

**Evaluación de la biodegradación de pentolita por acción de bacterias de la familia Pseudomonadaceae  
aisladas de suelos del Polígono de tiro, destacamento el Corazón cantón Mejía provincia Pichincha –  
Ecuador**

Barberán Pontón, Alison Fernanda

Departamento Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Dr. Ávalos Zambrano, Rodrigo M. Sc.

7 de abril del 2021

## Reporte de Urkund



### Document Information

Analyzed document	Trabajo de Titulación_Barberán Pontón Alison Fernanda_VU.docx (D101014211)
Submitted	4/8/2021 7:19:00 PM
Submitted by	
Submitter email	afbarberan@espe.edu.ec
Similarity	4%
Analysis address	ravalos.espe@analysis.orkund.com

### Sources included in the report

<b>W</b>	URL: <a href="https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8595/tesis554.pdf?seque...">https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8595/tesis554.pdf?seque ...</a> Fetched: 1/5/2020 7:40:46 AM	1
<b>W</b>	URL: <a href="https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8719/tesis662.pdf?seque...">https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8719/tesis662.pdf?seque ...</a> Fetched: 7/7/2020 8:09:52 AM	2
<b>W</b>	URL: <a href="https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/51285/EFFECTO%20DEL%20CA...">https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/51285/EFFECTO%20DEL%20CA ...</a> Fetched: 1/9/2021 8:10:31 PM	8
<b>W</b>	URL: <a href="https://core.ac.uk/download/pdf/47071841.pdf">https://core.ac.uk/download/pdf/47071841.pdf</a> Fetched: 7/31/2020 3:43:01 PM	5
<b>W</b>	URL: <a href="https://1library.co/document/q7wgwxoz-degradacion-pentaeritritol-tetranitrato-bact...">https://1library.co/document/q7wgwxoz-degradacion-pentaeritritol-tetranitrato-bact ...</a> Fetched: 8/7/2020 7:43:00 PM	1
<b>W</b>	URL: <a href="https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8472/tesis436.pdf?seque...">https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8472/tesis436.pdf?seque ...</a> Fetched: 10/21/2019 3:43:37 AM	3
<b>SA</b>	<b>Tesis Edwin Licta 14-02-2020.docx</b> Document Tesis Edwin Licta 14-02-2020.docx (D63908712)	3
<b>SA</b>	<b>TESIS PAOLA NORKA LUDEÑA MENDEZ.09.10.20.docx</b> Document TESIS PAOLA NORKA LUDEÑA MENDEZ.09.10.20.docx (D81169220)	2
<b>J</b>	<b>Caracterización molecular de bacterias degradadoras de pentaeritritol tetranitrato (PETN) aisladas de ambientes mineros y evaluación de su eficiencia de degradación</b> URL: 84b4af55-3e9a-47c6-977f-b41ea5854d33 Fetched: 1/29/2021 4:52:37 AM	1
<b>W</b>	URL: <a href="http://fi-admin.bvsalud.org/document/view/ma764">http://fi-admin.bvsalud.org/document/view/ma764</a> Fetched: 12/17/2020 9:37:31 PM	2

RODRIGO  
AVALOS  
ZAMBRANO

Digitally signed by RODRIGO AVALOS  
ZAMBRANO  
DN: cn=RODRIGO AVALOS ZAMBRANO,  
serialNumber=1,2021.04.08.17:01:17-08:00  
C=COLOMBIA, o=INFORMACION  
=SECURITY DATA S.A.S., c=EC  
Date: 2021.04.08 17:01:17 -08:00



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, **“Evaluación de la biodegradación de pentolita por acción de bacterias de la familia Pseudomonadaceae aisladas de suelos del Polígono de tiro, destacamento el Corazón cantón Mejía provincia Pichincha – Ecuador”** fue realizado por la señorita **Barberán Pontón Allison Fernanda**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 8 de abril, 2021

**RODRIGO  
AVALOS  
ZAMBRANO**  
Avalos Zambrano, Rodrigo  
C.C. 0601299951  
**DOCENTE**

Digitally signed by RODRIGO AVALOS  
ZAMBRANO  
DN: cn=RODRIGO AVALOS ZAMBRANO,  
serialNumber=1, c=EC, o=UNIVERSIDAD  
DE LAS FUERZAS ARMADAS,  
ou=SECURITY DATA S.A. S.p.A. EC,  
Date: 2021.04.08 17:24:21 -0500



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Yo, **Barberán Pontón, Alison Fernanda**, con cédula de ciudadanía 1722790464, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación de la biodegradación de pentolita por acción de bacterias de la familia Pseudomonadaceae aisladas de suelos del Polígono de tiro, destacamento el Corazón cantón Mejía provincia Pichincha – Ecuador”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Sangolquí, 8 de abril, 2021**

Firma

**Barberán Pontón, Alison Fernanda**

C.C.: 1722790464



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Yo **Barberán Pontón, Alison Fernanda**, con cédula de ciudadanía 1722790464, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación de la biodegradación de pentolita por acción de bacterias de la familia Pseudomonadaceae aisladas de suelos del Polígono de tiro, destacamento el Corazón cantón Mejía provincia Pichincha – Ecuador”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 8 de abril, 2021**

Firma

**Barberán Pontón, Alison Fernanda**

C.C.: 1722790464

**Dedicatoria**

A mis padres

Nancy y Jaime,

a mi hermana Patricia y a mi hermano Abraham

***Alison Fernanda Barberán Pontón***

## Agradecimientos

*En mi vida universitaria y a lo largo de este trabajo he contado con el apoyo de muchas personas a las cuales me gustaría agradecer de todo corazón.*

*A mi tutor de proyecto el profesor Rodrigo Ávalos, agradezco haberme otorgado la confianza para desarrollar este tema y el apoyo, paciencia y ánimos. Sus comentarios y observaciones a lo largo de la investigación me ayudaron a desarrollarla y concluirla de la mejor manera.*

*A mi cotutora de proyecto la docente Karina Ponce Loaiza y a Rafael Vargas les agradezco infinitamente por sus enseñanzas, paciencia y toda la confianza a lo largo de todo el tiempo que trabajé con ellos, además por ayudarme con todo lo que necesité para desarrollar este trabajo.*

*A mis docentes por sus enseñanzas no solo a nivel educativo, si no por inculcarme perseverancia y constancia en todo nivel. A aquellos que me dieron la oportunidad de trabajar a su lado, infinitas gracias por la confianza que me otorgaron.*

*A mi primera mentora de laboratorio Carina Stael, gracias por darme la oportunidad de trabajar a su lado enseñándome muchísimas cosas y por apoyarme aún ya fuera del laboratorio con todo lo que he necesitado siempre.*

*A mis amigos a lo largo de la carrera David, María Cristina, Marjorie, Carlos A.; gracias por hacer de estos años no solo una experiencia educacional si no también días felices y llevaderos. A mi mejor amigo de toda la vida Carlos V., gracias por pese a cualquier circunstancia haber estado a mi lado.*

*A mis padres nunca podré terminar de agradecerles por todo lo que me han enseñado, apoyado y por ser los mejores padres que pueden existir. Mil gracias a mi hermana por siempre creer en mí y a mi hermano por siempre cada mal día sacarme una sonrisa.*

## Índice de Contenidos

Reporte de Urkund .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de Contenidos .....	8
Índice de Figuras .....	13
Índice de Tablas .....	14
Listado de Abreviaturas .....	15
Resumen .....	16
Abstract .....	17
Capítulo 1: Introducción .....	18
Antecedentes.....	18
Justificación .....	18
Objetivos.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos.....	19
Capítulo 2: Marco Teórico.....	20
Explosivos .....	20

Definición .....	20
Características.....	20
Problemática en el Uso de Explosivos.....	20
Métodos Para el Tratamiento de Explosivos.....	21
Atenuación Natural.....	21
Tratamientos Fisicoquímicos.....	21
Tratamientos Biológicos de Explosivos.....	22
Pentolita .....	26
Tetranitrato de pentaeritritol (PETN).....	26
Trinitrotolueno (TNT).....	27
Microorganismos presentes en suelos contaminados con pentolita .....	29
Degradación de explosivos por acción de microorganismos.....	29
Transformación de PETN por bacterias.....	30
Transformación de TNT por bacterias.....	31
Degradación aeróbica de TNT .....	31
Degradación anaeróbica de TNT.....	33
Familia Pseudomonadaceae .....	34
Capítulo 3: Metodología .....	35
Materiales, Equipos y Reactivos.....	35
Materiales, Equipos y Reactivos para el Muestreo y Procesamiento de Muestras .....	35

	10
Equipos .....	35
Materiales .....	35
Reactivos.....	35
Materiales, equipos y reactivos para la preparación de medios de cultivo y siembra de bacterias..	35
Equipos .....	35
Materiales .....	36
Reactivos.....	36
Materiales, equipos y reactivos para la preparación de muestras y corrida por HPLC .....	36
Equipos .....	36
Materiales .....	37
Reactivos.....	37
Metodología .....	38
Fase de Campo.....	38
Muestreo. ....	38
Procesamiento de muestras.....	39
Fase de Laboratorio .....	39
Aislamiento de bacterias.....	39
Aislamiento de microorganismos de muestras de suelo.....	39
Caracterización de bacterias .....	41
Caracterización morfológica y prueba de oxidasa.....	41

	11
Pruebas bioquímicas .....	42
Crecimiento bacteriano en medios con pentolita .....	43
Preparación de medios con pentolita .....	43
Preparación de medios sólidos con pentolita. ....	43
Preparación de caldos de cultivo con pentolita. ....	43
Siembra en medios de cultivo con pentolita añadida .....	43
Siembra de selección de cepas.....	43
Evaluación del crecimiento microbiano de cepas .....	44
Selección del mejor tratamiento.....	44
Recuento en placa de las cepas en cada tratamiento. ....	44
Siembra para la evaluación del potencial de degradación .....	44
Evaluación de la degradación de pentolita. ....	45
Corrida por HPLC.....	45
Análisis estadístico .....	45
Pruebas post hoc.....	46
Capítulo 4: Resultados .....	47
Aislamiento de bacterias.....	47
Biomasa microbiana inicial de muestras de suelo.....	47
Caracterización de bacterias .....	48
Selección de cepas potencialmente degradadoras de pentolita.....	52

Selección del mejor tratamiento.....	53
Evaluación de la degradación de pentolita .....	53
Potencial de degradación de pentolita .....	54
Análisis estadístico.....	56
Capítulo 5: Discusión.....	60
Conclusiones.....	66
Recomendaciones.....	67
Bibliografía.....	68
Anexos .....	75

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química del Tetranitrato de pentaeritritol (PETN) .....	26
<b>Figura 2.</b> Estructura química del trinitrotolueno .....	28
<b>Figura 3.</b> Catálisis del PETN por la enzima PETN reductasa de <i>Enterobacter cloacae</i> PB2 .....	30
<b>Figura 4.</b> Reducción de TNT mediante enzimas Nitroreductasas .....	32
<b>Figura 5.</b> Transformación del complejo Meisenheimer mediante enzimas de la familia Old Yellow Enzyme .....	33
<b>Figura 6.</b> Ubicación Geográfica del Área de muestreo.....	38
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de familias identificadas .....	52
<b>Figura 8.</b> Conteo de microorganismos para todos los tratamientos al final de la incubación.....	53
<b>Figura 9.</b> Variación de la concentración de TNT y PETN durante 8 días en cada una de las cepas.....	54
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de degradación de TNT y PETN .....	55

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales tratamientos biológicos empleados para la remediación de TNT y PETN .....	23
<b>Tabla 2.</b> Propiedades fisicoquímicas del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT).....	27
<b>Tabla 3.</b> Propiedades fisicoquímicas del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT).....	28
<b>Tabla 4.</b> Composición del Agar Nutriente .....	40
<b>Tabla 5.</b> Composición del medio MacConkey Lactosa .....	40
<b>Tabla 6.</b> Composición del medio Papa Dextrosa (PDA).....	40
<b>Tabla 7.</b> Composición del medio Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD) .....	41
<b>Tabla 8.</b> Composición del medio Chromocult .....	41
<b>Tabla 9.</b> Medio Citrato de Simmons .....	42
<b>Tabla 10.</b> Medio Triple Azúcar Hierro .....	42
<b>Tabla 11.</b> Unidades formadoras de colonias por placa Petrifilm.....	47
<b>Tabla 12.</b> Resultados de tinción GRAM para las bacterias en las diferentes muestras tomadas .....	47
<b>Tabla 13.</b> Caracterización de las 58 cepas aisladas en medio MKL .....	48
<b>Tabla 14.</b> Resultados de la siembra en los medios XLD y Chromocult de las cepas pre – seleccionadas ..	49
<b>Tabla 15.</b> Pruebas de batería corta para cepas pre – seleccionadas (segunda pre – selección) .....	50
<b>Tabla 16.</b> Cepas de la familia Pseudomonadaceae sembradas en medio sólido con pentolita. ....	52
<b>Tabla 17.</b> Concentración de TNT y PETN en los diferentes tiempos de muestreo .....	54
<b>Tabla 18.</b> Porcentaje de degradación de TNT y PETN para cada una de las cepas.....	55
<b>Tabla 19.</b> Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error.....	56
<b>Tabla 20.</b> Análisis estadístico multivariable (ANOVA) .....	56
<b>Tabla 21.</b> Pruebas de efectos inter-sujetos.....	57
<b>Tabla 22.</b> Pruebas post hoc: comparaciones múltiples.....	58
<b>Tabla 23.</b> Prueba de Duncan para subconjuntos homogéneos.....	59

### Listado de Abreviaturas

<b>TNT</b>	Trinitrotolueno
<b>PETN</b>	Tetranitrato de Pentaeritritol
<b>2,4 – DNT</b>	2,4 – Dinitrotolueno
<b>HPLC</b>	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
<b>spp.</b>	Especies
<b>TSI</b>	Hierro Triple azúcar
<b>A/A</b>	Pico amarillo/ Fondo amarillo – Superficie ácida/profundidad ácida
<b>K/A</b>	Pico rojo/ Fondo amarillo – Superficie alcalina/profundidad ácida
<b>K/K</b>	Pico rojo/ Fondo rojo – Superficie alcalina/profundidad alcalina
<b>XLD</b>	Xilosa Lisina Desoxicolato
<b>MKL</b>	MacConkey Lactosa
<b>SH<sub>2</sub></b>	Sulfuro de Hidrógeno
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>N<sub>2</sub></b>	Dinitrógeno
<b>NO<sub>x</sub></b>	Óxidos de Nitrógeno
<b>UFC/mL</b>	Unidades formadoras de colonias por mililitro
<b>TNCT</b>	Considerado muy alto para el recuento

## Resumen

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la biodegradación de pentolita por acción de bacterias de la familia Pseudomonadaceae aisladas de suelos del Polígono de tiro, destacamento el Corazón cantón Mejía provincia Pichincha – Ecuador. Las muestras se tomaron del suelo del polígono de tiro a diferentes profundidades e inocularon en medios de cultivo nutritivos y selectivos, se aislaron 58 colonias y se realizaron pruebas bioquímicas para determinar su familia. Se encontró que un 20% de las cepas aisladas pertenecían a la familia Rhizobiaceae, un 36% a la familia Aeromonadaceae y que el 44% de las cepas pertenecían a la familia Pseudomonadaceae. Se evaluó la tolerancia de las Pseudomonadaceae a los porcentajes 0,1%; 1%; 5% de Pentolita añadida al medio de cultivo obteniéndose un cuatro cepas con buen crecimiento en el medio, las que se inocularon en caldos de cultivo con diferentes proporciones de pentolita de donde se estimó el crecimiento microbiano para cada cepa por conteo en placa tras los ocho días de incubación, determinándose que el mayor crecimiento de microbiano se dio en el tratamiento con 0,1% de pentolita por lo cual se evaluó la degradación de pentolita a esta proporción obteniéndose los porcentajes de degradación: para TNT 84,17%, 9,973%, 80,274% y 14,068% para las cepas 1, 2, 3 y 4 respectivamente; para PETN 9,48%, 69,29%, 13,47% y 50,41% para las cepas 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Finalmente se determinó que las cepas 1 y 3 fueron más eficientes al degradar TNT y las cepas 2 y 4 más eficientes en la degradación de PETN.

### **PALABRAS CLAVE:**

- **PSEUDOMONADACEAE**
- **PENTOLITA**
- **TOLERANCIA**
- **BIODEGRADACIÓN**

### **Abstract**

The objective of this study was to evaluate the biodegradation of pentolite by the action of bacteria of the Pseudomonadaceae family isolated from soils of the firing range, the Corazon detachment, Mejía canton, Pichincha province - Ecuador. The samples were taken from the soil of the firing range at different depths and inoculated in nutritious and selective culture media, 58 colonies were isolated and biochemical tests were carried out to determine their family. It was found that 20% of the isolated strains belonged to the Rhizobiaceae family, 36% to the Aeromonadaceae family and that 44% of the strains belonged to the Pseudomonadaceae family. The tolerance of the Pseudomonadaceae was evaluated at the percentages 0,1%; 1%; 5% Pentolite added to the culture medium, obtaining four strains with good growth in the medium, which were inoculated in culture broths with different proportions of pentolite, from which the microbial growth for each strain was estimated by plate count after eight days of incubation, determining that the highest microbial growth occurred in the treatment with 0,1% pentolite, for which the degradation of pentolite was evaluated at this proportion, obtaining the degradation percentages: for TNT 84,17%; 9,973%; 80,274% and 14,068% for strains 1, 2, 3 and 4 respectively; for PETN 9,48%; 69,29%, 13,47% and 50,41% for strains 1, 2, 3 and 4 respectively. Finally, it was determined that strains 1 and 3 were more efficient in degrading TNT and strains 2 and 4 were more efficient in degrading PETN.

#### **KEYWORDS:**

- **PSEUDOMONADACEAE**
- **PENTOLITE**
- **TOLERANCE**
- **BIODEGRADATION**

## Capítulo 1: Introducción

### Antecedentes

La contaminación ambiental es una amenaza global para la salud y el medio ambiente. Las actividades mineras y militares en particular que utilizan explosivos, sus productos y subproductos de degradación son una fuente de contaminación. La pentolita es una mezcla de PETN – TNT que se emplea para cargas fundidas y prensadas. Los compuestos nitroaromáticos 2, 4, 6-trinitrotolueno (TNT) y el tetranitrato de pentaeritrol (PETN) son explosivos que se han producido a gran escala para su uso en aplicaciones industriales, militares y mineras que con el tiempo sus residuos se han acumulado en el suelo y aguas subterráneas. Estos contaminantes orgánicos de nitrato son altamente recalcitrantes que normalmente no se encuentran en el medio ambiente, clasificándose como compuestos xenobióticos. Según García (2014), el TNT es un compuesto posiblemente carcinogénico y mutagénico, altamente persistente en el suelo. El PETN se lo ha considerado potencialmente tóxico a diferentes niveles tróficos lo que hace importante su estudio.

### Justificación

La contaminación de suelos con restos de TNT y PETN componentes de la pentolita utilizada en las diferentes actividades militares y mineras, hace necesario el tratamiento de estos residuos peligrosos que se generan por la detonación de los mismos. Según Rozo (2011), los suelos expuestos a dichos explosivos poseen microorganismos degradadores de este tipo de compuestos, para estos microorganismos la fuente de energía, carbono y nitrógeno son los residuos que se generan debido a las detonaciones en la aplicación de sus actividades, por tal motivo es indispensable el estudio de los procesos biológicos como la biodegradación de compuestos xenobióticos para la reducción del impacto ambiental por efecto de la detonación de explosivos y minimización de los riesgos al medio ambiente, por lo tanto a la salud humana.

En el Ecuador el uso de explosivos como la pentolita en diferentes actividades e industrias hace que se constituya como una fuente contaminante de creciente preocupación, debido a que la pentolita contamina suelos y aguas subterráneas he ahí, la importancia de establecer una metodología de estudio y evaluación de la biodegradación de restos de este explosivo y sus subproductos en las diferentes áreas de aplicación. Con este estudio se pretende generar un acercamiento a la cinética de degradación de pentolita por parte de los microorganismos de la familia Pseudomonadaceae aislados de los suelos que se muestrearon del polígono de tiro del Depósito Conjunto “El Corazón” del Comando Conjunto de las Fuerzas Armadas localizado en las coordenadas  $0^{\circ}29'26.4''S$   $78^{\circ}36'41,1''W$  en donde se realizan pruebas con explosivos y se considera que debe existir una acumulación de restos de pentolita (TNT y PETN) componentes del explosivo en estudio.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Evaluar la biodegradación de pentolita por acción de bacterias de la familia Pseudomonadaceae aisladas de suelos del Polígono de tiro, destacamento el Corazón cantón Mejía provincia Pichincha – Ecuador

### ***Objetivos Específicos***

Aislar e identificar las bacterias presentes en las muestras de suelo obtenidas a diferentes profundidades (20, 60, 100 cm) del Polígono de Tiro, a través de medios de cultivo selectivos y pruebas bioquímicas.

Cultivar las bacterias de la familia Pseudomonadaceae en medio de cultivo suplementado con pentolita en proporciones del 0,1%, 1% y 5%.

Cuantificar por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) la biodegradación de pentolita por acción de las bacterias cultivadas.

## Capítulo 2: Marco Teórico

### Explosivos

#### *Definición*

Un explosivo se define como una sustancia que por la aplicación de energía experimenta una rápida reacción química que produce una gran cantidad de calor, ejerciendo presión a su entorno (Pedraza, 2015); este proceso se denomina detonación y además transforma al explosivo en nuevos compuestos químicos denominados subproductos.

#### *Características*

Los explosivos constan de un núcleo de carbono unido de forma covalente a grupos oxidizantes: nitro, nitramina, éster de nitrato, entre otros. Dichos grupos contienen enlaces nitrógeno – nitrógeno, nitrógeno – oxígeno y tienen dos o más átomos covalentemente unidos, en una explosión se da la ruptura de estos enlaces por reacción redox, formando productos gaseosos como CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>). Los compuestos nitroaromáticos son contaminantes ubicuos cuya toxicidad es bien conocida, además se consideran moléculas persistentes dependiendo de la composición del explosivo.

El término explosión se refiere a detonaciones químicas, es decir que las explosiones son producto de una reacción química exotérmica donde la energía de una sustancia o mezcla de sustancias es liberada con rapidez provocando una onda expansiva de choque. Cuando un explosivo es detonado este libera sus subproductos al ambiente, dichos compuestos se pueden quedar en el suelo, en sedimentos, aguas superficiales y subterráneas de los sitios donde se producen las explosiones.

#### *Problemática en el Uso de Explosivos*

El uso de explosivos genera una problemática ambiental durante su producción y uso a gran escala debido a que los componentes, sus subproductos y residuos que se generan son considerados tóxicos y persistentes por la presencia de compuestos aromáticos. La persistencia de los residuos de

explosivos y sus subproductos han conducido al incremento de la contaminación ambiental de suelos, sedimentos, aguas superficiales y subterráneas.

La liberación de sustancias químicas de los explosivos en el suelo causa contaminación debido a la detonación implicando riesgo de acumulación de compuestos tóxicos en las cadenas alimentarias humanas y silvestres. Su presencia en el medio ambiente representa un peligro ecológico y para la salud, por lo tanto, es necesario establecer diferentes métodos para limpiar los sitios contaminados y garantizar la seguridad ambiental.

### ***Métodos Para el Tratamiento de Explosivos***

Existen varios métodos para remediar suelos contaminados con explosivos, muchos de estos métodos implican alternativas fisicoquímicas generando un alto impacto ambiental debido a que los compuestos en los explosivos son contaminantes y persistentes en el medio ambiente (Rozo, 2011). Por tal razón es necesario encontrar alternativas ambientalmente viables.

**Atenuación Natural.** También denominada remediación intrínseca, consiste en el uso de procesos naturales para limpiar ambientes contaminados, los procesos de reducción u oxidación de compuestos se controlan por medio del monitoreo periódico de la reducción de la concentración del contaminante (García, 2014). Según Bidja Abena y colaboradores(2019), este proceso se basa en el potencial de degradación intrínseco de las poblaciones de microorganismos presentes en el suelo impactado para la degradación y eliminación del contaminante, sin embargo este potencial es limitado debido a que las concentraciones del contaminante exceden las que pueden ser asimiladas por las poblaciones microbianas.

**Tratamientos Fisicoquímicos.** Existen diversos métodos de remediación fisicoquímica y biológica utilizados para la remediación de contaminantes. Esta remediación va enfocada a los residuos producidos en la fabricación, uso y manejo de explosivos obsoletos que en ocasiones no detonan y solo son almacenados. Existen diversos tratamientos de este tipo, los cuales se resumen en el anexo 1.

**Tratamientos Biológicos de Explosivos.** En los procesos de tratamientos biológicos se tienen en cuenta tres conceptos fundamentales: biotransformación, biodegradación y mineralización (García, 2014). La biotransformación es el proceso de biodegradación mediante el cual organismos vivos descomponen sustancias en compuestos más pequeños, y en cuanto a la mineralización, esta se da cuando se ha completado la biodegradación, según Knapp & Bromley (2003), la mineralización describe la degradación de un compuesto a sus componentes minerales, es decir  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , además, dependiendo de la composición del compuesto se pueden liberar otros minerales (sulfuro, sulfato, sulfito, amoníaco, nitrito, fluoruro, etc.) e incluso puede liberarse metano si el proceso es anaeróbico.

En la actualidad las investigaciones han tenido como centro el uso de procesos biológicos donde participan microorganismos, plantas y otros organismos vivos o sus productos para la eliminación de productos xenobióticos y sus subproductos de manera eficiente, buscándose la degradación completa por medio del metabolismo microbiano para que el producto final pueda ser utilizado por la naturaleza (Marín, 2014). Es importante considerar las características únicas que posee cada sitio donde las alternativas de tratamiento se vean favorecidas individualmente o se requiera más de una para la reducción de los contaminantes explosivos a niveles seguros y aceptables, los tratamientos biológicos más aceptados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1.

Principales tratamientos biológicos empleados para la remediación de TNT y PETN

TRATAMIENTO	CARACTERÍSTICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<b>Compostaje</b>	Se emplean residuos orgánicos mezclados con los contaminantes por lo cual son susceptibles a reducción cometabólica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Económicamente viable</li> <li>• Posibilidad de realizar <i>in situ</i></li> <li>• Se han obtenido buenos resultados de remoción</li> <li>• Se emplean los microorganismos propios del área contaminada, así como los microorganismos presentes en el material de aporte (ej. estiércol)</li> <li>• Disminución de la toxicidad de los compuestos en suelos y lixiviados</li> <li>• El material tratado puede ser devuelto al lugar si cumple con la normativa, además puede soportar el crecimiento vegetal tras el proceso</li> <li>• Se ha reportado para TNT y PETN</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costoso, por la maquinaria y mano de obra</li> <li>• Tiempo prolongado de acción (tiempo de incubación altos)</li> <li>• No efectivo en altas concentraciones de explosivo</li> <li>• Grandes extensiones de tierra requeridas</li> <li>• Probabilidad de fijación de los explosivos al material húmico</li> <li>• Exposición del personal a vapores tóxicos</li> <li>• Incremento de material contaminado por la mezcla con materia orgánica</li> <li>• Poco conocimiento de los microorganismos involucrados en el proceso</li> </ul>
<b>Reactor</b>	El suelo contaminado se mezcla con agua para crear un lodo, esto se realiza en reactores de varios	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pueden ser aerobios, anaerobios o una secuencia de ambos para mayor rendimiento</li> <li>• Control de parámetros (O<sub>2</sub>, pH, temperatura, etc)</li> <li>• Mayor remoción debido al contacto directo entre el suelo contaminado, los nutrientes y microorganismos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relativamente costoso por los procesos de control, operación y mantenimiento</li> <li>• No puede realizarse <i>in situ</i></li> <li>• Tras el tratamiento se requiere la separación suelo – agua para su disposición</li> </ul>

TRATAMIENTO	CARACTERÍSTICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
	<p>diseños y al lodo se le puede adicionar nutrientes, cofactores y aceptores de electrones. Se agita mecánicamente.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El sistema promueve la reducción de los grupos nitro</li> <li>• Relativamente rápido (35 – 150 días)</li> <li>• Reducción de la disponibilidad de los explosivos por unión covalente a la materia orgánica</li> <li>• Un paso aeróbico final tras la fase anaeróbica ocasiona que los metabolitos se unan a la materia orgánica</li> <li>• Con la fase aerobia se acelera el crecimiento de la biomasa y se mineraliza el TNT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede no darse la degradación completa de los metabolitos reducidos por su unión covalente a la materia orgánica</li> <li>• Para el caso de PETN no se han reportado estudios a gran escala.</li> </ul>
<p><b>Bioremediación</b></p>	<p>Consiste en la disposición del suelo contaminado en una capa delgada (menor a 1,5 m)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilizado ampliamente hace muchos años</li> <li>• Simple y económico de implementar</li> <li>• Se mejora la degradación por el buen contacto con el aire</li> <li>• Empleo de microorganismos nativos.</li> <li>• Efectivo y de bajo costo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere adicionar nutrientes para garantizar la degradación</li> <li>• Menor control para monitorear los procesos de degradación</li> <li>• Se requiere sistemas de control del drenaje de agua y grandes extensiones de tierra</li> <li>• Ocasionalmente se agregan microorganismos por la disminución de las poblaciones autóctonas (debido a la toxicidad del contaminante)</li> </ul>

TRATAMIENTO	CARACTERÍSTICAS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
			<ul style="list-style-type: none"> <li>• En ocasiones se requiere un traslado del suelo a un espacio más amplio</li> <li>• A elevadas concentraciones del contaminante puede no ser efectivo.</li> <li>• No efectivo en suelos arcillosos.</li> </ul>
<b>Fitoremediación</b>	Se utilizan plantas específicas para remover contaminantes	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento de porcentaje de remediación.</li> <li>• Efectiva detoxificación de suelos y humedales</li> <li>• Relativamente económico y aceptado por el público</li> <li>• Funciona en grandes extensiones con baja concentración de contaminantes</li> <li>• Producción de enzimas microbianas por plantas a las cuales se les ha incorporado genes bacterianos (codifican para nitroreductasas) que las hacen más tolerantes a niveles altos de explosivo</li> <li>• Existen reportes que funcionan para PETN</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relativamente costoso en cuanto a procesos de control y mantenimiento</li> <li>• Las plantas pueden secuestrar el contaminante (en vacuolas) más no degradarlo</li> <li>• Afectación al ecosistema en caso de utilizarse plantas genéticamente modificadas</li> <li>• La remoción es eficiente a concentraciones bajas (4 ppm) y disminuye con el aumento de la concentración (20 ppm)</li> </ul>

## Pentolita

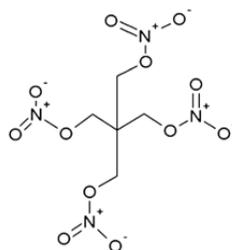
La pentolita se encuentra comúnmente como un sólido extremadamente explosivo, se compone por partes iguales de tetranitrato de pentaeritritol (PETN) y trinitrotolueno (TNT), es muy sensible al calor y a los golpes (National Center for Biotechnology Information (c), 2020). La composición PETN – TNT en proporción 50 – 50 es la más generalizada y se emplea para cargas fundidas y prensadas. Existen otras proporciones de PETN – TNT, la de 86.5% de TNT es eutéctica; por ello la pentolita 50 – 50 contiene el 57.8% de mezcla eutéctica y el 42.2% de PETN (Mora, 2013).

### ***Tetranitrato de pentaeritritol (PETN)***

Tetranitrato de pentaeritritol o PETN, es un nitrato de pentaeritritol donde cuatro grupos hidroxilo de pentaeritritol se han convertido en el éster de nitrato correspondiente (figura 1). Es insoluble en agua debido a que los enlaces éster que se forman en la condensación del pentaeritriol no poseen carga, lo que reduce la polaridad y solubilidad (National Center for Biotechnology Information (a), s.f.). El PETN es uno de los más poderosos explosivos conocidos, utilizado en mezclas con plastificantes conforma explosivos plásticos o flematizado con cera (5–40%) para estabilización; esto se busca para mejorar el manejo de los explosivos o reducir su sensibilidad (Pouretedal *et al.*, 2017). Su uso como explosivo no se da en forma pura sino comúnmente empleado con TNT, se resumen sus características fisicoquímicas en la tabla 2.

### **Figura 1.**

#### *Estructura química del Tetranitrato de pentaeritritol (PETN)*



Tomado de: *Persistence of pentolite (PETN and TNT) in soil microcosms and microbial enrichment cultures* (p.2) por (Arbeli *et al.*, 2016).

Tabla 2.

*Propiedades fisicoquímicas del tetranitrato de pentaeritritol (PETN)*

<b>Fórmula molecular</b>	<b>C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub></b>
<b>Peso molecular (gmol<sup>-1</sup>)</b>	316,17
<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1,78
<b>Punto de fusión</b>	141,3°C – 143,3°C
<b>Solubilidad (en g por 100 g de solvente a 25°C)</b>	Acetona: 20,3 Acetato de etilo: 6,3 Etanol: 0,2 Agua: 2 × 10 <sup>-4</sup>
<b>Coefficiente octanol/agua (log K<sub>ow</sub>)</b>	1,61 – 3,71
<b>Constante de Henry (atm · m<sup>3</sup>/mol)</b>	1,2 × 10 <sup>-11</sup> – 1,7 × 10 <sup>-9</sup>
<b>Presión de vapor a 25°C (mm Hg)</b>	1,34 × 10 <sup>-11</sup> – 1,035 × 10 <sup>-10</sup>
<b>Apariencia y color</b>	Cristales blancos tetragonales

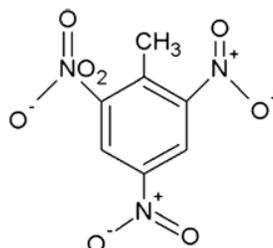
Nota. Recuperado de: *Determinación del potencial de degradación anaeróbica De 2,4,6-Trinitrotolueno (TNT) y Tetranitrato De Pentaeritritol (PETN) en suelos impactados con explosivos* (p. 24) por (García, 2014).

### ***Trinitrotolueno (TNT)***

El 2,4,6-trinitrotolueno es un compuesto aromático que tiene los grupos nitro en las posiciones 2, 4 y 6 (figura 2) (Arbeli *et al.*, 2016). Es un derivado del 1,3,5-trinitrobenceno, utilizado como explosivo en aplicaciones militares e industriales principalmente para llenar proyectiles, granadas y bombas de demolición aerotransportadas, dada su insensibilidad al impacto de expulsión del cañón de una pistola, este puede explotar por un mecanismo detonador (National Center for Biotechnology Information (b), s.f.). En la tabla 3 se presentan sus características fisicoquímicas.

**Figura 2.**

Estructura química del trinitrotolueno



Tomado de: *Persistence of pentolite (PETN and TNT) in soil microcosms and microbial enrichment cultures*

(p.2) por (Arbeli *et al.*, 2016)

**Tabla 3.**

*Propiedades fisicoquímicas del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)*

<b>Fórmula molecular</b>	<b>C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub></b>
<b>Peso molecular (g·mol<sup>-1</sup>)</b>	227,1
<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1,65
<b>Punto de fusión</b>	80°C – 82°C
	Acetona: 132
	Benceno: 88
<b>Solubilidad (en g por 100 g de solvente a 25°C)</b>	Cloroformo: 25
	Etanol: 1,5
	Agua: 0,01
<b>Coefficiente octanol/agua (log K<sub>ow</sub>)</b>	1,6 – 1,86
<b>Constante de Henry (atm · m<sup>3</sup>/mol)</b>	4,57 × 10 <sup>-7</sup>
<b>Presión de vapor a 25°C (mm Hg)</b>	1,99 × 10 <sup>-4</sup>
<b>Apariencia y color</b>	Escamas amarillas con olor a almendras amargas

Nota. Recuperado de: *Determinación del potencial de degradación anaeróbica De 2,4,6-Trinitrotolueno (TNT) y Tetranitrato De Pentaeritrol (PETN) en suelos impactados con explosivos* (p. 22) por (García, 2014).

Varios estudios han informado los efectos del TNT sobre receptores ecológicos como bacterias, algas, plantas y seres humanos. En animales se encontró que el TNT tiene un efecto teratogénico y citotóxico; se exploran aún efectos cancerígenos en seres humanos (Habineza *et al.*, 2017).

### **Microorganismos presentes en suelos contaminados con pentolita**

PETN y TNT (componentes de la pentolita), son considerados sustancias de lenta degradación debido a su estructura química y naturaleza, sin embargo, se han desarrollado diversos estudios con el fin de encontrar y aislar microorganismos con capacidad de degradarlos (Rozo, 2011). Existen bacterias con la capacidad de mineralizar ciertos explosivos utilizando sus compuestos como únicas fuentes de carbono y nitrógeno; además, el TNT y PETN se transforman inicialmente por enzimas inespecíficas sugiriendo una degradación gobernada por procesos cometabólicos (Arbeli *et al.*, 2016). Varios estudios sobre el tiempo de residencia y transformaciones de este tipo de compuestos se han centrado en la diferenciación de vías enzimáticas e identificación de intermediarios químicos siendo los aislados bacterianos aquellos que transforman a compuestos reducidos que se podrían absorber en el suelo y sedimentar materia orgánica (Montgomery *et al.*, 2013).

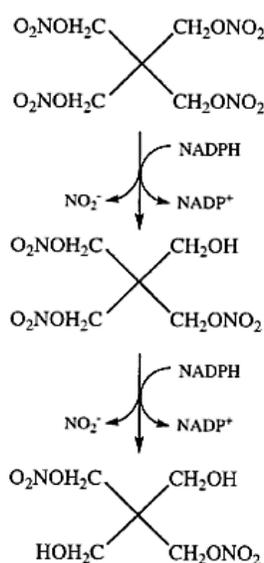
### ***Degradación de explosivos por acción de microorganismos***

Según García (2014) la biodegradación de PETN y TNT es dependiente de sus propiedades fisicoquímicas, especialmente de la presencia de grupos nitro los cuales son muy electronegativos favoreciendo las vías reductivas sobre las oxidativas. Actualmente las investigaciones se han centrado en procesos biológicos de organismos capaces 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 (Marín, 2014; pág 18).

**Transformación de PETN por bacterias.** La vía de degradación reportada para PETN consiste en reducciones consecutivas de grupos nitro liberando dos grupos nitro en condiciones aeróbicas y de tres a cuatro grupos nitro en condiciones anaeróbicas (García, 2014; pág 47). En la figura 3 se evidencia como los átomos de carbono y nitrógeno pueden ser asimilados por bacterias, contribuyendo a la formación de biomasa y el desarrollo de actividad metabólica.

**Figura 3.**

*Catálisis del PETN por la enzima PETN reductasa de Enterobacter cloacae PB2*



Tomado de: *Comparación de la degradación de pentaeritritol tetranitrato (PETN) en condiciones de atenuación natural y bioestimulación* (p.6) por (Velásquez, 2009).

Según García (2014), el proceso de transformación de PETN reportado es un proceso anaerobio donde la bacteria tiene la capacidad de utilizar esteres de nitrato como fuente de nitrógeno. Esta vía de degradación anaerobia de PETN, tiene ventajas potenciales de una rápida reducción a bajos potenciales redox, debido a la carencia de electrones de los grupos nitro de este compuesto, sin embargo, se requiere la adición de nitrato y/o sulfato como aceptores de electrones (García, 2014).

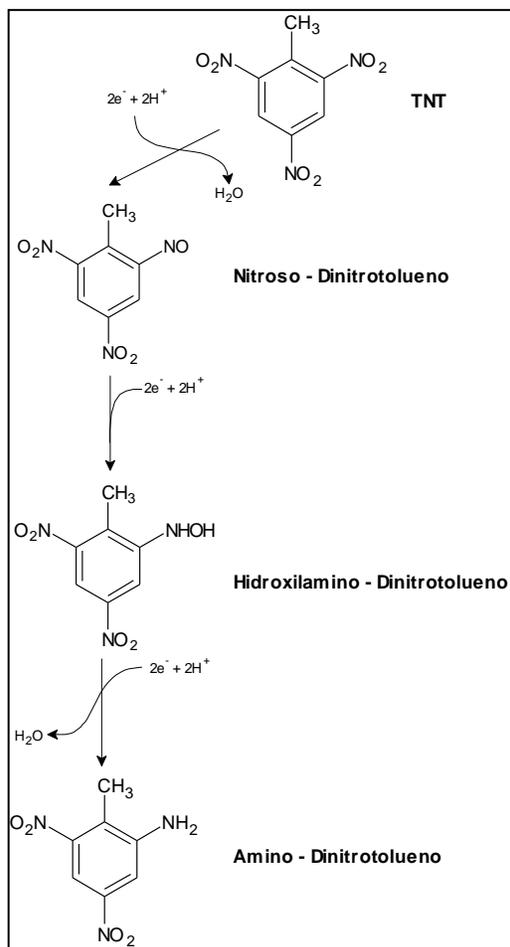
**Transformación de TNT por bacterias.** El TNT se metaboliza bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas por acción de nitroreductasas que son capaces de reducir los grupos nitro en el anillo aromático. Debido a la estructura del TNT (figura 2), el primer paso en la degradación del TNT en forma aerobia y anaerobia involucra reacciones reductivas directas o de condensación para la eliminación de al menos uno de los grupos nitro del anillo. Según los autores García (2014), Habineza y colaboradores (2017) y Marín (2014) al ser eliminado el anillo decrece la naturaleza electrofílica de las moléculas permitiendo a enzimas dioxigenasas usar los compuestos como sustratos; los grupos nitro se reducen a sus correspondientes aminas de forma natural debido a la presencia de numerosos donadores de electrones en los sedimentos, suelos y acuíferos. Existen varias bacterias representativas que degradan compuestos nitroaromáticos como el TNT, algunas de ellas se resumen en el anexo 3.

**Degradación aeróbica de TNT.** Se conocen tres vías metabólicas de degradación de TNT bajo condiciones aeróbicas, convirtiéndolo en compuestos intermediarios menos tóxicos (Rozo, 2011; pág 27). En la vía I el TNT actúa como aceptor de electrones, debido a la facilidad existente para reducir los grupos nitro formados por los enlaces nitrógeno-oxígeno altamente electrofílicos, la vía II es una ruta más compleja donde se forma un complejo híbrido llamado complejo de Meisenheimer (Arbeli *et al.*, 2016; pág 2). La vía III consiste en la reducción oxigenolítica de TNT, resultando en la producción de 3 – metil – 4,6 – dinitrocatecol a partir de la remoción de un grupo nitro (Marín, 2014; pág 25).

**Vía I.** En esta vía el TNT actúa como aceptor de electrones efectuándose una reducción secuencial de uno o máximo dos grupos nitro a grupos hidroxilamino o aminos por acción de enzimas nitroreductasas tal como se esquematiza en la figura 4, produciendo diferentes isómeros de compuestos nitroaromáticos que se muestran en el anexo 3 (Marín, 2014). Se han reportado bacterias como *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida* con este metabolismo (Rozo, 2011).

Figura 4.

Reducción de TNT mediante enzimas Nitroreductasas

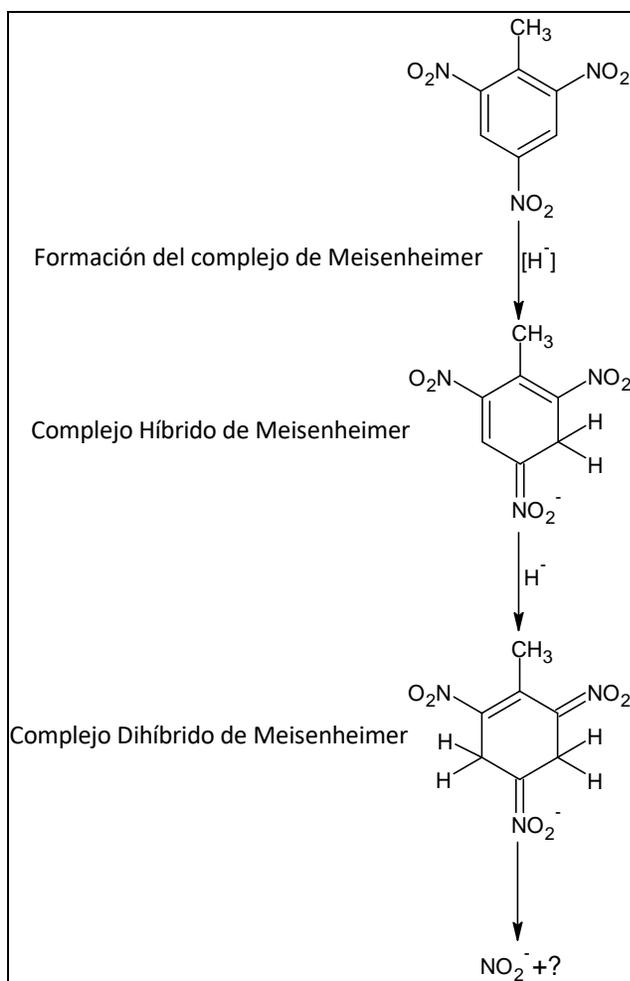


Tomado de: *Aislamiento y evaluación de bacterias degradadoras de pentolita, obtenidas a partir de muestras de suelos, agua y lodos con presencia de explosivos* (p.30) por (Rozo, 2011)

**Vía II.** Para formar el complejo de Meisenheimer (figura 5) el microorganismo ataca directamente los enlaces que conforman el anillo aromático. No se reportan numerosos microorganismos capaces de llevar a cabo este mecanismo, sin embargo, se conoce con certeza que *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae* y *Rhodococcus erythropolis* son capaces de degradar compuestos nitroaromáticos mediante esta vía (Rozo, 2011).

Figura 5.

Transformación del complejo Meisenheimer mediante enzimas de la familia Old Yellow Enzyme



Tomado de: *Selección e identificación molecular de un consorcio bacteriano para la degradación de TNT(2,4,6-trinitrotolueno) aislados de ambientes contaminados* (p.33) por (Marín, 2014).

**Vía III.** Esta vía se consiste en la reducción sucesiva del grupo nitro, esta posibilidad se reactivó gracias a la detección de 3 – metil – 4,6 dinitrocatecol y la liberación significativa de nitritos durante la transformación de TNT por acción de cultivos mixtos (Marín, 2014).

**Degradación anaeróbica de TNT.** La degradación de TNT en condiciones de anaerobiosis, consiste en una transformación secuencial de los grupos nitro unidos al anillo aromático hacia la

correspondiente amina (Marín, 2014). Esta vía es generalmente realizada por microorganismos anaerobios facultativos, como *Clostridium*, junto con algunas bacterias sulfatoreductoras como *Desulfovibrio* (Rozo, 2011).

### **Familia Pseudomonadaceae**

Los miembros de la familia Pseudomonadaceae son bacterias GRAM negativas cuya morfología consiste en bacilos con flagelación polar (Moejes *et al.*, 2017). Se encuentran ampliamente distribuidos encontrándose como saprófitos de vida libre en suelos, agua dulce, ambientes marinos o como agentes de enfermedades en plantas y animales (Drobish *et al.*, 2017), además, se encuentran ubicuamente en suelos de gran variedad de ambientes debido a su capacidad de metabolizar una amplia gama de nutrientes (Roquigny *et al.*, 2017). Poseen un metabolismo típicamente respiratorio, incapacidad de fijar dinitrógeno y capacidad de crecimiento a expensas de una gran variedad de sustratos (Palleroni, 1981).

## Capítulo 3: Metodología

### Materiales, Equipos y Reactivos

#### *Materiales, Equipos y Reactivos para el Muestreo y Procesamiento de Muestras*

##### Equipos

- Balanza de mano (CAMRY)
- Balanza digital (CAMRY)
- Nevera portátil (Igloo)

##### Materiales

- Pala (TRUPER)
- Palín (TRUPER)
- Azadón (TRUPER)
- Balde
- Costales
- Cinta métrica extensible (STANLEY)
- Cuerda
- Marco de madera
- Bolsas plásticas (Ziploc)
- Etiquetas
- Cinta adhesiva
- Marcador permanente y esfero
- Guantes
- Libreta
- Jeringuillas 10 mL (NIPRO)
- Clavos de acero

##### Reactivos

- Placas Petrifilm (3M™)
- Agua destilada estéril

#### *Materiales, equipos y reactivos para la preparación de medios de cultivo y siembra de bacterias*

##### Equipos

- Balanza analítica (Mettler Toledo)
- Autoclave (All – American)
- Agitador Orbital (OrbiCult ESCO)
- Mecheros de alcohol

**Materiales**

- Probeta 100 mL (Glassco)
- Envases para pesar
- Cucharas de plástico o cucharas metálicas estériles
- Cinta autoclave
- Papel Aluminio
- Fósforos/encendedor
- Papel toalla
- Matraz de 1000 mL (Glassco)
- Cajas Petri estériles
- Asa de siembra metálica
- Palillos estériles
- Hisopos estériles
- Tirillas de prueba oxidasa (Hardy Diagnostics)
- Asa Digrafsky de vidrio

**Reactivos**

- Agua destilada estéril
- Alcohol al 96%
- Savlón
- Alcohol antiséptico
- Agar Nutriente (Acumedia de Neogen)
- Agar MacConkey Lactosa (Titan Biotech Ltd.)
- Agar PDA (Becton Dickinson)
- Agar hierro triple azúcar (Titan Biotech Ltd.)
- Agar Citrato de Simmons (Titan Biotech Ltd.)
- Agar Chromocult (Merck)
- Agar Xilosa – Lisina – Desoxicolato (Neogen Corporation)
- Caldo TSB (Becton Dickinson)

***Materiales, equipos y reactivos para la preparación de muestras y corrida por HPLC*****Equipos**

- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento (UltiMate 3000 HPLC Thermo Scientific)
- Balanza analítica (Mettler Toledo)
- Columna cromatográfica C18 (Thermo Scientific)

**Materiales**

- Balones aforados de diferentes volúmenes: 1 mL – 1 L (Glassco)
- Filtros de cartucho de 0,22  $\mu\text{m}$  de nylon
- Viales de 2 mL con sello de PTFE
- Jeringas desechables de 10 mL (NIPRO)
- Micropipeta 100 – 1000  $\mu\text{L}$  (Labnet)
- Puntas para micropipeta 100 – 1000  $\mu\text{L}$

**Reactivos**

- Acetonitrilo – grado HPLC (J.T. BAKER)
- Acetona – grado HPLC (PanReac AppliChem)
- Metanol – grado HPLC (J.T. BAKER)
- Agua destilada – grado HPLC

## Metodología

### *Fase de Campo*

Las muestras de suelo fueron recolectadas del polígono de tiro del Depósito Conjunto “El Corazón” del Comando Conjunto de las Fuerzas Armadas localizado exactamente en las coordenadas 0°29'26.4''S 78°36'41,1''W por la mañana, a tres distintas profundidades: 20, 60, 100 cm.

### Figura 6.

#### *Ubicación Geográfica del Área de muestreo*



**Muestreo.** Se limitó un área de 1 m<sup>2</sup> con los clavos y la cuerda. Se definieron 10 puntos de muestreo al azar siguiendo la trayectoria indicada en zig – zag y con ayuda del marco de madera se limitó cada punto donde se tomaría la submuestra, con una pala se extrajo 200 gramos de suelo que se pesaron en un balde con la balanza de mano y se colocaron en un costal donde se mezclaron todas las submuestras tomadas y se homogeneizaron con ayuda de un palín. Una vez homogeneizada la muestra compuesta de suelo, se tomó y pesó con una balanza 500 g y se transfirieron a una bolsa de plástico Ziploc. La profundidad fue medida con ayuda de una cinta metro y una vez formada la muestra compuesta dejó la tierra excedente extraída en su lugar. Todo este proceso se repitió para obtener cada una de las muestras en las diferentes profundidades.

**Procesamiento de muestras.** Se pesaron 10 g de cada muestra tomada y se colocaron en fundas ziploc donde se agregó 90 mL de agua destilada estéril, se agitó manualmente hasta homogeneizar. Se prepararon tres diluciones por cada muestra en forma seriada. Para la primera dilución se tomó 1 mL de la mezcla con una jeringa conteniendo 9 mL de agua estéril, se agitó de forma manual este contenido y se vertió en una funda ziploc de la cual se tomó 1 mL con una jeringa que contenía 9 mL de agua destilada estéril se agitó manualmente y se colocó en otra funda ziploc, para la última dilución se tomó 1 mL de la dilución previa con una jeringa que contenía 9 mL de agua destilada estéril. 1 mL de cada una de las diluciones se inocularon en placas Petrifilm para determinar la biomasa inicial de cada muestra (UFC/mL) con la ecuación 1.

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ colonias} \times \text{factor de dilución}^*}{\text{mL muestra sembrada}} \quad (1)$$

Siendo: factor de dilución\* → inversa de la dilución

### ***Fase de Laboratorio***

El trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y Enzimología del Centro de Investigación de Aplicaciones Militares (CICTE) de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicados en el Cantón Rumiñahui, de la Provincia de Pichincha, en la Autopista General Rumiñahui, (coordenadas: 0° 18' 53.5" Sur, 78° 26' 36.5" Oeste).

### **Aislamiento de bacterias**

#### ***Aislamiento de microorganismos de muestras de suelo***

Utilizando la dilución  $10^{-3}$  de cada muestra, se sembró por estriado con asa metálica en medios de cultivo Agar Papa Dextrosa, MacConkey Lactosa y Agar Nutriente se incubó durante 48 horas a

temperatura ambiente. Para aislar las bacterias de interés se efectuó una segunda siembra en el medio de cultivo MacConkey Lactosa. La composición de los diferentes medios de cultivo utilizados se resume en las tablas 4, 5 y 6.

**Tabla 4.**

*Composición del Agar Nutriente*

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Agar	15,0
Extracto de Carne de Res	3,0
Peptona de gelatina	5,0

Nota. Recuperado de: *Nutritivo Agar* por (Laboratorios Britania (b), 2015)

**Tabla 5.**

*Composición del medio MacConkey Lactosa*

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>	<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Agar	13,5	Lactosa	10,0
Cristal violeta	0,001	Digerido péptico de tejido animal	1,5
Rojo Neutro	0,03	Digerido pancreático de gelatina	17,0
Cloruro de sodio	5,0	Digerido pancreático de caseína	1,5
Sales biliares	1,5		

Nota. Recuperado de: *MacConkey II Agar* por (Becton Dicknson (a), 2014)

**Tabla 6.**

*Composición del medio Papa Dextrosa (PDA)*

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Agar	15,00
Dextrosa	20,0
Infusión de papa	4,0

Nota. Recuperado de: *Agar Papa Dextrosa* por (Insumolab, 2014).

## Caracterización de bacterias

### Caracterización morfológica y prueba de oxidasa

Se determinó si las bacterias aisladas son de tipo oxidasa positiva u oxidasa negativa por medio del test oxidasa, para lo cual se tomó un fragmento de cada colonia con un palillo estéril y se colocó sobre una tirilla de prueba oxidasa y se observó el cambio de coloración. Se determinó además las características bioquímicas de las bacterias aisladas por medio de la siembra en los medios selectivos Chromocult y Xilosa, Lisina, Desoxicolato, la composición de los medios utilizados se indica en las tablas 7 y 8.

**Tabla 7.**

*Composición del medio Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD)*

Componente	Cantidad (g/L)	Componente	Cantidad (g/L)
Xilosa	3,5	Extracto de levadura	3,0
L – Lisina	5,0	Rojo de Fenol	0,08
Lactosa	7,5	Desoxicolato de Sodio	2,5
Sacarosa	7,5	Tiosulfato de Sodio	6,8
Cloruro de sodio	5,0	Agar	13,5
Citrato férrico de amonio	0,8		

Nota. Recuperado de: *Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD)* por (Condalab, 2019b).

**Tabla 8.**

*Composición del medio Chromocult*

Componente	Cantidad (g/L)	Componente	Cantidad (g/L)
Caseína	1	Salmon – beta – D – Galactósido	0,2
IPTG	0,1	Piruvato sódico	1
Cloruro Sódico	5	Tergitol 15 – S – 7 surfactante	0,15
Sorbitol	1	Sal X – beta – G – glucurónido CHX	0,1
Triptófano	1	Dihidrógeno fosfato de sodio 2H <sub>2</sub> O	2,2
Extracto de levadura	2	Agar	10
Hidrógeno fosfato disódico	2,7		

Nota. Recuperado de: *Agar Cromogénico E. coli-Coliformes (CCA) ISO* por (Condalab, 2019a).

### Pruebas bioquímicas

Se efectuaron pruebas bioquímicas utilizando el protocolo descrito por Espinoza & Morales (2019) utilizándose las pruebas citrato y triple azúcar – hierro. Para citrato se tomó una colonia aislada del medio y se sembró con un asa estéril en forma de estría única en el agar inclinado, se incubó a temperatura ambiente durante 48 horas (con tapa floja). En el medio triple azúcar hierro (TSI) se sembró picando el fondo con un asa estéril y extendiendo sobre la superficie del medio e incubando a temperatura ambiente por 48 horas. Se observaron los cambios en cada medio; la composición de cada uno de los medios de cultivo utilizados para las pruebas de batería corta se encuentra especificadas en las tablas 9 y 10.

**Tabla 9.**

*Composición del Medio Citrato de Simmons*

Componente	Cantidad (g/L)	Componente	Cantidad (g/L)
Agar	15,00	Fosfato dipotásico	1,0
Azul de bromotimol	0,08	Cloruro de sodio	5,0
Sulfato de Magnesio	0,2	Citrato de sodio	2,0
Fosfato monoamónico	1,0		

Nota. Recuperado de: *Simmons Citrato Agar* por (Laboratorios Britania S.A. (a), 2015).

**Tabla 10.**

*Medio Triple Azúcar Hierro*

Componente	Cantidad (g/L)	Componente	Cantidad (g/L)
Agar	13,00	Sacarosa	10,0
Rojo fenol	0,025	Lactosa	10,0
Tiosulfato sódico	0,2	Cloruro sódico	5,0
Sulfato ferroso de amonio	0,2	Digerido péptico de tejido animal	10,0
Glucosa	1,0	Digerido pancreático de caseína	10,0

Nota. Recuperado de: *Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar)* por (Becton Dickinson (b), 2003).

## **Crecimiento bacteriano en medios con pentolita**

### ***Preparación de medios con pentolita***

**Preparación de medios sólidos con pentolita.** Para la selección de cepas con potencial de degradar pentolita se prepararon medios de cultivo sólidos con diferentes proporciones de pentolita añadida, para esto se preparó 500 mL de una solución stock al 10% de pentolita disuelta en acetona. Se prepararon tres matraces con 25,8 g de medio MacConkey Lactosa y se les añadió diferentes volúmenes de agua destilada estéril. Se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 1,5 psi de presión, se dejó enfriar los matraces durante 10 minutos y se les añadió la solución stock de pentolita en diferentes volúmenes hasta alcanzar las diferentes proporciones (0,1%, 1% y 5%), se mezcló manualmente y se dispensó en cajas Petri estériles.

**Preparación de caldos de cultivo con pentolita.** A fin de evaluar el porcentaje de pentolita en donde crecen mejor las cepas en estudio se prepararon tres caldos de cultivo con tres diferentes proporciones de pentolita añadida, para ello se preparó 100 mL de una solución stock de pentolita al 15% en acetona y se prepararon tres matraces con medio Caldo Soja Trypticaseína (TSB) y se les añadió diferentes volúmenes de agua destilada estéril. Se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 1,5 psi de presión, se dejó enfriar los matraces durante 10 minutos y se les añadió la solución stock de pentolita en diferentes volúmenes hasta alcanzar las diferentes proporciones (0,1%, 1% y 5%), se mezcló manualmente y se dispensó 60 mL en frascos con tapa rosca que se agitaron a 100 rpm en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 72 horas.

### ***Siembra en medios de cultivo con pentolita añadida***

**Siembra de selección de cepas.** Para seleccionar las cepas más aptas para la degradación de pentolita, se efectuó una siembra por estriado con un asa metálica estéril en medio MKL adicionado con las diferentes proporciones de pentolita. Se incubó a temperatura ambiente durante 7 días y se

seleccionaron las cepas que mostraron el mejor crecimiento acorde a una escala de valoración establecida para medios de determinación (Becton Dickinson, 2013; Condalab, 2019a).

### ***Evaluación del crecimiento microbiano de cepas***

**Selección del mejor tratamiento.** Se preparó un pre – inóculo para cada una de las cepas aisladas, en 250 mL de caldo TSB se inocularon cada una de las cepas aisladas y se llevaron a agitación constante en un agitador orbital a 120 rpm durante 48 horas a temperatura ambiente en ausencia de luz. Posteriormente se inoculó 5 mL de cada una de las cepas en los caldos de cultivo con pentolita para evaluar la biomasa microbiana generada por cada una de las cepas en las diferentes concentraciones de pentolita.

**Recuento en placa de las cepas en cada tratamiento.** Tras 7 días de incubación de las cepas en los diferentes caldos se determinó las poblaciones microbianas cultivables en cada tratamiento mediante la técnica de recuento en placa por dilución, se realizaron diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  para su siembra en placa con medio de cultivo Agar Nutriente al cual se transfirió 100  $\mu$ L de la dilución  $10^{-3}$  y se extendió utilizando un asa Digrafsky de vidrio previamente esterilizada, se selló con Parafilm e incubó a temperatura ambiente durante 48 horas, el conteo de colonias se efectuó por medio de la aplicación Colony Counter de Promega y se expresaron los resultados como UFC/mL.

### ***Siembra para la evaluación del potencial de degradación***

Del pre – inóculo preparado para cada cepa se efectuó un recambio de caldo de cultivo, para ello se tomaron 10 mL de cada pre – inóculo y se sembraron en 200 mL de caldo de cultivo TSB, se llevaron a agitación en un agitador orbital a 120 rpm durante 48 horas a temperatura ambiente en ausencia de luz, transcurrido este período se sembró 10 mL de cada cepa en el caldo de cultivo con la proporción de pentolita elegida (el mejor tratamiento) y se incubó a temperatura ambiente y agitación constante en un agitador orbital a 120 rpm durante 8 días.

**Evaluación de la degradación de pentolita.** Durante el tiempo de incubación de los inóculos en el tratamiento elegido se efectuaron 6 eventos de muestreo (extracciones) para cada una de las cepas, se extrajo 2 mL de cada inóculo en los tiempos  $t_0=0$  h,  $t_1=96$  h (4 días) y  $t_2=192$  h (8 días) y se diluyen con acetonitrilo en proporción 1:1, se almacenaron en refrigeración a 4°C en ausencia de luz para posteriormente ser analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

**Corrida por HPLC.** La degradación de Pentolita por acción de las cepas seleccionadas para el tratamiento elegido se evaluó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), aplicando el método 8330 de la EPA (EPA, 1994) con una columna C18. El método empleado para las extracciones fue el establecido en el protocolo para análisis de explosivos por la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) (anexo 7). Al realizar las extracciones las muestras se diluyeron a un factor 1:1 con acetonitrilo por lo que se multiplicó por dos los valores que se obtuvieron en las lecturas para obtener la concentración real de explosivo.

### **Análisis estadístico**

Para desarrollar el modelo experimental se efectuó el análisis estadístico ANOVA (Análisis de la varianza) donde se analizaron dos hipótesis, una hipótesis nula y una alternativa que fueron aceptadas o rechazadas según el valor  $-p$  o significancia que se observó en los resultados obtenidos. Se plantearon las hipótesis siguientes:

- $H_0$ : El factor (cepa) tiene influencia sobre la variable dependiente (concentración de TNT y PETN)
- $H_1$ : El factor (cepa) no tiene influencia sobre la variable dependiente (concentración de TNT y PETN)

Se seleccionó este método debido al manejo de dos variables dependientes que son las concentraciones de TNT y PETN, este método según permite determinar si existe o no influencia de la variable independiente (cepas obtenidas) sobre la dependiente (concentración de TNT y PETN). El criterio de aceptación o rechazo de las hipótesis dependió del valor  $-p$  o significancia (sig) que se rige a

un intervalo de confianza del 95% ( $\alpha=0,05$ ), es decir si el valor  $-p>\alpha$  se acepta la hipótesis nula y si el valor  $-p<\alpha$  la hipótesis nula se rechaza.

### ***Pruebas post hoc***

Una vez establecida la diferencia entre las medias se efectuaron pruebas de rango post hoc que establecieron comparaciones y determinaron que medias diferían y si esta diferencia era o no significativa para ello se utilizó la prueba de Tukey por el elevado número de comparaciones. Se efectuó además la prueba de Duncan la cual formó subconjuntos donde asoció los factores (cepas) en relación a su efecto sobre las variables dependientes (concentración de TNT y PETN).

## Capítulo 4: Resultados

### Aislamiento de bacterias

#### *Biomasa microbiana inicial de muestras de suelo*

La biomasa microbiana inicial para las diferentes muestras se resume en la tabla 11. Se encontró que a la profundidad de 100 cm se obtuvo la mayor cantidad de unidades formadoras de colonias, por lo tanto, la muestra seleccionada para el aislamiento de microorganismos fue la tomada a 100 cm de profundidad.

**Tabla 11.**

*Unidades formadoras de colonias por placa Petrifilm*

MUESTRA	DILUCIÓN		
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
100 cm	TNCT	TNCT	9,60 × 10 <sup>5</sup> UFC/mL
60 cm	TNCT	TNCT	2,12 × 10 <sup>5</sup> UFC/mL
20 cm	TNCT	1,08 × 10 <sup>5</sup> UFC/mL	3,40 × 10 <sup>5</sup> UFC/mL

Debido a la elevada cantidad de biomasa en las diluciones 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup> se utilizó la dilución 10<sup>-3</sup> para la siembra de bacterias en los medios de cultivo AN y MKL. Se caracterizó las bacterias obtenidas en cada muestra por tinción GRAM obteniéndose las características indicadas en la tabla 12.

**Tabla 12.**

*Resultados de tinción GRAM para las bacterias en las diferentes muestras tomadas*

MUESTRA	Agar Nutriente		Medio MKL	
	Morfología	Tinción GRAM	Morfología	Tinción GRAM
100 cm	Bacilos	GRAM –	Bacilos	GRAM –
60 cm	Bacilos	GRAM –	Bacilos	GRAM –
20 cm	Bacilos	GRAM – y GRAM +	Bacilos y cocos	GRAM –

### Caracterización de bacterias

Se aislaron 58 colonias a las cuales se caracterizaron por medio de la prueba oxidasa y valorando las características bioquímicas tras su crecimiento en el medio MKL. Los resultados se presentan en la tabla 13.

**Tabla 13.**

*Caracterización de las 58 cepas aisladas en medio MKL*

CÓD	Oxidasa	GRAM	CÓD	Oxidasa	GRAM	CÓD	Oxidasa	GRAM	CÓD	Oxidasa	GRAM
1	+	-	9.3	-	-	14.2	+	-	C8	+	-
2	+	-	9.4	+	-	14.3	+	-	A2	+	-
3	+	-	10.1	+	-	15.1	-	-	A3	+	-
4	+	-	10.2	+	-	15.2	+	-	A4	+	-
5.1	+	-	10.3	+	-	15.3	+	-	A5	+	-
6.1	+	-	11.1	+	-	16	-	+	T1	+	+
6.2	+	-	11.2	+	-	17	-	+	T2	+	-
7.1a	+	-	11.3	+	-	18	-	+	T3	+	-
7.1b	+	-	11.4	+	-	C1	+	-	T4	+	-
7.2a	+	-	12.1	+	-	C2	+	-	T5	-	+
7.2b	+	-	12.3	+	-	C3	+	-	T6	-	+
8.1	+	-	13.1	+	-	C4	-	-	T7	-	+
8.2	+	-	13.2	+	-	C5	+	-	T8	-	+
9.1	+	-	13.3	-	-	C6	-	-			
9.2	+	-	14.1	+	-	C7	+	-			

De las 58 cepas aisladas se identificaron 12 (20,69%) de ellas como oxidasas negativas por lo cual estas fueron descartadas para análisis posteriores. Además, se identificaron por medio de la siembra en medio MKL cepas GRAM + al notar la ausencia de crecimiento en el medio pese a haber tenido crecimiento en agar nutriente, en la figura 7 se muestra el porcentaje de cepas que se ajusta a cada característica. La interpretación de resultados para el medio XLD fue la siguiente; para crecimiento: 0 inhibición, 1 crecimiento o inhibición parcial, 2 buen crecimiento y para el color de la colonia; CN centro negro, R zona transparente rojiza, A color amarillo. Para el medio Chromocult la interpretación

de resultados fue la siguiente forma; A azul oscuro, V violeta, S salmón, R rojo, se presentan los resultados en la tabla 14.

**Tabla 14.**

*Resultados de la siembra en los medios XLD y Chromocult de las cepas pre – seleccionadas*

CÓD.	XLD		Chromocult		
	Crecimiento	Color de la colonia	Color de la colonia	Salmon-GAL	X-glucurónido
1	2	A	I	–	–
2	1	R	I	–	–
3	1	R	I	–	–
4	1	R	I	–	–
5.1	2	A	I	–	–
6.1	1	R	I	–	–
6.2	1	R	I	–	–
7.1a	1	R	I	–	–
7.1b	2	R	I	–	–
7.2a	2	R	I	–	–
7.2b	2	A	I	–	–
8.1	2	A	I	–	–
8.2	2	A	I	–	–
9.1	2	R	I	–	–
9.2	2	R	I	–	–
9.4	1	R	I	–	–
10.1	2	A	I	–	–
10.2	2	R	I	–	–
10.3	1	R	I	–	–
11.1	2	A	I	–	–
11.2	2	A	I	–	–
11.3	2	A	I	–	–
11.4	2	A	I	–	–
12.1	2	R	I	–	–
12.3	2	R	I	–	–
13.1	2	A	V	–	–
13.2	2	R	V	–	–
14.1	2	R	I	–	–
14.2	2	R	I	–	–
14.3	2	R	I	–	–
15.2	1	R	I	–	–
15.3	1	A	I	–	–
C1	2	R	I	–	–
C2	1	R	I	–	–
C3	2	R	I	–	–

CÓD.	XLD		Chromocult		
	Crecimiento	Color de la colonia	Color de la colonia	Salmon-GAL	X-glucurónido
C7	2	R	V	–	–
C8	2	R	V	–	–
A2	2	R	V	–	–
A3	2	R	V	–	–
A4	1	R	I	–	–
A5	1	R	I	–	–
T1	0	0	0	0	0
T2	1	R	I	–	–
T3	0	0	0	0	0
T4	1	R	I	–	–

Las bacterias de la familia Pseudomonadaceae sembradas en el medio Chromocult se distinguieron por la formación de colonias incoloras a rosas (anexo 6), y en medio XLD (anexo 5) por la formación de colonias con una zona transparente rojiza o de color amarillo. Debido a la gran cantidad de cepas identificadas con las características descritas se efectuaron pruebas bioquímicas para determinar con mayor seguridad la familia y género de las cepas aisladas tal como se muestra en la tabla 15.

**Tabla 15.**

*Pruebas de batería corta para cepas pre – seleccionadas (segunda pre – selección)*

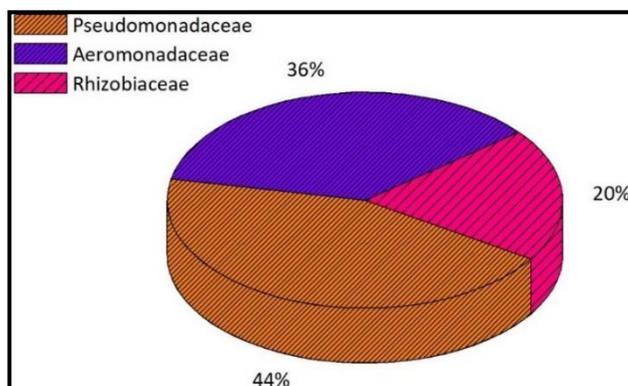
CÓD	Gas	SH <sub>2</sub>	TSI	Citrato	Identificación De La Familia	Identificación Del Género
1	–	–	K/K	–	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.
2	–	–	K/K	–	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.
3	–	–	K/K	–	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.
4	–	–	A/A	+	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
5.1	–	–	A/A	+	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
6.1	–	–	K/A	+	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
6.2	–	–	K/K	+	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomona</i> spp.
7.1a	–	–	K/A	–	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> spp.
7.1b	–	–	K/K	+	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomona</i> spp.
7.2a	–	–	K/A	–	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> spp.
7.2b	–	–	K/K	+	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomona</i> spp.
8.1	–	–	K/K	+	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomona</i> spp.
8.2	–	–	K/A	–	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> spp.
9.1	–	–	K/K	–	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.

<b>CÓD</b>	<b>Gas</b>	<b>SH<sub>2</sub></b>	<b>TSI</b>	<b>Citrato</b>	<b>Identificación De La Familia</b>	<b>Identificación Del Género</b>
<b>9.2</b>	-	-	K/K	-	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.
<b>9.4</b>	-	-	A/A	+	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>10.1</b>	-	-	K/K	-	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.
<b>10.2</b>	-	-	K/K	-	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.
<b>10.3</b>	-	-	K/K	-	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.
<b>11.1</b>	-	-	K/K	-	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.
<b>11.2</b>	-	-	K/K	-	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.
<b>11.3</b>	-	-	A/K	-	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> spp.
<b>11.4</b>	-	-	K/K	-	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.
<b>12.1</b>	+	+	K/K	+	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.
<b>12.3</b>	+	+	K/K	+	Pseudomonadaceae	<i>Azotobacter</i> spp.
<b>13.1</b>	+	+	A/A	+	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>13.2</b>	+	+	A/K	+	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>14.1</b>	-	-	A/A	-	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> spp.
<b>14.2</b>	-	-	K/A	-	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> spp.
<b>14.3</b>	-	+	K/A	-	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> spp.
<b>15.2</b>	+	-	K/A	+	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>15.3</b>	+	-	A/A	+	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>C1</b>	+	+	K/A	+	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>C2</b>	+	+	K/K	+	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomona</i> spp.
<b>C3</b>	+	+	K/K	+	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomona</i> spp.
<b>C5</b>	+	-	A/A	-	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>C7</b>	-	-	A/A	-	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> spp.
<b>C8</b>	+	-	A/A	+	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> spp.
<b>A2</b>	-	-	A/A	-	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>A3</b>	-	-	A/A	-	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>A4</b>	+	-	A/A	-	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>A5</b>	-	-	A/A	-	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>T2</b>	-	-	K/A	-	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>T3</b>	+	-	A/A	-	Aeromonadaceae	<i>Aeromona</i> spp.
<b>T4</b>	-	-	K/K	-	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomona</i> spp.

Se determinó que un 20% de las cepas aisladas pertenecían a la familia Rhizobiaceae, un 36% a la familia Aeromonadaceae y que el 44% (18 cepas) de las cepas pertenecían a la familia Pseudomonadaceae figura 7.

**Figura 7.**

*Porcentaje de familias identificadas*



### **Selección de cepas potencialmente degradadoras de pentolita**

Para seleccionar las cepas con potencial de degradación de pentolita se sembraron las 18 cepas identificadas como parte de la familia Pseudomonadaceae en los medios de cultivo sólidos con diferentes proporciones de pentolita. La escala de valoración para determinar el crecimiento fue la siguiente: 0 inhibición, 1 crecimiento o inhibición parcial, 2 buen crecimiento.

**Tabla 16.**

*Cepas de la familia Pseudomonadaceae sembradas en medio sólido con pentolita.*

	CÓD (Cepas)																	
	1	2	3	6.2	7.1b	7.2b	8.1	9.1	9.2	10.1	10.2	10.3	11.1	11.2	11.4	C2	C3	T4
<b>0,1%</b>	2	1	0	1	0	0	2	1	1	1	2	2	0	1	0	2	2	0
<b>1%</b>	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2	0	0	0	1	1	0
<b>5%</b>	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0

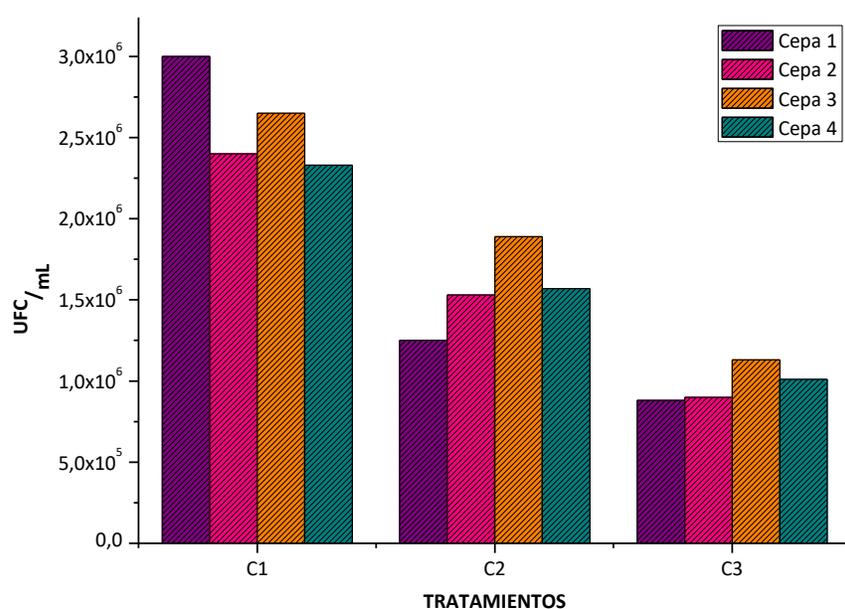
Como se observa en la tabla 16 de las 18 cepas evaluadas las que mostraron un buen crecimiento en el medio con todas las proporciones de pentolita fueron las cepas 1, 8.1, 10.2 y 10.3. Estas cepas fueron las seleccionadas para inocularse en los caldos de cultivo con pentolita. Se las denominó como cepa 1 (1), cepa 2 (8.1), cepa 3 (10.2) y cepa 4 (10.3).

### Selección del mejor tratamiento

El criterio de selección para el mejor tratamiento (proporción de pentolita añadida) fue la biomasa microbiana (representada en UFC/mL) que se encontró al final del tiempo de incubación de cada una de las cepas en los tratamientos establecidos, como se evidencia en la figura 8 el tratamiento que tuvo un mayor desarrollo de colonias fue el C1 que corresponde a la proporción de pentolita 0,1%.

**Figura 8.**

*Conteo de microorganismos para todos los tratamientos al final de la incubación*



### Evaluación de la degradación de pentolita

Se evaluó la capacidad degradadora de las 4 cepas seleccionadas en el tratamiento escogido (pentolita 0,1%), las cepas inoculadas en caldo con 0,1% de pentolita permanecieron en un agitador orbital durante 8 días a 120rpm temperatura ambiente. Se determinó la transformación de pentolita considerando la variación de la concentración de TNT y PETN a lo largo del tiempo de incubación (8 días) tal como se muestra en la tabla 17. Considerando que la pentolita es una mezcla TNT y PETN se obtuvieron resultados independientes para TNT y PETN.

### Potencial de degradación de pentolita

Para determinar el potencial de degradación de pentolita se cuantificó por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) la variación de concentración de TNT y PETN en cada una de las cepas a lo largo del tiempo de incubación, se obtuvieron los cromatogramas que se evidencian en el anexo 9 donde se denotan los picos característicos del TNT y PETN, además las áreas de estas curvas se sustituyeron en la ecuación de las curvas de calibración efectuadas por Rozo, (2011) y se determinaron las concentraciones de TNT y PETN a las 0h, 4 días y 8 días de incubación tal como se muestra en la tabla 17.

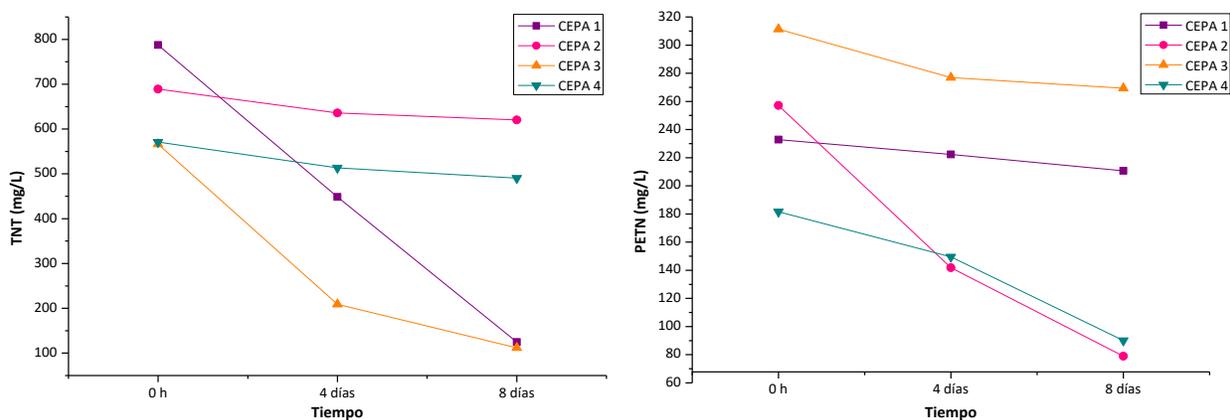
**Tabla 17.**

*Concentración de TNT y PETN en los diferentes tiempos de muestreo*

	TNT [mg/L]				PETN [mg/L]			
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4
<b>0 h</b>	787,428	689,102	566,068	570,845	232,784	257,090	311,297	181,580
<b>4 días</b>	448,274	635,907	209,111	513,490	222,311	141,778	276,960	149,534
<b>8 días</b>	124,648	620,376	111,664	490,538	210,722	78,936	269,352	90,043

**Figura 9.**

*Variación de la concentración de TNT y PETN durante 8 días en cada una de las cepas*



Como se evidencia en la figura 9 la variación de la concentración de TNT fue mayor para las cepas 1 y 3 mientras que la variación de la concentración de PETN fue mayor en las cepas 2 y 4.

Para determinar el potencial de degradación de TNT y PETN se determinó el porcentaje de degradación de cada cepa por medio de la ecuación 2.

$$P_d = \frac{C_o - C_f}{C_o} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

$P_d$  → Porcentaje de degradación

$C_o$  → Concentración inicial de explosivo

$C_f$  → Concentración final de explosivo

En la tabla 18 se muestran los porcentajes de degradación obtenidos para cada componente de la pentolita. En la figura 10 se puede apreciar con mayor claridad la diferencia entre los porcentajes de degradación de TNT y PETN para cada una de las cepas.

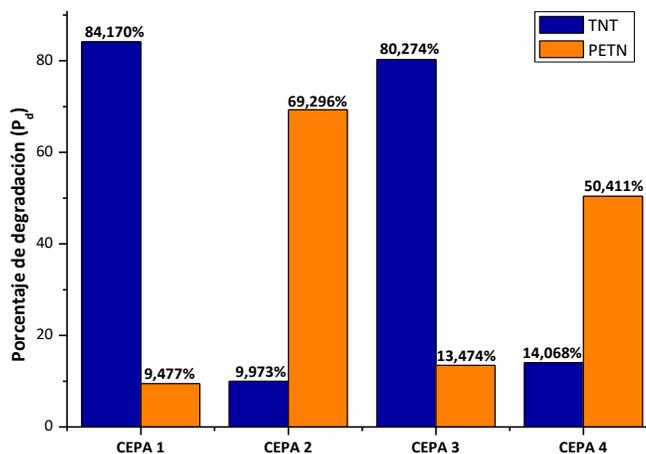
**Tabla 18.**

*Porcentaje de degradación de TNT y PETN para cada una de las cepas*

EXPLOSIVO	CEPA			
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4
$P_d$ (TNT)	84,170%	9,973	80,274	14,068
$P_d$ (PETN)	9,477%	69,296	13,474	50,411

**Figura 10.**

*Porcentaje de degradación de TNT y PETN*



## Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se sometieron a pruebas de normalidad (anexo 10) para determinar el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas. Se evaluó además la igualdad de las varianzas de las muestras por medio de la prueba de Levene (tabla 19) para determinar qué tipo de prueba debía ser utilizada en la comparación de medias.

**Tabla 19.**

*Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error*

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
<b>TNT</b>	Se basa en la media	2,763	3	8	0,111
	Se basa en la mediana	1,575	3	8	0,270
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,575	3	4,173	0,323
	Se basa en la media recortada	2,689	3	8	0,117
<b>PETN</b>	Se basa en la media	3,269	3	8	0,080
	Se basa en la mediana	1,408	3	8	0,310
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,408	3	3,504	0,376
	Se basa en la media recortada	3,118	3	8	0,088

Todos los valores de significancia (Sig.) son mayores a 0,05 por lo tanto se concluye que existe una igualdad de las varianzas entre los grupos.

**Tabla 20.**

*Análisis estadístico multivariable (ANOVA)*

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>TNT*CEPA</b>	Entre grupos (Combinado)	195305,878	3	65101,959	1,531	0,280
	Dentro de grupos	340164,518	8	42520,565		
	Total	535470,396	11			
<b>PETN*CEPA</b>	Entre grupos (Combinado)	39161,887	3	13053,962	4,772	0,034
	Dentro de grupos	21885,661	8	2735,708		
	Total	61047,548	11			

El análisis ANOVA (tabla 20) con un nivel de confianza de 95% acepta la hipótesis nula para la variable TNT ( $H_0$ : las cepas influyen sobre la variación de la concentración de TNT) debido a que la significancia mostró un valor mayor a  $\alpha$  ( $0,280 > 0,05$ ), de forma contraria rechaza la hipótesis nula y acepta la alternativa para la variable PETN ( $H_1$ : las cepas no influyen sobre la variación de la concentración de PETN) ya que la significancia mostró un valor menor a  $\alpha$  ( $0,034 < 0,05$ ).

Tras los resultados obtenidos en ANOVA (tabla 20) se efectuaron pruebas de interacción para las variables independiente (cepa) y dependiente (concentración de explosivo) con el objetivo de determinar si existe un efecto significativo de la variable independiente sobre la variable dependiente, como se muestra en la tabla 21.

**Tabla 21.**

*Pruebas de efectos inter-sujetos*

Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
CEPA	TNT	195305,878	3	65101,959	1,531	0,280
	PETN	39161,887	3	13053,962	4,772	0,034

Con una significancia mayor a 0,05 se muestra que la cepa no tiene un efecto significativo sobre la variable dependiente concentración de PETN, sin embargo, la variable cepa si muestra un efecto significativo sobre la concentración de TNT ( $0,280 > 0,05$ ). Dichos resultados concuerdan con el análisis ANOVA (tabla 20). Se efectuaron, además, pruebas de rango post hoc con el objetivo de determinar que medias difieren. Para ello se utilizó la prueba de Tukey debido al número elevado de comparaciones que se deben realizar entre los factores tabla 22.

Tabla 22.

Pruebas post hoc: comparaciones múltiples

Variable dependiente	Cepas	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%			
					Límite inferior	Límite superior		
TNT	1	2	-195,01167	168,365802	0,667	-734,17823	344,15490	
		3	157,83567	168,365802	0,787	-381,33090	697,00223	
		4	-71,50767	168,365802	0,973	-610,67423	467,65890	
	2	1	195,01167	168,365802	0,667	-344,15490	734,17823	
		3	352,84733	168,365802	0,233	-186,31923	892,01390	
		4	123,50400	168,365802	0,881	-415,66256	662,67056	
	3	1	-157,83567	168,365802	0,787	-697,00223	381,33090	
		2	-352,84733	168,365802	0,233	-892,01390	186,31923	
		4	-229,34333	168,365802	0,553	-768,50990	309,82323	
	4	1	71,50767	168,365802	0,973	-467,65890	610,67423	
		2	-123,50400	168,365802	0,881	-662,67056	415,66256	
		3	229,34333	168,365802	0,553	-309,82323	768,50990	
	PETN	1	2	62,67100	42,706031	0,497	-74,08875	199,43075
			3	-63,93067	42,706031	0,482	-200,69041	72,82908
			4	81,55333	42,706031	0,296	-55,20641	218,31308
		2	1	-62,67100	42,706031	0,497	-199,43075	74,08875
3			-126,60167	42,706031	0,070	-263,36141	10,15808	
4			18,88233	42,706031	0,969	-117,87741	155,64208	
3		1	63,93067	42,706031	0,482	-72,82908	200,69041	
		2	126,60167	42,706031	0,070	-10,15808	263,36141	
		4	145,48400*	42,706031	0,038	8,72425	282,24375	
4		1	-81,55333	42,706031	0,296	-218,31308	55,20641	
		2	-18,88233	42,706031	0,969	-155,64208	117,87741	
		3	-145,48400*	42,706031	0,038	-282,24375	-8,72425	

Nota. Se basa en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = 2735,708.

\*La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La tabla 23 nos muestra una comparación de las medias de las cepas frente a los explosivos TNT y PETN por medio de la prueba de Duncan. El análisis asocia a las cepas en el mismo subconjunto para TNT, esto indica que todas las cepas muestran un comportamiento similar en la degradación de TNT. En

el caso del explosivo PETN el análisis asocia a las cepas 4 y 2 en el subconjunto 1 y a las cepas 1 y 3 en subconjunto 2, mostrando que cada subconjunto actúa de la misma forma frente a PETN.

**Tabla 23.**

*Prueba de Duncan para subconjuntos homogéneos*

TNT			PETN				
CEPA	N	Subconjunto	CEPA	N	Subconjunto		
		1			1	2	
	3	3	295,61433	4	3	140,38567	
	1	3	453,45	2	3	159,268	
<b>Duncan</b>	4	3	524,95767	<b>Duncan</b>	1	3	221,939
	2	3	648,46167		3	3	285,86967
	<b>Sig.</b>		0,085	<b>Sig.</b>		0,104	0,173

## Capítulo 5: Discusión

El muestreo del suelo seleccionado para este estudio en polígono de tiro del Depósito Conjunto “El Corazón” del Comando Conjunto de las Fuerzas Armadas fue al azar, formando submuestras para lograr cultivar una amplia variedad y cantidad de microorganismos, esto se pudo evidenciar tras la siembra en placas Petrifilm cuyos resultados indican una biomasa microbiana abundante tal como se representa en la tabla 11 en la cual se resumen los resultados obtenidos de la siembra de las muestras de suelo en placas Petrifilm; estos resultados concuerdan con los descritos por Ramírez, (2005) y Schweizer, (2011) quienes destacan la importancia de esta metodología debido a que las muestras compuestas representan todo el lote delimitado, obteniéndose así los microorganismos más abundantes en los suelos en estudio.

De la biomasa microbiana encontrada en el estudio, se obtuvo una gran variedad de morfotipos entre cocos y bacilos GRAM positivos y negativos, estos resultados se asemejan a lo reportado por Blagodatskaya & Kuzyakov en 2013, quienes resaltan que en el suelo se encuentran una amplia gama de microorganismos. Un resultado a destacar fue la diferencia de microorganismos obtenida durante las 48 horas de incubación, en las primeras 24 horas, los primeros microorganismos en surgir fueron de tipo GRAM positivos y, tras las 48 horas de incubación se presentaron bacterias de tipo GRAM negativo, estos resultados coinciden con lo descrito por Mau y colaboradores en (2011), que aislaron una biomasa microbiana diversa obteniéndose grupos de bacilos GRAM positivos y GRAM negativos; la diferencia de crecimiento de estos microorganismos a los diferentes tiempos de incubación se explica con lo descrito por Blagodatskaya & Kuzyakov (2013), quienes indican que las formas de “crecimiento rápido” aparecen entre las 11 a 19 horas de siembra y son principalmente bacterias GRAM positivas mientras que las bacterias de crecimiento lento aparecen tras 33 horas prevaleciendo las bacterias GRAM negativas.

Se obtuvieron 58 cepas de las muestras de suelo, se sometieron a pruebas bioquímicas para determinar la familia y género al que corresponden. La primera prueba bioquímica realizada fue la oxidasa, cuyo principio es una reacción bioquímica que determina la presencia de citocromo oxidasa por medio de una reacción colorimétrica donde el reactivo incoloro reducido se convierte en un producto coloreado oxidado, resultados que concuerdan con lo descrito por (Shields & Cathcart, 2016). Esta prueba ayudó a la evaluación inicial de las 58 cepas aisladas de las cuales; el 79,31% (46 cepas) revelaron un test oxidasa positivo tornando las tirillas de oxidasa blancas a un color azul, para la determinar el tipo de bacteria se utilizó el medio selectivo – diferencial MacConkey Lactosa, descrito por Shyamal (2013), este medio se caracteriza por permitir tan solo el crecimiento de bacterias GRAM negativas e inhibir el crecimiento de bacterias GRAM positivas, de esta prueba se determinó que, del total de cepas aisladas el 84,48% revelaron ser GRAM negativas al mostrar crecimiento en este medio, además del total de cepas evaluadas 45 cumplieron con ambas características que se sometieron a pruebas bioquímicas y siembra diferencial.

Para una caracterización más profunda se efectuó la siembra de las 45 cepas oxidasa positivas en los medios de cultivo selectivo – diferenciales Chromocult y XLD además de efectuarse pruebas de batería corta TSI y citrato para una caracterización de mayor confianza. El medio Chromocult permitió el crecimiento selectivo de bacterias GRAM negativas esto gracias al Tergitol – 7 que según Valero y colaboradores, (2017) actúa como inhibidor de bacterias GRAM positivas, una característica deseada para caracterizar las cepas aisladas de los suelos del polígono de tiro, además, en su composición (tabla 13) se pueden encontrar dos sustratos cromogénicos, que se escinden por acción de enzimas específicas que están ausentes en los miembros de la familia Pseudomonadaceae por lo cual las colonias en este medio son incoloras tal como se observa en las imágenes del anexo 6 concordando con lo descrito por Antunes y colabores, (2018). En el medio XLD se observó el crecimiento de bacterias con variedad de coloraciones, particularmente las bacterias de la familia Pseudomonadaceae mostraron colonias con

una coloración rosa tal como se observa en las imágenes del anexo 5 esto coincide a lo descrito por Biolife (2020). La coloración rosa de las colonias se debió al metabolismo no fermentativo de las azúcares lactosa y sacarosa que cambiaron el color del indicador del medio a esta tonalidad tal como lo describieron Zhurbenko y colaboradores en (2020).

Con la finalidad de confirmar la identificación inicial de las cepas aisladas se efectuaron pruebas bioquímicas de batería corta TSI y citrato. Las pruebas en el agar TSI arrojaron una serie de resultados como se observa en la tabla 21, las Pseudomonadaceae por su metabolismo no fermentativo cambiaron el color del medio TSI a rojo intenso ya que obtienen energía de las peptonas de forma aeróbica o anaeróbica esto coincide con lo descrito por Lehman en (2005) quien indica que si las bacterias metabolizan las peptonas del medio este adquiere un color rojo intenso. Varios miembros de la familia Pseudomonadaceae son capaces de metabolizar el citrato cambiando el color de medio de cultivo a azul (resultado positivo) tal como se muestra en la tabla 21, según Macwilliams, (2009) este cambio de coloración se debió a la capacidad de los aislados bacterianos para utilizar el citrato como fuente de carbono y energía generando subproductos alcalinos (carbonatos y bicarbonatos) que alteraron la coloración del indicador azul de bromotimol debido al incremento del pH, sin embargo no todos los miembros de la familia Pseudomonadaceae dan positivo a esta prueba, manteniendo el color del medio en verde aunque haya existido crecimiento en el medio; estos resultados coinciden con estudios similares como los de Bonnet y colaboradores (2019) & Bou y colaboradores (2011).

Para determinar que cepas de las identificadas como Pseudomonadaceae poseen potencial de degradación de pentolita se utilizó un medio de cultivo selectivo adicionado con la misma, esto corresponde a lo descrito por Bonnet y colaboradores, (2019) que define a un medio de cultivo selectivo como aquel que proporciona lo necesario para aislar una especie o género en particular y además se le puede añadir productos químicos en este caso particular pentolita de modo que se logró eliminar microorganismos no deseados y obtener aquellos con la característica deseada que fue el potencial de

descomponer pentolita. Se estableció una escala de valoración del crecimiento de bacterias tras la siembra e incubación, las cepas seleccionadas fueron aquellas que presentaron un buen crecimiento en la escala establecida para todas las proporciones de pentolita, estas fueron las cepas 1, 8.1, 10.2 y 10.3 es decir cuatro cepas de las 18 sembradas en el medio suplementado. Los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito por los autores Mercimek (2015); Nogales (2017); Quillche (2016) y sus colaboradores; Pedraza, (2015) & Rozo (2011) que reportan la degradación de compuestos nitroaromáticos como el TNT y remoción eficaz de PETN por bacterias de la familia Pseudomonadaceae en diversas condiciones: aerobias, anaerobias, cepas cultivadas individualmente y en consorcios. El potencial de degradación de pentolita por parte de las bacterias GRAM negativas como las Pseudomonadaceae se debe a la versatilidad metabólica de las cepas Pseudomonadaceae que según Nogales y colaboradores (2017) participan en importantes procesos metabólicos del medio ambiente además de ser estudiados como microorganismos paradigmáticos en el estudio de biodegradación de contaminantes biogénicos y xenobióticos.

Adicionalmente se caracterizó la siembra de las cepas seleccionadas las cuales inicialmente poseían una coloración transparente/rosácea y transcurrido el tiempo de un mes su coloración se tornó café rojizo debido a los subproductos generados por la degradación del explosivo, el cambio de coloración corresponde a la generación de aminodinitrotolueno, dichos cambios concuerdan a estudios similares como los de Arbeli y colaboradores, (2016); Pedraza, (2015) y Rozo, (2011) donde las colonias sembradas tuvieron características similares. Las cuatro cepas seleccionadas se inocularon en caldos de cultivo con diferentes proporciones de pentolita, se evidenció que el mayor desarrollo de biomasa microbiana se dio con el tratamiento al 0,1% de pentolita, lo cual es correspondiente a lo efectuado en estudios como los de Mercimek y colaboradores, (2015); Rozo, (2011); Serrano y colaboradores, (2018) y Zhuang y colaboradores, (2012) donde se han utilizado concentraciones entre 0,01% al 0,1% de TNT y

PETN para los ensayos de degradación obteniéndose resultados favorables tanto en el desarrollo de biomasa microbiana como en la degradación del explosivo.

Para este estudio se probaron la cuatro cepas seleccionadas y se evaluó la degradación de pentolita durante ocho días, esto debido a lo descrito por Mercimek y colaboradores, (2015) donde explica que la mayor tasa de degradación por miembros de la familia Pseudomonadaceae se ha dado en tan solo días de evaluación alcanzando más del 50% en porcentaje de degradación. Estos resultados además corresponden a lo obtenido con las cepas 1 y 3 las cuales alcanzaron porcentajes de degradación de 84,170% y 80,274%, para el TNT, sin embargo, la degradación de PETN se muestra reducida en estas cepas con porcentajes de 9,477% y 13,474% estos resultados concuerdan con el análisis estadístico que sitúa a estas cepas en el mismo subconjunto por medio de la prueba de Duncan además, los resultados concuerdan con lo descrito por Avellaneda y colaboradores (2020) & Pedraza (2015) donde indican que la presencia de TNT afecta de forma negativa a la transformación de PETN la cual se muestra inhibida en más del 40%, otro motivo de esta limitada degradación de PETN pudo ser que las cepas 1 y 3 no posean la capacidad enzimática para poder metabolizarlo o requieran un cometabolito para degradarlo tal como lo describe en su estudio Rozo (2011).

De forma contraria las cepas 2 y 4 fueron más eficientes en la degradación de PETN obteniendo los porcentajes de degradación: 69,296% y 50,411%, teniendo ambas cepas un efecto similar sobre la concentración de PETN tal como se obtuvo en el análisis de Duncan (tabla 23) esto concuerda con estudios similares como los de Avellaneda (2020); Serrano (2018) y colaboradores & Pedraza (2015) donde las concentraciones de PETN se ven ampliamente reducidas en los primeros días de degradación. Sin embargo, en estas cepas se mostró una transformación reducida de TNT (9,477% y 13,474%) estos resultados son comparables a los del estudio de Rozo en (2011) donde explica que la presencia de PETN en conjunto con TNT puede presentar un efecto inhibitorio debido a su toxicidad.

Se puede observar además en los cromatogramas obtenidos (anexo 7) que los picos correspondientes tanto al TNT como al PETN no se ven drásticamente reducidos, contrario a estudios similares como el de Paredes y colaboradores, (2018) donde el pico de pentolita (TNT y PETN) reduce su área a menos de 1000 mAU\*min mientras que los picos de pentolita (TNT y PETN) para este estudio apenas reducen su área por debajo de los 2000 mAU\*min aunque los tiempos de retención oscilaron en el mismo rango de 1,5 a 2,5 minutos. Esto puede explicarse debido a que en otros estudios como los de Avellaneda y colaboradores (2020); García (2014) & Marín (2014) las concentraciones a probar no fueron tan elevadas como las utilizadas en este estudio, además se probó la eficiencia de degradación no de cepas individuales si no de consorcios bacterianos e inclusive estudios como el de Castro y colaboradores (2018) se estudió la degradación independiente del explosivo TNT o como en el estudio de Zhuang (2012) donde se probó la evaluación independiente de PETN y con bacterias de otras familias que han sido aisladas de suelos contaminados con pentolita. Inclusive se muestran mayores tasas de degradación cuando se forman consorcios microbianos con hongos, o se analiza la degradación de pentolita en hongos de forma independiente como en los estudios realizados por Paredes (2018) & Serrano (2018) con sus colaboradores.

## Conclusiones

En las muestras tomadas de los suelos del polígono de tiro se encontró que a una profundidad de 100 cm se logró aislar la biomasa microbiana más abundante con  $9,60 \times 10^5$  UFC/mL y diversa pues se componía de cocos y bacilos GRAM positivos y negativos, obteniéndose un total de 58 cepas aisladas.

De las 58 cepas se identificaron que 18 pertenecían a la familia Pseudomonadaceae por medio de la siembra y multiplicación en los medios selectivos – diferenciales y pruebas bioquímicas además se identificaron cepas pertenecientes a las familias Rhizobiaceae y Aeromonadaceae.

Cuatro cepas de las 18 identificadas como Pseudomonadaceae mostraron un elevado crecimiento en los medios suplementados con pentolita, además, se determinó que el medio suplementado con una proporción del 0,1% de pentolita fue el más adecuado para el desarrollo de una biomasa mayor que en los demás porcentajes que se sometieron a estudio.

Los resultados de HPLC de la biodegradación de pentolita para cada cepa evaluada ayudaron a determinar los porcentajes de degradación de cada componente que constituye este explosivo. Se determinó que las cepas 1 y 3 son más eficientes en la degradación de TNT y que las cepas 2 y 4 son más eficientes en la degradación de PETN, concluyendo que la biodegradación de pentolita debe ser efectuada por consorcios para lograr efectuar una transformación eficiente de los componentes que la constituyen.

El análisis estadístico ANOVA determinó que el factor cepa tiene una influencia significativa sobre la variación de la concentración de TNT y que este mismo factor no tiene una influencia significativa sobre la variación de concentración de PETN.

### Recomendaciones

Evaluar la degradación de pentolita por consorcios y por otras cepas aisladas de suelos contaminados con pentolita no pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae para optimizar el potencial de biodegradación y la formación de subproductos de degradación y cómo influyen estos en el porcentaje de degradación.

Considerar evaluar la degradación de TNT y PETN de forma individual, es decir, un componente en ausencia del otro para obtener una aproximación pareja del potencial de degradación de cada una de las cepas para cada componente de la pentolita. Esto debido a la inhibición parcial presentada en la degradación de PETN por la presencia del TNT, de igual forma por la inhibición parcial presentada en la biodegradación de TNT en presencia de PETN.

### Bibliografía

Antunes, G. d. A., Gandra, J. A. C. D., Moreira, E. A., Machado, W. C. S., Magalhães, S. da S. G., Xavier, M. A. de S., & Xavier, A. R. E. de O. (2018). Chromocult Coliform agar and duplex PCR assays as methodologies for tracking *Escherichia coli* K12 in industrial biotechnological processes. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *8*(3), 126–132. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8318>

Amin, M. M., Khanahmad, H., Teimouri, F., Sadani, M., Karami, M. A., & Hatamzadeh, M. (2017). Effect of monorhamnolipid contribution on anaerobic-natural attenuation of explosives in contaminated soils. *Journal of Environmental Engineering (United States)*, *143*(8), 1–7. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001227](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001227)

Arbeli, Z., Garcia, E., Pardo, C., Hidalgo, K., Velásquez, T., Peña, L., Ramos C, E., Avila-Arias, H., Molano-Gonzalez, N., Brandão, P. F. B., & Roldan, F. (2016). Persistence of pentolite (PETN and TNT) in soil microcosms and microbial enrichment cultures. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(9), 9144–9155. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6133-3>

Avellaneda, H., Arbeli, Z., Teran, W., & Roldan, F. (2020). Transformation of TNT , 2 , 4 - DNT , and PETN by *Raoultella planticola* M30b and *Rhizobium radiobacter* M109 and exploration of the associated enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *8*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02962-8>

Becton Dickinson. (2013). XLD Agar (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar) USO. *Dickinson and Company*, *22*(September 2005), 1–9. <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.2885%0Ahttp://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8783>

Becton Dickinson (b). (2003). BD Triple Sugar Iron Agar (TSI Agar). In *BD Diagnostic Systems* (Vol. 2, pp. 1–4).

Becton Dicknson (a). (2014). BD MacConkey II Agar. In *BD* (Vol. 1, Issue July, pp. 7–10).

- Beiras, R. (2018). Biotransformation. In *Marine Pollution* (pp. 205–214). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813736-9.00012-x>
- Bidja Abena, M. T., Li, T., Shah, M. N., & Zhong, W. (2019). Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in highly contaminated soils by natural attenuation and bioaugmentation. *Chemosphere*, 234, 864–874. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.111>
- Biolife. (2020). XLD AGAR. In *Biolife Italiana*.
- Bonnet, M., Lagier, J. C., Raoult, D., & Khelaifia, S. (2019). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes and New Infections*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100622>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Castro, J., Guasumba, Y., Jarrín, N., & Leiva, L. (2018). *Degradación del 2,4,6 - trinitrotolueno (TNT) por acción de la enzima nitrato reductasa presente en bacterias del género Rhizobium*. Quito.
- Condalab. (2019a). Agar Cromogénico E. coli-Coliformes (CCA) ISO. *Condolab*, 1–2.  
<https://doi.org/10.1111/lam.12147/supinfo>
- Condalab. (2019b). Agar XLD (Agar Xilosa Lisina Desoxicolato) ISO. *Insumolab*, 2.  
<https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1056-9309-agar-xld-agar-xilosa-lisina-desoxicolato-iso.html>
- Condalab. (2019c). *Caldo Soja Trypticaseína (TSB) EP/USP/ISO*.
- Delgado, M. (2019). *ORIOUS BIOTECH*. Obtenido de Los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal:  
[https://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Los\\_microorganismos\\_del\\_suelo\\_en\\_la\\_nutrici%C3%B3n\\_vegetal#:~:text=LAS%20BACTERIAS%20DEL%20SUELO,o%20pH%20neutro%20\(neutr%C3%B3nfilas\)](https://www.oriusbiotech.com/escrito?nom=Los_microorganismos_del_suelo_en_la_nutrici%C3%B3n_vegetal#:~:text=LAS%20BACTERIAS%20DEL%20SUELO,o%20pH%20neutro%20(neutr%C3%B3nfilas)).

- Drobish, A. M., Emery, B. D., Whitney, A. M., Lauer, A. C., Maureen, G., & Mcquiston, J. R. (2017). *Previously Unidentified Clinical Strains*. 66(8), 3063–3070.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001147.Oblitimonas>
- EPA. (1994). *Nitroaromatics and Nitramines by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* (Vol. 1994, Issue enero 24).
- Espinoza, K., & Morales, S. (Marzo de 2019). *Salmonella spp en aves silvestres que habitan alrededor de una granja de cuyes tecnificada en el distrito de Manchay, Lima*. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15698>
- García, L. (2014). *Determinación del potencial de degradación anaeróbica De 2,4,6-Trinitrotolueno (TNT) y Tetranitrato De Pentaeritritol (PETN) en suelos impactados con explosivos*. 164.  
<http://www.bdigital.unal.edu.co/45645/>
- Genter, R. B. (1996). Ecotoxicology of Inorganic Chemical Stress to Algae. In *Algal Ecology* (pp. 403–468). Academic Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-012668450-6/50043-6>
- Giri, B., Giang, P. H., Kumari, R., Prasad, R., & Varma, A. (2005). Microbial Diversity in Soils. In F. Buscot & A. Varma (Eds.), *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions* (Vol. 3, pp. 19–55). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7\\_2](https://doi.org/10.1007/3-540-26609-7_2)
- Habineza, A., Zhai, J., Mai, T., Mmereki, D., & Ntakirutimana, T. (2017). Biodegradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) in contaminated soil and microbial remediation options for treatment. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 61(3), 171–187. <https://doi.org/10.3311/PPch.9251>
- Hillel, D. (2004). *Introduction to Environmental Soil Physics*. Elsevier.
- Insumolab. (2014). *Agar Papa Dextrosa* (pp. 10–12).
- Joutey, N., Bahafid, W., Sayel, H., & El Ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. In *Biodegradation - Life of Science* (pp. 289–320). <https://doi.org/10.5772/56194>

Knapp, J., & Bromley, K. C. A. (2003). Recalcitrant organic compounds. In D. Horan & M. Nigel (Eds.), *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology* (Vol. 70, Issue 7, pp. 559–595). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-012470100-7/50035-2>

Laboratorios Britania (b). (2015). Agar Nutritivo. In *Britania* (pp. 10–11).

Laboratorios Britania S.A. (a). (2015). Simmons Citrato Agar. In *Laboratorios Britania* (Vol. 84, Issue 3, p. 178).

Lehman, D. (2005). Triple Sugar Iron Agar. *American Society for Microbiology, September 2005*, 2–3.

Marín, C. (2014). Selección e identificación molecular de un consorcio bacteriano para la degradación de TNT(2,4,6-trinitrotolueno) aislados de ambientes contaminados. *Anales de La Universidad de Chile*, 0(9). <https://doi.org/10.5354/0717-8883.1985.22776>

Moejes, F., Succurro, A., Popa, O., Maguire, J., & Ebenhöf, O. (2017). Dynamics of the Bacterial Community Associated with *Phaeodactylum tricornutum* Cultures. *Processes*, 5(4), 77. <https://doi.org/10.3390/pr5040077>

Montgomery, M. T., Coffin, R. B., Boyd, T. J., & Osburn, C. L. (2013). Incorporation and mineralization of TNT and other anthropogenic organics by natural microbial assemblages from a small, tropical estuary. *Environmental Pollution*, 174, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.11.036>

National Center for Biotechnology Information (a). (s.f.). PubChem Database. Recuperado el 23 de Agosto de 2019, de PubChem Compound Summary for CID 6518, Pentaerythritol tetranitrate: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pentaerythritol-tetranitrate>

National Center for Biotechnology Information (b). (s.f.). PubChem Database. Obtenido de PubChem Compound Summary for CID 8376, 2,4,6-Trinitrotolueno: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2\\_4\\_6-Trinitrotolueno](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4_6-Trinitrotolueno)

National Center for Biotechnology Information (c). (2020). PubChem Database. Obtenido de PubChem Compound Summary for CID 56841779, Pentolite:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pentolite>

Nogales, J., García, J. L., & Díaz, E. (2017). Degradation of Aromatic Compounds in Pseudomonas: A Systems Biology View. In *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*.

<https://doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5>

Palleroni, N. (1981). Introduction to the Family Pseudomonadaceae. *Curtis's Botanical Magazine*, 12(3), 655–665. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8748.1995.tb00499.x>

Paredes, M., Guerra, J., Granda, S., & Ávalos, R. (2018). Evaluación de la capacidad enzimática para degradar la pentolita (TNT y PETN) a partir de *Aspergillus niger*.

Pedraza, P. (2015). *Caracterización y evaluación de la capacidad degradadora de TNT y PETN por un consorcio microbiano aislado de ambientes con presencia de pentolita*.

Pouretedal, H. R., Damiri, S., Ravanbod, M., Haghdoost, M., & Masoudi, S. (2017). The kinetic of thermal decomposition of PETN, Pentastite and Pentolite by TG/DTA non-isothermal methods. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 129(1), 521–529. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6164-0>

Rodgers, J., & Bunce, N. (2001). *Electrochemical Treatment of 2,4,6-Trinitrotoluene and Related Compounds*. 35(2), 406–410.

Roquigny, R., Novinscak, A., & Biessy, A. (2017). Pseudomonadaceae: From Biocontrol to Plant Growth Promotion. *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation*, 39–68.

<https://doi.org/10.1007/978-981-10-4862-3>

Rozo, L. (2011). *Aislamiento Y Evaluación De Bacterias Degradadoras De Pentolita, Obtenidas a Partir De Muestras De Suelos, Agua Y Lodos Con Presencia De Explosivos*.

Safdari, M. S., Kariminia, H. R., Rahmati, M., Fazlollahi, F., Polasko, A., Mahendra, S., Wilding, W. V., & Fletcher, T. H. (2018). Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation,

biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 342, 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.044>

Serrano-González, M. Y., Chandra, R., Castillo-Zacarias, C., Robledo-Padilla, F., Rostro-Alanis, M. de J., & Parra-Saldivar, R. (2018). Biotransformation and degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by microbial metabolism and their interaction. In *Defence Technology* (Vol. 14, Issue 2, pp. 151–164). <https://doi.org/10.1016/j.dt.2018.01.004>

Shields, P., & Cathcart, L. (2016). Oxidase Test Protocol. In *ASM Conference for Undergraduate Educators* (Issue Am. Soc. Microbiol.).

Shyamal, P. (2013). Culture Media. In *University of Medical College*.

Spain, J. (1995). Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Microorganisms to Combat Pollution*, 523–555. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-1672-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-011-1672-5_13)

Stenuit, B. A., & Agathos, S. N. (2013). Biodegradation and Bioremediation of TNT and Other Nitro Explosives. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences* (Issue July). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.00364-x>

Strehse, J. S., Appel, D., Geist, C., Martin, H. J., & Maser, E. (2017). Biomonitoring of 2,4,6-trinitrotoluene and degradation products in the marine environment with transplanted blue mussels (*M. edulis*). *Toxicology*, 390, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.09.004>

Valero, P., Giannakis, S., Mosteo, R., Ormad, M. P., & Pulgarin, C. (2017). Comparative effect of growth media on the monitoring of *E. coli* inactivation and regrowth after solar and photo-Fenton treatment. *Chemical Engineering Journal*, 313, 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.126>

Velásquez, T. (2009). *Comparación de la degradación de pentaeritrol tetranitrato (PETN) en condiciones de atenuación natural y bioestimulación. 1*, 1–44.

Wang, D., Boukhalfa, H., Marina, O., Ware, D. S., Goering, T. J., Sun, F., Daligault, H. E., Lo, C. C., Vuyisich, M., & Starckenburg, S. R. (2017). Biostimulation and microbial community profiling reveal

insights on RDX transformation in groundwater. *MicrobiologyOpen*, 6(2), 1–14.

<https://doi.org/10.1002/mbo3.423>

Zapata, F., & García-Ruiz, C. (2020). Chemical Classification of Explosives. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 0(0), 1–18. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1760783>

Zhurbenko, R., Lobaina, T., & Rodriguez, C. (2020). Efecto De Una Combinación De Nutrientes E Inhibidores Del Crecimiento Bacteriano Sobre El Desarrollo De Salmonella. *2018*, 23(i), 127–133.

<https://www.siicsalud.com/des/expertoimpreso.php/157223>

Zou, D. (2016). Theory and technology of rock excavation for civil engineering. In *Theory and Technology of Rock Excavation for Civil Engineering*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1989-0>

## Anexos