



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología**

**Aislamiento, identificación, caracterización y selección  
de cepas bacterianas con capacidad de degradar 2,4,6-  
trinitrotolueno (TNT)**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

Para optar el Grado de Bachiller en Microbiología y Parasitología

**AUTOR**

Wilma Ursula QUISPE ROJAS

**ASESOR**

Dr. Pablo RAMÍREZ ROCA

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Quispe, W. (2021). *Aislamiento, identificación, caracterización y selección de cepas bacterianas con capacidad de degradar 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)*. [Trabajo de investigación de bachiller, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos del autor</b>	
Nombres y apellidos	WILMA URSULA QUISPE ROJAS
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	76130796
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-9174-3947">https://orcid.org/0000-0002-9174-3947</a>
<b>Datos del asesor</b>	
Nombres y apellidos	PABLO RAMÍREZ ROCA
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06183797
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-9309-7021">https://orcid.org/0000-0001-9309-7021</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente de jurado</b>	
Nombres y apellidos	SUSANA MÓNICA GUTIÉRREZ MORENO
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08060631
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	MARCOS ALEJANDRO SULCA LÓPEZ
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41283664
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	LIZ ERIKA CRUZ PIO
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41509033

<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	A.1.2.1 Biorremediación y Bioconversión
Grupo de investigación	Genómica funcional de Microorganismos y Biorremediación - MICROGEN
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Trabajo de Investigación. B20100150a
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.059516805919612 Longitud: -77.08214906087528
Año o rangos de años en que se realizó la investigación	2021
URL de disciplinas OCDE	Biorremediación, Biotecnologías de diagnóstico en la gestión ambiental <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.08.02">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.08.02</a> Biología celular, Microbiología <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01</a>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN)**

Siendo las 15:18 horas del 17 de noviembre de 2021, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/mjj-strc-sfo>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Grado Académico de Bachiller en Microbiología y Parasitología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** de **WILMA URSULA QUISPE ROJAS**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20210082005, la graduando expuso su Trabajo de Investigación: **“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS CON CAPACIDAD DE DEGRADAR 2,4,6-TRINITROTOLUENO (TNT)”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: Aprobado con mención honrosa.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Grado Académico de Bachiller en Microbiología y Parasitología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** a **WILMA URSULA QUISPE ROJAS** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 17:00 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 17 de noviembre de 2021.



**UNMSM**

Firmado digitalmente por GUTIERREZ  
MORENO Susana Monica FAU  
20148092262 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 17.11.2021 16:58:09 -05:00

---

**Dra. SUSANA GUTIERREZ MORENO**  
(PRESIDENTA)

---

**Dr. PABLO RAMIREZ ROCA**  
(ASESOR)

---

**Dra. LIZ CRUZ PIO**  
(MIEMBRO)

---

**Dr. MARCOS SULCA LOPEZ**  
(MIEMBRO)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al fondo del Programa de Promoción de Trabajo de Investigación (B20100150a) para optar el grado de Bachiller del Vicerrectorado de investigación de la UNMSM, por el cofinanciamiento de este estudio.

A mi estimado asesor Pablo Ramírez, por la confianza depositada en mí.

A los profesores Juan Jiménez, Miguel Talledo y Nora Vera porque sus clases reforzaron mi gusto hacia la carrera.

A Angélica, mi madre y mi más grande alegría; a mi querido hermano Carlos porque su esfuerzo me permitió seguir adelante, a mi hermana Jennifer, a mi papá Carlos y a mi tía Wilma por su apoyo.

A mis compañeros de laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología: Jaime, Bryan, María, Paolo, Gus, Wendy, Hedder y especialmente a Marito quien siempre me anima.

A mis queridos amigos Branco y Tatiana, quienes verdaderamente me desean lo mejor.

A mis amigos del internet, que alegran mi día a día. También a mis amistades de la base 16, siempre muy divertidos.

Y a todas las personas que contribuyeron de manera directa e indirecta con la realización de este trabajo.

## ABREVIATURAS

2, 4- DNT	2, 4 dinitrotolueno
2-ADNT	2 amino-4, 6-dinitrotolueno
2-HDNT	2 hidroxilamino-4, 6-dinitrotolueno
4- ADNT	4 amino -2, 6 – dinitrotolueno
4A-2NOC-6-NT	4 amino-2-nitroso-6-nitrotolueno
4-HDNAT	4- hidroxilamino- 2, 6- dinitrotolueno
ADNTs	Amino-di-nitro-toluenos
AZTs	Tetranitrozoxitoluenos
DAHAT	2, 4-diamino-6-hidroxilaminotolueno
DANT	2, 4-diamino-6-nitrotolueno
DANTs	Di-amino-mono-nitrotoluenos
GS-GOGAT	Vía de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa
HADNTs	Hidroxilamino-di-nitrotoluenos
H-TNT	Hidruro-Meisenheimer
MLN	Medio Libre de Nitrógeno
MOD	Materia orgánica disuelta
MOP	Materia orgánica particulada
MOS	Materia orgánica del suelo
NED	N-1-naftiletilendiamina
p-cresol	4-hidroxitolueno
TAT	2, 4, 6-triaminotolueno
TCA	Ciclo del ácido cítrico
TNT	2, 4, 6-trinitrotolueno
$\lambda_{max}$	Longitud de onda máxima



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Delimitación del problema. ....	1
1.2 Pregunta del problema. ....	1
1.3 Justificación de la investigación. ....	1
1.3 Objetivos. ....	3
1.3.1 Objetivo General. ....	3
1.3.2 Objetivos específicos. ....	3
1.4 HIPÓTESIS.....	3
2. ESTADO DEL CONOCIMIENTO.....	4
2.1 Microorganismos degradadores del TNT.....	5
2.2 Mecanismo bacteriano de la captación del TNT.....	6
2.3 Mecanismos generales de la degradación microbiana de compuestos nitroaromáticos. ....	7
2.4 Degradación bacteriana del TNT. ....	7
2.4.1 Degradación aeróbica del TNT.....	8
2.4.2 Degradación anaeróbica del TNT.....	13
2.4.3 Degradación combinada de TNT vía aeróbica y anaeróbica.....	14
2.5 Enzimas involucradas en la degradación del TNT.....	16
2.5.1 Nitroreductasas tipo I (insensibles al oxígeno). ....	16
2.5.2 Transferasas de hidruro de tipo II.....	17
2.6 Mecanismos bacterianos para la obtención de nitrógeno a partir del TNT.....	19
2.7 Detección del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) mediante el método colorimétrico- espectrofotométrico. ....	20
2.8 Detección de nitritos mediante la reacción de Peter Griess.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Materiales. ....	21
3.2 Metodología. ....	22
3.2.1 Aislamiento bacteriano y caracterización cultural. ....	22
3.2.2 Identificación molecular. ....	22

3.2.3 Determinación del crecimiento bacteriano mediante la medición de la densidad óptica. ....	24
3.2.4 Selección de cepas bacterianas capaces de utilizar TNT como fuente de nitrógeno.....	24
3.2.5 Crecimiento de la cepa bacteriana S3B en MLN suplementado con diversas concentraciones de TNT.....	25
3.2.6 Determinación de la $\lambda_{\max}$ de los aniones Jackson-Meisenheimer. ....	25
3.2.7 Determinación de la $\lambda_{\max}$ del colorante azo (reacción de Peter Griess).....	26
3.2.8 Determinación de la degradación del TNT por la cepa bacteriana S3B.....	26
4. RESULTADOS .....	28
4.1 Caracterización cultural de las colonias aisladas. ....	28
4.2 Identificación molecular. ....	30
4.3 Análisis filogenético. ....	31
4.4 Determinación del crecimiento bacteriano mediante la medición de D.O.....	33
4.5 Selección de cepas bacterianas capaces de utilizar TNT como fuente de nitrógeno. ....	33
4.6 Crecimiento de la cepa bacteriana S3B en MLN suplementado con diversas concentraciones del TNT.....	37
4.7 Determinación de la $\lambda_{\max}$ de los aniones Jackson-Meisenheimer.....	39
4.8 Determinación de la $\lambda_{\max}$ del colorante azoico (reacción de Peter Griess).....	39
4.9 Determinación de la degradación del TNT.....	40
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	41
5.1 Identificación molecular y caracterización cultural de las bacterias aisladas.....	41
5.2 Análisis filogenético. ....	42
5.3 Selección de cepas bacterianas capaces de utilizar TNT como fuente de nitrógeno. ....	43
5.4 Determinación de la degradación del TNT.....	45
6. CONCLUSIONES.....	47
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos y el metabolismo que emplean para la transformación de TNT en condiciones aeróbicas .....	10
Tabla 2. Microorganismos y el metabolismo que emplean para la transformación de TNT en condiciones anaeróbicas. ....	14
Tabla 3. Caracterización macroscópica y coloración Gram de los 5 aislados.....	29
Tabla 4. Especies y porcentaje de identidad a nivel molecular de las 5 cepas bacterianas .....	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Asimilación co-metabólica de nitrógeno utilizando 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como fuente de nitrógeno.....	6
Figura 2. Mecanismos de las vías de biodegradación del TNT. ....	12
Figura 3. Vía de degradación aeróbica- anaeróbica de TNT .....	15
Figura 4. Mecanismo cinético de “ping-pong” durante la reducción de compuestos nitroaromáticos por las nitroreductasas .....	16
Figura 5. Biotransformación de 2,4,6-trinitrotolueno catalizada por PETN reductasa de <i>Enterobacter cloacae</i> PB2 .....	18
Figura 6. Formación de los aniones Jackson-Meisenheimer .....	20
Figura 7. Cuantificación colorimétrica de iones nitritos liberados por TNT mediante la reacción de Peter Griess y posibles interferencias. ....	21
Figura 8. Cepas bacterianas aisladas en agar TSA tras 48 horas de incubación .....	28
Figura 9. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de los productos de amplificación correspondientes al gen <i>16S ADNr</i> .....	30
Figura 10. Árbol filogenético Neighbor-Joining de las 5 cepas bacterianas aisladas... ..	32
Figura 11. Determinación del crecimiento de las cepas SM4, SM2, S2, SM6 y S3B en medio TSA, los datos fueron obtenidos mediante densidad óptica. ....	33
Figura 12. Determinación del crecimiento de las cepas SM4, SM2, S2, SM6 y S3B en medio libre de nitrógeno .....	34
Figura 13. Determinación del crecimiento de las cepas SM4, SM2, S2, SM6 y S3B en MLN suplementado con 20 ppm de TNT .....	35
Figura 14. Determinación del crecimiento de las cepas SM4, SM2, S2, SM6 y S3B en MLN suplementado con 60 ppm de TNT .....	35
Figura 15. Determinación del crecimiento de las cepas SM4, SM2, S2, SM6 y S3B en MLN suplementado con 100 ppm de TNT .....	36
Figura 16. Tubos con MLN suplementado con 100 ppm de TNT a las 38 horas. ....	36
Figura 17. Crecimiento de la cepa S3B en MLN a diferentes concentraciones de TNT y en diferentes tiempos. ....	38
Figura 18. Obtención del $\lambda_{max}$ de los aniones de Jackson-Meisenheimer.....	39
Figura 19. Obtención del $\lambda_{max}$ del colorante azo (Reacción de Peter Griess). ....	39

Figura 20. Determinación de la degradación del TNT de la cepa bacteriana S3B en MLN suplementado con 100 ppm de TNT en 72 horas .....	40
Figura 21. Detección indirecta de NO <sub>2</sub> mediante la reacción de Peter Griess, empleando espectrofotometría.....	40

## RESUMEN

Uno de los explosivos nitroaromáticos más utilizados en el mundo es el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), el cual puede permanecer en la naturaleza durante largos periodos de tiempo sin degradarse, debido a la disposición simétrica de los grupos nitro en su estructura. Incluso a bajas concentraciones, el TNT tiene un efecto mutagénico en organismos vivos, desde microorganismos hasta humanos; es cancerígeno y causa diversas enfermedades; por dicho motivo, la presente investigación tuvo como objetivo el aislamiento e identificación molecular de cepas bacterianas, procedentes de un lote de explosivo con contaminación biológica, con la capacidad de degradar el TNT. Se aislaron 5 cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Microbacterium*, *Acidovorax* y *Diaphorobacter*. La cepa S3B perteneciente al género *Diaphorobacter*, obtuvo un crecimiento superior a las otras cuatro cepas bacterianas empleando únicamente TNT a diferentes concentraciones (20 ppm, 60 ppm y 100 ppm) como fuente de nitrógeno. Finalmente, en el ensayo de degradación del TNT, se obtuvo un porcentaje de degradación del 77.7% de; asimismo, se detectó la liberación de nitritos. La presente investigación muestra el potencial de la cepa S3B para la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con TNT.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Delimitación del problema.**

Los explosivos son compuestos ricos en nitrógeno y oxígeno usados con propósitos militares e industriales (minería, construcción, metalurgia de alta energía, etc); los cuales, al ser detonados, generan una onda de choque con alta presión y residuos tóxicos en el medio ambiente (Chatterjee et al., 2017). Asimismo, la manufactura, testeado y uso de explosivos produce gran contaminación del suelo y aguas subterráneas. Los métodos de remediación físicos y químicos como los procesos de incineración, adsorción y oxidación avanzada son muy costosos y pueden producir subproductos tóxicos (Kao et al., 2016). Debido a esta problemática, en los últimos años se han generado métodos de remediación alternativos como la biorremediación, la cual permite la reducción biológica de compuestos químicos empleando microorganismos, plantas o incluso insectos (Singh *et al.*, 2012).

Uno de los explosivos nitroaromáticos más utilizado es el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), que puede permanecer en la naturaleza durante mucho tiempo sin degradarse debido a la disposición simétrica de los grupos nitro en su estructura química (Gök et al., 2019). Bajas concentraciones de TNT tienen un efecto mutagénico en organismos vivos (desde microorganismos hasta humanos); es cancerígeno y causa diversas enfermedades (Maksimova et al., 2018); por dicho motivo, la presente investigación se centra en la evaluación de la capacidad degradativa TNT por cepas aisladas e identificadas molecularmente procedentes de un lote de explosivo contaminado.

### **1.2 Pregunta del problema.**

¿Las cepas bacterianas aisladas a partir de un lote de explosivos con contaminación biológica presentan una capacidad degradativa frente al 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)?

### **1.3 Justificación de la investigación.**

Clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de los EE. UU., como carcinógeno de Clase 1, el TNT es tóxico para todos los seres vivos, este xenobiótico se adhiere fuertemente a la materia orgánica del suelo y es

recalcitrante a la degradación debido a la presencia de tres grupos nitro que introducen restricciones estéricas y confieren una alta deficiencia de electrones al anillo aromático (Rylott et al., 2011).

En humanos se han reportado numerosos síntomas de intoxicación después de la inhalación o absorción dérmica del TNT; días después de la exposición se observan síntomas como: dolor de cabeza, pérdida de apetito, mareos, náuseas, insomnio, entumecimiento de varias partes de la piel y diarrea (Juhasz y Naidu, 2007; Fahrenfeld et al., 2013). Hay también diversos cambios en el hemograma como resultado de la exposición. Un síntoma particularmente llamativo es la cianosis, que es la coloración rojo azulada de los labios, las uñas y la piel debido a la deficiencia de oxígeno (Claus, 2014). Las interacciones de los compuestos nitroaromáticos con el ácido desoxirribonucleico (ADN) y la mutagenicidad resultante han sido caracterizados, y se observó que los productos de la oxidación y reducción de compuestos nitroaromáticos pueden dañar directamente al ADN o causar la formación de aductos que inducen mutagénesis por incorporación incorrecta de nucleótidos durante la síntesis del ADN (Purohit y Basu, 2000). Estudios estructurales y espectroscópicos han encontrado que la posición del grupo nitro en el anillo aromático y la presencia de otros grupos funcionales pueden influir en la mutagenicidad y carcinogenicidad de estos productos químicos (Ju y Parales, 2010). Además, el TNT es altamente tóxico para las plantas terrestres, afectando la tasa de germinación, produciendo una disminución de la biomasa de las plantas y crecimiento anormal; estas características tienen una correlación positiva con el aumento de la concentración de TNT (Vila y Laurent, 2008). Debido a su uso actual en la construcción y demolición, el TNT se ha convertido en el explosivo más empleado.

Durante la manufactura del TNT, se remueven isómeros no deseados y especies residuales de dinitrato empleando una solución acuosa de sulfito de sodio llamada "sellite", a la cual se unen los residuos mientras el TNT remanente es lavado y secado para su empaquetamiento. Los desechos industriales conocidos como "aguas rojas" y "aguas rosadas" son formadas durante la purificación con "sellite" y el lavado post purificación, respectivamente. Ambos residuos líquidos presentan una alta toxicidad, tan solo el "agua rosada" tiene una concentración de 150 ppm de TNT (Yinon, 1990; Gok et al., 2019).



El TNT residual de las etapas de fabricación, almacenamiento y uso, son fuentes de contaminación del agua, el suelo, la atmósfera y la biosfera. Por dicha razón, la remediación de los residuos y sitios contaminados con TNT es necesario para mantener la seguridad y la calidad de los ecosistemas ambientales. Se han establecido varios procedimientos fisicoquímicos tradicionales como el uso de reactores *ex situ*, incineración del suelo, relleno sanitario, compostaje del suelo y desorción térmica para la remediación de suelos contaminados con TNT; desafortunadamente, estos procedimientos son muy costosos (Ayoub et al., 2010). La remediación de base biológica se ha considerado como un enfoque ecológicamente compatible para desintoxicar áreas contaminadas con TNT. Las tecnologías de biorremediación se enfocan principalmente en la degradación microbiana y la fitorremediación proporcionando una prometedora perspectiva de bajo costo para limpiar el suelo contaminado con TNT (Liang et al., 2017).

### **1.3 Objetivos.**

#### **1.3.1 Objetivo General.**

Determinar la presencia de bacterias con capacidad de transformar el TNT, procedentes de un lote de explosivo con contaminación biológica.

#### **1.3.2 Objetivos específicos.**

**1.3.2.1** Aislar e identificar molecularmente las cepas bacterianas presentes en un lote de explosivo contaminado.

**1.3.2.2** Seleccionar la cepa bacteriana con mayor crecimiento microbiano, utilizando el TNT como única fuente de nitrógeno.

**1.3.2.3** Determinar el porcentaje de degradación de TNT y producción de nitritos de la cepa bacteriana con mayor crecimiento empleando el TNT como única fuente de nitrógeno.

### **1.4 HIPÓTESIS**

**1.4.1 H<sub>1</sub>:** Alguna de las bacterias aisladas a partir de un lote de explosivo con contaminación biológica posee una actividad degradativa frente al 2,4,6-trinitrotolueno (TNT).

**1.4.2 H<sub>0</sub>:** Ninguna de las bacterias aisladas bacterianas aisladas a partir de un lote de explosivo con contaminación biológica posee una actividad degradativa frente al 2,4,6-trinitrotolueno (TNT).

## **2. ESTADO DEL CONOCIMIENTO**

En la década de 1960, se descubrió la capacidad de diversos microorganismos del suelo y la rizosfera de metabolizar compuestos xenobióticos, convirtiendo a los procesos biológicos en una posibilidad viable y aceptable para la degradación de compuestos peligrosos (Singh et al., 2012). Los intentos de desarrollar un sistema biológico tecnológico para degradar TNT se remontan a la década de 1970 (Nyanhongo et al., 2005).

Los microorganismos son los habitantes más antiguos de la tierra, son versátiles y adaptables al entorno cambiante; por lo que, son un componente rentable para combatir diversas problemáticas antropogénicas (Ju y Parales, 2010). Actualmente, los microorganismos y sus diversas enzimas metabólicas se emplean para la eliminación segura de contaminantes ambientales, ya sea mediante destrucción directa o indirectamente, mediante la transformación del contaminante a un intermediario más seguro (Kivisaar et al., 2011). La limitación que enfrentan las tecnologías de tratamiento físico y químico se superaría con la ayuda de los microorganismos; sin embargo, la biodegradación completa de compuestos xenobióticos a menudo requiere de un consorcio de microorganismos ya que, generalmente, una sola especie de microorganismo no es capaz de metabolizar todos los productos resultantes de las reacciones iniciales de la biodegradación (Singh et al., 2012).

El TNT es una molécula débilmente polar con un momento dipolar molecular de 1.37 D (Xue *et al.*, 1995) y un valor log Kow (1.86) relativamente alto en comparación con otros nitros explosivos. Por lo tanto, el TNT puede unirse a la materia orgánica del suelo (MOS) a través de reacciones de partición hidrófobas inespecíficas (Eriksson et al., 2004). Singh et al., (2010) informaron que la fracción alifática (principalmente alquilo) de MOS controla principalmente la sorción inespecífica de TNT. En consecuencia, Eriksson et al., (2004) demostraron que el reparto hidrofóbico es el principal mecanismo de adsorción

de TNT en la materia orgánica particulada (MOP) que es rica en carbono alifático.

Por otro lado, los productos de transformación de un contaminante definido pueden mostrar un comportamiento de sorción, así como una toxicidad muy diferente a la del compuesto original, y por lo tanto presentan un riesgo ecotoxicológico divergente. Los metabolitos reducidos de TNT (p. Ej. Nitroso, hidroxilamino, diaril azoxi y derivados amino) están sujetos tanto a la división hidrofóbica como a la unión específica (electrostática y covalente) con MOS. Además, los metabolitos del TNT reducidos presentan una afinidad preferencial por la materia orgánica disuelta (MOD), en lugar de MOP, mediante diferentes tipos de interacciones específicas con grupos funcionales de la MOD como los grupos carboxilo y carbonilo (Eriksson et al., 2004, Eriksson y Skyllberg, 2009).

Específicamente, los productos de la degradación del TNT se unen a la fracción de tamaño más pequeño de MOD (<3.5 kDa), que tiene una cantidad sustancialmente mayor de grupos funcionales de oxígeno reactivos a los sustituyentes amino (Eriksson y Skyllberg, 2009). Esta fracción no es propensa a los mecanismos de floculación por metales importantes en los suelos y puede liberarse en aguas superficiales y subterráneas mediante la lixiviación de la MOD en suelos contaminados. Por otro lado, la fracción de arcilla coloidal dispersable en agua y suelo, podría adsorber significativamente los metabolitos del TNT y favorecer así el transporte facilitado por coloides de residuos explosivos en los suelos (Dontsova et al., 2009).

El transporte de TNT por movilización coloidal del suelo fue confirmado por Sharma et al., (2013) pero el mecanismo exacto de las interacciones entre TNT y coloides aún no está completamente aclarado (Stenuit y Agathos, 2019).

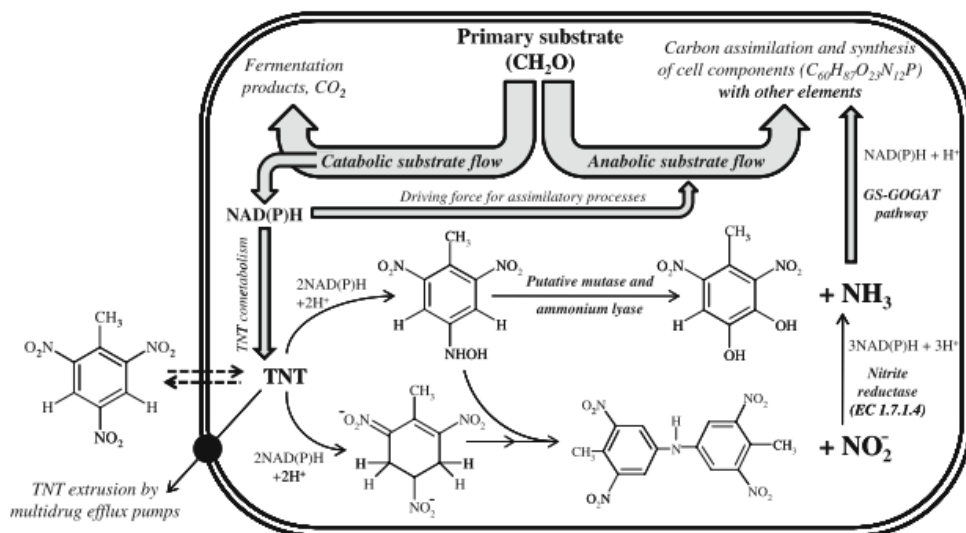
## **2.1 Microorganismos degradadores del TNT.**

Se han aislado diversos tipos de microorganismos capaces de utilizar TNT, bacterias aerobias como *Pseudomonas* sp. *Bacillus* sp. *Acinetobacter* sp. *Achromobacter* sp. *Staphylococcus* sp. *Rhodococcus* sp. *Enterobacter* sp. *Klebsiella* sp; y bacterias anaeróbicas como *Clostridium* sp. *Desulfovibrio* sp. *Methanococcus* sp; entre otras. (Kulkarni y Chaudhari, 2007; Solyanikova et al., 2012; Bernstein y Ronen, 2012; Gumuscu y Tekinay, 2013; Maksimova et al.,

2018). Además, algunas especies de hongos los cuales pueden llegar a la mineralización completa del TNT. Entre ellos, los hongos de la podredumbre blanca como *Phanerochaete chrysosporium* (Michel y Gottschalk, 1994) y *Stropharia* sp. (Scheibner y Hofrichter, 1998), son potenciales degradadores de TNT en condiciones aeróbicas. Los hongos micromicetos y basidiomicetos también pueden degradar TNT, por ejemplo, *Gymnopilus luteofolius*, *Kuehneromyces mutabilis* y *Phanerochaete velutina* (Celin et al., 2020). Todos estos microorganismos emplean diversas rutas metabólicas para la transformación del TNT.

## 2.2 Mecanismo bacteriano de la captación del TNT.

Hasta la fecha, la captación de TNT por un sistema de transporte dependiente de energía no ha sido reportado, por lo que, la difusión pasiva a través de las barreras de células microbianas se considera como el mecanismo predominante de captación de TNT (figura 1). El flujo de membrana máximo de TNT es de alrededor de  $0.037 \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Bressler y Gray, 2003). Sin embargo, en el caso *P. putida* KT2440 se ha reportado la inducción de dos bombas de eflujo de múltiples fármacos (MexEF / OprN) en presencia de TNT, lo que sugiere la importancia de los sistemas de extrusión activos para mantener una concentración baja de TNT intracelular para superar su toxicidad (Fernández et al. 2009).



**Figura 1.** Asimilación co-metabólica de nitrógeno utilizando 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como fuente de nitrógeno. El  $\text{CH}_2\text{O}$  se utiliza como fórmula para un sustrato orgánico promedio (Stenuit y Agathos, 2010).

### **2.3 Mecanismos generales de la degradación microbiana de compuestos nitroaromáticos.**

La degradación microbiana de nitroaromáticos puede ocurrir por cuatro mecanismos (Symons y Bruce, 2006; Kulkarni y Chaudhari, 2007).

- Reducción inicial que produce aminas aromáticas, las cuales pueden seguir metatizándose gracias a la enzima nitroreductasa presente en varios microorganismos que degrada los compuestos nitroaromáticos, reduciendo inicialmente el grupo nitro a una amina. La reducción procede a través de un grupo nitroso y un grupo hidroxiamino (Marvin-Sikkema y De Bont, 1994).
- Reacción de oxigenación inicial que produce nitrito, los microorganismos utilizan compuestos nitroaromáticos como fuente de nitrógeno y los degradan mediante la eliminación oxigenolítica del grupo nitro (Singh et al., 2012).
- Eliminación reductiva completa del grupo nitro produciendo nitrito, vía que está presente en varias bacterias y se caracteriza por la eliminación reductiva completa del grupo nitro como nitrito y la formación de un complejo hidruro-Meisenheimer como uno de los metabolitos. Este complejo hidruro-Meisenheimer indica que la degradación comienza con un ataque nucleofílico en el anillo aromático (Lenke y Knackmuss, 1992).
- Reducción parcial del grupo nitro a una hidroxilamina que, después de un reemplazo posterior, se metaboliza aún más. Los grupos de extracción de electrones (nitro) activan la molécula para la reducción del grupo nitro. El aumento en el número de grupos nitro en el anillo aumenta la probabilidad de reducción y disminuye el ataque electrofílico. La reducción de grupos nitro puede proceder fácilmente mediante una o dos transferencias de electrones (Lenke et al., 2000).

### **2.4 Degradación bacteriana del TNT.**

Las variaciones, los productos resultantes y las reacciones de degradación de TNT varían dependiendo de la especie bacteriana y tipo de cultivo. Sin embargo, la vía de desnitrificación es una de las más rentables para los microorganismos debido a la disminución de la naturaleza electrofílica de TNT, lo que les permite

utilizar dioxigenasas y mononitrotoluenos o dinitrotoluenos como sustratos (Martin et al., 1997).

Los compuestos explosivos pueden servir como fuente de carbono o nitrógeno para muchos microorganismos aeróbicos o anaeróbicos. La principal dificultad en la degradación microbiana del TNT es la disposición simétrica de tres grupos nitro que crean una condición de un alto déficit de electrones en el anillo aromático. El uso del TNT como fuente de carbono y energía es muy difícil para los microorganismos. La degradación en presencia de oxígeno resulta en la transformación o destrucción del TNT a otras formas, pero solo en condiciones anaeróbicas se da la mineralización completa. Los metabolitos iniciales en la biotransformación de TNT son: hidroxilamino-di-nitrotoluenos (HADNTs), amino-di-nitro-toluenos (ADNTs), di-amino-mono-nitrotoluenos (DANTs) y tetranitroazoxitoluenos (AZTs). Debido a la deficiencia de electrones del anillo, la degradación inicial de TNT por microorganismos se caracteriza por reacciones reductivas (Vorbeck et al.,1994). Los grupos nitro restantes del TNT (-NO<sub>2</sub>) pueden reducirse sucesivamente a grupos nitroso (-NO), hidroxilamino (-NHOH) y finalmente amino (-NH<sub>2</sub>).

Bacterias anaerobias obligatorias, como *Clostridium* sp., *Desulfovibrio* sp; y arqueas como *Methanococcus* sp., pueden reducir TNT completamente a 2,4,6-triaminotolueno (TAT) (Ederer et al.,1997). Dependiendo de las condiciones redox, estos compuestos pueden convertirse aún más por mecanismos bióticos y abióticos en derivados de azo, azoxi, hidrazona y fenol-acetilo (Hawari, 2000).

#### **2.4.1 Degradación aeróbica del TNT.**

Las bacterias aeróbicas generalmente transforman la molécula del TNT mediante dos rutas, la primera es la reducción consecutiva del TNT e inicia al reducir uno o dos grupos nitro a 4-hidroxilamino- 2, 6-dinitrotolueno (4-HDNAT) o 2 hidroxilamino-4,6-dinitrotolueno (2-HDNT) a través de la nitroreductasa no específica dependiente de NAD(P)H. La hidroxilamina se reduce a grupos amino mediante nitroreductasas y la formación de 2,4-dihidroxilamino-6- dinitrotolueno, 2 amino-4,6-dinitrotolueno (2-ADNT) y 4 amino-2,6-dinitrotolueno (4-ADNT) a partir de la hidroxilamina; sin embargo, en algunos casos, las formas parcialmente reducidas de TNT pueden reaccionar en presencia de oxígeno para producir azoxitetranitrotoluenos (AZTs) recalcitrantes y con alta toxicidad.

Posteriormente puede formarse 4-amino-2-nitroso-6-nitrotolueno (4A-2NOC-6-NT) a partir de 4-ADNT y 2,4-dihidroxilamino-6-dinitrotolueno, que es uno de los compuestos finales resultantes de la vía de degradación aeróbica, el cual se ha detectado en cultivos de *Bacillus* sp. *Staphylococcus* sp; y *Pseudomonas aeruginosa* tal como se observa en la tabla 1 (Lewis et al., 1997, Serrano-González et al., 2018; Ndibe et al., 2018).

Dado que el TNT se reduce fácilmente a 4-ADNT y 2-ADNT, varios estudios se han centrado en la posible conversión oxidativa de estos isómeros. Un papel fundamental en este proceso pertenece a las oxigenasas. *E. coli* recombinante que expresa 2,4-dinitrotolueno dioxigenasa de *Burkholderia* sp., es capaz de oxidar a 2-ADNT en la tercera y cuarta posiciones con la liberación de nitrito, la formación de 3-amino-4-metil-5-nitrocatecol y el grupo hidroxilato metilo para formar 2-amino-4,6-dinitro-alcohol bencílico. El nitrobenceno dioxigenasa recombinante de *Comamonas* sp. JS765 puede oxidar 4-ADNT en la segunda y tercera posiciones, con la liberación de nitrito y la formación de 3-amino-6-metil-5-nitrocatecol (Johnson et al., 2001; Smets et al., 2007). La combinación de oxigenasas terminales (2,4-dinitrotolueno dioxigenasa y nitrobenceno dioxigenasa) condujo a la oxidación simultánea de los correspondientes derivados del TNT con la formación de catecoles y alcohol bencílico (Keenan y Wood, 2006). A pesar de que existe esta ruta oxigenolítica de escisión del anillo aromático, la actividad de estas dioxigenasas parece ser bastante baja (generalmente menos de 0,5 nmol de producto / mg de proteína), especialmente para el 4-ADNT, que es el más recalcitrante, y además aún no se sabe si los aminometilnitrocatecoles formados pueden ser transformados enzimáticamente o siguen siendo productos finales (Maksimova et al., 2018).

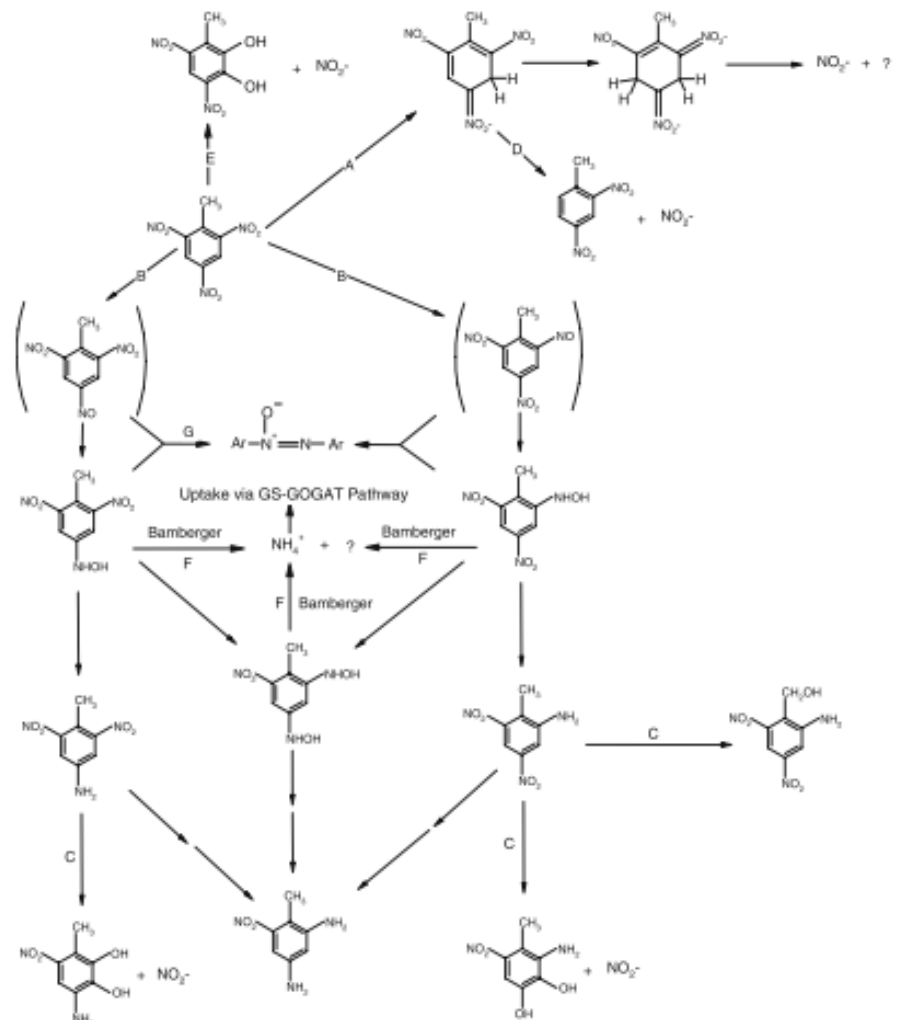
Como se indicó anteriormente, los tres grupos nitro dispuestos simétricamente en el TNT inducen una alta deficiencia de electrones en el anillo aromático (Esteve-Núñez et al., 2001). Debido a que es necesario un entorno de alta reducción electronegativa para transformar el TNT, la adición de oxígeno combinado con el flujo de electrones del metabolismo del biocatalizador puede facilitar la tasa de reducción del TNT. En esta ruta, la reducción del tercer grupo nitro requiere bacterias anaerobias, ya que las bacterias aeróbicas solo pueden reducir 2 de los 3 grupos nitro del TNT (Mc Farland y Sara, 2016).

**Tabla 1.** Microorganismos y el metabolismo que emplean para la transformación de TNT en condiciones aeróbicas. Adaptado de Serrano-González et al (2018)

<b>Microorganismo</b>	<b>Metabolismo</b>
<i>Bacillus</i> sp.	Libera nitrito a partir del TNT y de la conversión a 2- amino – 4 nitrotolueno
<i>Enterobacter cloacae</i> PB2	Reducción del TNT a complejos de Meisenheimer y liberación de nitrito
<i>Enterobacter</i> sp.	Transformación del TNT a compuestos polares no identificados, mineralización y asimilación del 50% del TNT en lípidos
<i>Klebsiella</i> sp. Cl	Metaboliza el TNT
<i>Acinobacter</i> sp. VT11	Conversión completa del TNT
<i>Mycobacterium</i> sp. Cepa HL4NT-1	Transmuta el TNT a complejos hidruros y dihidruros de Meisenheimer
<i>Methylobacterium</i> sp.	Degrada el TNT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Libera nitrito a partir del TNT y de la conversión a 2- amino – 4 nitrotolueno
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MA101	Convierte el TNT y ADNT en compuestos muy polares a través de procesos aeróbicos
<i>Pseudomonas fluorescens</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> B3468	Una flavoproteína NADPH cataliza múltiples transformaciones y genera H- TNT y H <sub>2</sub> - TNT
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Transformación del TNT en ADNT, DANT y 4-acetamida-2-amino-6-nitrotolueno
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Reducción de grupos nitro y nitrito liberados a partir del 2,4-dihidroamilamino-6-nitrotolueno
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	Desnitrificación del TNT para liberar nitrito y reducción del grupo nitro a grupo amino
<i>Pseudomonas</i> sp. Clon A	Capaz de desnitrificar el TNT
<i>Pseudomonas</i> sp. Cepa CBS3	El TNT es reducido a DANT
<i>Pseudomonas</i> sp. Cepa FR2	El TNT es reducido a DANT
<i>Pseudomonas</i> sp. Cepa iibx	Primera confirmación de mineralización del TNT – [C <sub>14</sub> ]
<i>Pseudomonas</i> sp.	El TNT empleado como única fuente de nitrógeno y transformado a 2ADNT y 4ADNT
<i>P. putida</i> JLR11	Degradación del TNT mediante las enzimas nitroreductasas pnra y pnrb
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	El crecimiento en ácido pícrico cataliza la hidrogenación del anillo, formando complejos de hidruro y dihidruro TNT-Meisenheimer
<i>Raoultella terrigena</i> cepa HB	Convierte el TNT en productos amino. Transformó dinitrotolueno y nitrobenzenos.
<i>Serratia marcescens</i>	El TNT como única fuente de carbono y energía en presencia de Tween.
<i>Staphylococcus</i> sp.	Liberación de nitrito a partir del TNT y transformación a 2-amino-4-nitrotolueno
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	El TNT empleado como única fuente de nitrógeno



La segunda vía es la reducción directa de dos electrones del anillo aromático mediante la adición de un hidruro (figura 2, apartado E), los productos de esta reacción incluyen el complejo hidruro de Meisenheimer, el complejo dihidruro de Meisenheimer y los tautómeros protonados, varios tautómeros protonados pueden volverse a aromatizar después de la liberación de nitrito con la formación de DNT's (Vorbeck et al., 1994; Haidour y Ramos, 1996; Esteve-Núñez et al., 2001). Para que se produzca esta vía es fundamental la acción de una clase de flavo-reductasas llamada transferasas de hidruro tipo II, las cuales pertenecen a la familia enzimática *Old Yellow Enzymes* (OYE) (Serrano-González et al., 2018). La familia enzimática OYE, se encuentra principalmente en levaduras, pero se han caracterizado varios homólogos bacterianos como la Pentaeritrol tetranitrato (PETN) reductasa de *Enterobacter cloacae* PB2 y NCIMB10101 (French et al., 1999; Williams et al., 2004), la N-etilmaleimida reductasa de *E. coli* AB1157, JM109 y EPI300 (González-Pérez et al., 2007; Stenuit et al., 2006; Williams et al., 2004), la reductasa xenobiótica B de *P. putida* KT2440 (Wittich et al., 2008), *P. aeruginosa* PAO1 y *P. fluorescens* IC (Pak et al. 2000), “enzimas amarillas de *Shewanella* (SYE1-4)” de *Shewanella oneidensis* (Brigé et al., 2006). Por otro lado, existen reportes de esta vía en la degradación de TNT de *Pseudarthrobacter chlorophenolicus* (Lamba et al., 2021), *Bacillus cereus* (Mercimek et al., 2013) y *Mycobacterium* sp. cepa HL 4-NT-1 (Vorbeck et al., 1998); sin embargo, no se han identificado las transferasas de hidruro tipo II a cargo de la acción enzimática (Lamba et al., 2021). Además, el oxígeno no es necesario para la formación de esos complejos, por lo tanto, la degradación aeróbica del TNT es un metabolismo alternativo cuando no es posible eliminar el oxígeno del medio ambiente (Esteve-Núñez et al., 2001).



**Figura 2.** Mecanismos de las vías de biodegradación del TNT. **A)** Reducción del anillo aromático mediante un complejo de Meisenheimer con liberación de nitrito. **B)** Reducción del grupo nitro del TNT a una serie de intermediarios reducidos. **C)** Los aminodinitroloenos se oxidan mediante dioxigenasas para formar aminometilnitrocatecol liberando nitrito o se hidroxilan en el grupo metilo para formar alcohol aminodinitrobencílico. **D)** El complejo hidruro-Meisenheimer (H-TNT) se desnitrifica posteriormente a 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT). **E)** Una vía oxigenolítica da como resultado la producción de 3-metil-4,6-dinitrocatecol mediante la eliminación de un grupo nitro. **F)** El reordenamiento similar al de Bamberger de los intermediarios hidroxilamino va seguido de la liberación de amonio y la absorción subsiguiente a través de la vía de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT). **G)** Formación de dímeros de azoxitetranitrotoluenos a partir de la reacción de intermediarios nitroso e hidroxilamino (Smets et al., 2007).

#### 2.4.2 Degradación anaeróbica del TNT.

El TNT se reduce completamente a 2,4,6-triaminotolueno (TAT) por bacterias estrictamente anaerobias, como *Desulfovibrio* sp., *Clostridium* sp; y arqueas como *Methanococcus* sp. (Boopathy y Kulpa, 1994). Las especies de *Desulfovibrio* pueden metabolizar TNT en condiciones anóxicas y usarlo como fuente exclusiva de nitrógeno (Drzyzga et al., 1998). Especies de *Clostridium* y *Desulfovibrio* pueden catalizar la reducción completa del TNT a TAT, que es uno de los pasos finales de la degradación. Varias reacciones intermedias ocurren antes de la transformación a TAT, como la reducción de 2,4-diamino-6-nitrotolueno (DANT) a TAT, que necesita piruvato y H<sub>2</sub> para ejecutarse (Ndibe et al., 2018).

Los procesos anaeróbicos microbianos son capaces de generar una rápida degradación del TNT a bajo potencial redox y minimizar la reacción de polimerización oxidativa (Lewis et al., 1997). Como ocurre durante la degradación aeróbica del TNT, los grupos nitro pueden reducirse consecutivamente a grupo nitroso, luego hidroxilamino y finalmente grupos amino. En este punto, los compuestos finales son los mismos que los principales productos de degradación aeróbica: 2-ADNT y 4-ADNT. Sin embargo, solo por degradación anaeróbica como la realizada por *Clostridium acetobutylicum* podría transformarse el TNT en 4-hidroxilamino-2,6-dinitrotolueno y finalmente 2-amino-5-hidroxil-4-hidroxilamino-6-nitrotolueno (Hughes et al., 1998; Watrous et al., 2003).

Volviendo a la ruta general, 2-ADNT y 4-ADNT se reducen a 2,4-diamino-6-nitrotolueno (DANT) a través de la nitroreductasa NAD(P)H no específica. Además, después de que el TAT se produce por la sulfito reductasa disimilatoria, DANT se transforma en 2,4-diamino-6-hidroxilaminotolueno (DAHAT) por hidrogenasas, piruvato ferredoxin oxidorreductasa o monóxido de carbono deshidrogenasa. Cabe mencionar que DANT puede reducirse directamente a TAT en especies como *Clostridium sordelli*, *C. bifermentans* y *C. sporogenes* (tabla 2). En el siguiente paso, el TAT puede convertirse sucesivamente en 2,4,6-trihidroxitolueno y luego en 4-hidroxitolueno (p-cresol). El p-cresol es uno de los metabolitos intermedios en la degradación típica de la ruta del tolueno, y precede a las transformaciones finales de la ruta para producir succinil CoA y acetyl-CoA (Serrano-González et al., 2018).

**Tabla 2.** Microorganismos y el metabolismo que emplean para la transformación de TNT en condiciones anaeróbicas. Adaptado de Serrano-González et al (2018).

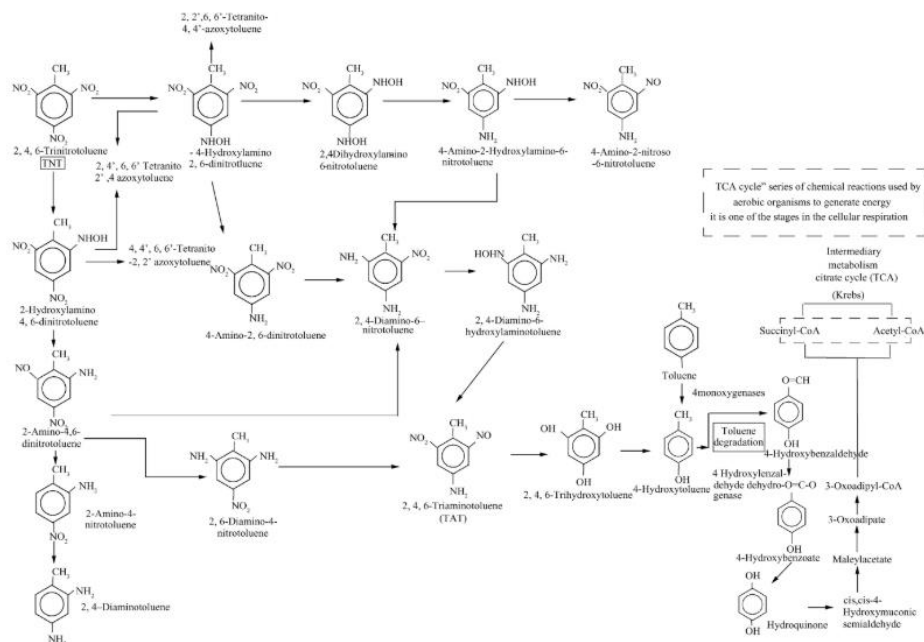
<b>Microorganismo</b>	<b>Metabolismo</b>
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Reducción del TNT a TAT
<i>Clostridium bifermentans</i> cepa CYS-1	Degradación del TNT a compuestos polares alifáticos vía 4ADNT y 2, 4DANT
<i>Clostridium bifermentans</i> cepa LJP-1	Transforma el TNT a TAT y compuestos fenólicos
<i>Clostridium pasterianum</i>	Reducción del TNT a TAT
<i>Clostridium sordelii</i>	Reducción del TNT a TAT
<i>Clostridium</i> sp.	Reordenamiento de Bamberger del dihidroxilaminodinitrotolueno
<i>Desulfovibrio</i> sp. Cepa B	Utiliza el TNT como fuente de nitrógeno teniendo al tolueno como intermediario putativo
<i>Desulfovibrio</i> sp.	Utiliza el TNT como única fuente de nitrógeno y da como resultado una reducción a TAT
<i>Escherichia coli</i>	Reducción del TNT a TAT
<i>Lactobacillus</i> sp.	Reducción del TNT a TAT
<i>Methanococcus</i> sp. Cepa B	Reducción del TNT a DANT
<i>Serratia marcescens</i>	Degrada el TNT
<i>Veillonella alkalescens</i>	Reduce el TNT a toluendiamina

#### **2.4.3 Degradación combinada de TNT vía aeróbica y anaeróbica.**

Tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, el TNT se transforma en derivados amino a través de nitro-reductasa dependiente de NAD(P)H no específica (Kalderis et al., 2011). La mayoría de las bacterias degradadoras del TNT utilizan solo una vía metabólica inicial para su degradación; sin embargo, algunas bacterias pueden usar simultáneamente dos vías diferentes (Haldour y Ramos, 1996). Una de las vías metabólicas es una reducción consecutiva de dos electrones en los grupos nitro del anillo aromático, lo que produce intermediarios reducidos como DANT, 4-HDNAT, 2-HDNT, 2-ADNT, 4-ADNT, isómeros y dímeros azo y azoxi (Lewis et al., 1997).

La segunda vía, es mediante la reducción directa de dos electrones del anillo aromático por la adición de un hidruro, los productos de esta reacción incluyen el complejo hidruro de Meisenheimer, el complejo dihidruro de Meisenheimer y los tautómeros protonados (Vorbeck et al., 1994; Esteve-Núñez et al., 2001).

Las transformaciones finales de la ruta aeróbica conducen a la producción del 2-amino-4,6-dinitrotolueno (2-ADNT), 4-amino-2-nitroso-6-nitrotolueno (4A-2NOC-6-NT) y 2,6-diamino-4-nitrotolueno (DANT). En el caso de bacterias anaerobias, tras la producción de 4-ADNT y 2-ADNT, estas se reducen a DANT a través de nitroreductasa NAD(P)H no específica. Luego, el DANT se transforma en DAHAT por hidrogenasa o monóxido de carbono deshidrogenasa, seguido de la formación de TAT por la sulfito reductasa disimilatoria (Serrano-González et al., 2018). Alternativamente, el DANT también puede reducirse directamente a TAT por *C. sordelli*, *C. biferrmentans* y *C. sporogenes* (Singh et al., 2013). El TAT puede reducirse sucesivamente a 2,4,6-trihidroxitolueno y luego a *p*-cresol. El *p*-cresol es un metabolito intermedio dentro de la vía de degradación del tolueno; se forma como resultado de la reducción de dos de los enlaces de hidróxido del anillo aromático del 2,4,6 trihidroxitolueno. La acción de la 4-cresol deshidrogenasa, transforma el *p*-cresol en 4-hidroxibenzaldehído, seguido de la oxidación del grupo metilo para formar 4-hidroxibenzoato. El 4-hidroxibenzoato se puede oxidar sucesivamente a Benzoil-CoA, que sufre una serie de reacciones: primero se convierte en 2,3 epoxibenzoil-CoA, seguidos de transformación en 3,4 dehidroapiril-CoA-semialdehído y luego 3,4 dehidroapiril-CoA para producir finalmente succinil-CoA y acetil-CoA (Mc Farland y Sara, 2016). Finalmente, el succinil CoA y acetil-CoA se incorporan en el ciclo del ácido cítrico (TCA), tal como se observa en la figura 3.



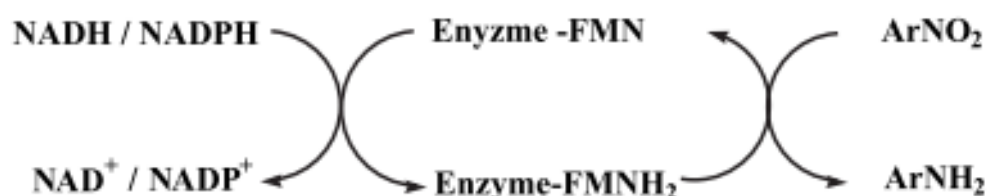
**Figura 3.** Vía de degradación aeróbica-anaeróbica del TNT. El esquema es basado en la base de datos de EWAG biocatálisis/biodegradación (Serrano-González et al., 2018).

## 2.5 Enzimas involucradas en la degradación del TNT.

Las nitroreductasas son un grupo de enzimas que reducen una amplia gama de compuestos nitroaromáticos tales como nitrofurazonas, nitroarenos, nitrofenoles y nitrobencenos, incluidos explosivos como el TNT, la ciclotrimetilentrinitramina (RDX) y la nitroglicerina (GTN). Los miembros de esta familia son flavoproteínas que usan NADPH / NADH como donantes de electrones. Las nitroreductasas se distinguen en dos grupos principales en función de su capacidad para metabolizar compuestos sustituidos con grupos nitro en presencia de oxígeno, las nitroreductasas de importancia para la degradación aeróbica del TNT son las de tipo I (Nyahongo et al., 2005; Maksimova et al., 2018).

### 2.5.1 Nitroreductasas tipo I (insensibles al oxígeno).

Las nitroreductasas insensibles al oxígeno reducen el TNT en una reacción que transfiere dos electrones incluso en presencia de oxígeno molecular. Las nitroreductasas tipo I se han descrito en muchas bacterias, particularmente en las Enterobacterias donde se les llama nitroreductosa clásica (Bryant y DeLuca, 1991). La mayoría de las nitroreductasas purificadas de bacterias son flavoproteínas solubles de tipo 1 que usan NADH o NADPH como donantes de electrones. Las nitroreductasas tipo I siguen un mecanismo cinético de “*ping-pong*” al transformar el TNT, donde los grupos FMN cambian de ciclo entre el estado neutral oxidado y el estado aniónico reducido. El FMN de la enzima se reduce primero por NADPH / NADH, seguido por la reducción del compuesto nitro sustituido, regenerando la enzima (figura 4). Estas enzimas no transfieren fácilmente un electrón al oxígeno molecular para formar radicales superóxidos como lo hacen las nitroreductasas tipo II (Singh et al., 2013).

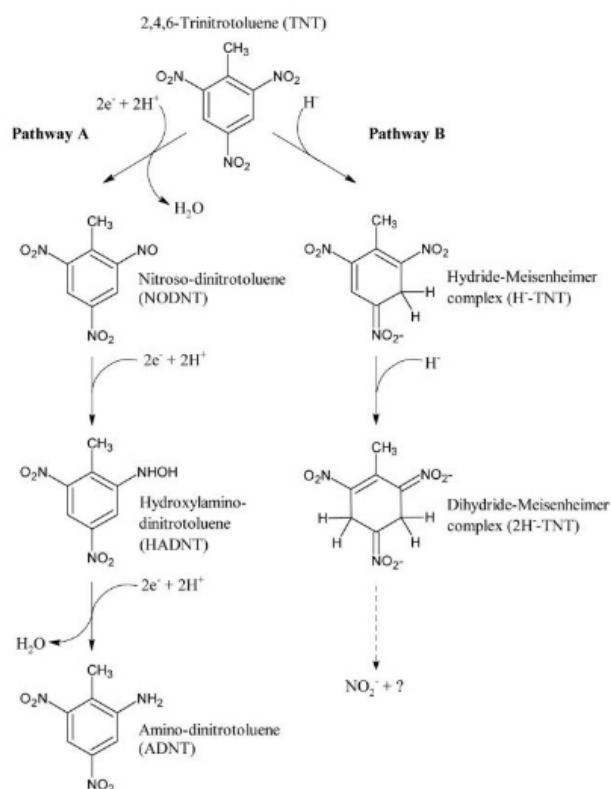


**Figura 4.** Mecanismo cinético de “*ping-pong*” durante la reducción de compuestos nitroaromáticos por nitroreductasas (Nyahongo et al., 2005).

### 2.5.2 Transferasas de hidruro de tipo II.

Es una flavoproteína de la familia de la NAD(P)H deshidrogenasa. La catálisis enzimática se puede identificar mediante una reacción de doble desplazamiento (un mecanismo no secuencial temporal), donde una enzima cambia a una forma intermedia cuando se produce la primera reacción de sustrato a producto (Van Dillewijn et al., 2008). Funciona en dos medias reacciones. Primero, la enzima produce FMNH<sub>2</sub> unido por reducción de NAD(P)H. En segundo lugar, una semirreacción oxidativa del TNT reoxida el FMNH<sub>2</sub> para producir la formación de complejos de mono y dihidruro-Meisenheimer, por dos vías posibles en competencia mutua: 1) reducción del grupo nitro presente en el TNT y 2) la adición nucleófila específica de iones de hidruro al TNT. La reacción del grupo nitro se produce más rápido debido al diferente potencial redox, y en la mayoría de los casos esta reacción comienza en el grupo *p*-nitro (Riefler y Smets, 2002).

Una transferasa de hidruro de tipo II es la PETN reductasa (PETNr), flavoenzima monomérica de 40 kDa encontrada por primera vez en *Enterobacter cloacae* PB2 que es capaz de catalizar tanto la nitroreducción de TNT como la reducción del anillo. PETNr se aisló a través de su capacidad para conferir resistencia a PETN, un explosivo de éster de nitrato, en la bacteria (Binks et al., 1996). La PETNr es miembro de la familia de flavoenzimas *Old Yellow Enzyme* y fue la primera de una serie de enzimas de esta familia que desde entonces han demostrado ser capaces de transformar explosivos (Williams et al., 2004). PETNr es capaz de liberar de forma reductora nitrito no solo de PETN y nitroglicerina, sino también de explosivos nitroaromáticos como TNT y ácido pícrico (figura 5).



**Figura 5.** Biotransformación de 2,4,6-trinitrotolueno catalizada por PETN reductasa de *Enterobacter cloacae* PB2 (Symons y Bruce, 2006).

La nitroreducción de compuestos aromáticos triples nitrados es más común. Muchas bacterias y enzimas han demostrado ser capaces de la nitroreducción oportunista de compuestos nitroaromáticos. Un ejemplo reciente es el de PnrA, una nitroreductasa dependiente de NADPH, homóloga a *nfsA*, la nitroreductasa de *Escherichia coli* (Caballero et al., 2006); capaz de transformar TNT para producir 4-hidroxilamino-2,6-DNT a través de un mecanismo *bi-ping* de *ping-pong*. Es capaz de reducir múltiples sustratos nitroaromáticos, incluidos 2,4-DNT, 3-nitrotolueno, 3-nitrobenzoato y 4-nitrobenzoato, 3,5-dinitrobenzamida y 3,5 dinitroanilina, aunque fue más eficiente con el TNT (Symons y Bruce, 2006).



## 2.6 Mecanismos bacterianos para la obtención de nitrógeno a partir del TNT.

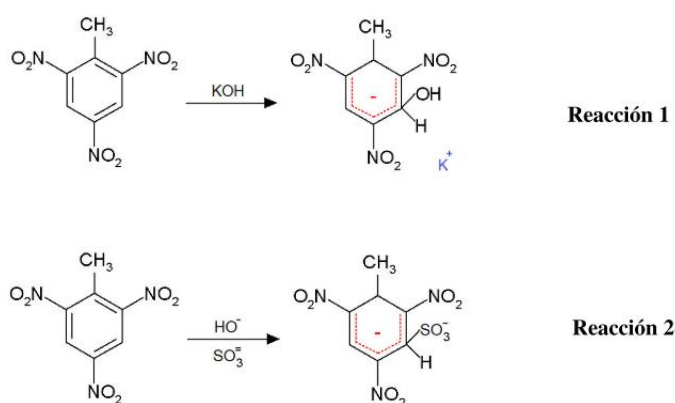
Existen dos rutas para la obtención de nitrógeno a partir de TNT, la forma más conocida es la vía de desnitrificación, demostrada mediante cromatografía líquida de alta eficacia (Stenuit et al., 2010); en la cual se da la condensación abiótica de isómeros de hidroxilamino-di-nitrolueno (HADNT) y de complejos de di-hidruro protonado de Meisenheimer, tras la condensación se producen cantidades estequiométricas de di-arilaminas y nitrito (González-Pérez et al., 2007; Wittich et al., 2009). El nitrito liberado participa en un proceso en donde participa la nitrito reductasa y luego se convierte en amonio. Después de esto, se asimila a través de la GS-GOGAT como último paso (Caballero et al., 2005).

La segunda vía es la de desaminación, en donde la utilización asimilatoria del TNT puede iniciarse mediante la transformación del TNT en HADNT's a través de la actividad del nitro reductasas, que a su vez experimentan un reordenamiento de Bamberger, isomerización catalizada por una mutasa que transforma compuestos hidroxilamino aromáticos a intermedios de aminofenol seguida de una reacción de desaminación catalizada por una liasa, terminando con una liberación de amonio asimilatorio, este mecanismo fue observado en *Escherichia coli* iJO1336, *P. pseudoalcaligenes* JS45, *Mycobacterium* sp. 4-NT, *Pseudomonas* 4-NT, (Nadeau y Spain, 2003; Stenuit et al., 2006; González-Pérez et al., 2007; Iman et al., 2017).

Es importante destacar que, si bien la vía de desnitrificación requiere solo dos equivalentes reductores para producir iones de amonio asimilables, la reacción de condensación con el complejo de dihidruro-Meisenheimer puede desviar los isómeros de HADNT hacia una ruta que requiere cinco equivalentes reductores adicionales para producir un equivalente de nitrógeno utilizable, lo que no es rentable para la célula. Además, los isómeros HADNT pueden conjugarse fácilmente con moléculas biológicas para formar residuos macromoleculares como los nitrosoaminodinitrotoluenos, que son los primeros intermediarios de la oxidación de HADNT, los cuales al reaccionar con las proteínas pueden inhibir el crecimiento de cepas metabolizadoras del TNT (Vorbeck et al., 1998). De manera similar, la asimilación microbiana de nitrógeno de los isómeros HADNT puede desviarse en la producción de isómeros de tetranitroazoxitolueno limitando la liberación de nitrógeno para la célula. Sin embargo, algunas de estas interferencias pueden ser prevenibles con una regulación correcta del contenido de oxígeno de la atmósfera (Claus et al., 2007).

## 2.7 Detección del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) mediante el método colorimétrico- espectrofotométrico.

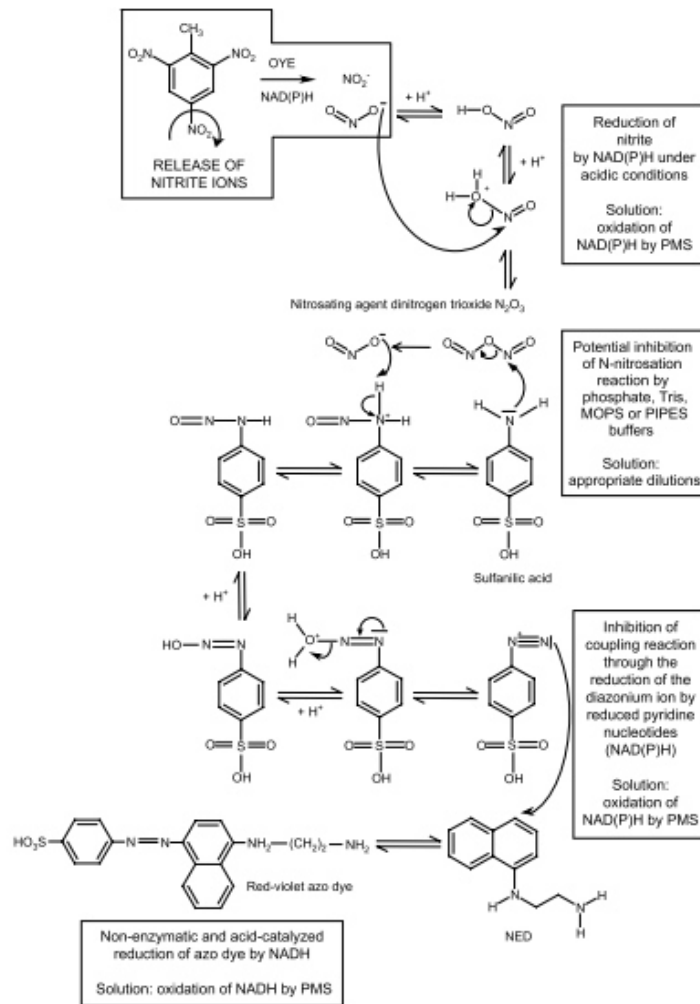
Este método está basado en la reacción de compuestos poliaromáticos y un álcali (figura 6, como lo son el hidróxido de sodio (NaOH) o el hidróxido de potasio (KOH), ya que dicha reacción produce aniones Jackson-Meisenheimer, los cuales generan un cambio de coloración visible (Felt et al., 2002). La formación clásica de aniones Jackson-Meisenheimer se da rápidamente por la adición de una base en la posición 3 del anillo de trinitrotolueno (reacción 1); sin embargo, los aniones son inestables termodinámicamente, por ello se adiciona iones sulfito al anillo aromático lo que generaría un anión más estable (reacción 2).



**Figura 6.** Formación de los aniones Jackson-Meisenheimer (Peceros, 2019).

## 2.8 Detección de nitritos mediante la reacción de Peter Griess.

La liberación de nitrito procedente del TNT generalmente se detecta mediante un ensayo colorimétrico simple a través de una reacción de diazotación (figura 7). El nitrito reacciona en condiciones ácidas con ácido sulfanílico para formar un catión de diazonio que posteriormente se acopla a 1-naftilamina para producir un colorante azo soluble en agua de color rojo violeta (Stenuit y Agathos, 2009). Además, Bratton y Marshall (1939) propusieron una variante de la reacción de Peter Griess original con el uso de sulfanilamida y N-1-naftiletilendiamina (NED). Este ensayo rápido, es muy adecuado para la selección de microorganismos de alto rendimiento de que pueden desnitrificar el TNT; sin embargo, debido a la variabilidad que pueden existir entre los resultados se considerará como semi cuantitativo (Stenuit et al., 2004).



**Figura 7.** Cuantificación colorimétrica de iones nitritos liberados por el TNT mediante la reacción de Peter Griess y posibles interferencias (Stenuit y Agathos, 2009).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales.

**3.1.1** Muestra: Tetranitrato de pentaeritritol (PETN) húmedo contaminado.

**3.1.2** Material químico: 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) (pureza 99%). Se disolvió 100 mg de TNT en 10 mL de acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ) para obtener una concentración de 10 000 g/L. Luego de ser

agregado a los medios de cultivo, el solvente se dejó evaporar por 12 horas a 180 rpm para evitar interferencias en los ensayos.

### **3.2 Metodología.**

#### **3.2.1 Aislamiento bacteriano y caracterización cultural.**

Para el aislamiento y descripción de las características culturales de las colonias, se diluyó 10 g o 10 mL de la muestra en 90 mL de agua peptonada (1% Peptona y 0.5% NaCl) y se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada hasta  $10^{-3}$ . Seguidamente, 100  $\mu$ L de cada dilución fue diseminado por triplicado en medio Agar Tripticasa de Soya (TSA) e incubado a 30 °C por 48 horas. Las colonias con morfología única fueron subsecuentemente aisladas por agotamiento en medio TSA dos veces, se describió las características culturales y además se realizó tinción Gram de cada colonia con morfología única.

$10^{-3}$

#### **3.2.2 Identificación molecular.**

Para la identificación de las bacterias se realizaron pruebas moleculares, según se detalla a continuación:

##### **3.2.2.1 Extracción del ADN y amplificación por la PCR.**

Las cepas con características culturales diferentes fueron cultivadas en medio Caldo Tripticasa de Soya (TSB) por 32-48 horas a 30 °C y el protocolo estuvo sujeto a las indicaciones del kit *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen). Se cuantificó por fluorimetría Qubit® (Invitrogen). Para la amplificación del gen *16S rDNA* bacteriano se emplearon los cebadores 27F (5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') y 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT-3'), el tamaño del producto de la PCR esperado fue de 1468 pb correspondiente al primer tramo del gen (Abanto et al., 2013) y se siguió las indicaciones del kit *KOD HOT start DNA-polimerase* (Novagen®) para la reacción de la PCR, la cual consistió en: desnaturalización inicial 94 °C por 2 minutos,

34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación a 55 °C por 1 minuto, amplificación a 72 °C por 2 minutos y amplificación final a 72 °C por 10 minutos.

Para visualizar los productos de la PCR, se utilizó la cámara de electroforesis Biometra® y geles de agarosa. Los geles se prepararon con agarosa al 1% en tampón TAE al 0.5%. Además, se utilizó una solución de azul de bromofenol (0.25%) y sacarosa (40%) como buffer de carga, la cual se mezcló con los amplicones. El marcador de tamaño molecular usado fue de 1 kb *DNA Ladder* (Promega®) y la tinción del ADN se realizó empleando *GelRed*. El tiempo de corrida fue de 40 minutos a 70 V. Las bandas se observaron por fluorescencia emitida en un transiluminador Biometra® de luz UV (320 nm).

### **3.2.2.2 Secuenciamiento e identificación molecular.**

Los amplificados fueron secuenciados por la empresa MACROGEN INC (Korea), para lo cual se envió 50 µL de reacción. Los productos de secuenciamiento fueron curados usando el programa Chromas v.2.6.6. En el cual se eliminó los iniciadores y se desestimó regiones con baja calidad de secuenciamiento. Se generó las secuencias consenso usando el programa Cap3 y se realizó un alineamiento contra la base de datos del NCBI, a través de la herramienta Blast N (Johnson et al., 2008).

### **3.2.2.3 Análisis filogenético.**

Se construyó un árbol filogenético basado en el gen *16S rDNA* con el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). El árbol filogenético fue reconstruido por el método agrupativo de *Neighbor-Joining*, con un *bootstrap* de 1000 réplicas y la distancia evolutiva fue calculada mediante el modelo *Kimura two-parameter*.

### **3.2.3 Determinación del crecimiento bacteriano mediante la medición de la densidad óptica.**

Las cepas bacterianas se reactivaron en 10 mL de medio CASO y se incubó a 30 °C por 18 horas, luego se agregó 300 µL del reactivado a 10 mL de medio CASO (inoculo 3%) y se dejó incubando por 12 horas hasta que alcanzó la turbidez similar al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland.

Posteriormente se recolectó todo el volumen y se centrifugó a 7500 rpm por 8 minutos empleando un tubo de centrifuga de 15 mL. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular fue resuspendido en 1.5 mL PBS 1X, se transvasó a un tubo centrifuga de 2 mL y se centrifugó a 13000 rpm por 8 minutos, luego se descartó el sobrenadante y se repitió este paso 3 veces. Posteriormente, se inoculó al 3% en 10 mL de medio CASO y se dispensó un volumen de 150 µL del medio previamente inoculado en cada pocillo de la microplaca, este último paso fue realizado por triplicado, contando con 3 pocillos de medio inoculado por cada cepa bacteriana y adicionalmente 1 pocillo de medio CASO sin bacteria, considerado como control negativo. La microplaca se incubó a 30 °C y 180 rpm. Finalmente, la medición de la absorbancia se llevó a 600 nm en intervalos de 1 hora por 60 horas empleando el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ 2. Los datos fueron analizados empleando el programa GraphPad Prism 8 (Swift, 1997).

### **3.2.4 Selección de cepas bacterianas capaces de utilizar TNT como fuente de nitrógeno.**

Se procedió de la misma manera que en el apartado 3.2.3, con la diferencia que, el medio de cultivo a inocular será el medio libre de nitrógeno (MLN) modificado de Durán (2013) constituido por(g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3.5); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.5); MgSO<sub>4</sub> (0.124); NaCl (10), ácido succínico (10) y glucosa (10) a pH 7.05 ±0.2. El medio fue preparado a concentraciones de TNT de 0 ppm, 20 ppm, 60 ppm

y 100 ppm, y para cada concentración se empleó como control negativo MLN sin inóculo bacteriano. Los matraces se incubaron en agitación a 180 rpm a 30 °C por 60 horas.

Paralelamente, se llevó a cabo un ensayo en microplaca, a partir de los matraces anteriormente inoculados. Brevemente, la microplaca contaba con 3 pocillos por cada cepa bacteriana analizada en una determinada concentración de TNT, por ejemplo; la cepa bacteriana S3B contaba con 3 pocillos con el MLN a una concentración de TNT de 0 mg/L, otros 3 pocillos con MLN a una concentración de TNT de 20 mg/L y así sucesivamente. De este modo, se enfrentó cada una de las 5 cepas bacterianas con las 4 concentraciones de TNT. Los controles negativos fueron 4, uno por cada concentración de TNT. Las condiciones de incubación y tiempos de lectura fueron los mismos que en el apartado 3.2.3.

### **3.2.5 Crecimiento de la cepa bacteriana S3B en MLN suplementado con diversas concentraciones de TNT.**

Previa selección de la cepa bacteriana con mayor crecimiento en MNL suplementado con 100 ppm de TNT, se siguió la misma metodología abarcada en el punto 3.2.4 pero esta vez empleando concentraciones de TNT de 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 100 ppm, 200 ppm y 300 ppm.

### **3.2.6 Determinación de la $\lambda_{\max}$ de los aniones Jackson-Meisenheimer.**

En el caso de la determinación de los aniones de Jackson-Meisenheimer, se preparó una solución de 100 ppm de TNT en agua destilada. En un tubo de ensayo se añadió 1 mL de la solución, 1 mL de acetona y 0.5 mL de KOH (0.1 N) y 0.8 mL de 0.12 M de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  anhidro, luego de 5 minutos de incubación se realizó un barrido espectrofotométrico en el rango de 300 nm a 700 nm, con intervalo de 1 nm, utilizando el espectrofotómetro

para microplacas Epoch™ 2. El análisis de la data se realizó empleando el programa GraphPad Prism 8 (Swift, 1997).

### **3.2.7 Determinación de la $\lambda_{max}$ del colorante azo (reacción de Peter Griess).**

Para ello, se preparó una solución de 100 ppm de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ) en agua destilada. En un tubo de ensayo se añadió 1 mL de la solución, 0.4 mL de la solución de ácido sulfanílico y 0.2 mL de la solución con N-(1-naftil)-etilendiamina, finalmente al igual que con los aniones, se realizó un barrido espectrofotométrico en el rango de 300 nm a 700 nm, con intervalo de 1 nm, utilizando el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ 2. El análisis de la data se realizó empleando el programa GraphPad Prism 8 (Swift, 1997).

### **3.2.8 Determinación de la degradación del TNT por la cepa bacteriana S3B.**

La cepa seleccionada, se reactivó en 10 mL de medio CASO y se incubó a 30 °C por 18 horas, luego se agregó 300  $\mu\text{L}$  del reactivado a 10 mL de medio CASO (inoculo 3%) y se dejó incubando por 12 horas hasta que alcanzó la turbidez similar al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland. Posteriormente, se recolectó todo el volumen y se centrifugó a 7500 rpm por 8 minutos empleando un tubo de centrifuga de 15 mL. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular fue resuspendido en 1.5 mL PBS 1X, se transvasó a un tubo centrifuga de 2 mL y se centrifugó a 13000 rpm por 8 minutos, luego se descartó el sobrenadante y se repitió este paso 3 veces. Posteriormente, se inoculó al 3% en un medio libre de nitrógeno modificado de Durán (2013) constituido por (g/L):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (3.5),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.5),  $\text{MgSO}_4$  (0.124), NaCl (10), ácido succínico (10) y glucosa (10) a pH  $7.05 \pm 0.2$ .



El medio fue preparado a la concentración de 100 ppm. Los matraces se incubaron en agitación a 180 rpm a 30 °C por 5 días, se tomó 1 punto por día.

### **3.2.8.1 Determinación del TNT residual.**

Para la determinación de TNT se mezcló 1 mL de muestra, previa agitación, 1 mL de acetona, 0.5 mL de KOH (0.1 N) y 0.8 mL de 0.12 M de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> anhidro, para estabilizar el producto de reacción (Jenkins, 1990); luego, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura por triplicado a 463 nm. El porcentaje de degradación de TNT (R<sub>TNT</sub>) se calculó según la siguiente ecuación:

$$R_{TNT} = \frac{TNT_0 - TNT_1}{TNT_0} \times 100$$

R<sub>TNT</sub>: porcentaje de degradación de TNT.

TNT<sub>0</sub>: Absorbancia del TNT en el tiempo 0.

TNT<sub>1</sub>: Absorbancia del TNT en el tiempo 1.

Los datos fueron analizados empleando el programa GraphPad Prism 8 (Swift, 1997).

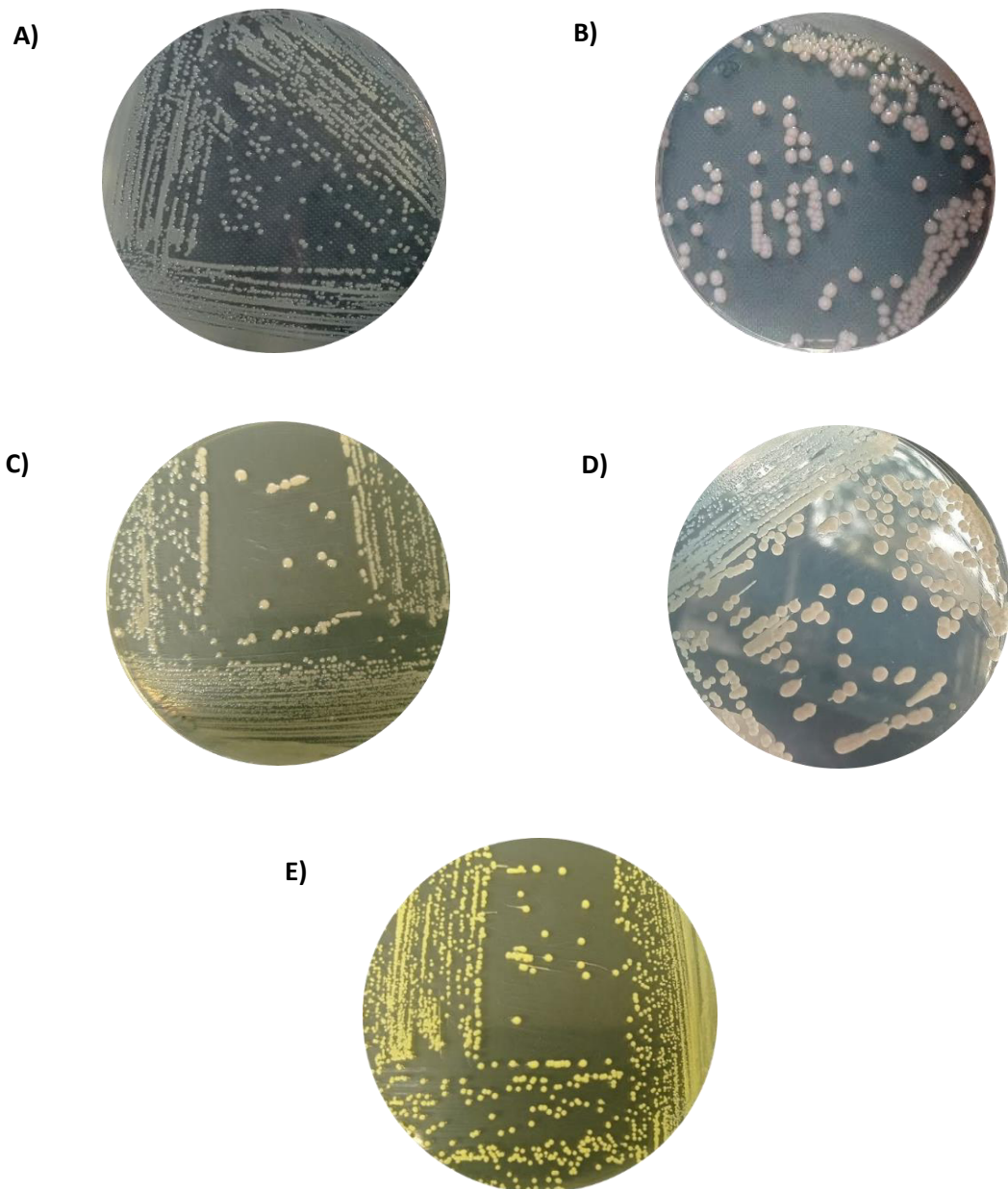
### **3.2.8.2 Detección de nitritos.**

El ensayo se realizó mediante la reacción de Peter Griess. Con esta finalidad, primero se preparó la solución con N-(1-naftil)-etilendiamina (NED), 0.13 g de NED fue diluido en 100 mL de ácido acético al 15% (v/v); luego, para la solución con ácido sulfanílico se diluyó 0.33 g de sulfanilamida en 100 mL de ácido acético al 15% (v/v). Para la determinación de la concentración de nitritos, se mezcló 1 mL del sobrenadante de cada muestra, 0.4 mL de la solución de ácido sulfanílico y 0.2 mL de la solución NED, y se midió la absorbancia por triplicado a 361 nm.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterización cultural de las colonias aisladas.

Como resultado del aislamiento, se obtuvieron 5 colonias diferenciadas principalmente por su forma, borde y coloración en agar TSA, tras 48 horas de incubación a 30 °C. Las características culturales, son descritas en la tabla 3 y se observan en la figura 8.



**Figura 8.** Cepas bacterianas aisladas en agar TSA tras 48 horas de incubación a 30 °C. A) Cepa SM2, B) Cepa S2, C) Cepa SM4, D) Cepa S3B y E) Cepa SM6.

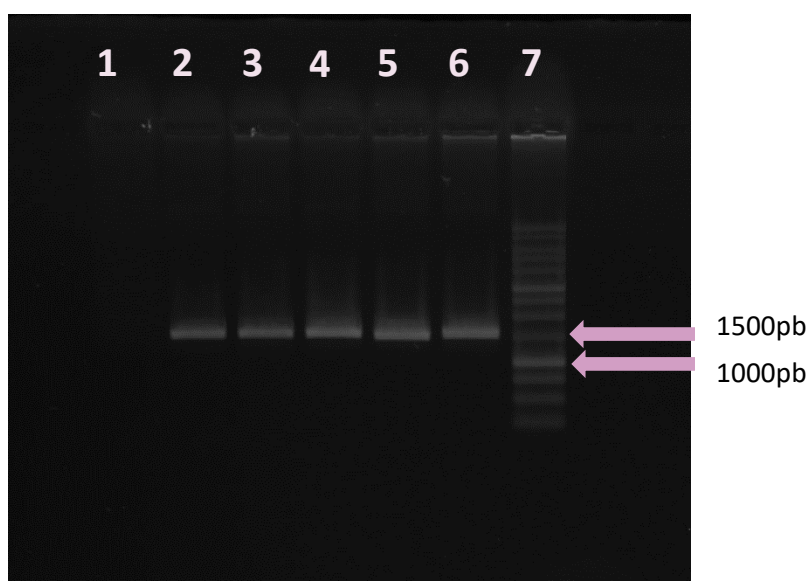
**Tabla 3.** Caracterización macroscópica y coloración Gram de los 5 aislados.

<b>Característica</b>	<b>Código</b>				
	<b>SM6</b>	<b>S2</b>	<b>SM2</b>	<b>S3B</b>	<b>SM4</b>
<b>Forma</b>	Circular	Circular	Puntiforme	Circular-Ovoide	Circular
<b>Borde</b>	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero
<b>Elevación</b>	Elevada	Umbonada	Elevada	Plana	Elevada
<b>Superficie</b>	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
<b>Color</b>	Amarillo	Beige	Blanco	Beige	Blanco - Amarillento
<b>Consistencia</b>	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa	Cremosa
<b>Coloración Gram</b>	Gram positiva	Gram positiva	Gram negativa	Gram negativa	Gram positiva
<b>Morfología Celular</b>	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos	Bacilos

## 4.2 Identificación molecular.

Se realizó una identificación molecular mediante el método de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el objetivo fue amplificar el gen *16S ADN*, ampliamente utilizado en filogenia bacteriana, para ello se emplearon los *primers* universales 27F y 1492R cuyo producto de amplificación es cercano a los 1500 pb.

Los productos de amplificación de las 5 cepas estudiadas, coinciden con un valor cercano 1500 pb según el estándar de pesos moleculares que contiene fragmentos de ADN desde 250 pb hasta los 10 000 pb (Figura 9).



**Figura 9.** Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de los productos de amplificación correspondientes al gen *16S DNAr*. Carril 1) control negativo, carril 2) cepa SM4, carril 3) cepa SM2, carril 4) cepa S2, carril 5) cepa SM6, carril 6) cepa S3B y carril 7) Marcador de 1Kb de Promega®.

Los productos de secuenciamiento fueron curados usando el programa Chromas v.2.6.6 en el cual se eliminó los iniciadores y se desestimó regiones con baja calidad de secuenciamiento, luego de la generación de secuencias consenso usando el programa Cap3, se realizó un alineamiento contra la base de datos del NCBI, a través de la herramienta BlastN; obteniendo los resultados observados en la tabla 4. De las 5 cepas aisladas, 3 de ellas pertenecen al género *Microbacterium*, mientras SM2 pertenece al género *Acidovorax* y la cepa

S3B pertenece al género *Diaphorobacter*. Sin embargo, en ninguna de las cepas se llegó a determinar la especie bacteriana (tabla 4).

La identidad de las bacterias, tuvo correlación con la tinción Gram, las 3 bacterias clasificadas como Gram positivas pertenecían al género *Microbacterium*, y las 2 bacterias Gram negativas pertenecían a los géneros *Acidovorax* y *Diaphorobacter*.

**Tabla 4.** Especies y porcentaje de identidad a nivel molecular de las 5 cepas bacterianas aisladas.

Cepa	Especie identificada y código de acceso	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura (%)	E-value	Identidad (%)
SM4	<i>Microbacterium</i> sp. (MG228460.1)	2555	2555	100	0.0	99.64
SM2	<i>Acidovorax</i> sp. T1 (KX162718.1)	2542	10168	100	0.0	100.00
S2	<i>Microbacterium</i> sp. (KR906337.1)	2246	2246	100	0.0	99.35
SM6	<i>Microbacterium</i> sp. (MN810190.1)	2444	2444	100	0.0	100.00
S3B	<i>Diaphorobacter</i> sp. (MT361874.1)	2551	2551	100	0.0	100.00

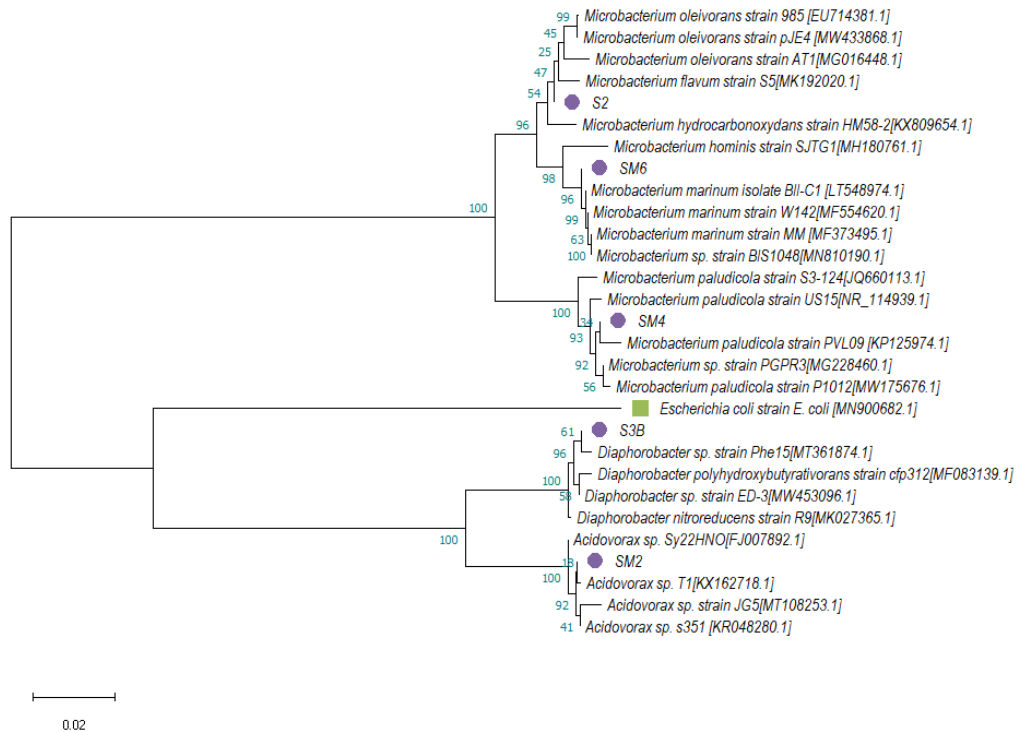
#### 4.3 Análisis filogenético.

Se realizó un análisis filogenético empleando 24 secuencias nucleotídicas diferentes del gen *16S rDNA* de especies bacterianas estrechamente relacionadas a las cinco cepas del estudio según Blast N, los códigos de acceso pueden observarse al lado del nombre de cada especie en el árbol (figura 10). Como grupo externo se empleó a *E. coli* [MN900682.1].

La topología del árbol confirma que la cepa S2, se encuentra dentro del mismo clado que otras especies del género *Microbacterium*, como lo son *M. oleivorans*, *M. hydrocarbonoxydans* y *M. flavum*; presentando una relación más cercana con los dos últimos géneros. Por otro lado, la cepa SM6, se encuentra dentro del mismo clado con bacterias pertenecientes a la especie *M. marinum*, la robustez de dicho clado es de 98% lo que se considera significativo. En el caso de SM4,

se encuentra en un clado junto a bacterias de la especie *M. paludicola*, dicho clado obtuvo una robustez del 100% lo que confirma su relación filogenética. Cabe mencionar que tanto S2, SM6 y SM4 pertenecen al género bacteriano *Microbacterium*, lo que queda confirmado en el árbol ya que las cepas parten de un mismo nodo, conformado un clado con una robustez del 100%. También se pudo demostrar que la cepa S3B se encuentra estrechamente relacionada con especies del género bacteriano *Diaphorobacter*, perteneciendo al mismo clado con una robustez del 100%. Asimismo, la cepa SM2 pertenece a un clado bacteriano junto con especies del género *Acidovorax*, la robustez de este árbol es del 100% lo que confirma su relación filogenética.

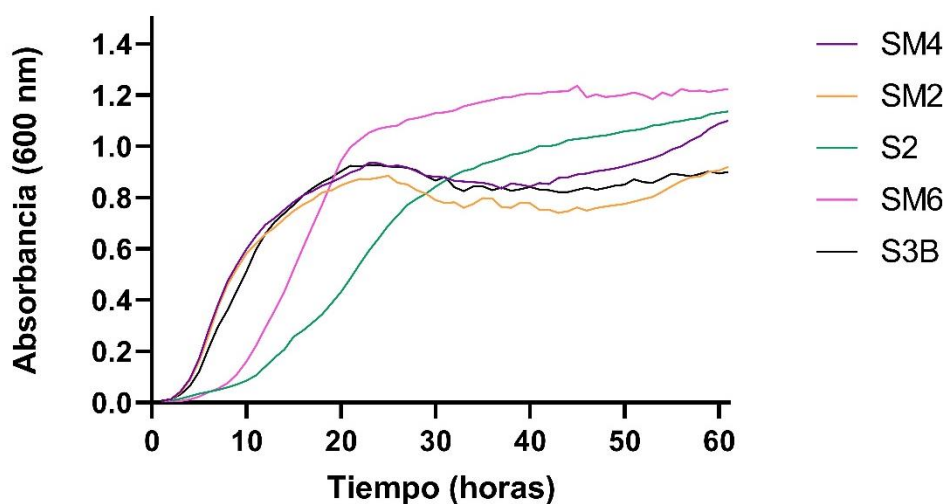
Adicionalmente, se puede destacar que las cepas S3B y SM2 parten de un mismo nodo ancestral perteneciendo ambas a un mismo clado con una robustez del 100% (figura 10).



**Figura 10.** Árbol filogenético Neighbor-Joining de las 5 cepas bacterianas aisladas, en base a la secuencia nucleotídica del gen *16S DNAr*. Los valores de *bootstrap* son mostrados en el punto de ramificación como porcentaje de 1000 réplicas. Las cepas del estudio cuentan con un punto morado al lado del nombre, mientras el cuadrado verde indica el grupo externo.

#### 4.4 Determinación del crecimiento bacteriano mediante la medición de D.O.

La determinación del crecimiento se llevó a cabo por el método de espectrofotometría a una D.O. 600 nm y el ensayo tuvo una duración de 60 horas, el medio empleado fue TSB, los resultados se pueden observar en la figura 11. Se determinó que el tiempo medio de la fase exponencial de la cepa SM4 fue a las 12 horas con una absorbancia de 0.69, para la cepa SM2 fue a las 10 horas con una absorbancia de 0.58, en el caso de la cepa S2 fue a las 20 horas con una absorbancia de 0.43, para la cepa SM6 fue a las 15 horas con una absorbancia de 0.52 y finalmente para la cepa S3B fue a las 9 horas con una absorbancia de 0.44. La cepa que demoró más para llegar al tiempo medio de la fase exponencial, fue la cepa S2 seguida de SM6, mientras que la cepa que demoró menos en alcanzar dicha fase fue la cepa S3B en tan solo 9 horas. El tiempo medio de la fase exponencial es un dato relevante a tomar en cuenta para los ensayos posteriores.



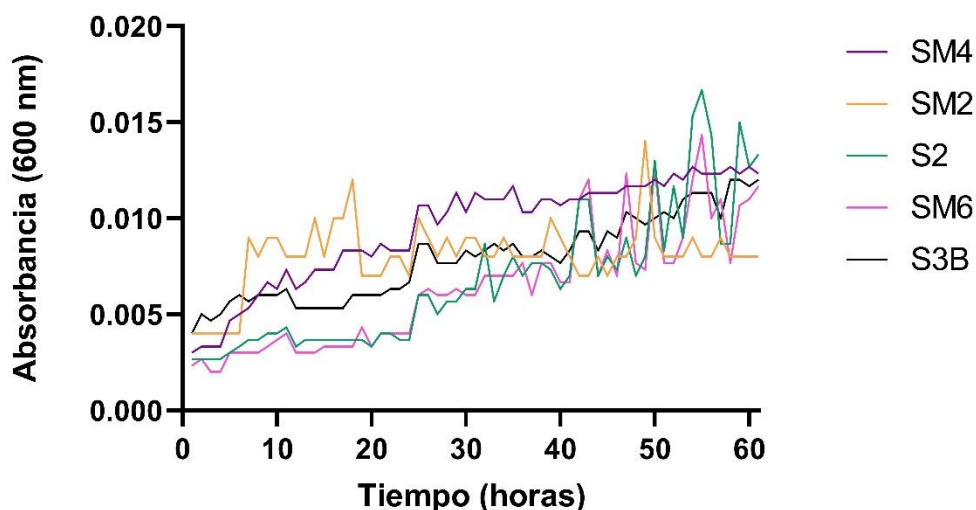
**Figura 11.** Determinación del crecimiento de las cepas SM4, SM2, S2, SM6 y S3B en medio TSA, los datos fueron obtenidos mediante densidad óptica.

#### 4.5 Selección de cepas bacterianas capaces de utilizar TNT como fuente de nitrógeno.

Para determinar el uso de TNT como fuente de nitrógeno por parte de las bacterias se midió el crecimiento mediante el método espectrofotométrico por 60 horas, empleando concentraciones de 20 ppm, 60 ppm y 100 ppm. Para descartar la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno se realizó un ensayo

en las mismas condiciones anteriormente mencionadas, pero empleando el medio sin TNT (0 ppm de TNT), y sin ninguna fuente de nitrógeno adicional.

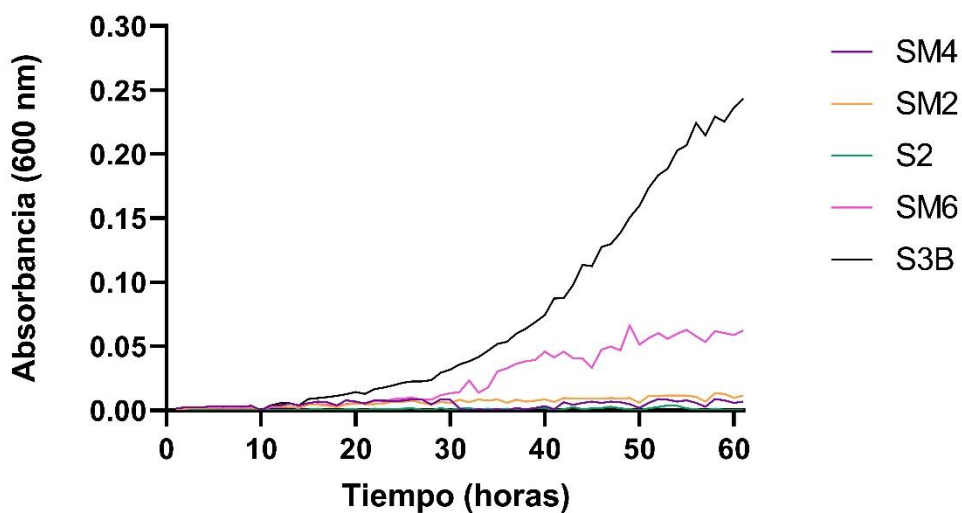
El resultado del crecimiento bacteriano sin ninguna fuente de nitrógeno puede observarse en la figura 12. Estos resultados indican que ningún aislado fue capaz de crecer en ausencia de este elemento en un lapso de 60 horas, por lo que se descarta la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno, lo que podría interferir en próximos ensayos experimentales.



**Figura 12.** Determinación del crecimiento de las cepas SM4, SM2, S2, SM6 y S3B en medio libre de nitrógeno, los datos fueron obtenidos mediante densidad óptica.

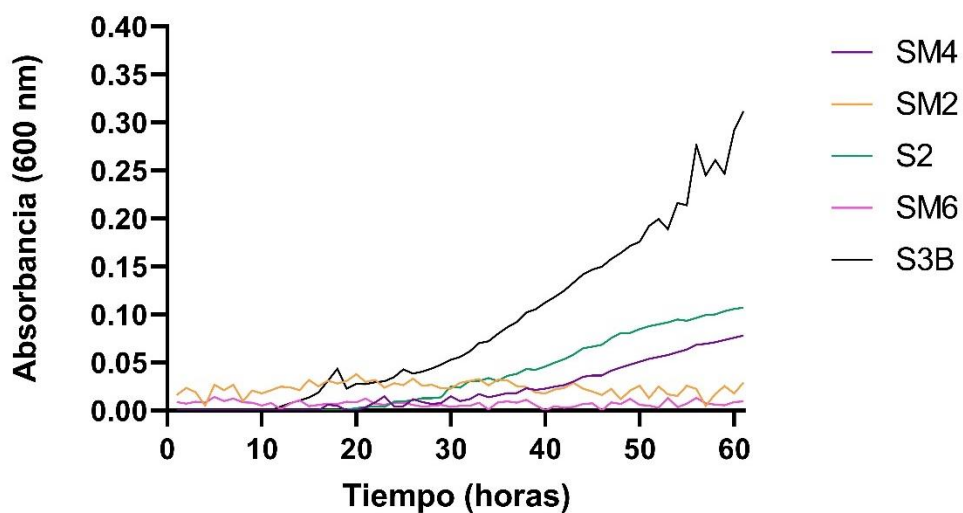
La determinación del crecimiento en medio libre de nitrógeno (MLN) suplementado con TNT a la concentración de 20 ppm brindó los resultados observados en la figura 13. Las cepas bacterianas que lograron obtener un crecimiento significativo fueron S3B y SM6. La densidad óptica alcanzada al término de la incubación (60 horas) fue 0.24 para S3B y 0.06 para SM6. La cepa S3B obtuvo cerca del cuádruple de la absorbancia (600 nm) obtenida por SM6.





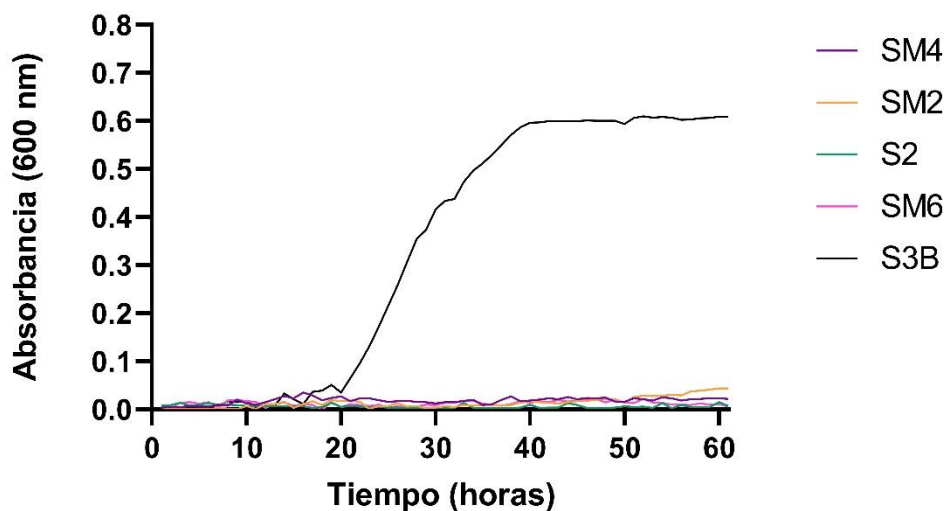
**Figura 13.** Determinación del crecimiento de las cepas SM4, SM2, S2, SM6 y S3B en MLN suplementado con 20 ppm de TNT, los datos fueron obtenidos mediante densidad óptica.

En el crecimiento bacteriano en MLN suplementado con 60 ppm de TNT como única fuente de nitrógeno, la cepa S3B volvió a tener la mayor D.O., llegando al valor de 0.31 al término de las 60 horas, las cepas S2 y SM4 alcanzaron las absorbancias a 600 nm de 0.11 y 0.07 respectivamente. Las demás cepas no obtuvieron un crecimiento significativo, tal como se observa en la figura 14.



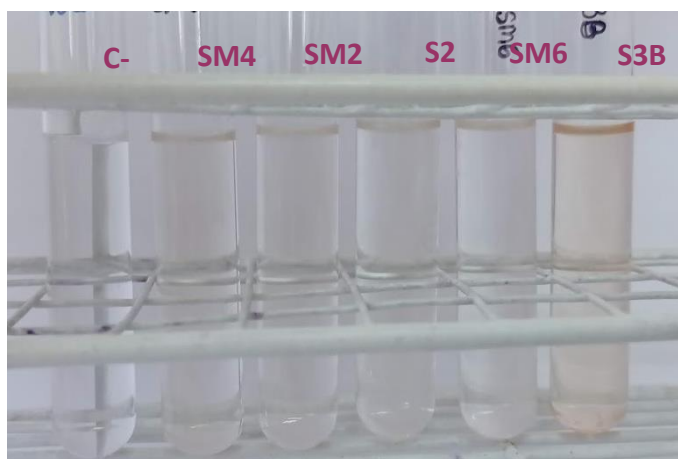
**Figura 14.** Determinación del crecimiento de las cepas SM4, SM2, S2, SM6 y S3B en MLN suplementado con 60 ppm de TNT, los datos fueron obtenidos mediante densidad óptica.

Finalmente, el crecimiento bacteriano en MLN con 100 ppm de TNT tuvo un claro resultado, la única cepa bacteriana capaz de tolerar dicha concentración y crecer en estas condiciones fue S3B. El valor máximo de D.O., alcanzado fue de 0.60 al término de las 60 horas (Figura 15).



**Figura 15.** Determinación del crecimiento de las cepas SM4, SM2, S2, SM6 y S3B en MLN suplementado con 100 ppm de TNT, los datos fueron obtenidos mediante densidad óptica.

El crecimiento de la cepa S3B también fue evidenciado, al cambio de color del MLN, el cual pasó de un tono transparente translúcido a un tono rojizo-anaranjado, la fotografía fue tomada a las 38 horas (figura 16).

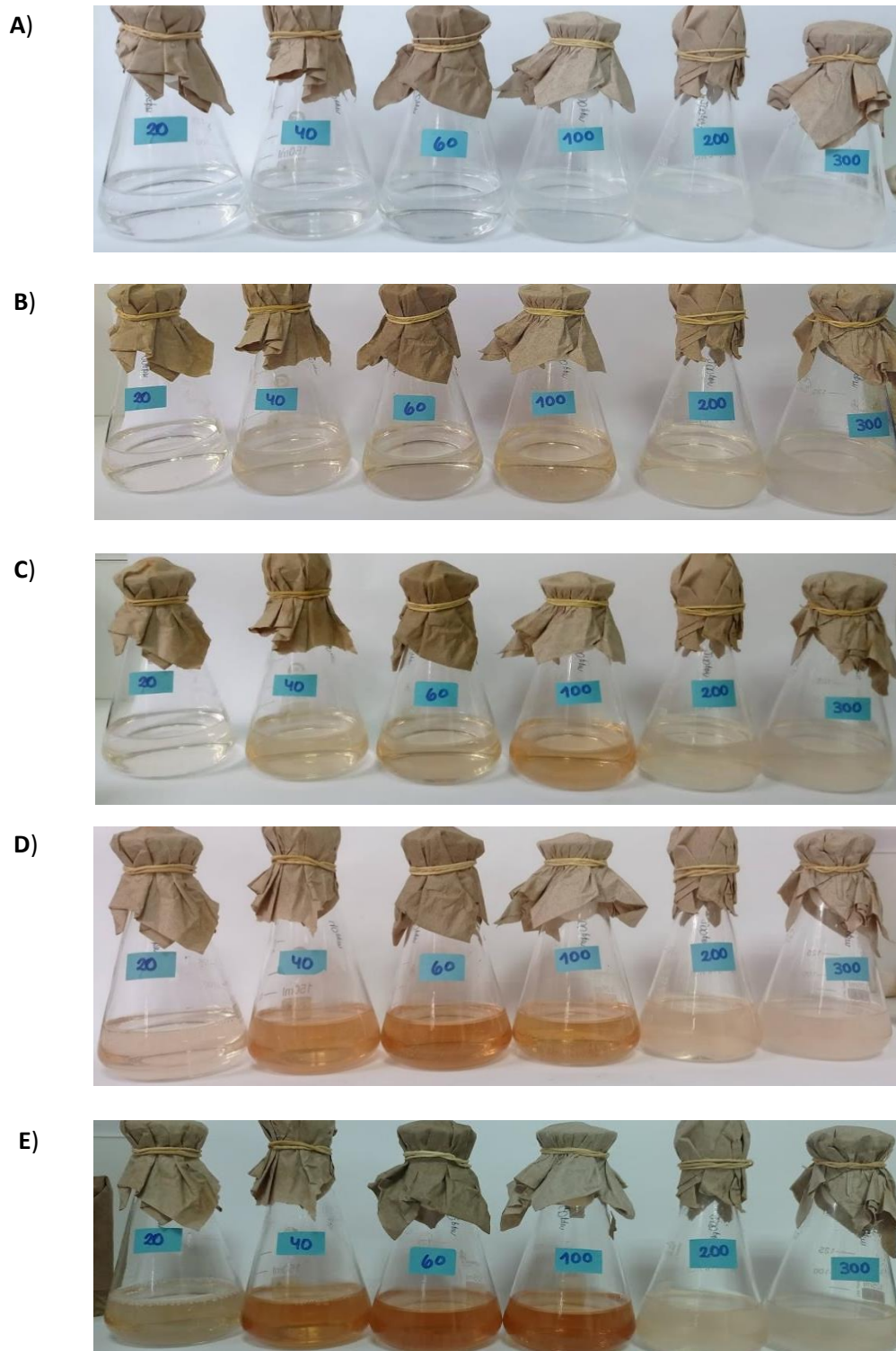


**Figura 16.** Tubos con MLN suplementado con 100 ppm de TNT a las 38 horas. 1) Control negativo, 2) SM2, 3) SM4, 4) S2, 5) SM6 y 6) S3B.

#### **4.6 Crecimiento de la cepa bacteriana S3B en MLN suplementado con diversas concentraciones del TNT.**

En ensayos anteriores se emplearon concentraciones de 20 ppm, 60 ppm y 100 ppm de TNT; por lo que en este ensayo se enfrentó únicamente a la cepa S3B con concentraciones mayores de 200 ppm y 300 ppm, adicional a las concentraciones anteriormente ensayadas; sin embargo, la medición de la D.O., a 600 nm fue infructífera debido a la interferencia del TNT en estado coloidal. De igual manera se incubaron los matraces y se tomaron fotografías a diferente tiempo para observar la variación de color del MLN a diferentes concentraciones de TNT.

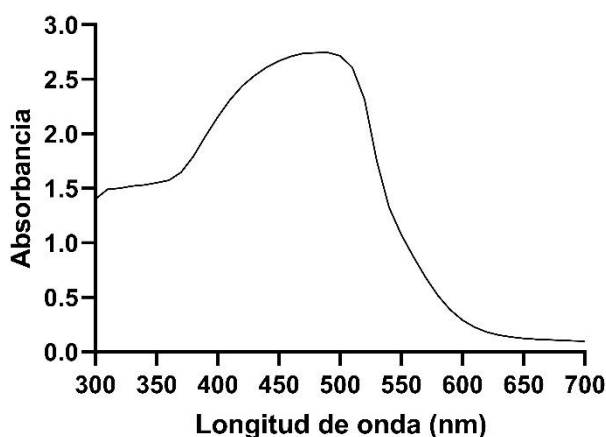
Como se observa en la figura 17 (A-E) existe un cambio de coloración del medio notable en los matraces con concentraciones de 40 ppm, 60 ppm y 100 ppm, especialmente en las dos últimas se puede observar en el último punto un color anaranjado-rojizo intenso. Sin embargo, en las concentraciones 200 ppm y 300 ppm no se llegó a observar un cambio significativo, solo un ligero viraje de blanquecino a rosa palo, lo que puede indicar que a esta concentración el xenobiótico impidió el crecimiento del microorganismo (figura 17).



**Figura 17.** Crecimiento de la cepa S3B en MLN a diferentes concentraciones de TNT (de 20 ppm a 300 ppm) y en diferentes tiempos. A) 0 horas, B) 24 horas, C) 48 horas, D) 72 horas y E) 96 horas.

#### 4.7 Determinación de la $\lambda_{\text{max}}$ de los aniones Jackson-Meisenheimer.

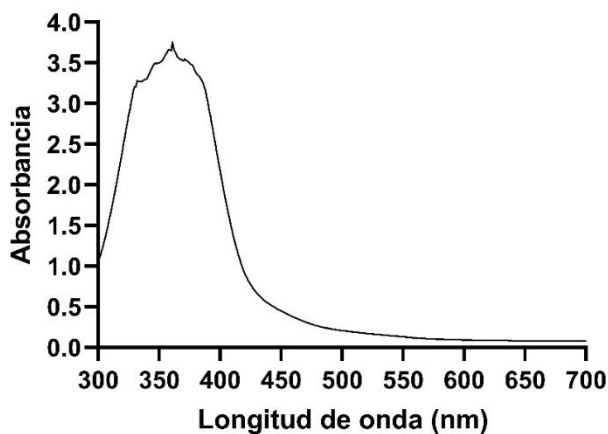
Se halló la longitud de onda con máxima absorbancia para la detección de los aniones de Jackson-Meisenheimer, empleando una concentración de 100 ppm de TNT. Se determinó que el  $\lambda_{\text{max}}$  es de 483 nm. El barrido espectrofotométrico comprendió desde 300 nm a 700 nm, con un intervalo de 1 nm (figura 18).



**Figura 18.** Obtención del  $\lambda_{\text{max}}$  de los aniones de Jackson-Meisenheimer.

#### 4.8 Determinación de la $\lambda_{\text{max}}$ del colorante azoico (reacción de Peter Griess).

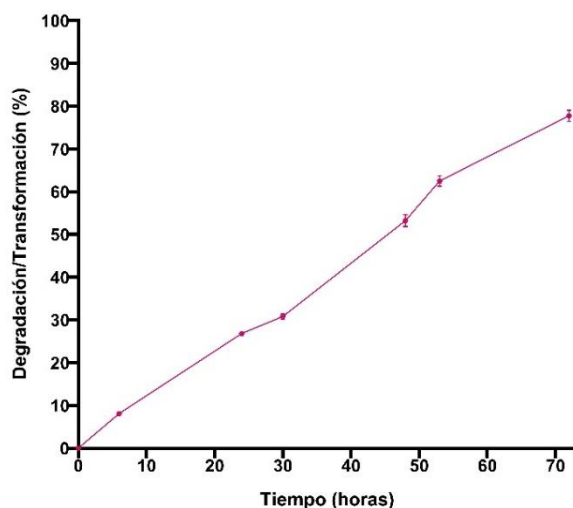
Se determinó la longitud de onda con máxima absorbancia para la detección de los aniones del colorante azoico producto de la reacción de Peter Griess empleando una concentración de 100 ppm de nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ). La  $\lambda_{\text{max}}$  fue de 361 nm, el barrido espectrofotométrico comprendió desde 300 nm a 700 nm, con un intervalo de 1 nm (figura 19).



**Figura 19.** Obtención del  $\lambda_{\text{max}}$  del colorante azoico (Reacción de Peter Griess).

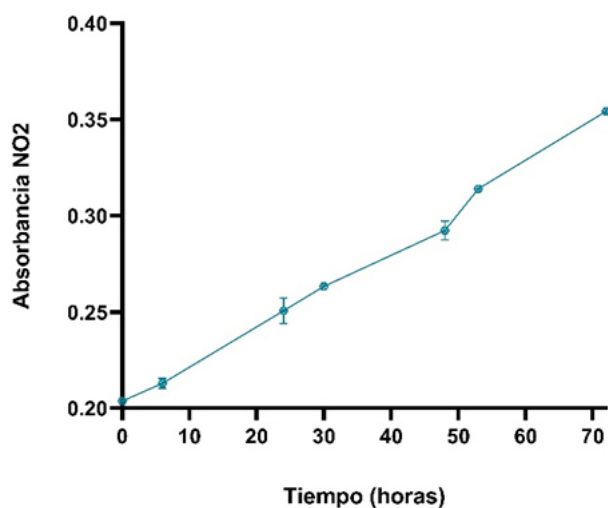
#### 4.9 Determinación de la degradación del TNT.

La determinación de la degradación del TNT de la cepa S3B en MLN suplementado con TNT a concentración de 100 ppm como única fuente de nitrógeno tuvo una duración de 72 horas y el porcentaje de degradación en el último punto fue de 77.7% (figura 20).



**Figura 20.** Determinación de la degradación del TNT de la cepa bacteriana S3B en MLN suplementado con 100 ppm de TNT en 72 horas.

Conjuntamente con la detección indirecta de TNT, se realizó la medición indirecta de los nitritos a 361 nm, los resultados fueron los observados en la figura 25. El valor máximo alcanzado fue de 0.354 nm. Se puede apreciar el incremento de esta sal sódica con el paso de las horas (figura 21).



**Figura 21.** Detección indirecta de NO<sub>2</sub> mediante la reacción de Peter Griess, empleando espectrofotometría.

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El compuesto nitroaromático más utilizado es el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT). Es bien sabido que el TNT tiene efectos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos en diversos organismos. Actualmente, la incineración es la alternativa de remediación más efectiva, pero su uso con suelos contaminados es costoso debido a los costos de excavación del suelo, transporte y energía para la incineración (Esteve-Núñez et al., 2001). La biodegradación natural del TNT por bacterias, puede contribuir al desarrollo de estrategias de biorremediación más ecológicas y rentables (Chatterjee et al. 2017). Sin embargo, el TNT es más recalcitrante que los mononitrotoluenos y dinitrotoluenos debido a la ubicación simétrica de los grupos nitro en el anillo aromático, una disposición que limita el ataque de las enzimas dioxigenasas clásicas involucradas en el metabolismo microbiano de compuestos aromáticos (Riger et al., 1999) por lo que solo una cantidad limitada de bacterias son capaces de biotransformar el TNT generando compuestos secundarios menos tóxicos o asimilables por otros microorganismos, por ejemplo, *Pseudomonas* sp., *Desulfovibrio* sp., *Bacillus* sp., y *Staphylococcus* sp; tienen la capacidad de transformar TNT en condiciones aeróbicas y anaeróbicas a través de vías reductoras (McFarlan y Yao, 2016).

### 5.1 Identificación molecular y caracterización cultural de las bacterias aisladas.

Las bacterias aisladas fueron procedentes de muestras de explosivo PETN en estado sólido, los cuales poseían una coloración amarillenta diferente a la coloración blanca habitual, por lo que después de diversos análisis se sospechó de contaminación biológica, lo que se corroboró con el aislamiento de 5 cepas bacterianas con diferencias morfológicas, tres de ellas fueron Gram positivas y dos Gram negativas. Si bien existen reportes de aislamientos bacterianos en sitios contaminados con TNT, como es el caso de *Stenotrophomonas maltophilia* (SU K2), *Klebsiella pneumoniae* (SU K3) y *Raoultella planticola* (SU K4) aisladas de aguas rosadas generadas durante los lavados de purificación de TNT (Gök et al., 2019) y de diferentes géneros bacterianos como *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Raoultella*, aislados de suelo cercano a las cuencas de aguas residuales del TNT (Thijs et al., 2018) y de suelo de zonas militarizadas con alta contaminación de explosivos (Thijs et al., 2014). El presente experimento sería el primer reporte de bacterias aisladas directamente de un explosivo en estado sólido (PETN). Los aislados se

diferenciaron entre sí principalmente por su coloración, forma y bordes, además fueron identificados molecularmente mediante el gen *16S rDNA*, determinando que 3 de las 5 cepas pertenecían al género *Microbacterium*, sin embargo, una cepa estaba relacionada a especies diferentes. De las 2 cepas restantes, una pertenecía al género *Acidovorax* y la otra al género *Diaphorobacter*.

El género *Microbacterium* ha sido anteriormente hallado en suelos contaminados con TNT, junto con otras especies del filo *Actinobacteria* al que pertenece; por otro lado, las cepas SM2 y S3B identificadas como *Acidovorax* sp., y *Diaphorobacter* sp., respectivamente, no han sido previamente reportadas en suelos contaminados con explosivos, pero sí se ha reportado al género *Burkholderia*, miembro del orden *Burkholderiales*, al que también pertenecen los géneros *Acidovorax* y *Diaphorobacter* (Thijs et al., 2014; Thijs et al., 2018). Las cepas bacterianas aisladas están relacionadas principalmente a bacterias que pertenecen al microbiota de la rizosfera o en general del suelo, por lo que se infiere que la contaminación de los explosivos fue debido a un contacto directo con el suelo o con superficies que tuvieron contacto previo con el mismo.

## **5.2 Análisis filogenético.**

En el árbol filogenético se pudieron observar 3 ramificaciones principales, en una de ellas se encontraban las cepas pertenecientes al género *Microbacterium* (S2, SM6 y SM4), las cuales se analizaron junto con otras cepas bacterianas del mismo género mediante el uso de la herramienta Blast N. En el caso de la cepa S2, se relaciona estrechamente con *M. flavum* y *M. hydrocarbonoxydans*, sin embargo, contrastando con sus características en el manual de Bergey (Takeuchi y Hatano, 1998), no logra tener un parecido cultural a ninguna de las dos especies, por lo que se necesitarían mayores análisis a nivel de otros genes. Asimismo, una caracterización bioquímica para definir la especie. En el caso de la cepa SM6, se encuentra en el mismo clado que la especie *M. marinum*, con la cual comparte un comportamiento cultural muy semejante ya que ambas poseen un pigmento amarillo muy intenso característico, bordes, forma y consistencia similar (Zhang et al., 2012); además, *M. marinum* se encuentra también relacionada a *M. hominis*, al igual que la cepa SM6 (Figura 11); si bien no se puede afirmar completamente la pertenencia del aislado SM6 a la especie



*M. marinum*, existe una elevada posibilidad de que su identidad sea la sugerida. La cepa SM4, se encuentra en el mismo clado que *M. paludicola* con una robustez del 100%, con la cual comparte características a nivel filogenético y cultural, ya que ambas son descritas como colonias circulares de color amarillento de bordes enteros (Park et al., 2006); sin embargo, al igual que en el caso anterior, no se puede afirmar totalmente la pertenencia a la especie mencionada por lo que solo se sugiere.

En la segunda ramificación se encuentra el grupo externo empleado, y finalmente en la tercera ramificación se encuentran las cepas SM2 y S3B. La cepa SM2 se encuentra en el mismo clado junto con especies no clasificadas del género *Acidovorax*, por lo que no fue posible relacionarla a ninguna especie. Por otro lado, la cepa S3B fue posicionada en un clado conjuntamente con especies del género *Diaphorobacter* como *D. nitroreducens* y *D. polyhydroxybutyrativorans*, ambas especies se encuentran altamente relacionadas, no solo comparten la actividad nitrificante y denitrificante, característica del género, sino también un comportamiento cultural y bioquímico muy similar (Qiu et al., 2015), por lo que la cepa S3B podría pertenecer a cualquiera de las dos especies mencionadas.

Cabe mencionar que las cepas SM2 y S3B, parten de un mismo nodo ancestral y conforman un clado con un *bootstrap* del 100%, lo que puede ser relacionado con la taxonomía de dichas cepas, ya que ambas pertenecen al orden *Burkholderiales* y a la familia *Comamonadaceae*. Por otro lado, las cepas S3B y SM2 presentan una lejanía filogenética con las cepas SM4, S2 y SM6, ya que relacionando una vez más con la taxonomía bacteriana, el primer grupo pertenece al filo *Proteobacteria* mientras que el segundo grupo pertenece al filo *Actinobacteria*.

### **5.3 Selección de cepas bacterianas capaces de utilizar TNT como fuente de nitrógeno.**

Las cepas del género *Microbacterium* (SM4, SM6 y S2) no lograron tener un crecimiento considerable y rápido en las 60 horas en las diversas concentraciones del TNT. En el estudio realizado por Thijs y colaboradores (2018), reportaron que el género *Microbacterium* no había presentado un

crecimiento en presencia del TNT o que no ocurrió una transformación efectiva del TNT, este comportamiento también fue observado en otros géneros bacterianos pertenecientes al filo *Actinobacteria* como lo son *Streptomyces*, *Arthobacter* y *Rhodococcus*, resultados similares presentaron los géneros del filo *Firmicutes* (Thijs et al., 2014; Thijs et al., 2018). Fuller y Manning (1997) han sugerido posibles explicaciones para explicar la sensibilidad de las bacterias Gram positivas al TNT como resultado de concentraciones y toxicidad más altas del TNT intracelular. Estos incluyen la hipótesis de que: la pared celular de las bacterias Gram-positivas puede ser más permeable al TNT. Las bacterias Gram-positivas pueden poseer menos sistemas de transporte de extrusión activos y también que bacterias Gram-positivas pueden poseer menos enzimas que desintoxican el TNT. Más prometedoras han demostrado ser las bacterias Gram-negativas, incluidos los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Cupriavidus*, *Methylobacterium*, *Variovorax*, *Methylobacterium*, *Enterobacter*, entre otras, pueden transformar el TNT (Esteve-Núñez et al., 2000; French et al., 1998; Fuller y Manning 1997; Haidour y Ramos, 1996; Ramos et al., 1997, Ramos et al. 2005; Rylott et al., 2011; Van Aken et al., 2004; Van Dillewijn et al., 2008; Wittich et al., 2008).

La cepa S3B perteneciente al género *Diaphorobacter*, presenta la capacidad de emplear el TNT como única fuente de nitrógeno, algunos informes muestran que el TNT puede ser utilizado como fuente de nitrógeno y también como aceptor externo de electrones por muchos microorganismos (Boopathy y Kulpa, 1994; Duque et al., 1993). Uno de estos microorganismos es *Pseudomonas* sp. JLR 11, que libera nitrito del anillo aromático antes de reducirlo a amonio. A través de este mecanismo, aproximadamente el 85% del nitrógeno presente en TNT se integra como nitrógeno orgánico en las células (Esteve-Núñez et al., 2001).

En la obtención de nitrógeno a partir de la vía de desnitrificación y de desaminación se requiere la participación indispensable de las enzimas nitro reductasas, especialmente las nitro reductasas de tipo I, insensibles al oxígeno, las cuales son capaces de catalizar, mediante incrementos de dos electrones, la reducción de grupos nitro aromáticos a grupos amino, esta clase de enzimas está presente en bacterias Gram negativas (Serrano-González et al., 2018). La cepa bacteriana Gram negativa S3B es ideal para el uso de nitrógeno a partir del TNT, ya que pertenece al género *Diaphorobacter*, el cual se caracteriza por tener actividad nitrificante y desnitrificante de manera simultánea, es capaz de

formar amonio a partir de nitrito, e incluso cuando existe una muy alta concentración de amonio se promueve la desnitrificación con el fin de mantener un balance de nitrógeno en condiciones aeróbicas (Wong-Chong y Loehr, 1978; Gibbs et al., 2004; Khardenavis et al., 2007). Debido a la anteriormente mencionado, es completamente viable la utilización de nitrógeno procedente del TNT por la cepa S3B, mediante la vía de desnitrificación, por otro lado, debido a que no se conoce la especie de la cepa S3B y por ende la totalidad de los componentes de su maquinaria enzimática no es posible asegurar la viabilidad de la asimilación de nitrógeno mediante la vía de desaminación ya que esta vía depende de la acción de diversas enzimas adicionales a la nitro reductasa (Nadeau y Spain, 2003; Stenuit et al., 2006; González-Pérez et al., 2007; Iman et al., 2017), pero existe dicha posibilidad.

El crecimiento de la cepa S3B se vio directamente influenciado por la concentración del TNT en el medio libre de nitrógeno, en términos de densidad óptica y tiempo, a medida que aumentaba la concentración del TNT la absorbancia a 600 nm fue mayor y el tiempo para alcanzar la fase media exponencial fue menor, se puede inferir que a mayor disponibilidad del TNT y por ende mayor concentración de su única fuente de nitrógeno existe un crecimiento celular más rápido. Cabe mencionar que las cepas estuvieron varios meses en ceparios en medio TSA y no se desarrolló una aclimatación en medio con el TNT previo al ensayo, es probable que si se desarrollaba subcultivos sucesivos en medio con el TNT antes del ensayo y se empleaba dicho cultivo como inóculo los resultados habrían presentado variaciones a favor del uso de TNT como fuente de nitrógeno.

#### **5.4 Determinación de la degradación del TNT.**

El porcentaje de transformación bacteriana del TNT a otros compuestos en 72 horas fue del 77.7% medido mediante el método espectrofotométrico, tras una reacción colorimétrica del TNT y el KOH 0.1N, si bien es una técnica de detección indirecta que puede brindarnos un monitoreo de la presencia del TNT en el medio no es la técnica ideal para la detección del TNT. La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) brinda una medición más precisa no solo del TNT sino también de los compuestos secundarios generados, sin embargo, es marcadamente más costosa que el método colorimétrico- espectrofotométrico, y es por dicha razón que en este ensayo se optó por el último método mencionado.

En el caso de la cepa S3B, perteneciente al género *Diaphorobacter*, es completamente viable la transformación del TNT mediante la vía reducción consecutiva de dos electrones ya que el mencionado género bacteriano se caracteriza por su intensa actividad nitrificante y des nitrificante, característica otorgada gracias a la actividad de su gran variedad de nitro reductasas (Wong-Chong y Loehr, 1978; Gibbs et al., 2004; Khardenavis et al., 2007). De la misma manera no se puede asegurar que la cepa S3B haya empleado la vía de reducción directa de dos electrones del anillo aromático mediante la adición de un hidruro, ya que esta vía recae en la acción de un hidruro transferasa de tipo II de la familia OYE, y hasta la fecha no se ha anotado o identificado a alguna reductasa de esta familia en el género *Diaphorobacter*; sin embargo, cabe la gran posibilidad de que exista enzimas de dicha familia en el género bacteriano, las cuales pueden no haberse identificado debido a los pocos estudios realizados en el mencionado sobre este taxón bacteriano. Un resultado que apoya el uso de esta vía en la cepa S3B, es la variación de la coloración del medio, el MLN que en un inicio no tenía coloración alguna, se tornó en un color rosáceo- anaranjado al cabo de 24 horas, oscureciéndose cada vez más a medida que el TNT se iba degradando, hasta llegar a un color rojizo- anaranjado-marrón a las 72 horas tal como se ve en la figura 17. El complejo hidruro-Meisenheimer de TNT formado por bacterias aeróbicas ha sido ampliamente referenciado por tener un color rojo/anaranjado-marrón (Pak et al., 2000; Nyanhongo et al., 2009; Mercimek et al., 2013; Gok et al., 2019; Lamba et al., 2021) lo que concuerda con los resultados observados en el crecimiento de la cepa S3B en medio TNT. Por lo que existe la probabilidad que ambas rutas estén siendo ejecutadas al mismo tiempo, lo que respaldaría la rápida transformación de TNT por parte de la bacteria.

Durante la determinación de la degradación del TNT se detectó un aumento de la concentración de  $\text{NO}_2$ . El compuesto mencionado es un producto de la condensación de isómeros de hidroxilamino-di-nitrolueno (HADNT) y de complejos de di-hidruro protonado de Meisenheimer (González-Pérez et al., 2007; Wittich et al., 2009), lo que reforzaría la hipótesis de que la cepa S3B presente alguna reductasa perteneciente a la familia OYE. Cabe mencionar que la ruta oxigenolítica, también tiene como producto secundario la liberación de  $\text{NO}_2$ , lo que podría aumentar en muy pequeña proporción la concentración de  $\text{NO}_2$  en el medio, ya que las enzimas oxigenolíticas tienen una actividad

sumamente baja (Maksimova et al., 2018). Finalmente, existe la posibilidad de que el  $\text{NO}_2$  detectado proceda de la acción nitrificante de *Diaphorobacter*, a partir del amonio liberado mediante la vía de reordenamientos de Bamberger, sin embargo, es una opción poco plausible debido a la rápida asimilación del amonio mediante la vía de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (Caballero et al., 2005; Smets et al., 2007).

## 6. CONCLUSIONES

- Se logró aislar cinco cepas bacterianas a partir de un lote de explosivo con contaminación biológica. Las cepas SM4, SM6 y S2 fueron identificadas como miembro del género *Microbacterium*, la cepa SM2 fue identificada como parte del género *Acidovorax* y la cepa S3B fue identificada como miembro del género *Diaphorobacter*.
- La bacteria del género *Diaphorobacter* fue seleccionada debido a su capacidad de utilizar el TNT a concentraciones de 20 ppm, 60 ppm y 100 ppm como única fuente de nitrógeno.
- El porcentaje de degradación del TNT de *Diaphorobacter* sp. S3B en 72 horas fue del 77.7%, demostrando su potencial en el tratamiento de aguas y suelos contaminados con TNT.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANTO, Michel, et al. Molecular identification of iron oxidizing bacteria isolated from acid mine drainages in Peru. En *Advanced Materials Research*. Trans Tech Publications Ltd, 2013. p. 84-87.

AYOUB, Kaidar, et al. Application of advanced oxidation processes for TNT removal : a review. *Journal of hazardous materials*, 2010, vol. 178, no 1-3, p. 10-28.

BERNSTEIN, Anat; RONEN, Zeev. Biodegradation of the explosives TNT, RDX and HMX. En *Microbial degradation of xenobiotics*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012. p. 135-176.

BINKS, Peter R., et al. Degradation of pentaerythritol tetranitrate by *Enterobacter cloacae* PB2. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, vol. 62, no 4, p. 1214-1219.

BOOPATHY, R ; KULPA, C. F. Biotransformation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) by a *Methanococcus* sp. (strain B) isolated from a lake sediment. *Canadian journal of microbiology*, 1994, vol. 40, no 4, p. 273-278.

BRATTON, A. Calvin ; MARSHALL JR, E. K. A new coupling component for sulfanilamide determination. *Journal of Biological Chemistry*, 1939, vol. 128, no 2, p. 537-550.

BRESSLER, David C. ; GRAY, Murray R. Transport and reaction processes in bioremediation of organic contaminants. 1. Review of bacterial degradation and transport. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 2003, vol. 1, no 1.

BRIGÉ, Ann, et al. Comparative characterization and expression analysis of the four Old Yellow Enzyme homologues from *Shewanella oneidensis* indicate differences in physiological function. *Biochemical Journal*, 2006, vol. 394, no 1, p. 335-344.

BRYANT, Christopher ; DELUCA, Marlene. Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD (P) H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, vol. 266, no 7, p. 4119-4125.

CABALLERO, Antonio, et al. Assimilation of nitrogen from nitrite and trinitrotoluene in *Pseudomonas putida* JLR11. *Journal of bacteriology*, 2005, vol. 187, no 1, p. 396-399.

CATACORA, Claudia Marín, et al. Degradación aeróbica de TNT (2, 4, 6-trinitrotolueno) por un consorcio bacteriano aislado de ambientes contaminados. *Ciencia & Desarrollo*, 2017, no 21, p. 20-28.

CELIN, S. Mary, et al. Environmental monitoring approaches used during bioremediation of soils contaminated with hazardous explosive chemicals. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2020, vol. 26, p. e00088.

CHATTERJEE, Soumya, et al. Common explosives (TNT, RDX, HMX) and their fate in the environment : Emphasizing bioremediation. *Chemosphere*, 2017, vol. 184, p. 438-451.

CLAUS, H., et al. Transformation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) by *Raoultella terrigena*. *Biodegradation*, 2007, vol. 18, no 1, p. 27-35.

CLAUS, Harald. Microbial degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene in vitro and in natural environments. En *Biological remediation of explosive residues*. Springer, Cham, 2014. p. 15-38.

DONTSOVA, Katerina., et al. Sorption of High Explosives to Water-Dispersible Clay : Influence of Organic Carbon, Aluminosilicate Clay, and Extractable Iron. *Journal of environmental quality*, 2009, vol. 38, no 4, p. 1458-1465.

DRZYZGA, Oliver, et al. Mass balance studies with <sup>14</sup>C-labeled 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) mediated by an anaerobic *Desulfovibrio* species and an aerobic *Serratia* species. *Current microbiology*, 1998, vol. 37, no 6, p. 380-386.

DUQUE, Estrella, et al. Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2, 4, 6-trinitrotoluene. *Journal of Bacteriology*, 1993, vol. 175, no 8, p. 2278-2283.

DURÁN, Yerson, et al. Biodegradation of the explosive pentaerythritol tetranitrate (PETN) by bacteria isolated from mining environments. *Revista Peruana de Biología*, 2013, vol. 20, no 2, p. 145-150.

EDERER, M. M.; LEWIS, T. A.; CRAWFORD, R. L. 2, 4, 6-Trinitrotoluene (TNT) transformation by clostridia isolated from a munition-fed bioreactor: comparison with non-adapted bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1997, vol. 18, no 2-3, p. 82-88.

ERIKSSON, Johan ; SKYLLBERG, Ulf. Aniline and 2, 4, 6-trinitrotoluene associate preferentially to low molecular weight fractions of dissolved soil organic matter. *Environmental pollution*, 2009, vol. 157, no 11, p. 3010-3015.

ERIKSSON, Johan, et al. Binding of 2, 4, 6-trinitrotoluene, aniline, and nitrobenzene to dissolved and particulate soil organic matter. *Environmental science & technology*, 2004, vol. 38, no 11, p. 3074-3080.

ESTEVE-NÚÑEZ, Abraham; CABALLERO, Antonio; RAMOS, Juan L. Biological degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2001, vol. 65, no 3, p. 335-352.

FAHRENFELD, Nicole, et al. Effect of biostimulants on 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) degradation and bacterial community composition in contaminated aquifer sediment enrichments. *Biodegradation*, 2013, vol. 24, no 2, p. 179-190.

FANT, F., et al. The use of amino compounds for binding 2, 4, 6-trinitrotoluene in water. *Environmental Pollution*, 2001, vol. 111, no 3, p. 503-507.

FELT, Deborah R. ; LARSON, Steven L. ; VALENTE, Edward J. UV-VIS spectroscopy of 2, 4, 6-trinitrotoluene-hydroxide reaction. *Chemosphere*, 2002, vol. 49, no 3, p. 287-295.

FERNÁNDEZ, Matilde, et al. Microbial responses to xenobiotic compounds. Identification of genes that allow *Pseudomonas putida* KT2440 to cope with 2, 4, 6-trinitrotoluene. *Microbial biotechnology*, 2009, vol. 2, no 2, p. 287-294.

FRENCH, Christopher E. ; NICKLIN, Stephen ; BRUCE, Neil C. Aerobic degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by pentaerythritol tetranitrate reductase. *Applied and environmental microbiology*, 1998, vol. 64, no 8, p. 2864-2868.

FRENCH, Christopher E., et al. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. *Nature biotechnology*, 1999, vol. 17, no 5, p. 491-494.



FULLER, Mark E. ; MANNING JR, John F. Aerobic gram-positive and gram-negative bacteria exhibit differential sensitivity to and transformation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT). *Current microbiology*, 1997, vol. 35, no 2, p. 77-83.

GIBBS, B. M., et al. The presence of ammonium facilitates nitrite reduction under PHB driven simultaneous nitrification and denitrification. *Water Science and Technology*, 2004, vol. 50, no 10, p. 181-188.

GÖK, Zehra Gün; İNAL, Murat; YIĞITOĞLU, Mustafa. Biodegradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) with bacteria isolated from TNT-polluted waste pink water. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 2019, vol. 63, no 3, p. 459-468.

GONZÁLEZ-PÉREZ, M. Mar, et al. Escherichia coli has multiple enzymes that attack TNT and release nitrogen for growth. *Environmental microbiology*, 2007, vol. 9, no 6, p. 1535-1540.

GUMUSCU, Burcu; TEKINAY, Turgay. Effective biodegradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene using a novel bacterial strain isolated from TNT-contaminated soil. *International biodeterioration & biodegradation*, 2013, vol. 85, p. 35-41.

HAÏDOUR, Alí; RAMOS, Juan L. Identification of products resulting from the biological reduction of 2, 4, 6-trinitrotoluene, 2, 4-dinitrotoluene, and 2, 6-dinitrotoluene by Pseudomonas sp. *Environmental science & technology*, 1996, vol. 30, no 7, p. 2365-2370.

HAWARI, Jalal. Biodegradation of RDX and HMX : from basic research to field application. *Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives*, 2000, p. 277-310.

HUGHES, J. B., et al. Bamberger rearrangement during TNT metabolism by Clostridium acetobutylicum. *Environmental science & technology*, 1998, vol. 32, no 4, p. 494-500.

IMAN, Maryam, et al. Systems biology approach to bioremediation of nitroaromatics: constraint-based analysis of 2, 4, 6-trinitrotoluene biotransformation by Escherichia coli. *Molecules*, 2017, vol. 22, no 8, p. 1242.

JENKINS, Thomas F. ; SCHUMACHER, Patricia W. *Evaluation of a Field Kit for Detection of TNT in Water and Solids*. COLD REGIONS RESEARCH AND ENGINEERING LAB HANOVER NH, 1990.

JOHNSON, Glenn R. ; SMETS, Barth F. ; SPAIN, Jim C. Oxidative transformation of aminodinitrotoluene isomers by multicomponent dioxygenases. *Applied and environmental microbiology*, 2001, vol. 67, no 12, p. 5460-5466.

JU, Kou-San ; PARALES, Rebecca E. Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2010, vol. 74, no 2, p. 250-272.

JUHASZ, Albert L. ; NAIDU, Ravendra. Explosives : fate, dynamics, and ecological impact in terrestrial and marine environments. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 2007, p. 163-215.

KALDERIS, Dimitrios, et al. Soils contaminated with explosives : environmental fate and evaluation of state-of-the-art remediation processes (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 2011, vol. 83, no 7, p. 1407-1484.

KAO, Chih-Ming, et al. Biodegradation of trinitrotoluene (TNT) by indigenous microorganisms from TNT-contaminated soil, and their application in TNT bioremediation. *Bioremediation Journal*, 2016, vol. 20, no 3, p. 165-173.

KAPLAN, Lloyd A. ; SIEDLE, Allen R. Boron hydrides. IV. Stable hydride Meisenheimer adducts. *The Journal of Organic Chemistry*, 1971, vol. 36, no 7, p. 937-939.

KEENAN, Brendan G. ; WOOD, Thomas K. Orthric Rieske dioxygenases for degrading mixtures of 2, 4-dinitrotoluene/naphthalene and 2-amino-4, 6-dinitrotoluene/4-amino-2, 6-dinitrotoluene. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, vol. 73, no 4, p. 827-838.

KHAN, Shams Tabrez; HIRAISHI, Akira. *Diaphorobacter nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a poly (3-hydroxybutyrate) -degrading denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *The Journal of general and applied microbiology*, 2002, vol. 48, no 6, p. 299-308.

KHAN, Shams Tabrez; HIRAISHI, Akira. Isolation and characterization of a new poly (3-hydroxybutyrate) -degrading, denitrifying bacterium from activated sludge. *FEMS microbiology letters*, 2001, vol. 205, no 2, p. 253-257.

KHARDENAVIS, Anshuman A. ; KAPLEY, Atya; PUROHIT, Hemant J. Simultaneous nitrification and denitrification by diverse *Diaphorobacter* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, vol. 77, no 2, p. 403-409.

KIVISAAR, Maia. Evolution of catabolic pathways and their regulatory systems in synthetic nitroaromatic compounds degrading bacteria. *Molecular microbiology*, 2011, vol. 82, no 2, p. 265-268.

KULKARNI, Meenal ; CHAUDHARI, Ambalal. Microbial remediation of nitroaromatic compounds : an overview. *Journal of Environmental Management*, 2007, vol. 85, no 2, p. 496-512.

KUMAR, Sudhir, et al. MEGA X : molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 2018, vol. 35, no 6, p. 1547.

LAMBA, Jyoti, et al. Study on aerobic degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) using *Pseudarthrobacter chlorophenicus* collected from the contaminated site. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2021, vol. 193, no 2, p. 1-11.

LENKE, Hiltrud; KNACKMUSS, Hans-joachim. Initial hydrogenation during catabolism of picric acid by *Rhodococcus erythropolis* HL 24-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, vol. 58, no 9, p. 2933-2937.

LENKE, Hiltrud; ACHTNICH, Christof; KNACKMUSS, Hans-Joachim. *Perspectives of bioelimination of polynitroaromatic compounds*. CRC Press, Boca Raton, FL, 2000.

LEWIS, T. A., et al. Microbial transformation of 2, 4, 6-trinitrotoluene. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1997, vol. 18, no 2, p. 89-96.

LIANG, Shih-Hsiung, et al. Enhancement of microbial 2, 4, 6-trinitrotoluene transformation with increased toxicity by exogenous nutrient amendment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2017, vol. 138, p. 39-46.

MAKSIMOVA, Yu G. ; MAKSIMOV, A. Yu ; DEMA KOV, V. A. Biotechnological approaches to the bioremediation of an environment polluted with trinitrotoluene. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2018, vol. 54, no 8, p. 767-779.

MARTIN, J. L., et al. Denitration of 2, 4, 6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastanoi*. *Canadian journal of microbiology*, 1997, vol. 43, no 5, p. 447-455.

MARVIN-SIKKEMA, F. D. ; DE BONT, J. A. M. Degradation of nitroaromatic compounds by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, vol. 42, no 4, p. 499-507.

MCFARLAN, Sara; YAO. 2,4,6-Trinitrotoluene degradation pathway, 2016. [http://eawag-bbd.ethz.ch/tnt/tnt\\_map.html](http://eawag-bbd.ethz.ch/tnt/tnt_map.html).

MERCIMEK, H. Aysun, et al. Aerobic biodegradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) by *Bacillus cereus* isolated from contaminated soil. *Microbial ecology*, 2013, vol. 66, no 3, p. 512-521.

MERGAERT, Joris ; SWINGS, Jean. Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. *Journal of industrial microbiology*, 1996, vol. 17, no 5, p. 463-469.

MICHELS, Jochen ; GOTTSCHALK, Gerhard. Inhibition of the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxylamino-dinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, vol. 60, no 1, p. 187-194.

NADEAU, Lloyd J. ; HE, Zhongqi; SPAIN, Jim C. Bacterial conversion of hydroxylamino aromatic compounds by both lyase and mutase enzymes involves intramolecular transfer of hydroxyl groups. *Applied and environmental microbiology*, 2003, vol. 69, no 5, p. 2786-2793.

NDIBE, Thankgod Ositadinma, et al. A review on biodegradation and biotransformation of explosive chemicals. *European Journal of Engineering and Technology Research*, 2018, vol. 3, no 11, p. 58-65.

NYANHONGO, Gibson S., et al. Biodegradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT): An enzymatic perspective. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2005, vol. 23, no 2, p. 53-69.

NYANHONGO, Gibson S., et al. Incorporation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) transforming bacteria into explosive formulations. *Journal of hazardous materials*, 2009, vol. 165, no 1-3, p. 285-290.

ORJUELA, P., et al. Evaluación de cepas antagónicas de actinomicetos y de *Trichoderma* spp. aislados a partir de suelos de cultivos de arroz (*Oryza sativa*) para el control de *Rhizoctonia solani*. *Revista Mundo Microbiológico. Asociación Colombiana de Microbiología*, 2003, vol. 2, no 2, p. 9-14.

PAK, Jeong W., et al. Transformation of 2, 4, 6-trinitrotoluene by purified xenobiotic reductase B from *Pseudomonas fluorescens* IC. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, no 11, p. 4742-4750.

PARK, Hye Yoon, et al. *Microbacterium paludicola* sp. nov., a novel xylanolytic bacterium isolated from swamp forest. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2006, vol. 56, no 3, p. 535-539.

PECEROS, Mesalina. Levaduras con potencial de remediación de 2, 4, 6-trinitrotolueno (TNT) y evaluación de su capacidad degradativa. 2019.

PUROHIT, Vandana; BASU, Ashis K. Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chemical research in toxicology*, 2000, vol. 13, no 8, p. 673-692.

QIU, Tianlei, et al. *Diaphorobacter polyhydroxybutyratorans* sp. nov., a novel poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-degrading bacterium isolated from biofilms. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2015, vol. 65, no Pt\_9, p. 2913-2918.

RAMOS, Juan L., et al. Biodegradation of nitroaromatics by microbes. En *Bioremediation Protocols*. Humana Press, 1997. p. 187-200.

RAMOS, Juan L., et al. Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, vol. 16, no 3, p. 275-281.

RIEFLER, R. Guy ; SMETS, Barth F. NAD (P) H: flavin mononucleotide oxidoreductase inactivation during 2, 4, 6-trinitrotoluene reduction. *Applied and environmental microbiology*, 2002, vol. 68, no 4, p. 1690-1696.

RIEGER, Paul-Gerhard, et al. Hydride-Meisenheimer complex formation and protonation as key reactions of 2, 4, 6-trinitrophenol biodegradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Journal of bacteriology*, 1999, vol. 181, no 4, p. 1189-1195.

RYLOTT, Elizabeth L. ; LORENZ, Astrid ; BRUCE, Neil C. Biodegradation and biotransformation of explosives. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, vol. 22, no 3, p. 434-440.

SCHEIBNER, Katrin ; HOFRICHTER, Martin. Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidase. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 1998, vol. 38, no 1, p. 51-59.

SERRANO-GONZÁLEZ, Mónica Y., et al. Biotransformation and degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene by microbial metabolism and their interaction. *Defence technology*, 2018, vol. 14, no 2, p. 151-164.

SHARMA, Prasesh; MAYES, Melanie; TANG, Guoping. Role of soil organic carbon and colloids in fate of TNT, RDX and HMX in training range soils. *Chemosphere*, 2013, vol. 92, no 8.

SINGH, Baljinder; KAUR, Jagdeep; SINGH, Kashmir. Microbial remediation of explosive waste. *Critical reviews in microbiology*, 2012, vol. 38, no 2, p. 152-167.

SINGH, Neera, et al. Effect of soil organic matter chemistry on sorption of trinitrotoluene and 2, 4-dinitrotoluene. *Journal of hazardous materials*, 2010, vol. 173, no 1-3, p. 343-348.

SINGH, Shree Nath (ed.). *Biological remediation of explosive residues*. Springer Science & Business Media, 2013.

SMETS, Barth F. ; YIN, Hong ; ESTEVE-NUÑEZ, Abraham. TNT biotransformation : when chemistry confronts mineralization. *Applied microbiology and biotechnology*, 2007, vol. 76, no 2, p. 267-277.

SOLYANIKOVA, I. P., et al. Detoxification of high concentrations of trinitrotoluene by bacteria. *Applied biochemistry and microbiology*, 2012, vol. 48, no 1, p. 21-27.

STENUIT, Ben ; AGATHOS, Spiros N. Rapid and unbiased colorimetric quantification of nitrite and ammonium ions released from 2, 4, 6-trinitrotoluene during biodegradation studies: Eliminating interferences. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2009, vol. 63, no 1, p. 116-122.

STENUIT, Ben A. ; AGATHOS, Spiros N. Microbial 2, 4, 6-trinitrotoluene degradation: could we learn from (bio) chemistry for bioremediation and vice versa?. *Applied microbiology and biotechnology*, 2010, vol. 88, no 5, p. 1043-1064.

STENUIT, Ben, et al. Aerobic growth of Escherichia coli with 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) as the sole nitrogen source and evidence of TNT denitration by whole cells and cell-free extracts. *Applied and environmental microbiology*, 2006, vol. 72, no 12, p. 7945-7948.

STENUIT, Benoît ; AGATHOS, Spiros N. Biodegradation and bioremediation of TNT and other nitro explosives. 2019.

STENUIT, Benoît, et al. Construction of a metagenomic library derived from soil contaminated by 2, 4, 6 trinitrotoluene: Screening for catabolic genes conferring productive biodegradation of TNT. En *European Science Foundation (ESF) Workshop" Environmental Genomics and Environmental Metagenomics"*, Poster No. 28, *Book of Abstracts* p. 62. 2004.

SWIFT, Mary L. GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing. *Journal of chemical information and computer sciences*, 1997, vol. 37, no 2, p. 411-412.

SYMONS, Zoe C. ; BRUCE, Neil C. Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. *Natural product reports*, 2006, vol. 23, no 6, p. 845-850.

TAKEUCHI, Mariko ; HATANO, Kazunori. Union of the genera Microbacterium Orla-Jensen and Aureobacterium Collins et al. In a redefined genus Microbacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1998, vol. 48, no 3, p. 739-747.

TAYLOR, R. P. Novel Meisenheimer complexes : the preparation of tetramethylammonium 1, 1-dihydro-2, 4, 6-trinitrocyclohexadienate. *Journal of the Chemical Society D : Chemical Communications*, 1970, no 21, p. 1463a-1463a.

THIJS, Sofie, et al. Exploring the rhizospheric and endophytic bacterial communities of *Acer pseudoplatanus* growing on a TNT-contaminated soil: towards the development of a rhizocompetent TNT-detoxifying plant growth promoting consortium. *Plant and soil*, 2014, vol. 385, no 1, p. 15-36.

THIJS, Sofie, et al. The sycamore maple bacterial culture collection from a TNT polluted site shows novel plant-growth promoting and explosives degrading bacteria. *Frontiers in plant science*, 2018, vol. 9, p. 1134.

VAN AKEN, Benoit ; YOON, Jong Moon ; SCHNOOR, Jerald L. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2, 4, 6-trinitrotoluene, hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine, and octahydro-1, 3, 5, 7-tetranitro-1, 3, 5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* × *nigra* DN34). *Applied and environmental microbiology*, 2004, vol. 70, no 1, p. 508-517.

VAN DILLEWIJN, Pieter, et al. Subfunctionality of hydride transferases of the old yellow enzyme family of flavoproteins of *Pseudomonas putida*. *Applied and environmental microbiology*, 2008, vol. 74, no 21, p. 6703-6708.

VILA, Mireille ; LORBER-PASCAL, S. ; LAURENT, Francois. Phytotoxicity to and uptake of TNT by rice. *Environmental geochemistry and health*, 2008, vol. 30, no 2, p. 199-203.

VORBECK, Claudia, et al. Identification of a hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2, 4, 6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. *Journal of Bacteriology*, 1994, vol. 176, no 3, p. 932-934.

VORBECK, Claudia, et al. Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2, 4, 6-trinitrotoluene. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, vol. 64, no 1, p. 246-252.



WATROUS, Mary M., et al. 2, 4, 6-Trinitrotoluene reduction by an Fe-only hydrogenase in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and environmental microbiology*, 2003, vol. 69, no 3, p. 1542-1547.

WHITMAN, William B., et al. (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. Springer New York, 2012.

WILLEMS, A.; GILLIS, M. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volumen 2 The Proteobacteria*. Family IV. Genus Acidovorax. 2005.

WILLIAMS, Richard E., et al. Biotransformation of explosives by the old yellow enzyme family of flavoproteins. *Applied and environmental microbiology*, 2004, vol. 70, no 6, p. 3566-3574.

WITTICH, Rolf-Michael, et al. OYE flavoprotein reductases initiate the condensation of TNT-derived intermediates to secondary diarylamines and nitrite. *Environmental science & technology*, 2008, vol. 42, no 3, p. 734-739.

WONG-CHONG, G. M. ; LOEHR, R. C. Kinetics of microbial nitrification : nitrite-nitrogen oxidation. *Water Research*, 1978, vol. 12, no 8, p. 605-609.

XUE, S. K. ; ISKANDAR, I. K. ; SELIM, H. M. Adsorption-desorption of 2, 4, 6-trinitrotoluene and hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine in soils. *Soil Science*, 1995, vol. 160, no 5, p. 317-327.

YINON, Jehuda. *Toxicity and metabolism of explosives*. CRC press, 1990.

ZHANG, Limin, et al. *Microbacterium marinum* sp. nov., isolated from deep-sea water. *Systematic and applied microbiology*, 2012, vol. 35, no 2, p. 81-85.