



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización y evaluación de la capacidad degradadora de TNT y PETN por un consorcio microbiano aislado de ambientes con presencia de pentolita

Paula Andrea Nathalie Pedraza Arias

Universidad Nacional de Colombia

Posgrado Interfacultades Microbiología

Bogotá, Colombia

2015

Caracterización y evaluación de la capacidad degradadora de TNT y PETN por un consorcio microbiano aislado de ambientes con presencia de pentolita

Paula Andrea Nathalie Pedraza Arias

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de

Magister en Microbiología

Director:

Joaquín Benavides López de Mesa, M.Sc

Codirector:

Pedro Filipe de Brito Brandão, Ph.D

Línea de Investigación:

Microbiología Ambiental

Universidad Nacional de Colombia

Posgrado Interfacultades Microbiología

Bogotá, Colombia

2015

A Dios por demostrarme día a día que todo hace parte de un plan

A mi mama por siempre creer en mí

A mi papa por apoyarme en todo

"Mientras más grande sea la prueba, más glorioso será el triunfo"

The greater the struggle, the more glorious the triumph

Agradecimientos

A Fabio Aristizabal por su ayuda en el momento oportuno sin la cual no habría podido culminar este proyecto.

A Jairo Cerón por todos los consejos.

A Mónica Numpaque por su amistad, todo el apoyo incondicional y los aportes realizados a este trabajo.

A Pedro Brandão por su compromiso, corregir con paciencia mis errores y sus valiosos aportes.

A Joaquín Benavides por la asesoría y haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto.

Al posgrado interfacultades de Microbiología, a Martha Fontanilla y en especial a Socorro Prieto por su ayuda, paciencia y todos los consejos durante todo este proceso.

A mi mamá, mi papá, mi abuela, Felipe por siempre apoyarme en todo, enseñarme a ser perseverante y no rendirme frente a las adversidades.

A mi amiga de toda la vida, Liliana Álvarez por darme mucho ánimo y apoyo durante todo este proceso.

Resumen

En el presente estudio se evaluaron cinco consorcios microbianos aislados de ambientes con presencia de pentolita con la finalidad de elegir el que mostrara la mejor capacidad degradadora de TNT y PETN. Se realizó la identificación de morfotipos de los cinco consorcios mediante el cultivo en un medio mínimo de nutrientes suplementado con pentolita. Una vez fue elegido el consorcio, fue evaluada su capacidad de degradación de PENT en presencia y ausencia de TNT y finalmente se realizó la caracterización del consorcio mediante la identificación de sus constituyentes microbianos a nivel molecular a través de una tecnología de secuenciación de alto rendimiento. Fueron encontrados géneros como *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp y *Rhodococcus* sp los cuales han sido reportados en estudios previos en el grupo de investigación como degradadores de TNT y PETN y en otros estudios como degradadores de otros compuestos aromáticos. Los resultados sugieren que el enriquecimiento selectivo realizado bajo condiciones aerobias sumado a los pases mes a mes, no permitieron conservar la capacidad degradadora tanto de TNT como de PETN por parte del consorcio microbiano.

Palabras clave: Consorcio, TNT, PETN, degradación, caracterización molecular

Abstract

The current investigation assesses five microbial consortia isolated from pentolite polluted environments with the purpose of selecting one consortia that shows the best degrading ability. Five microbial consortia were plated in minimal nutrient media supplemented with pentolite to perform colonies identification. Once the consortia were chosen the PETN degradation was assessed in presence and absence of TNT. Finally the molecular characterization was performed by a high throughput sequencing technology. *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp. and *Rhodococcus* sp were identified. These bacteria have been reported in previous studies as TNT and PETN degraders and in other studies as degraders of other aromatic compounds. The results suggest that aerobic conditions did not allow for the preservation of the degrading ability of TNT and PETN by the microbial consortia.

Key Words: Consortia, TNT, PETN, degradation, molecular characterization.

Contenido

Lista de figuras.....	X
Lista de tablas.....	XII
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XIII
Introducción.....	1
1. Marco teórico.....	4
1.1 Explosivos.....	4
1.1.1 Pentolita.....	4
1.1.2 Características del 2,4,6 Trinitrotolueno (TNT).....	4
1.1.3 Características del pentaeritriol tetranitrato (PETN).....	6
1.2 Métodos para el tratamiento de ambientes contaminados con explosivos... ..	7
1.2.1 Métodos Físicoquímicos.....	7
1.2.2 Atenuación natural.....	8
1.2.3 Métodos Biológicos.....	9
1.3 Bioremediación.....	12
1.4 Consorcios microbianos.....	13
1.4.1 Bioremediación de compuestos contaminantes con consorcios microbianos.....	14
1.5 Degradación aerobia de TNT.....	17
1.5.1 Vías principales aerobias para transformación de TNT.....	19
1.5.2 Degradación anaerobia de TNT.....	26
1.6 Biodegradación de PETN.....	28
1.7 Métodos de estudio de poblaciones microbianas.....	30
1.8 Tecnologías de alto rendimiento de secuenciación de segunda generación.....	33
2. Problema y Justificación.....	35
3. Objetivos.....	37
3.1 Objetivo General.....	37
3.2 Objetivos Específicos.....	37
4. Materiales y Métodos.....	38
4.1 Materiales.....	38
4.1.1 Reactivos químicos.....	38
4.1.2 Origen de los cultivos de enriquecimiento.....	39
4.2 Métodos.....	40

4.2.1 Características macroscópicas de los consorcios degradadores evaluados: Estudio de morfotipos.....	40
4.2.2 Selección de consorcio con la mejor capacidad degradadora.....	40
4.2.3 Evaluación de la capacidad degradadora de pentolita por el consorcio seleccionado.....	41
4.2.4 Evaluación de la degradación de PETN en ausencia de TNT por el consorcio microbiano seleccionado.....	42
4.2.5 Extracción de explosivos a partir de muestras líquidas.....	43
4.2.6 Cuantificación de explosivos.....	44
4.2.7 Identificación molecular de los géneros microbianos que conforman el consorcio.....	45
4.2.7.1 Extracción de DNA.....	45
4.2.7.2 Secuenciación del DNA del consorcio microbiano.....	46
4.2.7.3 Análisis Bioinformático.....	46
4.2.8 Análisis de datos.....	47
5. Resultados.....	48
5.1 Características macroscópicas y microscópicas de los consorcios degradadores evaluados: Estudio de morfotipos.....	48
5.2 Selección de consorcio con la mejor capacidad degradadora.....	48
5.3 Evaluación de la capacidad degradadora de TNT y PETN por el consorcio seleccionado.....	53
5.4 Evaluación de la degradación de PETN en ausencia de TNT por el consorcio microbiano seleccionado.....	58
5.5 Identificación molecular de los géneros microbianos que conforman el consorcio.....	62
6. Discusión de resultados.....	64
6.1 Características macroscópicas y microscópicas de los cinco consorcios degradadores evaluados.....	64
6.2 Evaluación de la metodología empleada para la evaluación de TNT y PETN.....	65
6.3 Evaluación de la capacidad degradadora de TNT.....	65
6.4 Evaluación de la capacidad degradadora de PETN en presencia y ausencia de TNT.....	66
6.5 Identificación molecular de los géneros microbianos que conforman el consorcio.....	68
7. Conclusiones y Recomendaciones.....	71
7.1 Conclusiones.....	71
7.2 Recomendaciones.....	72
A. Anexo: Preparación del medio T2.....	73
B. Anexo: Curvas de Calibración.....	75
C. Anexo: Análisis Estadísticos.....	77
Bibliografía.....	82

Lista de figuras

Figura 1-1. Estructura química del 2,4,6-Trinitrotolueno.....	5
Figura 1-2. Principales vías de degradación de TNT.....	6
Figura 1-3. Estructura química del pentaeritriol tetranitrato 2,2-bis[(nitrooxi)metil]-1,3 propanediol dinitrato.....	7
Figura 1-4. Complejo de monohidrido Meisenheimer.....	21
Figura 1-5. Remoción de los grupos nitro del TNT por acción de oxigenasas.....	22
Figura 1-6. Principales mecanismos de degradación aerobia de TNT.....	25
Figura 1-7. Principales mecanismos de degradación anaerobia de TNT.....	27
Figura 1-8. Ruta de reducción de PETN a partir de la pentaritriol reductasa de <i>E.cloacae</i> PB2.....	29
Figura 4-1. Cultivos de enriquecimiento de los consorcios microbianos identificados de acuerdo a su punto de muestreo.....	39
Figura 4-2. Diseño experimental para seleccionar el consorcio con la mejor capacidad de degradación de pentolita.....	41
Figura 4-3. Diseño experimental utilizado para monitorear la degradación de PENT por el consorcio microbiano CPR2 (campo de prueba) en presencia y ausencia de TNT.....	43
Figura 4-4. Procedimiento para la extracción de explosivos a partir de muestras acuosas.....	44
Figura 5-1. Comportamiento de los cinco consorcios TP1, ES1, M2, EC2, CPR2 en la degradación de TNT, PETN y formación de subproductos: DANT y amDNT en cultivos de enriquecimiento.....	52
Figura 5-2. Interacción de los factores experimentales mes, tiempo y consorcio entre las medias de las concentraciones de TNT para los cinco consorcios evaluados y control abiótico.....	53

Figura 5-3. Interacción de los factores experimentales mes, tiempo y consorcio entre las medias de las concentraciones de PETN para los cinco consorcios evaluados y control abiótico.....	53
Figura 5-4. Comportamiento del consorcio CPR2 en la degradación de TNT y PETN en cuatro meses de monitoreo en cultivos de enriquecimiento.....	56
Figura 5-5. Interacción de los factores experimentales mes y tiempo entre las medias de las concentraciones de TNT en presencia de PETN en los 4 meses de monitoreo para el consorcio CPR2.....	57
Figura 5-6. Interacción de los factores experimentales mes y tiempo entre las medias de las concentraciones de PETN en presencia de TNT en los 4 meses de monitoreo para el consorcio CPR2.....	57
Figura 5-7. Comportamiento del consorcio CPR2 en la degradación de PETN en ausencia de TNT en cuatro meses de monitoreo.....	60
Figura 5-8. Interacción entre los factores experimentales mes y tiempo de las medias de las concentraciones de PETN en ausencia de TNT en los 4 meses de monitoreo para el consorcio CPR2.....	61

Lista de Tablas

Tabla 1-1. Propiedades físicas y químicas del TNT.....	5
Tabla 1-2. Principales tratamientos fisicoquímicos utilizados para la remediación de explosivos.....	8
Tabla 1-3. Métodos biológicos empleados para la remoción de TNT.....	11
Tabla 1-4. Aproximaciones generales de la bioremediación.....	13
Tabla 1-5. Estudios que reportan el uso de consorcios bacterianos con capacidad degradadora de TNT y derivados de nitro aromáticos.....	16
Tabla 1-6. Técnicas moleculares basadas en fingerprinting.....	31
Tabla 1-7. Principales características de las tecnologías de secuenciación de segunda generación.....	34
Tabla 4-1. Identificación de los consorcios de acuerdo al lugar de muestreo.....	40
Tabla 4-2. Coeficientes de determinación obtenidos en las curvas de calibración....	44
Tabla 5-1. Porcentajes de degradación de TNT y PETN de los cinco consorcios evaluados.....	49
Tabla 5-2. Características macroscópicas de los microorganismos degradadores de TNT y PETN obtenidos de los consorcios ES1 y TP1.....	49
Tabla 5-3. Características macroscópicas de los microorganismos degradadores de TNT y PETN obtenidos para los consorcios CPR2, EC2 y M2.....	50
Tabla 5-4. Caracterización de los microorganismos que conforman el consorcio CPR2 a partir de la secuenciación del gen 16S rRNA.....	63

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
TNT	2,4,6-trinitrotolueno
PETN	Pentaeritriol tetranitrato 2,2-bis[(nitrooxi)metil]-1,3-propanediol dinitrato
HADNT	Hidroxilaminodinitrotolueno
amDNT	Aminodinitrotoluenos (2 y 4 aminodinitrotoluenos)
DANT	2,4 y 2,6 diaminonitrotoluenos
2,4-DNT	2,4-dinitrotolueno
DNT	Dinitrotolueno
Azoxy	Azoxytetranitrotolueno
2-ADNT	2-aminodinitrotolueno
4-ADNT	4-aminodinitrotolueno
RDX	1,3,5-trinitroperhidro-1,3,5-triacina
HMX	Octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
GTN	Glicerol trinitrato
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia

Introducción

Las prácticas de fabricación de armas, disposición de residuos y actividades como la exploración minera han dado como resultado la contaminación de suelos y aguas con explosivos como TNT y PETN (Pennington and Brannon, 2002, Stenuit and Agathos, 2010). Estos químicos de síntesis industrial al ser compuestos xenobióticos poseen sustituyentes que son raramente encontrados en la naturaleza, sus características determinan su toxicidad, persistencia en el ambiente y la manera en que son degradados por los microorganismos (Binks et al., 1996, Esteve-Núñez et al., 2001). Los métodos físicos han sido los más usados para el tratamiento de ambientes contaminados con explosivos. Dentro de estos los más ampliamente usados han sido la incineración y detonación. No obstante, estos procedimientos poseen muchas desventajas debido a su alto costo, generación de residuos tóxicos y baja eficiencia en la remoción de los explosivos (Bacosa et al., 2010, Panz and Miksch, 2012). El impacto ambiental del uso de estos compuestos ha llevado a que crezca la preocupación acerca de los perjuicios que causan a la salud por sus efectos mutagénicos y tóxicos. Por lo anterior es de gran importancia encontrar nuevas tecnologías efectivas, económicas, limpias y amigables con el medio ambiente para hacer remediación de estas áreas contaminadas (Lewis et al., 2004, Bacosa et al., 2010). La remoción del material orgánico contaminante a través de métodos biológicos usando consorcios de microorganismos, ha sido sugerido por su gran potencial, en comparación al rendimiento del uso de cepas individuales, para los procesos de remediación. Esto se debe a que un gran número de cepas bacterianas al tener contacto con la molécula contaminante, han evolucionado incorporando estos compuestos a los ciclos biogeoquímicos y a su vez adaptando los sitios activos de sus enzimas para usar estos compuestos como fuente de carbono y/o nitrógeno para su crecimiento (Lewis et al., 1997, Williams et al., 2004, Kulkarni and Chaudhari, 2007).

Los estudios reportados sobre biodegradación de la mezcla de TNT y PETN (conocida también como pentolita) son muy escasos. Además de los estudios realizados en el grupo de investigación USBA (Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental) de la Pontificia

Universidad Javeriana (Garcia Bonilla, 2011, Roldan et al., 2013, Garcia Galindo, 2014), el único estudio publicado hasta la fecha ha sido el de (Georgie, 2011) donde se aislaron 36 cepas que usan el TNT y PETN como única fuente de nitrógeno.

Para el TNT, debido a que ha sido más ampliamente usado que el PETN en la industria militar y minera, por el riesgo que representa al ser tóxico y mutagénico, se encuentran más reportes de estudios de comunidades microbianas que colaboran en la degradación usando los grupos nitro como fuente de nitrógeno. Los procesos de biodegradación de TNT involucran la reducción de los sustituyentes nitro con la formación de isómeros aminoaromáticos como aminodinitrotoluenos o diaminonitrotoluenos, cuya formación se ve favorecida en condiciones de aerobiosis (Alvarez et al., 1995). También se ha encontrado la formación de complejos de Meisenheimer los cuales son de fácil formación debido al carácter electrofílico del TNT a través de enzimas hidruro transferasas que sustituyen los grupos nitro por iones hidruro. Sin embargo, en el metabolismo aerobio del TNT, a través de reacciones de condensación, los productos parciales reducidos reaccionan entre sí formando compuestos azoxy que son más tóxicos que la misma molécula de TNT (Alvarez et al., 1995, Lewis et al., 1997, Esteve-Núñez et al., 2001, Williams et al., 2004). Por otro lado, los procesos de biodegradación de TNT en condiciones anaerobias poseen grandes ventajas debido al bajo potencial de óxido-reducción donde generalmente las reacciones ocurren a una tasa más rápida. Además, los grupos nitro son usados como aceptores finales de electrones y bajo estas condiciones de reducción no se forman los compuestos azoxy. La reducción completa de la molécula de TNT da como resultado TAT y en algunos estudios se ha reportado la formación de ácidos carboxílicos que pueden ser integrados a rutas metabólicas centrales llevando a la mineralización del TNT (Alvarez et al., 1995, Lewis et al., 1997, Boopathy, 2014).

La degradación de PETN involucra la reducción secuencial de tres de sus cuatro grupos nitro por la acción de la enzima pentaeritriol reductasa, sugiriendo que para que haya una buena actividad por parte de esta enzima, se requiere de la presencia de al menos tres grupos nitro, ya que el pentaeritrioldinitrato no es sustrato para esta enzima (Binks et al., 1996, Zhuang et al., 2012).

En la mayoría de estudios de bioremediación, se recomienda el uso de consorcios microbianos debido a su amplia gama de capacidades metabólicas y enzimáticas al ser eficientes en la remoción de compuestos contaminantes en comparación con las cepas individuales, las cuales

degradan un rango limitado de sustratos complejos (Bacosa et al., 2010, Wang et al., 2011, Mikesková et al., 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior, el estudio de las comunidades microbianas que habitan en ambientes contaminados con explosivos, tiene el potencial de poder usarlas y que de esta forma la biorremediación se considere como un método alternativo y eficiente para el tratamiento de estos contaminantes gracias a la diversidad metabólica y a la adaptación que han tenido estos microorganismos en el tiempo. A su vez, el establecimiento de consorcios degradadores es de gran importancia, debido a que se puede lograr un mayor porcentaje de remoción, disminución de la toxicidad y en algunos casos llegar a la mineralización del contaminante. Por esta razón, es necesario conocer los microorganismos que conforman el consorcio, esto con el fin de asegurar su viabilidad, reproducibilidad y su capacidad biodegradadora (Snellinx et al., 2003, Robertson and Jjemba, 2005).

En el presente estudio, se pretendió evaluar la capacidad degradadora de cinco consorcios no definidos en cultivos de enriquecimiento obtenidos a partir de ambientes contaminados con TNT y PETN, con la finalidad de elegir el consorcio que tuviera la mejor capacidad degradadora de estos explosivos. Para esto, se realizó la evaluación la degradación de PETN en presencia y ausencia de TNT debido a que, como se reportó en un estudio previo, la presencia de TNT afecta la degradación de PETN (Garcia Bonilla, 2011). Posteriormente, se realizó la caracterización molecular de los microorganismos que integran el consorcio a través de secuenciación del gen 16S rRNA y análisis bioinformático.

1. Marco teórico

1.1 Explosivos

Un explosivo se define como una sustancia que por fricción, impacto, choque, chispa, llama o cualquier simple aplicación de energía experimenta una rápida reacción química que produce una gran cantidad de calor ejerciendo presión sobre su entorno. Muchos explosivos orgánicos constan de un núcleo de carbono unido covalentemente a grupos oxidizantes como: nitro, nitramina, éster de nitrato entre otros. Estos grupos poseen enlaces tipo N-N y N-O y tienen dos o más átomos covalentemente unidos. En una explosión, ocurre una reacción redox interna donde estos enlaces se rompen con la formación de productos gaseosos como N_2 y CO_2 (Agrawan, 2007).

1.1.1 Pentolita

La pentolita es la mezcla (50:50) de dos explosivos nitroaromáticos: TNT (2,4,6-trinitrotolueno) y PETN (pentaeritriol tetranitrato), una formulación que es muy utilizada en la industria minera, petrolera y de carbón. Su uso ha causado un impacto ambiental negativo debido a que es un compuesto tóxico y mutagénico. El TNT es considerado un compuesto recalcitrante debido a su alta persistencia en suelos y aguas y porque su producción a nivel mundial es masiva. El PETN es un éster de nitrato y su uso no es tan extensivo en comparación con del TNT, debido a su sensibilidad al impacto y choques. El PETN es utilizado en cordones detonantes o como carga principal explosiva (EPA, 2001).

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

El 2,4,6 trinitrotolueno (**Figura 1-1**) es un sólido inodoro de color amarillo que no es producido de manera natural en el medio ambiente. Está clasificado en clase C como un carcinogénico potencial por la EPA de Estados Unidos (Rylott et al., 2001). Ha sido el explosivo más usado de manera histórica por los ejércitos. Su estabilidad y capacidad de ser mezclado en proyectiles es

razón de su gran uso. Esta hecho mediante la nitración secuencial del tolueno por una mezcla de ácido nítrico y sulfúrico (Rylott et al., 2001). Es uno de los explosivos más ampliamente usados para la fabricación de municiones militares y para aplicaciones industriales como voladura de pozo profundo. Su producción y uso extendido ha ocasionado contaminación y acumulación en suelos y aguas subterráneas (EPA, 2015).

Químicamente, el elevado estado de oxidación (+3) de los grupos nitro y la deficiencia de electrones del anillo aromático le confiere su carácter oxidante y electrofílico (afín a cargas negativas) haciendo de este compuesto susceptible de reducción. En la **Tabla 1-1** se describen sus propiedades físicas y químicas (Stenuit and Agathos, 2010).

Se han descrito dos vías principales de degradación, (**Figura 1-2**). 1) en una de ellas se realiza ataque directo al anillo aromático realizando sustitución de los grupos nitro por iones hidrido con la formación de complejos de Meisenheimer; y 2) en la otra vía se realiza la reducción de los grupos nitro con la formación de subproductos aminoaromáticos (Roldan et al., 2008, Beynon et al., 2009).

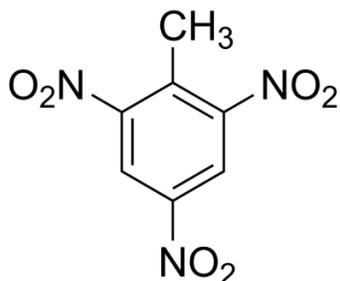


Figura 1-1. Estructura química del 2,4,6-Trinitrotolueno (Rylott et al., 2001)

Tabla 1-1. Propiedades físicas y químicas del TNT (EPA, 2001, Lewis et al., 2004)

Propiedad	Valor
Descripción física (estado a temperatura ambiente)	Cristales solidos amarillos
Peso molecular (g/mol)	227,13
Solubilidad en agua (mg/L)	130
Coeficiente de partición octanol-agua (log K)	1,6
Punto de ebullición (*C)	240
Punto de fusión (*C)	80,1
Presión de vapor 20*C (mm Hg)	1,99x10 ⁻⁴
Gravedad especifica	1,652

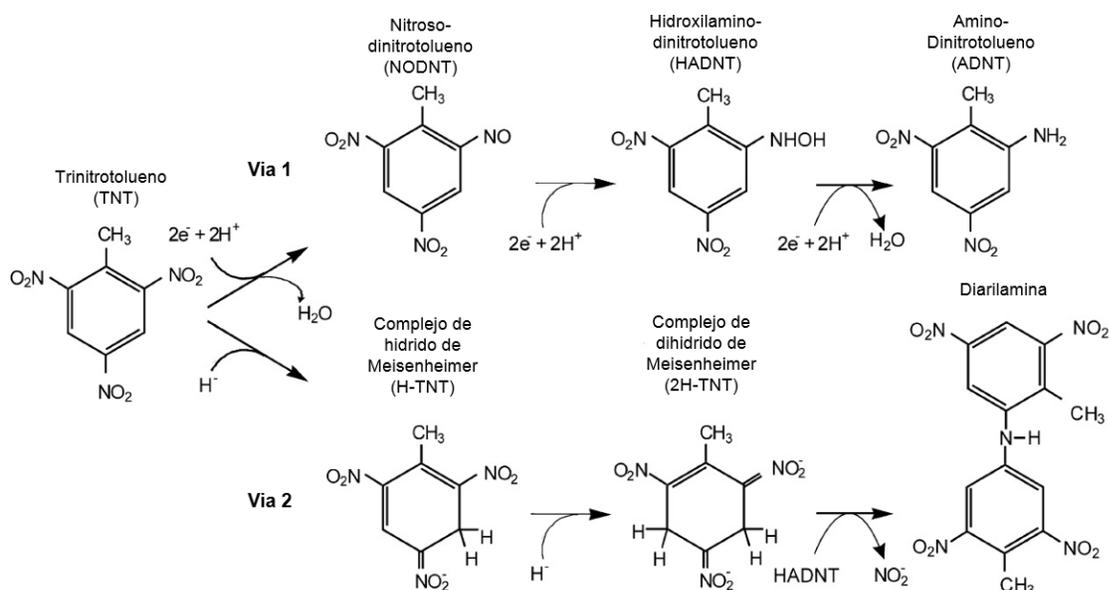


Figura 1-2. Principales vías de degradación del TNT. (Beynon et al., 2009).

1.1.3 Características del pentaeritriol tetranitrato (PETN)

El 2,2-bis[(nitrooxi)metil]-1,3-propanediol dinitrato (**Figura 1-3**) es un éster de nitrato producido por condensación con ácido nítrico del pentaeritriol (White and Snape, 1993). La unión éster que lo conforma es rara en la naturaleza y por esta razón es considerado recalcitrante a la degradación y representa ser un reto para la remediación. Es ampliamente usado como un fármaco vasodilatador y en su mezcla con TNT, es utilizado como un poderoso explosivo usado en detonadores, encontrándose clasificado como un constituyente de municiones altamente contaminante (Binks et al., 1996, Zhuang et al., 2012). Además, su carácter insoluble es atribuido a que el ácido nítrico, al ser monobásico, hace que los enlaces éster que se forman en la condensación del pentaeritriol no tengan carga, lo cual reduce su polaridad y solubilidad. (White and Snape, 1993, Ye et al., 2004).

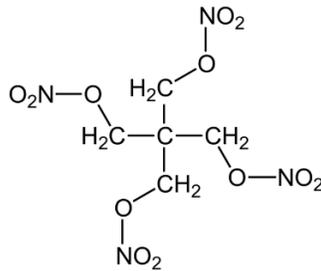


Figura 1-3. Estructura química del tentaeritriol tetranitrato 2,2-bis[(nitrooxi)metil]-1,3-propanediol dinitrato (Williams et al., 2004).

1.2 Métodos para el tratamiento de ambientes contaminados con explosivos

Existen diferentes métodos para el tratamiento de suelos contaminados con explosivos. Dentro de estos se encuentran los métodos físicos, químicos y biológicos. La selección del método depende del tipo de compuesto, se debe evaluar la tecnología a implementar y se deben tener en cuenta diferentes factores tales como las condiciones del ambiente a remediar, los costos y tiempo requerido entre otros (Esteve-Núñez et al., 2001, Khan et al., 2004). Tradicionalmente, los métodos físicos, como la incineración y detonación, han sido utilizados para tratamiento de ambientes contaminados con explosivos. No obstante, poseen muchas desventajas debido a la generación de residuos tóxicos, elevados costos y baja eficiencia en la remoción de los explosivos (Bacosa et al., 2010, Panz and Miksch, 2012). De esta manera, los métodos biológicos han demostrado ser prometedores y eficientes, utilizando el potencial metabólico y enzimático de diversos organismos como plantas, bacterias y hongos para la remediación de ambientes contaminados (Lewis et al., 2004, Bacosa et al., 2010).

1.2.1 Métodos Fisicoquímicos

Teniendo en cuenta la creciente preocupación acerca del riesgo que representa para el ambiente la contaminación con explosivos como TNT y PETN, han sido usados métodos tradicionales como volatilización, hidrólisis, fotoxidación e incineración para el tratamiento de estos ambientes. No obstante, estos métodos en general poseen muchas desventajas por su alto costo, se llevan a cabo *ex-situ*, su baja eficiencia en la remoción del explosivo al separar en lugar de destruir el explosivo y por generar residuos tóxicos. En la **Tabla 1-2** se describen

algunos de estos tratamientos de uso convencional (Kulkarni and Chaudhari, 2007, Panz and Miksch, 2012).

Tabla 1-2: Principales tratamientos fisicoquímicos utilizados para la remediación de explosivos

Método	Definición	Ventajas	Desventajas
Detonación en campo abierto ^a	Técnica más usada en donde el material explosivo es detonado ^a	Al ser detonado de manera controlada el explosivo ya no hay riesgo de explosión. ^a	Ocasiona problemas en el entorno debido a los residuos originados de la detonación que causan contaminación de aire, suelos y aguas subterráneas ^a
Incineración ^b	Combustión del material explosivo a altas temperaturas (>1500°C). ^b	Es rápido y efectivo. ^b Método convencional de tratamiento en suelos. ^b	La combustión puede llevar a la detonación. Producción de grandes volúmenes de residuos. ^b Altos costos en excavación de suelos, transporte y energía. ^b Emisión de gases tóxicos. ^{c, d, e, f}
Oxidación ^{e, h, g}	Utiliza agentes oxidantes como el peróxido de hidrogeno, UV, ozono los cuales generan radicales hidroxilo que actúan oxidando el contaminante y causan la apertura del anillo aromático. ^e	Usado en aguas Mineralización a CO ₂ y agua. ^e	Altos costos Emisión de gases tóxicos a la atmosfera. ^e Cuando se usa peróxido de hidrógeno el proceso es eficiente a bajas longitudes de onda. ^h Se requiere de baja turbidez para mejorar la transmisión de luz. ^h Genera intermediarios tóxicos ^g
Adsorción ^{c, g}	Unión del material orgánico contaminante a una matriz de carbono activado para prevenir la migración. ^c	Usado en aguas. ^c	Degradación incompleta de TNT. ^g Retención de compuestos no tratados. Requiere de nutrientes adicionales. ^{c, g} Separa mas no destruye el explosivo. ^g

(^a EPA, 2001, ^b Esteve-Núñez et al., 2001, ^c Park et al., 2003, ^d Zhuang, 2007, ^e Rodgers and Bunce, 2001, ^f Panz and Miksch, 2012, ^g Kulkarni and Chaudhari, 2007, ^h Khan et al., 2004)

1.2.2 Atenuación natural

También llamada remediación intrínseca o bioatenuación. La atenuación natural es un método utilizado para la remediación de ambientes contaminados donde no hay intervención y donde la acción simultanea de procesos naturales, la presencia en suelos y sedimentos de donadores de electrones como formas reducidas de hierro, sulfuro (Esteve-Núñez et al., 2001) sumado a procesos fisicoquímicos (volatilización, reducción u oxidación), y biológicos (microorganismos), son los encargados de reducir la concentración de los contaminantes. Raramente es utilizada como único tratamiento ya que los procesos de biorremediación que se llevan a cabo sin monitoreo o intervención pueden llegar a tomar largos periodos de tiempo en disminuir la

concentración de los contaminantes del sitio de interés. De esta manera, el ambiente contaminado ocasiona una baja diversidad de plantas y microorganismos presentes en el ambiente contaminado los cuales afectan la funcionalidad y estabilidad de un ecosistema (Stenuit and Agathos, 2010). El resultado final de este tratamiento es la incorporación de material contaminante a material orgánico del suelo (Declercq et al., 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior, la atenuación monitoreada es reconocida como un mecanismo de tratamiento para la remediación de suelos contaminados en algunos países de Europa y Estados Unidos. No obstante, algunos países como Francia y Finlandia donde aún no es formalmente usada como técnica de remediación debido a que, de acuerdo a los estudios que se han realizado, aseguran que las bajas temperaturas afectan la tasa de biodegradación y la estructura física y química del contaminante (Declercq et al., 2012). Los biomarcadores son de gran importancia en el monitoreo de la atenuación natural para conocer la participación, cambios, estructura y adaptaciones como la formación de lípidos polares en la membrana y genes encargados de codificar para la formación de enzimas en la comunidad microbiana (flora nativa) del suelo que actúan como catalizadores en la transformación de TNT (Pennington et al., 1999).

1.2.3 Métodos Biológicos

Son métodos prometedores de descontaminación de suelos y aguas contaminadas al utilizar el potencial metabólico de bacterias, hongos, levaduras, plantas, algas (Rylott et al., 2001) para la limpieza de ambientes, ya que actúan transformando contaminantes orgánicos en compuestos menos tóxicos. Durante este proceso, los microorganismos utilizan los contaminantes como fuente de nutrientes, nitrógeno y energía adaptando vías metabólicas existentes que pueden ser usadas en sustratos recalcitrantes análogos. Además, aprovechan el gran potencial por su participación en todos los ciclos biogeoquímicos (Stenuit and Agathos, 2010). Por otro lado, las plantas almacenan los productos de transformación de TNT en vacuolas y paredes celulares (Panz and Miksch, 2012). Además, este método se basa en la promoción del crecimiento de consorcios microbianos que provienen de los sitios contaminados ya que los mejores resultados de remoción de contaminantes han sido encontrados cuando los microorganismos forman parte de un consorcio (Kulkarni and Chaudhari, 2007).

Debido a que la limpieza de las áreas contaminadas es ahora de gran importancia, se ha invertido esfuerzo considerable en encontrar tecnologías eficientes, sostenibles y ambientalmente amigables de remediación (Stenuit and Agathos, 2010). Los tratamientos biológicos son considerados de manera frecuente ya que se ha demostrado su efectividad en la remediación de la contaminación con explosivos (Esteve-Núñez et al., 2001, Lewis et al., 2004). En la **Tabla 1-3** se describen algunos de los métodos biológicos que han sido utilizados para la remediación de explosivos.

Tabla 1-3. Métodos biológicos empleados para la remoción de TNT.

Método	Definición	Ventajas	Desventajas
Compostaje ^{a, b, c, e}	Es la mezcla de desechos orgánicos con suelo contaminado. Este material de desecho actúa diluyendo la concentración del material contaminante presente en el suelo disminuyendo su toxicidad ^a	Incorporación de TNT material húmico de suelo. ^c Realizado in –situ Metabolitos como aminoquinonas, aminohidroquinonas e imino han sido identificados. ^c El suelo que ha sido tratado y se ha confirmado la reducción de la concentración y toxicidad del contaminante es usado como relleno. ^c	Requiere de mucha cantidad de materiales de compostaje el cual es mezclado únicamente con el 10% de residuos para el tratamiento. ^b Baja caracterización química de los resultados del proceso. ^c Largos periodos de incubación. ^a Falta de conocimiento acerca de los microorganismos que intervienen en el proceso. ^a
Reactor de Lodos ^{d, e}	El suelo contaminado es mezclado con agua y nutrientes para crear un lodo en un bioreactor de varios diseños bajo condiciones controladas de temperatura, pH y aireación. ^{a, c, e} .	Al ser un sistema cerrado permite el control de temperatura, pH, nutrientes. ^d Los metabolitos reducidos del TNT originados de este método, son incorporados a material orgánico. ^e Se ha demostrado su habilidad en reducir TNT metabolitos como TAT, 4-ADNT y 2,4-DANT. ^e	Altos costos Se lleva a cabo <i>ex –situ</i> . ^c Largos tiempos en el proceso de remediación. ^e La remediación disminuye a bajas temperaturas. ^e
Fitoremediación ^{e, f, g, h, i}	Es el potencial que poseen las plantas de biotransformar y disminuir la contaminación tanto de contaminantes orgánicos como inorgánicos. Los productos de transformación de TNT son depositados en vacuolas y paredes celulares. ^{a, g} La combinación de las actividades catabólicas de las bacterias con potencial de las plantas constituye ser una aproximación eficiente para la bioremediación in situ. ⁱ	Bajos costos Aplicabilidad in situ Las plantas poseen la capacidad de tolerar la presencia de explosivos. ^h No requiere de equipos específicos No requiere introducción de sustancias químicas. Es ampliamente aceptado Se ha demostrado su efectividad por su habilidad de transformar TNT en metabolitos como aminodinitrotoluenos, ácido 2-amino-4,6 dinitrobenzoico, 2,4 dinitro-6-hidroxil-benzil alcohol, 2-N-acetoxiamino-4,6-dinitro-benzaldehído y 2,4-dinitro-6- hidroxil-tolueno y otros compuestos más polares que el TNT. Tanto plantas acuáticas como terrestres son capaces de remover hasta el 100% de TNT. ^f Las plantas transgénicas son más resistentes a sus efectos tóxicos a través de transferencia de genes que codifican para enzimas nitroreductasa que confiere a la planta la capacidad de tolerar mayores concentraciones y de remover este contaminante en menor tiempo. ^{a, g}	En algunos casos, largos tiempos en el proceso de remediación. La remediación se puede ver limitada a altas concentraciones de TNT.

(^a Esteve-Núñez et al., 2001, ^b Park et al., 2003, ^c Kulkarni and Chaudhari, 2007, ^d Khan et al., 2004, ^e Lewis et al., 2004, ^f Panz and Miksch, 2012, ^g Rylott et al., 2001, ^h Pennington and Brannon, 2002, ⁱ Stenuit and Agathos, 2010)

1.3 Biorremediación

Cuando se habla de biorremediación, es común encontrar términos como mineralización, biodegradación y transformación. La mineralización hace referencia a la utilización del compuesto nitroaromático como fuente de energía, carbono y/o nitrógeno y de esta manera llevando a la formación final de productos como CO₂ (Pennington and Brannon, 2002, Zhuang et al., 2014). Por otro lado, la biodegradación/transformación es la capacidad que poseen los microorganismos de utilizar todo el potencial de su maquinaria enzimática para transformar el compuesto contaminante en derivados menos tóxicos (Pennington and Brannon, 2002, Khan et al., 2004, Kulkarni and Chaudhari, 2007).

La biorremediación es el proceso que bajo condiciones controladas, utiliza los sistemas biológicos para catalizar la degradación de moléculas xenobióticas en compuestos menos tóxicos. En cada aproximación, los microorganismos poseen habilidades inherentes para metabolizar y colonizar los ambientes contaminados con compuestos nitroaromáticos. Dicha aproximación se puede realizar de diferentes maneras: 1) mediante la promoción del crecimiento o la adición de nutrientes (bioestimulación); 2) por adición de un aceptor final de electrones; 3) controlando las condiciones de temperatura; o 4) incorporando bacterias nativas o exógenas (Bioaumentación). La **Tabla 1-4** describe algunas de las formas de biorremediación más comunes. Los microorganismos autóctonos del lugar o foráneos, son los primeros en ser usados para biorremediación (Kulkarni and Chaudhari, 2007, Chatterjee et al., 2008).

Tabla 1-4. Aproximaciones generales de la biorremediación

Proceso	Características
Bioaumentación^{a,b}	Incorporación de microorganismos nativos o exógenos competentes para incrementar la capacidad degradativa de sitios contaminados. ^a Se sugiere la utilización de microorganismos nativos que se encuentren adaptados a la presencia del contaminante. ^b Se ha reportado una mejor remoción del contaminante cuando se realiza con consorcios microbianos esto debido a la combinación de rutas metabólicas, actividad enzimática y sinérgica de los microorganismos. ^b Puede ocurrir predación o competición. ^b
Bioestimulación^{a,c}	Es la optimización de condiciones mediante el suministro de factores limitantes como nutrientes (fuentes de nitrógeno, carbono, fósforo, entre otras) y aceptores de electrones para la estimulación del metabolismo y velocidad de crecimiento de los microorganismos nativos degradadores lo que acelera las tasas de biodegradación. ^a Permite la degradación más rápida y eficaz de contaminantes por parte de microorganismos nativos. ^c Puede llegar a tomar largos tiempos de remediación. ^a
Bioventeo^{c,d,e}	Es un técnica <i>in situ</i> que consiste en realizar aspersión de aire para proveer oxígeno a las poblaciones de la superficie para maximizar la biodegradación y minimiza la liberación de gases volátiles a la atmósfera. ^{d,e} El propósito es promover la degradación biológica a medida que el aire se mueve a través del suelo. ^c El movimiento del aire estimula de manera natural los microorganismos que usen como fuente de carbono y energía a los contaminantes. ^c

(^a Stenuit and Agathos, 2010, ^b Silva et al., 2009, ^c Kulkarni and Chaudhari, 2007, ^d Lewis et al., 1997, ^e Khan et al., 2004)

1.4 Consorcios microbianos

Es una asociación sinérgica de varios microorganismos que muestran un rendimiento de degradación superior a las cepas microbianas individuales por la combinación de rutas metabólicas que colaboran para la degradación de un contaminante (Mikesková et al., 2012). Generalmente, son recuperados del sitio que ha tenido contacto con el compuesto contaminante debido a que los microorganismos presentes en el entorno poseen la capacidad de adaptar sus vías metabólicas y enzimas para tomar el compuesto como fuente de carbono y/o nitrógeno disminuyendo su toxicidad. Las interacciones entre los microorganismos que conforman un consorcio están basadas principalmente en la comunicación entre sus miembros por la producción de moléculas señal de tipo acil homoserin lactonas o metabolitos donde cada población detecta y responde a la presencia de los otros miembros del consorcio lo cual le permite realizar una división de labores que da como resultado su habilidad de llevar a cabo la degradación de moléculas complejas (Brenner et al., 2008, Mikesková et al., 2012).

Dentro de esta asociación sinérgica, existen dos razones muy importantes por las cuales los consorcios poseen mayor productividad:

- 1) Están constituidos por un gran número de especies clave donde cada miembro de la comunidad microbiana juega un papel importante en la degradación de un compuesto contaminante debido a que dentro de sus grandes capacidades unas especies remueven metabolitos tóxicos o, por otro lado, producen polímeros extracelulares como los surfactantes que hacen biodisponibles las moléculas contaminantes. Lo anterior hace posible que se lleven a cabo las actividades microbianas de otras poblaciones en beneficio de la degradación de un compuesto contaminante (Ghazali et al., 2004b, Robertson and Jjemba, 2005, Goldman and Brown, 2009).
- 2) Debido a su robustez y complementariedad, muestran mayor resistencia a cambios ambientales debido a que son capaces de soportar largos periodos de limitación de nutrientes y protegen el consorcio de invasores debido a que intercambian metabolitos entre los miembros de la comunidad, lo que promueve la estabilidad en el tiempo de los miembros del consorcio (Brenner et al., 2008, Goldman and Brown, 2009, Moretti et al., 2010, Patel et al., 2012b, Mikesková et al., 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior, el uso de consorcios en biorremediación de compuestos contaminantes posee muchas ventajas comparado con las cepas individuales lo cual ha sido ampliamente reportado en varios estudios donde se ha demostrado que poseen la capacidad de degradar con eficiencia los siguientes compuestos contaminantes: hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos como el naftaleno, antraceno, fenantreno, colorantes azo, pesticidas y bifenilos policlorados (Gallego et al., 2007, Vandermeer and Daugulis, 2007, Chirnside et al., 2007, Jacques et al., 2008, Silva et al., 2009, Bacosa et al., 2010, Mikesková et al., 2012).

1.4.1 Biorremediación de compuestos contaminantes con consorcios microbianos

En la mayoría de estudios de biorremediación de compuestos contaminantes como los explosivos, diversos autores reportan que la remoción de estos compuestos se lleva a cabo de manera más rápida y eficiente con un cultivo mixto que con cepas bacterianas individuales debido a que las últimas únicamente poseen la capacidad de metabolizar un rango limitado de sustratos complejos

. De esta manera se ha demostrado que los consorcios microbianos debido a su amplia gama de capacidades metabólicas y enzimáticas, resultan ser más efectivos en la degradación de contaminantes. A su vez, es de gran importancia el desarrollo y optimización del consorcio ya que debe tener la capacidad de sobrevivir bajo las condiciones de competencia por parte de la flora nativa del sitio a tratar (Ghazali et al., 2004b, Bacosa et al., 2010, Mikesková et al., 2012).

Existen interacciones específicas de los microorganismos dentro de la cooperación metabólica y la efectividad de la remoción del contaminante la cual depende de la presencia de todos sus constituyentes bacterianos ya que cada uno de los miembros del consorcio cumple un rol específico en la degradación, que se puede ver afectado cuando falta alguno de ellos. Según (Alexander, 1999) una población juega un papel importante eliminando los metabolitos tóxicos, donde si estos no son removidos podrían bloquear las actividades microbianas de un segundo grupo de microorganismos que posee la capacidad de degradar compuestos que la primera población solo tuvo la capacidad de degradar de manera parcial (Ghazali et al., 2004a, Mikesková et al., 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior y que la degradación de contaminantes orgánicos complejos como los explosivos, implica una asociación de varios microorganismos, varios autores han evaluado consorcios microbianos degradadores de TNT, demostrando su efectividad en la remoción(**Tabla1-5**).

Tabla 1-5. Estudios que reportan el uso de consorcios bacterianos con capacidad degradadora de TNT y derivados de nitro aromáticos.

Autores	Objetivo del estudio	Resultados
(Hudcova <i>et al.</i> , 2011)	Degradación aerobia de 2,4-dinitrotolueno por cepas bacterianas individuales y poblaciones mixtas definidas.	El cultivo mixto degradó 50 veces más rápido el 2,4 DNT que las cepas individuales. El cultivo mixto mostró su gran habilidad de degradar un gran espectro de nitrotoluenos.
(Paca <i>et al.</i> , 2009)	Biodegradación de 2,4 DNT y 2,6 DNT por un cultivo mixto definido.	El cultivo mixto aislado de sitios contaminados con nitroaromáticos, degradó de manera satisfactoria los DNT.
(Robertson and Jjemba, 2005)	Evaluar la biodisponibilidad de TNT en suelos para la mineralización microbiana.	Cerca del 50% del TNT fue mineralizado lo cual fue determinado por la producción de CO ₂ . <i>Enterobacter sp</i> fue el responsable del 25% de la mineralización de TNT la cual se vió incrementada por los otros dos miembros del consorcio.
(Nyanhongo <i>et al.</i> , 2009)	Incorporar <i>P.putida</i> y <i>Bacillus sp.</i> a una formulación de explosivos para incrementar la biotransformación de TNT y sus residuos tóxicos HADNT.	La adición de esporas de <i>Bacillus sp</i> tenía la capacidad de sobrevivir en la formulación del explosivo permitiendo la transformación inmediata de TNT.
(Snellinx <i>et al.</i> , 2003)	Aislar, caracterizar e identificar cepas bacterianas aeróbicas con capacidad degradadora de compuestos nitro aromáticos como 2,4 DNT.	Los consorcios aislados degradaron el 2,4 DNT sin la producción de intermediarios. El 2,4 DNT era usado como única fuente de carbono y nitrógeno.
(Fuller and Manning Jr, 2004)	Conocer si la población microbiana Gram-positiva, era restablecida a medida que se reducían las concentraciones del explosivo.	Se observó un incremento en población microbiana de Gram-positivos a medida que se reducían las concentraciones de explosivo.
(Sagi-Ben Moshe <i>et al.</i> , 2009)	Evaluación de la degradación anaerobia de TNT, RDX y HMX con consorcios aislados de ambientes contaminados.	Hubo disminución de bacterias Gram-positivas. Los subproductos generados de la degradación de TNT, limitaron la degradación de los otros explosivos.
(Travis <i>et al.</i> , 2008)	Evaluar los cambios fisiológicos, estructurales, funcionales en una comunidad microbiana cuando se agregó TNT en diferentes concentraciones.	Análisis químicos demostraron que el TNT fue reducido a amino derivados.

1.5 Degradación aerobia de TNT

En la mayoría de casos descritos para la remoción de nitrógeno, las bacterias aerobias transforman la molécula de TNT reduciendo uno o dos sustituyentes nitro a nitroso, hidroxilamino e isómeros de aminonitroaromaticos como 2-ADNT y 4-ADNT y su reducción posterior lleva a la formación de DANT. También se ha encontrado la formación de complejos de hidrido o dihidrido de Meisenheimer, los cuales son fácilmente formados debido a la naturaleza electrofílica del TNT, que tiende a formar enlaces covalentes con nucleófilos como los iones hidroxil e iones hidrido (Alvarez et al., 1995, Nyanhongo et al., 2009, Stenuit and Agathos, 2010). Además, se encontró que las nitrito reductasas y reductasas nitroaromáticas de *Pseudomonas putida* están involucradas en la formación de amonio a partir de isómeros de HADNT, para que pueda ser tomado como fuente de nitrógeno (Stenuit and Agathos, 2010). Sin embargo, en el metabolismo aerobio del TNT, se pueden formar compuestos parciales reducidos por reacciones de condensación, que reaccionan entre ellos y que en presencia de oxígeno, mediante la oxidación de los grupos hidroxilamino por su inestabilidad, se forman azoxytetranitrotoluenos como 4,4',6,6'-tetranitro-2,2'-azoxytoluene (4,4'-azoxy) o diarilaminas secundarias que son compuestos recalcitrantes aún más tóxicos que el TNT, conocidos como metabolitos *dead end* y no son metabolizables por los microorganismos que los producen y al parecer son el mayor obstáculo para el metabolismo productivo de TNT (Alvarez et al., 1995, Lewis et al., 1997, Esteve-Núñez et al., 2001, Williams et al., 2004).

En varios estudios se ha evaluado la biodegradación de TNT en condiciones aerobias y se han encontrado las siguientes generalidades:

1. El proceso de transformación de TNT en sistemas aerobios es un proceso cometabolico, que requiere de la adición de un sustrato primario que le sirva como fuente de carbono y energía ya que la enzimas encargadas de la degradación del TNT son inducibles. Lo cual fue reportado en (Martin et al., 1997) donde la adición de glucosa incremento la producción de 2-ADNT y 4-ADNT (Lewis et al., 1997, Stenuit and Agathos, 2010).
2. En el aislamiento de una cepa de *Pseudomonas* sp se encontró que tenía la capacidad de tomar el TNT como única fuente de nitrógeno y transformarlo de manera secuencial en dinitrotolueno, nitrotolueno y tolueno. Adicionalmente, la cepa de *Pseudomonas* sp.

fue transformada con un plásmido de *Pseudomonas putida* que tenía la capacidad de tomar el tolueno como fuente de carbono. De esta manera la combinación de estas vías llevo a la mineralización de TNT por parte de la cepa de *Pseudomonas sp.* transformada (Duque et al., 1993).

3. La formación de 2,4-DNT es deseable debido a que las cepas de *Pseudomonas spp.* pueden metabolizar este nitroaromático a través de enzimas dioxigenasas para producir 4-metil-5-nitrocatecol y esto es seguido por oxidación, liberación de nitrito y mineralización (Esteve-Núñez et al., 2001).
4. Los derivados hidroxilamino son intermediarios clave para las rutas catabólicas ya que se encontró que los microorganismos transforman el TNT en 2-hidroxilamino-4,6-dinitrotolueno, 4-hidroxilamino-2,6-dinitrotolueno y de esta manera obtienen el nitrógeno por la formación de amonio y lo hacen disponible para el crecimiento, aunque no es claro en cual estadio del metabolismo ni en cual forma es más asimilable el nitrógeno para las bacterias (Vorbeck et al., 1994).
5. La cepa de *Enterobacter cloacae* PB2 se aisló originalmente por su habilidad de usar nitroesteres como el PETN y también se encontró que puede crecer con TNT como única fuente de nitrógeno. Con los resultados de este estudio, se obtuvo evidencia *in-vitro* de la reducción de TNT con la pentaeritriol reductasa y mostro que esta enzima reducía el TNT a un complejo hidrido de Meisenheimer con la oxidación de NADPH y liberación de nitrito (Binks et al., 1996). Debido a que subproductos como HADNT y amDNT fueron detectados se asumió que la enzima tenía otras actividades nitroreductasas.
6. En los suelos contaminados con TNT, una proporción de este compuesto puede encontrarse adsorbido a los componentes húmicos de suelo, haciendo de este no biodisponible para la degradación por microorganismos. Esta habilidad del TNT de adsorberse se le atribuye a que es propenso a formar complejos de pares donadores de electrones. En el estudio de (Robertson and Jjemba, 2005), se comparó la degradación del TNT adsorbido a un suelo usando un consorcio conformado por cuatro microorganismos y así mismo, se realizó la evaluación de este compuesto usando los microorganismos que conformaban este consorcio por separado. El porcentaje de remoción de TNT más alto se encontró en el consorcio, mientras que las cepas por separado no tuvieron un porcentaje de remoción considerable. Lo anterior demuestra que el rendimiento de remoción de este contaminante se lleva a cabo con eficacia cuando varios microorganismos se encuentran presentes debido a que uno de ellos

pudo haber secretado un surfactante que logro hacer disponible el TNT adsorbido en el suelo, y de esta manera, los microorganismos restantes del consorcio pudieron degradar el compuesto.

1.5.1 Vías principales aerobias para transformación de TNT

Los electrones π del anillo aromático del TNT son atraídos por los sustituyentes nitro por su electronegatividad haciendo que el núcleo del anillo tenga carga positiva volviéndose electrofílico. El enlace N-O de los grupos nitro se encuentra polarizado debido a que el oxígeno es más electronegativo que el nitrógeno. De esta manera, la carga positiva del nitrógeno en combinación con su electronegatividad, hace de este compuesto susceptible de reducción por enzimas reductasas o hidruro transferasas (Esteve-Núñez et al., 2001, Stenuit and Agathos, 2010). La reducción del primer grupo nitro se lleva a cabo de manera más rápida que la de los demás sustituyentes y la conversión de los grupos nitro a amino disminuye la deficiencia de electrones del anillo aromático, lo que causa bajo potencial redox que es requerido para reducir los demás grupos nitro de la molécula. Adicionalmente, los sustituyentes nitro de la posición *para* son más fácil de ser reducidos que aquellos que se encuentran en la posición *orto* (Duque et al., 1993, Esteve-Núñez et al., 2001). La eliminación de los grupos nitro es necesaria para disminuir el carácter electrofílico de la molécula y permitir que las dioxigenasas usen este compuesto como sustrato (Esteve-Núñez et al., 2001).

La mayoría de los compuestos nitroaromáticos son xenobióticos debido a que han sido liberados al ambiente por actividades humanas de manera reciente. Por lo tanto, la presión selectiva de la contaminación ambiental ha llevado a la adaptación microbiana de enzimas modificando sus sitios activos haciendo de estas capaces de usar un amplio rango de compuestos con grupos nitro (Roldan et al., 2008). La degradación microbiana del TNT se lleva a cabo por reacciones cometabolicas, no se ha reportado ninguna cepa que por sí sola realice una degradación suficiente. La evolución de una vía de mineralización se da cuando hay varias reacciones consecutivas con diferentes microorganismos o cuando se realiza la transformación de una cepa con genes de otros microorganismos (Duque et al., 1993, Lewis et al., 1997, Stenuit and Agathos, 2010).

La biodegradación de compuestos polinitroaromáticos como el TNT, puede ser realizada mediante dos vías: 1) a través del ataque directo al anillo aromático y su reducción por enzimas (oxigenasas o hidruro transferasas) que por adición hidrida causan la liberación consecutiva de los grupos nitro que lo conforman; o bien, 2) a través de la acción de nitroreductasas que actúan reduciendo de manera secuencial sus sustituyentes (**Figura 1-2**) (Williams et al., 2004). La acción en conjunto de estas enzimas producidas por diferentes microorganismos, podría llevar a la mineralización de la molécula. Los principales mecanismos de degradación aerobia de TNT se describen en la **Figura 1-6**.

La degradación de compuestos polinitroaromáticos como el TNT, al tener sustituyentes nitro, pueden ser transformados en condiciones aeróbicas, mediante las siguientes vías:

- **Reducción del anillo aromático y formación de complejos de Meisenheimer: adición de iones hidrido al anillo aromático**

La reducción del anillo aromático por la adición de iones hidrido es llevada a cabo por enzimas hidrido transferasas que generan los complejos hidrido y dihidrido de Meisenheimer, los cuales pueden ser más adelante metabolizados con la liberación de nitrito. Esta vía ha sido observada en bacterias, hongos y plantas. La primera enzima que interviene es la Hidrido Transferasa II, codificada por el gen *npdI*. Esta enzima cataliza la formación del complejo de Hidrido de Meisenheimer (**Figura 1-4**) que ocurre en el carbono C3. Posteriormente, en la presencia de suficientes agentes reductores, la enzima hidrido transferasa I, codificada por el gen *npdC*, cataliza la segunda transferencia hidrida en el carbono C5 que origina el complejo dihidrido Meisenheimer. La actividad de las transferasas requiere de una reductasa dependiente de NADPH para proveer los iones hidrido y de esta manera realizar la síntesis de ambos complejos de Meisenheimer. Posteriormente, ocurre la liberación de nitrito con la formación simultánea de 2-hidroxilamino-6-nitrotolueno y el núcleo aromático se rearomatiza (Alvarez et al., 1995, Lewis et al., 1997, Kulkarni and Chaudhari, 2007, Roldan et al., 2008, Stenuit and Agathos, 2010). La formación de complejos de Meisenheimer se puede llevar a cabo tanto en ausencia como presencia de oxígeno (Duque et al., 1993). A su vez, se encontró que la flavoproteína oxidoreductasa (XenB) de *Pseudomonas fluorescens* cataliza la reducción de TNT por la adición de un ion hidrido al anillo aromático con la formación concomitante del complejo de dihidrido de Meisenheimer o por la reducción de los grupos nitro.

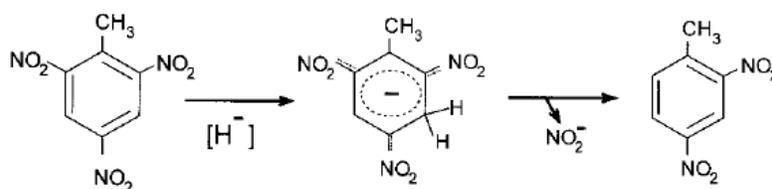


Figura 1-4. Complejo de monohidrido Meisenheimer (Esteve-Núñez et al., 2001)

- **Nitroreductasas**

La reducción de los grupos nitro del TNT con la formación de subproductos aminoderivados es llevada a cabo por dos tipos de nitroreductasas y se caracterizan por participar en diferentes procesos metabólicos debido a su versatilidad en cuanto al sustrato. Se han descrito dos clases y difieren en su respuesta al oxígeno:

- **Las nitroreductasas de tipo I** o insensibles al oxígeno, catalizan la reducción secuencial de los grupos nitro a través de la adición de pares de electrones del NADPH con la formación de nitroso, hidroxilamino y derivados amino. (Roldan et al., 2008). Análisis filogenéticos de estas enzimas sugieren que se encuentran clasificadas en dos familias: Grupo A NfsA y Grupo B NfsB. Las enzimas del grupo A usualmente son NADPH dependientes y las del grupo B pueden usar NADH o NADPH como donadores de electrones. Además, poseen un mononucleótido de flavina y amplio espectro de especificidad de sustratos (Roldan et al., 2008).
- **Las nitroreductasas de tipo II** o sensibles al oxígeno catalizan la reducción de un electrón del grupo nitro para formar un radical anión nitroso el cual es un intermediario en la reducción del grupo nitro a nitroso que puede reaccionar con oxígeno para formar un anión superóxido, de esta manera alterando el compuesto nitroaromático (Kulkarni and Chaudhari, 2007, Roldan et al., 2008).

El nitrito y amonio liberado de los grupos aromáticos pueden ser usados como fuente de nitrógeno para el crecimiento microbiano. Las enzimas nitroreductasas, a su vez, pueden reducir el TNT y formar intermediarios como: hidroxilaminodinitrotolueno (HADNT), aminodinitrotolueno (amDNT) y diaminonitrotolueno (DANTs) (Roldan et al., 2008).

- **Reacciones mediadas por enzimas oxigenasas**

Monooxigenasas: adicionan un átomo de oxígeno ocasionando la pérdida de un grupo nitro del anillo aromático (Kulkarni and Chaudhari, 2007).

Dioxigenasas: introducen dos grupos hidroxilo en el anillo aromático con la consecuente remoción del grupo nitro. Su acción concomitante hacen de estas enzimas importantes en la degradación microbiana de moléculas nitroaromáticas (Alvarez et al., 1995, Crawford, 1995). Los principales mecanismos que involucran remoción de los grupos nitro del TNT por acción de oxigenasas se describen en la **Figura 1-5**.

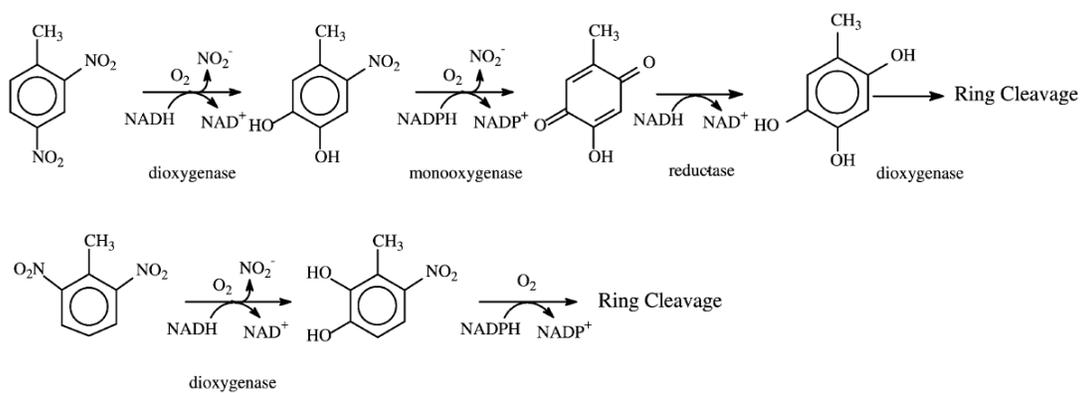


Figura 1-5: Remoción de los grupos nitro del TNT por acción de oxigenasas (Lewis et al., 2004).

Se han reportado otras enzimas que se encuentran involucradas en la transformación de compuestos polinitroaromáticos que poseen actividad de flavoproteínas o flavoreductasas “Old Yellow Enzymes” (OYE) las cuales poseen un amplio rango de espectro de acción de sustratos con capacidad de denitrificar algunos explosivos como pentaeritrol tetranitrato (PETN), glicerol trinitrato (GTN) y el polinitroaromático TNT donde no actúa únicamente como nitrorreductasa sino que transforma el TNT mediante la formación de los complejos monohidrido-Meisenheimer o el dihidrido-Meisenheimer, con la liberación de nitrito. Dentro de estas flavoreductasas se encuentra la pentaeritrol tetranitrato reductasa de *Enterobacter cloacae* (Binks et al., 1996), la N-etilmaleimido reductasa de *E.coli*, las reductasas xenobioticas Xen A y XenB de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida*, las cuales son dependientes de NADPH. Estas enzimas no actúan únicamente reduciendo los grupos nitro de estos compuestos sino que también actúan sobre el anillo aromático. Además, algunos miembros de las OYE son capaces de degradar compuestos no aromáticos como los ésteres de nitrato PETN o GTN, mediante la denitrificación reductiva con la consecuente liberación de nitrito.

Hasta hace poco, el mecanismo de liberación de nitrógeno del TNT era desconocido, sin embargo se ha establecido que el complejo del dihidrido de Meisenheimer forma una diarilamina secundaria y estable en reacción con las hidroxilaminas derivadas de TNT lo que da como resultado la liberación de nitrito (French et al., 1998, Rylott et al., 2001, Stenuit and Agathos, 2010).

En diversos estudios de degradación de TNT, se han encontrado reportados los siguientes microorganismos como degradadores en condiciones aerobias: *Pseudomonas* sp, *Mycobacterium* sp, *Rhodococcus erythropolis*, *Serratia* sp., *Staphylococcus* sp, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* sp., *Pseudoxanthomonas* sp. (Alvarez et al., 1995, Esteve-Núñez et al., 2001, Roldan et al., 2008, Stenuit and Agathos, 2010, Bacosa et al., 2010, Mikesková et al., 2012, Patel et al., 2012b, Patel et al., 2012a).

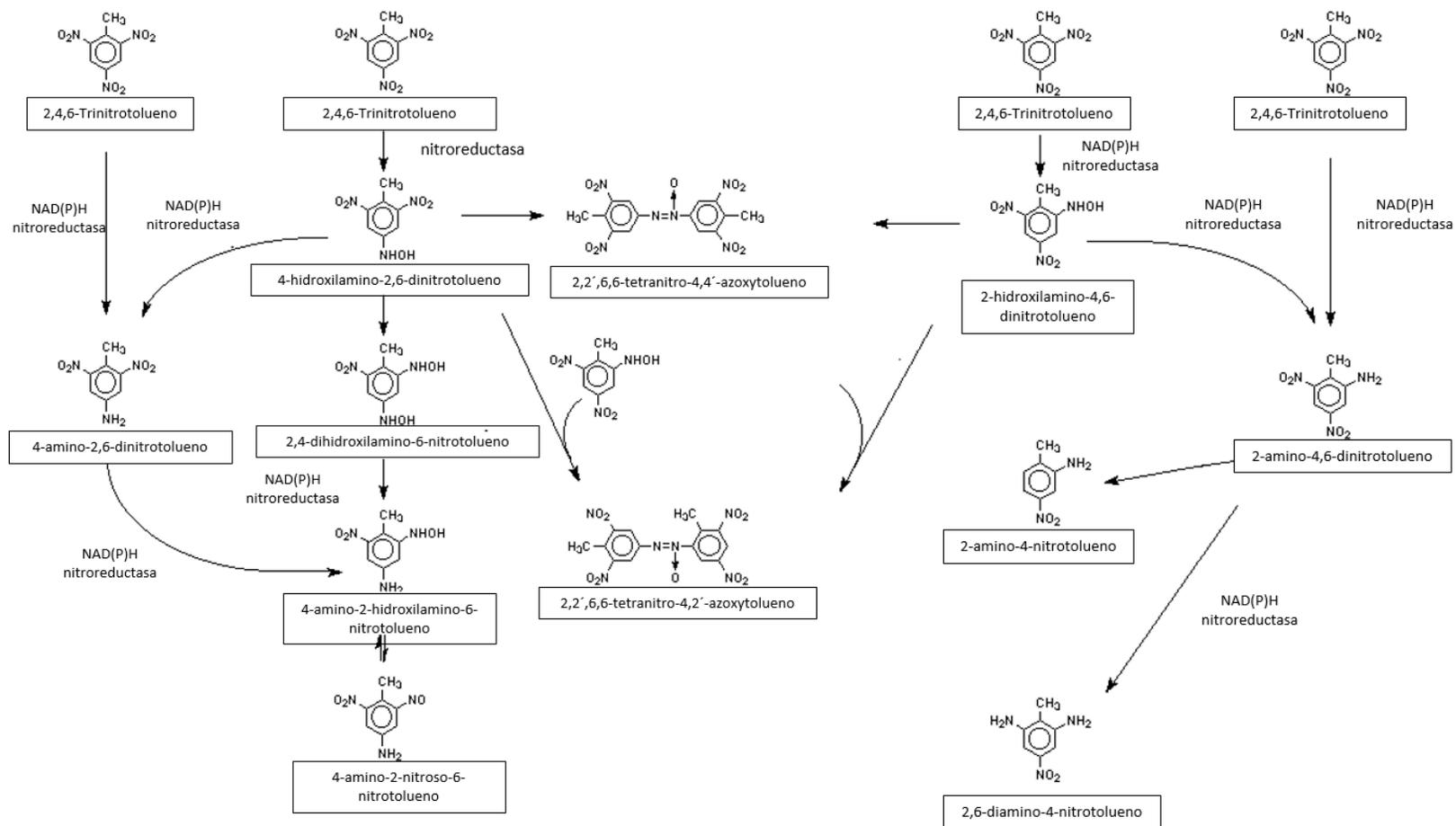


Figura 1-6. Principales mecanismos de degradación aerobia de TNT (McFarlan, 2014).

1.5.2 Degradación anaerobia de TNT

Los procesos de biodegradación de TNT que se llevan a cabo en condiciones de anaerobiosis, son reacciones netamente reductoras que se ven favorecidas debido al bajo potencial de óxido-reducción que minimiza la polimerización oxidativa de los sustratos debido a la ausencia de oxígeno. Estas reacciones ocurren a una tasa más rápida en comparación a las reacciones aerobias debido a que no se forman compuestos azoxy. Además, los sustituyentes nitro son usados como fuente de nitrógeno y como aceptores finales de electrones por los microorganismos y en algunos casos, la reducción completa de la molécula de TNT da como resultado la formación de TAT. Se ha reportado que bacterias sulfato reductoras y metanogénicas poseen la capacidad de metabolizar compuestos nitroaromáticos si se encuentran presentes en el medio los aceptores y donadores de electrones apropiados. Los siguientes microorganismos han sido reportados como degradadores de TNT en condiciones de anaerobiosis: *Methanococcus* sp., *Desulfovibrio* sp y *Clostridium acetobutylicum*. Los principales mecanismos de degradación anaerobia de TNT se describen en la **Figura 1-7** (Alvarez et al., 1995, Lewis et al., 1997, Esteve-Núñez et al., 2001, Boopathy, 2014).

En un estudio de (Costa et al., 1996) se evaluó la capacidad de degradación de TNT, con sulfato y nitrato como aceptores finales de electrones, por un aislamiento al que de acuerdo a sus características denominaron *Desulfovibrio* sp., una bacteria sulfato reductora. Según los resultados obtenidos, se encontró la presencia de diferentes productos aminoderivados como 4-amino-2,6-dinitrotolueno, 2-amino-4,6-dinitrotolueno y 2,4-diamino-6-nitrotolueno con sulfato como aceptor final de electrones, en siete días de incubación. Sin embargo, cuando el nitrato fue utilizado como aceptor final de electrones, se encontró como producto el ácido butírico, un metabolito inocuo, el cual puede ser incorporado a vías metabólicas centrales llevando a la mineralización de TNT. Por otro lado, en el estudio de (Boopathy, 2014), se determinó que bajo condiciones sulfato reductoras, el consorcio evaluado logró remover más TNT que en condiciones nitrato reductoras, debido a que la tasa de remoción fue más rápida bajo estas condiciones. Además, se encontró en mayor proporción la formación de ácido acético, seguido de CO₂, lo cual indica que hubo mineralización del TNT. Según afirman los autores, este consorcio debido a la formación de subproductos inocuos y que una parte del TNT fue mineralizado, posee gran potencial para la bioremediación de suelos contaminados con este compuesto.

1.6 Biodegradación de PETN

La ruta metabólica más conocida de biodegradación de PETN fue descrita por (Binks et al., 1996) donde fue aislada una cepa de *Enterobacter cloacae* PB2 con la capacidad de producir una enzima a la que denominaron pentaeritriol reductasa (**Figura 1-8**). Según este estudio, esta enzima libera de manera reductiva el nitrito del PETN, mediante la oxidación de NADPH para formar pentaeritrioltrinitrato y luego pentaeritrioldinitrato. También se encontró la presencia de aldehídos formados a partir de alcoholes lo que sugiere la actividad subsecuente de otra enzima con actividad deshidrogenasa. A su vez, para que haya una buena actividad por parte de esta enzima, se requiere de la presencia de al menos tres grupos nitrato, ya que el pentaeritrioldinitrato no es sustrato para esta enzima. La PETN reductasa es dependiente de NADPH y hace parte de la familia de las flavoproteínas “*Old Yellow Enzymes*” y posee la capacidad de reducir otros compuestos con grupos nitro como el TNT ya que en otro estudio se encontró que la PETN reductasa puede reducir el anillo aromático del TNT a través adición hidrida formando complejos de hidrido y dihidro de Meisenheimer (Williams et al., 2004, Zhuang et al., 2012). Esta ruta metabólica fue reportada en otro estudio de (White et al., 1996) donde fue aislado un microorganismo aerobio identificado como *Agrobacterium radiobacter* el cual tenía la capacidad de tomar como fuente de carbono esteres de nitrato como GTN y PETN. Este microorganismo tenía la capacidad de realizar denitrificación secuencial de los grupos nitro del GTN con la formación de gliceroldinitrato y finalmente glicerol mononitrato. La enzima no tenía la capacidad de degradar el GMN y formar glicerol, de esta manera se concluyó que este microorganismo no podía tomar como fuente de carbono al GTN. A su vez, se realizaron ensayos donde se agregó como sustrato PETN para conocer la especificidad de sustrato por parte de la enzima. Se encontraron tres picos que al igual que en lo observado en GTN, fueron productos secuenciales que hipotéticamente se le atribuyeron a la producción de pentaeritriol trinitrato, pentaeritriol dinitrato y mononitrato lo cual puede confirmar lo descrito en (Binks et al., 1996). Las enzimas encargadas de la denitrificación secuencial requieren de la presencia de al menos tres grupos nitro y la presencia de un solo grupo nitro no era sustrato para esta enzima, por lo tanto el GTN como el PETN, no fueron tomados como fuente de carbono. De esta manera los autores concluyen que la degradación de estos compuestos no se puede llevar a cabo por una sola especie bacteriana.

En otro estudio realizado por (Zhuang et al., 2012), de degradación de PETN en condiciones de anaerobiosis y usando como aceptores finales de electrones compuestos como nitratos y sulfatos, se encontró que la formación de intermediarios (pentaeritrioltrinitrato, pentaeritrioldinitrato) eran los mismos, independientemente de los aceptores de electrones presentes. Es importante resaltar que la adición de nitratos tuvo un efecto favorable debido a que facilitó las tasas de degradación de PETN mediante la estimulación del crecimiento de las especies microbianas denitrificantes lo que indujo a la producción de nitrito reductasa. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se propuso que el PETN puede ser usado como sustrato primario para el crecimiento microbiano mediante el uso de los átomos de carbono y nitrógeno de su estructura. También se encontró que debido al carácter deficiente de electrones de los grupos nitro del PETN, pueden ser usados como aceptores finales de electrones.

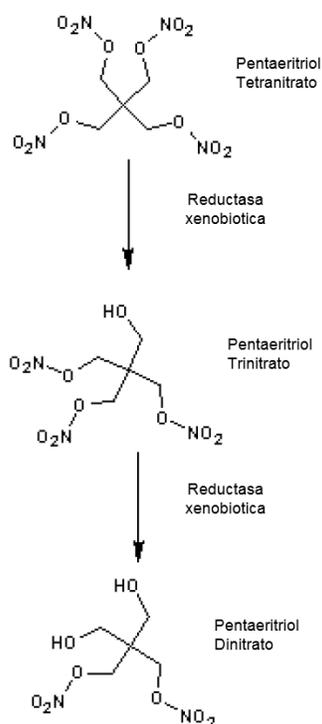


Figura 1-8 : Ruta de reducción de PETN a partir de la pentaeritriol reductasa de *E.cloacae* PB2 (Yang, 2012).

1.7 Métodos de estudio de poblaciones microbianas

Tradicionalmente, la caracterización de la composición de comunidades microbianas se había limitado a la siembra y conteo en placa en medios de cultivo para conocer sus diferentes morfologías, pero solo una fracción de los microorganismos involucrados en la biodegradación de contaminantes en suelos y aguas ha podido ser cultivada en el laboratorio. Se ha estimado que la comunidad microbiana de un gramo de suelo puede contener alrededor de mil especies bacterianas diferentes pero solo se ha podido rescatar el 1% de los microorganismos a través de este método debido a que el medio creado en el laboratorio con frecuencia no posee la capacidad de imitar las condiciones óptimas tanto bióticas como abióticas requeridas para el crecimiento microbiano (Brenner et al., 2008, Malik et al., 2008a, Hirsch et al., 2010). De esta manera, las técnicas moleculares permiten conocer la diversidad microbiana sin la necesidad del cultivo en placa. Estos métodos se basan en la caracterización de componentes celulares como: proteínas, ácidos nucleídos, RNA mensajero y otros componentes específicos (Malik et al., 2008a, Hirsch et al., 2010).

Dentro de los métodos moleculares actualmente utilizados para el estudio de comunidades microbianas se destacan: fingerprinting, PCR en tiempo real, microarreglos, metagenómica, metatranscriptómica, metaproteómica. Las técnicas de *fingerprinting* dan a conocer un perfil específico de una población microbiana determinada. Están basados en la separación de amplicones de genes funcionales como el del gen 16S rRNA, el cual al ser un gen altamente conservado, es utilizado para estudios de filogenia y taxonomía bacteriana. Sin embargo, la profundidad de detección de los métodos de *fingerprinting* es limitada debido a que solo distinguen un número determinado de amplicones que son las poblaciones que son predominantes en una comunidad microbiana (Stenuit et al., 2008, Hirsch et al., 2010). En el presente estudio, no fue utilizada ninguna técnica de *fingerprinting* ya que el DNA total del consorcio microbiano fue enviado a secuenciar y allí el gen 16S rRNA fue amplificado con primers del dominio bacteria de alta precisión.

Algunas de las principales técnicas de *fingerprinting* se resumen en la **Tabla 1-6**.

Tabla 1-6. Técnicas moleculares basadas en fingerprinting

Técnica	Fundamento	Ventajas	Desventajas
<p>DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)/TGGE (temperature gradient gel electrophoresis)^{a,b,c,d}</p>	<p>Separa los fragmentos de rDNA de la misma longitud pero con diferente composición de bases.^{b,c}</p> <p>El número de bandas es proporcional al número de especies dominantes en la muestra.^c</p>	<p>Permite monitorear los cambios en el tiempo de la comunidad microbiana.^a</p> <p>Da a conocer las especies microbianas dominantes en una muestra.^a</p> <p>Permite hacer corte de bandas y secuenciar DNA.^d</p> <p>Es un método reproducible^b</p>	<p>Solo posee la capacidad de detectar 1-2% de las especies microbianas en una muestra.^b</p> <p>Los fragmentos amplificados están limitados a 500 pb limitando el análisis filogenético.^d</p> <p>Una banda puede representar más de una especie debido a que los fragmentos de DNA de diferentes secuencias pueden tener características de movilidad similar en el gel^b</p> <p>Debido a las múltiples copias de rRNA, se puede perder especificidad filogenética y puede ocurrir la aparición de múltiples bandas de una misma especie.^c</p>
<p>ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis)^d</p>	<p>Los fragmentos amplificados por PCR del gen 16S rRNA son cortados por enzimas de restricción, luego los fragmentos son separados en un gel de electroforesis, y porque las diferentes secuencias de DNA son cortadas en diferentes locaciones, dan como resultado un perfil único de la comunidad a ser analizada. La división de la comunidad está influenciada por el tipo de enzima de restricción.^d</p>	<p>Es simple, rápido y económico para la identificación microbiana y estudios ecológicos.^d</p> <p>Muy útil para la detección de cambios en la estructura de una comunidad microbiana.^d</p>	<p>No posee la capacidad de medir la diversidad microbiana.^d</p> <p>No detecta grupos filogenéticos en una comunidad.^d</p> <p>El análisis de los patrones de banda en algunas comunidades son muy complejos.^d</p> <p>Combinado con otras técnicas como TRFLP y DGGE es muy útil para caracterizar comunidades microbianas.^d</p>
<p>ARISA (ribosomal intergenic spacer analysis)^{a,d}</p>	<p>Amplifica la región intergenica de los operones entre 16S y 23S. La región intergenica, dependiendo de la especie posee una secuencia y distancia (50-150 pb) y esta característica única facilita la identificación taxonómica de los organismos.^a</p>	<p>Método simple y rápido.^a</p> <p>Permite obtener una resolución taxonómica mayor.^d</p> <p>Determinación de perfiles de comunidades más complejos.^a</p>	<p>En análisis de resultados de comunidades microbianas de sitios contaminados es limitado debido a las pocas bases de datos.^{a,d}</p>

		Diferencia cepas y especies cercanas. ^d	
T-RFLP (terminal- restriction fragment length polymorphism) ^{b,d}	Los primers son marcados para ser visualizados y cuantificados por fluorescencia. Se basa en las variaciones de los sitios de restricción entre las secuencias y la determinación de las longitudes de los fragmentos. ^b	Permite realizar el análisis de comunidades microbianas complejas proporcionando información de la diversidad porque cada banda visible representa un OTU. ^d El patrón de bandeo puede ser usado para medir la riqueza de especies. ^d	Se requieren múltiples enzimas de restricción para describir una comunidad microbiana ya que se puede sobreestimar la comunidad microbiana. ^b Se puede obtener un perfil de bandas complejo que puede limitar el análisis. ^{b,d}
PLFA (profile of phospholipids fatty acids) ^{d,e,f}	Determina los cambios en los perfiles de fosfolípidos para conocer la composición de grupos microbianos que puede ser interpretado por bases de datos de cultivos puros y vías biosintéticas. ^{d,e}	Da a conocer la estructura y estado fisiológico de las poblaciones microbianas. ^f	Hay ácidos grasos de membrana que son comunes en diferentes microorganismos ya que los ácidos grasos ramificados no solo se encuentran en Gram positivos sino también en Gram negativos. ^{e,f} Se requiere el uso de técnicas de perfil molecular para determinar la diversidad de la comunidad microbiana. ^d
SSCP (single strand conformation polymorphism) ^{b,c}	Detecta variaciones en la secuencia entre diferentes fragmentos de DNA que son amplificados por PCR de los genes 16S rRNA. ^{b,c}	Es reproducible ^b	Sensible para fragmentos de 400-500pb. ^b Los DNA de cadena sencilla pueden formar más de una conformación estable. ^b

(^a Hirsch et al., 2010, ^b Zhang and Xu, 2008, ^c et al., 2008, ^d Malik et al., 2008b, ^e Fuller and Manning, 1998, ^f Fuller and Manning Jr, 2004)

1.8 Tecnologías de secuenciación de segunda generación de alto rendimiento

Los métodos de secuenciación de segunda generación de secuenciación se han convertido en herramientas indispensables para realizar estudios de ecología microbiana y diversidad para conocer su composición, la interacción entre sus constituyentes y su ambiente. Están basados en el análisis masivo en paralelo, el cual mejora el rendimiento de la secuenciación reduciendo los costos en reactivos al encontrarse las reacciones inmovilizadas en una matriz donde se generan cientos de miles de secuencias. Dentro de las tecnologías de secuenciación de segunda generación de encuentran: Roche 454, Illumina Genome Analyzer, SOLiD Applied Biosystems Sequencer (Metzker, 2010, Hirsch et al., 2010, Mikesková et al., 2012, Di Bella et al., 2013).

- **Roche 454**

Esta fue la primera tecnología en ser usada para el análisis de biodiversidad. La plataforma 454 emplea pirosecuenciación que es un método de bioluminiscencia no electroforético el cual mide la liberación de pirofosfato orgánico convirtiéndolo en luz visible usando una serie de reacciones enzimáticas. En este método, las librerías de DNA se fragmentan, luego se ligan a perlas de agarosa (adaptadores) donde la doble hélice es denaturada a hebra sencilla las cuales son amplificadas a través de PCR por emulsión. Las perlas son llevadas a pozos donde la incorporación de nucleótidos libera pirofosfato. Esta reacción desencadena reacciones que producen luz por acción de luciferasa y esta cantidad de luz es proporcional al número de nucleótidos incorporados (Mardis, 2008, Metzker, 2010, Liu et al., 2012, Klindworth et al., 2013, Di Bella et al., 2013).

- **Illumina Genome Analyzer**

El sistema *Illumina* utiliza secuenciación por síntesis donde los cuatro nucleótidos son adicionados de manera simultánea a los canales de flujo con ayuda de la DNA polimerasa para la incorporación de los fragmentos. El proceso inicia con la fragmentación del DNA y adición de adaptadores, luego estas hebras sencillas se unen a un flujo celular en donde ocurre la amplificación en puente creando *clusters* o múltiples copias de DNA con ayuda de la DNA polimerasa. El siguiente paso es la secuenciación la cual comienza con la extensión del primer

de secuenciación para producir la primer lectura. En cada ciclo, los cuatro nucleótidos marcados con un tinte fluorescente son incorporados a la cadena creciente basándose en la secuencia de la hebra molde donde la longitud de onda de la lectura con la intensidad de la señal determina la base incorporada. Esta tecnología ha estado involucrada en el proyecto del microbioma humano y es ampliamente usada en estudios taxonómicos de identificación de microorganismos (Gloor et al., 2010, Di Bella et al., 2013).

• SOLiD System

Esta tecnología se basa en la actividad ligasa de sondas díbase de DNA semidegeneradas, que contienen fluoróforos. Utiliza un sistema donde las librerías de DNA son preparadas, fragmentadas y ligadas a un adaptador de secuencias de inicio conocidas. Los fragmentos son luego adheridos a perlas magnéticas y la amplificación se realiza a través de emulsión. El producto de PCR resultante y las perlas magnéticas se unen de manera covalente a una lámina de cristal donde se lleva a cabo la secuenciación en múltiples ciclos de ligación mediante la unión de sondas que son marcadas de manera fluorescente (Mardis, 2008, Liu et al., 2012).

Las principales características de estas tecnologías se describen en la **Tabla 1-7**

Tabla 1-7. Principales características de las tecnologías de secuenciación de segunda generación.

	Plataforma		
	Roche (454)	Illumina	SOLiD
Química de secuenciamiento ^{a,b,d}	Pirosecuenciación	Síntesis basado en polimerasa	Ligación
Método de amplificación ^{a,b,c}	PCR por emulsión	Amplificación en puente	PCR por emulsión
Tiempo de corrida ^b	24 horas	3-10 días	7-14 días
Gb por corrida ^b	0,7 Gb	600 Gb	120 Gb
Longitud de lectura ^{a,b, c,d, e}	250 pb	32-40 pb	35 pb

(^a Di Bella et al., 2013, ^b Liu et al., 2012, ^c Mardis, 2008, ^d Metzker, 2010, ^e Hirsch et al., 2010)

2. Problema y Justificación

La utilización de explosivos como TNT y PETN no solo en la industria militar, en la fabricación de municiones, sino también en otras actividades como la exploración minera, perforación petrolera, construcción de túneles entre otros, ha llevado al uso continuo de estos compuestos generando contaminación de suelos y aguas subterráneas. Ambos explosivos al ser de fabricación industrial, son xenobióticos debido a que poseen sustituyentes que son difícilmente encontrados en la naturaleza y por sus características químicas son considerados como tóxicos, recalcitrantes y mutagénicos.

En muchos estudios se ha reportado el uso de métodos fisicoquímicos para la eliminación de explosivos. No obstante, estos métodos poseen muchas desventajas principalmente debido a sus altos costos y generación de residuos tóxicos. Por otro lado, también se han propuesto los métodos biológicos que usan el potencial metabólico que poseen los microorganismos de modificar los sitios activos de sus enzimas y usar como fuente de carbono y/o nitrógeno estos compuestos contaminantes convirtiéndolos en una solución eficiente y amigable con el ambiente. Dentro de esta aproximación, en diferentes estudios de biorremediación se han empleado consorcios microbianos que han sido recuperados de lugares que han tenido contacto con el contaminante. Las poblaciones microbianas que constan de más de una especie, por la combinación de vías metabólicas y sinergismo pueden llevar a cabo tareas de mayor complejidad cuando se trata de la degradación de un compuesto contaminante. De esta manera, los consorcios bacterianos constituyen una alternativa para el tratamiento de ambientes contaminados con sustancias recalcitrantes como los explosivos. Para asegurar la remoción del contaminante, los consorcios deben ser aislados de sitios que hayan tenido contacto con este, debido a que las poblaciones se encuentran adaptadas a crecer bajo estas condiciones. Teniendo en cuenta que los consorcios empleados en biorremediación han sido recuperados de lugares que han tenido contacto con el contaminante, es de gran importancia conocer sus constituyentes,

la capacidad degradadora de quienes lo conforman y además asegurar su reproducibilidad en el tiempo. Para lograr esto, existen técnicas que van desde el estudio de morfotipos hasta el uso de técnicas moleculares para conocer las especies que se encuentran dentro del consorcio.

En este trabajo, se evaluó la capacidad degradadora de cinco consorcios microbianos obtenidos de ambientes contaminados con TNT y PETN con el objetivo de elegir uno de ellos para realizar un monitoreo de la degradación de PETN en presencia y ausencia de TNT y conocer la composición de la comunidad microbiana a través de secuenciación del gen 16S rRNA y estudio bioinformático.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Caracterización y evaluación de un consorcio microbiano aislado de ambientes con presencia de pentolita

3.2 Objetivos Específicos

- Seleccionar el consorcio microbiano que muestre la mejor capacidad de degradación a partir de cinco consorcios degradadores mediante cultivos de enriquecimiento.
- Evaluar la degradación de PETN por el consorcio microbiano en presencia y ausencia de TNT.
- Caracterizar el consorcio microbiano a nivel molecular

4. Materiales y Métodos

El estudio de los consorcios degradadores fue realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de la Salle, el análisis cromatográfico en el Laboratorio de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental USBA de la Pontificia Universidad Javeriana y el estudio genético de la comunidad microbiana en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos químicos

Los explosivos TNT (2,4,6-Trinitrotolueno) y PETN (Pentaeritritol tetranitrato) empleados para realizar los ensayos de degradación, fueron proporcionados por una industria nacional. Para el análisis cromatográfico, fueron utilizados solventes como acetonitrilo y estándares analíticos de TNT, PETN, 2-amino-4,6-dinitrotolueno, 4-amino-2,6-dinitrotolueno y 2,4-dinitrotolueno (AccuStandard®, New Haven, CT) grado HPLC.

Para la preparación de la solución stock de pentolita (TNT y PETN) se pesaron ambos explosivos sólidos y los mismos fueron disueltos con acetonitrilo. Esta solución stock estaba constituida por mezcla de los explosivos (1:1) a una concentración de 20000 mg/L. Fue a partir de esta solución que se prepararon las demás soluciones para los ensayos realizados. Una solución stock de PETN a 20000 mg/L fue preparada a parte para los ensayos donde se agregó únicamente PETN a las unidades experimentales. La concentración final tanto de PETN como de TNT utilizada para la realización de los ensayos fue de 100mg/L de cada explosivo.

4.1.2 Origen de los cultivos de enriquecimiento

Como parte de un estudio previo de (Linares and Lopez, 2013), fueron obtenidas muestras de suelo de una fábrica productora de explosivos en las cercanías de Bogotá D.C de lugares que históricamente habían estado expuestos a TNT y PETN, los cuales de acuerdo al lugar de procedencia, se les asignó un nombre relacionado y una nomenclatura para su identificación la cual fue utilizada durante todo el proyecto. En la **Tabla 4-1** se presenta la identificación de los consorcios de acuerdo al punto de muestreo. Posteriormente, se realizó un pre-enriquecimiento el cual consistió en agregar 5 g de la muestra de suelo en 45 ml de medio líquido T2 (**Anexo A**) y 200 mg/L de pentolita para conservar la presión selectiva del explosivo de esta manera asegurando el crecimiento de los microorganismos con capacidad de tolerar dichas condiciones. Estos cultivos de enriquecimiento (**Figura 4-1**) han sido mantenidos desde entonces en frascos Shott de 250 ml en agitación continua (200 rpm), 30°C con un recambio mensual a medio líquido T2 nuevo (**Anexo A**).



Figura 4-1: Cultivos de enriquecimiento de los consorcios microbianos identificados de acuerdo a su punto de muestreo (ver Tabla 4-1 para el significado de las siglas indicadas en la figura).

Tabla 4-1. Identificación de los consorcios de acuerdo al lugar de muestreo.

Puntos de muestreo	Ubicación	Nomenclatura
1	Exterior sin explosivo	ES1
2	Campo de prueba	CPR2
3	Multiplicadores	M2
4	Tanque de pentolita	TP1
5	Excaja de captación	EC2

4.2 Métodos

4.2.1 Características macroscópicas de los consorcios degradadores evaluados: Estudio de morfotipos

Para conocer las diferentes morfologías macroscópicas de los consorcios degradadores de pentolita, a partir de los cultivos de enriquecimiento, se realizaron diluciones seriadas con solución salina al 0.85 % (v/v) y se realizó siembra por triplicado en un medio mínimo de nutrientes (medio T2 mas agar 15g/L) suplementado con pentolita y se realizó observación de las diferentes colonias obtenidas. También, se realizó tinción de Gram para realizar una primera aproximación acerca de los componentes microbianos del consorcio.

4.2.2 Selección de consorcio con la mejor capacidad degradadora

Fue evaluada la capacidad degradadora de TNT y PETN de los 5 consorcios descritos en la **Tabla 4-1** mediante cultivo de enriquecimiento. Estos cultivos fueron mantenidos a lo largo de todo el estudio en frascos Shott de 250 ml con pentolita (200 mg/L) a 200 rpm, 30°C.

Para seleccionar el consorcio con la mejor capacidad degradadora (**Figura 4-2**) se evaluó la transformación de pentolita durante 14 días (eventos de muestreo a los 0,1, 3, 7,14 días) con tres replicas (n=3) adicionalmente se prepararon controles abióticos. El montaje fue realizado en frascos ámbar de 25 ml denominados unidades experimentales. En todos los ensayos para determinar la capacidad de degradación de TNT y PETN, antes de realizar el montaje, a partir de la solución stock de pentolita preparada, se agregaron 200 mg/L disueltos en acetonitrilo el cual se dejó evaporar durante 30 minutos y luego se agregó 2 ml de medio mínimo T2 en cada unidad experimental y se dejó solubilizando en agitación a 200 rpm, 30°C por 24 horas. Posteriormente, para realizar el montaje fue adicionado a las unidades experimentales, 3 ml del consorcio (**método por sacrificio**). La incubación se realizó bajo las siguientes condiciones:

200 rpm, 30°C. La concentración de explosivos y formación de subproductos fue determinada por HPLC (secciones 4.2.5 y 4.2.6).

Para calcular el porcentaje de degradación se utilizó la siguiente ecuación (Park et al., 2003).

$$\% \text{ degradacion} = \frac{\text{Concentracion explosivo}_{\text{inicial}} - \text{Concentracion explosivo}_{\text{final}}}{\text{Concentracion explosivo}_{\text{inicial}}} \times 100$$

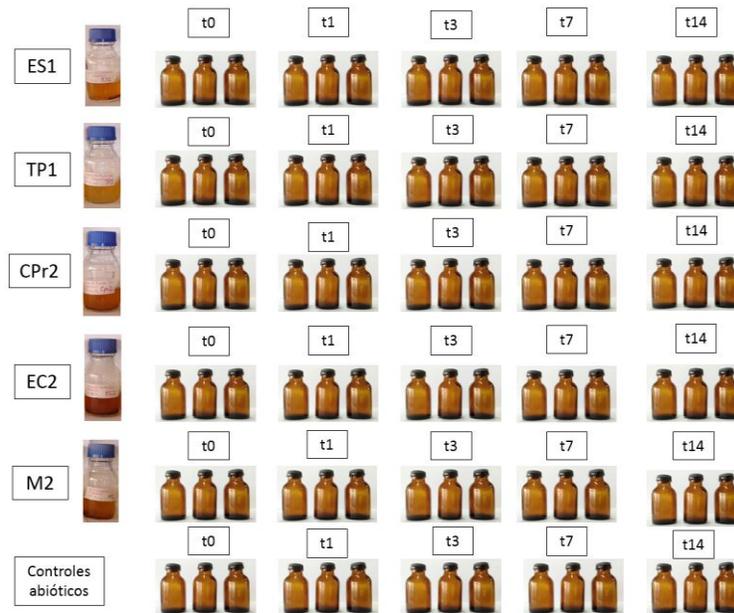


Figura 4-2: Diseño experimental para seleccionar el consorcio con la mejor capacidad de degradación de pentolita.

4.2.3 Evaluación de la capacidad degradadora de pentolita por el consorcio seleccionado

A partir de los 5 consorcios evaluados, se eligió al consorcio Campo de prueba 2 (CPR2) para continuar con los ensayos de degradación de pentolita (TNT y PETN), PETN e identificación molecular.

Para realizar el monitoreo de la transformación de pentolita (TNT y PETN), a partir del consorcio madre (CPR2) se realizaron 4 montajes cada 21 días en 5 eventos de muestreo (0, 1, 7, 14, 21 días) con tres replicas, 200 mg/L de pentolita a 200 rpm y 30°C (**Figura 4-3**). Adicionalmente, se prepararon controles abióticos (sin microorganismos) uno por cada tiempo

de muestreo. Este ensayo se efectuó con el fin de conservar las mismas condiciones para conocer el comportamiento en el tiempo de la degradación por parte del consorcio microbiano en la presencia de ambos explosivos y formación de subproductos los cuales fueron determinados a través de HPLC (Secciones 4.2.5 y 4.2.6).

4.2.4 Evaluación de la degradación de PETN en ausencia de TNT por el consorcio microbiano seleccionado

A partir del consorcio seleccionado CPR2, se realizó la evaluación de la degradación de PENT en ausencia de TNT. La metodología fue similar a la utilizada en la evaluación de la degradación de pentolita (Sección 4.2.3). La diferencia en este ensayo fue que solo se agregó PETN a las unidades experimentales con el propósito de conocer si los microorganismos tenían la capacidad de tomar este explosivo como fuente de nitrógeno. Inicialmente, fue preparado un pre-inoculo a partir del consorcio madre el cual fue lavado y centrifugado en solución salina al 0.85 % (v/v), 8000 rpm por 10 minutos con el fin de eliminar trazas de TNT que pudieran estar en el medio de crecimiento anterior. Consecutivamente a los ensayos de pentolita, se realizaron 4 montajes cada 21 días en 5 eventos de muestreo (0, 1, 7, 14, 21 días) con tres replicas, 100 ppm de PETN, 200 rpm, 30°C y se prepararon controles abióticos por cada evento de muestreo (**Figura 4-3**). La degradación de PETN fue determinada por HPLC como se describe a continuación (Secciones 4.2.5 y 4.2.6).

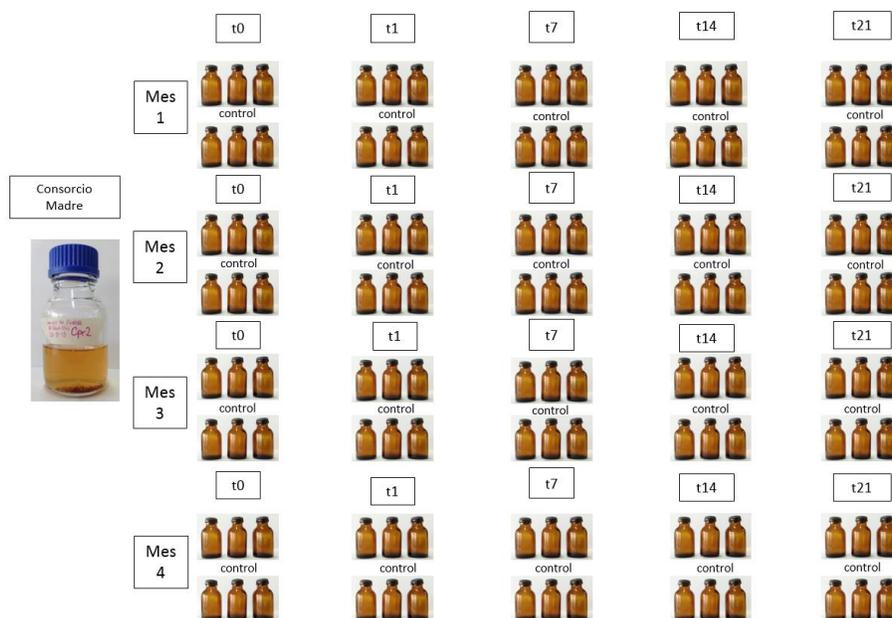


Figura 4-3. Diseño experimental utilizado para monitorear la degradación de PENT por el consorcio microbiano CPR2 (campo de prueba) en presencia y ausencia de TNT

4.2.5 Extracción de explosivos a partir de muestras líquidas

Para la determinación de la concentración de explosivos e intermediarios se utilizó el método 8330B (EPA, 2015). En la ejecución de este método se realizó una modificación la cual consistía en tomar 2 ml de la muestra y no 5 ml como indica el procedimiento original. En la **Figura 4-4** se describe el procedimiento realizado.



Figura 4.4. Procedimiento para la extracción de explosivos a partir de muestras acuosas.

4.2.6 Cuantificación de explosivos

La cuantificación de explosivos se realizó por HPLC (cromatografía líquida de alta eficiencia) en el equipo Prominence 20A; (Shimadzu) utilizando el método 8330B (EPA, 2015). Las condiciones utilizadas durante la corrida fueron: Columna Pinnacle II C18; (Restek®) de 5 µm, 250 x 4.6 mm y un flujo de corrida de 1,5 ml/min, y un detector de arreglo de diodos (UV 210 nm). La fase móvil constaba de acetonitrilo:agua (50:50). Para esto, se realizaron curvas de calibración (**Anexo B**) con estándares de TNT, PETN, 4-amino-2,6-dinitrotolueno, 2,6-dinitrotolueno y se calcularon sus respectivos coeficientes de determinación (**Tabla 4-2**). Con esta metodología se pretendió conocer el porcentaje de remoción de explosivos y la formación de intermediarios.

Tabla 4-2: Coeficientes de determinación obtenidos en las curvas de calibración.

Estándar primario	Referencia Comercial	Tiempo de retención (min)	Coefficientes de Determinación (R^2)
2,4,6 TNT	M-8330-11	7.62±0.04	0.9978
AmDNT	M-8330-14	7.69±0.02	0.9971
DNT	M-8330-03	7.90±0.02	0.9991
PETN	M-8330-ADD-2-10X	13.79±0.07	0.9984

Durante el análisis cromatográfico, junto con las muestras fueron analizados los siguientes controles:

1. Blanco de reactivos (agua:acetonitrilo, 50:50) para descartar la presencia de contaminantes.
2. Dos estándares de la curva de calibración a diferentes concentraciones.
3. Repetición de la lectura de la última muestra para evaluar la precisión del equipo.

4.2.7 Identificación molecular de los géneros microbianos que conforman el consorcio

4.2.7.1 Extracción de DNA

Para el estudio de las comunidades microbianas a partir del cultivo de enriquecimiento o consorcio madre, se lavó y centrifugó dos veces la biomasa del consorcio microbiano con solución salina al 0.85% (v/v), 8000 rpm por 15 minutos. Posteriormente, se realizó la extracción de DNA utilizando un kit comercial de extracción (*Power soil DNA isolation kit*; MoBio®). La integridad y calidad del producto de extracción fue analizado en un gel de agarosa al 1% usando el agente intercalante para la tinción de DNA, SYBR® Safe (Invitrogen), y fue utilizado como marcador de peso molecular el Hyperladder III (Invitrogen). La corrida fue realizada por 60 min a 50 V. Posteriormente el gel fue visualizado con luz ultravioleta en un transiluminador (MoBio). La determinación de la concentración de DNA fue realizada por fluorometría con un kit comercial (Qubit dsDNA BR assay kit; Invitrogen) el cual posee mayor sensibilidad y especificidad en la medición.

4.2.7.2 Secuenciación del DNA del consorcio microbiano

Las muestras fueron enviadas a un servicio de secuenciación en la Universidad de Wisconsin, Estados Unidos y el DNA fue secuenciado a través de la tecnología de alto rendimiento *Illumina* donde fue amplificada la región de cobertura V3/V4 la cual, según se ha reportado (Claesson et al., 2010), es la región que proporciona mejor precisión en la identificación de especies microbianas. La preparación de las librerías del gen 16S rRNA fueron realizadas con un set de primers de alta precisión para el dominio bacteria (Schloss and Handelsman, 2006, Klindworth et al., 2013) S-D-Bact-0341-b-s-17 (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y S-D-Bact-0785-a-A-21 (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3').

4.2.7.3 Análisis Bioinformático

Los datos fueron analizados usando el software Mothur (Version 1.33.3), el cual es una herramienta que integra diferentes algoritmos para describir y comparar comunidades microbianas (Schloss et al., 2009). El primer paso consistió en el proceso de ensamblaje donde se combinaron dos sets de lecturas (*forward* y *reverse*) mediante un algoritmo heurístico. Luego, para minimizar errores de secuenciación, fueron cortadas las lecturas con un promedio de Q-score por debajo de 25 y las secuencias que contenían más de un nucleótido no determinado (N) u homopolimero. Las secuencias con menos de 50 pb fueron eliminadas. Las lecturas de alta calidad fueron alineadas usando el algoritmo Needleman-Wunch y la base de datos de referencia SILVA (Schloss et al., 2009). Para reducir redundancias en los datos, se llevó a cabo un paso de agrupamiento de secuencias con un 100% de similitud (Huse et al., 2010). Por otro lado, para la identificación y remoción de quimeras se usó el algoritmo Uchime (<http://drive5.com/uchime>) (Gomez-Alvarez, 2009). Después, las secuencias fueron clasificadas usando el método Wang (Wang et al., 1999) con la base de datos de referencia SILVA 16S.

Finalmente, se generó una matriz de distancias y asignación de filotipos usando un algoritmo descrito por (Schloss and Handelsman, 2006) con un nivel de definición de 0.03. Luego, se realizó la determinación de la diversidad alfa y fueron calculados estimadores Chao1, Ace, índice no paramétrico de diversidad Shannon y curvas de rarefacción, las cuales son construidas a partir de las frecuencias adquiridas en una base de datos basada en el análisis de asignación de la unidad taxonómica operativa (OTU, del inglés *Operational Taxonomic Unit*).

4.2.8 Análisis de datos

Para determinar si existían diferencias significativas en las concentraciones de explosivos para elegir el consorcio degradador, y luego en el monitoreo realizado en los cuatro meses evaluados y en los tiempos de muestreo durante la evaluación de la degradación de PETN en ausencia y presencia de TNT, se realizaron pruebas de ANOVA y análisis multifactoriales **(Anexo C)**.

Los programas estadísticos empleados fueron Statgraphic (Versión 10.0) y SPSS (Versión 22.0). Las gráficas del comportamiento de los explosivos fueron realizadas en Sigmaplot (Versión 12.0).

5. Resultados

5.1 Características macroscópicas y microscópicas de los consorcios degradadores evaluados: Estudio de morfotipos

Durante el monitoreo realizado de la siembra en placa de los cinco consorcios evaluados, se observaron diferentes morfologías macroscópicas en las colonias observadas. Luego de una semana de su siembra en el medio mínimo de nutrientes suplementado con pentolita, las colonias eran transparentes y al mes cambiaron su color a café rojizo (**Tablas 5-2 y 5-3**) y se encontraron bacterias Gram positivas y Gram negativas.

5.2 Selección de consorcio con la mejor capacidad degradadora de TNT y PETN

Fueron evaluados cinco consorcios degradadores descritos en la **Tabla 4-1** mediante cultivo de enriquecimiento. Los consorcios TP1, ES1, M2 y EC2 mostraron bajos porcentajes de degradación tanto de TNT (3, 14, 20 y 34%, respectivamente) como de PETN (12, 0, 6 y 25% respectivamente) mientras que el consorcio CPR2 presentó degradación de más del 50 % de TNT y PETN (**Tabla 5-1**). Los porcentajes de degradación solo muestran un dato puntual y no permiten observar el proceso de degradación en los tiempos de muestreo de forma detallada a diferencia de lo que se presenta en la **Figura 5-1**. En las gráficas de la izquierda de la **Figura 5-1** se presentan los resultados obtenidos para TNT, subproductos (DANT y amDNT) y control abiótico cada uno de los tiempos de muestreo (0, 1, 3, 7 y 14 días) para cada uno de los consorcios evaluados, mientras que las gráficas de la derecha presentan los resultados obtenidos para PETN y sus respectivos controles abióticos. Los resultados se describen a continuación.

Tabla 5-1. Porcentajes de degradación de TNT y PETN de los cinco consorcios evaluados

Consortio	% Degradación TNT	% Degradación de PETN
TP1	3	12
ES1	14	0
M2	20	6
EC2	34	25
CPR2	53	51

Tabla 5-2: Características macroscópicas de los microorganismos degradadores de TNT y PETN obtenidos para los consorcios ES1 y TP1.

MORFOTIPO	FUENTE	DIÁMETRO (mm)	ELEVACIÓN	BORDE	FORMA	TEXTURA	COLOR
	ES1	5	Convexa	Ondulado	Irregular	Cremosa	Rojo
	ES1	1	Plana	Entero	Puntual	Seca	Rojo
	ES1	4	Plana	Ondulado	Irregular	Seca	Rojo
	ES1	4	Plana	Entero	Irregular	Cremosa	Rojo
	TP1	4	Umbilicada	Entero	Puntual	Gota	Transp. Rojo
	TP1	4	Umbilicada	Entero	Puntual	Seca	Rojo
	TP1	2	Plana	Entero	Puntual	Gota	Beige

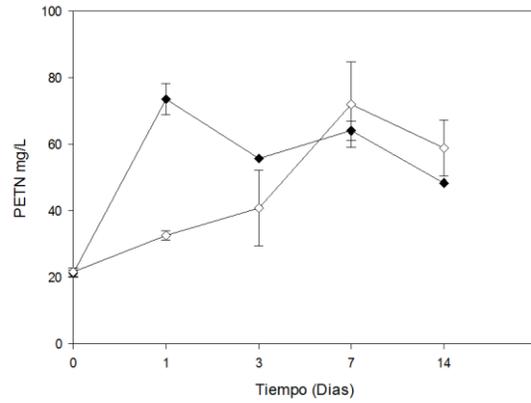
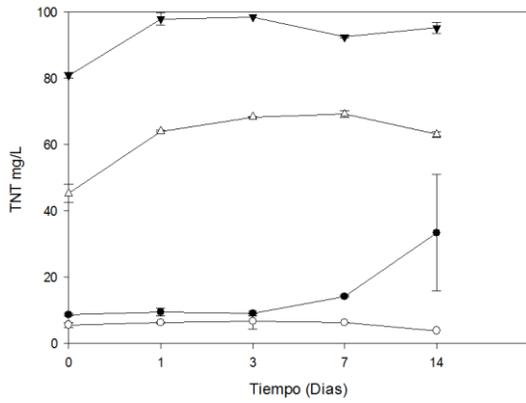
*ES: Exterior sin explosivo; TP: Tanque de pentolita; Transp.: Transparente.

Tabla 5-3: Características macroscópicas de los microorganismos degradadores de TNT y PETN obtenidos para los consorcios CPR2, EC2 y M2.

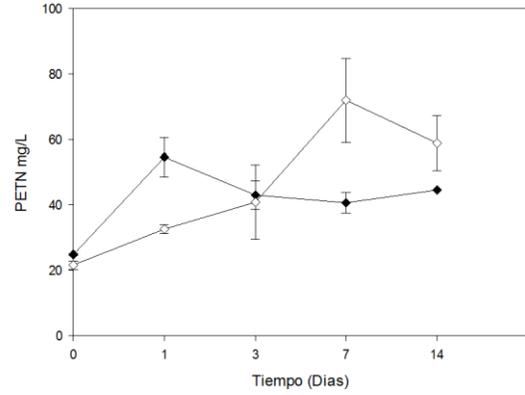
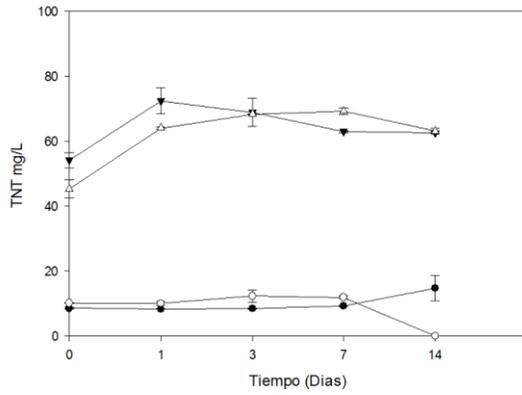
MORFOTIPO	FUENTE	DIAMETRO (mm)	ELEVACION	BORDE	FORMA	TEXTURA	COLOR
	CPR2	3	Convexa	Ondulado	Irregular	Seca	Rojo
	CPR2	2	Convexa	Entero	Puntual	Seca	Rojo
	CPR2	2	Plana	Entero	Puntual	Seca	Rojo
	CPR2	4	Plana	Entero	Irregular	Seca	Beige
	EC2	3	Plana	Entero	Puntual	Seca	Transp. Rojo
	EC2	4	Umbilicada	Entero	Puntual	Gota	Transp. Rojo
	M2	6	Plana	Ondulado	Irregular	Seca	Beige
	M2	4	Umbilicada	Entero	Puntual	Gota	Transp. Rojo

*CPR: Campo de prueba; EC: Exaja de captación; M: Multiplicadores; Transp.: Transparente.

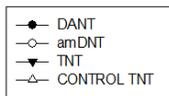
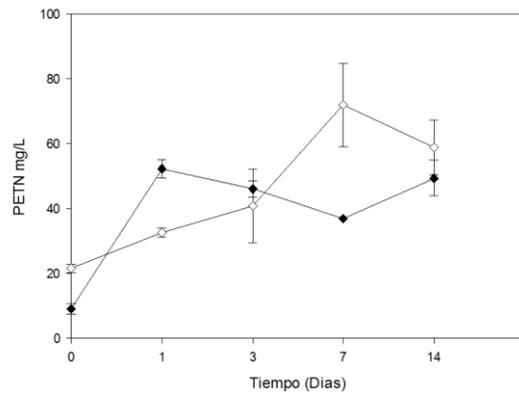
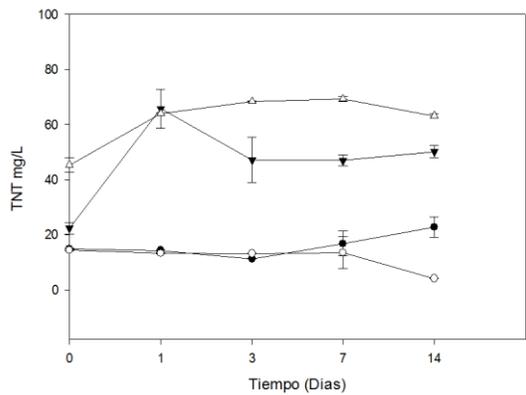
Consorcio TP1



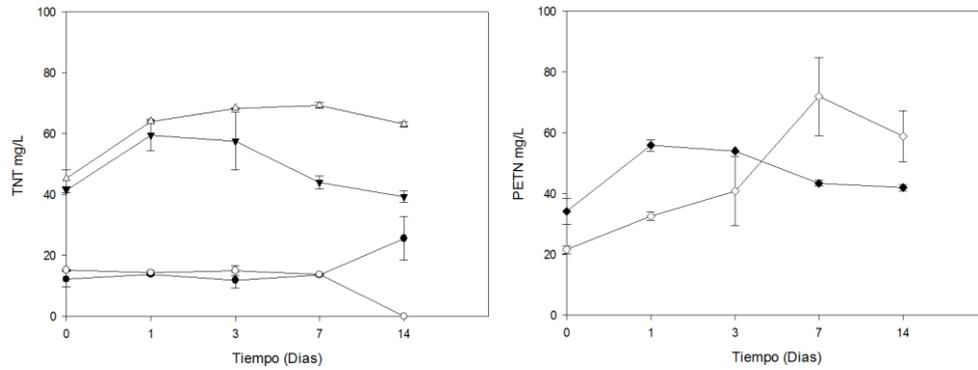
Consorcio ES1



Consorcio M2



Consortio EC2



Consortio CPR2

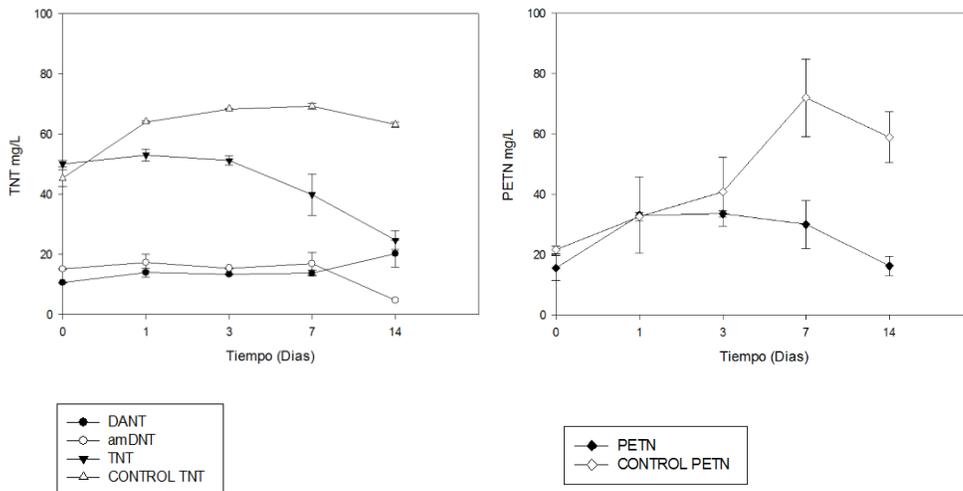


Figura 5-1: Comportamiento de los cinco consorcios TP1, ES1, M2, EC2, CPR2 en la degradación de TNT, PETN y formación de subproductos (DANT y amDNT) en cultivos de enriquecimiento.

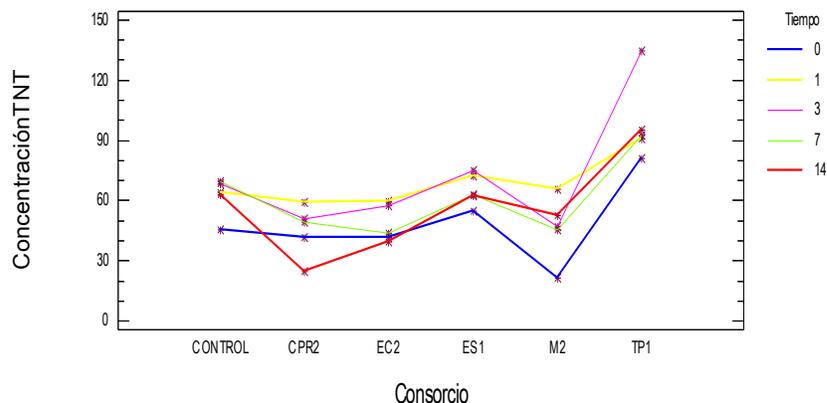


Figura 5-2. Interacción de los factores experimentales mes, tiempo y consorcio entre las medias de las concentraciones de TNT para los cinco consorcios evaluados y control abiótico.

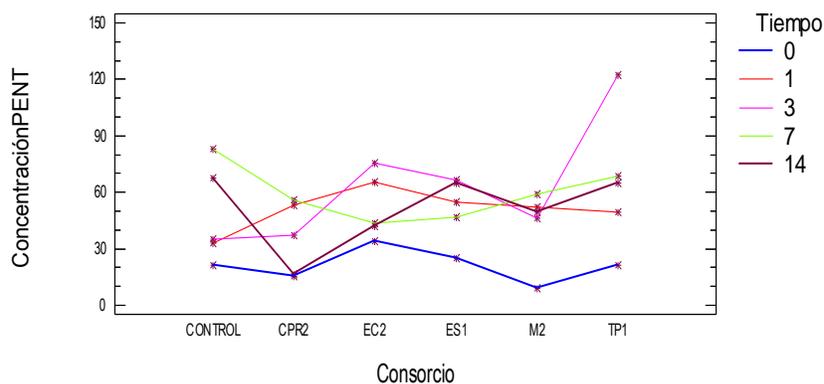


Figura 5-3. Interacción de los factores experimentales mes, tiempo y consorcio entre las medias de las concentraciones de PETN para los cinco consorcios evaluados y control abiótico.

El comportamiento de los consorcios TP1, M2, ES1 y EC2 presentaron en general bajo porcentaje de degradación tanto de TNT como de PETN en los 14 días de evaluación mientras que en el consorcio ES1 no se observó degradación de PETN. Por otro lado, para el día 1 se observó un incremento en las concentraciones de TNT y PETN en todos los consorcios y control abiótico debido a la solubilización de los explosivos. El control abiótico de TNT no presentó degradación, pero el de PETN presentó variabilidad debido a su difícil solubilidad.

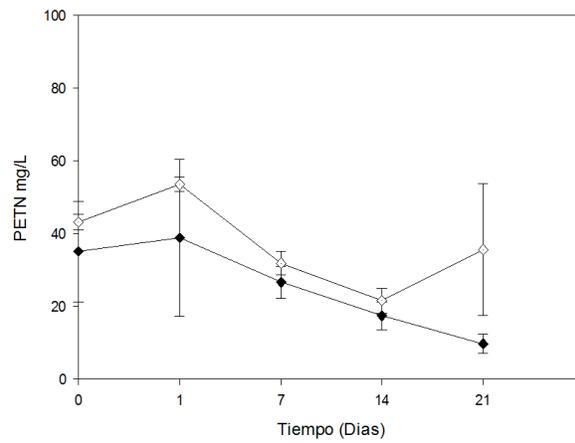
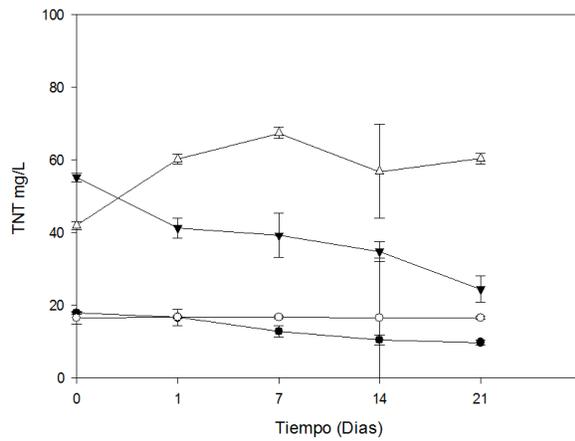
Además, se identificó que existe interacción significativa ($p < 0.05$) entre los factores experimentales consorcio-mes-tiempo tanto para la degradación de TNT como de PETN (**Figuras 5-2 y 5-3**).

El consorcio CPR2 fue el único de los cinco consorcios que presentó degradación de más del 50% de ambos explosivos y en el análisis de varianza ($p < 0.05$) realizado (**Anexo C**). Se encontró que fue el consorcio con menor concentración tanto de TNT como de PETN en el último tiempo de muestreo (día 14), (**Figuras 5-2 y 5-3**) por este motivo fue elegido para realizar los ensayos de degradación posteriores. Además, en todos los consorcios se observa que hasta el tiempo 7 se conserva la estabilidad en las concentraciones de los subproductos diamino y amDNT ($\leq 16\text{mg/L}$) y a partir de este tiempo ocurre un incremento en el tiempo 14 de diamino ($\leq 33\text{mg/L}$) y una disminución simultánea de amDNT ($\leq 4\text{mg/L}$).

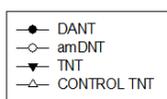
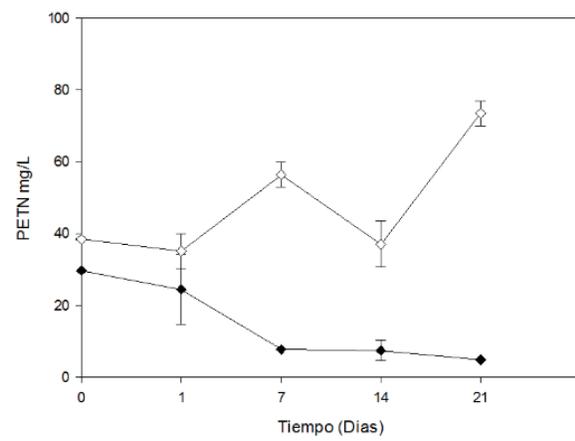
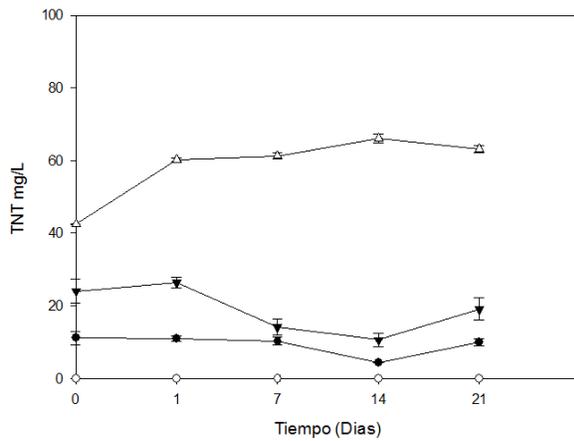
5.3 Evaluación de la capacidad degradadora de TNT y PETN por el consorcio seleccionado

Luego de conocer el comportamiento en la degradación de TNT y PETN por los cinco consorcios evaluados, fue elegido el consorcio CPR2 para continuar con los ensayos de degradación en presencia y ausencia de TNT con el objetivo de conocer si la capacidad de degradación se conservaba durante los ocho meses de monitoreo, cuatro con TNT y PETN y cuatro con PETN en ausencia de TNT. A partir de este consorcio, fueron realizados cuatro montajes (**Figura 5-4**), en presencia de ambos explosivos, cada 21 días en cinco eventos de muestreo (0, 1, 7, 14 y 21 días), para conocer su comportamiento en la degradación de ambos explosivos: TNT, PETN y formación de subproductos. Los resultados se presentan a continuación.

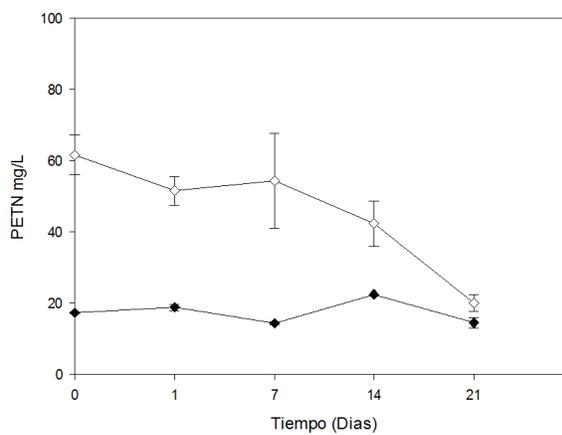
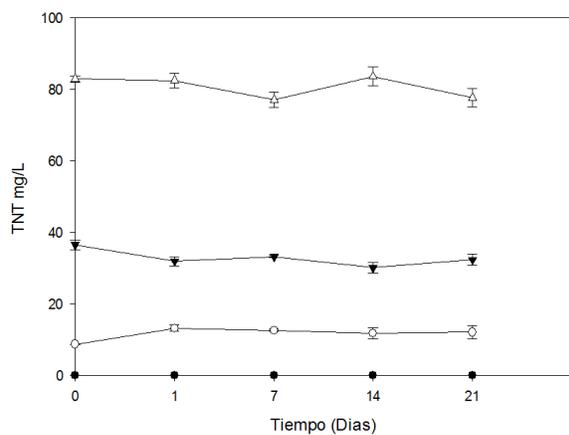
Mes 1



Mes 2



Mes 3



Mes 4

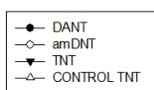
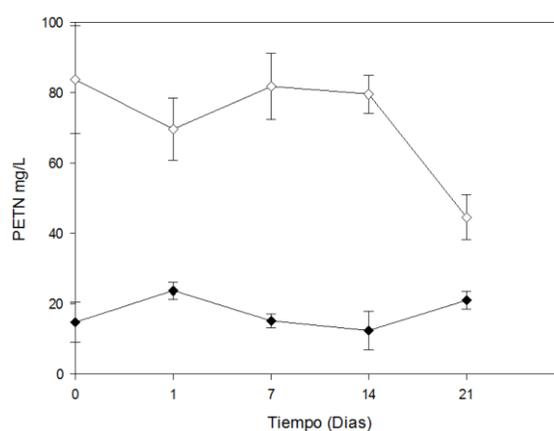
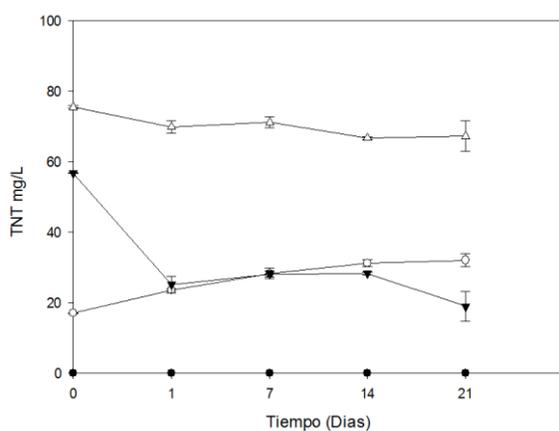


Figura 5-4: Comportamiento del consorcio CPR2 en la degradación de TNT (izquierda) y PETN (derecha) en cuatro meses de monitoreo en cultivos de enriquecimiento.

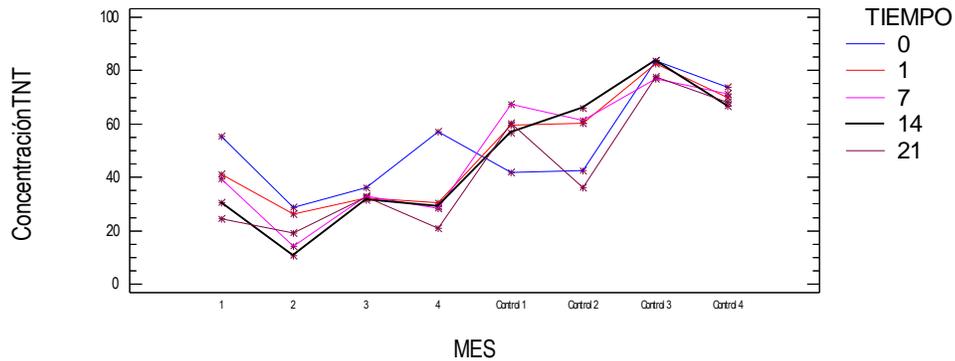


Figura 5-5. Interacción de los factores experimentales mes y tiempo entre las medias de las concentraciones de TNT en presencia de PETN en los 4 meses de monitoreo para el consorcio CPR2.

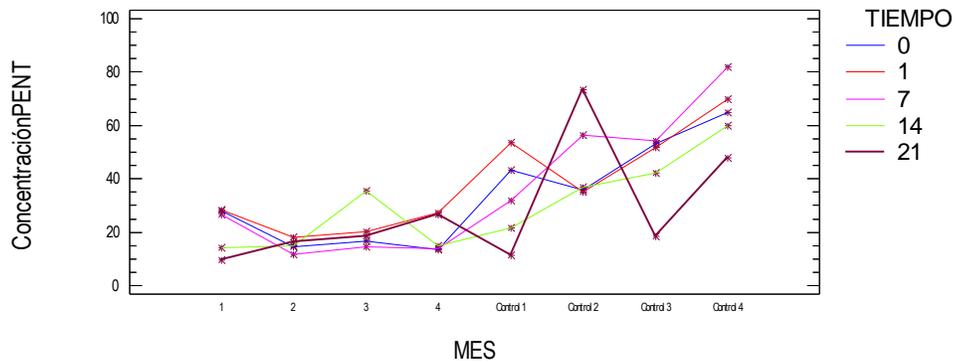


Figura 5-6. Interacción de los factores experimentales mes y tiempo entre las medias de las concentraciones de PETN en presencia de TNT en los 4 meses de monitoreo para el consorcio CPR2.

• Degradación de TNT y PETN

En términos generales se observa que la capacidad degradadora del consorcio disminuye con los meses en los cuatro meses de evaluación (**Figura 5-4**). En los dos primeros meses, el consorcio redujo el PETN en más del 50 % pero su capacidad degradadora disminuye gradualmente, de igual forma que el TNT en los meses posteriores de evaluación. De la misma manera, durante la biodegradación de los explosivos, se identificó que existe una interacción significativa entre los factores experimentales mes-tiempo sobre la concentración de TNT y PETN, dando como mejor resultado para TNT en el mes 2 día 14 y para PETN, mes 1 día 21

(Figuras 5-5 y 5-6). Por otro lado, El control abiótico presenta estabilidad en las concentraciones de TNT pero el PETN presenta dispersión en los datos de las concentraciones debido a la naturaleza química del compuesto.

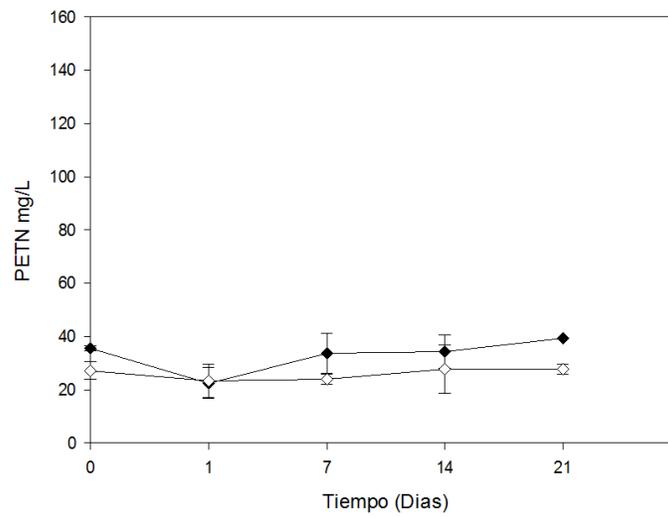
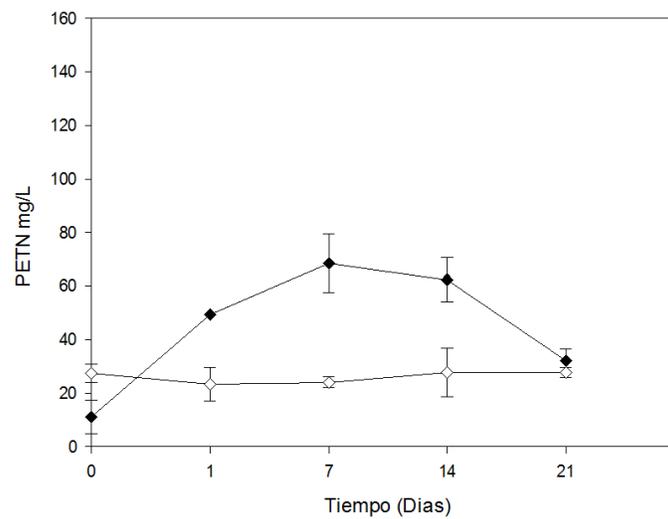
- **Formación de subproductos**

De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 5-4), de manera general se observa la formación de ambos subproductos DANT ($\leq 17\text{mg/L}$) y amDNT ($\leq 16\text{ mg/L}$) y en los dos meses siguientes no hay presencia de DANT. Mientras que el amDNT en el mes 4 aumentó ($\leq 32\text{ mg/L}$).

Es importante mencionar que durante la biodegradación de los explosivos se encontraron cambios de color en el medio del consorcio madre de transparente a café rojizo debido a la formación de subproductos de degradación como DANT y amDNT (Nyanhongo et al., 2009). Los controles abióticos no presentaron cambios de color (Figura 4-1).

5.4 Evaluación de la degradación de PETN en ausencia de TNT por el consorcio microbiano seleccionado

Después de los ensayos realizados en presencia de TNT y PETN, fue realizado otro ensayo donde se agregó únicamente PETN a las unidades experimentales (Figura 5-9) para conocer si el consorcio microbiano era capaz de tomar este sustrato como fuente de nitrógeno ya que en estudios previos realizados se había reportado que la presencia de TNT afectaba la degradación de PETN (Garcia Bonilla, 2011) (Figura 5-9).

Mes 1**Mes 2**

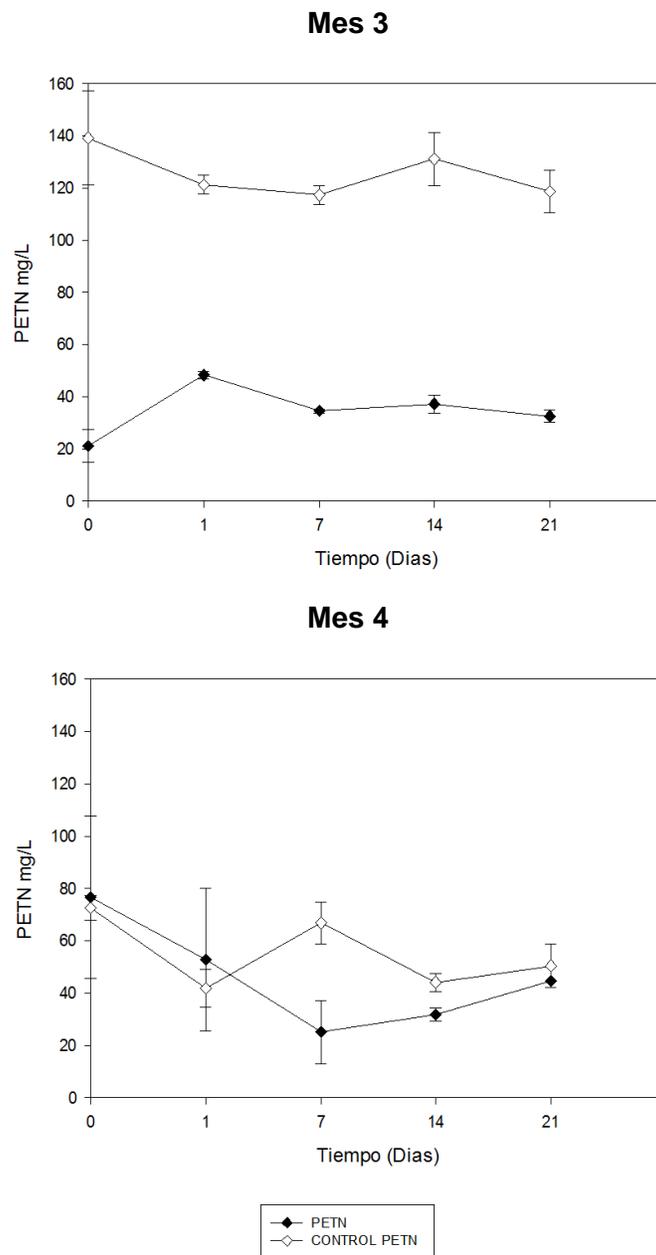


Figura 5-7: Comportamiento del consorcio CPR2 en la degradación de PETN en ausencia de TNT en cuatro meses de monitoreo.

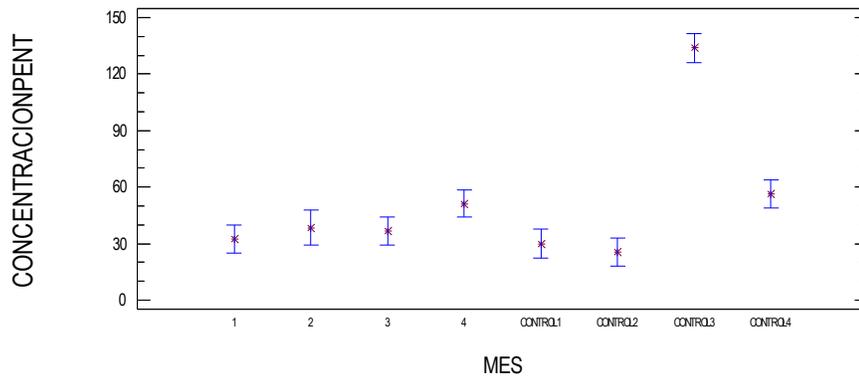


Figura 5-8. Interacción entre los factores experimentales mes y tiempo de las medias de las concentraciones de PETN en ausencia de TNT en los 4 meses de monitoreo para el consorcio CPR2.

En términos generales se observó que no hubo degradación de PETN y en comparación con el ensayo realizado en presencia de TNT de acuerdo a el análisis estadístico, mostró que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la presencia o ausencia de TNT. También, se encontró que no hay interacción entre los factores experimentales mes-tiempo (**Figura 5-10**). A su vez, se observó alta dispersión en los datos entre las réplicas de los tiempos de muestreo y los controles abióticos donde hubo aumento y disminución de la concentración de este explosivo durante los ensayos lo cual se vio reflejado en las barras de error debido a la baja solubilidad de este sustrato lo que hace que no fuera posible observar diferencias significativas entre la degradación por el consorcio y el control abiótico (Binks et al., 1996, Sanders et al., 2002).

5.5 Identificación molecular de los géneros microbianos que conforman el consorcio

Fueron identificados los géneros de las bacterias que conforman el consorcio CPR2 el cual fue seleccionado debido a que presentó el mayor porcentaje de degradación (> 50 %) al inicio del estudio (**Tabla 5-1**).

Las secuencias obtenidas corresponden al gen 16S rRNA, y presentaron porcentajes de identidad del 97 % cuando fueron comparados con las secuencias de microorganismos reportadas en la base de datos SILVA (Schloss et al., 2009).

En términos generales, se observó la presencia de bacterias Gram-negativas pertenecientes en su mayoría a los filum de alfa proteobacteria seguido por beta proteobacteria y gamma proteobacteria entre otros. En total, se encontraron 38 secuencias para el gen 16S rRNA de microorganismos presentes en el consorcio. En la **Tabla 5-4** se presenta la caracterización de los géneros de los microorganismos que conforman el consorcio CPR2.

Tabla 5-4. Caracterización de los microorganismos que conforman el consorcio CPR2 a partir de la secuenciación del gen 16S rRNA

Identificación	% de identidad	Filum	Clase	Orden	Familia	Genero
<i>Brevundimonas spp.</i>	97	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales	Caulobacteraceae	Brevundimonas
<i>Bradyrhizobium spp</i>	97	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium
<i>Bosea spp.</i>	97	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bosea
<i>Brucella spp</i>	97	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	Brucella
<i>Ochrobactum spp.</i>	97	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Brucellaceae	Ochrobactum
<i>Hyphomicrobium spp</i>	97	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium
<i>Parvibaculum spp.</i>	97	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhodobiaceae	Parvibaculum
<i>Ancylobacter spp</i>	97	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Ancylobacter
<i>Starkeya spp.</i>	97	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteriaceae	Starkeya
<i>Sphingopyxis spp</i>	97	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingopyxis
<i>Achromobacter spp.</i>	97	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Achromobacter
<i>Bordetella spp</i>	97	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Bordetella
<i>Kerstersia spp</i>	97	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Kerstersia
<i>Pigmentiphaga spp</i>	97	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Pigmentiphaga
<i>Bulkholderia spp</i>	97	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Bulkholderiaceae	Bulkholderia
<i>Ralstonia spp.</i>	97	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Bulkholderiaceae	Ralstonia
<i>Delftia spp</i>	97	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Delftia
<i>Variovorax spp</i>	97	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Variovorax
<i>Undibacterium spp</i>	97	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteriaceae	Undibacterium
<i>Aeromonas spp</i>	97	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas
<i>Azomonas spp</i>	97	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Azomonas
<i>Azorizophilus spp</i>	97	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Azorizophilus
<i>Azotobacter spp</i>	97	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Azotobacter
<i>Pseudomonas spp.</i>	97	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
<i>Serpens spp</i>	97	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Serpens
<i>Dokdonella spp</i>	97	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Dokdonella
<i>Pseudoxanthomonas sp</i>	97	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Pseudoxanthomonas
<i>Rhodanobacter spp</i>	97	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Rhodanobacter
<i>Stenotrophomonas spp</i>	97	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas
<i>Rhodococcus spp</i>	97	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardiaceae	Rhodococcus
<i>Propionibacterium spp</i>	97	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Propionibacteriaceae	Propionibacterium
<i>Bifidobacterium spp</i>	97	Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium
<i>Collinsella spp</i>	97	Actinobacteria	Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	Collinsella
<i>Pedobacter spp</i>	97	Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Pedobacter
<i>Chryseobacterium spp</i>	97	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium
<i>Elizabethkingia spp</i>	97	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Elizabethkingia
<i>Flavobacterium spp</i>	97	Bacteroidetes	Flavobacteria	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium
<i>Streptococcus spp</i>	97	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus

6. Discusión de resultados

6.1 Características macroscópicas y microscópicas de los cinco consorcios degradadores evaluados

A partir de la siembra de los cinco consorcios en medio mínimo de nutrientes suplementado con pentolita, se observó que inicialmente las colonias eran transparentes y al mes de su siembra cambiaban su color a café rojizo debido a la generación de subproductos de degradación del explosivo. (Tope and Jamil, 2000, Nyanhongo et al., 2009) observaron resultados similares en sus ensayos y la formación de este color se le atribuyó a la presencia de ADNT (aminodinitrotolueno) el cual fue encontrado durante todo el tiempo del presente estudio. Estas mismas características fueron observadas en estudios previos en el grupo de investigación (García Bonilla, 2011, García Galindo, 2014, Roldán et al., 2013). Estos autores reportaron el cambio de color del medio de cultivo a café rojizo debido a la presencia de subproductos de degradación de TNT.

Además, se encontraron en su mayoría bacterias Gram-negativas y en baja proporción bacterias Gram-positivas, lo que concuerda con lo reportado por los autores (Fuller and Manning, 1997, Alvarez et al., 1995, Stenuit and Agathos, 2010). Las bacterias Gram-negativas poseen varios mecanismos para tolerar las concentraciones de TNT. Uno de ellos es la estructura y composición de la pared celular y la presencia de una membrana externa que hace a la célula menos permeable al ingreso del explosivo. También, poseen sistemas de transporte activo y mecanismos de resistencia a antibióticos como las bombas de eflujo que les sirven para llevar hacia el exterior de la célula el TNT y también se ha encontrado que poseen la capacidad de sintetizar enzimas que ayudan detoxificar el TNT (Stenuit and Agathos, 2010). Por otro lado, las bacterias Gram-positivas aerobias son más sensibles a altas concentraciones de TNT y se ven inhibidas por su toxicidad debido a que el péptidoglicano presente en la pared celular es más permeable al ingreso del explosivo ocasionando que ocurra un inadecuado funcionamiento celular al interferir en el ensamblaje apropiado de la pared celular (Fuller and Manning Jr, 2004).

6.2 Evaluación de la metodología empleada para la evaluación de TNT y PETN

En estudios previos realizados en el grupo de investigación en donde se empleó el método de extracción líquido-líquido (García Bonilla, 2011, Roldán et al., 2013, García Galindo, 2014), se observaron al igual que en este estudio, variabilidad y altas desviaciones estándar en las concentraciones de PETN lo que ocasiona disminución en la precisión y exactitud en la cuantificación de las concentraciones de este explosivo. En las **Figuras 5-1, 5-4 y 5-5**, se puede ver como ocurre la variación entre los meses de evaluación en las concentraciones de PETN tanto de los ensayos como en los controles abióticos.

En la realización de la metodología, antes de hacer el montaje de los ensayos, los explosivos son agregados disueltos en un solvente volátil, el cual se evapora y debido al carácter apolar de los explosivos estos quedan adheridos a la pared del vidrio de la unidad experimental, y de esta manera se puede perder parte de la concentración agregada. Además, cuando se realiza el procedimiento de separación de los explosivos de las bacterias del consorcio (**Figura 4-4**), se vuelve a agregar un volumen de acetonitrilo lo que hace que se disuelvan nuevamente los explosivos y al homogenizar en vortex se recuperan las cantidades que no fueron degradadas y esto genera las diferencias en las concentraciones entre las réplicas de los ensayos. Lo discutido anteriormente puede explicar las razones por las cuales se obtuvieron diferencias en los ensayos de degradación de PETN.

6.3 Evaluación de la capacidad degradadora de TNT

Durante la evaluación de la degradación de TNT, se encontró que en los meses iniciales, el TNT era degradado debido a la disminución de su concentración y por la presencia de subproductos como amDNT y DANT y además no se pudo identificar una tendencia en la degradación de los explosivos debido a la variabilidad en los resultados, lo cual se ha observado en estudios anteriores con consorcios en condiciones aerobias (García Bonilla, 2011). Según los resultados reportados por (Williams et al., 2004), el TNT puede ser transformado en condiciones aerobias a través de dos vías metabólicas principales: 1) una involucra el ataque directo al anillo aromático con la formación de complejos de Meisenheimer o bien, 2) mediante la reducción de los sustituyentes nitro con la formación de HADNT, amDNT, DNT, y compuestos azoxy (**Figura 1-2**). Teniendo en cuenta la tendencia observada en la

evaluación de la degradación por los consorcios microbianos, en este caso, debido a formación de subproductos como DANT y amDNT, los resultados sugieren que la ruta metabólica llevada a cabo por los microorganismos involucró la reducción de los sustituyentes nitro por la acción de enzimas nitroreductasas (Esteve-Núñez et al., 2001, Nyanhongo et al., 2009) que actúan reduciendo inicialmente un grupo nitro con la formación de HANT (hidroxilaminonitrotolueno) el cual según (Vorbeck et al., 1994) es un intermediario clave que hace disponible el nitrógeno proveniente de los grupos nitro del TNT para el crecimiento. El HANT es reducido a ADNT el cual requiere de condiciones aerobias para su formación (Alvarez et al., 1995). Luego, otro grupo nitro del anillo aromático es reducido con la formación de DANT. La formación de estos subproductos ocasiona cambio de color en el medio a café rojizo (Nyanhongo et al., 2009) lo cual fue observado durante todo el tiempo de estudio (**Figura 4-1, Tabla 5-2 y 5-3**).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, en las reacciones de transformación aerobia de TNT, se pueden generar compuestos azoxy los cuales son producidos a través de reacciones de condensación del amDNT. Estos compuestos son considerados como metabolitos *dead end* o suicidas debido a que son más tóxicos que el TNT. Estos pudieron ocasionar la disminución en la degradación tanto de TNT como de PETN sugiriendo que pudo haber una pérdida de poblaciones de microorganismos claves encargados de realizar la reducción inicial de grupos nitro del anillo aromático. Estos resultados coinciden con el estudio de (García Bonilla, 2011) donde afirma que las condiciones aerobias del enriquecimiento selectivo no fueron adecuadas y la frecuencia de pases afectaron la estabilidad de los consorcios y por ende su capacidad degradadora. En contraste a los resultados del estudio de (García Galindo, 2014) donde se demostró que la técnica de enriquecimiento selectivo en condiciones anaerobias favorecen la degradación de TNT y PETN y hace que el proceso de degradación sea más eficiente que al ser realizado en condiciones aerobias. También, en este estudio se demostró que la frecuencia de los pases permitió obtener cultivos que degradaban TNT y PETN en el tiempo y se obtuvieron cepas y consorcios degradadores.

6.4 Evaluación de la capacidad degradadora de PETN en presencia y ausencia de TNT

En términos generales, para el caso de este estudio, al evaluar la degradación en conjunto de TNT y PETN (pentolita), se encontró que las condiciones aerobias no favorecieron la

degradación de PETN y además, no se observó una diferencia significativa en la degradación de PETN tanto en ausencia como en presencia de TNT (**Figura 5-6 y Figura 5-8**). A pesar de que se observó disminución en la concentración de PETN en los dos primeros meses del monitoreo realizado, cuando se encontraban tanto TNT como PETN presentes en el medio, los resultados demostraron que el PETN fue degradado en mayor tasa que el TNT (**Figura 5-4**). No obstante, en el tercer mes empieza a disminuir la degradación de PETN (**Figura 5-4**) lo cual se le puede atribuir a la acumulación de subproductos tóxicos como azoxy o DANT generados a partir de la degradación aerobia de TNT que pudieron disminuir las poblaciones de microorganismos claves encargadas de producir las enzimas involucradas en la degradación de PETN. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos de (García Bonilla, 2011) donde se encontró que en condiciones aerobias la presencia de TNT inhibió la degradación de PETN por cultivos de enriquecimiento. También, (Roldan et al., 2013) reportan que al realizar evaluación de la degradación solo con TNT, PETN o en la mezcla de ambos compuestos, se encontró que hubo degradación de PETN únicamente cuando el TNT no estaba presente. Esto coincide con lo que afirma (Sagi-Ben Moshe et al., 2009) donde la presencia de TNT afectó la biodegradación de los explosivos RDX y HMX debido a efectos tóxicos a partir de los subproductos formados de la degradación de TNT y también por inhibición de la actividad enzimática. Adicionalmente, en el estudio de (García Galindo, 2014) donde se realizó la comparación de la degradación de TNT y PETN en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, la autora reporta que los ensayos en condiciones de anaerobiosis favorecen la degradación en conjunto de estos dos explosivos ya que en ausencia de oxígeno no se forman los subproductos *dead end* y también porque bajo estas condiciones reductoras, se favorece la degradación de PETN por el bajo potencial redox (Zhuang, 2007).

Finalmente, en el ensayo realizado en ausencia de TNT (**Figura 5-7**), que fue ejecutado con el propósito de conocer si el consorcio tenía la capacidad de degradar PETN, teniendo en cuenta que se ha reportado que subproductos de degradación de TNT como los compuestos azoxy, por su toxicidad pueden afectar la degradación de otros compuestos presentes. De esta manera, lo esperado en este ensayo era obtener disminución en la concentración de PETN y que según lo reportado por (Roldan et al., 2013) al realizar ensayos únicamente en la presencia de este compuesto, los resultados demostraron que hubo degradación de PETN. Sin embargo, en el presente estudio a pesar de que se realizó un pre-inoculo con el propósito de acondicionar las poblaciones microbianas degradadoras a este compuesto, según lo que

sugieren los resultados de este estudio, los microorganismos presentes en el consorcio demostraron que no poseen la capacidad de degradar PETN.

6.5 Identificación molecular de los géneros microbianos que conforman el consorcio

El método de secuenciación de segunda generación como el implementado en este trabajo, permitió conocer a mayor profundidad el perfil molecular de la población de microorganismos. Este método generalmente es mejor que llevar a cabo métodos de *fingerprinting* como DGGE (electroforesis en gel con gradiente denaturante) ya que este último método solo permite conocer las poblaciones predominantes en una comunidad microbiana. Esto pudo ser visto en el estudio de (García Bonilla, 2011) donde se logró identificar 10 especies de bacterias, a diferencia del presente estudio donde se identificaron 38 especies bacterianas. Hallazgos similares fueron encontrados en el estudio de (Gloor et al., 2010) donde se identificaron 59 microorganismos a través de la secuenciación por *Illumina* mientras que la secuenciación de bandas de DGGE solo detectaron 8 microorganismos.

A partir de la identificación molecular, se encontró que el consorcio CPR2 está conformado en su mayoría por representantes de los filum alfa proteobacteria seguido por beta proteobacteria y gamma proteobacteria (**Tabla 5-4**). También se observó que se encuentra constituido principalmente por bacterias Gram-negativas aerobias lo cual ha sido ampliamente reportado por varios autores (Binks et al., 1996, White et al., 1996, Stenuit and Agathos, 2010, Alvarez et al., 1995, Nyanhongo et al., 2009). Las bacterias Gram negativas poseen mayor tolerancia a las concentraciones de TNT la cual es atribuida esencialmente a la presencia de una membrana externa donde a través de sistemas de transporte activo le ayuda a llevar hacia el exterior de la célula el TNT. Por otro lado, debido a que la pared celular de las bacterias Gram-positivas es más permeable, hace que estas sean más sensibles a las altas concentraciones de TNT resultando en su inhibición por su toxicidad (Fuller and Manning Jr, 2004). Sin embargo, en otros estudios se ha encontrado que la formación de estructuras de resistencia como endosporas, en bacterias Gram-positivas, les ayuda a tolerar las altas concentraciones de explosivo (Ghazali et al., 2004b). Incluso se encontró que una cepa de *Bacillus* sp. mostro mayor eficiencia en la remoción de TNT comparado con la degradación de *Pseudomonas* sp. (Ghazali et al., 2004b, Nyanhongo et al., 2009). En otras bacterias Gram-positivas como *Rhodococcus* sp., se ha encontrado que la conformación de su envoltura celular

de naturaleza hidrófoba al estar constituida por lípidos ramificados, ácidos micólicos y peptidoglicano unido a polisacáridos, le confiere impermeabilidad y resistencia al TNT (Sutcliffe et al., 2010).

En estudios previos realizados en el grupo de investigación USBA de la Pontificia Universidad Javeriana, donde se evaluó la degradación de TNT y PETN en condiciones aerobias y anaerobias, se encontraron en común géneros como *Ochrobactum* sp., *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Bosea* sp., *Variovorax* sp., *Rhodococcus* sp. (García Bonilla, 2011, Roldán et al., 2013, García Galindo, 2014).

Dentro de los géneros identificados se encontró *Pseudomonas* sp. el cual ha sido ampliamente reportado en investigaciones de biorremediación de suelos contaminados donde se ha demostrado su eficacia en la remoción de PETN (Ye et al., 2004) y TNT (Ghazali et al., 2004b) en condiciones de aerobiosis y se ha demostrado que el TNT es usado como fuente de nitrógeno (Alvarez et al., 1995, Esteve-Núñez et al., 2001, Mikesková et al., 2012, Patel et al., 2012a). También, en el estudio de (Popescu et al., 2004) se encontraron microorganismos como *Rhodococcus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp en un consorcio degradador de TNT. Los autores corroboraron la hipótesis de que los cultivos mixtos poseen diversas capacidades metabólicas que colaboran en la degradación de este compuesto contaminante.

En el estudio de (Snellinx et al., 2003) se aislaron dos consorcios de suelos y aguas contaminadas con explosivos y según los resultados obtenidos, *Variovorax paradoxus*, *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp. y *Pseudomonas viridiflava*, mostraron ser indispensables para la degradación de 2,4-DNT un precursor del TNT.

En otros estudios se han encontrado reportados gran parte de los microorganismos identificados en el presente estudio como degradadores de otros compuestos químicos aromáticos. Teniendo en cuenta que enzimas de tipo oxigenasas, dioxigenasas y nitroreductasas al pertenecer a la familia de las "Old Yellow Enzymes", por su amplia especificidad de sustrato, son capaces de degradar otros compuestos xenobióticos de estructura química similar al TNT como hidrocarburos, naftaleno, fenantreno, ácido pícrico entre otros (Roldán et al., 2008, Stenuit and Agathos, 2010).

Es así como en estudios realizados por (Stenuit and Agathos, 2010) se encontró que *Rhodococcus* sp. puede utilizar diferentes compuestos aromáticos como el ácido pícrico, naftaleno, tolueno como fuente de carbono, nitrógeno y energía por la formación de enzimas

dioxigenasas (Treadway et al., 1999). De manera similar en el estudio de (Widada et al., 2002) se aislaron microorganismos de un ambiente contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos y se encontró que géneros como *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp, y *Sphingomonas* sp. utilizaban diferentes vías para degradar naftaleno y fenantreno y a su vez, se encontró la presencia de genes que codifican para la formación de enzimas oxigenasas.

En otros estudios realizados por (Young et al., 2007, Bacosa et al., 2010), donde se aisló un consorcio a partir de un suelo contaminado con queroseno, se encontró la presencia de géneros como *Achromobacter* sp., *Rhodanobacter* sp., *Ralstonia* sp., *Pseudoxanthomonas* sp. entre otros. Según los resultados de esta investigación, se determinó que estos microorganismos tenían la capacidad de degradar completamente y de manera preferencial las fracciones aromáticas que son las más tóxicas mientras que las fracciones alifáticas fueron degradadas de manera parcial. Así mismo se encontró a *Stenotrophomonas* sp. y *Pseudomonas alcaligenes* haciendo parte de un consorcio aislado de una planta de tratamiento de hidrocarburos donde se demostró su habilidad de degradar hidrocarburos aromáticos y alifáticos (Gallego et al., 2007).

7. Conclusiones y Recomendaciones

7.1 Conclusiones

El enriquecimiento selectivo realizado bajo condiciones aerobias, sumado a los pases mes a mes a medio fresco, no permitieron conservar la capacidad degradadora por parte del consorcio microbiano probablemente debido a que se llegaron a perder algunas de las poblaciones de microorganismos claves encargadas de la reducción inicial de los explosivos.

La estructura, complementariedad y sinergia que existe entre los constituyentes de un consorcio microbiano son factores de gran importancia debido a su amplia gama de capacidades metabólicas y enzimáticas y que resultan ser más efectivos en la degradación de compuestos contaminantes como el TNT y PETN en comparación a las cepas individuales debido a que cada miembro cumple un rol que se puede ver afectado en la ausencia de alguno de sus integrantes.

La adición de una fuente de carbono alternativa al medio de cultivo es indispensable debido a que la degradación de TNT en sistemas aerobios requiere de la presencia de un sustrato primario que le sirva como fuente de carbono y energía para la formación de enzimas reductoras y además porque los microorganismos no poseen la capacidad de usar el TNT como fuente de carbono.

Debido a la naturaleza química del PETN, al ser de difícil solubilidad, se encontró variabilidad en las concentraciones de los ensayos y controles abióticos, y a su vez, limitó la degradación por parte de los microorganismos.

Según lo que sugieren los resultados de este estudio, los microorganismos presentes en el consorcio demostraron que no poseen la capacidad de degradar PETN.

El método de secuenciación de segunda generación como el implementado en este trabajo, permitió conocer a mayor profundidad el perfil molecular de la población de microorganismos ya que en este estudio se lograron identificar 38 especies.

7.2 Recomendaciones

Realizar caracterización de las comunidades microbianas antes de realizar el enriquecimiento selectivo, en la mitad del estudio y al final con el fin de conocer si estas poblaciones se conservan a lo largo del tiempo de estudio a través del uso de tecnologías de secuenciación de segunda generación como la utilizada en este trabajo.

Determinar otros subproductos de degradación de TNT como hidroxilaminodinitrotoluenos y compuestos azoxy para elucidar con mayor detalle la posible ruta metabólica que llevan a cabo los microorganismos para el proceso de degradación.

Realizar ensayos en condiciones anaerobias para evaluar el desempeño en la degradación de TNT y PETN por los consorcios, para saber si bajo condiciones reductoras y de diferentes aceptores de electrones, los microorganismos son capaces de degradar los explosivos.

Hacer identificación de las cepas aisladas de los consorcios y comparar su identidad con las identificadas por los métodos moleculares.

A.Anexo: Preparación del medio T2

Solución	Composición	Cantidad
Solución Carbono Llevado a 100 ml con agua destilada	Glucosa	2,5 g
	Citrato	2,5 g
	Acetato	2,5 g
	Glicerol	2 ml
Buffer Llevado a 250 ml con agua destilada	K ₂ HP ₄	7,5 g
	KH ₂ PO ₄	7,5 g
Solución Sales Llevado a 250 ml con agua destilada	HCl 1M	3 ml
	NaCl 0.5 nM	12,5 g
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O 0.81 mM	5 g
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O 0.2 mM	1 g
Solución Hierro Llevado a 100 ml con agua destilada	HCl 1M	3 ml
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	10 mM
Solución Elementos traza Llevado a 1000 ml con agua destilada	HCl 18-19%	20 ml
	MgSO ₄ · H ₂ O	0,2 g
	H ₃ BO ₃	0,1 g
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0.1 g
	CaSO ₄ · 5 H ₂ O	0.05 g
	CaCl ₂ · H ₂ O	0.05 g
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.01 g
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.01 g
NiSO ₄ · 6 H ₂ O	0.01 g	

Para preparar 1000 ml de medio de cultivo antes de esterilizar por autoclave, se requieren:

Solución	Cantidad
Solución Carbono	10 ml
Solución Buffer	10 ml
Solución Sales	10 ml
Agar (para preparar medio solido)	15g/L

El pH es ajustado a $7,2 \pm 0,2$ antes de esterilizar por autoclave. Después de esterilizar se adiciona:

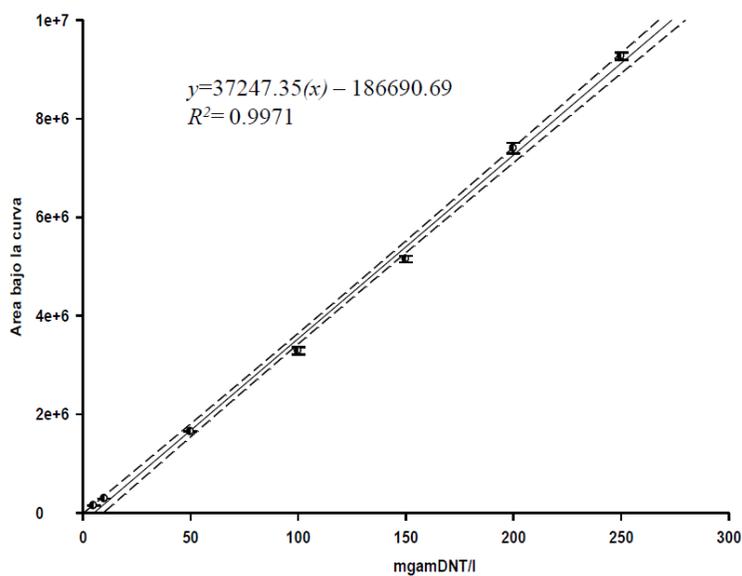
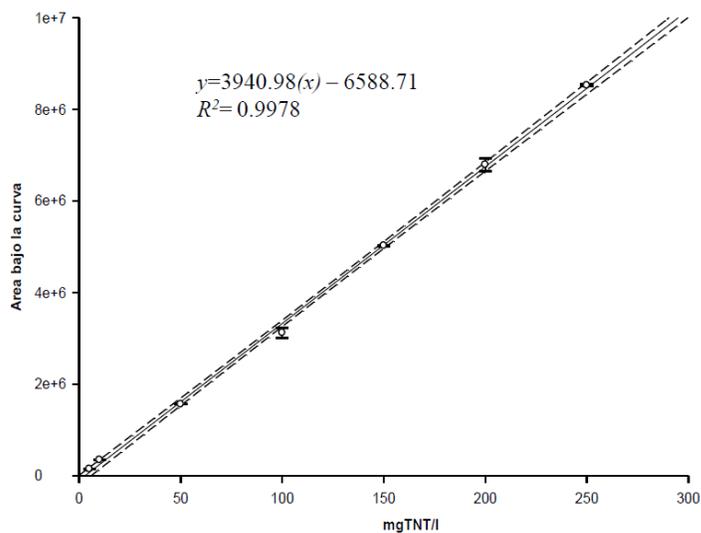
Solución	Cantidad
Solución Hierro	1 ml
Solución Elementos Traza	1 ml

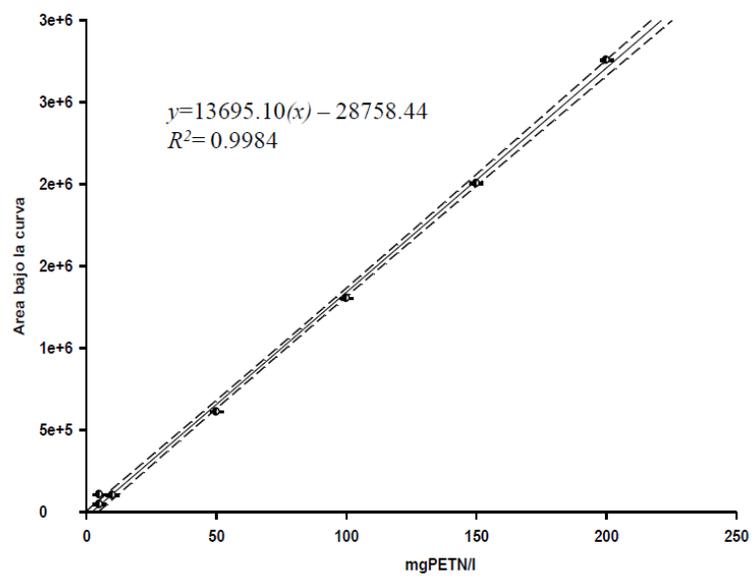
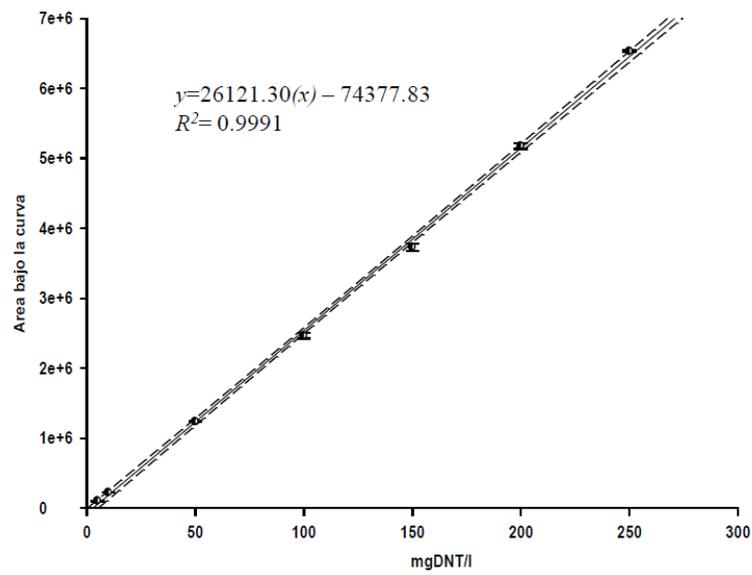
Preparación de solución stock de los explosivos

Para preparar una solución stock de 20000 mg/L de pentolita (TNT y PETN) se disuelven 2 g de cada uno de los explosivos en 100 ml de acetonitrilo.

B. Anexo: Curvas de Calibración

Curvas de calibración obtenidas a partir de los estándares de referencia. Se muestra promedio ($n=3$) ± 1 ds y el intervalo de confianza (95%).





C. Anexo: Análisis Estadísticos

MODELO DE DISEÑO EXPERIMENTAL:

$$[E]_i = \mu + T_s + (C)_j + (CT)_{js} + \varepsilon_{jksr}$$

i=1,2, (Explosivos)

j=1,2, (Consortio)

s=1,2,3,4,5. (Tiempos)

r=1,2,3. (Repeticiones)

RESULTADOS

1. Comparación de los cinco consorcios para TNT

ANALISIS DE VARIANZA:

Analysis of Variance for Concentración TNT - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Consortio	28292,3	5	5658,46	54,82	0,0000
B:Tiempo	6463,67	4	1615,92	15,65	0,0000
INTERACTIONS					
AB	6007,12	20	300,356	2,91	0,0010
RESIDUAL	5574,31	54	103,228		
TOTAL (CORRECTED)	46931,5	83			

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

Conclusión: existe interacción entre niveles de los factores experimentales, dando como mejor resultado el CPR2 en el día 14.

1. Comparación de los cinco consorcios para PENT

ANALISIS DE VARIANZA:

Analysis of Variance for Concentración PENT - Type III Sums of Squares

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

MAIN EFFECTS					
A:Consortio	6711,28	5	1342,26	2,44	0,0455
B:Tiempo	17911,4	4	4477,85	8,16	0,0000
INTERACTIONS					
AB	19560,0	20	978,002	1,78	0,0478
RESIDUAL	29649,4	54	549,062		

TOTAL (CORRECTED)	75140,6	83			

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

Conclusión: existe interacción entre niveles de los factores experimentales, dando como mejor resultado el CPR2 en el día 14.

2. Comparación de las concentraciones de TNT y PETN, para el consorcio CPR2 cuando están presentes los dos explosivos.

2.1. Comparación de las concentraciones de TNT en presencia de PETN

MODELO DE DISEÑO EXPERIMENTAL:

$$[E]_i = \mu + M_s + (T)_j + (MT)_{js} + \varepsilon_{jksr}$$

i=1,2, (Explosivos)

j=1,2,3,4,5 (Tiempo)

s=1,2,3,4, (Mes)

r=1,2,3. (Repeticiones)

ANÁLISIS DE VARIANZA

Analysis of Variance for Concentración TNT - Type III Sums of Squares

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

MAIN EFFECTS					
A:MES	45766,3	7	6538,04	466,49	0,0000
B:TIEMPO	1415,19	4	353,798	25,24	0,0000
INTERACTIONS					
AB	6673,16	28	238,327	17,00	0,0000
RESIDUAL	1135,24	81	14,0153		

TOTAL (CORRECTED)	55151,0	120			

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

Conclusión: existe interacción entre niveles de los factores experimentales mes-tiempo, dando como mejor resultado el mes 2 en el día 14 de la concentración de TNT en presencia de PETN.

2.2. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE PETN, EN PRESENCIA DE TNT

ANÁLISIS DE VARIANZA

Analysis of Variance for Concentración PENT - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:MES	32175,3	7	4596,47	34,85	0,0000
B:TIEMPO	1793,1	4	448,276	3,40	0,0127
INTERACTIONS					
AB	12137,7	28	433,489	3,29	0,0000
RESIDUAL	10683,0	81	131,888		
TOTAL (CORRECTED)	56746,7	120			

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

Conclusión: existe interacción entre niveles de los factores experimentales mes-tiempo, dando como mejor resultado el mes 1 día 21 de la concentración de PETN en presencia de TNT

3. Comparación de las concentraciones de PETN, para el consorcio CPR2 sin la presencia de TNT.

MODELO DE DISEÑO EXPERIMENTAL:

$$[E]_i = \mu + M_s + (T)_j + (MT)_{js} + \varepsilon_{jksr}$$

i=1, (Explosivo)

j=1,2,3,4,5 (Tiempo)

s=1,2,3,4, (Mes)

r=1,2,3. (Repeticiones)

ANÁLISIS DE VARIANZA

Analysis of Variance for CONCENTRACIONPENT - Type III Sums of Squares

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

MAIN EFFECTS					
A:MES	13944,1	4	3486,03	2,50	0,0473
B:TIEMPO	1048,41	4	262,104	0,19	0,9441
RESIDUAL	135127,0	97	1393,06		

TOTAL (CORRECTED)	149868,0	105			

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

Conclusión: no existe interacción entre los factores experimentales mes-tiempo.

Bibliografía

- Agrawan, J. 2007. *Organic Chemistry of Explosives*, England, Jhon Wiley & Sons Limited.
- Alexander, M. 1999. *Biodegradation and Bioremediation*, San Diego, California.
- Alvarez, M., Kitts, C., Botsford, J. & Unfeker, P. 1995. Pseudomonas aeruginosa strain MA01 aerobically metabolizes the aminodinitrotoluenes produced by 2,4,6 trinitrotoluene nitro group reduction. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 984-991.
- Bacosa, H., Suto, K. & Inoue, C. 2010. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64, 702-710.
- Beynon, E., Symons, Z., Jackson, R., Lorenz, A., Rylott, E. & Bruce, N. 2009. The role of Oxophytodienoate Reductases in the Detoxification of the Explosive 2,4,6-Trinitrotoluene by Arabidopsis. *Plant Physiology*, 151, 253-261.
- Binks, P. R., French, C. E., Nicklin, S. & Bruce, N. C. 1996. Degradation of pentaerythritol tetranitrate by Enterobacter cloacae PB2. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1214-1219.
- Boopathy, R. 2014. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) under sulfate and nitrate reducing conditions. *Biologia*, 10, 1264-1270.
- Brenner, K., You, L. & Arnold, F. H. 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology*, 26, 483-489.
- Chatterjee, S., Chattopadhyay, P., Roy, S. & Sen, S. 2008. Bioremediation: a tool for cleaning polluted environments. *Journal of Applied Biosciences*, 11, 594 - 601.
- Chirside, A. E. M., Ritter, W. F. & Radosevich, M. 2007. Isolation of a selected microbial consortium from a pesticide-contaminated mix-load site soil capable of degrading the herbicides atrazine and alachlor. *Soil Biology and Biochemistry*, 39, 3056-3065.
- Claesson, M., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J., Ross, R. & Toole, P. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acid Research*, 1-13.
- Costa, V., Boopathy, R. & Manning, J. 1996. Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that removed TNT (2,4,6-trinitrotoluene) under sulfate- and nitrate-reducing conditions. *Bioresource Technology*, 56, 273-278.
- Crawford, R. L. 1995. The microbiology and treatment of nitroaromatic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 329-336.

- Declercq, I., Cappuyns, V. & Duclos, Y. 2012. Monitored natural attenuation (MNA) of contaminated soils: State of the art in Europe - A critical evaluation. *Science of the Total Environment*, 426, 393-405.
- Di Bella, J., Bao, Y., Gloor, G., Burton, J. & Reid, G. 2013. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of Microbiology Methods*, 1-15.
- Duque, E., Haidour, A., Godoy, F. & Ramos, J. 1993. Construction of a Pseudomonas Hybrid Strain That Mineralizes 2,4,6-Trinitrotoluene. *Journal of Bacteriology*, 175, 2278-2283.
- EPA 2001. Handbook on the management of ordnance and explosives at closed, transferring, and transferred ranges and other sites.
- EPA 2015. Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, Method 8330B: Nitroaromatics, Nitramines, and Nitrate Esters by High Performance Liquid Chromatography (HPLC).
- Esteve-Núñez, A., Caballero, A. & Ramos, J. L. 2001. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 335-352.
- French, C. E., Nicklin, S. & Bruce, N. C. 1998. Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2864-2868.
- Fuller, M. & Manning, J. 1998. Evidence for differential effects of 2,4,6-trinitrotoluene and other munitions compounds on specific subpopulations of soil microbial communities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 2185-2195.
- Fuller, M. E. & Manning Jr, J. F. 2004. Microbiological changes during bioremediation of explosives-contaminated soils in laboratory and pilot-scale bioslurry reactors. *Bioresource Technology*, 91, 123-133.
- Gallego, J., Garcia, M., Llamas, J., Belloch, C., Pelaez, A. & Sanchez, J. 2007. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia. *Biodegradation*, 18, 269-281.
- García Bonilla, E. J. 2011. *Recuperación y evaluación de la capacidad degradadora de consorcios bacterianos aislados de ambientes impactados con TNT y PETN*. Maestría en Ciencias - Microbiología, Universidad Nacional de Colombia.
- García Galindo, L. A. 2014. *Determinación del potencial de degradación anaeróbica de 2,4,6 trinitrotolueno (TNT) y tetranitrato de pentaeritrol (PETN) en suelos impactados con explosivos*. Maestría en Ciencias Microbiología, Universidad Nacional de Colombia.
- Georgie, N. 2011. *Biodegradation of 2,4,6 Trinitrotoluene (TNT), Pentaerythritol tetranitrate (PETN) & Pentolite by environmental microbes*. Doctor of Philosophy, RMIT University.
- Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B. & Basri, M. 2004a. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration; Biodegradation*, 54, 61-67.
- Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B. & Basri, M. 2004b. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, 61-67.
- Gloor, G., Hummelen, R., Macklaim, J., Dickson, R., Fernandes, A., MacPhee, R. & Reid, G. 2010. Microbiome Profiling by Illumina Sequencing of Combinatorial Sequence-Tagged PCR Products. *PLoS One* 5, 5, 1-15.
- Goldman, R. P. & Brown, S. P. 2009. Making sense of microbial consortia using ecology and evolution. *Trends in Biotechnology*, 27, 3-4.

- Gomez-Alvarez, V. T., Tracy Schmidt, Thomas 2009. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. *ISME journal*, 3, 1314-1317.
- Hirsch, P. R., Mauchline, T. H. & Clark, I. M. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 878-887.
- Hudcova, T., Halecky, M., Kozliak, E., Stiborova, M. & Paca, J. 2011. Aerobic degradation of 2,4-dinitrotoluene by individual bacterial strains and defined mixed population in submerged cultures. *Journal of Hazardous Materials*, 192, 605-613.
- Huse, S., Welch, D. M., Morrison, H. & Sogin, M. 2010. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environmental Microbiology*, 12, 1889-1898.
- Jacques, R. J. S., Okeke, B. C., Bento, F. M., Teixeira, A. S., Peralba, M. C. R. & Camargo, F. A. O. 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresource Technology*, 99, 2637-2643.
- Khan, F. I., Husain, T. & Hejazi, R. 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of environmental management*, 71, 95-122.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. & Glockner, F. O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*, 41,
- Kulkarni, M. & Chaudhari, A. 2007. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. *Journal of Environmental Management*, 85, 496-512.
- Lewis, T. A., Ederer, M. M., Crawford, R. L. & Crawford, D. L. 1997. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18, 89-96.
- Lewis, T. A., Newcombe, D. A. & Crawford, R. L. 2004. Bioremediation of soils contaminated with explosives. *Journal of Environmental Management*, 70, 291-307.
- Linares, L. & Lopez, C. 2013. *Evaluacion de la capacidad de degradacion del explosivo pentolita mediante consorcios no definidos obtenidos a partir de muestras de suelo, agua y lodo con presencia de explosivos*. Ingenieria Ambiental, Universidad de La Salle.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L. & Law, M. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Biomedicine and Biothechnology*, 1-11.
- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M. & Naidu, R. 2008a. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, 34, 265-276.
- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M. & Naidu, R. 2008b. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. 34, 265-276.
- Mardis, E. 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review Genomics*, 9, 387-402.
- Martin, J., Comfort, P., Shea, T., Kokjhon & Drijber, R. 1997. Denitration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastanoi*. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 447-455.
- McFarlan, S. 2014. *2,4,6-Trinitrotoluene Pathway Map* [Online]. Available: http://eawag-bbd.ethz.ch/tnt/tnt_map.html.
- McFarlan, S. & Yao, G. 2014. *Anaerobic Trinitrotoluene Pathway Map* [Online]. Available: http://eawag-bbd.ethz.ch/tnt2/tnt2_map.html.
- Metzker, M. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews*, 11, 31-46.

- Mikesková, H., Novotný, Č. & Svobodová, K. 2012. Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective. *Applied Microbiology Biotechnology*, 95, 861 – 870.
- Moretti, M., Grunau, A., Minerdi, D., Gehring, P., Roschitzki, B., Eberl, L., Garibaldi, A., Gullino, M. & Riedel, K. 2010. A proteomics approach to study synergistic and antagonistic interactions of the fungal–bacterial consortium *Fusarium oxysporum* wild-type MSA 35. *Proteomics*, 10.
- Nyanhongo, G. S., Aichernig, N., Ortner, M., Steiner, W. & Guebitz, G. M. 2009. Incorporation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transforming bacteria into explosive formulations. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 285-290.
- Panz, K. & Miksch, K. 2012. Phytoremediation of explosives (TNT, RDX, HMX) by wild-type and transgenic plants. *Journal of Environmental Management*, 113, 85-92.
- Park, C., Kim, T.-H., Kim, S., Kim, S.-W., Lee, J. & Kim, S.-H. 2003. Optimization for biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Pseudomonas putida*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95, 567-571.
- Patel, V., Cheturvedula, S. & Madamwar, D. 2012a. Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. *Journal of Hazardous Materials*, 201–202, 43-51.
- Patel, V., Jain, S. & Madamwar, D. 2012b. Naphthalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India. *Bioresource Technology*, 107, 122-130.
- Pennington, J. & Brannon, J. 2002. Environmental fate of explosives. *Thermochimica acta*, 384, 163-172.
- Pennington, J., Zakikhani, M. & Harrelson, D. 1999. Monitored Natural Attenuation of Explosives in Groundwater - Environmental Security Technology Certification Program Completion Report. United States: US Army Corps of Engineers.
- Popesku, J., Singh, A., Zhao, J., Hawari, J. & Ward, O. 2004. Metabolite production during transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by a mixed culture acclimated and maintained on crude oil-containing media. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 739-746.
- Robertson, B. K. & Jjemba, P. K. 2005. Enhanced bioavailability of sorbed 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by a bacterial consortium. *Chemosphere*, 58, 263-270.
- Rodgers, J. D. & Bunce, N. J. 2001. Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives. *Water Research*, 35, 2101-2111.
- Roldan, F., Arbeli, Z., Benavides, J., Perez, L & Manrique, M. 2013. *Diseño de un sistema con microorganismos degradadores de PETN y TNT incorporado en el explosivo pentolita. Informe Técnico Final. Fase II: Diseñar y seleccionar la metodología que permita incorporar el sistema con microorganismos degradadores en el explosivo comercial.*, Bogota, Colombia, INDUMIL.
- Roldan, M., Perez, R., Castillo, F. & Moreno, V. 2008. Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *Fems Microbiology Reviews*, 32, 474 - 500.
- Rylott, E., Lorenz, A. & Bruce, N. 2001. Biodegradation and biotransformation of explosives. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 434 - 440.

- Sagi-Ben Moshe, S., Ronen, Z., Dahan, O., Weisbrod, N., Groisman, L., Adar, E. & Nativ, R. 2009. Sequential biodegradation of TNT, RDX and HMX in a mixture. *Environmental Pollution*, 157, 2231-2238.
- Sanders, K. P., Marshall, M., Oxley, J. C., Smith, J. L. & Egee, L. 2002. Preliminary investigation into the recovery of explosives from hair. *Science & Justice*, 42, 137-142.
- Schloss, P. D. & Handelsman, J. 2006. Introducing SONS, a Tool for Operational Taxonomic Unit-Based Comparisons of Microbial Community Memberships and Structures. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6773-6779.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J. & J, W. D. 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. 75, 7537-7541.
- Silva, Í. S., Santos, E. d. C. d., Menezes, C. R. d., Faria, A. F. d., Franciscan, E., Grossman, M. & Durrant, L. R. 2009. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*, 100, 4669-4675.
- Snellinx, Z., Taghavi, S., Vangronsveld, J. & Lelie, D. 2003. Microbial consortia that degrade 2,4-DNT by interspecies metabolism: isolation and characterization. *Biodegradation*, 14, 19 - 29.
- Stenuit, B. & Agathos, S. 2010. Microbial 2,4,6-trinitrotoluene degradation: could we learn from (bio)chemistry for bioremediation and vice versa? *Applied Microbiology Biotechnology*, 88, 1043-1064.
- Stenuit, B., Eysers, L., Schuler, L., Agathos, S. N. & George, I. 2008. Emerging high-throughput approaches to analyze bioremediation of sites contaminated with hazardous and/or recalcitrant wastes. *Biotechnology Advances*, 26, 561-575.
- Sutcliffe, I., Brown, A. & Dover, L. 2010. The Rhodococcal Cell Envelope: Composition, Organisation and Biosynthesis. *Microbiology Monographs*, 16, 29-71.
- Travis, E. R., Bruce, N. C. & Rosser, S. J. 2008. Short term exposure to elevated trinitrotoluene concentrations induced structural and functional changes in the soil bacterial community. *Environmental Pollution*, 153, 432-439.
- Treadway, S., Yanagimachi, K., Lankenau, E., Lessard, P., Stephanopoulos, G. & Sinskey, A. 1999. Isolation and characterization of indene bioconversion genes from *Rhodococcus* strain I24. *Applied Microbiology Biotechnology*, 51, 786-793.
- Vandermeer, K. & Daugulis, A. 2007. Enhanced degradation of a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons by a defined microbial consortium in a two-phase partitioning bioreactor. *Biodegradation*, 18, 211-221.
- Vorbeck, C., Lenke, P., Fischer & H, K. 1994. Identification of a hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. *Journal of Bacteriology*, 176, 932-934.
- Wang, J., Rozen, S., Shapiro, B., Shasha, D., Wang, Z. & Yin, M. 1999. New techniques for DNA sequence classification. *Journal of Computational Biology*, 6, 209-218.

- Wang, W., Yan, L., Cui, Z., Gao, Y., Wang, Y. & R, J. 2011. Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresource Technology*, 102, 9321-9324.
- White, G. & Snape, J. 1993. Microbial cleavage of nitrate esters : defusing the environment. *Journal of General Microbiology*, 139, 1947-1957.
- White, G., Spane, J. & Nicklin, S. 1996. Biodegradation of Glycerol Trinitrate and Pentaerythritol Tetranitrate by *Agrobacterium radiobacter*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 637-642.
- Widada, J., Nojiri, H., Kasuga, K., Yoshida, T., Habe, H. & Omori, T. 2002. Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. *Applied Microbiology Biotechnology*, 58, 202-209.
- Williams, R. E., Rathbone, D. A., Scrutton, N. S. & Bruce, N. C. 2004. Biotransformation of Explosives by the Old Yellow Enzyme Family of Flavoproteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3566-3574.
- Yang, Y. 2012. *Pentaerythritol tetranitrate Degradation Pathway Map* [Online]. Available: http://eawag-bbd.ethz.ch/petn/petn_map.html.
- Ye, J., Singh, A. & Ward, O. 2004. Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20, 117-135.
- Young, C., Ho, M., Arun, A., Chen, W., Lai, W., Shen, F., Rekha, P. & Yassin, A. 2007. *Pseudoxanthomonas spadix* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1823-1827.
- Zhang, L. & Xu, Z. 2008. Assessing bacterial diversity in soil. *Journal of Soils and Sediments*, 8, 379 - 388.
- Zhuang, L. 2007. *Remediation of Pentaerythritol Tetranitrate (PETN) Contaminated Water and Soil*. Tesis Doctoral, University of Waterloo.
- Zhuang, L., Gui, L. & Gillham, R. W. 2012. Biodegradation of pentaerythritol tetranitrate (PETN) by anaerobic consortia from a contaminated site. *Chemosphere*, 89, 810-816.
- Zhuang, L., Gui, L., Gillham, R. W. & Landis, R. C. 2014. Laboratory and pilot-scale bioremediation of Pentaerythritol Tetranitrate (PETN) contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 264, 261-268.