degradador

La evaluación del potencial degradador de los microorganismos crecidos en un medio líquido, se realiza mediante el control del consumo del sustrato (TNT), siendo los métodos más utilizados la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) (Esteve-Nuñez, 2001), este último análisis se llevó a cabo en esta investigación. El HPLC permitió la detección de la cantidad de TNT residual en el medio de cultivo en un tiempo de retención de 22,15 minutos. En este trabajo se tomó en cuenta otros criterios de preselección previo al análisis de las cepas como la turbidez que fue medida por espectrofotometría (DO_{600}) donde la cepa 2T431 presentó el mayor valor de crecimiento desde $2,5\text{E}+08$ ufc/ml hasta $6,9 \text{ E}+08$ ufc/ml y sólo 6,77% de degradación, el más bajo de las 4 cepas preseleccionadas, por lo que se le considera como tolerante al TNT.

Según estudios con *Pseudomonas putida* la tolerancia está dada por dos tipos de estrategias: La inducción de genes que codifican nitroreductasas que están relacionadas con la desintoxicación (Fernandez *et al.*, 2009); y la inducción y el empleo de transportadores/bombas moleculares que expulsan las sustancias químicas tóxicas (Nicolaou *et al.*, 2010). Sin embargo Durán (2013) establece como criterio de selección de cepas degradadoras de PETN la mayor densidad óptica presentada entre 19 cepas, en esta investigación no se observaron tales coincidencias tal como se observa para 2T431.

Una característica adicional observada en la experimentación fue el cambio de color a amarillo en el medio de cultivo, tal como reporta Villegas (2009). Investigaciones realizadas por Nyanhongo *et al.*, 2008 postulan que esta coloración se presenta cuando se acumulan en el medio subproductos de la degradación como 2-aminodinitrotolueno y 4-aminodinitrotolueno, los cuales son producidos por géneros como *Bacillus*, *Desulfovibrio* (Kulkarni *et al.*, 2007), *Pseudomonas* sp (Park *et al.*, 2002) y algunos consorcios microbianos de bacterias Gram negativas (Kulkarni *et al.*, 2007). Esta característica correspondió a UP1 y el consorcio que mostraron un viraje a crema amarillento tenue al degradar el TNT, 3T412C mantuvo su coloración crema sin variaciones perceptibles tras 72 horas de incubación (Anexo 6). Por esta razón se eligió sólo el método de conteo con cámara Petroff-Hausser para continuar el monitoreo de crecimiento pues esta variación del color interfiere con las mediciones espectrofotométricas tal como reporta Varón (2013), esto conlleva a desconfiar de este método.

Dentro de las vías metabólicas del TNT diversos estudios han reportado que durante su degradación en condiciones aerobias, se pueden condensar sus intermediarios y formar compuestos inertes como los azoxy que son recalcitrantes y causan una alta tasa de mutación y muerte en la población microbiana, por lo cual limitan el proceso de degradación. (Stenuit & Agathos, 2010; Esteve-Nuñez, 2001; Vorbeck *et al.*, 1994; Kim & Song, 2000). Este compuesto es asociado al viraje de color rojo o naranja en el medio de cultivo, característica que también ha sido reportado en esta investigación para la cepa UP10 que presentó color rojo en el medio tras 48 horas de incubación y 34,13% de degradación de TNT con una disminución considerable de su población atribuyéndosele su causa a la generación de estos metabolitos que son más tóxicos que el TNT.

Liberación de nitritos

La detección de nitritos en el medio podrían indicar la ruta metabólica empleada durante el proceso de degradación (García, 2011), ya que las bacterias en condiciones aerobias pueden reducir 2 de los 3 grupos de nitritos de la molécula de TNT, el tercer grupo requiere de condiciones anaeróbicas (Esteve-Nuñez *et al.*, 2001), sin embargo son necesarias la prueba de detección de otros metabolitos como el 4amDNT y 2,6 DNT tal como lo presenta Varón (2012).

Se observó también la variación de su detección en el medio de cultivo, lo que podría deberse a la continua transformación de este compuesto a nitrato y su rápida incorporación de éstos al metabolismo de las bacterias (Esteve-Núñez & Ramos, 1998; Esteve-Núñez *et al.*, 2000) lo cual podría impedir una acumulación de nitritos en el medio, tal como se observó para

3T412C que a las 24 horas presentó una producción de 0,4 mg/l hasta las 24 horas pero en 48 horas lo consumió totalmente, el consorcio tuvo un comportamiento similar pero a las 48 horas se detectó 0,1 mg/l de nitrito remanente que a las 72 horas se consumió totalmente. Contrariamente sucedió para UP1 el cual presentó una producción de 1,5 mg/l en 72 horas lo cual indica que no estaba utilizado por la célula.

Conformación del consorcio y evaluación de la degradación de TNT

La conformación del consorcio en esta investigación corresponde a un tipo de consorcio definido formado en laboratorio, esta clase de consorcio es ampliamente utilizado en estudios de biorremediación y se caracteriza porque es reproducible (García, 2011) y se conoce la capacidad degradadora de cada uno de sus miembros. El antagonismo fue descartado por las pruebas de enfrentamiento dual recomendadas por Varón (2012) en el que establece como criterio de establecimiento de consorcio la no formación de halo durante la evaluación del crecimiento en medio sólido.

La concentración de TNT óptima para estimular la degradación del compuesto por parte de los microorganismos varía desde 20 mg/l hasta 200 g/l (Litake *et al.*, 2003; Villegas, 2009), sin embargo concentraciones por encima de 100 mg/l ejercen un efecto inhibitor sobre el crecimiento de los microorganismos con potencial degradador (Gonnison *et al.*, 1993). Los ensayos en este experimento se realizaron a una concentración inicial aproximada de 60 mg/l.

Aunque existen reportes que afirman que la degradación en consorcios es mejor en términos de porcentaje y reducción del tiempo (Antolinez *et al.*, 2001) para este caso no se mostró tal efecto, pues tras 24 horas de evaluación 3T412C mostró mayor degradación que el consorcio y que UP1, esto podría atribuírsele a una etapa de reconocimiento de metabolitos entre las bacterias, ya que los consorcios se caracterizan porque pueden realizar funciones metabólicas más complejas en comparación a la actividad metabólica realizada por uno solo.

Sin embargo a las 48 horas tanto el consorcio como 3T412C mostraron un comportamiento homogéneo lo que podría fundamentarse en estabilización del consorcio por la presencia de señales moleculares que pueden activar diferentes rutas metabólicas para la generación de subproductos que pueden ser utilizados por los miembros del consorcio y la producción de surfactantes que potenciaron la degradación en el consorcio tras ese tiempo.

Para saber cómo la comunidad bacteriana interactúa en el tiempo hacen falta un análisis de la comunidad y su caracterización genotípica como lo presenta García (2011) en donde evalúa la recuperación de la capacidad degradadora de TNT y PETN de un consorcio bacteriano, sin embargo el autor encontró que la capacidad degradadora de los consorcios formados disminuyó con el tiempo, además es importante mencionar que se reportaron géneros como *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Cupriavidus* y *Comamonas* los que a partir de una concentración de 150 mg/l degradaron 93,37 % de TNT tras 20 días de incubación en el tratamiento usando como fuente de carbono a glucosa, glicerol, citrato y acetato, sin embargo en este trabajo el consorcio formado por *Klebsiella oxytoca*

3T412C y *Serratia marcescens* UP1 logró la degradación del 97,9% en 72 horas usando únicamente a succinato como fuente de carbono.

Además Varón, 2012 reporta que el consorcio formado por *Pseudomonas oleovorans* y *Shinella kummerowiae* no superó el 62% de degradación del TNT tras 120 horas de incubación y una concentración inicial de aproximadamente 100 mg/l, donde esta mezcla presentó un promedio del porcentaje de degradación de las dos cepas en su estado individual.

El género *Klebsiella* ha sido reportada como degradante de TNT. Investigaciones como la de Chang *et al.*, (2002) reporta que una cepa de *Klebsiella* sp C1 aislada a partir de lodos activados obtenidos de la planta de tratamiento de Chuncheon - Korea, creció rápidamente en medio de cultivo mínimo en presencia de 100 y 200 mg/L de TNT los que fueron degradados en 6 horas, sin embargo su aislamiento fue con un aumento progresivo de la concentración de TNT de 10 a 300 mg/l durante 6 meses. Es así que para esta misma cepa se ha reportado la presencia de nitroreductasa tipo I (Hyouun-Young *et al.*, 2005) lo que le permite degradar este tipo de explosivo. Además Litake *et al.*, 2005, reporta a un aislado clínico de *Klebsiella pneumoniae* como degradador del 100 % de TNT en 30 horas a partir de 50, 40 y 20 mg/l de TNT.

Por otro lado *Serratia marcescens* UP1, aunque mostró un bajo porcentaje de degradación de 42,9% en promedio tras 72 horas es reportado por Montpas *et al.*, (1997) como degradador de 50 mg/l de TNT tras 48 horas, las discrepancias podrán deberse a que esta última cepa fue aislada de suelo impactado con TNT.

VI. CONCLUSIONES

- Se seleccionaron bacterias biodegradadoras de TNT a las cepas *Klebsiella oxytoca* 3T412C y *Serratia marcescens* UP1 y al consorcio formado por éstas.
- Se identificó molecularmente a la cepa 3T412C como *Klebsiella oxytoca* y a la cepa UP1 como *Serratia marcescens*.
- *Klebsiella oxytoca* 3T412C, *Serratia marcescens* UP1 y el consorcio presentaron una biodegradación de TNT de 97,87%; 42,94% y 95,81% en 72 horas.
- *Klebsiella oxytoca* 3T412C y el consorcio fueron las cepas que presentaron estadísticamente el mayor porcentaje de biodegradación con 97,87% y 95,81 % de TNT biodegradado respectivamente en 72 horas.

VII. RECOMENDACIONES

- Identificar el biotipo de *Serratia marcescens* UP1.
- Seleccionar cepas con mayor porcentaje de degradación provenientes de suelo contaminado con explosivos para formar un consorcio.
- Evaluar el potencial de degradación de *K. oxytoca* con otros compuestos explosivos como RDX, HMX, TNP, GNT, etc.
- Analizar por HPLC la presencia de metabolitos como 2amDNT; 4amDNT y otros para establecer si se liberan metabolitos tóxicos durante la degradación de TNT.
- Estudiar la presencia de las enzimas involucradas en la degradación de TNT por cepas bacterianas y en consorcio.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Abanto Marín, M. F.** (2008). “Diversidad molecular de bacterias oxidadoras de hierro aisladas de drenajes ácidos de minas del Perú”. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
2. **Altschul SF; Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acids Res. 25:3389-3402.
3. **Antolinez, N.; Acero, S.; Martinez-Nieto P.; Bernal-Castillo J.** (2001) Degradación del Malathion por Bacterias aisladas de la Bahía de Cartagena. Paper presented at the IV Simposio Internacional de Desarrollo Sustentable/Regulación de la Fertilidad en Agroecosistemas de los Andes Tropicales.
4. **Atlas, R., y Bartha, R.** (2002). Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. España- Pearson Educacion, S.A.
5. **ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** (1996). 2,4,6 trinitrotolueno (TNT). Recuperado de <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=677&tid=125>

6. **Ayoub, K.; Van Hullebusch E. D.; Cassir, M.; Bermond, A.** (2010). Application of advanced oxidation processes for TNT removal: A review *Journal of Hazardous Materials*, 178: 10–28
7. **Bagley S.** (1985). Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect Control* 6 (2): 52-8.
8. **Ballesteros L.** (2006). Vibrational analysis of pentaerythritol tetranitrate (PETN) in soil particles. *Química*. Master of sciences. Universidad de Puerto Rico.
9. **Banarjee, H.N; Verma, M.; Hou; L.H.; Ashraf, M. ; Dutta; S.K.**(1999) Cytotoxicity of TNT and it's metabolites, *Yale J. Biol. Med.*, 72 : 1–4.
10. **Bartram J. et al.** (2003): Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. *Serie de la OMS Emerging Issues in Water and Infectious Disease*. Londres (Reino Unido), IWA Publishing.
11. **Best, E. P.; Sprecher, S. L.; Larson, H. L.; Fredrickson D. F.** (1999). Environmental behavior of explosives in groundwater from the Milan army ammunition plant in aquatic and wetland plant treatments. Removal, mass balances and fate in groundwater of TNT and RDX. *Chemosphere*. 38:3383–3396.

12. **Boopathy, R.; Manning, J.; Montemagno C.; Kulpa, C.**(1994) Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Pseudomonas* consortium under aerobic conditions. *Current of Microbiology* 28: 131-137
13. **Brannon, J. M.; Pennington J.C.**(2002). Environmental fate and transport process descriptors for explosives. ERDC/EL TR-02-10, U.S Army Engineer Research and Development Center, Vicksburg, Miss, USA.
14. **Caballero, A.** (2005). Bases genéticas y bioquímicas del metabolismo del nitrógeno del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) en *Pseudomonas putida* JLR11 Tesis Doctoral. UG. España
15. **Chang, C.-S.; Kim, H-Y.; Kang, Y-M.; Bae, K-S; Song, H-G.** (2002). Transformation of 2,4,6 -Trinitrotoluene in various conditions by *Klebsiella* sp. Strain C1 Isolated from Activated Sludge. *The Journal of Microbiology*, 193- 198.
16. **Cho Y.-S., Bheong-U.; Oh K.-H.** (2008). Simultaneous degradation of nitroaromatic compounds TNT, RDX, atrazine, and simazine by *Pseudomonas putida* HK-6 in bench-scale bioreactors. *J Chem Technology Biotech* 83:1211–1217.
17. **Clark, B.; Boopathy R.** (2007). Evaluation of bioremediation methods for the treatment of soil contaminated with explosives in Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana. *Journal of Hazardous Materials*, 143: 643– 648.

18. **Denis, F.** (1971). Contribution a l'etude des bacteries Mterotrophes du milieu marin: Inventaire de 2700 souches. PhD Thesis. Univ. Poitiers, France. 455 pp.
19. **Drzyzga, O.; Gorontzy, T.; Schmidt A.; Blotevogel, K. H.** (1995). Toxicity of explosives and related compounds to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177," Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 28 (2): 229–235
20. **Durán Ramirez, Y.** (2013). Caracterización molecular de bacterias degradadoras de pentaeritritol tetranitrato (PETN) aisladas de ambientes mineros y evaluación de su eficiencia de degradación. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
21. **Environmental Protection Agency (EPA).** (2001). Handbook on the management of ordnance and explosives at closed, transferring, and transferred ranges and other sites.
22. **Environmental Protection Agency (EPA).** (2006). Method 8330B: Nitroaromatics, nitramines, and nitrate esters by high performance liquid chromatography (HPLC).
23. **Esteve-Nuñez, A.; Caballero A.; Ramos, J.L.** (2001). Biological degradation of 2,4,6- Trinitrotoluene. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65 : 335-352.

24. **Esteve-Núñez, A.; Lucchesi, G.; Philipp, B.; Schink, B.; Ramos, J.L.** (2000). Respiration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* strain JLR 11. *J. Bact* 182: 1352-1355.
25. **Esteve-Núñez A.; Ramos, J.L.** (1998). Metabolism of 2,4,6 – trinitrotolueno by *Pseudomonas* sp JLR11. *Environ. Sci. Technol.*, 32:3808
26. **Estudios Mineros del Perú S.A.C. Manual de Minería.** (2005).
Recuperado de:
http://ingenierosdeminas.org/biblioteca_digital/libros/Manual_Mineria.pdf
27. **Eweis, J.; Ergas, S.; Chang, D.; Schroeder, E.** (1999). *Principios de Biorrecuperación* (1 ed.). Madrid España. Editorial Mc Graw Hill.
28. **Fernandez, M.; Duque, E.; Pizarro-Tobias, P.; Van Dillewijn, P.; Wittich, R.M.; Ramos, J. L.** (2009). Microbial responses to xenobiotic compounds. Identification of genes that allow *Pseudomonas putida* KT2440 to cope with 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiology Biotechnology*. 2: 287-294.
29. **Fiorella, P.D.; Spain, J.C.** (1997). Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS52. *Appl Environ Microbiol*. 63: 2007–2015.

30. **Fries, J.; Getrost H.** (1977). *Organic Reagents for Trace Analysis*. Merck Editores. 284-287.
31. **Fritsche, W.; Hofrichter, M.** (2000). Aerobic degradation by microorganisms, in: Klein, J. (Ed.), *Biotechnology, Environmental Processes II e Soil Decontamination*. 11b: 146 – 164
32. **García Bonilla, E. J.** (2011). *Recuperación y evaluación de la capacidad degradadora de consorcios bacterianos aislados de ambientes impactados con TNT y PETN*. (Tesis inédita de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia
33. **George, S.E.; Huggins-Clark G., Brooks L.R.** (2001). Use of a *Salmonella* microsuspension bioassay to detect the mutagenicity of munitions compounds at low concentrations, *Mutation Research*, 490 (1): 45–56.
34. **Global Security. Military explosives: PETN** (2014). Recuperado de <http://www.globalsecurity.org/military/systems/munitions/explosives-nitrate-petn.htm>
35. **Gonnison, D.; Pennington, J.; Price, C., Myrick, G.** (1993). Screening test and isolation procedure for TNT-degrading microorganisms. Installation Restoration, Research Program.
36. **Haïdour, A.; Ramos J. L.** (1996). Identification of products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-

dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Environ. Sci. Technol., 30:2365– 2370

37. **Hall, T.** (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. 41: 95-98

38. **Hyoun-Young K., Hong-Gyu S.** (2005). Purification and characterization of NAD(P)H-dependent nitroreductase I from *Klebsiella* sp. C1 and enzymatic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene..Appl Microbiol Biotechnol 68: 766–773.

39. **Juhasz A. L.; Naidu R.** (2007). Explosives: fate, dynamics, and ecological impact in terrestrial and marine environments. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 191: 163–215.

40. **Kalderis D., Juhasz A.L., Boopathy .R, Comfort S.** (2011). “Soils contaminated with explosives: environmental fate and evaluation of state of the art remediation processes (IUPAC technical report),” *Pure and Applied Chemistry*, 83 (7): 1407–1484.

41. **Kim H.Y., Song H.G.** (2000). Simultaneous utilization of two different pathways degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by white rot fungus *irpex lacteus*. Journal Microbiology.; 38(4):250-254.

42. **Kubota, A.; Maeda, T.; Nagafuchi, N.; Kadokami, K.; Ogawa, H.I.** (2008). TNT biodegradation and production of dihydroxylamino-nitrotoluene by aerobic TNT degrader *Pseudomonas sp.* strain TM15 in an anoxic environment. *Biodegradation*, 19: 795 - 805.
43. **Kulkarni M., Chaudhari A.** (2007). Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. *Journal of Environmental Management*. 85: 496-512.
44. **Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K.** (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*. 9 (4): 299-306.
45. **Lachance, B.; Robidoux, P. Y. ; Hawari, J.; Ampleman, G.; Thiboutot S.; Sunahara, G. I.** (1999). Cytotoxic and genotoxic effects of energetic compounds on bacterial and mammalian cells in vitro, *Mutation Research*, 444(1): 25–39.
46. **Lewis, J.; Martel, R.; Trepanier L.; Ampleman G.; Thiboutot S.** (2009). Quantifying the transport of energetic materials in unsaturated sediments from cracked unexploded ordnance. *Journal of Environmental Quality*, 38 (6): 2229– 2236,

47. **Lewis T.A., Newcombe D.A., Crawford R.L.** (2004) Bioremediation of soils contaminated with explosives. *J Environ Manag*, 70: 291–307
48. **Litake Geetanjali M., Joshi Suresh G., Ghole Vikram S.**, (2005). TNT biotransformation potential of the clinical isolate of *Salmonella typhimurium* - potential ecological implications. *Indian Journal of Occupational & Environmental medicine*, 9 (1): 29-34.
49. **Martel, R.; Mailloux, M.; Gabriel, U.; Lefebvre, R.; Thiboutot, S.; Ampleman G.** (2009). Behavior of energetic materials in ground water at an anti-tank range, *J. Environ. Qual.* 38 : 75–92.
50. **Montpas, S.; Samson J., Langlois É., Lei J., Piché Y., Chênevert R.** (1997). Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Serratia marcescens*. *Biotechnology Letters*, 19 (3) : 291–294
51. **Nicolaou, S.A.; Gaida, S. M.; Papoutsakis, E.T.** (2010). A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing from biofuels and chemicals, to biocatalysis and biorremediation *Metabolic Engineering*, 12, 307-331.
52. **Nyanhongo, G. S.; Schroeder, M.; Steiner, W.; Gubitz, G.M.** (2005). Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT): An enzymatic perspective.

53. **Nyanhongo G., Aichernig N., Ortner M., Steiner W., Guebitz G.** (2008). Incorporation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transforming bacteria into explosive formulations. *Journal of Hazardous Materials*. 8943: 1-6
54. **Oh, B.; Shea P.; Grijber R.; Vasilyeva, G.; Sarath G.** (2003). TNT biotransformation and detoxification by *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Biodegradation* 14: 309-319.
55. **Oh, K.H.; Kim Y.J.** (1998). Degradation of explosive 2,4,6-trinitrotoluene by s-triazine degrading bacterium isolated from contaminated soil. *Bull Environ Contam Toxicol.*, 61(6):702-8.
56. **Orjuela, P.; Sandon, A.; Franco, M.; Martinez, M.** (2003). Evaluación de cepas antagónicas de actinomicetos y de *Trichoderma spp.* aislados a partir de suelos de cultivo de arroz (*Oryza sativa*) para el control de *Rhizoctonia solani*. *Revistas Mundo Microbiológico. Asociación Colombiana de Microbiología.*, 2(2): 9-14.
57. **Páca, J.; Halecký, M.; Hudcová T.; Bajpai, R.** (2008). Aerobic biodegradation of dinitrotoluenes in batch systems by pure and mixed cultures. *Folia Microbiol.* 53 (2), 105- 109
58. **Pak, J.W.; Knoke, K.L.; Noguera, D.R.; Fox, B.G.; Chambliss, G.H.** (2000). Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by Purified

Xenobiotic Reductase B from *Pseudomonas fluorescens* I-C. Applied and Environmental Microbiology, 66: 4742–4750.

59. **Pandey, G.; Rakesh, K. J.** (2002). Bacterial Chemotaxis toward Environmental Pollutants: Role in Bioremediation. Applied and Environmental Microbiology. 68 (12): 5789–5795.

60. **Park, H.; Kim, H.S** (2000). Identification and characterization of the nitrobenzene catabolic plasmids pNB1 and pNB2 in *Pseudomonas putida* HS12. Journal Bacteriology, 182: 573-580.

61. **Park, C.; Kim, T.H.; Kim S.; Lee J.; Kim S.W.** (2002). Biokinetic parameter estimation fotodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) with *Pseudomonas putida* KP-T201. Journal Bioscience and Bioengineering. 94(1):57-61.

62. **Park, C.; Kim, T.-H.; Kim, S.; Kim, S.-W.; Lee, J.; Kim, S.-H.** (2013). Optimization for biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Pseudomonas putida*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 95(6): 567-571.

63. **Pichtel, J.** (2012). Distribution and Fate of Military Explosives and Propellants in Soil: A Review. Applied and Environmental Soil Science, 2012: 1-33

64. **Proinversión. La exploración minera en el Perú.** (2007).
Recuperado de
[http://www.proinversion.gob.pe/RepositorioAPS/0/0/JER/
PUBLICACIONES/documentos/ProInversion-
GuiaDeExploracionMinera2007.pdf](http://www.proinversion.gob.pe/RepositorioAPS/0/0/JER/PUBLICACIONES/documentos/ProInversion-GuiaDeExploracionMinera2007.pdf)>
65. **Robertson, BK; Jjemba PK.** (2005). Enhanced bioavailability of sorbed 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by a bacterial consortium. *Chemosphere*. 58(3): 263-70
66. **Robidoux, P. Y.; C. Svendsen, J.; Caumartin et al.** (2000). "Chronic toxicity of energetic compounds in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test," *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 19, no. 7, pp. 1764–1773,
67. **Rodgers, J.; Bunce J.**(2001). Treatment Methods for the Remediation of nitroaromatic explosives Water Residual, 35(9), 2101-2111.
68. **Smets, B.; Yin, H.; Esteve-Nuñez, A.**(2007). TNT biotransformation: when chemistry confronts mineralization. *Application Microbiology Biotechnonology*, 76, 267-277.

69. **Snellinx, Z.; Nepovim, A.; Taghavi, S.; Vangronsveld, J.; Vanek, T.; Van der Lelie, D.**(2002). Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 9, 48–61.
70. **Stackerbrandt, E & Goebel, B.** (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA reassociation and 16SrRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 846-849.
71. **Spain, J.C.; Hughes, J.B.; Knackmuss, H.J.**(2000). Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. CRC Press, Boca Raton.
72. **Stenuit, B.; Eysers, L.; Rozenberg, R.; Habib-Jiwan, J.L.; Agathos, S.N.** (2006). Aerobic Growth of *Escherichia coli* with 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) as the Sole Nitrogen Source and Evidence of TNT Denitration by Whole Cells and Cell-Free Extracts. *Appl Environ Microbiol*, 72: 7945–7948.
73. **Stenuit, B; Eysers, L; Rozenberg, R.; Habib-Jiwan, J.L.; Matthijs S., Cornelis P, et al.**(2009). Denitration of 2,4,6-Trinitrotoluene in aqueous solutions using small-molecular-weight catalyst(s) secreted by *Pseudomonas aeruginosa* ESA-5. *Environmental Science & Technology*. 43(6):2011-2017.

74. **Stenuit, B.A.; Agathos, S.N.** (2010). Microbial 2,4,6-trinitrotoluene degradation: Could we learn from (bio)chemistry for bioremediation and viceversa? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88(5):1043-64.
75. **Symons, Z. C.; Bruce Neil, C.** (2006). Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. *Nat. Prod. Rep.*, 23: 845–850.
76. **Thorn, K. A.; Pennington, K.C.; Hayes, C.A.** (2002). M-15 NMR investigation of the reduction and binding of TNT in an aerobic bench scale reactor simulating windrow composting.
77. **Tront, J. M. H.; J.B.** (2005). Oxidative microbial degradation of 2,4,6-trinitrotoluene via 3-methyl-4,6 dinitocatecol.
78. **Varón López H.** (2012). Efecto del pH y la temperatura en la degradación del 2,4,6 Trinitrotolueno, por bacterias aisladas de sitios con presencia de explosivos. (Tesis de Maestría). Universidad de la Sabana, Bogotá, Colombia.
79. **Villegas Plazas, S.** (2009). Aislamiento de microorganismos degradadores de 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) a partir de ambientes contaminados con explosivos. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

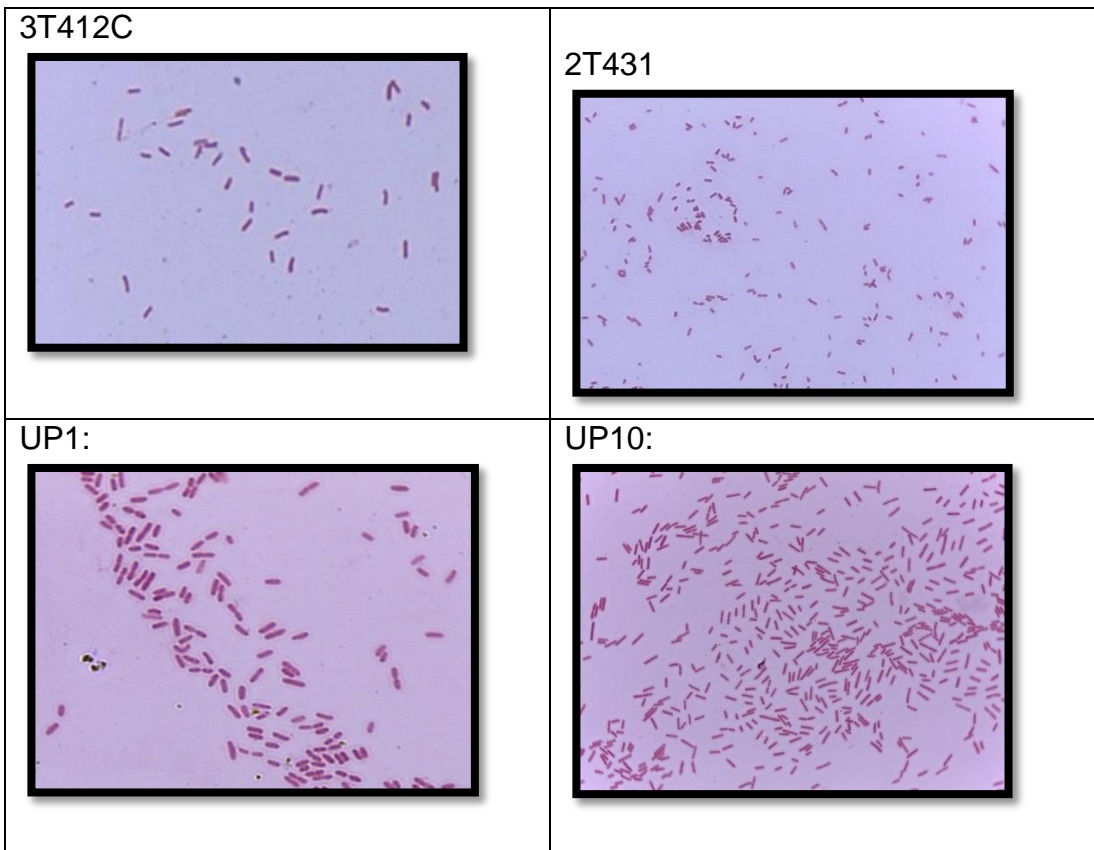
80. **Vorbeck C, Lenke H, Fischer P, Knackmuss HJ.** (1994). Identification of a hydride Meisenheimer Complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. *J. Bacteriol.* 176(3):932-4.
81. **Watrous, M.M.; Clark, S.; Kutty, R.; Huang, S.; Rudolph, F.B., Hughes, J.B.; Bennett, G.N.** (2003). 2,4,6-Trinitrotoluene Reduction by an Fe-Only Hydrogenase in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol.*; 69:1542–1547
82. **Williams, R.P., Hearn, W.R.** (1967). In *Antibiotics. II Biosynthesis* ed.D. Gottlieb, P.D. Shaw. Berlin Springer, 466
83. **Williams, R.T.; Rathbone, D.A.; Scrutton, NS; Bruce, N.C.** (2004). Biotransformation of explosives by the old yellow enzyme family of flavoproteins. *Apply Environmental Microbiology*, 70: 3566 – 3574.
84. **Yinon, J.** (1990). *Toxicity and Metabolism of Explosives*, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA.
85. **Yinon J.**(1999). *Forensic and environmental detection of explosives*. Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd.
86. **Zapata Málaga, H.** 2014. Aislamiento e identificación molecular de bacterias celulolíticas termófilas de las fuentes termales de Calientes, Candarave-Tacna. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú.

87. Zaripov, S.; Naumov, A.; Suvorova, E.; Garusov, A.; Naumova R. (2004). Initial Stages of 2,4,6-Trinitrotoluene Transformation by microorganisms. *Microbiology* 73: 398-403.

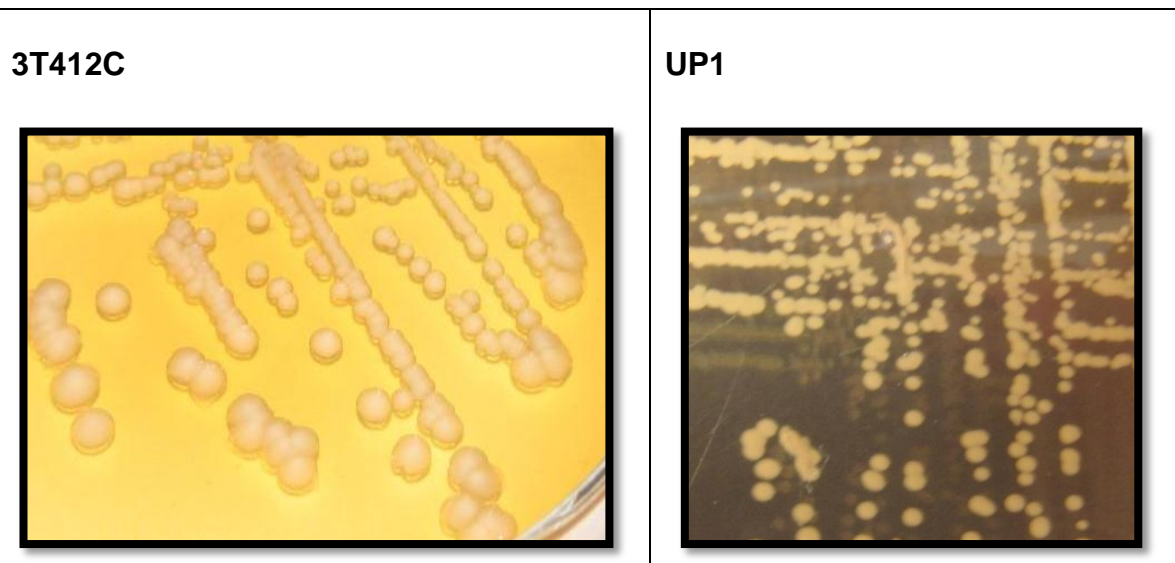
88. Ziganshin A.M., Gerlach R., Borch T., Naumov A.V., Naumova R.P. (2007). Production of Eight Different Hydride Complexes and Nitrite Release from 2,4,6-Trinitrotoluene by *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 73:7898–7905.

IX. ANEXOS

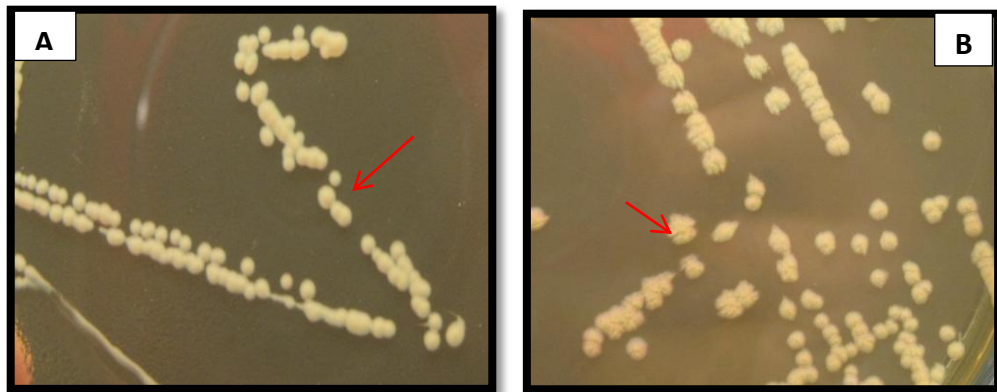
Anexo 1: Morfología microscópica según coloración Gram.



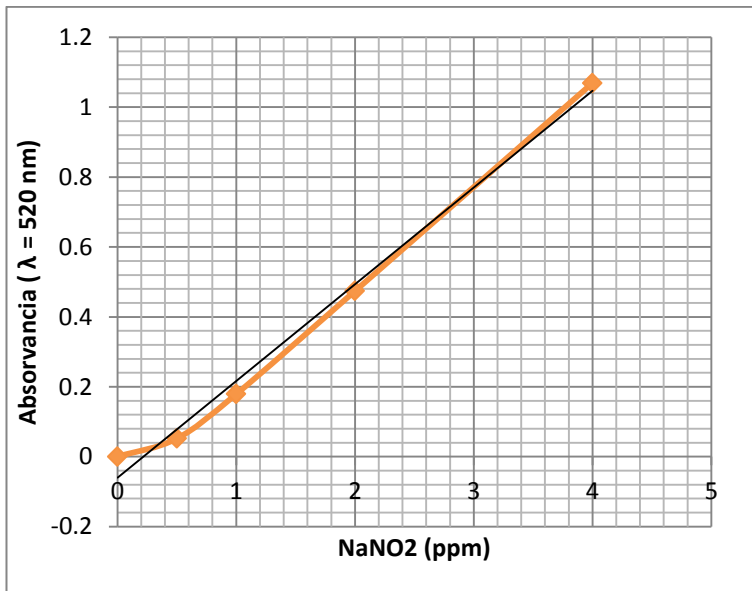
Anexo 2: Morfología colonial en TSA de 3T412C y UP1 a 37 °C luego de 24 horas de incubación.



Anexo 3: Comparación del crecimiento de 3T412C en medio sólido TSB a las 48 horas de incubación a temperatura ambiente ($28^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$)
 A: Colonias a partir de MM sin TNT. B: Colonias a partir de MM con TNT. Obsérvese mutación en la morfología colonial.

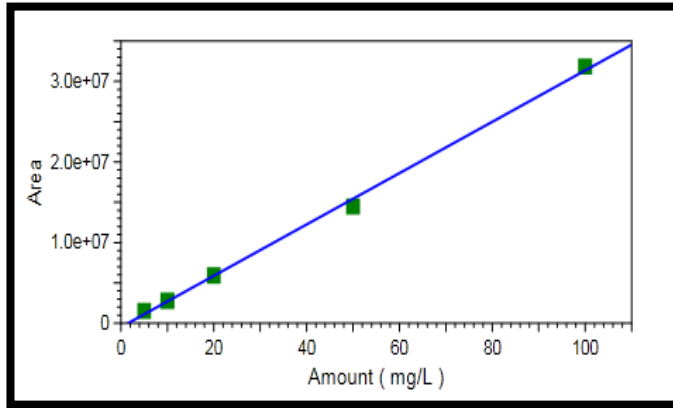


Anexo 4: Curva estándar de nitrito de sodio.



$y = 0,2825x - 0,0815$ $R^2 = 0,988$	
NaNO ₂ (ppm)	Absorbancia (λ=520nm)
0	0
0,5	0,022
0,7	0,083
1	0,179
2	0,474
4	1,069

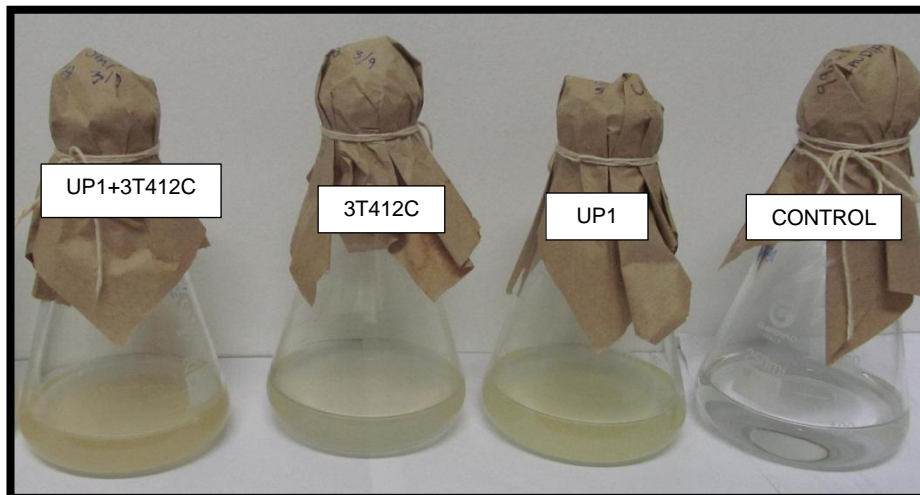
Anexo 5: Curva estándar de TNT.



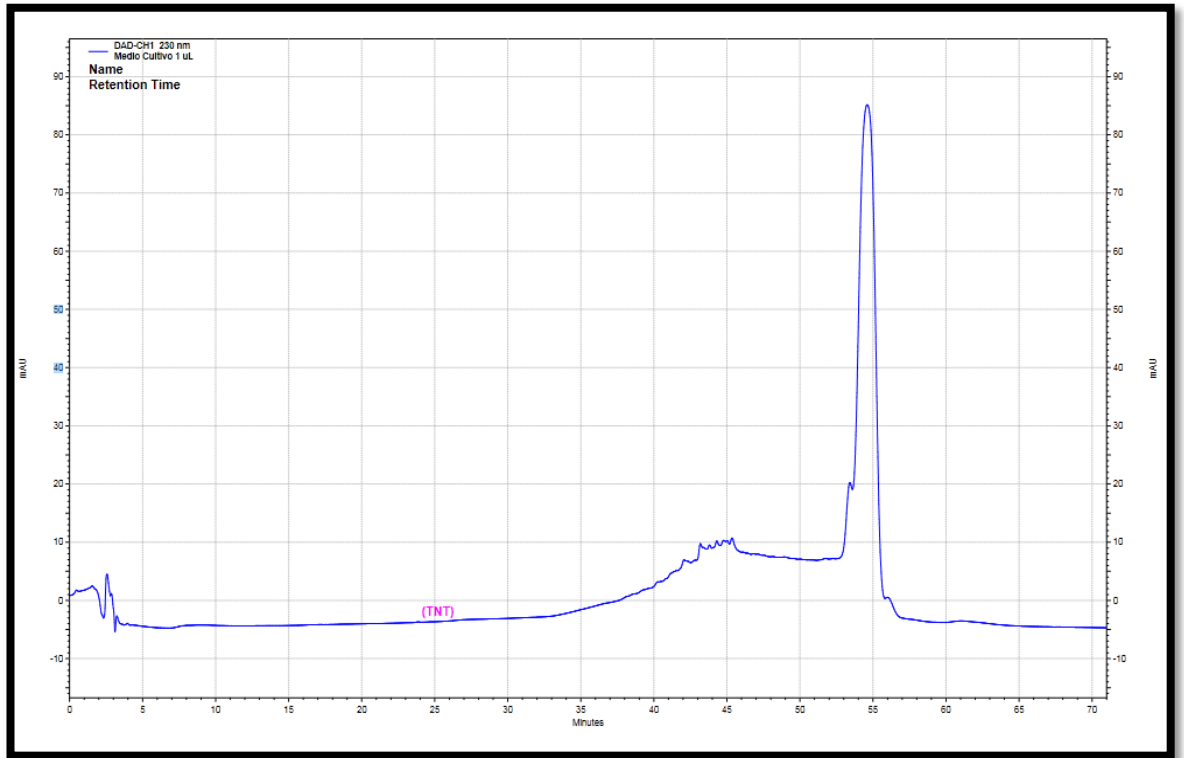
$$y=318397x - 473073; R^2=0,997842$$

Concentración (mg/l)	Área
5	1,5E+6
10	2,7E+6
20	5,9E+6
50	1,4E+7
100	3,1E+7

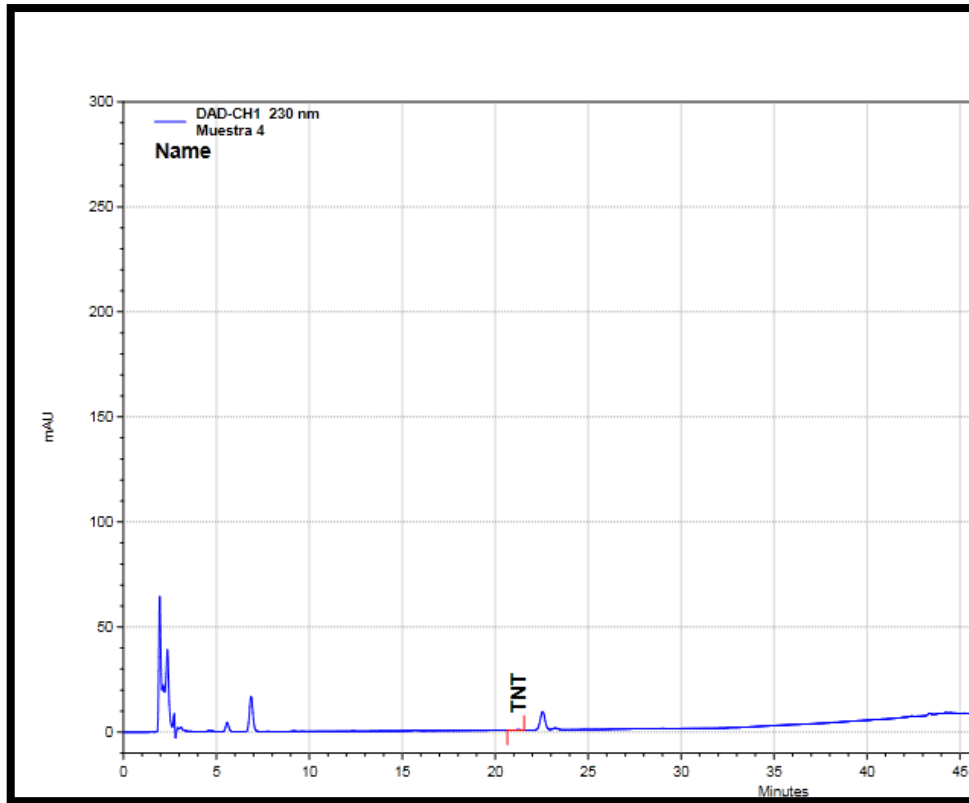
Anexo 6: Cultivo de 72 horas de incubación.



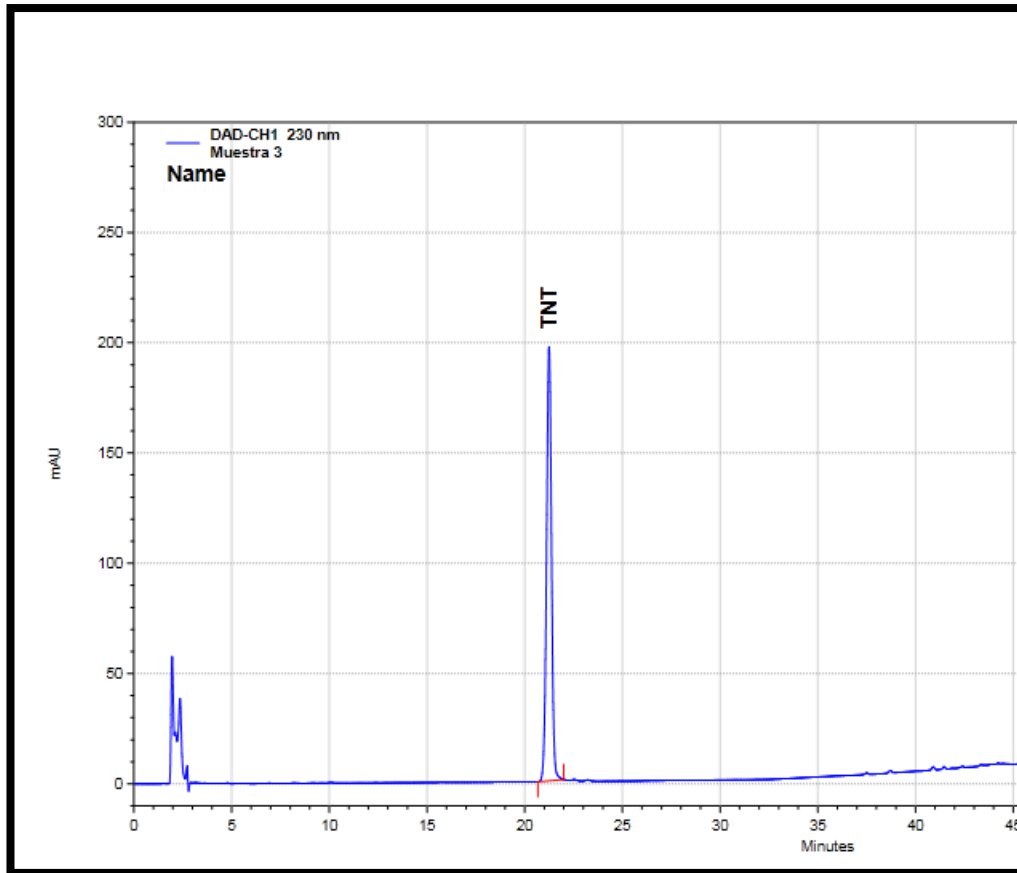
Anexo 7: Cromatograma de HPLC del medio de cultivo.



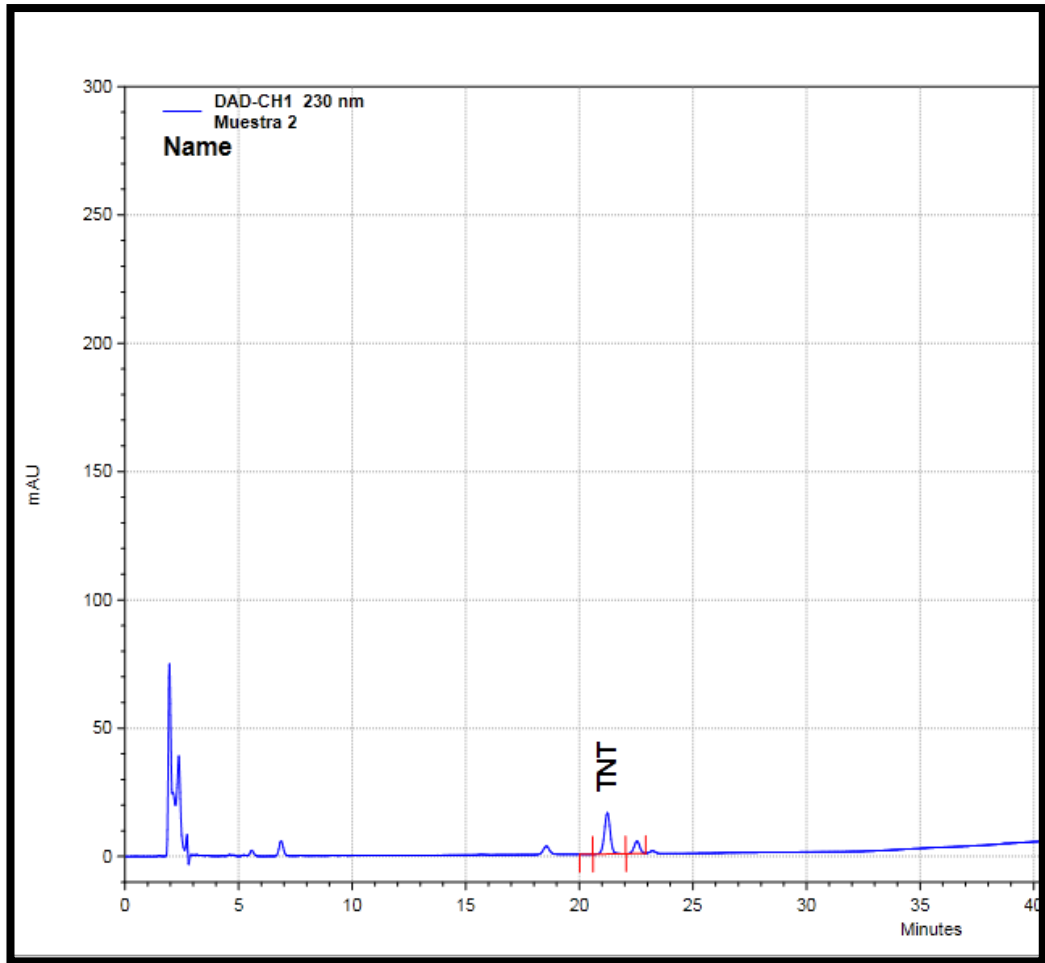
Anexo 8: Cromatograma de detección de TNT en 24 horas de incubación de 3T412C.



Anexo 9: Cromatograma de detección de TNT en 24 horas de incubación de UP1.



Anexo 10: Cromatograma de detección de TNT en 24 horas de incubación del consorcio 3T412C-UP1.



Anexo 11: Datos de la comparación entre medias del porcentaje de degradación de los tratamientos según prueba de Tuckey

COMPARACION ENTRE MUESTRAS	DIFERENCIA DE MEDIAS $\alpha=0,05$ $T_{\alpha} = 5,4287$	GRADO DE SIGNIFICANCIA
3T412C-CONTROL	96,58 > 5,42	S
3T412C-UP1	54,93 > 5,42	S
3T412C-CONSORCIO	2,06 < 5,42	NS
CONSORCIO-CONTROL	94,51 > 5,42	S
CONSORCIO-UP1	52,87 > 5,42	S
UP1-CONTROL	41,64 > 5,42	S

*S= Significativo

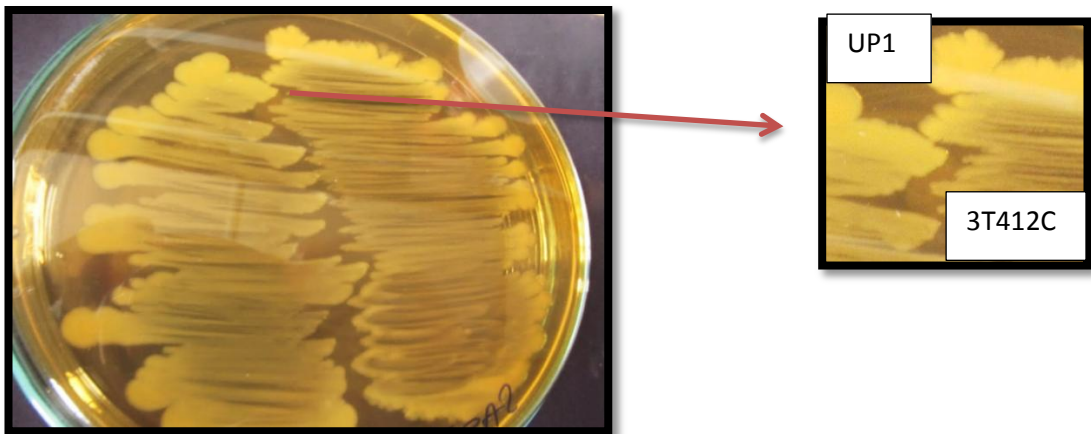
*NS= No significativo

Anexo 12: Datos de la comparación entre medias del porcentaje de degradación de los tratamientos por intervalo de tiempo según la prueba de Tuckey.

Tiempo=24 horas		
COMPARACIÓN ENTRE MUESTRAS	DIFERENCIA DE MEDIAS $\alpha=0,05$ $T_{\beta} = 4,91$	GRADO DE SIGNIFICANCIA
3T412C-CONTROL	96,16>4,91	S
3T412C-UP1	59,98>4,91	S
3T412C-CONSORCIO	6,05>4,91	S
CONSORCIO-CONTROL	90,11>4,91	S
CONSORCIO-UP1	53,93>4,91	S
UP1-CONTROL	36,18>4,91	S
Tiempo=48 horas		
COMPARACIÓN ENTRE MUESTRAS	DIFERENCIA DE MEDIAS $\alpha=0,05$ $T_{\alpha} = 4,91$	GRADO DE SIGNIFICANCIA
3T412C-CONTROL	96,39>4,91	S
3T412C-UP1	59,33>4,91	S
3T412C-CONSORCIO	0,11<4,91	NS
CONSORCIO-CONTROL	96,28>4,91	S
CONSORCIO-UP1	59,23>4,91	S
UP1-CONTROL	37,06>4,91	S
Tiempo=72 horas		
COMPARACIÓN ENTRE MUESTRAS	DIFERENCIA DE MEDIAS $\alpha=0,05$ $T_{\alpha} = 4,91$	GRADO DE SIGNIFICANCIA
3T412C-CONTROL	97,19>4,91	S
3T412C-UP1	45,49>4,91	S
3T412C-CONSORCIO	0,04<4,91	NS
CONSORCIO-CONTROL	97,15>4,91	S
CONSORCIO-UP1	45,45>4,91	S
UP1-CONTROL	51,70>4,91	S

*S= Significativo; NS= No significativo

Anexo 13: Ausencia de halos de inhibición en la prueba de antagonismo entre las cepas bacterianas UP1 y 3T412C a las 48 horas en medio TSA.



Anexo 14: Ausencia de halos de inhibición en la prueba de antagonismo entre las cepas bacterianas UP1 y 3T412C a las 48 horas en M.M.

