REMOCIÓN DEL TETRANITRATO DE PENTAERITRITOL (PETN) EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA MEDIANTE BACTERIAS NATIVAS AISLADAS DE AMBIENTES CON PRESENCIA DE EXPLOSIVOS.

SANDRA MILENA CARVAJAL RAMIREZ
DENIS YOHANA HERRERA CASTILLO

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA
PROGRAMA DE INGENIERIA AMBIENTAL
BOGOTÁ
2010

REMOCIÓN DEL TETRANITRATO DE PENTAERITRITOL (PETN) EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA MEDIANTE BACTERIAS NATIVAS AISLADAS DE AMBIENTES CON PRESENCIA DE EXPLOSIVOS.

SANDRA MILENA CARVAJAL RAMIREZ
DENIS YOHANA HERRERA CASTILLO

Proyecto de grado para optar al título de
Ingeniera Ambiental Y Sanitario

Director:
JOAQUIN LORENZO BENAVIDES LOPEZ DE MESA
Microbiólogo Ambiental

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE INGENIERIA
PROGRAMA DE INGENIERIA AMBIENTAL Y SANITARIA
BOGOTÁ
2010

Nota de Aceptación:

_____
_____
_____
_____
_____

_____
Firma del Presidente del Jurado

_____
Firma del Jurado

_____
Firma del Jurado

Bogotá , Febrero 2010.

AGRADECIMIENTOS

Mi proyecto de grado en primer lugar se lo dedico a ese ser superior que me guio por todo éste proceso, iluminandome el camino correcto, dandome fuerza en momentos difíciles y ayudándome a no desenfocarme de ésta gran meta.

A mi mamá Luz Marina Castillo, a mi padre Luis Herrera y a mi hermano Luis Herrera y a John Camacho, que fueron mi gran apoyo en todo momento, estubieron conmigo en todo este proceso brindadome amor y fuerzas para no desfallecer en mi sueño, sin ellos no fuera sido posible este logro, "ya que ellos son mi razón de ser y existir".

A todos los profesores que aportaron en mi formación como profesional .

Por último quiero dedicarselo y agradecer a mi compañera de proyecto y amiga Sandra Carvajal Ramírez por haber confiado en mi y haber compartido conmigo este proceso.

Yohana Herrera Castillo

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que debería nombrar en estas líneas, pero me quedaré con las más trasendentales... con aquellas que no han bajado la guardia y siempre me han apoyado, tanto a lo largo del desarrollo de esta Tesis como a lo largo de mi vida.

Agradezco a mis padres Hector Carvajal y Miriam Ramírez, a mis hermanas Andrea Carvajal y Viviana Carvajal, a mi novio Camilo Andrés Correa Gonzále y a mi gran amiga Marsela Carvajal, por su entrega y apoyo incondicional en este proceso de formación profesional y persona; sin su ayuda mis logros no hubieran sido cumplidos.

A Mauricio López Dimas y Yohana Herrera, por brindarme su amistad incondicional y apoyo diario, por ayudarme a encontrar la solución a cada una de las situaciones dificiles que se presentaron en el transcurso de mi carrera.

A la Universidad Javeriana, al Docente Fabio Roldán y a mi Director de Tesis Joaquín Benavidez, por su apoyo en el desarrollo del proyecto.

Finalmente, gracias a todo el equipo del Laboratorio de Microbiología ambiental de la Universidad de la Salle, en donde desarrollé distintas partes de esta Tesis. Gracias por los consejos, el apoyo y la ayuda incondicional en el desarrollo del proyecto.

A ustedes y a Dios muchisimas gracias, sin ustedes parte de mi proyecto de vida no se estaría cumpliendo.

Muchas gracias.

Sandra Carvajal

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
1. OBJETIVOS	3
1.2 OBJETIVO GENERAL	3
1.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
2. MARCO DE REFERENCIA	4
2.1 MARCO TEORICO	4
2.1.1 EXPLOSIVO	4
2.1.2 GENERALIDADES DE LOS EXPLOSIVOS	4
2.1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS EXPLOSIVOS SEGÚN SU ORIGEN.	5
2.1.4. CLASIFICACIÓN DE LOS EXPLOSIVOS SEGÚN NACIONES UNIDAS	5
2.1.5. PETN	6
2.1.6. BIODEGRADACIÓN	8
2.1.6.1. ASIMILACIÓN DE CARBONO	9
2.1.6.2. ASIMILACIÓN DE OTROS ELEMENTOS	9
2.1.8. BIORREMEDIACION DE SUELOS	9
2.1.7. CONTAMINACIÓN DEL SUELO	9
2.1.9. CRECIMIENTO BACTERIANO.	10
2.1.9.1. MEDIO DE CULTIVO	11
2.1.10. SIEMBRA	12
2.1.10.1. TIPOS DE SIEMBRA	13
2.1.11. MORFOLOGIA DE LAS COLONIAS	13
2.2. MARCO NORMATIVO	15
3. METODOLOGÍA	17
4. RESULTADOS Y ANALISIS	27
4.1. ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES FISICOQUIMICAS	27
4.2. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS	29
4.2.1. AISLAMIENTO	29
4.3. SELECCIÓN DE CEPAS	31
4.4. DETERMINACIÓN DE REDUCCIÓN DEL SUSTRATO PARA LOS AISLAMIENTOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (HPLC)	32
4.5. EVALUACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA	35
4.6 RESULTADO DEL BIOENSAYO	36
4.7 COMPORTAMIENTO DE LOS AISLAMIENTOS Y EL TIEMPO EN LA REMOCIÓN DEL SUSTRATO	47
5. CONCLUSIONES	21

6. RECOMENDACIONES 52
BIBLIOGRAFÍA 53
ANEXOS 55

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Propiedades físicas, químicas y explosivas del PETN……7

Tabla 2. Descripción de los puntos de muestreo 18

Tabla 3. Composición del Agua Residual Sintética 25

Tabla 4. Condiciones fisicoquímicas y microbiológicas 27

Tabla 5. Datos de pH y conductividad para las muestras 28

Tabla 6. Aislamientos seleccionados en los diferentes tratamientos 30

Tabla 7. Selección de cepas por morfología 31

Tabla 8. Resultados de la lectura en HPLC de la solución patrón 32

Tabla 9. Resultados de la lectura en HPLC del aislamiento P1.....33

Tabla 10. Resultados de la lectura en HPLC del aislamiento P23 33

Tabla 11. Resultados de la lectura en HPLC del aislamiento P26.....33

Tabla 12. Resultados de la lectura en HPLC del aislamiento P37.....34

Tabla 13. Resultados de la lectura en HPLC del aislamiento P38.....34

Tabla 14. Datos para la calibración del equipo HPLC 36

Tabla 15. Promedio de la concentración del sustrato para cada día del bioensayo P1 39

Tabla 16. Promedio de la concentración del sustrato para cada día del bioensayo P23 40

Tabla 17. Promedio de la concentración del sustrato para cada día del bioensayo P26 42

Tabla 18. Promedio de la concentración del sustrato para cada día del bioensayo P37 43

Tabla 19. Promedio de la concentración del sustrato para cada día del bioensayo P38 45

Tabla 20. Resultados de la concentración del sustrato final de los cinco aislamientos 46

Tabla 21. Analisis de varianza 47

Tabla 22. Comparación de la remoción en el día 1 y día 3, prueba t- student..48

Tabla 23. Comparación de la remoción en el día 1 y día 4, prueba t-student...48

Tabla 24. Comparación de la remoción en el día 3 y día 5, prueba t-student...49

Tabla 25. Comparación de la remoción en el día 1 y día 5, prueba t-student...49

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1: Resumen de las fases metodologicas del proyecto de investigación 17

Figura 2: Preenriquecimiento 19

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Métodos 9050A y 9045C EPA. Analisis pH y conductividad.....

Anexo 2. Componentes del medio mineral líquido.....

Anexo 3. Método 8330B EPA 2006. Analisis HPLC.....

Anexo 4. Curva de calibración HPLC.....

Anexo 5. Condiciones fisicoquímicas y microbiológicas según bibliografía.....

Anexo 6. Selección de cepas por morfología.....

Anexo 7. Cromatogramas de los 74 aislamientos.....

Anexo 8. Resultados microcosmos aislamientos seleccionados .....

Anexo 9. Protocolos de preparación de soluciones .....

LISTA DE GRÁFICAS

Pág.

Gráfica 1. Comportamiento de las fuentes de Carbono,Nitrógeno y Explosivo 30

Gráfica 2. Comportamiento de la concentración del sustrato vs teimpo para las tres replicas del bioensayo aislamiento P1 38

Gráfica 3. Promedio replicas aislamiento P1 39

Gráfica 4. Comportamiento de la concentración del sustrato vs teimpo para las tres replicas del bioensayo aislamiento P23 40

Gráfica 5. Promedio replicas aislamiento P23 41

Gráfica 6. Comportamiento de la concentración del sustrato vs teimpo para las tres replicas del bioensayo aislamiento P26 41

Gráfica 7. Promedio replicas aislamiento P26 42

Gráfica 8. Comportamiento de la concentración del sustrato vs teimpo para las tres replicas del bioensayo aislamiento P37 43

Gráfica 9. Promedio replicas aislamiento P37 44

Gráfica 10. Comportamiento de la concentración del sustrato vs teimpo para las tres replicas del bioensayo aislamiento P38 44

Gráfica 11. Promedio replicas aislamiento P38 45

Gráfica 12. Concentración final del sustrato de los cinco aislamientos en los cinco días del bioensayo 46

Gráfica 13. Comportamiento de la remoción del sustrato en el tiempo 50

GLOSARIO

AISLAMIENTO: el aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la producción de colonias aisladas en cultivos sólidos.

BACTERIAS DESNITRIFICANTES: bacterias quimitotrofos con potencial de reducción relativamente altos de manera aeróbica las cuales están muy ampliamente distribuidas por los suelos y las aguas. Un grupo de organismo (Nitrosomonas) oxida amoniaco a nitrito y otro grupo (Nitrobacter) oxidan nitrito a nitrato.

BACTERIAS ENTERICAS: grupo de bacterias Gram negativas en forma de bastoncillos, caracterizado por tener un metabolismo aeróbico facultativo.

BIODEGRADACIÓN: proceso de descomposición de un producto o una sustancia por acción de organismos vivientes.

BIORREMEDIACIÓN: involucra tratamientos que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para degradar ó transformar, compuestos orgánicos tóxicos, a productos metabólicos inocuos ó de menor toxicidad. (Van Deuren *et al.*, 1997).

CEPA: población celular descendiente de una única célula.

CONSORCIO: cultivo bacteriano(o asociación natural) de dos o más miembros en el que cada organismo se beneficia de la actividad de los otros.

CRECIMIENTO MICROBIANO: aumento de número de células de un microorganismos en la que el numero de estas se dobla en un periodo de tiempo fijo.

CULTIVO DE ENRIQUECIMIENTO: empleo de medios de cultivo y condiciones de incubación selectivos para aislar microorganismos directamente de muestras naturales.

ESPECIE: en procariotas colección de cepas estrechamente relacionadas (> 97% homología en las secuencias del rRNA16s) pero lo bastante distintas de las otras cepas como para ser reconocidas como una unidad diferente.

EXPLOSIVO: sustancia o mezcla de sustancias que de manera espontánea, por reacción química, puede desprender gases a una

temperatura, presión y velocidad tales que causen daños en los alrededores.[1]

IMPACTO AMBIENTAL: cualquier alteración en el ambiente de carácter físico, químico, biológico, cultural o socioeconómico que es producida por una acción humana o un evento natural catastrófico.

METABOLISMO: se refiere a la suma de reacciones bioquímicas requeridas para la generación de energía y el uso de la energía para sintetizar material celular a partir de moléculas del medio ambiente.

MICROORGANISMOS: son formas de vida muy pequeñas que sólo pueden ser observados a través del microscopio.

NUTRIENTE: sustancia que la célula toma de su ambiente y que utiliza en reacciones catabólicas o anabólicas.

QUIMIOLITOTROFO: organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos.

QUIMIOORGANÓTROFO: organismo que obtiene su energía de la oxidación de compuestos orgánicos.

REACCIÓN DE OXIDACIÓN- REDUCCIÓN: reacción en la que un compuesto se oxida mientras otro se reduce y toma los electrones liberados en la oxidación.

RESIDUO PELIGROSO: es aquel residuo o desecho que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables, infecciosas o radiactivas puede causar riesgo o daño para la salud humana y el ambiente. Así mismo, se considera residuo o desecho peligroso los envases, empaques y embalajes que hayan estado en contacto con ellos.

RESPIRACIÓN: reacciones catabólicas que producen ATP, cuyos donadores primarios de electrones son compuestos orgánicos o inorgánicos, y cuyos aceptores finales de electrones son también compuestos orgánicos o inorgánicos.

SUBSTRATO: molécula que reacciona con una enzima. También substancia que utiliza un microorganismo para crecer.

---

[1] PRADO, Martha y POLANCO, Karla. Elaboración de Procedimientos para la Manipulación, Transporte, Almacenamiento y Propuesta de Alternativas de Destrucción de los Explosivos Decomisados por la Policía Judicial de la Policía Nacional. Bogotá, 2006. Trabajo de Grado (Ingeniero Ambiental y Sanitario). Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. p. 21.

RESUMEN

En el estudio de remoción del explosivo a partir del aislamiento de bacterias nativas degradadoras del pentaeritritol tetranitrato (PETN) en ambientes contaminados con dicho explosivo, se seleccionaron doce tipos de muestras diferentes de agua, suelo y lodo[2], donde se sospechaba presencia del explosivo PETN.

Posteriormente se realizó un pre- enriquecimiento para las muestras obtenidas con el fin de realizar una bioaumentación, lo cual se realizó en medio mineral liquido; luego se sembró el pre- enriquecimiento en medio mineral sólido con diferentes fuentes de energía por triplicado a partir de diluciones seriadas; después de verificar crecimiento positivo de la población, se dio paso a la resiembra de las 74 colonias teniendo como criterio de selección la morfología de la colonia, coloración, borde, textura y opacidad; estas colonias se aislaron en medio mineral líquido con fuente de carbono y en medio mineral sólido con diferentes fuentes, se seleccionaron cinco aislamientos teniendo en cuenta una disminución en la concentración del explosivo obtenida de la medición por el método de High-performance liquid chromatography **(**HPLC), con el fin de identificar los aislamientos que presentaron mayor degradación

Los cinco aislamientos seleccionados se inocularon en agua residual sintética, desarrollando un microcosmos, en el cual se tiene como base un tiempo inicial t_0, y agua residual sintética sin microorganismos que sirve como referencia. El microcosmos se realizó por triplicado en un tiempo de cinco días; tiempo utilizado diariamente para verificar el comportamiento del aislamiento en cuanto a la remoción del sustrato por medio de HPLC.

[2] El presente proyecto esta sujeto bajo condiciones de confidencialidad. La procedencia de las muestras no puede ser revelada.

ABSTRACT

In the study of the explosive removal from native degrading bacteria isolation of pentaerythritol tetranitrate (PETN) in polluted environments with the explosive, we selected twelve kinds of different samples of water, soil and mud, where it was suspected the presence of explosive PETN.

Subsequently conducted a pre-enrichment for the samples obtained in order to make a bioaugmentation, which was performed in liquid mineral medium, then planted pre-enrichment in solid mineral medium with different sources of energy from triplicate dilutions serials; after verifying positive growth of the population, led to the replanting of each of the colonies as a selection criterion taking the colony morphology, color, edge, texture and opacity, these colonies were isolated in liquid mineral medium with carbon source and solid mineral medium with different sources, isolates were selected taking into account a decrease in the concentration of explosive measurement obtained by the method of high-performance liquid chromatography (HPLC) in order to identify isolates showed higher degradation

The selected isolates were inoculated in synthetic wastewater, developing a microcosm, in which it is based on an initial time t0, and synthetic sewage without biomass that serves as a reference. The microcosm was performed in triplicate in a time of five days, time spent daily to verify the performance of the insulation on the removal of the substrate by means of HPLC.

INTRODUCCION

Uno de los mayores motores económicos en el mundo ha sido el avance de la industria química, un ejemplo de ello es la fabricación de explosivos por la industria militar, minera y de construcción, actualmente esta actividad atribuye a la sociedad y al ambiente impactos negativos significativos que no son controlados ni mitigados.

El presente proyecto de investigación se realizó con el fin de mitigar el impacto ocasionado por el explosivo Tetranitrato de Pentaeritritol (PETN) catalogado como un agente contaminante y perjudicial para los recursos naturales y la salud humana, debido a sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas. Como medida de solución para remover el explosivo de ambientes contaminados mitigando el impacto causado, se propone la implementación de un proceso biológico con agua residual sintética establecida a nivel de laboratorio y bacterias nativas aisladas de ambientes contaminados con PETN.

Durante el proceso biológico es importante realizar el aislamiento de las bacterias para determinar y garantizar la remoción del PETN en ambientes contaminados por este explosivo sin generar efectos secundarios en el ambiente, sustituyendo mecanismos tradicionales de tratamiento final o eliminación como la incineración y el almacenamiento en depósitos que generaban contaminación de los recursos naturales, en el momento de emanar emisiones de gases tóxicos a la atmosfera contribuyendo al deterioro de la calidad del aire, además de la contaminación de suelo y aguas subterráneas por la percolación e infiltración del explosivo.

JUSTIFICACIÓN

Los residuos generados producto de la fabricación y detonación de explosivos requieren una regulación especial para su manejo, disposición y almacenamiento, representan un riesgo para los ecosistemas debido a los usos de minería, ingeniería, explotación de canteras y trabajos de exploración sísmica, afectado los ciclos naturales del ambiente y la salud humana; es por esto que se hace necesario involucrar procesos biológicos que mitiguen la peligrosidad del explosivo en el medio ambiente; una de las formas naturales para reducir dicho impacto es la biodegradación, los microorganismos trabajan directamente en el compuesto.

En Colombia no se han reportado estudios que involucren la biodegradación de explosivos por medio del aislamiento de microorganismos, por tal razón aislarán bacterias que tengan la capacidad de degradar el explosivo en agua residual, , así mismo se determinarán las condiciones de crecimiento de las colonias de bacterias encontradas y los niveles de remoción del compuesto por medio de una correlación entre el pico de concentración estándar y el pico de concentración al final de la biodegradación por parte de la colonia aislada, esto mediante la técnica de cromatografía liquida de alta eficacia (HPLC).

1. OBJETIVOS

1.2 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Determinar preliminarmente el porcentaje de remoción de PETN en agua residual sintética mediante bacterias nativas aisladas de ambientes con presencia de explosivos.

1.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Establecer las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas para el aislamiento de las cepas bacterianas degradadoras de PETN.
- ✓ Aislar preliminarmente las bacterias degradadoras de PETN a partir de muestras de ambientes con presencia de explosivos.
- ✓ Evaluar preliminarmente las cepas bacterianas con mayor capacidad degradadora de PETN con base en la reducción del sustrato.

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 MARCO TEORICO

2.1.1 EXPLOSIVO: Es una sustancia o mezcla de sustancias químicas, las cuales poseen la capacidad de transformarse en productos gaseosos y condensados mediante reacciones de oxido reducción; los productos se convierten en una masa que alcanza grandes presiones y temperaturas.

Los explosivos tienen baja estabilidad química y pueden transformarse rápidamente en gases causa de una combustión o por fuerte impacto, golpe o fricción. En este caso se conoce como explosivo detonante (dinamitas y nitratos de amonio). [1]

2.1.2 GENERALIDADES DE LOS EXPLOSIVOS

Los explosivos son sustancias que pueden estar en forma sólida ó líquida (o mezcla de sustancias) que de manera espontánea, por reacción química, pueden desprender gases a una temperatura, presión y velocidad tales que causen daños en los alrededores[2]

Mezcla explosiva: es toda sustancia explosiva en cuya composición, forma parte más de un componente y existen tres tipos de mezclas explosivas, que son:

Propiamente dichas: es la unión de especies químicas que individualmente no tienen carácter explosivo, pero que unidas entre si, son peligrosas. Ejemplo: la mezcla de Carbón, Azufre y Nitrato de Potasio para formar la pólvora.

De una sustancia con otras explosivas: es cuando se mezcla una sustancia explosiva, con otras sustancias que no tiene ese carácter. Ejemplo: la Nitroglicerina, que se mezcla con tierra de infusorios para formar la Dinamita de base inerte.

La mezcla de dos o más sustancias explosivas, con otras no explosivas.

---

[1] ESCUELA DE INGENIEROS MILITARES. Empleo de Explosivos en Obras de Ingeniería Civil y Militar. 2 ed. Colombia, 1992. p. 7.

[2] 1 ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS. Transporte de mercancías peligrosas: Reglamento modelo. Nueva York: UN, 2003. v. 1. c. 3. p. 12.

2.1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS EXPLOSIVOS SEGÚN SU ORIGEN.

Industriales: Son aquellos fabricados siguiendo normas señaladas en leyes internacionales; y así llevar patrón de fabricación.

Comerciales: Son fabricados para darle uso en la industria, obras civiles, minería. (Pentofex, ANFO, Indugel entre otros.)

Pirotécnicos: Empleados como artificios pirotécnicos, efectos de luces. (pólvoras).

Militares: Explosivos diseñados para uso del combatiente. (TNT, PETN, entre otros).

Artesanales: Explosivos fabricados artesanalmente, la manipulación de estas sustancias pueden ser de alto riesgo debido a que la fabricación de este no sigue normas específicas de fabricación. [3]

2.1.4. CLASIFICACIÓN DE LOS EXPLOSIVOS SEGÚN NACIONES UNIDAS.

CLASE: 1 – SUSTANCIAS EXPLOSIVAS		
La **Clase 1** comprende: **Sustancias explosivas:** son sustancias o mezcla de sustancias sólidas o líquidas que de manera espontánea o por reacción química, pueden desprender gases a una temperatura, presión y velocidad tales que causen daños en los alrededores. **Sustancias pirotécnicas:** son sustancias o mezcla de sustancias destinadas a producir un efecto calorífico, luminoso, sonoro, gaseoso o fumígeno o una combinación de los mismos, como consecuencia de reacciones químicas exotérmicas autosostenidas no detonantes. **Objetos explosivos:** son objetos que contienen una o varias sustancias explosivas.		
SUBCLASIFICACIÓN	**EXPLICACIÓN Y PICTOGRAMA DE SEGURIDAD**	
División 1.1	Sustancias y objetos que presentan un riesgo de explosión en masa (se entiende por explosión en masa la que afecta de manera prácticamente instantánea a casi toda la carga).	
División 1.2	Sustancias y objetos que presentan un riesgo de proyección sin riesgo de explosión en masa.	

[3] AREVALO, José Luis y MONTENEGRO, Norma. Diseño y evaluación de un sistema piloto para el aprovechamiento y/o disposición final de los explosivos ANFO y Pólvora Negra incautados por la Policía Nacional de Colombia.

División 1.3	Sustancias y objetos que presentan un riesgo de incendio con ligero riesgo de que se produzcan pequeños efectos de onda expansiva o de proyección, o ambos efectos, pero sin riesgo de explosión en masa.	
División 1.4	Sustancias y objetos que no presentan ningún riesgo considerable. Se incluyen en esta división las sustancias y objetos que sólo presentan un pequeño riesgo en caso de ignición o de cebado durante el transporte. Los efectos se limitan en su mayor parte al bulto, y normalmente no se proyectan a distancia fragmentos de tamaño apreciable. Los incendios exteriores no habrán de causar la explosión prácticamente instantánea de casi todo el contenido del bulto.	
División 1.5	Sustancias muy insensibles que presentan un riesgo de explosión en Masa. Se incluyen en esta división las sustancias que presentan un riesgo de explosión en masa, pero, que son tan insensibles que, en condiciones normales de transporte, presentan una probabilidad muy reducida de cebado o de que su combustión se transforme en detonación.	
División 1.6	Objetos extremadamente insensibles que no presentan riesgo de explosión en masa. Se incluyen en esta división los objetos que contienen solamente sustancias detonantes sumamente insensibles y que presentan una probabilidad ínfima de cebado o de propagación accidental.	

Fuente. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS. Transporte de mercancías peligrosas: Reglamento modelo. Nueva York: UN, 2003. V. 1, capitulo 8.

2.1.5. PETN: Pentrita o tetranitrato de pentaeritritol. Es altamente sensible a la fricción o al choque. Se emplea como potenciador en cargas explosivas de municiones de pequeño calibre, en minas terrestres y blindajes y cargas superiores de detonadores.

2.1.5.1. Contaminante del medio ambiente

El PETN no se encuentra libre en la naturaleza, el uso y producción del explosivo pueden alterar o modificar ecosistemas causando contaminación al medio ambiente. Actualmente También existen trabajos e informes que describen la biodegradación del PETN utilizando bacterias, las cuales reducen el PETN denitrificandolo en trinitratos y luego en dinitratos finalmente es reducido a dinitrato

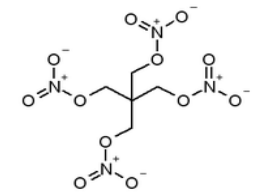
de pentaeritritol. El PETN combinado en suelo es fácilmente transportado por las aguas superficiales y subterráneas. La estructura del PETN es similar a los ésteres sulfato (CO-SO3-) y ésteres de fosfato (CO-PO32-), los cuales están presentes en el medio natural. No obstante, el nitrato de ésteres no se ha descubierto como compuestos que ocurren naturalmente estos sólo están presentes por la intervención del hombre en el medio ambiente.

2.1.5.2 Producción PETN

La fabricación del PETN implica la nitración del pentaeritritol con una composición de ácido sulfúrico y ácido nítrico. El método más importante en la nitrificación es el método ICI, el cual requiere solo de ácido nítrico concentrado (98%+), ya que la mezcla de ácidos puede establecer coproductos sulfonados inestables.

$$C(CH_2OH)_4 + 4HNO_3 \rightarrow C(CH_2ONO_2)_4 + 4H_2O$$

Tabla 1. Propiedades físicas, químicas y explosivas del PETN.

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUIMICAS	
Estructura molecular	
Nombre de la IUPAC	1,3-Dinitrato-2,2-bi(nitratometil)propano
Fórmula química	$C_5H_8N_4O_{12}$
Peso molecular	316.14 g/mol
Sensibilidad al choque	Media
Sensibilidad a la fricción	Media
Densidad	1.773 g/cm³ at 20 °C
Velocidad explosiva	8,400 m/s
Factor E.R.	1.66
Punto de fusión	141.3 °C
Punto de ebullición	Se descompone a 190 °C
Apariencia	Inodoro, blanco, sólido cristalino.
Número CAS	78-11-5
Densidad de detonación	1.7 g/cm³
Velocidad de detonación	8400 m/s
Densidad cristalina teórica	1.773 g/cm³
Se funde	1410 ºC

2.1.6. BIODEGRADACIÓN[4]

Los microorganismos usan naturalmente productos químicos sintéticos para su crecimiento. Usan estas moléculas como fuente de Carbono, de energía, Nitrógeno, Azufre, Fósforo, u otro elemento que necesitan las células. La atención se ha centrado en el consumo de C y energía para sostener el crecimiento de bacterias y hongos. Para los sustratos sintéticos que son ampliamente degradados, la molécula es simplemente otro sustrato orgánico de la cual la población puede obtener los elementos necesarios o la energía necesaria para las reacciones biosintéticas.

Un procedimiento común de investigación se basa en la capacidad de los microorganismos para uso de los compuestos orgánicos como fuentes de C y energía para el crecimiento, se conoce como la técnica de enriquecimiento de la población. El método se basa en la ventaja selectiva adquirida por un organismo que es capaz de utilizar un compuesto de prueba en particular como fuente de energía C y en un medio que contiene los nutrientes inorgánicos, pero no hay otras fuentes de C y energía. En estas condiciones, las especies que son capaces de crecer mediante la utilización de ese producto químico, se multiplicarán.

Sin embargo, las especies que usan los productos excretados por las poblaciones que actúan sobre el nutriente orgánico añadido también aumentarán, y así el aislamiento definitivo de un microorganismo en cultivo puro requiere sembrar en un medio de Agar para que las colonias individuales puedan ser seleccionadas.

Ese medio de Agar selectivo también se hace por tener una única fuente de C y energía. La transferencia repetida de enriquecimiento a través de soluciones que contienen la sustancia de ensayo y nutrientes inorgánicos, aumenta aún más el grado de selectividad de las siembras, ya que los materiales orgánicos y las especies no deseadas de la muestra original se diluye en el medio ambiente por las transferencias de serie.

El enriquecimiento ha sido base para el aislamiento de cultivos puros de bacterias y hongos que son capaces de utilizar un gran número de moléculas orgánicas como C y fuentes de energía. Sin embargo, los intentos de obtener microorganismos que son capaces de crecer en una variedad de otros compuestos orgánicos se han reunido con el fracaso.

[4] Martin Alexander, Biodegradation and Bioremediation, second edition

2.1.6.1. ASIMILACIÓN DE CARBONO[5]

Las mediciones se hacen en su mayoría en fuentes de Carbono, en el sustrato orgánico que se convierte en las células que están llevando a cabo la biodegradación. Los valores reflejan la eficiencia biológica de la conversión del sustrato en la biomasa, con los mayores valores que caracterizan a los organismos más eficientes. Estas mediciones son simples y directas en medios líquidos solubles en agua con sustratos y por lo tanto se pueden distinguir fácilmente el C en la solución. Las mediciones en el suelo, las aguas residuales, los sedimentos, en cambio, son complicadas debido a que otras partículas presentes, además de las células y porque el agua los productos complejos insolubles que se forman a menudo deben distinguirse de los materiales de la célula. El C, que se asimila es más mineralizado, como las células al metabolizar el sustrato original son a su vez descompuestos o consumidos por protozoarios u otros depredadores.

2.1.6.2. ASIMILACIÓN DE OTROS ELEMENTOS

Las moléculas sintéticas pueden ser utilizadas como fuentes de los elementos necesarios que no sean Carbono. Los microorganismos necesitan de N, P, S y una variedad de otros elementos, y los requerimientos de nutrientes, puede ser satisfecha como las especies responsables de degradar el compuesto de interés. Es común que el elemento que está en el complejo orgánico al ser convertidos a la forma inorgánica antes ser tratado se incorporó en los componentes de la célula. A pesar de sustratos orgánicos, pueden contener más de uno de los elementos necesarios para el crecimiento, el organismo a menudo es capaz de utilizar el producto químico como una fuente de uno solo de sus elementos constitutivos.

2.1.7. Contaminación del suelo

La polución edáfica provoca una perturbación del suelo que se traduce en una perdida de calidad y aptitud para el uso o lo hace inutilizable (a no ser que se le somete a un tratamiento previo). Según López (1999) la contaminación se asocia con la entrada de sustancias que a partir de una cierta concentración, debe considerarse no deseables. En términos de Hunt (2000). “se entiende por suelo contaminado aquel que ha sido degradado como consecuencia de la actividad del hombre, restringiendo por tanto su uso”. De otra parte el suelo contiene una gran variedad de sustancias químicas, por lo que puede dificultar, la determinación de

[5] Bailey, R.E., Gonsior, S.J., y Rhinehart, Environmental Sci.Technol.17, 617-631

cuando un mismo elemento o sustancia del suelo, deja de ser beneficiosos o indiferente, para pasar a tener la calificación de contaminante.

2.1.8. Biorremediación de suelos[6]

Para la recuperación de emplazamientos se han utilizado tecnologías a nivel biológico, físico, químico y térmico y mezcla de éstas. Sin embargo las tecnologías que se han empleado en las últimas décadas para la recuperación de terrenos desde el punto de vista físico – químico y térmico, (también llamadas técnicas de descontaminación convencionales) resultan altamente costosas.

La biorremediación estaría dentro de las tecnologías biológicas. El término biorremediación proviene de la traducción no adecuada del termino ingles bioremediation; en la lengua española el termino seria biorrecuperación. Sin embargo se usan indistintamente ambos términos, inclusive también se le refiere como biodegradación. La biorrecuperación es una técnica para el tratamiento de suelos y aguas, en donde microorganismos u otro tipo de seres vivos (plantas, hongos), usan como fuente de energía y/o carbono las sustancias químicas peligrosas (el contaminante) las degradan en unas menos toxicas, tanto para el medio ambiente como para la salud humana, para producir CO_2, agua y biomasa.

Biodegradación es la degradación molecular de una sustancia orgánica resultante de las acciones complejas de los organismos vivos. (NTC 1408)

Los factores que influyen en un proceso de biorrecuperación:

Suelo: tipología, temperatura, pH.

Microbiología: microflora y microfauna autóctonas.

Fuentes de energía y carbón: disponibilidad de nutrientes para los microorganismos.

Tipo y concentración del contaminante

2.1.9. Crecimiento bacteriano.[7]

2.1.9.1. Medio de cultivo

Es un sustrato o solución de nutrientes en los que crece y se multiplican los microorganismos en el laboratorio, con el objeto de aislar las diferentes especies bacterianas, identificarlas y realizar estudios complementarios.

2.1.9.2. Clasificación de los medios de cultivo

Consistencia

Origen

Composición

Utilización

1) Consistencia

Medios líquidos: contienen nutrientes básicos, carecen de agar-agar (sustancia inerte, polisacarida obtenida de las algas), se les adiciona algún tampón capaz de mantener el pH adecuado, por ejemplo: caldo nutritivo, tioglicato, caldo BHI.

Medios sólidos: se preparan añadiendo agar-agar a un medio líquido determinado.

Semisólidos: contienen de 0,5 a 1.0% de agar (menor cantidad que los sólidos), por lo que su consistencia es pastosa o tremula, ejemplo: medio de SIM, agar mortilidad.

2) Origen

Medios naturales: son preparados a partir de sustancias naturales o vegetales, ejemplo: suero, leche y patata.

Medios sintéticos: son aquellos que poseen unos componentes químicos definidos, disueltos en agua y se usan para los estudios metabólicos.

[7] Benitez, Lourdes y López Lersy. Fundamentos teórico-prácticos del aislamiento e identificación bacteriana. 19-28

3) Composición

a) Medios comunes: son aquellos cuya finalidad es el crecimiento de los microorganismos poco exigentes ejemplo: caldo común, agua de peptona.

b) Medios enriquecidos: son medios comunes a los que se les añaden ciertos productos como sangre, suero, glucosa, etc., que permitan el aporte de factores de crecimiento o sustancias que neutralizan agentes inhibidores del crecimiento de bacterias exigentes.

4) Utilización

a) Medios selectivos: son aquellos que se utilizan para inhibir por completo el crecimiento de bacterias distintas de las que se quiere aislar y que están presentes en la muestra. Las selectividad del medio se consigue por la adición de sustancias como las sales biliares, que inhiben a las formas cocáceas gram positivas. Los antibióticos son otras sustancias que transforman los medios de cultivo en selectivos.

b) Medios diferenciales. Son aquellos que se utilizan para poner de manifiesto las propiedades bioquímicas presenten en una mezcla. El resultado de la acción bacteriana sobre el medio, permite, diferenciar claramente aquellas que son positivas en las reacciones bioquímicas, de aquellas otras que se comportan de forma inerte.

c) Medios de enriquecimiento. Son aquellos que favorecen el crecimiento de algún tipo de bacterias que se encuentren en forma minoritaria en una mezcla de varios grupos bacterianos.

d) Medios de identificación. Son aquellos que se utilizan para estudiar la acción de un solo tipo de bacterias frente a un determinado sustrato.

2.1.10. SIEMBRA

El uso de medios de cultivo apropiados dan como resultado el rápido crecimiento de microorganismos. Las distintas especies bacterianas al crecer en un medio de cultivo, lo hacen de forma distinta, es por ello necesario conocer las características de crecimiento de los diferentes microorganismos.

2.1.10.1. TIPOS DE SIEMBRA

1. Inoculación por estría en placa de Agar. Se utilizan para aislar cultivo puros de muestras que contienen flora mixta.

2. Inoculación de tubos de Agar inclinado. Es un tubo de ensayo común que contiene Agar, el cual durante el proceso de enfriamiento se coloca en forma inclinada, se usa para aislar microorganismos aerobios y anaerobios, observación de pigmentos y reacciones bioquímicas.
3. Inoculación en medios líquidos. Se utiliza para el crecimiento rápido y masivo de las bacterias, se puede presentar en algunas de las siguientes formas:

   Enturbiamiento: con capacidad más o menos densa
   Formación de película: velo o nata en la superficie del cultivo
   Sedimento: deposito de bacterias en el fondo del tubo
   Cambio del color del medio: debido a pigmentos bacterianos solubles en el agua
   Formación de flóculos: se observa un aspecto de migas de pan suspendidas en el medio líquido

4. Inoculación en medios semisólidos. Se utiliza para observar la movilidad de algunas bacterias.

5. Inoculación en masas. Se utiliza para realizar recuentos totales de las colonias.

2.1.11. MORFOLOGIA DE LAS COLONIAS

1. Según su elevación

Esparcidas
Planas
Elevadas
Cóncavas

2. Según su superficie

Lisa
Rugosa

Anular
Radiada

3. Según su borde

Entero
Ondulado
Gastado
Filamentoso

4. Según el aspecto.

Puntiforme
Circular
Rizoide
Irregular
Filamentosa

2.2. MARCO NORMATIVO

Ley 737 de 2002, Congreso de la República, Por medio de la cual se aprueba la "Convención Interamericana contra la fabricación y el tráfico ilícito de armas de fuego, municiones, explosivos y otros materiales relacionados".

Decreto 2811 de 1974, Presidencia de la República, Por el cual se expide el Código Nacional de los Recursos Renovables y de Protección del Medio Ambiente, del suelo agrícola y de los usos no agrícolas de la tierra.

Decreto 1594 de 1984 Ministerio de Agricultura, Este decreto reglamenta el uso del agua y los residuos líquidos a nivel nacional. Establece los parámetros y las concentraciones máximas admisibles en un vertimiento líquido según el uso posterior que se quiera dar a éste.

Decreto 1335 de 1987, INDUMIL, Reglamento de seguridad en las labores subterráneas. Regula aspectos relacionados con productos explosivos los cuales son vendidos por Indumil.

Decreto 2222 de 1993, Ministerio de Minas y Energía, Por el cual se expide el reglamento de higiene y seguridad en las labores mineras a cielo abierto. La compra, transporte, almacenamiento, manejo y empleo de explosivos requeridos en las labores mineras deberá cumplir con la reglamentación establecida por las autoridades competentes.

Decreto 334 de 2002, Republica de Colombia, por el cual se establecen normas en materia de explosivos. "Sólo el Gobierno puede introducir y fabricar armas, municiones de guerra y explosivos. Nadie podrá poseerlos ni portarlos sin permiso de la autoridad competente";

Decreto 4741 de diciembre 30 de 2.005, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Éste Decreto reglamenta parcialmente la prevención y manejó de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral, donde se establecen las responsabilidades y obligaciones de los actores de la cadena de la gestión de residuos peligrosos.

Resolución 2400 de mayo 22 de 1.979, Ministerio del Trabajo y Seguridad Social. Esta resolución es el Estatuto de Seguridad Industrial, donde se establecen algunas disposiciones sobre vivienda, higiene y seguridad en los establecimientos de trabajo. En esta resolución se establecen algunas consideraciones relacionadas con la manipulación, transporte y almacenamiento de explosivos.

Resolución 081 de 2002, INDUMIL, Mediante la cual se clasifican como explosivos para todos los efectos legales, las materias primas o insumos que sin ser explosivos individualmente en conjunto conforman una sustancia explosiva.

Resolución 0062 de 2007, IDEAM, Por la cual se adoptan los protocolos de muestreo y análisis de laboratorio para la caracterización fisicoquímica de los residuos o desechos peligrosos en el país.

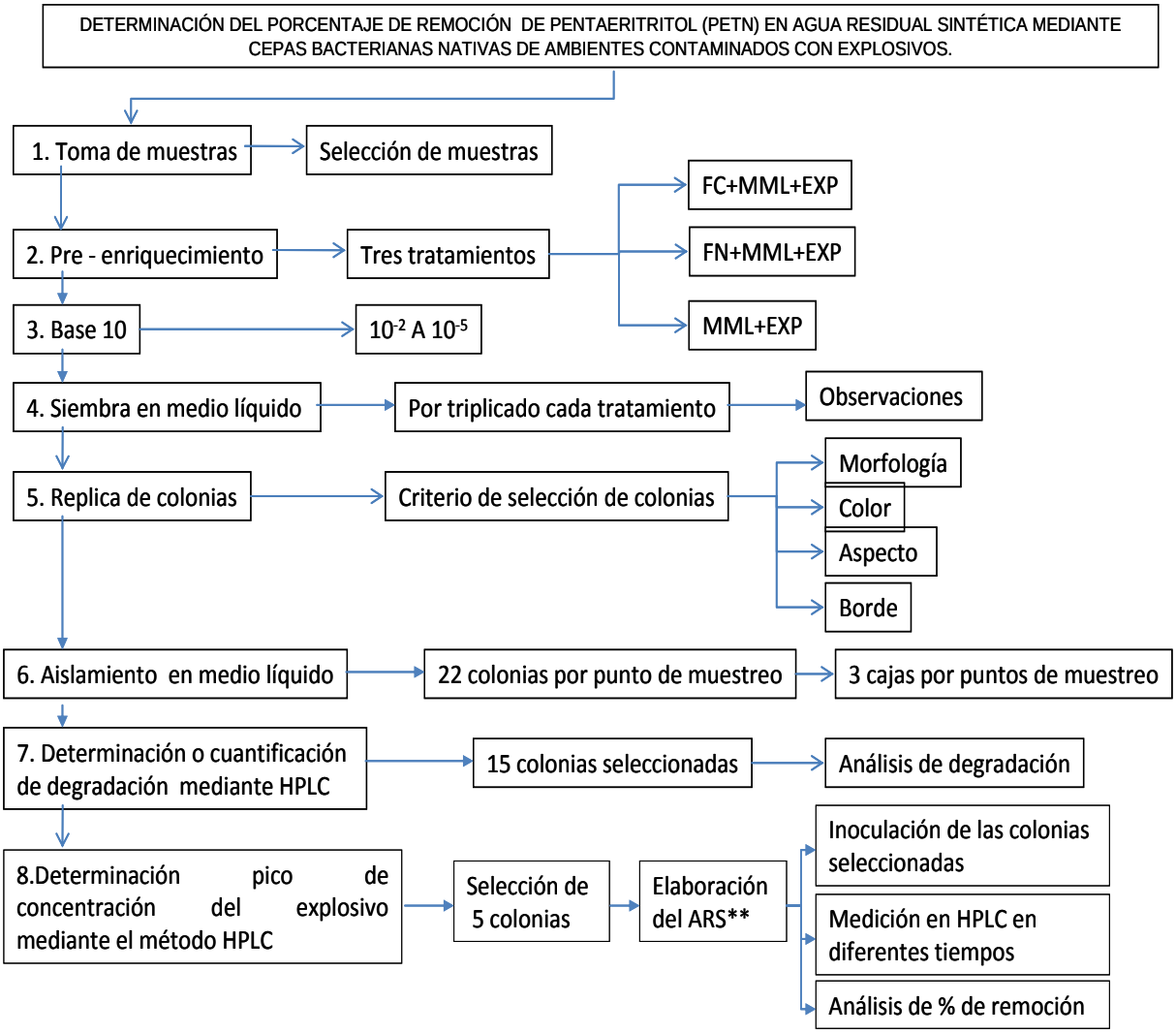
Circular Nº 0277 del 26 / 11 / 1997, INDUMIL, Se imparten instrucciones sobre la seguridad en la utilización de material explosivo. Transcribe, resume y reitera el cabal cumplimiento de las Normas de Seguridad en labores subterráneas y de superficie con explosivos en el territorio Nacional.

3.METODOLOGÍA

Este capítulo describe los procedimientos efectuados durante la elaboración del presente proyecto de investigación, en el cual se utilizaron diferentes ambientes contaminados por el explosivo Tetranitrato de Pentaeritritol (PETN), tomando como solución medidas biológicas para la degradación del mismo.

La presente investigación, cuenta con 6 fases, las cuales serán descritas mediante el diagrama de flujo.

Figura 1. Resumen de las fases metodológicas del proyecto de investigación



(MML+FC+EXP). Medio de cultivo mineral liquido (MML) + Fuente de Carbono (FC) + Explosivo (EXP).
(MML+FN+EXP). Medio de cultivo mineral liquido (MML)+ Fuente de Nitrógeno (FN)+ Explosivo (EXP).
(MML+EXP).Medio de cultivo mineral liquido (MML) + Explosivo. (EXP).

FASE1. TOMA DE MUESTRAS

Inicialmente se tomaron muestras de agua, suelo y lodo de doce puntos con presencia de Tetranitrato de pentaeritritol. Se analizaron las muestras de acuerdo a los parámetros establecidos por la EPA en los métodos 9050 A y 9045 C del año (2008). **(Ver Anexo 1)**

Tabla 2. Descripción de los puntos de muestreo.

MUESTRA	PUNTO DE MUESTREO
1	Exterior, frente a la planta de cristalización.
2	Canal exterior
3	Trampa taller multiplicador.
4	Canal trampa producción.
5	Caneca residuos de lavado.
6	Tanque de transporte.
7	Tanque exterior caja de captación
8	Tanque concentración de tenso activo
9	Campo de prueba
10	Lodos de la PTAR
11	Fitorremediación
12	Caño PTAR

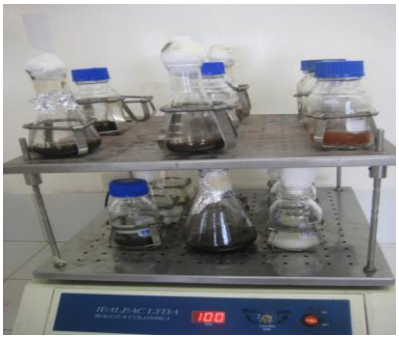
Fuente: Las Autoras 2010.

FASE 2. PRE-ENRIQUECIMIENTO

A partir de las muestras tomadas en doce puntos diferentes, se realizó el preenriquecimiento, este permite la bioaumentación de la población existente en las muestras; para llevar a cabo esta fase se adicionan cada una de las muestras en un medio mineral líquido **(Ver Anexo 2)**

Posteriormente se agita continuamente con una velocidad de 120 rpm por un periodo de 45 días, en condiciones estériles. *Ver Figura 2*

Figura 2. Preenriquecimiento



Fuente. Las Autoras 2010

La preparación del preenriquecimiento está basada en tres tratamientos diferentes, los cuales se diferencian uno del otro por las fuentes a utilizar como lo son, la de carbono, nitrógeno y explosivo. El medio mineral está compuesto con soluciones iguales en los tres tratamientos. De tal manera los tratamientos son formulados de la siguiente manera

Tratamiento 1 = Medio mineral liquido (MML)+ Fuente de Nitrógeno (FN)+ Explosivo (EXP). (MML+FN+EXP).

Tratamiento 2= Medio mineral liquido (MML) + Fuente de Carbono (FC) + Explosivo (EXP). (MML+FC+EXP).

Tratamiento 3= Medio mineral liquido (MML) + Explosivo. (EXP) (MML+EXP).

FASE 3. AISLAMIENTO

Al realizar la bioaumentación se realiza las diluciones para tener un control poblacional y así asegurar que las cepas sean las que degraden el explosivo.

Paso 1.

En tubos de ensayo realizar diluciones de 10^{-4} a 10^{-7} en solución salina al 0.86%. Las diluciones para los tratamientos 1,2,7,8 se realizan de 10^{-5} a 10^{-7}, y para los tratamientos 4,5,6,9,10,11,12 se realizan de 10^{-4} a 10^{-6}.

Paso 2.

Sembrar los microorganismos con una concentración de 50 mg/l, en medio mineral sólido con fuentes de carbono y nitrógeno y sin fuente, por triplicado en cada tratamiento

Paso 3.

Incubar por un tiempo mínimo de 15 días a una temperatura de 26ºC.

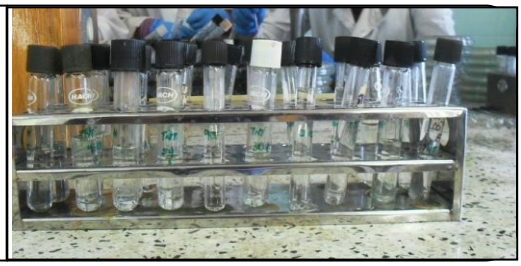
FASE 4. SELECCIÓN DE COLONIAS

Para la selección de colonias se duplica la concentración en el medio a 100 mg/l; la inoculación de cada cepa identificada se realiza en cajas de petri divididas cada una en 22 cuadrículas, este procedimiento se realiza por triplicado.

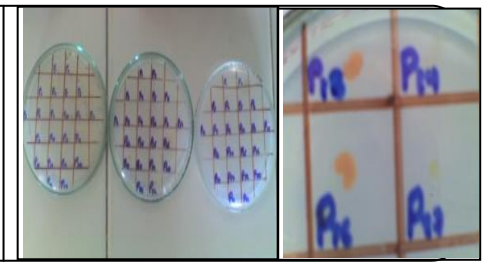
Paso 1.

Seleccionar la colonia teniendo como criterio su morfología, coloración, borde, textura y opacidad

Paso 2.

Inocular la colonia en medio mineral líquido con fuente de carbono en tubos de ensayo, con un capilar sellado y esterilizado	

Paso 3.

Inocular la cepa en medio mineral Sólido con las tres fuentes a utilizar (Carbono, Nitrógeno, Explosivo), por Triplicado, con un capilar sellado y esterilizado	

Paso 4.

Incubar por 30 días a Temperatura de 25°C	

FASE 5 .DETERMINACIÓN DE REDUCCIÓN DEL SUSTRATO PARA LOS AISLAMIENTOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (HPLC).

Posteriormente de inocular las colonias en medio mineral líquido con fuente de carbono, se evalúa el consumo del sustrato utilizando Cromatografía Liquida (HPLC). (EPA, 2006 Método 8330B) **(Ver Anexo 3)**. Se realiza una curva de calibración con concentraciones conocidas de cada uno de los compuestos, a partir de soluciones estándares conocidas para establecer las concentraciones del sustrato. **(Ver Anexo 4)**.

Para realizar la lectura de disminución del sustrato, es necesario filtrar cada una de las muestras y hacer un lavado a los materiales con acetonitrilo para

asegurar que el microorganismo no se adhiera a las paredes de los mismos, antes de filtrar es necesario separar la biomasa para utilizarla en el bioensayo. *Ver diagrama 1.*

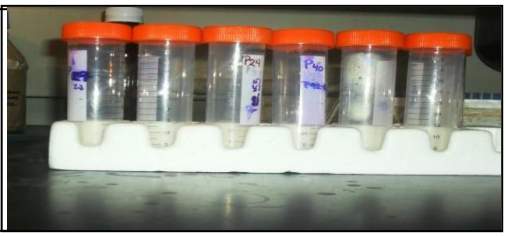
Para llevar a cabo la filtración se deben realizar los siguientes pasos.

Paso 1.

Lavar con 1ml de acetonitrilo el tubo de ensayo que contiene el medio, llevar a vortex por 1 minuto y agregar nuevamente 1mlde acetonitrilo posteriormente llevar a vortex por 1 minuto

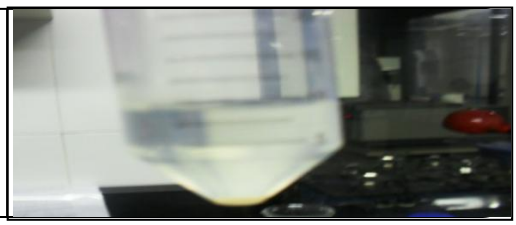
Paso 2.

Agregar el medio mineral líquido con fuente de carbono que tiene el inoculo del aislamiento en el tubo falcom



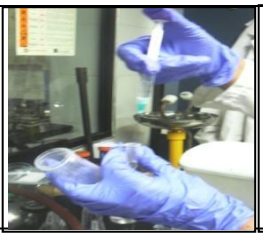
Paso 3.

Llevar el tubo falcom a 6000 rpm en la centrifuga con el fin de separar la biomasa del sobrenadante



Paso 4.

Se toman 2 ml del sobrenadante y agregarlo en un tubo eppendorf, posteriormente agitar en vortex por 30 segundos



Paso 5.

Agregar 2 ml del paso 1, y 2 ml del paso 4, en el tubo Serum, llevar a vortex por 30 segundos.

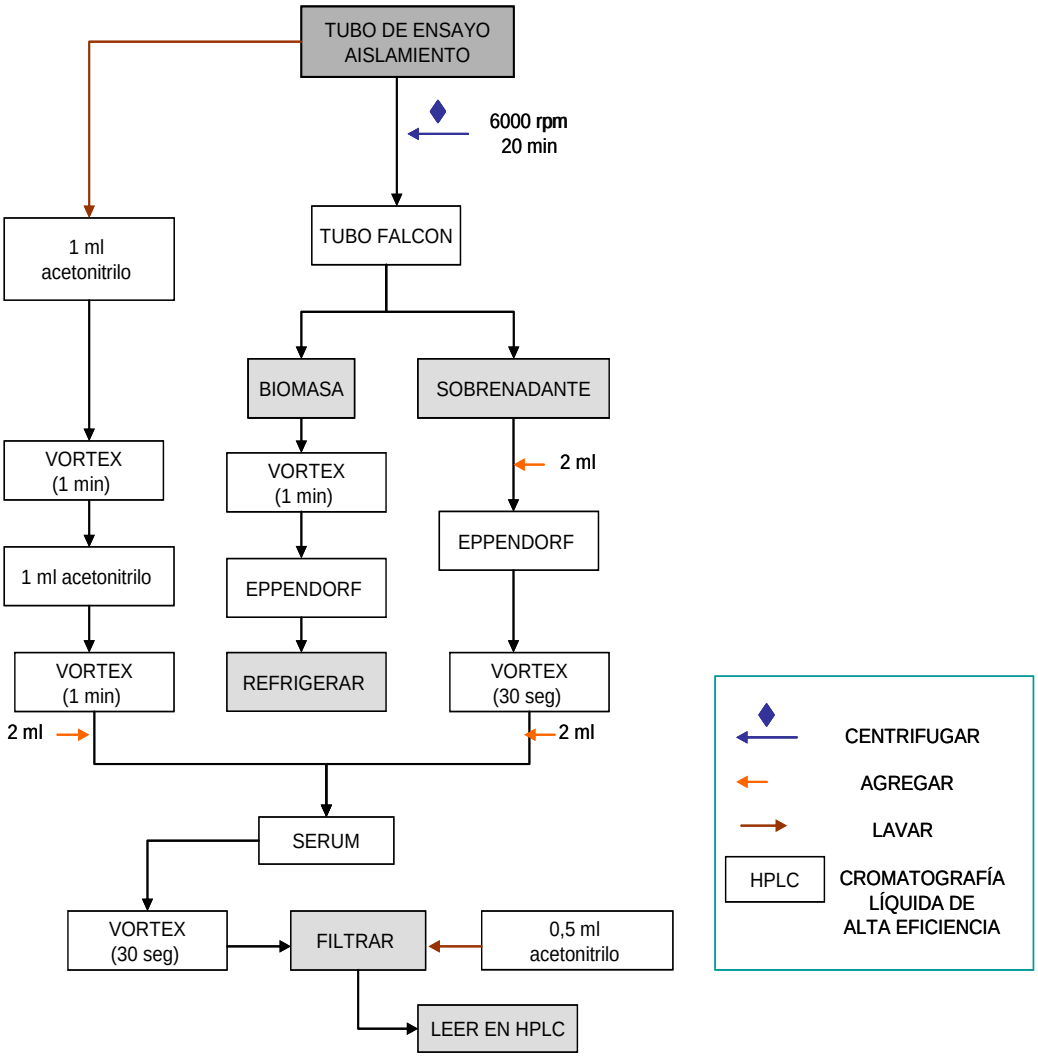
Paso 6.

Filtrar los 4 ml obtenidos, lavando el filtro con 0,5ml de acetonitrilo

Paso 7.

Analizar cada muestra en Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Diagrama 1. Procedimiento para la filtración para análisis en HPLC



FASE 6. EVALUACIÓN DE LA CEPAS SELECCIONADAS EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA.

Con la biomasa de los cinco aislamientos que presentaban mayor disminución en la concentración del explosivo, se realiza un bioensayo por triplicado, dichos aislamientos son inoculados en agua residual sintética, esto con el fin de identificar las bacterias que consumen el sustrato. Para esto se tiene como base un tiempo

de 5 días y un agua residual sin microorganismos, que nos sirve como referencia. Este bioensayo se evalúa midiendo el porcentaje de remoción del explosivo por medio del HPLC en cada uno de los tiempos establecidos, las condiciones de medición se basan específicamente en 42% de Agua, 56% de Metanol y 2% de Acetonitrilo, es importante tener en cuenta que el acetonitrilo es usado para reducir los tiempos de retención.

Es importante definir la densidad óptica con la que se va a trabajar, esto con el fin de estandarizar el número de bacterias en cada bioensayo, para esto se realiza un medio mineral líquido con fuente de carbono, y se inoculan cada una de las cepas en el medio, posteriormente se agita en shaker durante 4 días. Mediante la escala de McFarland se da paso a la determinación de la concentración mediante la densidad óptica.

La composición del agua residual sintética, necesaria para realizar el bioensayo, se muestra en la tabla 3.

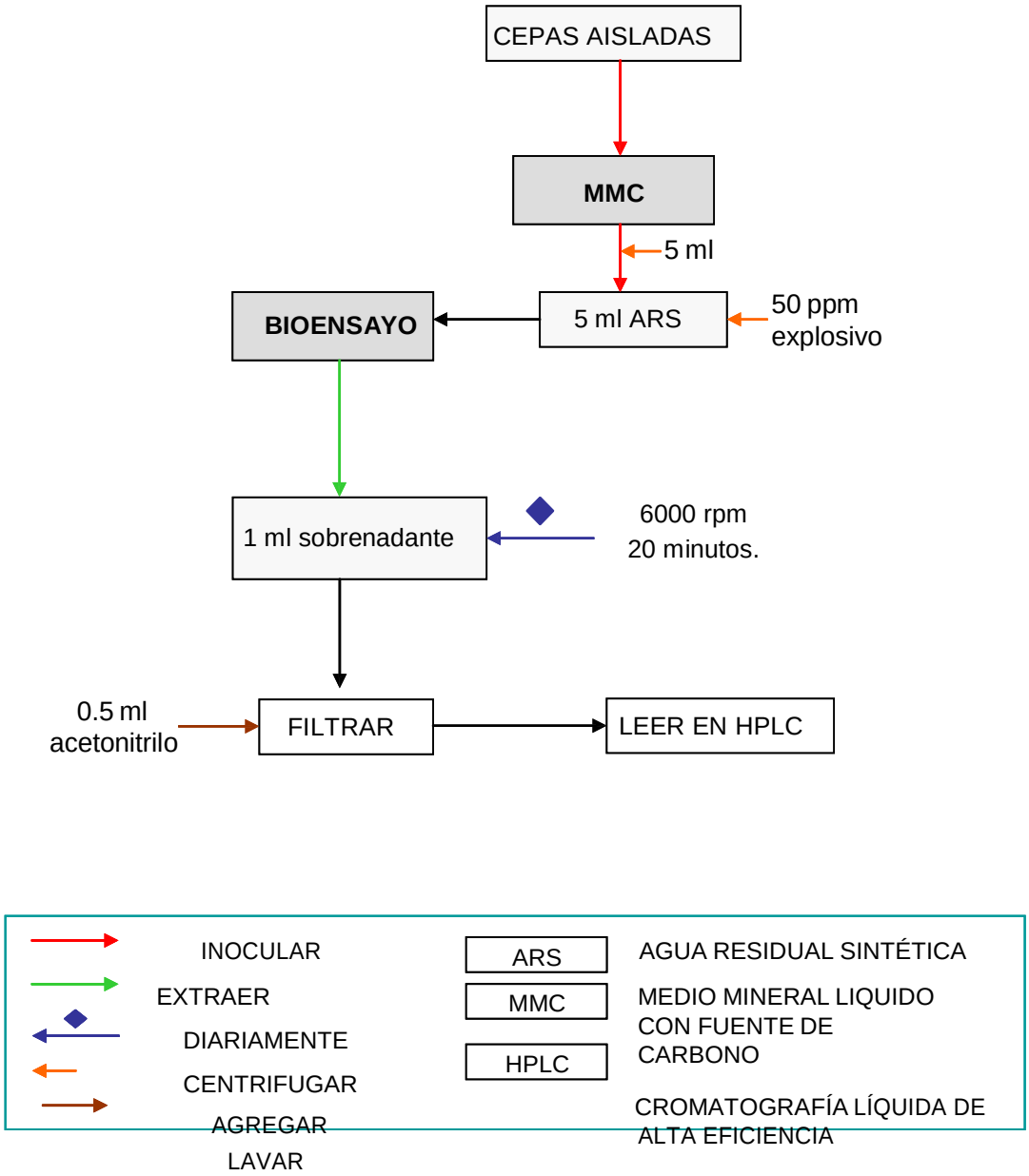
Tabla 3. Composición del Agua residual sintética

COMPUESTO	CANTIDAD (mg/l)
Suero de leche	0.326
Sucrosa	0.49
Acetato de sodio	1.12
Fosfato ácido de potasio	0.45
Urea	2.4

Fuente: Los autores, con referencia a Remoción Biológica de Materia Orgánica, Nitrógeno y fósforo en un sistema tipo anaerobio-anóxico-aerobio; GONZÁLEZ Maribel, SALDARRIAGA Julio, 2008

Una vez preparada el agua residual sintética (ARS), se procede a inocular 5ml del medio en 5 ml de ARS agregando 50 mg/l del explosivo, teniendo como referencia una solución patrón (10 ml de ARS). Después de inocular, se extrae diariamente de cada bioensayo 1 ml del sobrenadante, que se centrifuga a 6000 rpm durante 20 minutos el tubo centrifugado es filtrado adicionando 0,5 ml de acetonitrilo, por último se analiza la muestra en el HPLC, con el fin de determinar el comportamiento de la concentración del sustrato. *Ver diagrama 2.*

Diagrama 2. Procedimiento filtración microcosmos



4. RESULTADOS Y ANALISIS

4.1. ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES FISICOQUIMICAS

CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS	
Objetivo Especifico 1	Establecer las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas para el aislamiento de las cepas bacterianas degradadoras de PETN.

Para establecer las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas se tomaron como referencia diferentes fuentes bibliográficas, estudios de balance de masas, estequiometria y fisiología microbiana por parte de los investigadores principales[3] y las autoras de las cuales se identificaron los macro y micronutrientes a utilizar, en la *tabla 4,* se muestra la bibliografía y las condiciones necesarias para facilitar el crecimiento de la población microbiana. Según referencias bibliográficas se tuvo en cuenta el explosivo TNT ya que tiene propiedades similares al sustrato estudiado (PETN). **(Ver Anexo 5)**.
Se definieron las condiciones microbiológicas y fisicoquímicas para llevar a cabo el proyecto de investigación. *Ver tabla 4.*

Tabla 4. Condiciones fisicoquímicas y microbiológicas

FASE	CONDICIONES MICROBIOLOGICAS			CONDICIONES FISICOQUIMICAS
	Sustancias	**Tipo y Cantidad**	**Concentración**	
PREENRIQUECIMIENTO	Sales	HCl (3 ml)	1 M	**25 °C** **Ph 7** **50 ppm**
		NaCl (12.5 g)	8,5 Mm	
		$MgSO_4 – 7H_2O$ (5 g)	0,81 Mm	
		$CaCl_2$ $2H_2O$ (1g)	0,27 Mm	
	Buffer	K_2HPO_4 (17,5 g)	4,02 Mm	
		$K_2H_2PO_4$ (7,5 g)	2,2 Mm	
	Vitaminas	Clorhidrato de piridoxina (0,05 g)		
		Ácido p-aminobenzoico (0,025 g)		
		Ácido nicotínico (0,025g)		
		Pantotenato de calico (0,025 g)		
		Riboflavina (0,025 g)		
		Vitamina B_{12} (0,025 g)		
		Tiamina-HCl (0,025 g)		
		Biotina (0,01 g)		
		Ácido fólico (0,01 g)		
		α-lipoico (0,01 g)		

[3] INVESTIGADORES PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA Y UNIVERSIDAD DE LA SALLE

	Trazas	HCl (20 ml)	18 -19%	
		$MnSO_4$ H_2O (0,2 g)		
		H_3BO_3 (0,1g)		
		$ZnSO_4$ $7H_2O$ (0,1 g)		
		$CaSO_4$ $5H_2O$ (0,05 g)		
		$CoCl_2$ H_2O (0,05 g)		
		$CuSO_4$ $5H_2O$ (0,01 g)		
		Na_2MoO_4 $2H_2O$ (0,01 g)		
		$NiSO_4$ $6H_2O$		
	Explosivo	Pentrita (2,5 ml)		
	Hierro	HCl (3 ml)	1 M	
		$FeSO_4$ $7H_2O$ (0,3 g)	10, 8 µM	
	Incubación de 45 días			
	Agitado en shaker 75 rpm			
AISLAMIENTO	Diluciones 10^{-4} a 10^{-7}			Incubar a 21° C
	Solución salina 0.86%			Mantener pH 7
	Incubación de 3 semanas aprox.			[50 mg/L]
SELECCIÓN DE CEPAS	Sembrar en 22 cuadriculas con igual área			Incubación a 21° C
	Incubación de 3 semanas aprox.			[100 mg/L]

Fuente: Las Autoras 2010.

A las doce muestras seleccionadas contaminadas con PETN se realizaron análisis de pH y conductividad según los métodos de la EPA

Tabla 5. Datos de pH Y conductividad para las muestras

MUESTRA	PUNTO DE MUESTREO	CONDUCTIVIDAD (g/l)	pH
1	Exterior, frente a la planta de cristalización.	0.34	7.11
2	Canal exterior.	0.22	7.34
3	Trampa taller multiplicador.	0.17	6.58
4	Canal trampa producción.	1.15	
5	Caneca residuos de lavado.	1.47	2.11
6	Tanque de transporte.	---	---
7	Tanque exterior caja de captación	0.44	7.54
8	Tanque concentración de tenso activo	14.96	7.20
9	Campo de prueba	0.63	6.72
10	Lodos de la PTAR	1.57	8.73
11	Fitorremediación	0.47	7.42
12	Caño PTAR	0.44	8.95

Fuente: Las Autoras 2010.

Para garantizar que las muestras se encuentren en un pH neutro se utiliza la solución buffer, la cual hace que mantengan el pH durante todas las fases metodológicas sin alterar los resultados, logrando así que los microorganismos se encuentren en condiciones fisicoquímicas adecuadas para su crecimiento, sin afectar su comportamiento al consumir el sustrato.

4.2. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS

CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS	
Objetivo Especifico 2	Aislar preliminarmente las bacterias degradadoras nativas de PETN a partir de muestras de ambientes contaminados con explosivos.

4.2.1. AISLAMIENTO

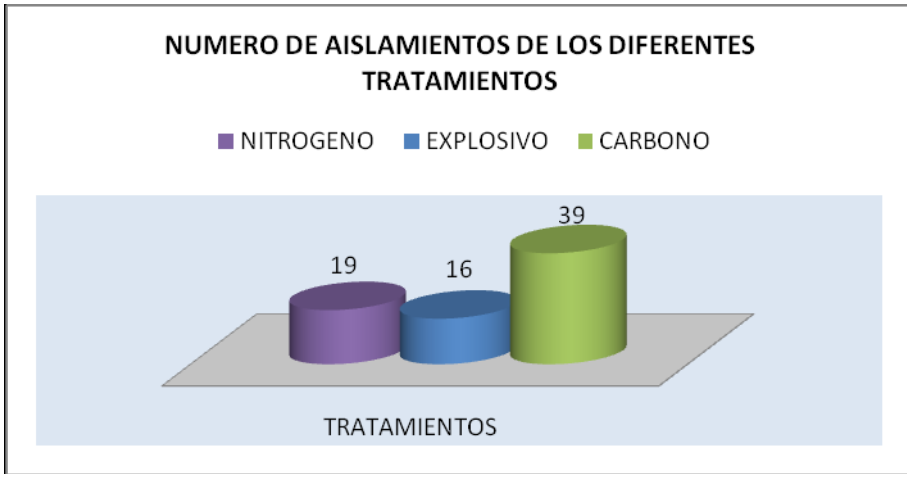
Después de realizar el preenriquecimiento durante 45 días y de establecer las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas necesarias para la subsistencia de las bacterias nativas, se da paso al aislamiento de cada una de las cepas, las cuales son sembradas en medio sólido con fuente de carbono (Glicerato, acetato, Glucosa, Citrato), fuente de nitrógeno(Nitrato de amonio) y sin fuente (explosivo), y medio mineral líquido con fuente de carbono únicamente. De dichos aislamientos se seleccionaron en total 74 cepas nativas, provenientes de los 12 puntos de muestreo; la mayoría de las cepas aisladas vienen del tratamiento con fuente de carbono, y de la muestra 2 en la cual se encontraron 20 aislamientos que hacen referencia al 27.02% del total de aislamientos realizados, *Ver tabla 6*

Tabla 6. Aislamientos seleccionados en los diferentes tratamientos

MUESTRAS	NUMERO DE AISLAMIENTOS		TRATAMIENTOS		
			NITROGENO (T1)	CARBONO (T2)	EXPLOSIVO (T3)
1. Exterior frente a la planta de cristalización	19	25.67%	7	10	4
2. Canal exterior.	20	27.02%	----	16	4
3. Trampa taller multiplicador.	13	17.56%	2	5	6
4. Canal trampa producción.	3	4.05%	----	3	---
5. Caneca residuos de lavado.	4	5.40%	2	2	---
6. Tanque de transporte.	3	4.05%	1	2	---
7. Tanque exterior caja de captación	1	1.35%	1	----	---
8. Tanque concentración de tenso activo	2	2.70%	---	1	1
9. Campo de prueba	3	4.05%	1	1	1
10. Lodos de la PTAR	3	4.05%	3	---	---
11. Fitorremediación	1	1.35%	---	1	---
12. Caño PTAR	2	2.70%	2	----	---
TOTAL	**74**	**100%**	**19**	**39**	**16**

Fuente: Las Autoras 2010

Gráfica 1. Comportamiento de las fuentes de carbono, nitrógeno y explosivo



Fuente: Las Autoras 2010

De los 74 aislamientos realizados en los diferentes tratamientos (Carbono, Nitrógeno, Explosivo), el 52% proviene del tratamiento con fuente de carbono, el 25% proviene del tratamiento con Nitrógeno y el 21% restante hacer referencia al tratamiento con explosivo.

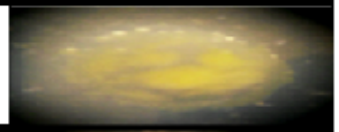
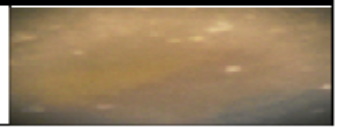
4.3. SELECCIÓN DE CEPAS

Para el aislamientos de las bacterias degradadoras de PETN, se realizaron diluciones seriadas, las cuales permiten tener un control poblacional, después de sembrar en 973 cajas de petri, cada una de las cepas halladas en la bioaumentación, se da paso a la selección de las diferentes cepas encontradas.

Para la selección de las cepas se identificaron con el estereoscopio, la morfología de cada una de estas, dicha morfología hace referencia al color, textura, forma, elevación que caracterizan a cada una de las mismas, identificando también la muestra, el tratamiento y la dilución de donde provienen.

En la tabla 7 se presenta una muestra de la morfología de algunos de los aislamientos seleccionados, para observar los demás resultados. **(Ver Anexo 6).**

Tabla 7. Selección de cepas por morfología.

NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P1	1	MMC	10 7	AMARILLA	IRREGULAR	LISA	CONVEXA	
P2	1	MMC	10^7	GRIS CLARO	REGULAR	RUGOSA	CONVEXA	
P3	1	MME	10^7	AMARILLA	IRREGULAR	RUGOSA	LEVANTADA	
P5	1	MME	10 7	CAFÉ	IRREGULAR	LISA	PLANA	
P7	N1	MMC	10^6	GRIS	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIA CAFÉ	
P8	N1	MMC	10^6	GRIS	IRREGULAR	LISA	LEVANTADA	

4.4. DETERMINACIÓN DE REDUCCIÓN DEL SUSTRATO PARA LOS AISLAMIENTOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (HPLC)

CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS	
Objetivo Especifico 3	Identificar preliminarmente las cepas bacterianas nativas con mayor capacidad degradadora con base en la reducción del sustrato.

Después de inocular las 74 colonias seleccionadas, en medio mineral líquido con fuente de carbono en un periodo de 30 días, se evaluó el consumo del sustrato utilizando el Método de Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC)[8].

Se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de cada uno de los compuestos, a partir de soluciones estándares para establecer las concentraciones del sustrato.

De los 74 aislamientos analizados en HPLC. **(Ver Anexo 7)**, los aislamientos (P1, P23, P26, P37 y P38) presentaron mayor reducción del sustrato en comparación a la concentración inicial del mismo (85mg/L). Ver cromatogramas.

Cromatogramas de los cinco Aislamientos seleccionados

SOLUCIÓN PATRÓN – ABSORVANCIA VS TIEMPO

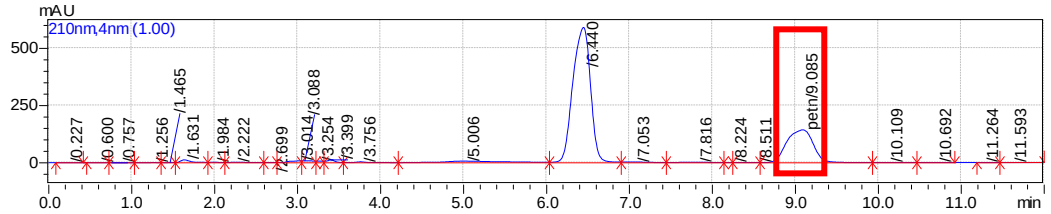


Tabla 8. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P1.

Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda
9,085	88,619	Ch2 210nm

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Los aislamientos seleccionados fueron las siguientes:

AISLAMIENTO P1 – ABSORBANCIA VS TIEMPO

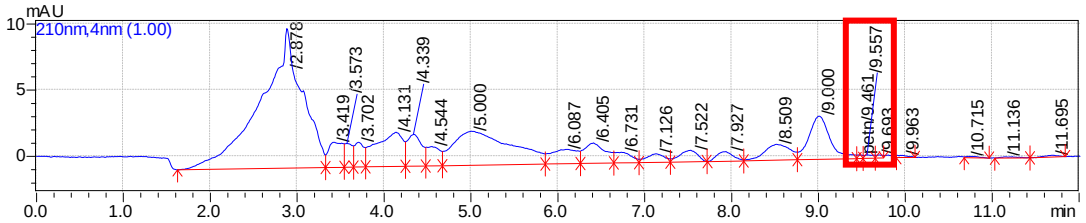


Tabla 9. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P1.

Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda
9,461	0,07446984	Ch2 210nm

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

AISLAMIENTO P23 – ABSORBANCIA VS TIEMPO

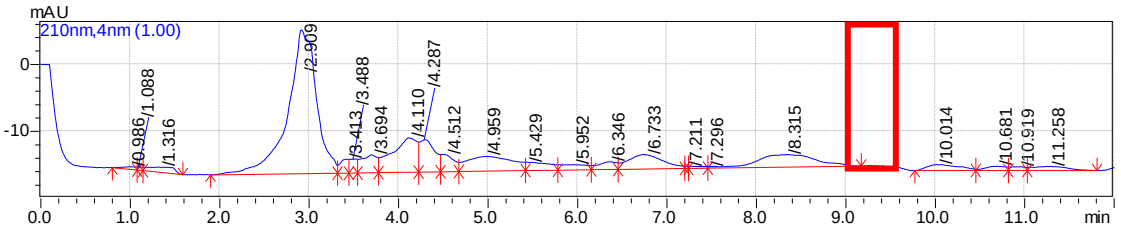


Tabla 10. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P23.

Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda
-	0	Ch2 210nm

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

AISLAMIENTO P26 – ABSORBANCIA VS TIEMPO

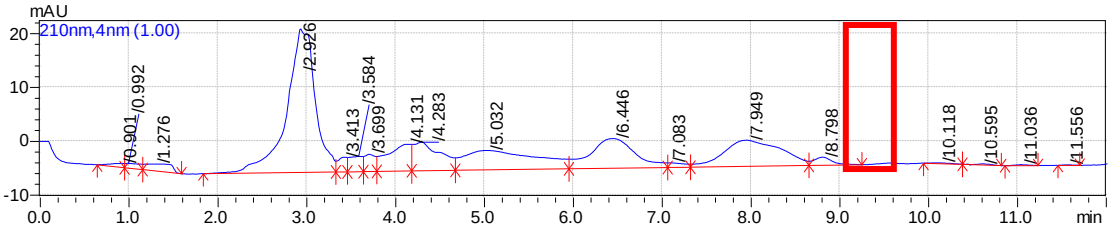


Tabla 11. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P26.

Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda
-	0	Ch2 210nm

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

AISLAMIENTO P37 – ABSORBANCIA VS TIEMPO

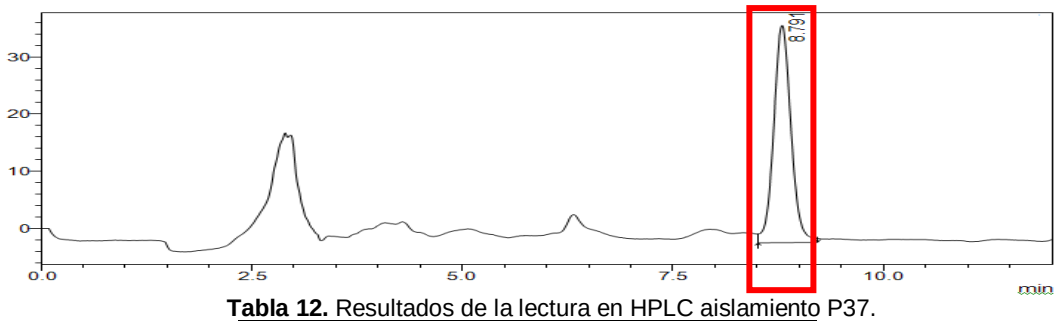


Tabla 12. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P37.

Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda
8,791	15,1720	Ch2 210nm

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

AISLAMIENTO P38 – ABSORVANCIA VS TIEMPO

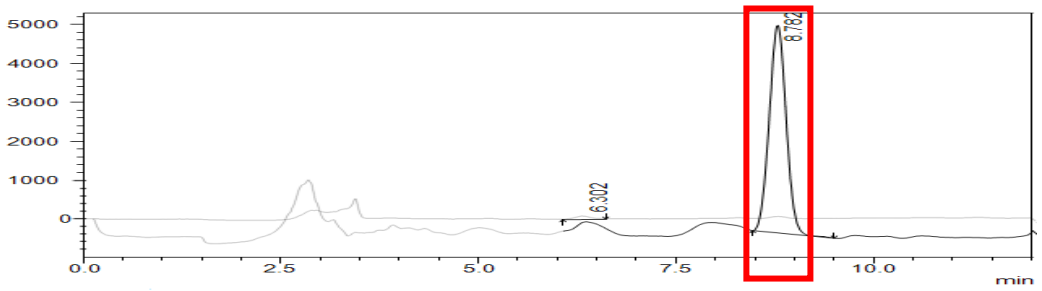


Tabla 13. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P38.

Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda
8,782	22,2260	Ch2 210nm

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

El cromatograma de la solución patrón muestra un pico de concentración de 85 mg/L del explosivo, que representa la concentración inicial del explosivo en las muestras.

En los cromatogramas obtenidos de las cinco muestras seleccionadas, se identifica el pico de concentración del sustrato en un tiempo de retención entre 9 y 10 minutos, tiempo establecido en el método 8330B (EPA, 2006), necesario para determinar la concentración del PETN presente en la muestra analizada.

La longitud de onda debe ser de 210nm para identificar la concentración del sustrato al momento de correr las muestras en HPLC según el método de la EPA ya mencionado.

Los picos presentes en los cromatogramas en tiempos establecidos entre 9 y 10 minutos, resultan por la presencia de sustancias contenidas en la muestra como acetonitrilo y de posibles subproductos de la degradación del agua residual y del PETN, éstas son identificadas en tiempos de retención diferentes.

De los aislamientos seleccionados (P23 y P26) de las 74 cepas, no se detectó concentración del explosivo lo cual indica que la concentración del sustrato presente fue removida en su totalidad.

Se seleccionaron cinco aislamientos que presentaron reducción del sustrato con el fin de garantizar que en la fase del bioensayo los aislamientos seleccionados tuvieron mayor probabilidad de degradar dicha concentración en un periodo de cinco días.

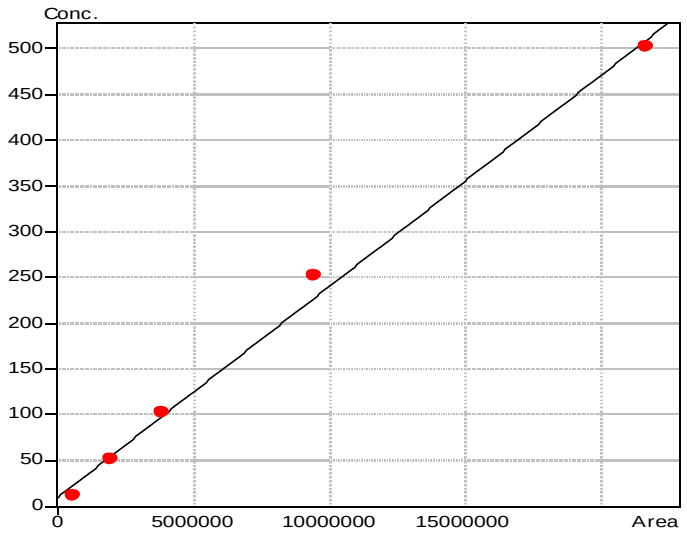
4.5. EVALUACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA

CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS	
Objetivo Especifico 3	Identificar preliminarmente las cepas bacterianas nativas con mayor capacidad degradadora con base en la reducción del sustrato.

Para la evaluación de las cepas seleccionadas fue necesario realizar un microcosmos, que se efectuó en un periodo de cinco días en los cuales se tomaron lecturas diarias en HPLC para medir la disminución del sustrato.

A continuación se muestra la curva de calibración utilizada en HPLC, para la determinación de la degradación sustrato.

CURVA DE CALIBRACIÓN



Donde:

Ecuación 1.

$$y \quad ax \quad b$$

$$a \quad 2.310315^{05}$$

$$b \quad 8.706775$$

$$R^2 \quad 0.9949371$$

$$R \quad 0.9974653$$

Tabla 14. Datos para la calibración del equipo (HPLC).

	CONCENTRACIÓN	AREA
1	10	579854
2	50	1928724
3	100	3871924
4	250	9430079
5	500	21693664

Fuente: Equipo HPLC. Universidad Javeriana, 2009.

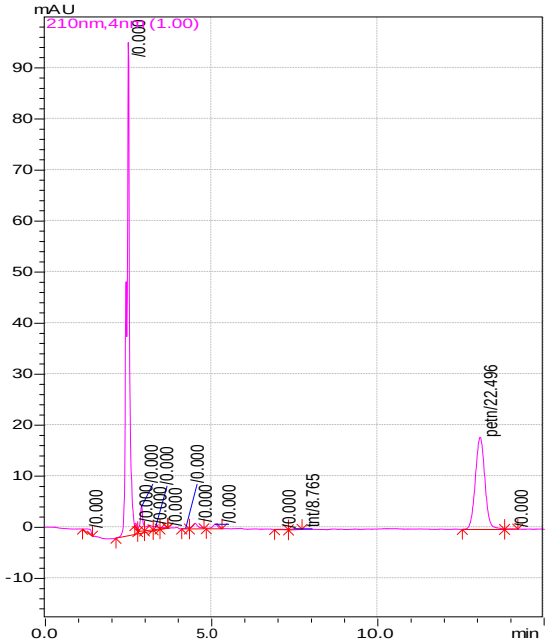
La curva de calibración es necesaria para determinar la concentración del sustrato al momento de realizar las lecturas.

Según los resultados obtenidos de cada aislamiento, se reemplaza X en la *Ecuación 1* por el valor del área obtenido en la lectura correspondiente a cada aislamiento y así determinando en Y el valor de la concentración en miligramo litro (mg/l) del sustrato; el valor resultante es multiplicado por un factor de 2 para establecer la concentración real del explosivo en la muestra; ya que al agregar 1 ml de muestra y 1 ml de acetronitrilo crea un factor de dilución de 1: 1; el cual indica que al momento de leer la concentración del explosivo este se encuentra diluido por la presencia de la sustancia.

Los siguientes cromatogramas de los cinco aislamientos seleccionados (P1, P23, P26, P37 y P38) muestran el pico de concentración del sustrato para cada día en un tiempo de retención entre 10 y 12 minutos.

Los picos del sustrato en los cromatogramas muestran valores negativos debido a que el equipo HPLC dentro de su programación esta calibrado con una curva que presenta valores superiores a 20 mg/L, los datos obtenidos en la lectura arrojan valores menores a dicha concentración, por tal motivo es necesario reemplazar los datos del área obtenidos de cada lectura, en la Ecuación 1, para obtener el resultado de la concertación del sustrato correspondiente.

Solución patrón:



Resultados de la lectura de la solución patrón en HPLC.

Replica	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda
1	13,071	45,991	Ch2 210nm

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

$$y \quad ax \quad b$$
$$a \quad 2{,}310315^{\ 05}$$
$$b \quad 8{,}706775$$

$$y \quad 2.310315^{\ 05} \ \ 559922 \quad 8.706775$$
$$y \quad 22{,}9955 ppm \quad 2$$
$$y \quad 45{,}991 ppm$$

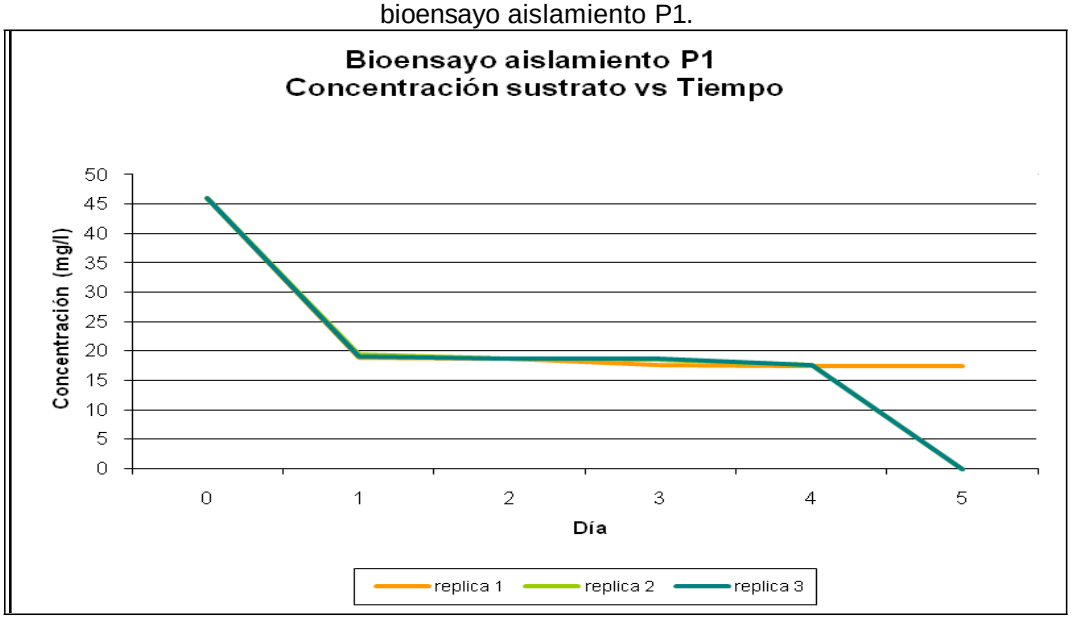
El cromatograma y los resultados muestran que la concentración inicial del bioensayo es de 45,991 mg/L.

AISLAMIENTOS SELECCIONADOS

Los cinco aislamientos seleccionados fueron analizados con HPLC durante cinco días, para verificar la remoción del sustrato **(Ver anexo 8).** Para que los resultados tuvieran mayor confiabilidad se realizaron 3 réplicas para cada aislamiento, los resultados se encuentran a continuación.

Aislamiento P1, resultados de los 5 días del bioensayo:

Grafica 2.Comportamiento de la concentración del sustrato vs Tiempo para las tres réplicas del bioensayo aislamiento P1.



En la gráfica se puede observar el comportamiento de la concentración del sustrato para las tres réplicas del bioensayo del aislamiento P1.

Las réplicas 2 y 3 muestran un comportamiento similar, reduciendo en su totalidad la concentración del sustrato el quinto día, de la misma forma se destaca la réplica 1 que muestra un comportamiento similar a las demás replicas hasta el cuarto día, en el quinto día la concentración del sustrato en esta réplica es disminuida pero no en su totalidad, este comportamiento en el día cinco y en el día cuatro se debe a posibles errores de medición por HPLC.

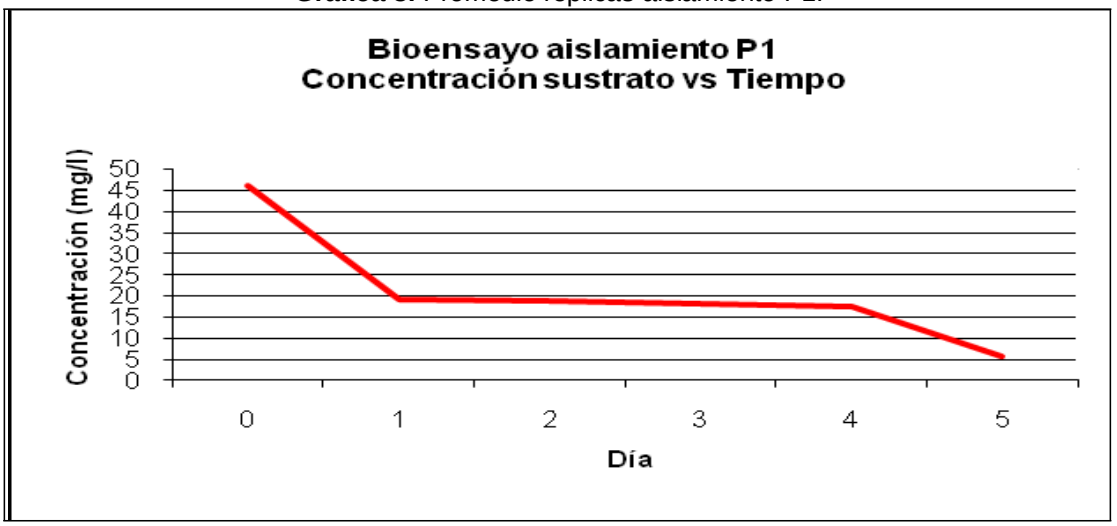
Promedio de la concentración del sustrato en las réplicas

Tabla 15. Promedio de la concentración del sustrato para cada día del bioensayo P1.

Aislamiento P1	
Día	Promedio (mg/l)
0	45,991
1	19,124
2	18,729
3	18,243
4	17,556
5	5,822

Fuente: Las Autoras, 2010

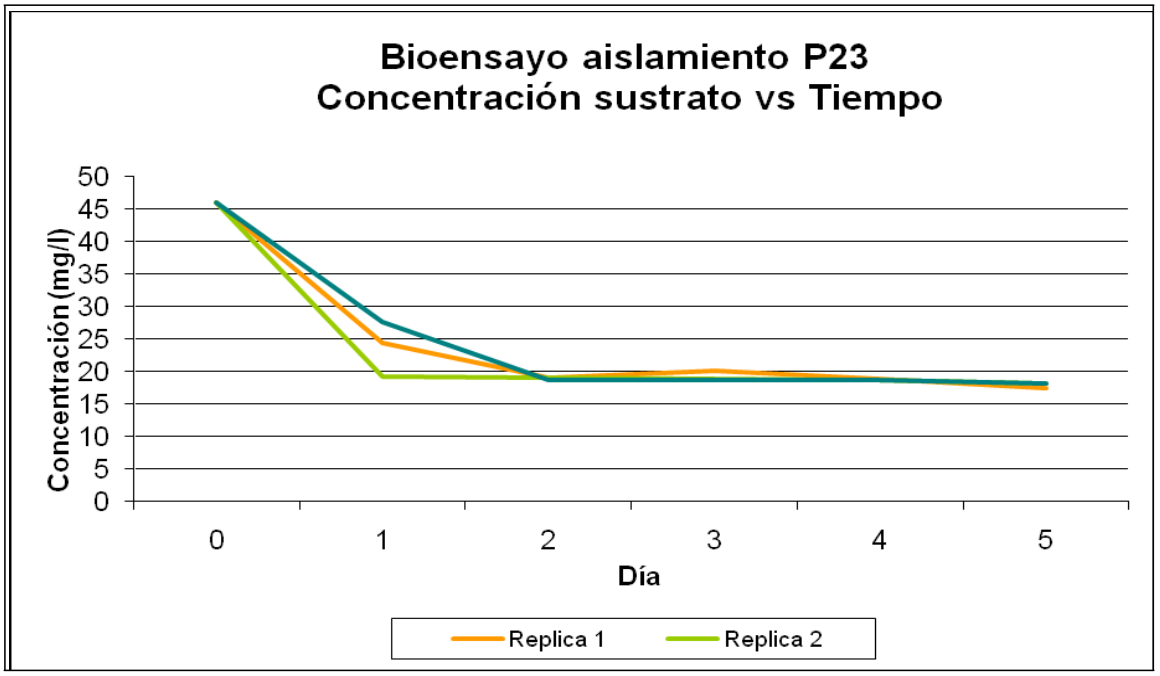
Grafica 3. Promedio réplicas aislamiento P1.



Según la gráfica del promedio obtenido de los datos de concentración de las tres réplicas se deduce que la concentración inicial del sustrato es constante; el primer día del bioensayo se da la mayor reducción del sustrato llegando a la mitad de la concentración inicial; del segundo al cuarto día la reducción del sustrato es mínima manteniéndose casi constante entre valores de 18 a 20 mg/l, en el quinto día se observa nuevamente una disminución del sustrato con valores inferiores a 6 mg/l, reduciendo así un 87% de la concentración inicial suministrada.

Aislamiento P23 resultados de los 5 días del bioensayo:

Grafica 4. Concentración del sustrato vs Tiempo para las tres réplicas del bioensayo aislamiento P23.



Para las réplicas del bioensayo del aislamiento P23, se observa un comportamiento similar en la reducción del sustrato.

Se observa que la concentración en las réplicas varía en el día 1, obteniendo un porcentaje de error del 12% valor poco significativo para alterar los resultados.

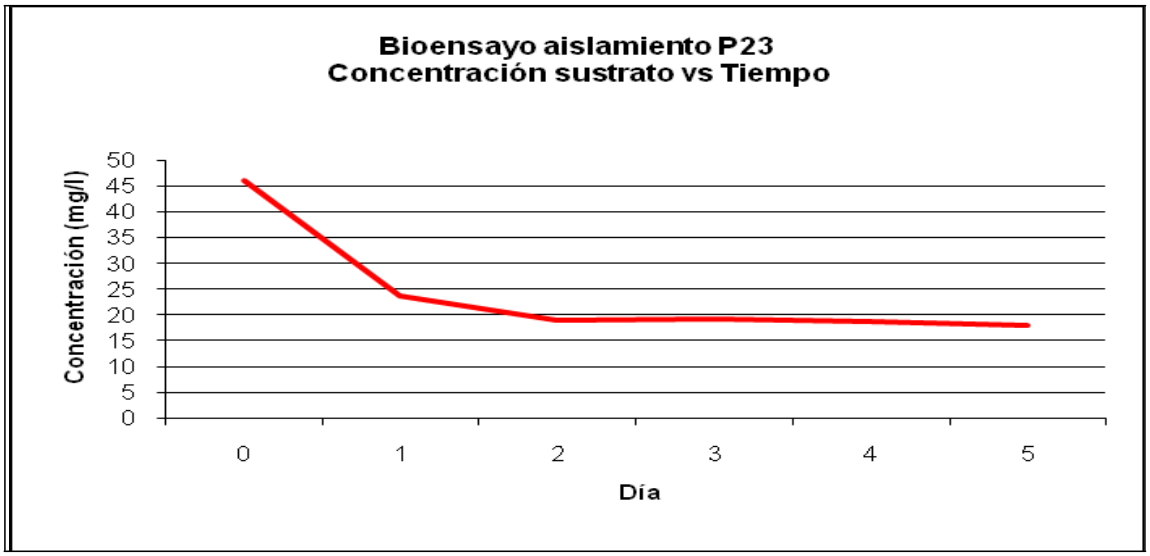
Promedio de la concentración del sustrato en las réplicas

Tabla 16. Promedio de la concentración del sustrato para cada día del bioensayo P23.

Aislamiento P23	
Día	Promedio (mg/l)
0	45,991
1	23,788
2	18,967
3	19,223
4	18,682
5	17,955

Fuente: Las Autoras, 2010

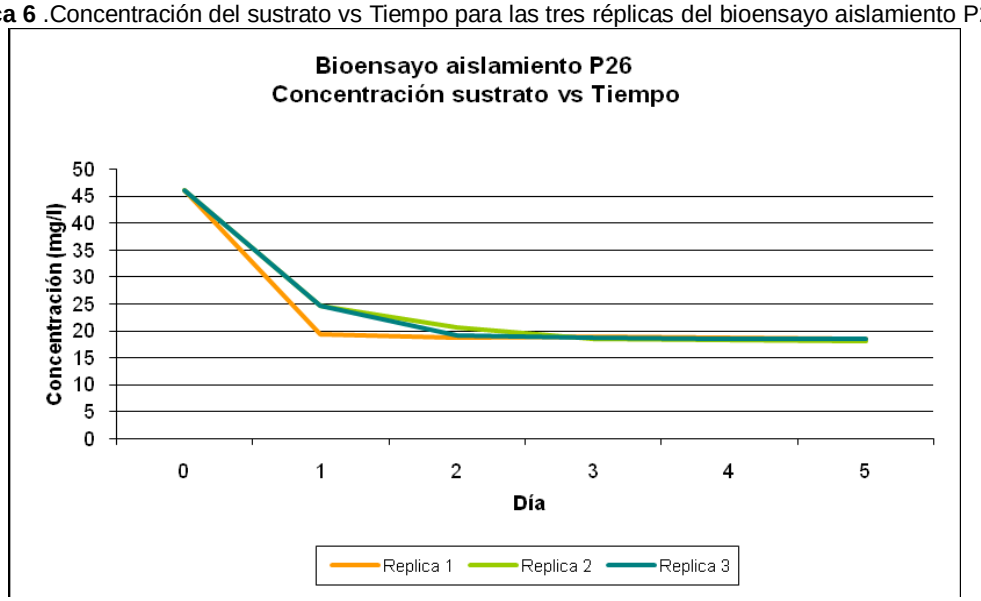
Grafica 5. Promedio réplicas aislamiento P23



Según la gráfica del promedio obtenido de los datos de concentración de las tres replicas se deduce que la concentración inicial del sustrato es constante, entre el primer y segundo día del bioensayo se da la mayor reducción del sustrato llegando a la mitad de la concentración inicial (18,967 mg/l); del tercer al cuarto día la reducción del sustrato es mínima manteniéndose casi constante entre valores de 17 a 18 mg/l, sin embargo se logra obtener una reducción del sustrato del 61%, obteniendo entonces una concentración final de 17,955 mg/l.

Aislamiento P26 resultados de los 5 días del bioensayo:

Grafica 6 .Concentración del sustrato vs Tiempo para las tres réplicas del bioensayo aislamiento P26.



Para las réplicas del bioensayo del aislamiento P26, se observa un comportamiento similar en la reducción del sustrato. La replica 1 varia con respecto a las demás, obteniendo un porcentaje de error del 10% valor poco significativo para alterar los resultados.

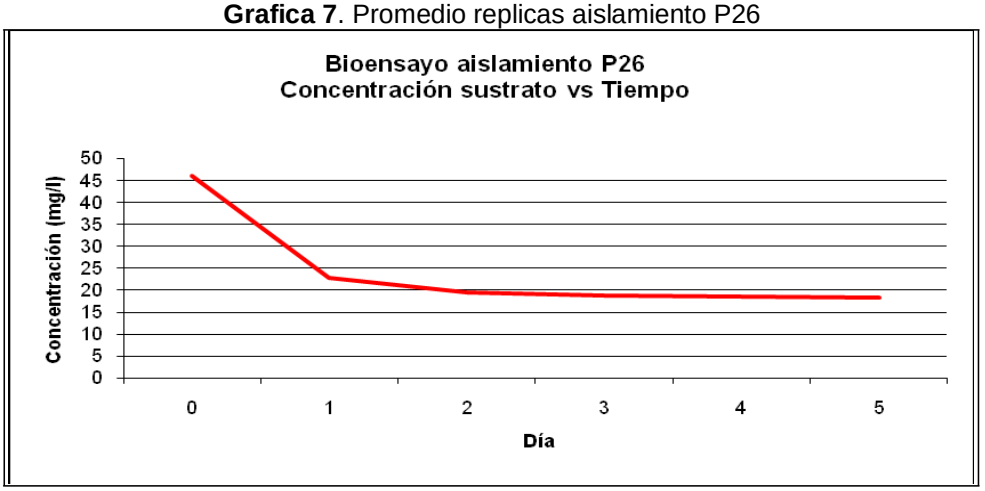
Promedio de la concentración del sustrato en las replicas

Tabla 17. Promedio de la concentración del sustrato para cada día del bioensayo.

Aislamiento P26	
Día	Promedio (mg/l)
0	45,991
1	22,916
2	19,577
3	18,714
4	18,513
5	18,353

Fuente: Las Autoras, 2010

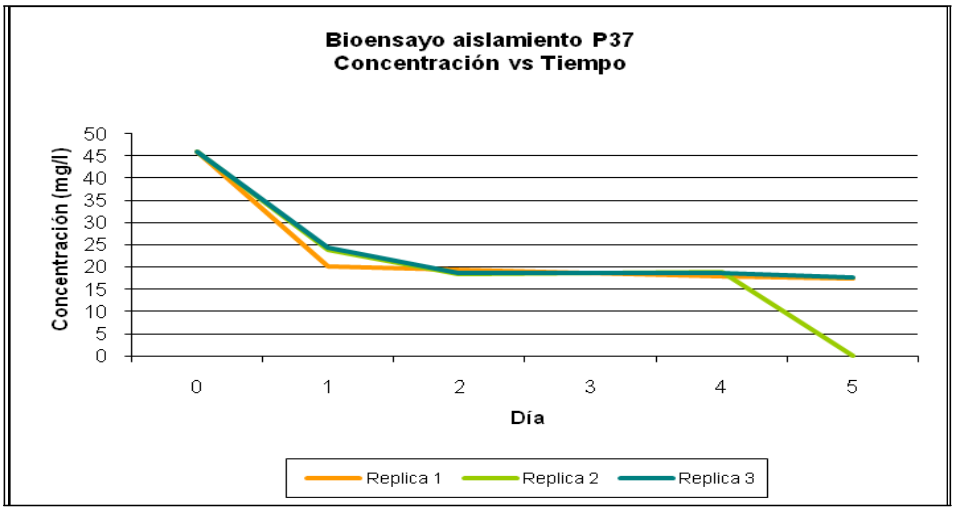
Grafica 7. Promedio replicas aislamiento P26



Según la gráfica entre el primer y segundo día del bioensayo se da la mayor reducción del sustrato llegando a la mitad de la concentración inicial (19,577 mg/l); del tercer al quinto día la reducción del sustrato es mínima manteniéndose casi constante entre valores de 18 a 19 mg/l, sin embargo se logra obtener una reducción del sustrato en el quinto día del bioensayo del 60% llegando a una concentración final de 18,353 mg/l.

Aislamiento P37 resultados de los 5 días del bioensayo:

Grafica 8. Concentración del sustrato vs Tiempo para las tres replicas del bioensayo aislamiento P37.



En la gráfica se puede observar el comportamiento de la disminución del sustrato para las tres rèplicas del bioensayo del aislamiento P37.

La réplica 1 y 3 muestra un comportamiento similar reduciendo el sustrato a una concentración de 18 mg/l aproximadamente, mientras la réplica 2 muestra un comportamiento similar a las demás replicas hasta el cuarto día, en el quinto día la concentración del sustrato es degradada en su totalidad.

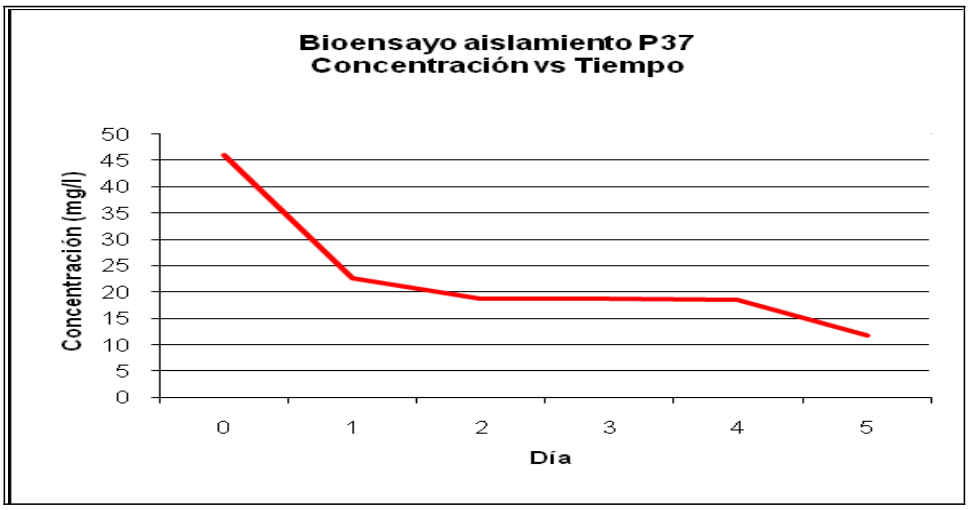
Promedio de la concentración del sustrato en las réplicas

Tabla 18. Promedio de la concentración del sustrato para cada día del bioensayo.

Aislamiento P37	
Día	Promedio (mg/l)
0	45,991
1	22,736
2	18,811
3	18,712
4	18,439
5	11,704

Fuente: Las Autoras, 2010

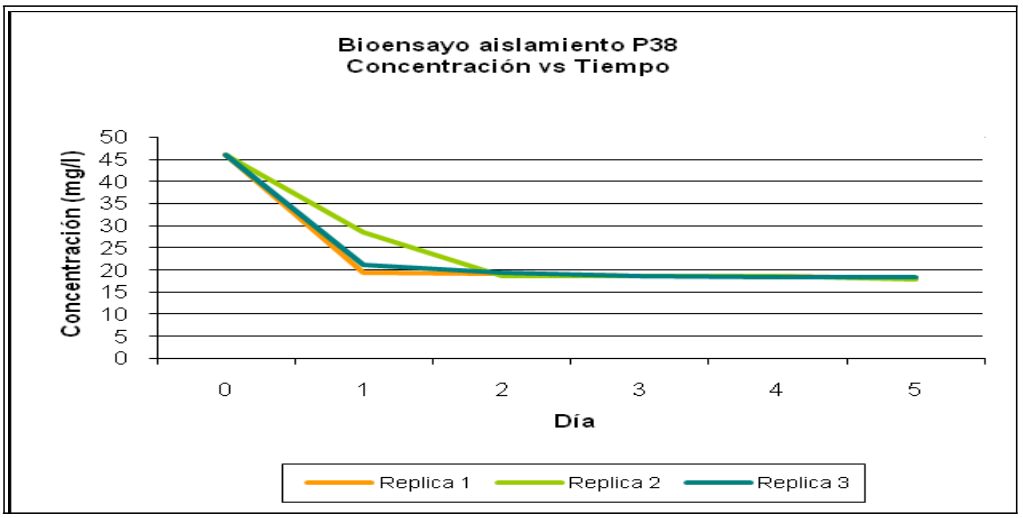
Grafica 9. Promedio réplicas aislamiento P37



Según la gráfica el primer y segundo día del bioensayo se da la mayor reducción del sustrato llegando a la mitad de la concentración inicial (18,811 mg/l); del segundo al cuarto día la reducción del sustrato es mínima manteniéndose casi constante en este tiempo 18 mg/l aproximadamente, logrando obtener en el quinto día del bioensayo el 75% de reducción del sustrato llegando a una concentración final de 11,704 mg/l.

Aislamiento P38 resultados de los 5 días del bioensayo:

Grafica 10. Concentración del sustrato vs Tiempo para las tres replicas del bioensayo aislamiento P38.



En la gráfica se puede observar que el comportamiento de la disminución del sustrato para las tres replicas del bioensayo del aislamiento P38, es similar durante los cinco días.

La réplica 2 respecto a las demás, varia levemente del día 1 al día 2 lo cual representa un porcentaje de error del 15%, valor poco significativo para alterar los resultados.

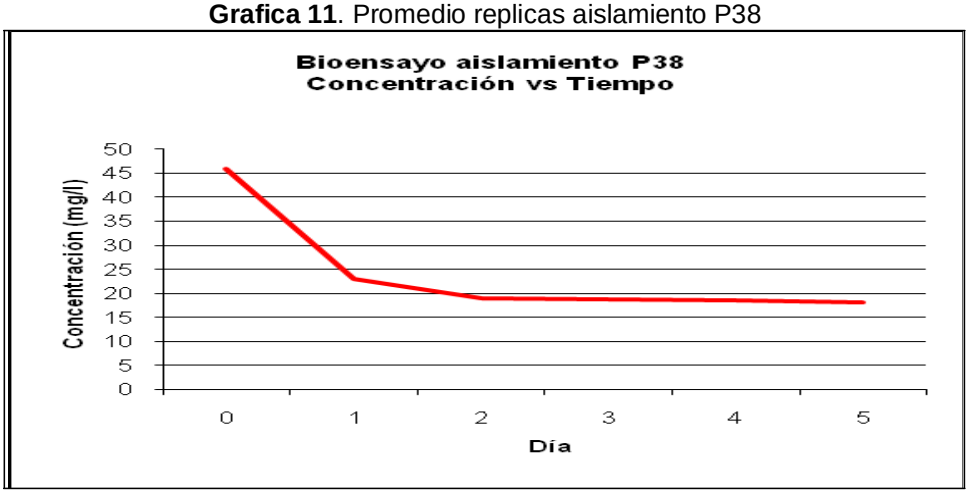
Promedio de la concentración del sustrato en las replicas

Tabla 19. Promedio de la concentración del sustrato para cada día del bioensayo P38.

Aislamiento P38	
Día	Promedio (mg/l)
0	45,991
1	23,016
2	19,002
3	18,664
4	18,519
5	18,101

Fuente: Las Autoras, 2010

Grafica 11. Promedio replicas aislamiento P38



El primer día del bioensayo se da la mayor reducción del sustrato llegando a la mitad de la concentración inicial (19,002 mg/l), el segundo día la reducción es un poco mas baja en estos días se da una reducción significativa del sustrato; del tercer al quinto día la reducción del sustrato es mínima manteniéndose casi constante aproximadamente 18 mg/l, en el quinto día el sustrato es reducido a 18.101 mg/l, lo cual representa un 61% de la concentración inicial del mismo.

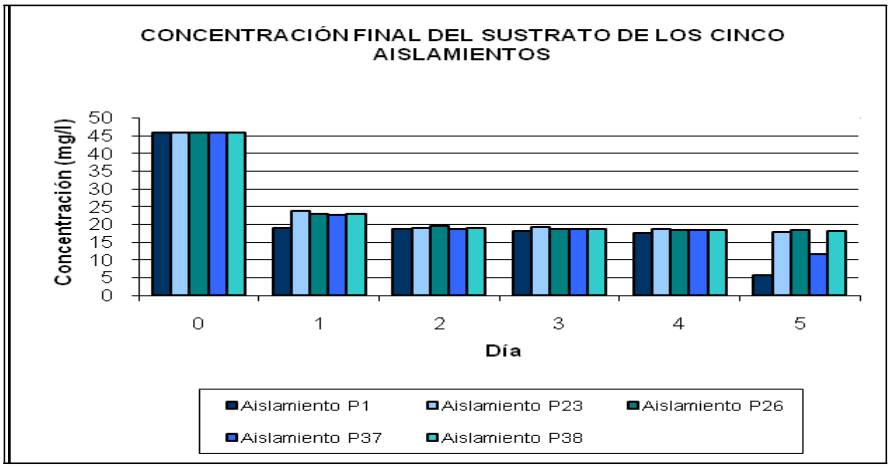
4.6 RESULTADOS BIOENSAYO

Tabla 20. Resultados de la concentración del sustrato final de los cinco aislamientos

Aislamiento	Concentración final (mg/l)	Porcentaje de reducción del sustrato
P1	5,822	87%
P23	17,955	61%
P26	18,353	60%
P37	11,704	75%
P38	18,101	61%

Fuente: Las Autoras, 2010.

Grafica 12. Concentración final del sustrato de los cinco aislamientos en los cinco días del bioensayo



Los resultados obtenidos de los cinco bioensayos muestran porcentajes de reducción superiores al 50%, lo que indican que los aislamientos remueven el explosivo.

De las lecturas realizadas en HPLC se obtuvo que el 87% de la disminución del sustrato fue suministrado por el aislamiento P1, el 75% por el aislamiento P 37, los aislamientos P23, p26 y P38 obtuvieron porcentajes cercanos al 60%, siendo los aislamientos P1 y P37, los mas eficientes e indicados para la remoción del explosivo PETN en ambientes contaminados por el mismo.

Los aislamientos seleccionados provienen de la muestra 1(Exterior frente a la planta de cristalización) y la muestra 2(canal hacia el exterior) ya que la probabilidad de encontrar el explosivo es alta en estos puntos, lo que indica una mayor posibilidad de hallar estos microorganismos degradadores en dichos puntos de muestreo.

4.7 COMPORTAMIENTO DE LOS AISLAMIENTOS Y EL TIEMPO EN LA REMOCIÓN DEL SUSTRATO

Para determinar el porcentaje de remoción del sustrato en el agua residual sintética es necesario observar el comportamiento de cada una de las cepas estudiadas y del tiempo establecido en el microcosmos realizado, por medio del estadístico de prueba Anova y t-student.

Tabla 21. Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F	Valor P
Cepas	0,062200475	4	0,82358324	53%
Tiempo	0,83281891	4	11,0271778	0%
Error	0,302096846	16		
Total	1,197116231	24		

Fuente. Los Autores 2009

Una vez se observó el comportamiento de la remoción de la concentración del explosivo para cada aislamiento y de cada tiempo, se verificaron los resultados con Microsoft Office Excel 2007, pruebas t-student (de dos colas), empleando los registros de remoción para cada aislamiento en determinado tiempo. (*Véase tabla 26).* Así pues, las respectivas hipótesis se muestran a continuación:

HIPOTESIS PARA AISLAMIENTOS

$$\mu + \beta = 0$$

$$\mu + \beta \neq 0$$

Hipótesis alternativa (H_1)= Los aislamientos y los tiempos presentan diferente comportamiento en la reducción del sustrato

Hipótesis Nula (Ho): Los aislamientos y los tiempos presentan el mismo comportamiento en la reducción del sustrato

---

Distribución teórica de probabilidad. Se usa para la comparación de dos medias en poblaciones independientes y normales.
http://www.colombiestad.gov.co/index.php?option=com_glossary&func=view&Itemid=25&catid=113&term=DISTRIBUCI%D3N+T+STUDENT
En probabilidad y estadística, la **distribución-*t*** o **distribución t de Student** es una distribución de probabilidad que surge del problema de estimar la media de una población normalmente distribuida cuando el tamaño de la muestra es pequeño. Ésta es la base del popular test de la t de Student para la determinación de las diferencias entre dos medias muestrales.

De lo anterior, para valores p < 0.05, la hipótesis nula es rechazada, teniendo en cuenta los datos obtenidos. *Ver tabla 26..*

La hipótesis nula en cuanto a tiempo es rechazada ya que el valor de p es de 0%, concluyendo que el tiempo establecido es necesario para remover la concentración del explosivo.

La hipótesis nula en cuanto a los aislamientos es aceptada ya que el valor p value es de 0.53, concluyendo que los aislamientos presentan el mismo comportamiento en la concentración del sustrato.

Tabla 22. Comparación de la remoción en el día 1 y día 3, prueba t-student

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales	***DIA 1***	***DIA 3***
Media	0,51438325	0,02216421
Varianza	0,00151453	0,00020478
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	0,000859655	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	26,54399455	
P(T<=t) dos colas	0%	
Valor crítico de t (dos colas)	2,306004133	

Fuente: Las Autoras 2010.

De acuerdo a la *tabla 22*, el valor p es significativo (< 0.05), entonces se rechaza la hipótesis nula de igualdad, es decir existe evidencia estadística que permite establecer que el comportamiento de la reducción del explosivo es diferente para el día 1 y el día 3.

Tabla 23. Comparación de la remoción en el día 1 y día 4, prueba t-student

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales	***DIA 1***	***DIA 4***
Media	0,51438325	0,0163342
Varianza	0,00151453	0,00014749
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	0,00083101	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	27,317335	
P(T<=t) dos colas	0%	
Valor crítico de t (dos colas)	2,30600413	

Fuente: Las Autoras 2010.

De acuerdo a la *tabla 23* el valor p es significativo (< 0.05), entonces se rechaza la hipótesis nula de igualdad, es decir existe evidencia estadística que permite establecer que el comportamiento de la reducción del explosivo es diferente para el día 1 y el día 4.

Tabla 24. Comparación de la remoción en el día 3 y día 5, prueba t-student

Prueba t para medias de dos muestras	***DIA 3***	***DIA 5***
Media	0,02216421	0,22068911
Varianza	0,00020478	0,08467634
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	0,04244056	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-1,52368236	
P(T<=t) dos colas	17%	
Valor crítico de t (dos colas)	2,30600413	

Fuente: Las Autoras 2010.

De acuerdo a la *tabla 24* el valor p no es significativo (> 0.05), por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula de igualdad, es decir no existe evidencia estadística que permita establecer que el comportamiento de la reducción del explosivo es diferente para el día 3 y el día 5.

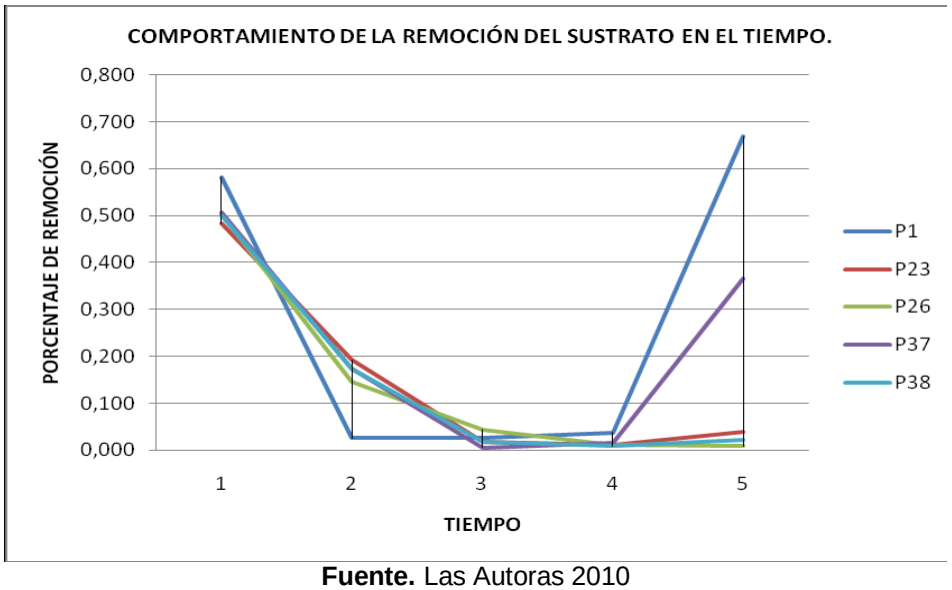
Tabla 25. Comparación de la remoción en el día 1 y día 5, prueba t-student

Prueba t para medias de dos muestras	***DIA 1***	***DIA 5***
Media	0,51438325	0,22068911
Varianza	0,00151453	0,08467634
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	0,04309544	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	2,23691579	
P(T<=t) dos colas	6%	
Valor crítico de t (dos colas)	2,30600413	

Fuente: Las Autoras 2010.

De acuerdo a la *tabla 25*, el valor p es significativo (< 0.05), entonces se rechaza la hipótesis nula de igualdad, es decir existe evidencia estadística que permite establecer que el comportamiento de la reducción del explosivo es similar para el día 1 y el día 5.

Grafica 13. Comportamiento de remoción del sustrato a través del tiempo.



Fuente. Las Autoras 2010

PROMEDIO	51%	14%	2,2%	1,6%	22%
DESVIACION ESTANDAR	4%	7%	1%	1%	29%
ERROR ESTANDAR	2%	3%	1%	1%	13%

Los aislamientos P23, P26 y P38 muestran un comportamiento similar en los porcentajes de remoción del sustrato durante los cinco días del microcosmos; en el quinto día los aislamientos P1 y P37 presentan un comportamiento diferente en relación con los demás aislamientos ya que presentan mayor porcentaje en la remoción del sustrato.

Los resultados obtenidos demuestran que el comportamiento es similar para todos los aislamientos ya que el error estándar está por debajo al 13% lo que afirma lo anteriormente expuesto.

El tiempo presenta una variación en cuanto al comportamiento diario de remoción mostrando valores entre el 50% y el 2%, esta variable representa a través del microcosmos una diferencia en los porcentajes de remoción, obteniendo mejores resultados en el día 1 y en el día 5.

5. CONCLUSIONES

Las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas establecidas con base en la bibliografía consultada fueron las mas adecuadas ya que los resultados obtenidos en las diferentes fases de desarrollo del proyecto, demostraron que los aislamientos de las cepas bacterianas degradadoras de PETN crecieron en óptimas condiciones ya que finalmente se determinó el porcentaje de remoción del explosivo generado por cada uno de los aislamientos seleccionados.

Después de generar una bioaumentación de las bacterias nativas aisladas de ambientes con presencia de explosivos, se realizo un proceso selectivo basado en diluciones seriadas permitiendo descartar los microorganismos no degradadores del explosivo.

De las bacterias seleccionadas 74 son posibles degradadoras del sustrato, siendo el medio mineral con carbono la fuente principal para el desarrollo de los microorganismos. La mayoría de las cepas seleccionadas provienen de la muestra dos que hace referencia al canal exterior de la planta de cristalización.

Los resultados obtenidos demuestran que la reducción del sustrato fue mayor al 50%, es decir todos los aislamientos son degradadores del sustrato, siendo el principal degradador el aislamiento P1 con un porcentaje de remoción del 87%, cepa proveniente de la muestra uno que hace referencia al exterior de la planta de cristalización cultivada en medio mineral con fuente de carbono en una dilución de 10^{-7}, lo cual indica una vez mas que este medio es esencial para el crecimiento del microorganismo dando paso a la degradación del explosivo.

Según el estadístico de prueba t-student y ANOVA, los cinco aislamientos presentan un comportamiento similar en el microcosmos, lo cual indica que cualquiera de las cepas seleccionadas remueven el explosivo; por otro lado el tiempo presenta un comportamiento diferente, lo que simboliza que cinco días son significativos para la remoción del sustrato.

6. RECOMENDACIONES

Es importante realizar estudios de los demás aislamientos para determinar cual de estos presentan comportamientos diferentes en la reducción del sustrato, para así seleccionar la cepa que presente mejor resultado de los 74 aislamientos.

Es conveniente realizar el microcosmos en el tiempo establecido (cinco días) ya que éste es significativo en cuanto a la valoración del porcentaje de remoción durante cada día.

Es necesario realizar bioensayos con medios que presenten concentraciones más elevadas del explosivo para determinar la capacidad de los aislamientos en cuanto a la adaptación de este medio.

Realizar tratamientos de biorremediación a escala real tanto de suelos como de agua y determinar su eficiencia de remoción.

Es importante identificar el medio de cultivo donde se presente mayor reducción del sustrato mediante cromatografía líquida HPLC, para optimizar el proceso de remoción de los 74 aislamientos seleccionados.

BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER, M. 1994. Biodegradation and Bioremediation. New York: Academic Press.

BINKS, P.R.; FRENCH, C. E.; NICKLIN S.; BRUCE, N.C. 1996. Degradation of pentaerythritol tetranitrate by cloacae PB2. Applied and Environmental Microbiology, 62 (4): 1214 – 1219

BRANNON, J. M. 2002. Environmental fate and transport process descriptor for explosives. ERDC/EL TR-02-10. US army Engineer Research and development Center, Vicksburg, MS.

BRYANT, C.; DELUCA, M. 1991. Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from Enterobacter cloacae. J. Biol. Chem, 266: 4119 – 4125

FULLER, M.; MANNING J. 2003. Microbiological changes during bioremediation of explosives-contaminated soils in laboratory and pilot-scale bioslurry reactors. Bioresource Technology, 123 - 133

JUHASZ, A. L.; NAIDU, R. 2007. Explosives: fate, dynamics, and ecological impact in terrestrial and marine enviorenments. Rev Environ Contam Toxicol, 191: 163 – 215

LENKE, H.; ACHTNICH, C.; KNACKMUSS, H. J. 2000. Perspectives of bioelimination of polynitroaromatic compounds Biodegradation of Nitroaromatic and Explosives. Edited by Spain JC, Hughes JB, Knackmuss HJ. Boca Raton: CRC Press LLC. 91 – 126

LI, Z. 2007. Remediation of pentaerythritol tetranitrate (PETN) contaminated wáter and soil. Tesis de Doctorado Doctor de filosofía en ciencias de la Tierra. University of Waterloo. Waterloo, Ontario, Canada. 124 p

LI, Z.; GUI, L.; GILLHAM, R. W. 2008. Remediation of pentaerythritol tetranitrate (PETN) contaminated wáter and soil. Department of Earth and Environmental Sciences. University of Waterloo, 62 – 73

MULLIGAN C.N.; RAYMOND, N.Y. 2004. Natural attenuation of contaminated soils. Environmental international. 30: 587 – 601

NEILSON, A.H. 1995. An environmental perspective on the biodegradation of organochlorine xenobiótics. International biodeterioation & Biodegradation. 3 – 21

PELLINI , L. 2006. Biorremediación estimulada por efluentes cloacales tratados de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis de Doctorado. Universidad nacional del Camahue.

RAMOS, J.L.; HAIDOUR, A.; DELGADO, A.; DUQUE, E.; FANDILA, M. D.; GIL, M.; PIÑAR, G. 1995. Potential of toluene- degrading systems for the construction of hybrid pathways for nitrotoluene metabolism. Biodegradation of nitroaromatic compounds. J.C. Spain (ed.), Plenum Press, New York, N.Y. p. 53 – 67

SPAIN, J. C. 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. Annu. Rev. Microbiol, 49: 523 – 555.

SYMONS, Z. C.; BRUCE, N. C. 2005. Bacterial pathways for degradation of nitroaromatics. The Royal Society of Chemestry, 23: 845 – 850

WHITE, G. F., SNAP J. R.; NICKLIN, S. 1996. Biodegradation of glicerol trinitrate and pentaerythritol tetranitrate by Agrobacterium radiobacter. Applied and Environmental Microbiology, 62: 637 – 642

ANEXO 1

METHOD 9045C

SOIL AND WASTE
pH

1.0 SCOPE AND APPLICATION

1.1 Method 9045 is an electrometric procedure for measuring pH in soils and waste samples. Wastes may be solids, sludges, or non-aqueous liquids. If water is present, it must constitute less than 20% of the total volume of the sample.

2.0 SUMMARY OF METHOD

2.1 The sample is mixed with reagent water, and the pH of the resulting aqueous solution is measured.

3.0 INTERFERENCES

3.1 Samples with very low or very high pH may give incorrect readings on the meter. For samples with a true pH of >10, the measured pH may be incorrectly low. This error can be minimized by using a low-sodium-error electrode. Strong acid solutions, with a true pH of <1, may give incorrectly high pH measurements.

3.2 Temperature fluctuations will cause measurement errors.

3.3 Errors will occur when the electrodes become coated. If an electrode becomes coated with an oily material that will not rinse free, the electrode can (1) be cleaned with an ultrasonic bath, or (2) be washed with detergent, rinsed several times with water, placed in 1:10 HCl so that the lower third of the electrode is submerged, and then thoroughly rinsed with water, or (3) be cleaned per the manufacturer's instructions.

4.0 APPARATUS AND MATERIALS

4.1 pH Meter with means for temperature compensation.

4.2 Glass Electrode.

4.3 Reference electrode: A silver-silver chloride or other reference

electrode of constant potential may be used.

NOTE: Combination electrodes incorporating both measuring and referenced functions are convenient to use and are available with solid, gel-type filling materials that require minimal maintenance.

4.4 Beaker: 50-mL.

4.5 Thermometer and/or temperature sensor for automatic compensation.

4.6 Analytical balance: capable of weighing 0.1 g.

5.0 REAGENTS

5.1 Reagent grade chemicals shall be used in all tests. Unless otherwise indicated, it is intended that all reagents shall conform to the specifications of the Committee on Analytical Reagents of the American Chemical Society, where such specifications are available. Other grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficiently high purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination.

5.2 Reagent water. All references to water in this method refer to reagent water, as defined in Chapter One.

5.3 Primary standard buffer salts are available from the National Institute of Standards and Technology (NIST) and should be used in situations where extreme accuracy is necessary. Preparation of reference solutions from these salts requires some special precautions and handling, such as low- conductivity dilution water, drying ovens, and carbon-dioxide-free purge gas. These solutions should be replaced at least once each month.

5.4 Secondary standard buffers may be prepared from NIST salts or purchased as solutions from commercial vendors. These commercially available solutions, which have been validated by comparison with NIST standards, are recommended for routine use.

6.0 SAMPLE PRESERVATION AND HANDLING

6.1 All samples must be collected using a sampling plan that addresses the considerations discussed in Chapter Nine of this manual.

6.2 Samples should be analyzed as soon as possible.

7.0 PROCEDURE

7.1 Calibration:

7.1.1 Because of the wide variety of pH meters and accessories, detailed operating procedures cannot be incorporated into this method Each analyst must be acquainted with the operation of each system and familiar with all instrument functions. Special attention to care of the electrodes is recommended.

7.1.2 Each instrument/electrode system must be calibrated at a minimum of two points that bracket the expected pH of the samples and are approximately three pH units or more apart. Repeat adjustments on successive portions of the two buffer solutions until readings are within 0.05 pH units of the buffer solution value. If an accurate pH reading based on the conventional pH scale [0 to 14 at 25EC] is required, the analyst should control sample temperature at 25±1EC when sample pH approaches the alkaline end of the scale (e.g., a pH of 11 or above).

7.2 Sample preparation and pH measurement of soils:

7.2.1 To 20 g of soil in a 50-mL beaker, add 20 mL of reagent water, cover, and continuously stir the suspension for 5 minutes. . Additional dilutions are allowed if working with hygroscopic soils and salts or other problematic matrices.

7.2.2 Let the soil suspension stand for about 1 hour to allow most of the suspended clay to settle out from the suspension or filter or centrifuge off the aqueous phase for pH measurement.

7.2.3 Adjust the electrodes in the clamps of the electrode holder so that, upon lowering the electrodes into the beaker, the glass electrode will be immersed just deep enough into the clear supernatant solution to establish a good electrical contact through the ground-glass joint or the fiber-capillary hole. Insert the electrodes into the sample solution in this manner. For combination electrodes, immerse just below the suspension.

7.2.4 If the sample temperature differs by more than 2EC from the buffer solution, the measured pH values must be corrected.

7.2.5 Report the results as "soil pH measured in water at _____ EC" where "__EC" is the temperature at which the test was conducted.

7.3 Sample preparation and pH measurement of waste materials:

7.3.1 To 20 g of waste sample in a 50-mL beaker, add 20 mL of reagent water, cover, and continuously stir the suspension for 5 minutes. Additional dilutions are allowed if working with hygroscopic wastes and salts or other problematic matrices.

7.3.2 Let the waste suspension stand for about 15 minutes to allow most of the suspended waste to settle out from the suspension or filter or centrifuge off aqueous phase for pH measurement.

NOTE: If the waste is hygroscopic and absorbs all the reagent water, begin the experiment again using 20 g of waste and 40 mL of reagent water.

NOTE: If the supernatant is multiphasic, decant the oily phase and measure the pH of the aqueous phase. The electrode may need to be cleaned (Step 3.3) if it becomes coated with an oily material.

7.3.3 Adjust the electrodes in the clamps of the electrode holder so that, upon lowering the electrodes into the beaker, the glass electrode will be immersed just deep enough into the clear supernatant to establish good electrical contact through the ground-glass joint or the fiber-capillary hole. Insert the electrode into the sample solution in this manner. For combination electrodes, immerse just below the suspension.

7.3.4 If the sample temperature differs by more than 2EC from the buffer solution, the measured pH values must be corrected.

7.3.5 Report the results as "waste pH measured in water at _____ EC" where "__EC" is the temperature at which the test was conducted.

8.0 QUALITY CONTROL

8.1 Refer to Chapter One for the appropriate QC protocols.

8.2 Electrodes must be thoroughly rinsed between samples.

9.0 METHOD PERFORMANCE

9.1 No data provided.

10.0 REFERENCES

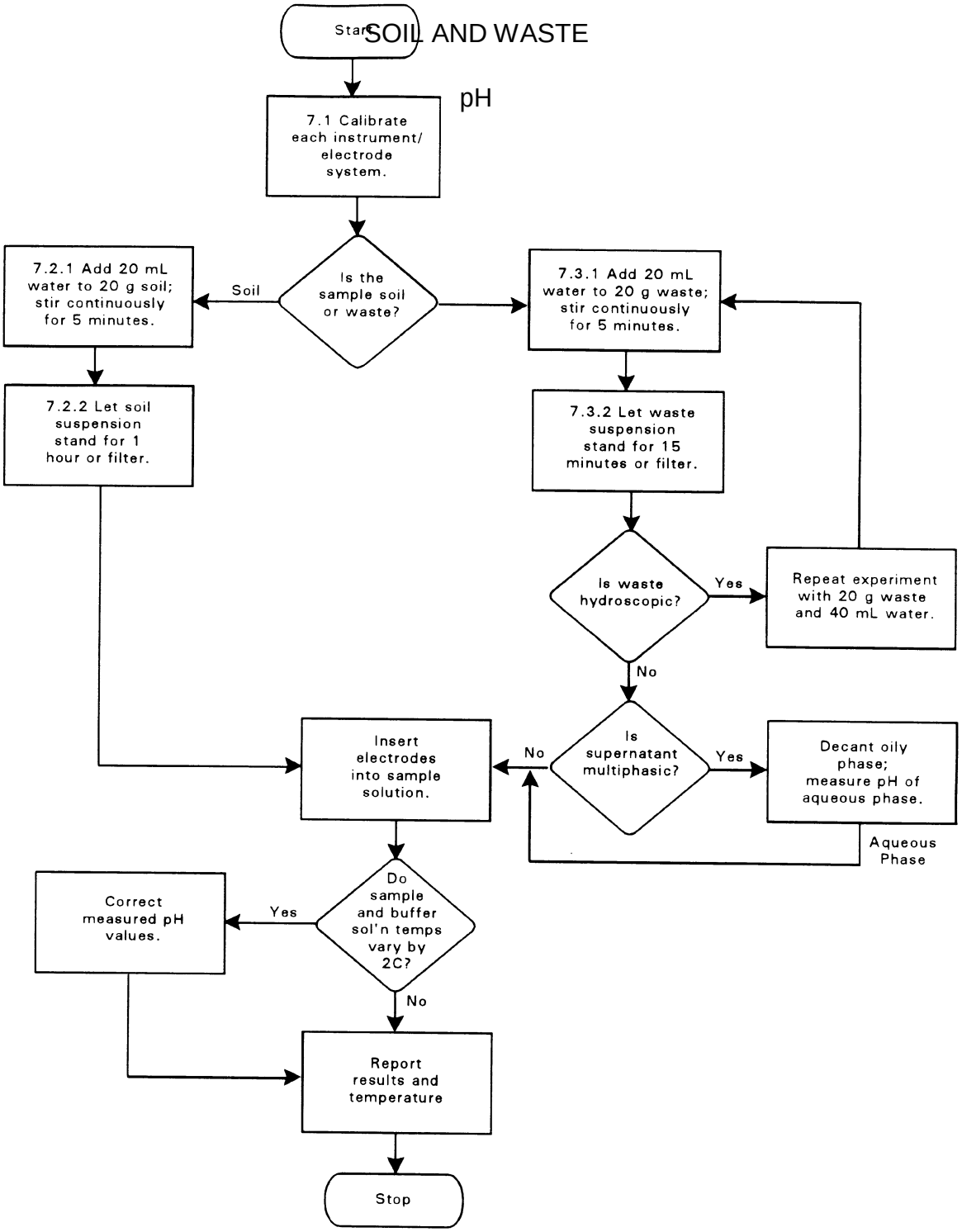
1. Black, Charles Allen; Methods of Soil Analysis; American Society of Agronomy: Madison, WI, 1973.

2. National Bureau of Standards, Standard Reference Material Catalog, 1986-87, Special Publication 260.

METHOD 9045C

SOIL AND WASTE

pH



METHOD 9050A

SPECIFIC

CONDUCTANCE

1.0 SCOPE AND APPLICATION

1.1 Method 9050 is used to measure the specific conductance of drinking, ground, surface, and saline waters and domestic and industrial aqueous wastes. Method 9050 is not applicable to solid samples or to organic samples.

2.0 SUMMARY OF METHOD

2.1 The specific conductance of a sample is measured using a self-contained conductivity meter (Wheatstone bridge-type or equivalent).

2.2 Whenever possible, samples are analyzed at 25EC. Unless a temperature correction routine is used by the instrument, samples of different temperatures must be equilibrated to and results reported at 25EC.

3.0 INTERFERENCES

3.1 Platinum electrodes can degrade and cause erratic results. When this happens, as evidenced by erratic results or flaking off of the platinum black, the electrode should be replatinized.

3.2 The specific conductance cell can become coated with oil and other materials. It is essential that the cell be thoroughly rinsed and, if necessary, cleaned between samples.

4.0 APPARATUS AND MATERIALS

4.1 Self-contained conductivity instruments: an instrument consisting of a source of alternating current, a Wheatstone bridge, null indicator, and a conductivity cell or other instrument measuring the ratio of alternating current through the cell to voltage across it. The latter has the advantage of a linear reading of conductivity. Choose an instrument capable of measuring conductivity with an error not exceeding 1% or 1 uS/cm, whichever is greater.

4.2 Platinum-electrode or non-platinum-electrode specific conductance cell.

4.3 Water bath.

4.4 Thermometer: capable of being read to the nearest 0.1EC and covering the range 23EC to 27EC. An electrical thermometer having a small thermistor sensing element is convenient because of its rapid response.

5.0 REAGENTS

5.1 Reagent grade chemicals shall be used in all tests. Unless otherwise indicated, it is intended that all reagents shall conform to the specifications of the Committee on Analytical

Reagents of the American Chemical Society, where such specifications are available. Other grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficiently high purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination.

5.2 Conductivity water: Pass distilled water through a mixed-bed deionizer and discard first 1,000 mL. Conductivity should be less than 1 uS/cm.

5.3 Standard potassium chloride (0.0100 M): Dissolve 0.7456 g anhydrous KCl in conductivity water and make up to 1,000 mL at 25EC. This solution will have a specific conductance of 1,413 uS/cm at 25EC.

6.0 SAMPLE COLLECTION, PRESERVATION, AND HANDLING

6.1 All samples must be collected using a sampling plan that addresses the considerations discussed in Chapter Nine of this manual.

6.2 All sample containers must be prewashed and thoroughly rinsed. Both plastic and glass containers are suitable.

6.3 Aqueous samples should be stored at 4EC and analyzed within 28 days.

7.0 PROCEDURE

7.1 Determination of cell constant: Rinse conductivity cell with at least three portions of 0.01 N KCl solution. Adjust temperature of a fourth portion to 25.0 $\pm$ 0.1EC. Measure resistance of this portion and note temperature. Compute cell constant, C:

$$C = (0.001413)(R_{KCl})\ 1 + 0.0191\ (t - 25)$$

where:

R_{KCl} = measured resistance, ohms; and

t = observed temperature, EC.

7.2 Conductivity measurement: Rinse cell with one or more portions of sample. Adjust temperature of a final portion to 25.0 ± 0.1EC. Measure sample resistance or conductivity and note temperature.

7.3 Calculation: The temperature coefficient of most waters is only approximately the same as that of standard KCl solution; the more the temperature of measurement deviates from
25.0EC, the greater the uncertainty in applying the temperature correction. Report all conductivities at 25.0EC.

7.3.1 When sample resistance is measured, conductivity at 25EC is:

$$K = \frac{(1{,}000{,}000)(C)}{R_m[1 + 0.0191\,(t - 25)]}$$

where:

K = conductivity, uS/cm; C = cell constant, cm-L; R_m = measured resistance of sample, ohms; and t = temperature of measurement.

7.3.2 When sample conductivity is measured, conductivity at 25EC is:

$$K = \frac{(K_m)(1{,}000{,}000)(C)}{1 + 0.0191\,(t - 25)}$$

where:

K_m = measured conductivity, uS at tEC, and other units are defined as above.

NOTE: If conductivity readout is in uS/cm, delete the factor 1,000,000 in the numerator.

NOTE: In the International System of Units (SI) the reciprocol of the ohm is the siemens (S) and conductivity is reported as millisiemens per meter (mS/m); 1 mS/m = 10 µmhos/cm and 1 µS/cm = 1 µmho/cm. To report results in SI units of mS/m divide µmhos/cm by 10.

8.0 QUALITY CONTROL

8.1 Refer to Chapter One for specific quality control procedures.

8.2 Analyze an independently prepared check standard to verify calibration.

8.3 Analyze one duplicate sample for every 10 samples.

9.0 METHOD PERFORMANCE

9.1 Three synthetic samples were tested with the following results:

Conductivity uS/c	No. of Results	Relative Standard Deviation %	Relative Error %
147.0	117	8.6	9.4
303.0	120	7.8	1.9
228.0	120	8.4	3.0

10.0 REFERENCES

1. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ed. (1985), Method 205.

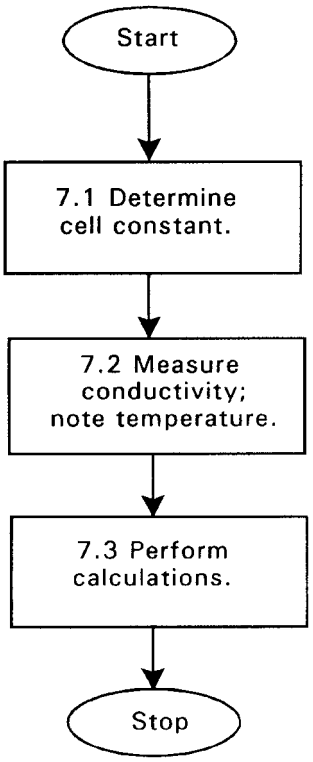
METHOD

9050A

SPECIFIC

CONDUCTAN

CE



ANEXO 2

COMPONENTES DEL MEDIO MINERAL LÍQUIDO.

Sustancias	Tipo y Cantidad	Concentración
Sales	HCl (3 ml)	1 M
	NaCl (12.5 g)	8,5 mM
	$MgSO_4 – 7H_2O$ (5 g)	0,81 mM
	$CaCl_2$ $2H_2O$ (1g)	0,27 mM
Buffer	K_2HPO_4 (17,5 g)	4,02 mM
	$K_2H_2PO_4$ (7,5 g)	2,2 mM
Vitaminas	Clorhidrato de piridoxina (0,05 g)	
	Ácido p-aminobenzoico (0,025 g)	
	Ácido nicotínico (0,025g)	
	Pantotenato de calico (0,025 g)	
	Riboflavina (0,025 g)	
	Vitamina B_{12} (0,025 g)	
	Tiamina-HCl (0,025 g)	
	Biotina (0,01 g)	
	Ácido fólico (0,01 g)	
	α-lipoico (0,01 g)	
Trazas	HCl (20 ml)	18 -19%
	$MnSO_4$ H_2O (0,2 g)	
	H_3BO_3 (0,1g)	
	$ZnSO_4$ $7H_2O$ (0,1 g)	
	$CaSO_4$ $5H_2O$ (0,05 g)	
	$CoCl_2$ H_2O (0,05 g)	
	$CuSO_4$ $5H_2O$ (0,01 g)	
	Na_2MoO_4 $2H_2O$ (0,01 g)	
	$NiSO_4$ $6H_2O$	
Explosivo	Pentrita (2,5 ml)	
Hierro	HCl (3 ml)	1 M
	$FeSO_4$ $7H_2O$ (0,3 g)	10, 8 µM

Fuente: Las Autoras.

Para la preparación del medio mineral del preenriquecimiento se utilizan las siguientes soluciones.

Descripción de las soluciones para la preparación del medio de cultivo.

Compuesto	Cantidad
Solución de Buffer	10 ml
Solución de Sales	10 ml
Fuente de carbono	10 ml
Fuente de nitrógeno	10 ml
Solución de Hierro	1 ml
Solución trazas	1 ml
Solución de vitaminas	1 ml
Solución de explosivo	2,5 ml

Fuente: Las Autoras.

ANEXO 3

Method 8330 (Nitroaromatics and Nitramines by HPLC) *cont'd*

Single-Component Explosives Solutions

Volume is 1mL/ampul. Concentration is µg/mL.

Compound	Solvent	Conc.	cat.# (ea.)	price
2-amino-4,6-dinitrotoluene	ACN	1,000	31670	enquire
4-amino-2,6-dinitrotoluene	ACN	1,000	31671	enquire
ammonium picrate	ACN	2,000	31890	enquire
3,5-dinitroaniline	ACN	1,000	31661	enquire
1,3-dinitrobenzene	ACN	1,000	31662	enquire
1,4-dinitrobenzene	ACN	2,000	33205	enquire
2,4-dinitrotoluene	ACN	1,000	31663	enquire
2,6-dinitrotoluene	ACN	1,000	31664	enquire
EGDN	M	1,000	31601	enquire
HMX	ACN	1,000	31665	enquire
nitrobenzene	ACN	1,000	31657	enquire
nitroglycerin	M	1,000	31498	enquire
nitroguanidine	M	1,000	31602	enquire
2-nitrotoluene	ACN	1,000	31659	enquire
3-nitrotoluene	ACN	1,000	31660	enquire
4-nitrotoluene	ACN	1,000	31658	enquire
PETN (pentaerythritol tetranitrate)	M	1,000	31600	enquire
picric acid	M	1,000	31499	enquire
propylene glycol dinitrate (PGDN)	M	1,000	31821	enquire
RDX	ACN	1,000	31666	enquire
tetryl	ACN	1,000	31667	enquire
1,3,5-trinitrobenzene	ACN	1,000	31668	enquire
2,4,6-trinitrotoluene	ACN	1,000	31669	enquire

ACN=acetonitrile
M = methanol

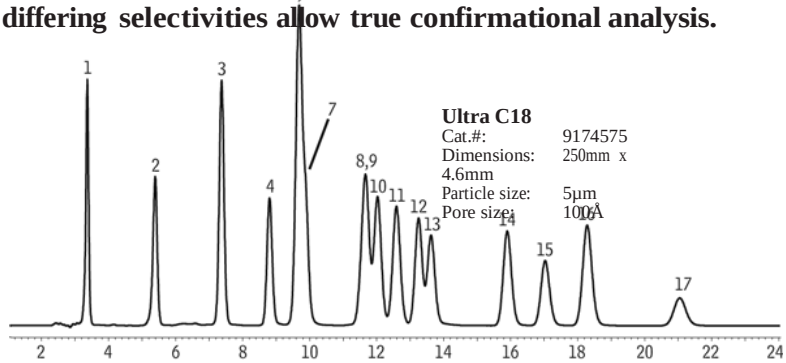
8330 Nitroaromatics Kit (1,000µg/mL)

31450: 8330 Calibration Mix #1
31451: 8330 Calibration Mix #2
31452: 8330 Internal Standard Mix
31453: 8330 Surrogate Mix
Contains 1mL each of these mixtures.
cat. # 31454 (kit) enquire

also **available**

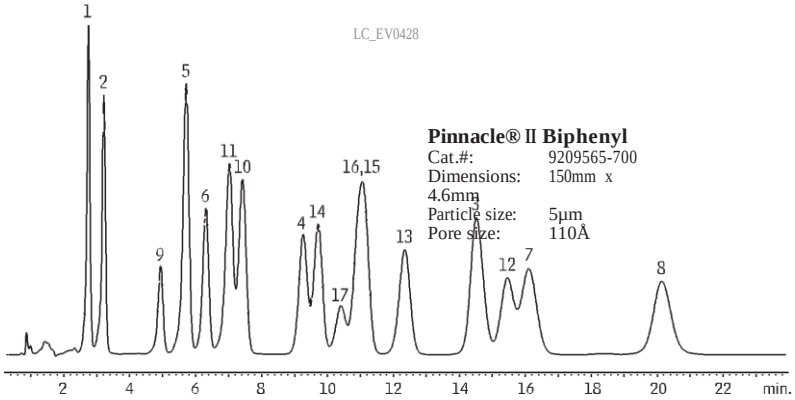
See materials for GC Method 8095 on pages 429-430.

EPA 8330B analytes resolve well on the Ultra C18 column and Pinnacle® II Biphenyl column; differing selectivities allow true confirmational analysis.



Peak List
1. HMX
2. RDX
3. 1,3,5-TNB
4. 1,3-DNB
5. 3,5-DNA
6. NB
7. tetryl
8. 2,4,6-TNT
9. NG
10. 2-A-4,6-DNT
11. 4-A-2,6-DNT
12. 2,4-DNT
13. 2,6-DNT
14. 2-NT
15. 4-NT
16. 3-NT
17. PETN

LC_EV0428



free literature

For more information, download our Trace-Level Explosives Analysis by HPLC applications note from www.restek.com.
lit. cat.# 59361A

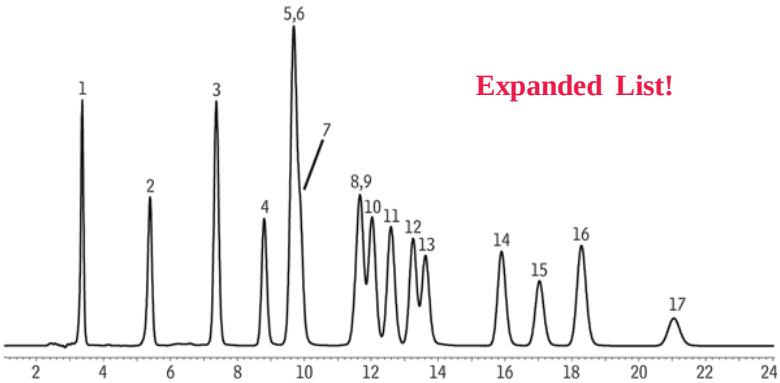
Sample: 50µg/mL each compound diluted in acetonitrile
8330 Calibration Mix #1 (cat.# 31450)
8330 Calibration Mix #2 (cat.# 31451)
PETN Standard(cat.# 31600)
3,5-dinitroaniline Reference Mix (cat.# 31661)
Nitroglycerin Standard (cat.# 31498)
Inj.: 10µL

Conditions:
Mobile phase: water:methanol (44:56 v/v)
Flow: 1.0mL/min.
Temp.: 30°C
Det.: UV detection @ 210nm

LC_EV0429

Explosives by EPA Method 8330B on Ultra C18

Peak List	Ret. Time (min.)
1. HMX	3.38
2. RDX	5.41
3. 1,3,5-TNB	7.39
4. 1,3-DNB	8.82
5. 3,5-DNA	9.71
6. NB	9.71
7. tetryl	9.88
8. 2,4,6-TNT	11.69
9. NG	11.69
10. 2-A-4,6-DNT	12.05
11. 4-A-2,6-DNT	12.61
12. 2,4-DNT	13.27
13. 2,6-DNT	13.64
14. 2-NT	15.92
15. 4-NT	17.05
16. 3-NT	18.32
17. PETN	21.08



LC_EV0428

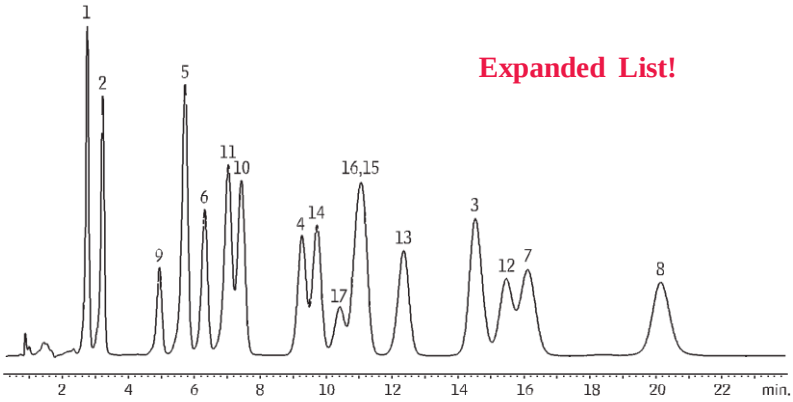
Column: Ultra C18
Cat.#: 9174575
Dimensions: 250mm x 4.6mm
Particle size: 5µm
Pore size: 100Å

Sample: 50µg/mL each compound diluted in acetonitrile
8330 Calibration Mix #1 (cat.# 31450)
8330 Calibration Mix #2 (cat.# 31451)
PETN Standard(cat.# 31600)
3,5-dinitroaniline Reference Mix (cat.# 31661)
Nitroglycerin Standard (cat.# 31498)
Inj.: 10µL

Conditions:
Instrument: Shimadzu Prominence
HPLC Mobile phase: water:methanol (44:56
v/v) Flow: 1.0mL/min.
Temp.: 30°C
Det.: UV detection @ 210nm

Explosives by EPA Method 8330B on Pinnacle® II Biphenyl

Peak List	Ret. Time (min.)
1. HMX	2.76
2. RDX	3.22
3. 1,3,5-TNB	4.94
4. 1,3-DNB	5.73
5. 3,5-DNA	6.31
6. NB	7.02
7. tetryl	7.43
8. 2,4,6-TNT	9.26
9. NG	9.73
10. 2-A-4,6-DNT	10.43
11. 4-A-2,6-DNT	11.07
12. 2,4-DNT	11.07
13. 2,6-DNT	12.36
14. 2-NT	14.54
15. 4-NT	15.46
16. 3-NT	16.12
17. PETN	20.17



LC_EV0429

Column: Pinnacle® II Biphenyl
Cat.#: 9209565-700
Dimensions: 150mm x 4.6mm
Particle size: 5µm
Pore size: 110Å

Sample: 50µg/mL each compound diluted in acetonitrile
8330 Calibration Mix #1 (cat.# 31450)
8330 Calibration Mix #2 (cat.# 31451)
PETN Standard (cat.# 31600)
3,5-dinitroaniline Standard (cat.# 31661)
Nitroglycerin Standard (cat.# 31498)
Inj.: 10µL

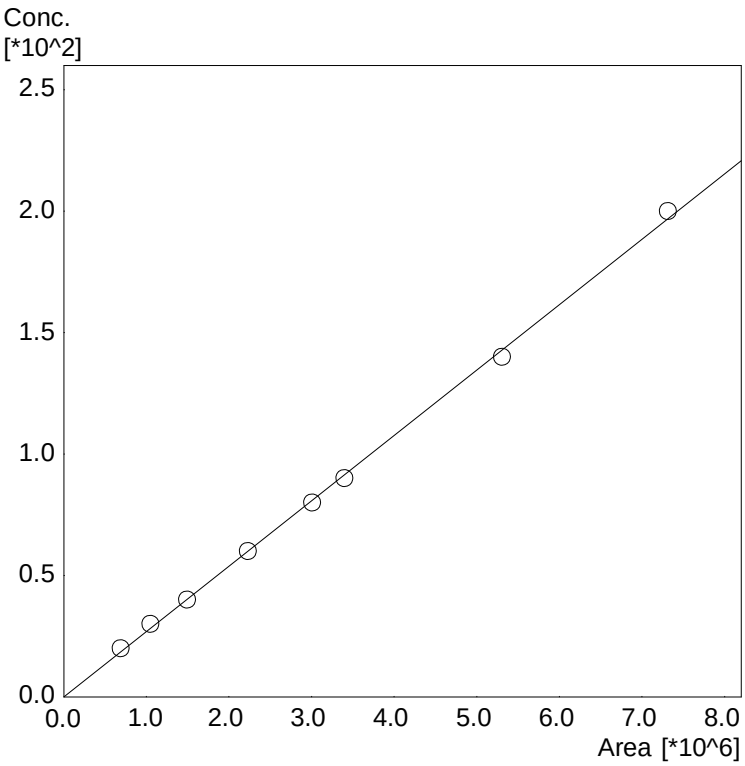
Conditions:
Instrument: Shimadzu Prominence
HPLC Mobile phase: water:methanol (45:55
v/v) Flow: 1.2mL/min.
Temp.: 30°C
Det.: UV detection @ 210nm

ANEXO 4

Tray#	: 1
Vail #	: 27
Injection Volume	: 20 uL
Data File Name	: P41.lcd
Method File Name	: curva26Nov2009.lcm
Batch File Name	: 26Nov2009.lcb
Report File Name	: Default.lcr
Data Acquired	: 11/26/2009 5:02:07 PM
Data Processed	: 12/1/2009 11:36:39 AM

<Chromatogram>

ID# : 2
Name : petn
Quantitative Method : External Standard
Function : f(x)=2.69254e-05*x+0.0435866
Rr1=0.9995050 Rr2=0.9990103
MeanRF:2.72805e-005 RFSD:1.5334e-006 RFRSD:5.62086
FitType : Linear
ZeroThrough



#	Conc. (Rati	MeanArea	Area
1	20.000	692394.0	664917
			719871
2	30.000	1050517.	980458
			1120576
3	40.000	1496011.	1513278
			1478744
4	60.000	2232036.	2075480
			2388594
5	80.000	3007429.	2860205
			3154653
6	90.000	3401001.	3442100
			3359902
7	140.000	5305818.	5412375
			5199262
9	200.000	7313997.	7316286
			7311710

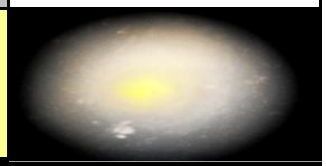
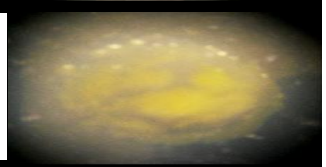
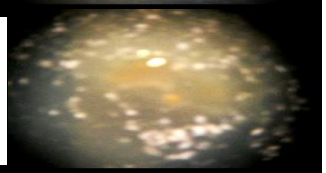
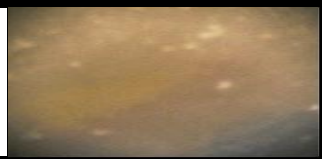
ANEXO 5

Autor/Año	Componentes Medio Cultivo Base	Fuente Carbono	Explosivo	Condiciones	Tiempo
Binks P., French C., Nicklin S., Bruce N., 1996	10mM Buffer Fosfato de Potasio	5mM Glucosa	1 mM PETN	30 º C 170 rpm	1 semana
	0.25 mM MgSO4	5mM Succinato			
	Elementos traza	10 mM glicerol			
Taek Oh B., Shea P., Drijber R., Vasilyeva G., Sarath G., 2003	0,1g/L MgSO4;	TNT	100mg/L TNT	28 º C 150 rpm	50 horas
	3,5g/L K2HPO4;				
	1,5g/L KH2PO4				
	1g/L Extracto Levadura				
	1mL elementos Traza				
Claus H., Bausinger I., Lehmler N., Perret G., Fels G., Dehner U., Preub J., König H., 2005	Agar Nutritivo Standard I	xxxx	10mg/L TNT	30° C 200 rpm	16 horas
Zaripov S., Naumov A., Suvorova E., Garusov A., Naumova R., 2003	0,25g/L MgSO4	5g/L Glucosa	12 - 200 ,g/L TNT	28° C 5000 gr x 15 minutos	24 horas
	4,5 g/L NA2HPO4				
	3 g/L KH2PO4				
	1 g/L (NH4)SO4				
	0,05 g/L Extracto de Levadura				
Claus H., Perret N., Bausinger T., Fels G., Preub J., König H., 2006	MMS + 7mM NH4Cl	Glucosa 3% p/v	40uM a 400 uM	37° C	7 días
Paca J., Halecky M., Barta J., Bajpai R., 2008	Medio basal: KH2PO4				
	Elementos Traza				

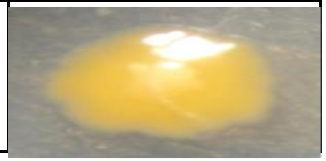
Autor/Año	Componentes Medio Cultivo Base	Fuente Carbono	Explosivo	Condiciones	Tiempo
Fuller M., Manning J., 1997	Melasa	xxx	80-98 ug/mL TNT	Tº Ambiente 200 ppm	2 semanas
French C., Nicklin S., Bruce N., 1998	KH2PO4; Na2HPO4 Elementos Traza HCl; MgO; CaCO3; FeSO4; ZnSO4; MnSO4; CuSO4; CoSO4; H3BO4	2 mM de glucosa	0.05 mM PETN (Disuelto en Acetona)	160 rpm 30°C	
Tope A., Jamil K., Baggi T., 1999	Extracto de Carne Pepetona NaCL K2HPO4 KH2PO4 MgSO4	xxx	60 mg/L TNT	175 rpm 25°C	24 horas
Paca J., Halecky M., Barta J., Bajpai R., 2008	Medio basal: KH2PO4 Elementos Traza	xxx	xxx	xxx	xxx
Preuss A., Fimpel J., Diekert G., 1992	MMS + NaHCO3; Na2S; K2HPO4; Na2HPO4; MgSO4	Piruvato Glucosa Extracto Levadura	0.2 mM TNT		
Stenuit B., Eyers L., Rozenberg R., Habib-Jiwan J., Agathos S., 2006	MMS	Glicerol Glucosa	TNT	37°C 250 rpm	

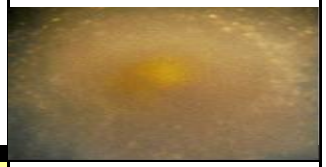
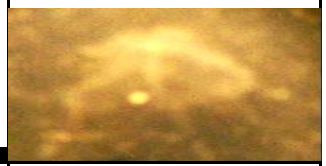
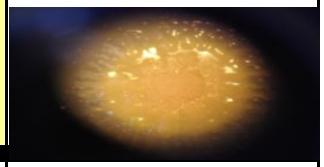
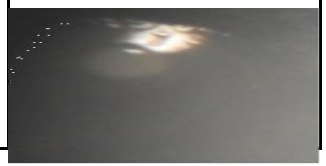
Autor/Año	Componentes Medio Cultivo Base	Fuente Carbono	Explosivo	Condiciones	Tiempo
White G., Snape J., Nicklin S., 1995	MMS: 3,5 g/L	1% Glicerol	30 mg/l GTN	30 ° C 150 rpm	2 Semanas
	K2HPO4; 1,5 g/L				
	KH2PO4; 0,5 g/L				
	NaCL; 0,12 g/L				
	MgSO4				
	Solución elementos Traza				
	0,57 g/L Borato de Sodio				
	0,24 g/L FeCL3·6H2O				
	0,04 g/L CoCl2·6H2O				
	0,06g/L CuSO4·5H2O				
	0,03 g/L MnCl2·4H2O				
	0,31 g/L ZnSO4·7H2O				
	0,03 g/L Na2MO4·2H2O				
Esteve A., Ramos J., 1998	Medio Mínimo Sales M8	0,1 % p/v Glucosa	100mg/L Nitroaromáticos	30° C 200 rpm	
Spanggord R., Spain J., Nishino S., Mortelmans C., 1991	0,7g/L K2HPO4		100 mg/L	25° C	5 días
	0,3g/L KH2PO4				
	0,5g/L NaCL				
	0,05g/L MgSO4				
	0,1g/L CaCl2·2H2O				
	0,003 FeSO4·7H2O.				
	1 mL de Elementos Traza: H2BO4; CaSO4; ZNSO4 Y Na2MgO2				
Park C., Kim T-H., Kim S., Lee J., Kim S-W., 2002	TSA	Succinato 0.5%	100 mg/l TNT	150 rpm 30° C	
	7g/L K2HPO4	TNT 20-100 mg/L			
	3 g/LKH2PO4				
	0,1 MgSO4				
	0,1 g/L NaCl				
	0,25g/L (NH4)2SO4				

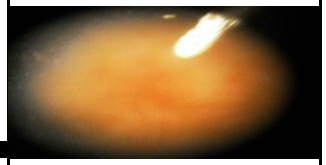
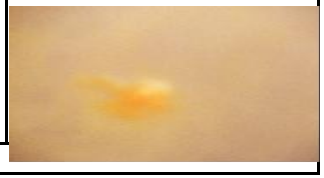
Autor/Año	Componentes Medio Cultivo Base	Fuente Carbono	Explosivo	Condiciones	Tiempo
Fuller M., Manning J., 1997	Melasa	xxx	80-98 ug/mL TNT	Tº Ambiente 200 ppm	2 semanas
French C., Nicklin S., Bruce N., 1998	KH2PO4; Na2HPO4	2 mM de glucosa	0.05 mM PETN (Disuelto en Acetona)	160 rpm 30°C	xxx
	Elementos Traza HCl; MgO; CaCO3; FeSO4; ZnSO4; MnSO4; CuSO4; CoSO4; H3BO4				
Tope A., Jamil K., Baggi T., 1999	Extracto de Carne	xxx	60 mg/L TNT	175 rpm 25°C	24 horas
	Pepetona				
	NaCL				
	K2HPO4				
	KH2PO4				
	MgSO4				

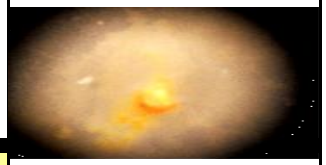
NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P1	1	MMC	10 7	AMARILLA	IRREGULAR	LISA	CONVEXA	
P2	1	MMC	10*7	GRIS CLARO	REGULAR	RUGOSA	CONVEXA	
P3	1	MME	10*7	AMARILLA	IRREGULAR	RUGOSA	LEVANTADA	
P5	1	MME	10 7	CAFÉ	IRREGULAR	LISA	PLANA	
P7	N1	MMC	10*6	GRIS	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIA CAFÉ	
P8	N1	MMC	10*6	GRIS	IRREGULAR	LISA	LEVANTADA	

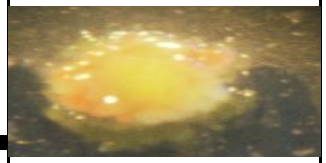
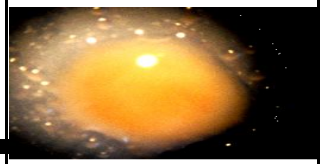
NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P9	N1	MMC	10*6	ROSADO	REGULAR	LISA	CONVEXA	
P10	N1	MMC	10*6	NARANJA	REGULAR	LISA	LEVANTADA	
P12	C1	MME	10 7	ROSADO	IRREGULAR	RUGOSA	PROTUBERANCIA ROSADO OSCURO	
P13	C1	MME	10 7	BLANCA	REGULAR	LISA	CONVEXA	
P14	C1	MME	10 7	AMARILLA	REGULAR	LISA	CONVEXA	
P15	C1	MME	10 7	BLANCA	IRREGULAR	RUGOSA	PROTUBERENCIA	

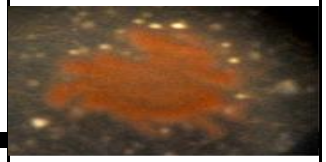
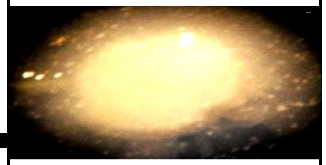
NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P16	C1	MME	10 7	AMARILLO	IRREGULAR	RUGOSA	PLANA	
P17	C1	MMC	10 7	AMARILLO	REGULAR	LISA	PROTUBERANCIA AMARILLA	
P18	C1	MM	10 7	AMARILLO CLARO	IRREGULAR	LISA	PLANA	
P19	C1	MM	10 7	BLANCA	REGULAR	LISA	LEVANTADA	
P20	N1	MM	10 6	AMARILLO CLARO	REGULAR	LISA	PLANA	
P21	N1	MM	10 6	AMARILLO	ONDULADO	LISA	LEVANTADA	

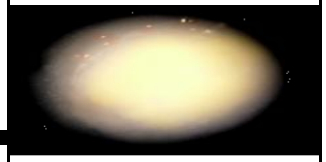
NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P22	N1	MMC	10 7	AMARILLO OSCURO	REGULAR	RUGOSA	PLANA	
P23	2	MMN	10 7	BLANCA	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIAS AMARILLAS	
P24	2	MMN	10 7	BLANCA	REGULAR	RUGOSA	PLANA	
P25	2	MMN	10 7	BLANCA	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIA NARANJA	
P26	2	MME	10 6	NARANJA CLARO	IRREGULAR	RUGOSA	PROTUBERANCIA NARANJA FUERTE	
P27	2	MMC	10 5	BLANCA	REGULAR	LISA	PROTUBERANCIA	

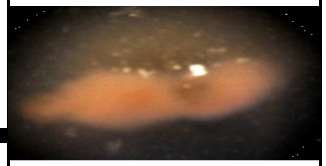
NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P28	2	MMC	10 5	NARANJA	REGULAR	LISA	CONVEXA	
P29	2	MMC	10 5	AMARILLA	REGULAR	LISA	PLANA	
P30	2	MMC	10 5	BLANCO	IRREGULAR	RUGOSA	PROTUBERANCIA NARANJA	
P33	C2	MMC	10 6	BLANCA	IRREGULAR	RUGOSA	PLANA	
P34	C2	MMC	10 6	CAFÉ	IRREGULAR	RUGOSA	PROTUBERANCIA	
P35	C2	MMC	10 5	BLANCA	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIA NARANJA	

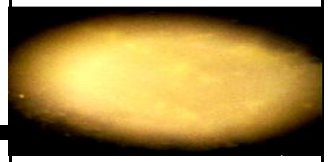
NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P36	C2	MMC	10 5	NARANJA	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIAS NARANJAS	
P37	2	MMC	10 7	AMARILLA	REGULAR	LISA	PLANA	
P38	2	MMC	10 7	BLANCA	IRREGULAR	RUGOSA	PROTUBERANCIA AMARILLA	
P39	2	MMC	10 7	BLANCA	IRREGULAR	LISA	LEVANTADO	
P40	2	MMC	10 7	BLANCA	REGULAR	LISA	PROTUBERANCIA ROSADA	
P41	2	MMC	10 7	BLANCA	IRREGULAR	RUGOSA	PROTUBERANCIA	

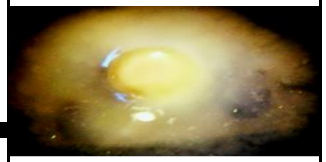
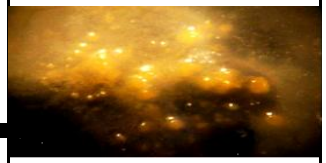
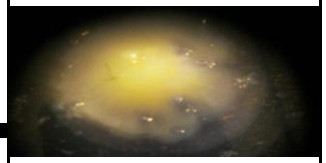
NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P42	2	MMC	10 7	AMARILLA	IRREGULAR	RUGOSA	LEVANTADA	
P43	2	MMC	10 6	NARANJA	REGULAR	LISA	CONVEXA	
P44	2	MM	10 7	AMARILLA	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIA AMARILLA	
P45	C3	MM	10 7	BLANCA	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIA	
P46	3	MM	10 5	NARANJA	REGULAR	LISA	CONVEXA	
P47	3	MMN	10 5	BLANCA	IRREGULAR	RUGOSA	PLANA	

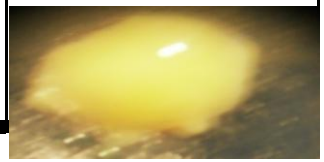
NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P 48	3	MMN	10 6	BLANCA	REGULAR	LISA	PROTUBERANCIA BLANCA	
P49	3	MMC	10 5	BLANCA	IRREGULAR	LISA	PLANA	
P50	3	MMC	10 5	ROSADA	IRREGULAR	RUGOSA	PLANA	
P51	3	MMN	10 6	NARANJA	IRREGULAR	RUGOSA	PROTUBERANCIA NARANJA	
P52	N3	MMN	10 5	AMARILLO CLARO	REGULAR	LISA	LEVANTADO	
P54	C3	MMN	10 4	BLANCA	REGULAR	LISA	LEVANTADO	

NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P 55	N3	MMC	10 4	BLANCA	REGULAR	LISA	CONVEXA	
P 56	C3	MMN	10 5	BLANCA	IRREGULAR	LISA	ONDULADA	
p58	C3	MMN	10 5	CAFÉ	REGULAR	LISA	PLANA	
P65	C3	MMN	10 6	NARANJA	IRREGULAR	RUGOSA	LEVANTADA	
P67	C4	MM	10 6	AMARILLA	IRREGULAR	LISA	PLANA	
P68	C4	MM	10 6	AMARILLA	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIA AMARILLA	

NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P69	C4	MMC	10 6	NARANJA	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIAS NARANJA FUERTE	
P90	N5	MMC	10 4	ROSADA	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIA CAFÉ	
P91	N5	MMC	10 4	ROSADO CLARO	IRREGULAR	RUGOSA	PLANA	
P92	5	MMC	10 6	ROSADA	IRREGULAR	LISA	PLANA	
P93	5	MMN	10 6	ROSADA	IRREGULAR	LISA	CONVEXA	
P111	C6	MMC	10 5	AMARILLA	IRREGULAR	RUGOSA	PLANA	

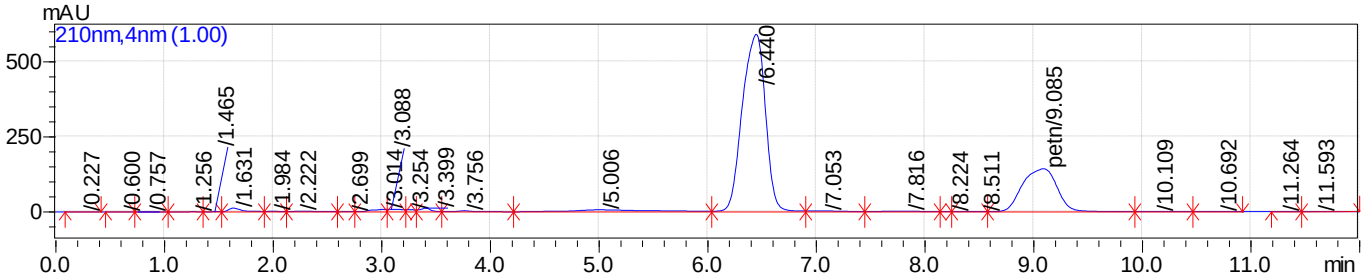
NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P112	C6	MMC	10 6	AMARILLA	IRREGULAR	LISA	PLANA	
P113	N6	MMC	10 6	ROSADA	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIA	
P133	N7	MMN	10 5	ROSADO CLARO	FILAMENTOSA	RUGOSA	PROTUBERANCIA	
P 155	C8	MMC	10 6	AMARILLA	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIA AMARILLA	
P156	8	MMC	10 5	NARANJA	IRREGULAR	RUGOSA	PLANA	
P178	C9	MM	10 6	BLANCA	REGULAR	LISA	CONCAVA/ PROTUBERANCIA BLANCA	

NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P179	N9	MMN	10 4	AMARILLA	IRREGULAR	LISA	PLANA	
P180	9	MMN	10 6	AMARILLA	IRREGULAR	RUGOSA	PLANA	
P199	N10	MM	10 4	AMARILLA	IRREGULAR	LISA	CONCAVA	
P200	N10	MM	10 6	AMARILLA/ NARANJA	REGULAR	LISA	CONCAVA	
P201	N10	MM	10 4	BLANCA	IRREGULAR	LISA	PROTUBERANCIA AMARILLA	
P221	C11	MM	10 4	BLANCA	REGULAR	LISA	CONVEXA	

NOMBRE	PROVENIENCIA			COLOR	FORMA	TEXTURA	ELEVACIÓN	IMAGEN
	MUESTRA	MEDIO	DILUCIÓN					
P243	N12	MMN	10 4	AMARILLO CLARO	IRREGULAR	LISA	CONCAVA	
P244	N12	MMN	10 4	MARILLO	IRREGULAR	LISA	CONVEXA	

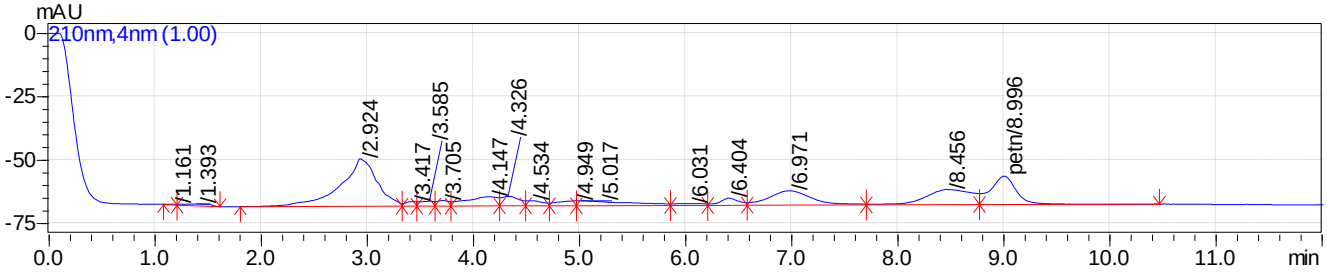
ANEXO 7

SOLUCIÓN PATRÓN – ABSORBANCIA VS TIEMPO



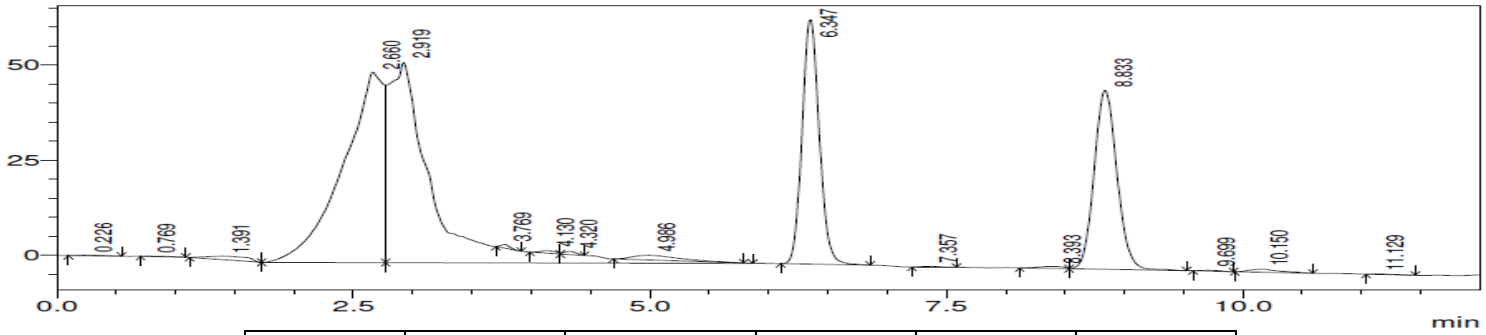
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	9,085	88,6197	Ch2 210nm	3172113	143178

AISLAMIENTO P2 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



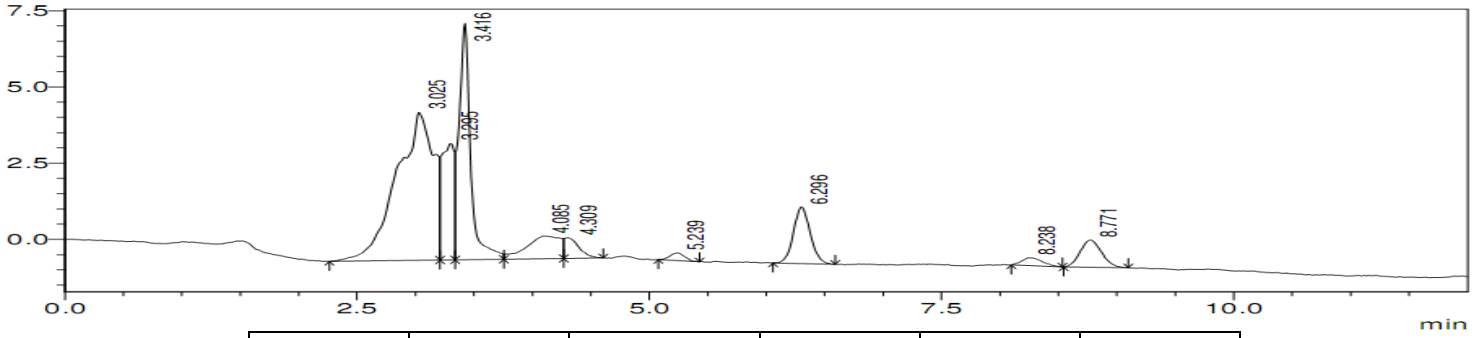
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,996	5,2609	Ch2 210nm	186845	11217

AISLAMIENTO P3 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



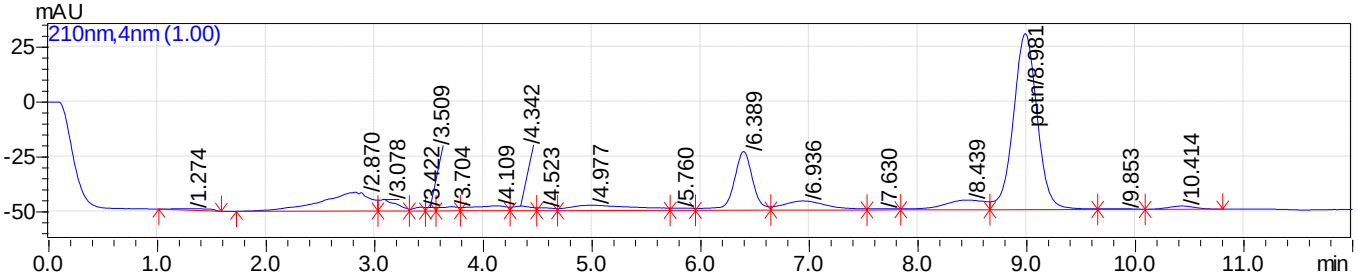
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,833	13,7207	Ch2 210nm	489808	48426

AISLAMIENTO P5 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



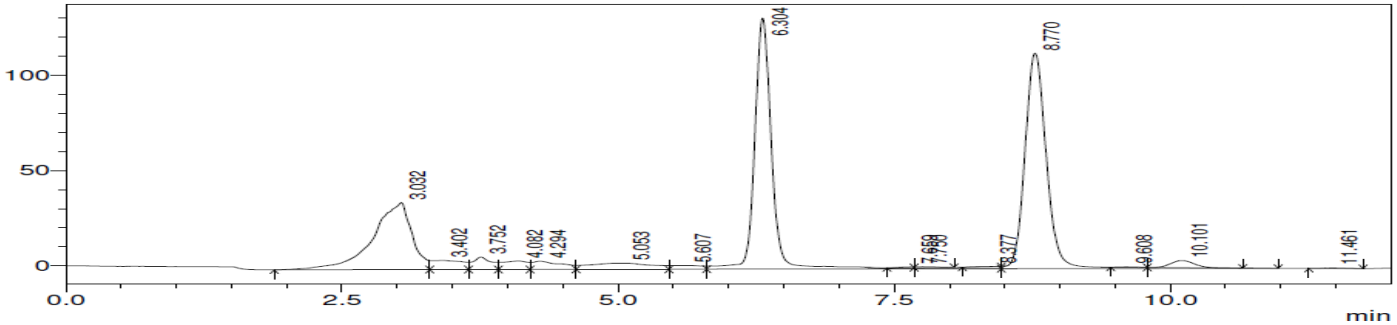
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,771	0,3592	Ch2 210nm	11302	895

AISLAMIENTO P6 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



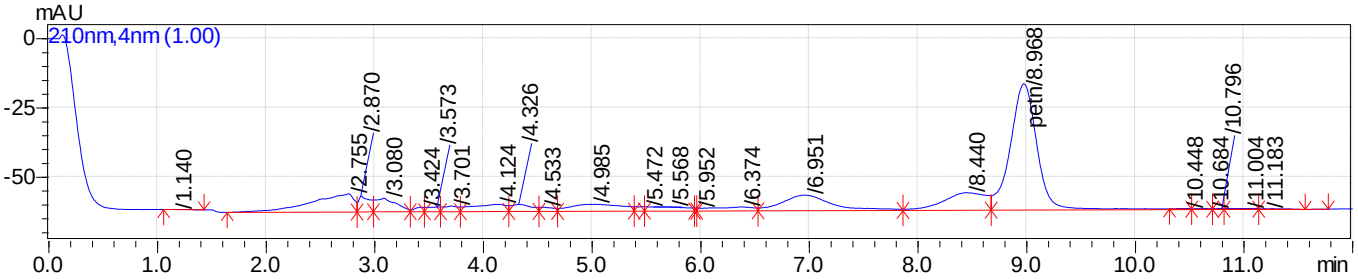
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,981	32,93464	Ch2 210nm	1221562	80153

AISLAMIENTO P7 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



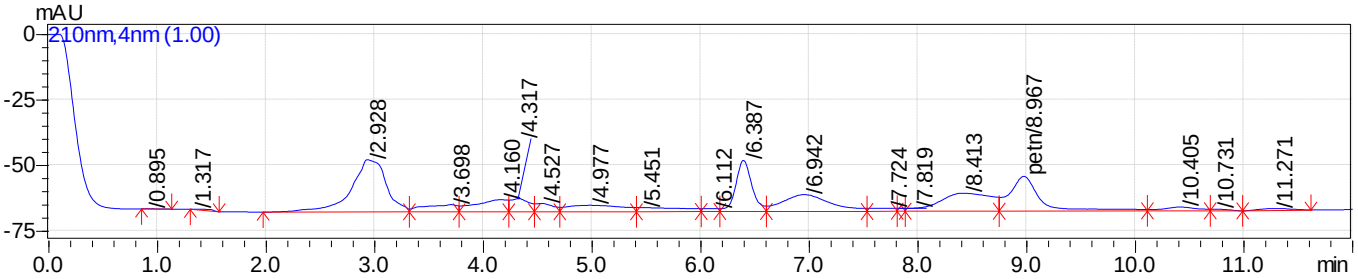
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,770	14,500	Ch2 210nm	955131	97846

AISLAMIENTO P8 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



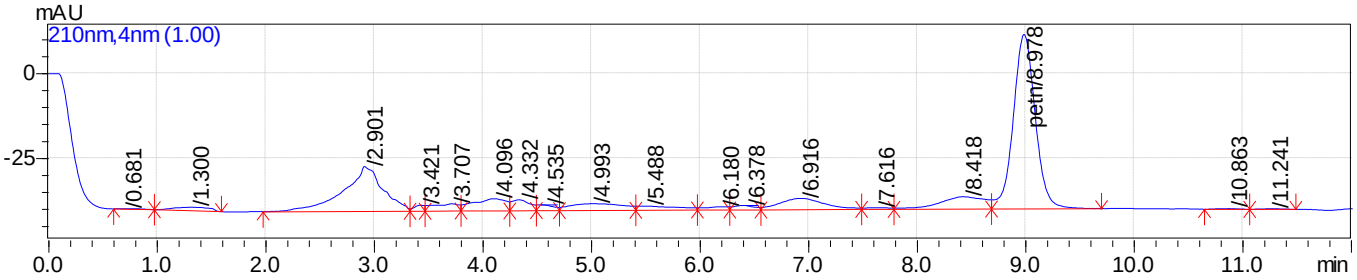
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,968	21,12051	Ch2 210nm	782789	45577

AISLAMIENTO P9 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



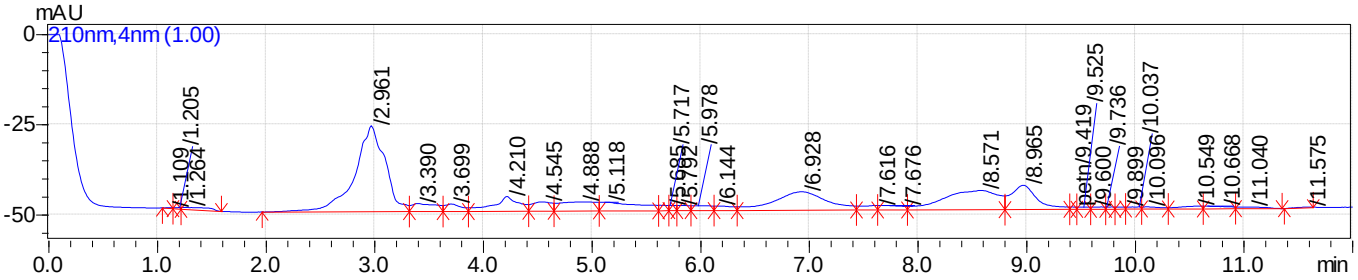
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,967	6,93902	Ch2 210nm	256094	13319

AISLAMIENTO P10 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



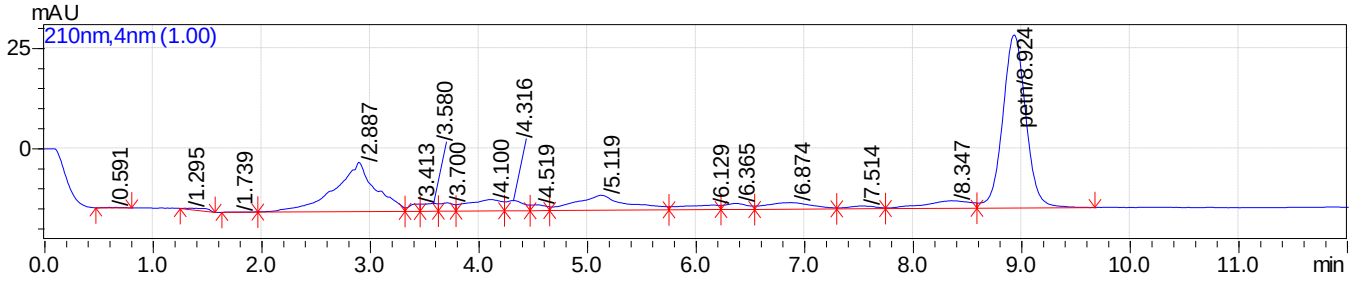
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,978	19,50974	Ch2 210nm	722966	51390

AISLAMIENTO P12 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



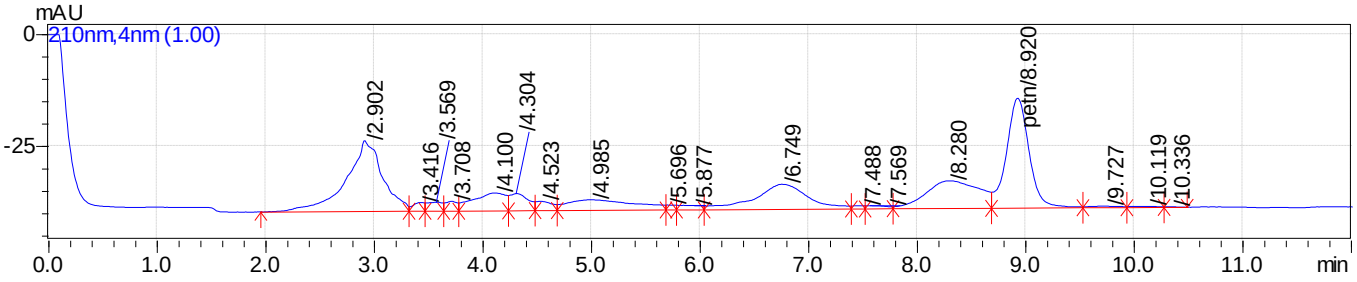
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	9,419	0,11084	Ch2 210nm	2498	671

AISLAMIENTO P13 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



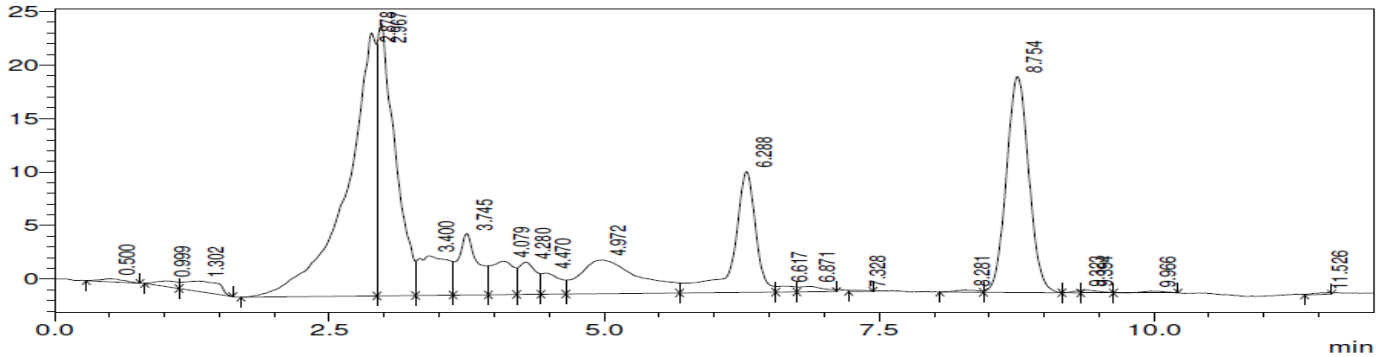
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,924	17,19771	Ch2 210nm	637098	43176

AISLAMIENTO P14 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



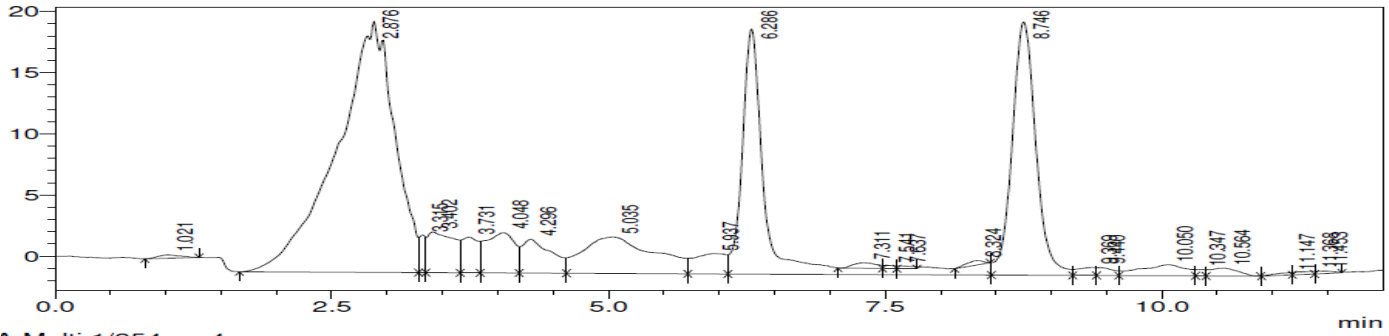
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,92	9,63989	Ch2 210nm	356403	24557

AISLAMIENTO P15 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



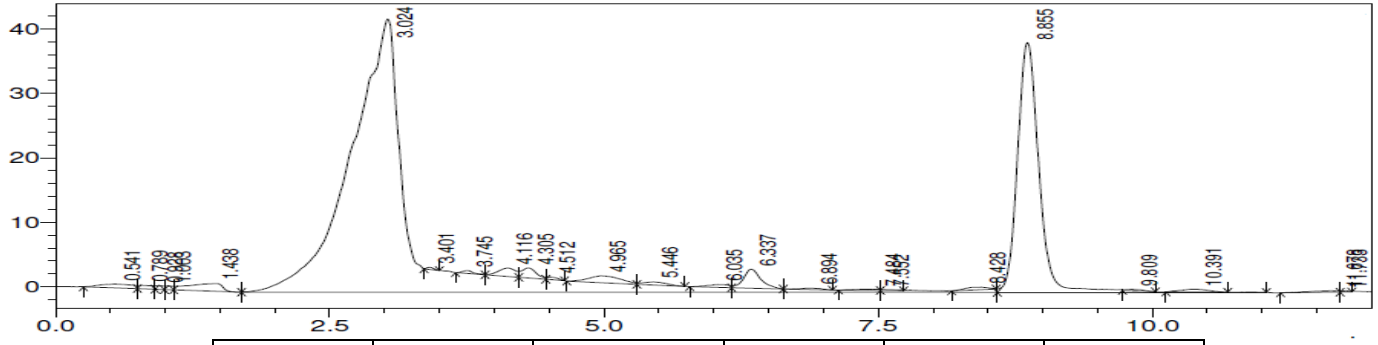
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,754	0,10439	Ch2 210nm	3136	238

AISLAMIENTO P16 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



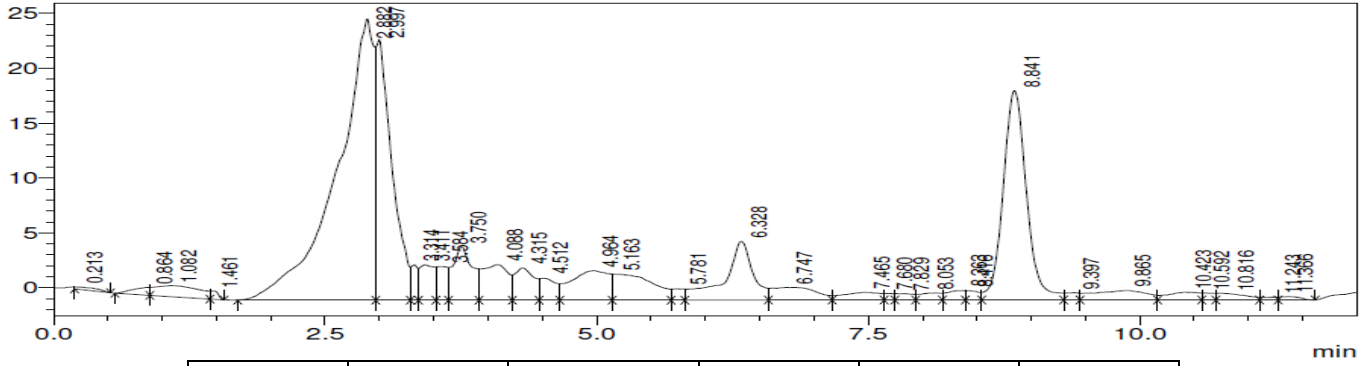
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,746	4,17686744	Ch2 210nm	153508	14498

AISLAMIENTO P17 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



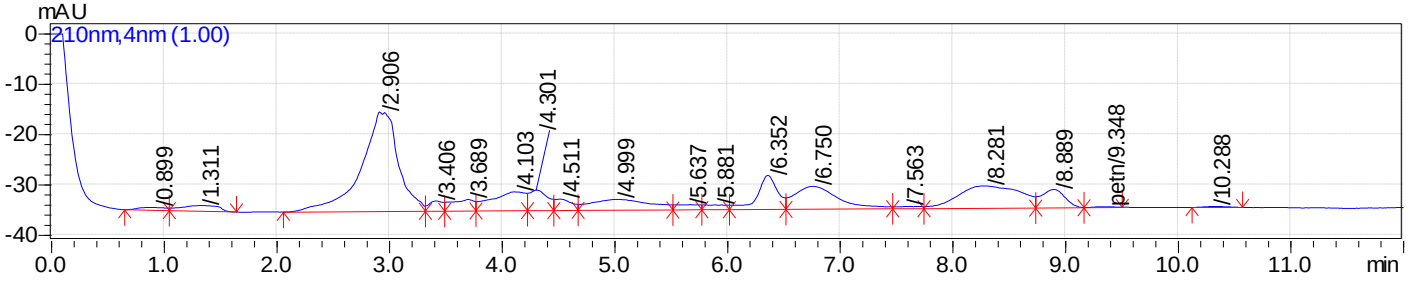
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,855	13,2318845	Ch2 210nm	489808	473

AISLAMIENTO P18 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



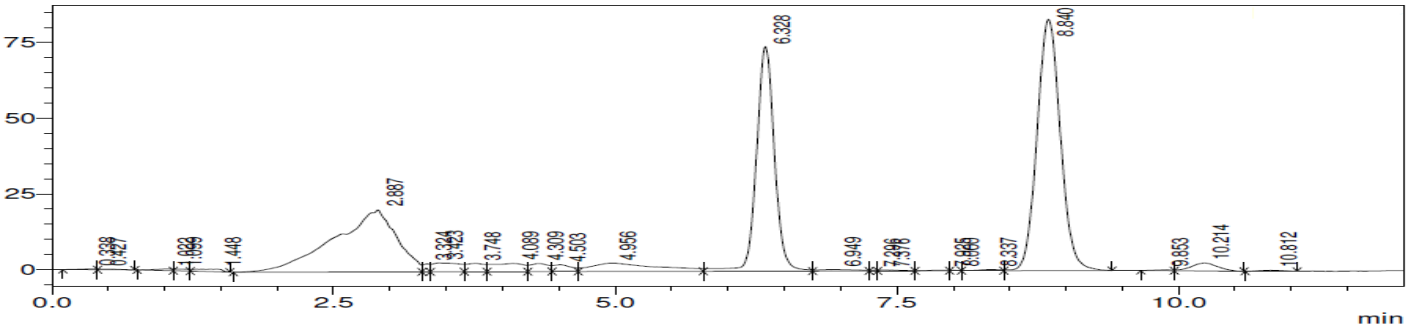
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,841	4,34598597	Ch2 210nm	159789	16503

AISLAMIENTO P19 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



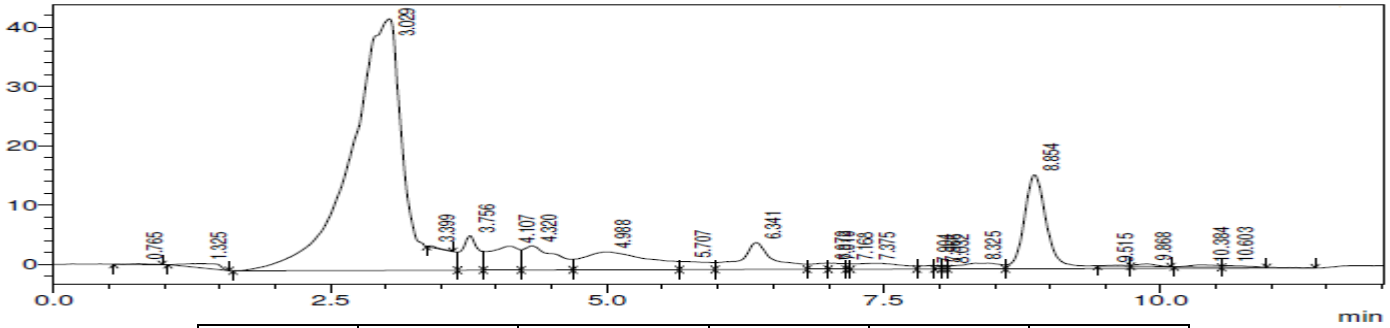
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	9,348	0,10439	Ch2 210nm	2258	178

AISLAMIENTO P20 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



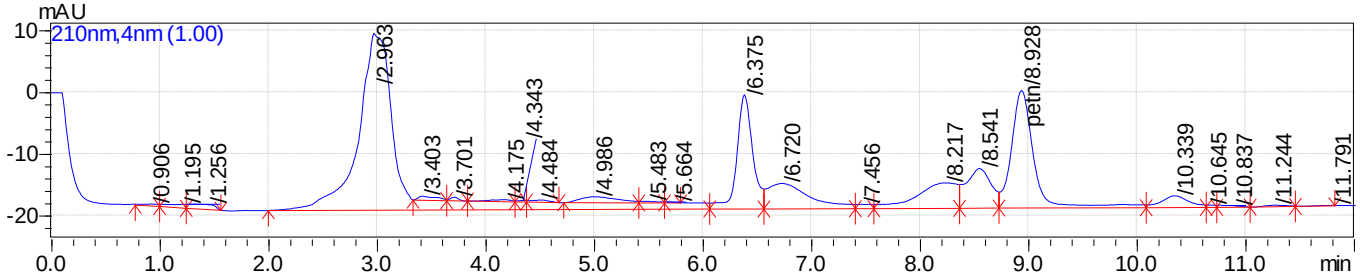
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,840	15,7967188	Ch2 210nm	585065	50305

AISLAMIENTO P21 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



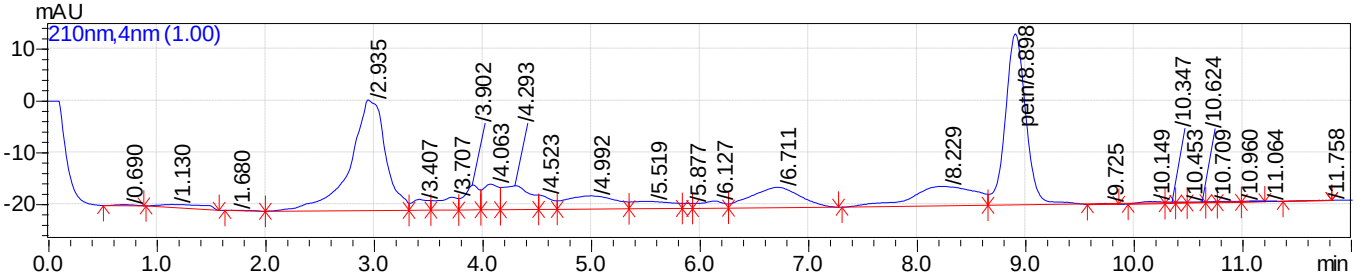
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,854	0,24287582	Ch2 210nm	24432	2481

AISLAMIENTO P22 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



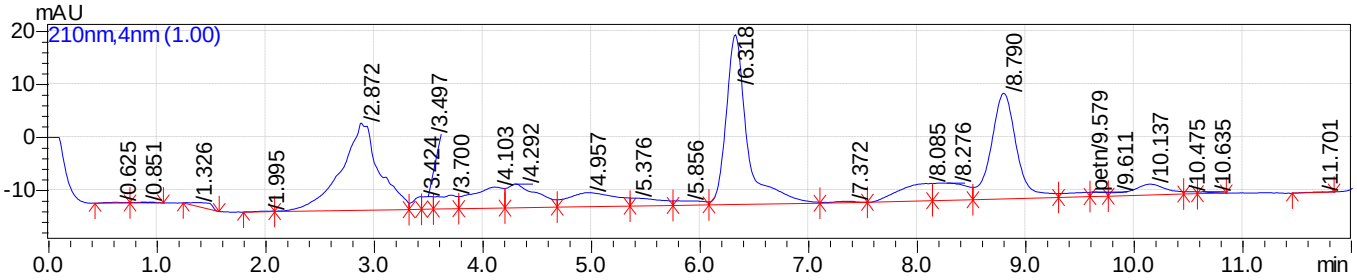
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,928	7,32654	Ch2 210nm	270486	19021

AISLAMIENTO P24 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



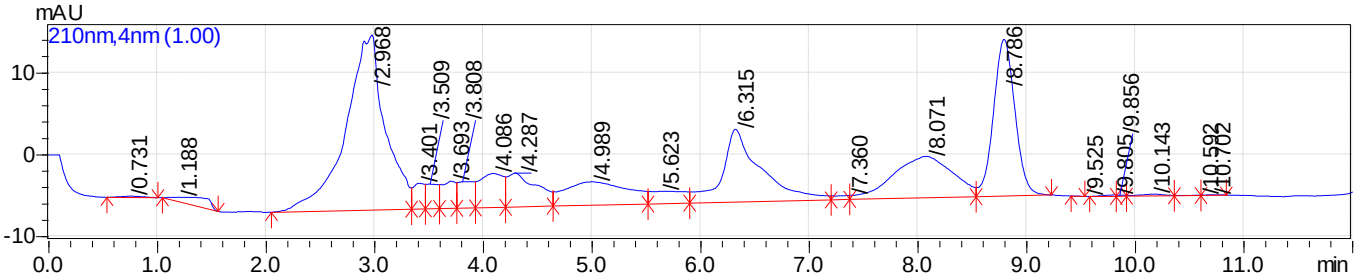
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,898	11,16268	Ch2 210nm	412959	33032

AISLAMIENTO P25 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



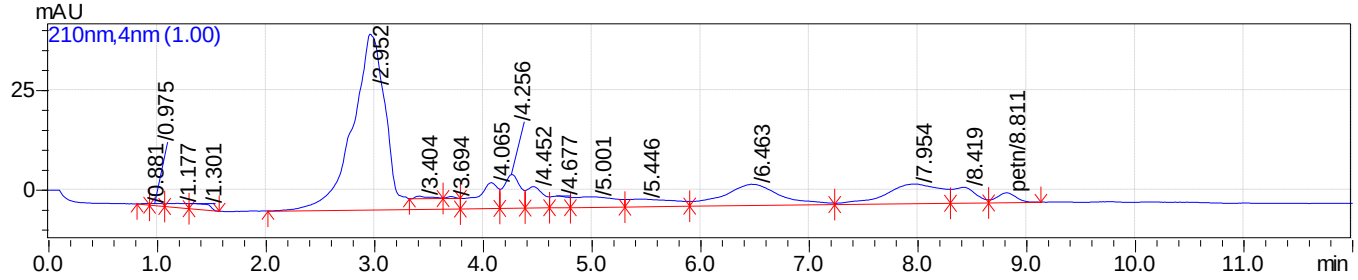
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	9,579	0,40251	Ch2 210nm	13330	815

AISLAMIENTO P27 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



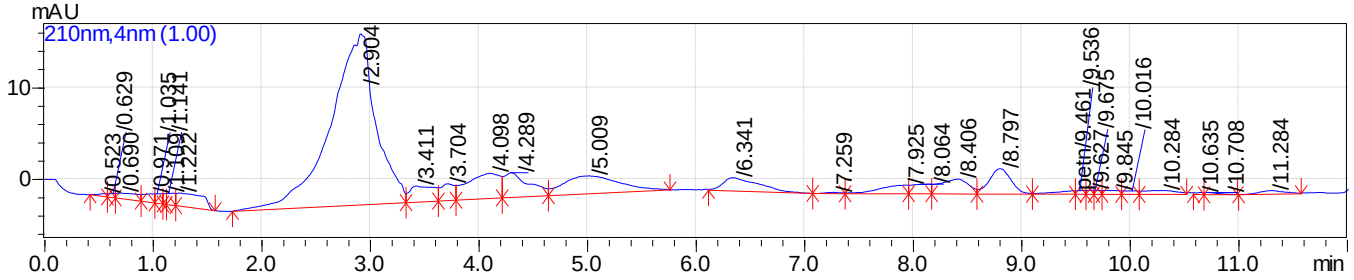
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	9,237	0,13897	Ch2 210nm	3542	449

AISLAMIENTO P28 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



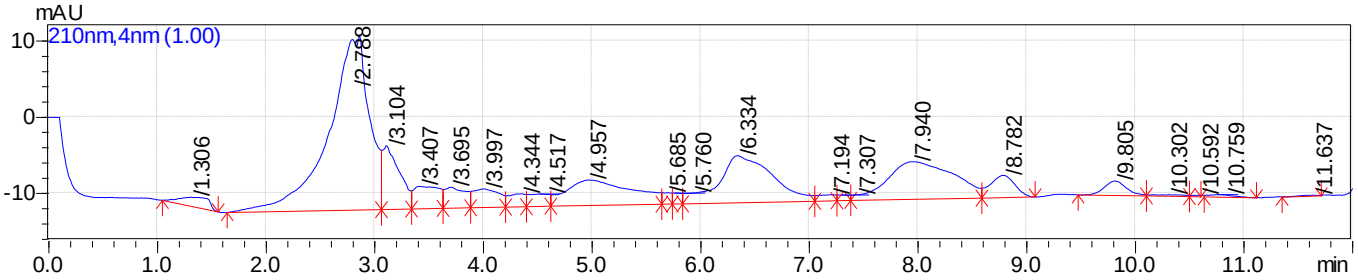
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,811	0,85403	Ch2 210nm	30100	2432

AISLAMIENTO P29 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



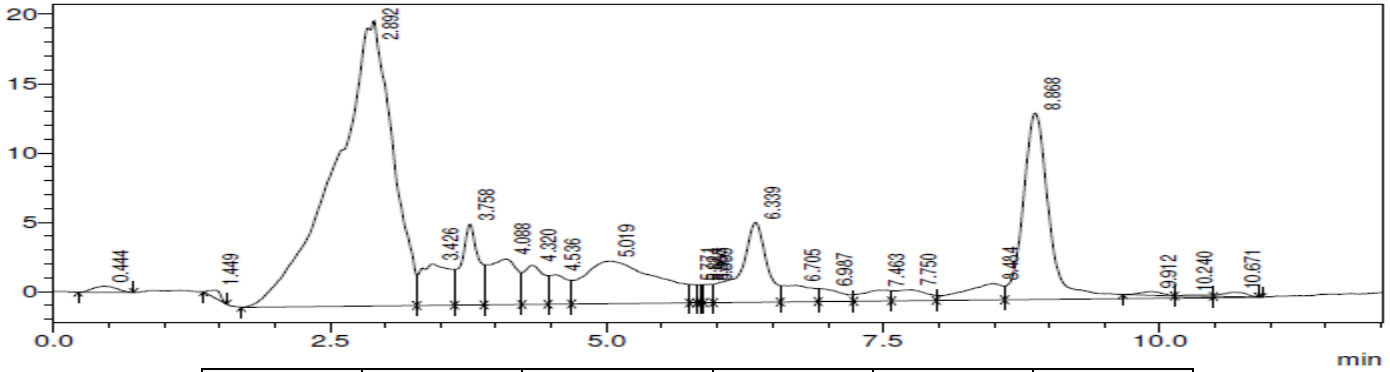
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	9,461	0,17897	Ch2 210nm	5028	360

AISLAMIENTO P30 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



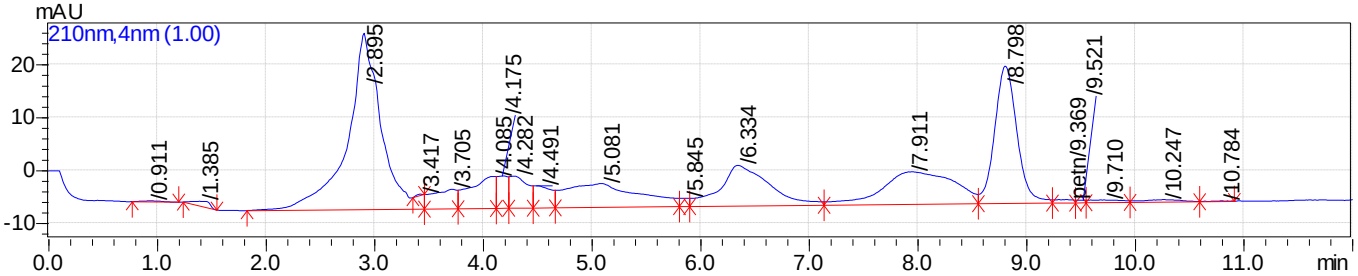
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	9,331	0,49861	Ch2 210nm	16900	825

AISLAMIENTO 33 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



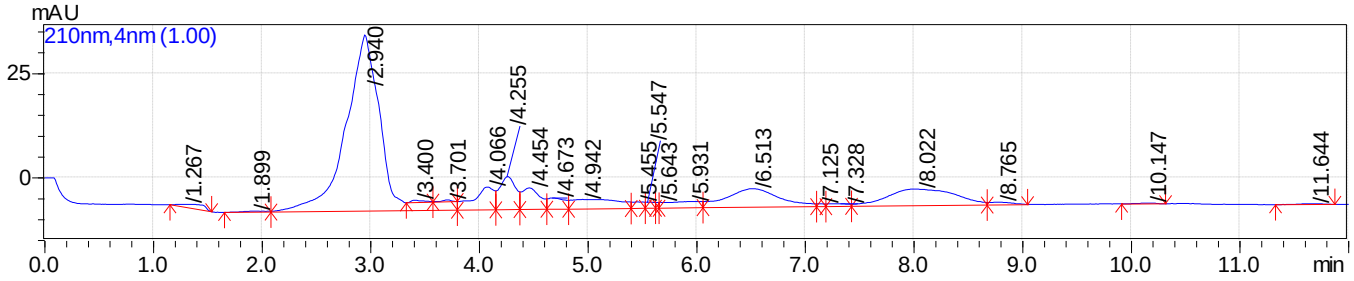
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,868	0,58431701	Ch2 210nm	20082	1737

AISLAMIENTO 34 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



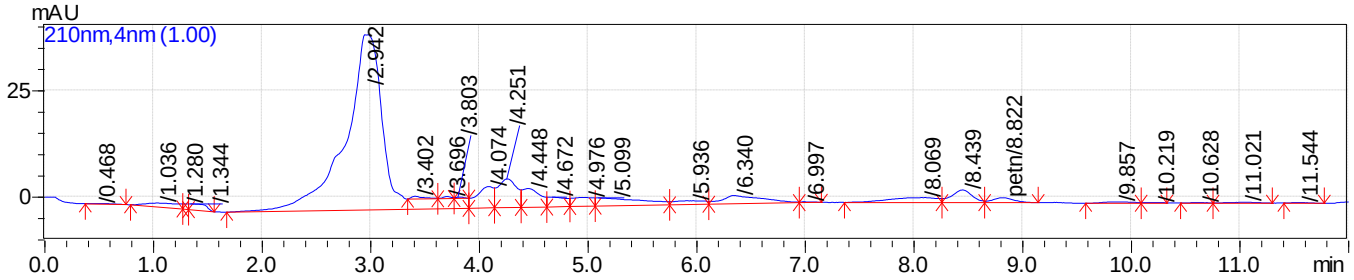
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	9,369	0,25374	Ch2 210nm	7805	638

AISLAMIENTO P35 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



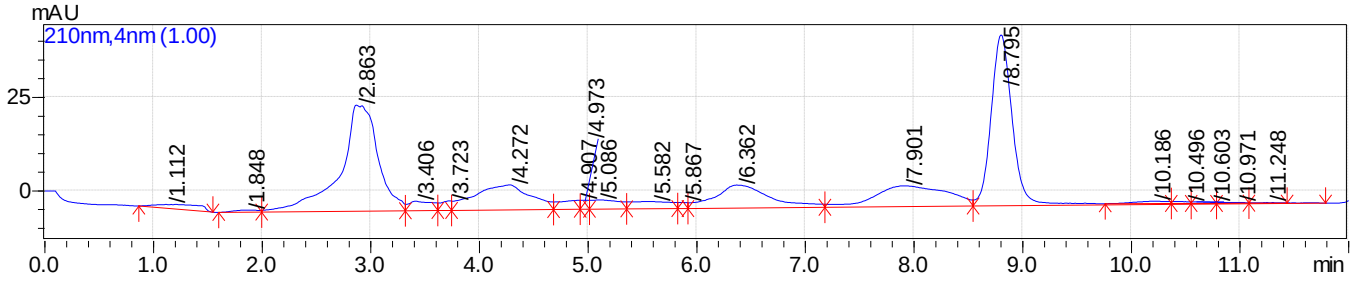
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,7	0,08486	Ch2 210nm	9665	642

AISLAMIENTO P36 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



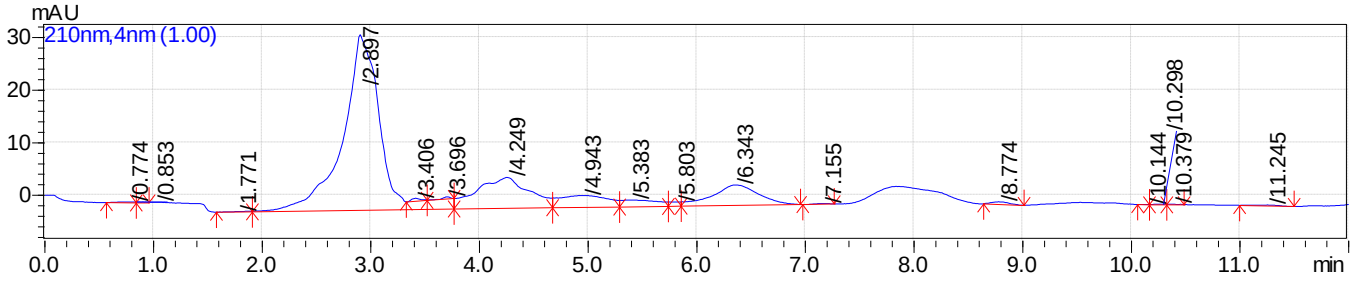
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,822	0,47552	Ch2 210nm	16042	1179

AISLAMIENTO P39 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



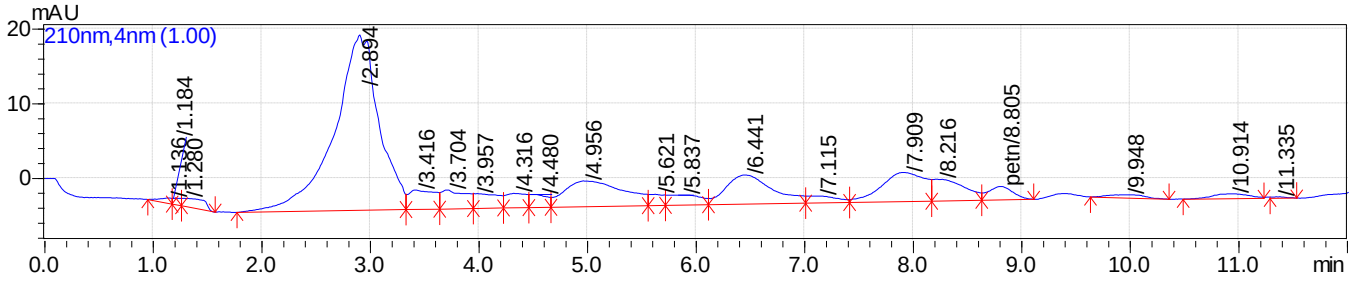
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	-	0	Ch2 210nm	0	0

AISLAMIENTO P40 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



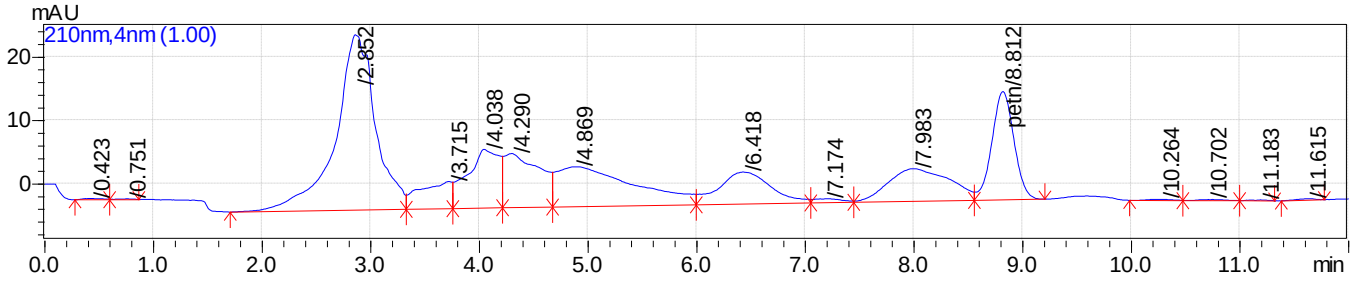
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	9,526	0,55307	Ch2 210nm	18922	667

AISLAMIENTO P41 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



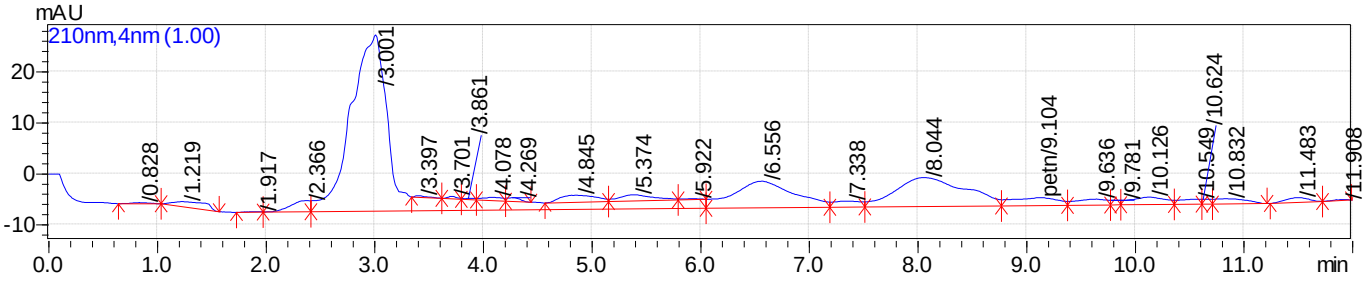
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,805	0,81348	Ch2 210nm	28593	1821

AISLAMIENTO P42 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



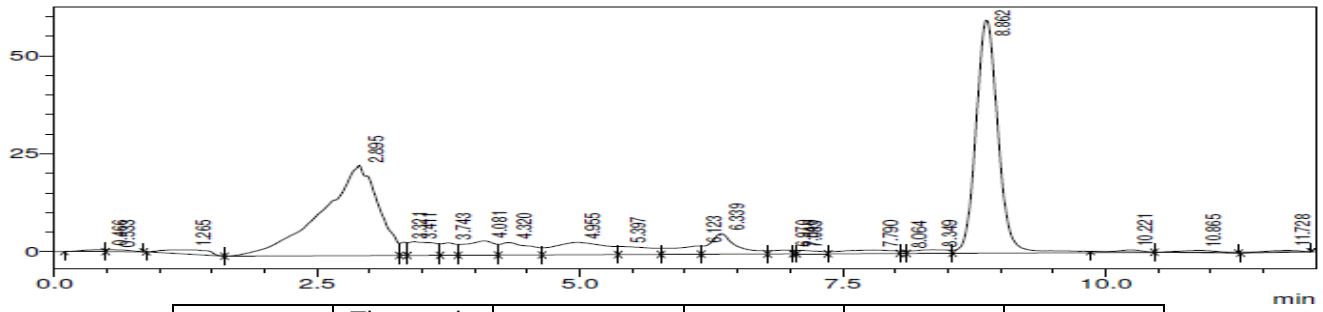
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,812	6,54782	Ch2 210nm	241565	17064

AISLAMIENTO P43 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



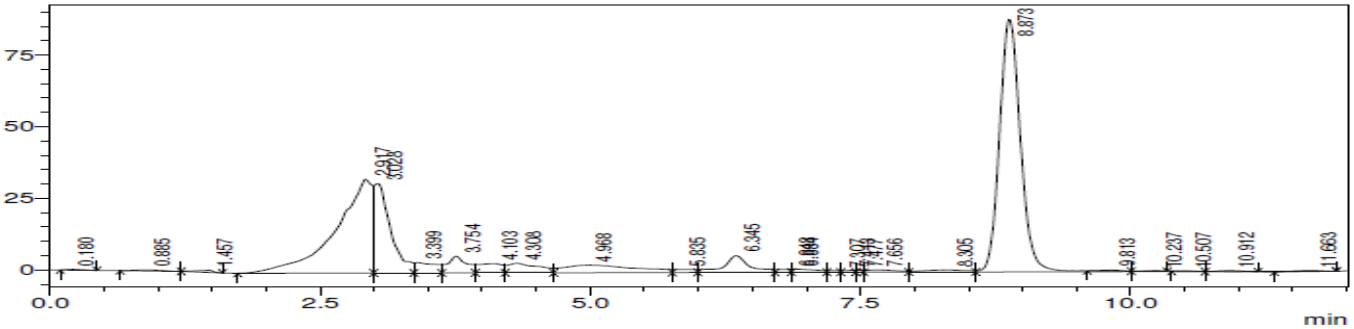
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	9,104	1,27511	Ch2 210nm	45738	1538

AISLAMIENTO P44 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



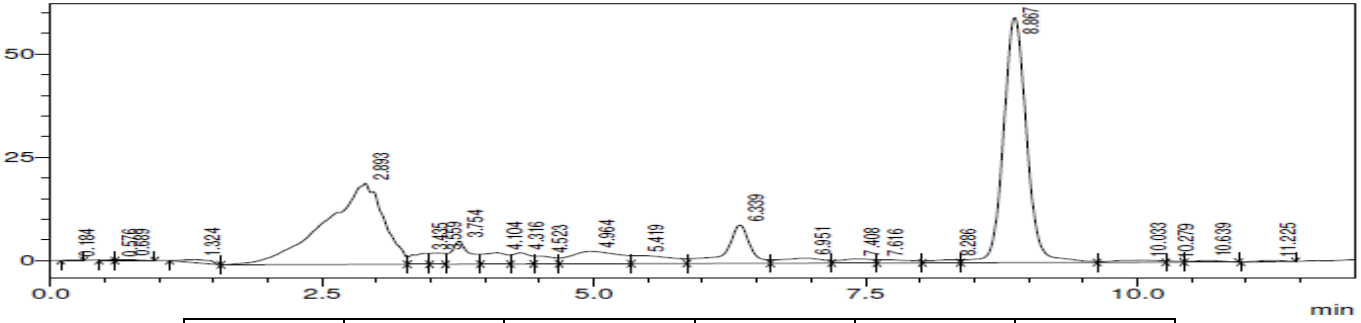
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,862	5,19685	Ch2 210nm	191390	17474

AISLAMIENTO P45 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



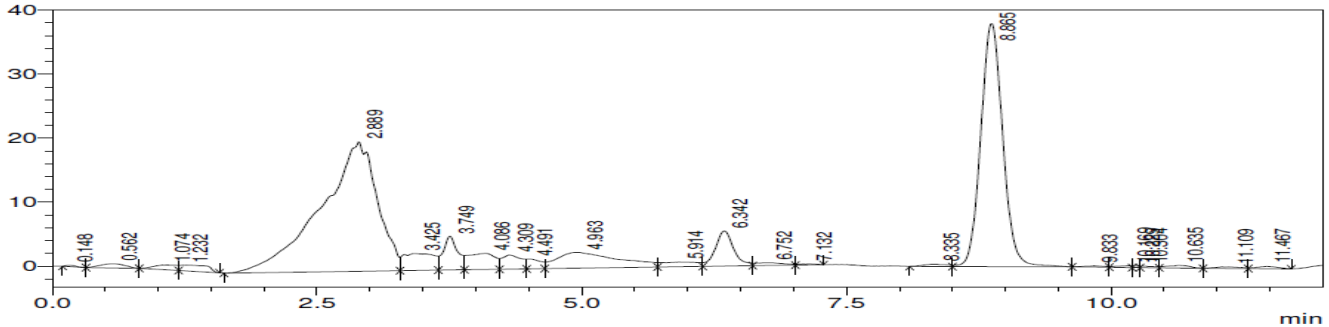
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,873	5,583451	Ch2 210nm	205748	19300

AISLAMIENTO P46 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



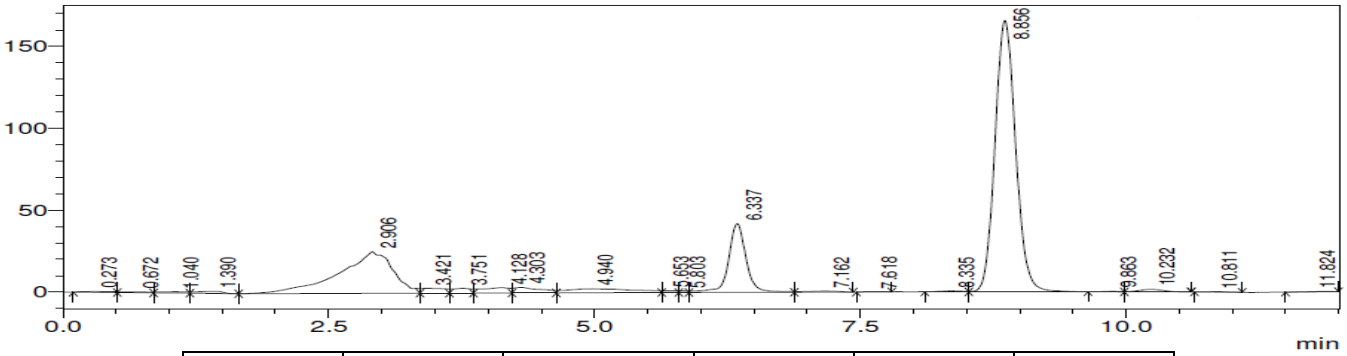
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,867	2,557	Ch2 210nm	66650	6200

AISLAMIENTO P47 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



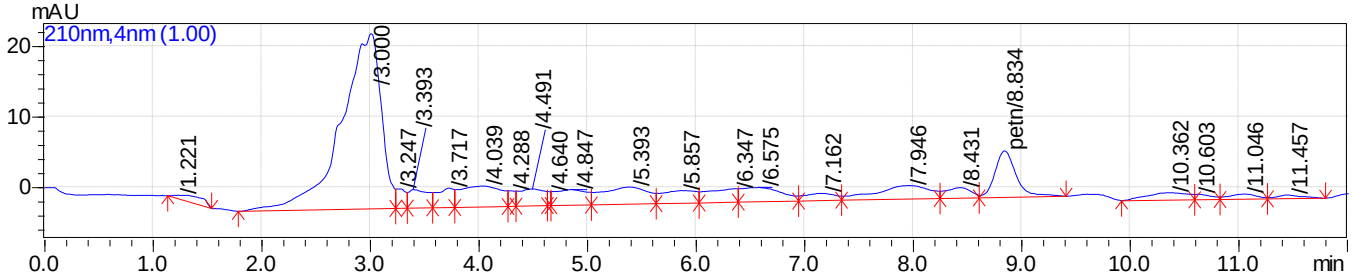
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,865	2,2100	Ch2 210nm	40814	3854

AISLAMIENTO P48 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



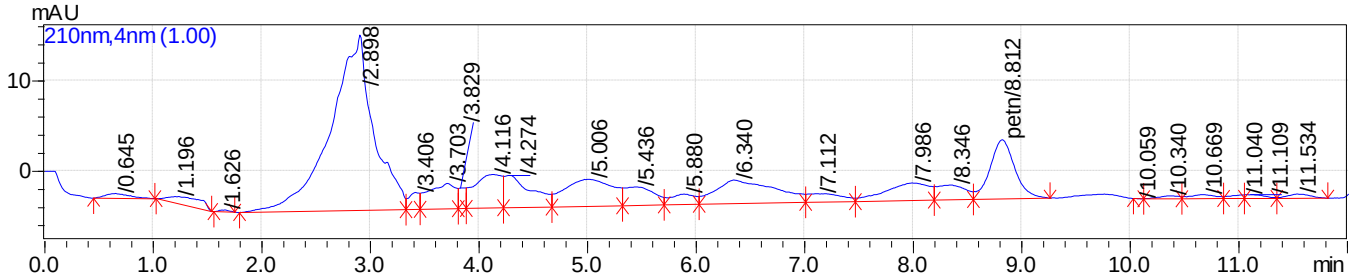
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,856	13,56156	Ch2 210nm	502597	51697

AISLAMIENTO P49 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



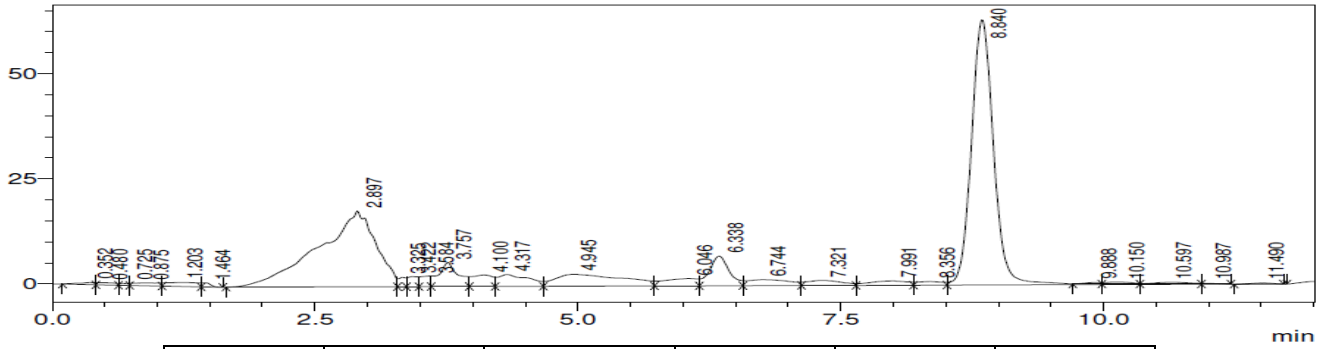
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,834	2,44435	Ch2 210nm	89163	6573

AISLAMIENTO P50 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



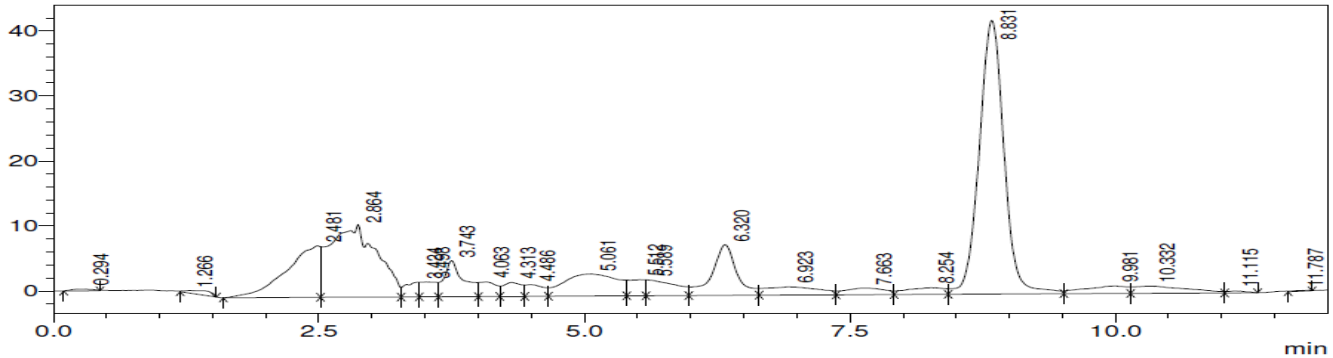
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,812	2,83701	Ch2 210nm	103747	6537

AISLAMIENTO P51 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



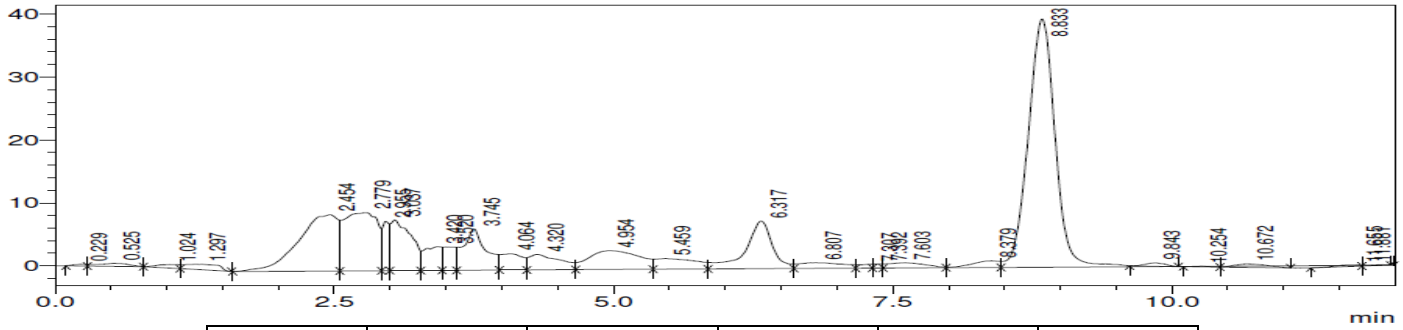
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,840	5,231347	Ch2 210nm	192671	16955

AISLAMIENTO P52 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



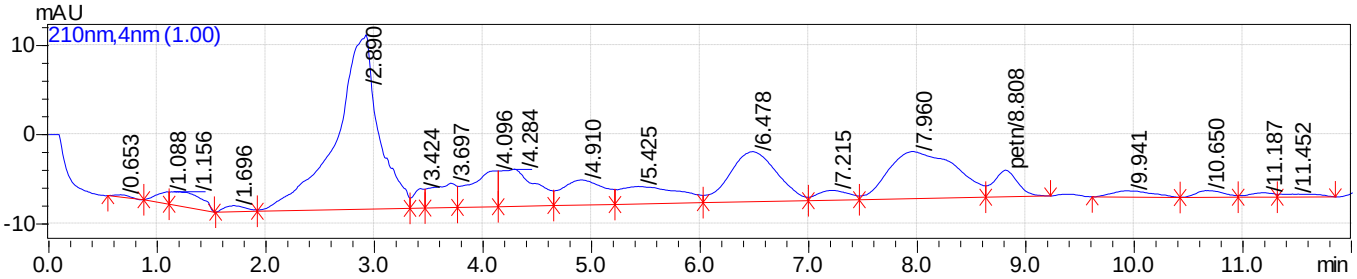
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,831	6,06073	Ch2 210nm	223474	15819

AISLAMIENTO P54 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



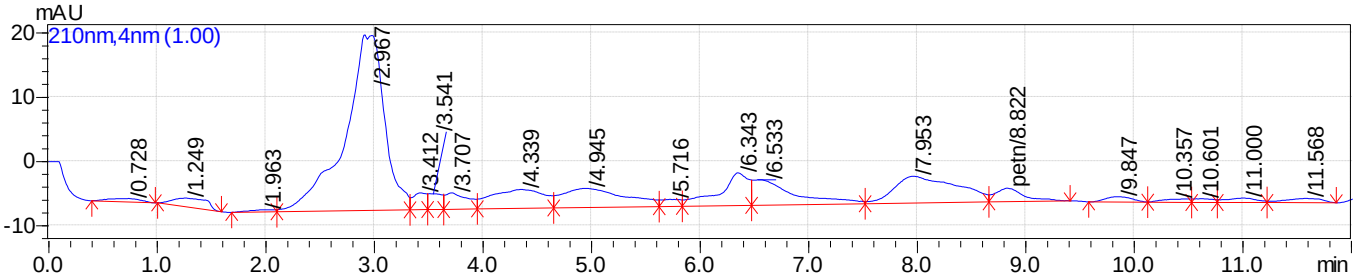
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,833	6,99811243	Ch2 210nm	258288	15514

AISLAMIENTO P55 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



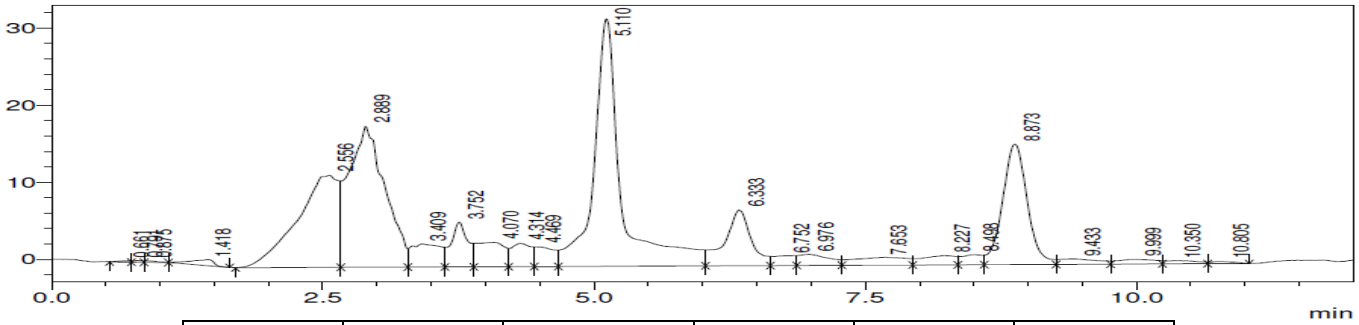
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,808	1,27501	Ch2 210nm	45735	3001

AISLAMIENTO P56– ABSORBANCIA VS TIEMPO



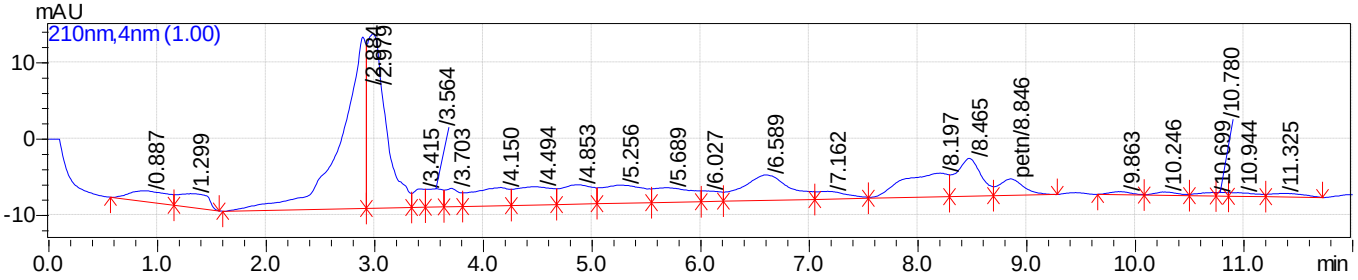
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,822	1,0813	Ch2 210nm	38540	2110

AISLAMIENTO P58 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



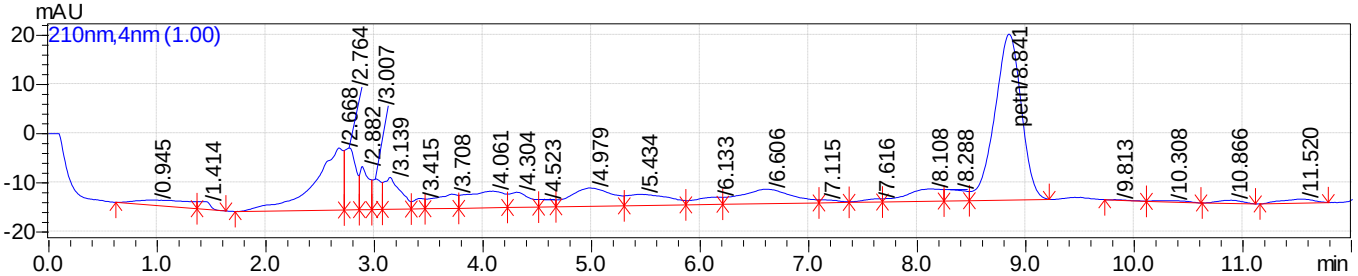
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,873	1,11099513	Ch2 210nm	2503	173

AISLAMIENTO P65 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



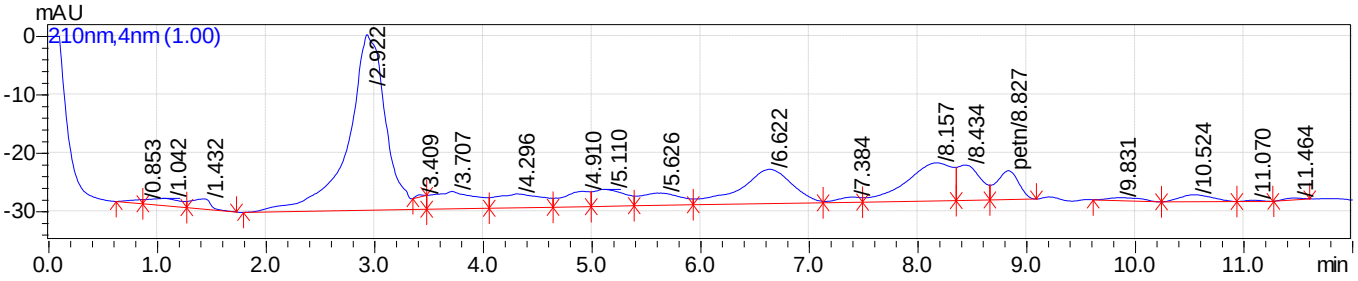
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,846	0,95733	Ch2 210nm	33936	2180

AISLAMIENTO P67 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



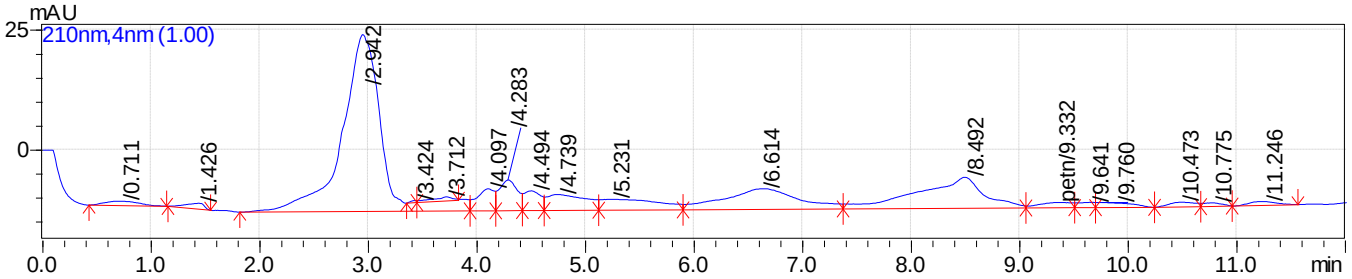
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,841	15,47917	Ch2 210nm	573272	33733

AISLAMIENTO P68 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



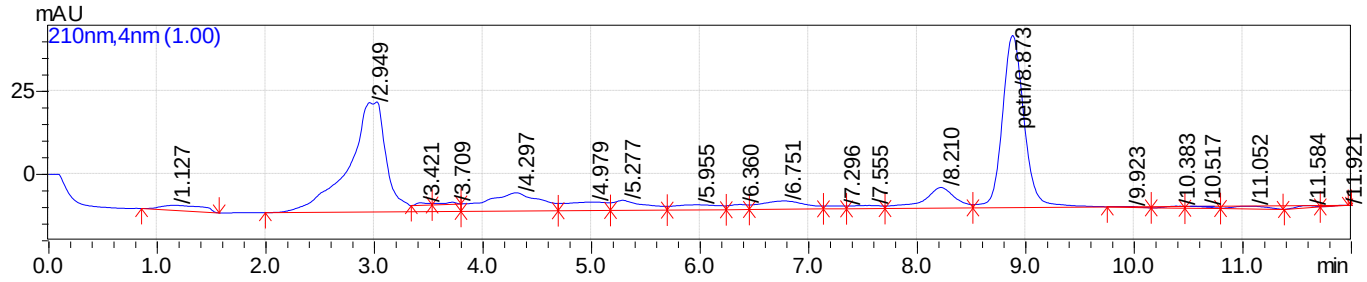
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,827	1,89702	Ch2 210nm	68836	4947

AISLAMIENTO P69 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



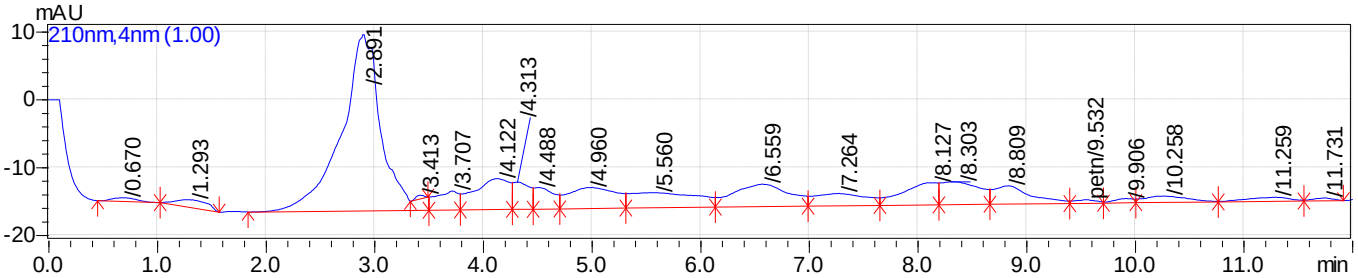
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	9,332	0,68536	Ch2 210nm	23835	1127

AISLAMIENTO P90 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



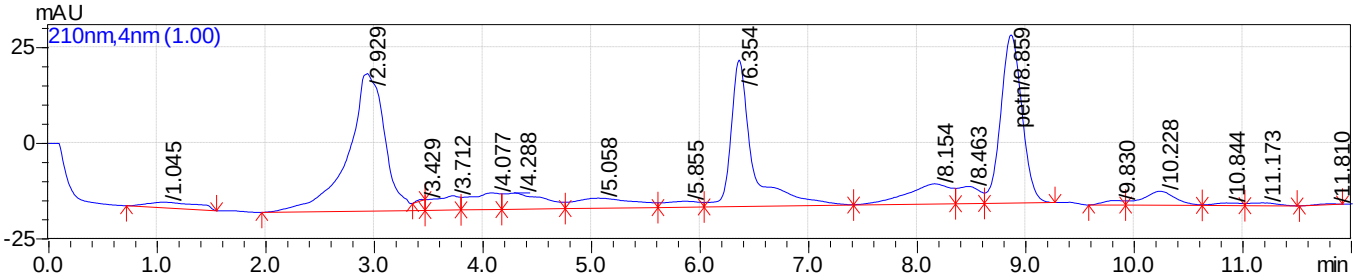
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,873	17,64614	Ch2 210nm	653752	51944

AISLAMIENTO P91 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



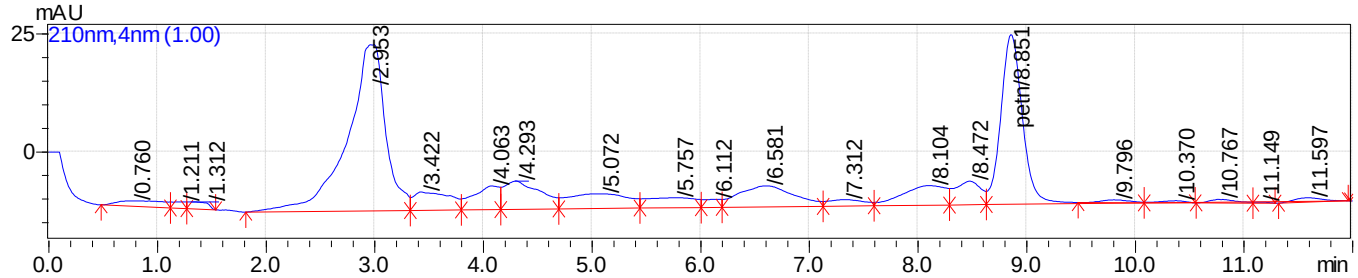
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,809	1,37958	Ch2 210nm	49618	2373

AISLAMIENTO P92 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



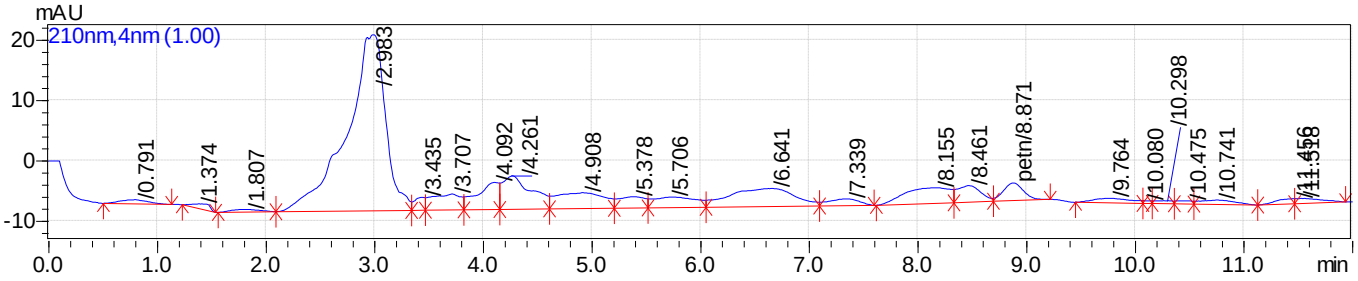
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,859	16,07439	Ch2 210nm	595378	43956

AISLAMIENTO P93 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



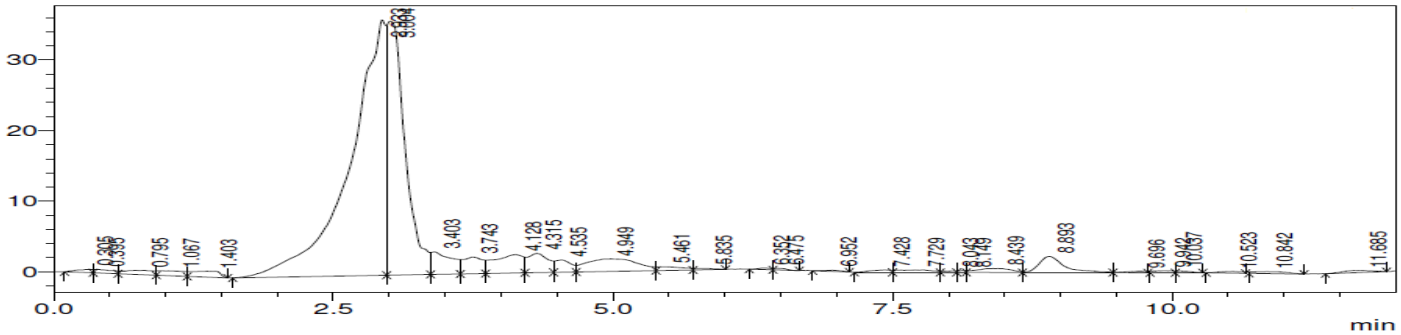
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,851	13,05599	Ch2 210nm	483276	35988

AISLAMIENTO P111 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



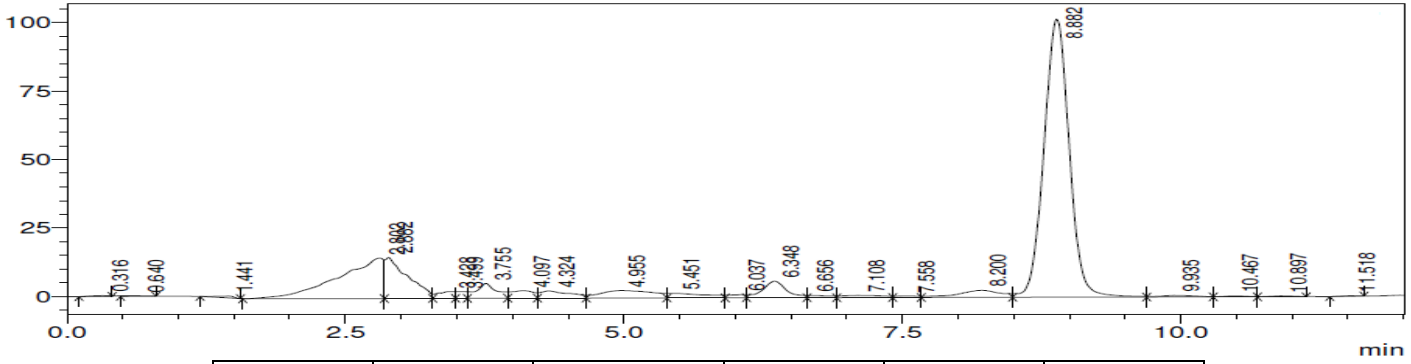
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,871	1,06892	Ch2 210nm	38081	2949

AISLAMIENTO P112 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



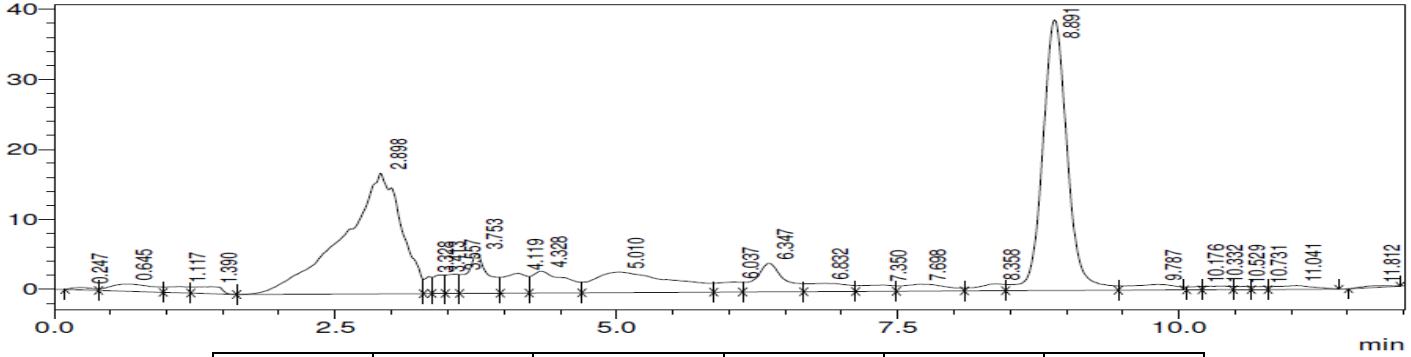
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,893	1,06892	Ch2 210nm	2515	202

AISLAMIENTO P113 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



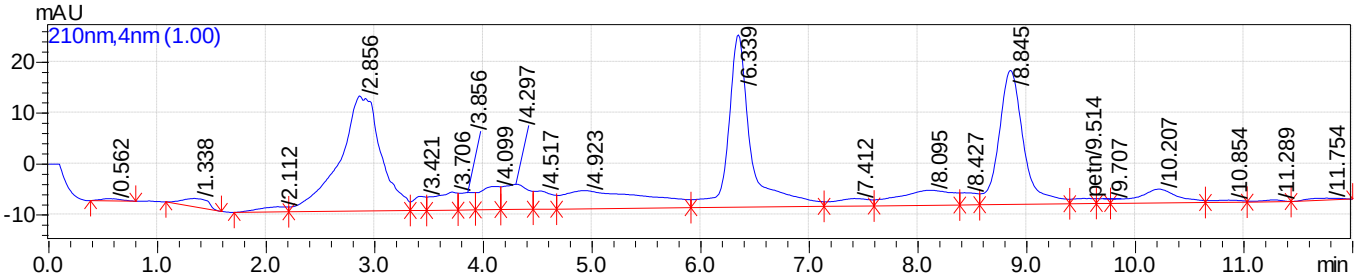
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,882	5,696457	Ch2 210nm	209495	19407

AISLAMIENTO P133 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



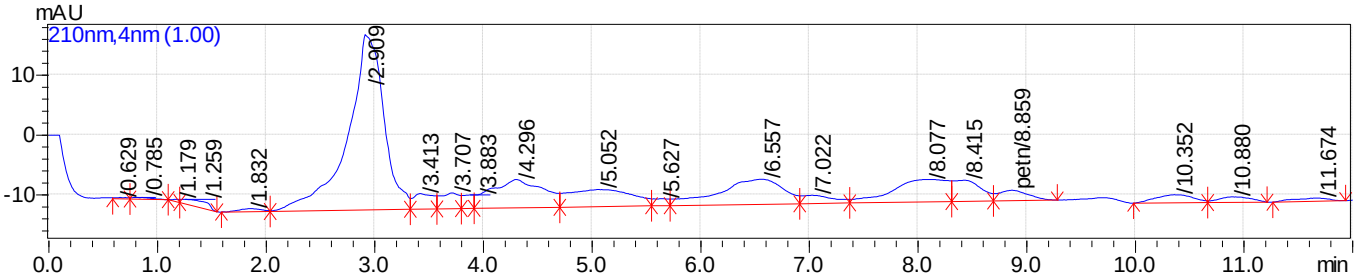
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,891	1,970	Ch2 210nm	22954	2141

AISLAMIENTO P155 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



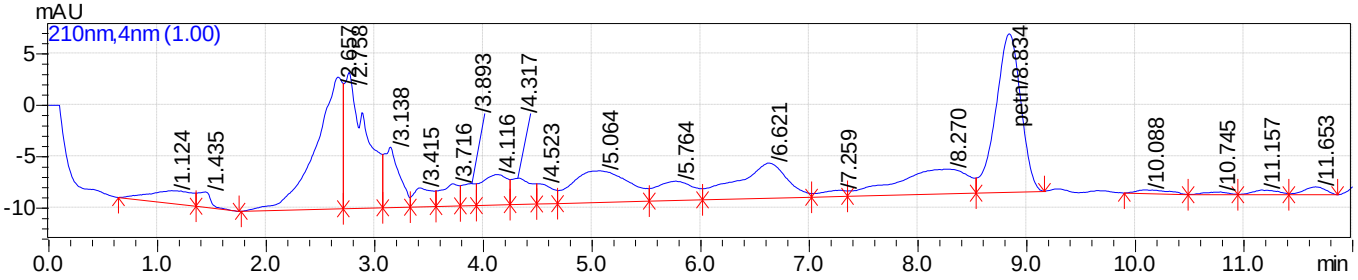
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	9,514	0,4348	Ch2 210nm	14530	1048

AISLAMIENTO P156 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



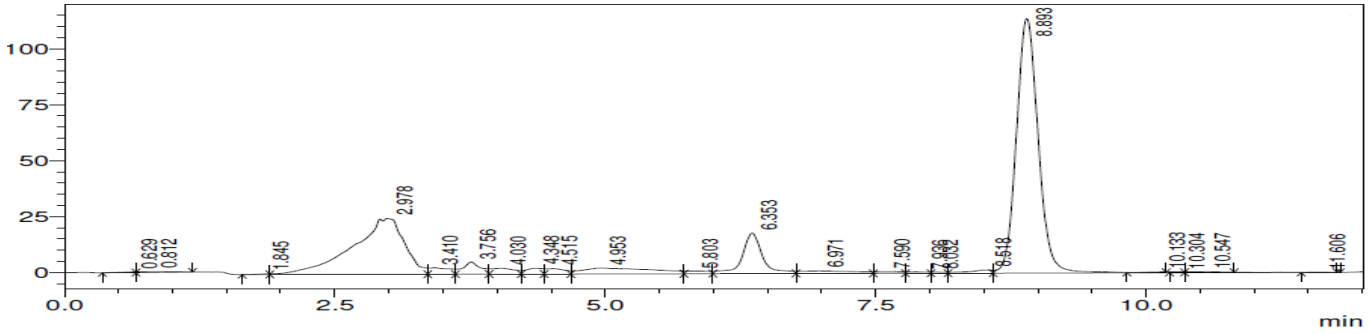
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,859	0,92578	Ch2 210nm	32764	1741

AISLAMIENTO P178 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



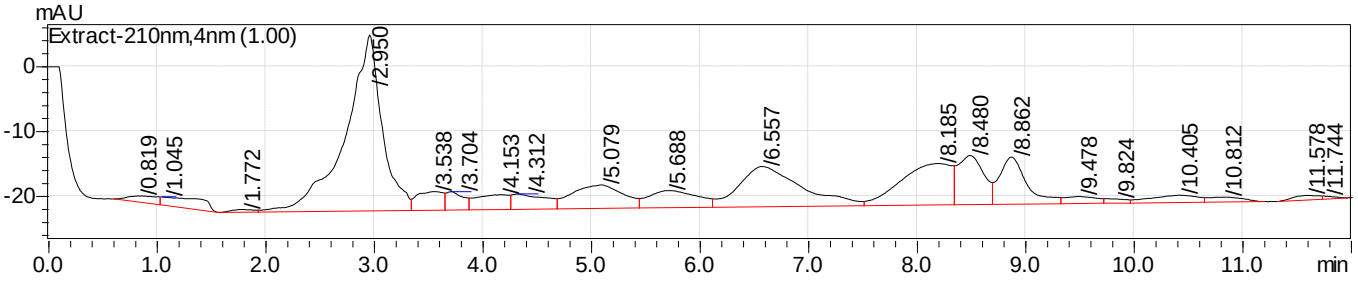
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,834	6,70207	Ch2 210nm	247294	15427

AISLAMIENTO P179 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



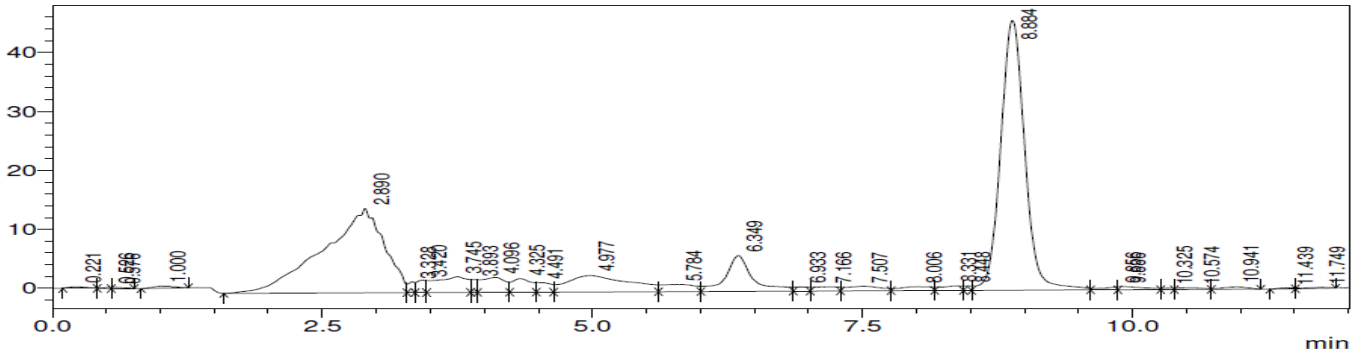
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,893	10,275016	Ch2 210nm	379971	35510

AISLAMIENTO P180 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



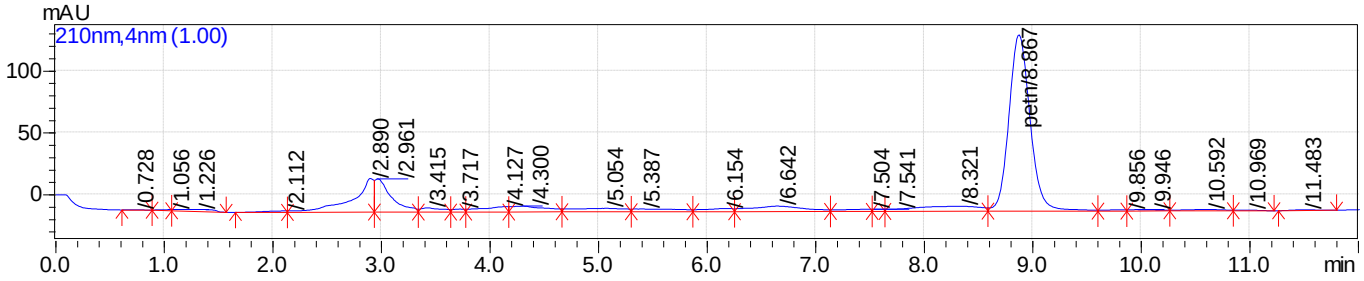
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,862	2,55409	Ch2 210nm	93239	6414

AISLAMIENTO P199 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



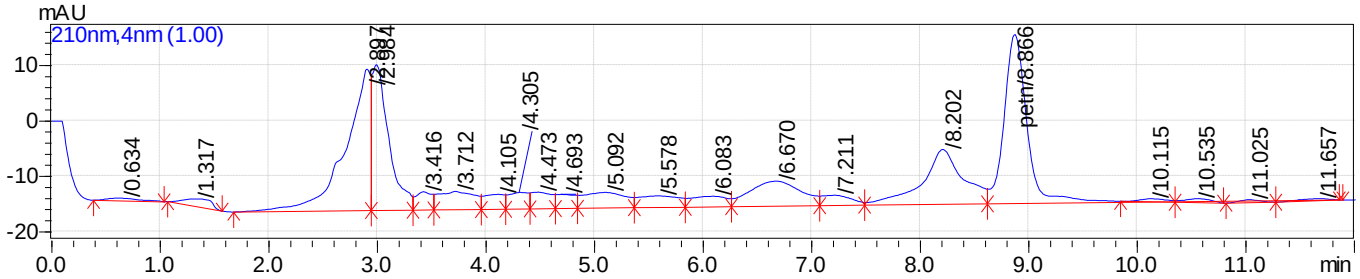
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,884	0,24287582	Ch2 210nm	7401	529

AISLAMIENTO P200 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



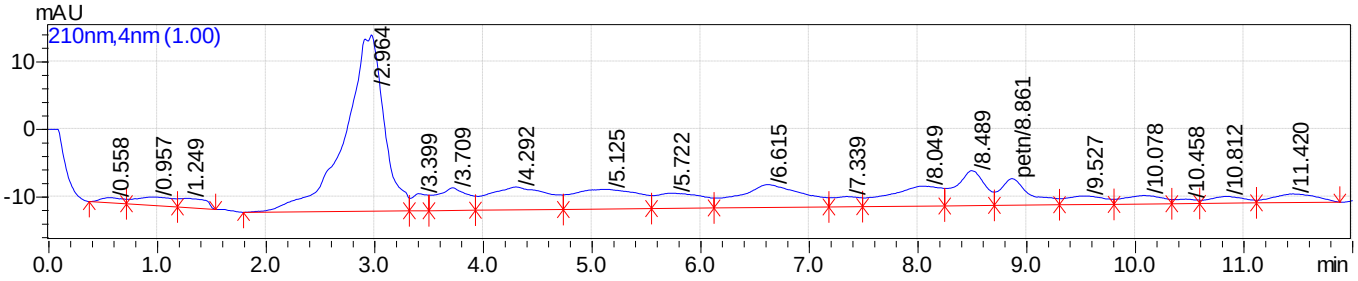
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,867	52,01884	Ch2 210nm	1930342	142500

AISLAMIENTO P201 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



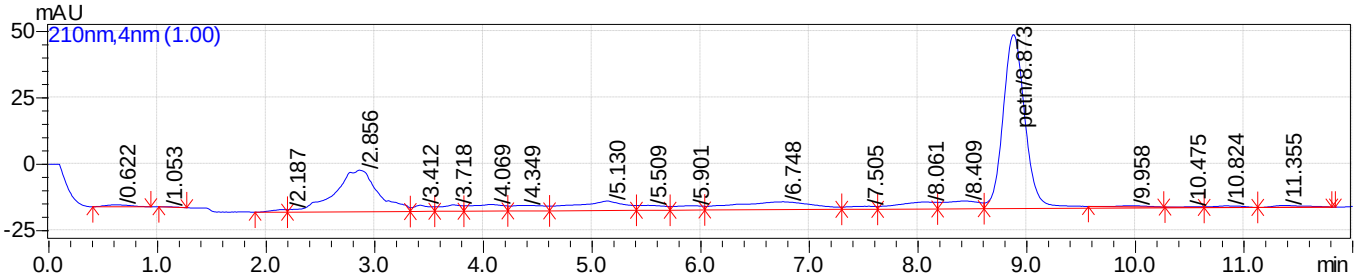
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,866	11,64821	Ch2 210nm	430991	30499

AISLAMIENTO P221 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



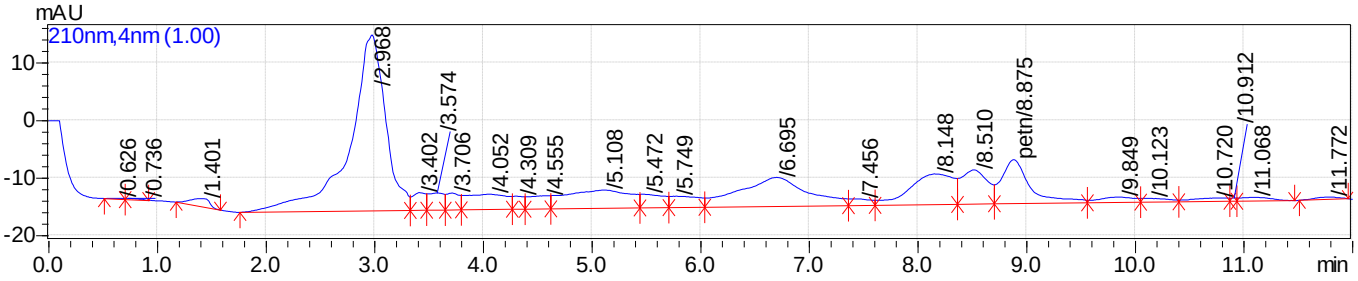
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,861	2,03519	Ch2 210nm	73967	3935

AISLAMIENTO P243 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,873	25,70948	Ch2 210nm	953222	65549

AISLAMIENTO P244 – ABSORBANCIA VS TIEMPO



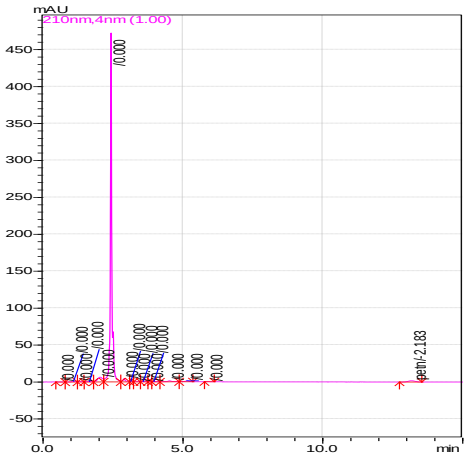
	Tiempo de retención (min)	Concentración (ppm)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	8,875	3,76896	Ch2 210nm	138359	7633

ANEXO 8

Aislamiento P1 resultados de los 5 días del bioensayo:

Replica 1

- Día 1


mAU
210nm,4nm (1.00)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
0.0
5.0
10.0
min
/0.000
0.000
0.000

$$y = 2.310315^{-05}(29092) + 8.706775$$

$$y = 9{,}37889 mg/l \times 2$$

$$y = 18{,}757 \frac{mg}{l}$$

- Día 3

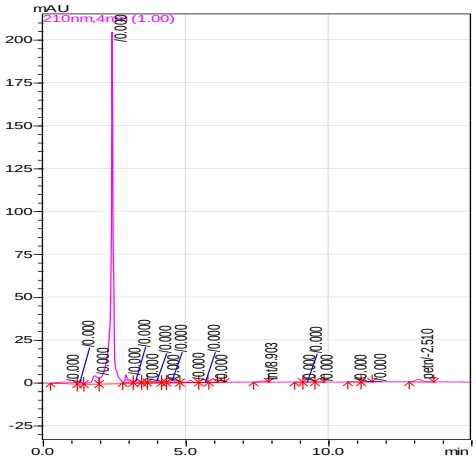


Tabla 3. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P1- Día3- Replica 1.

Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
13,134	17,54	Ch2 210nm	28006	1517

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

$$y = 2.310315^{-05}(28006) + 8.706775$$

$$y = 8.7713 mg/l \times 2$$

$$y = 17{,}54 \frac{mg}{l}$$

- Día 4

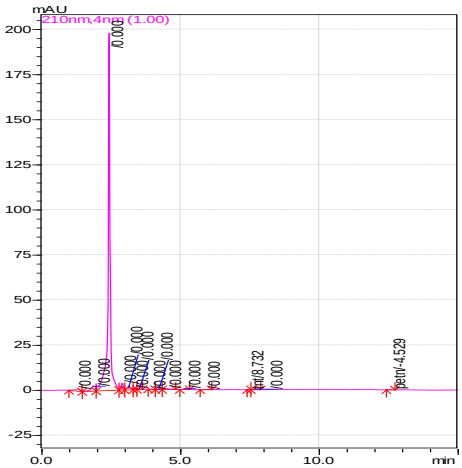


Tabla 4. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P1- Día4- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	12,585	17,469	Ch2 210nm	1202	111

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

$$y = 2.310315^{-05}(202) + 8.706775$$

$$y = 8.734544 mg/l \times 2$$

$$y = 17,469 \frac{mg}{l}$$

-Día 5

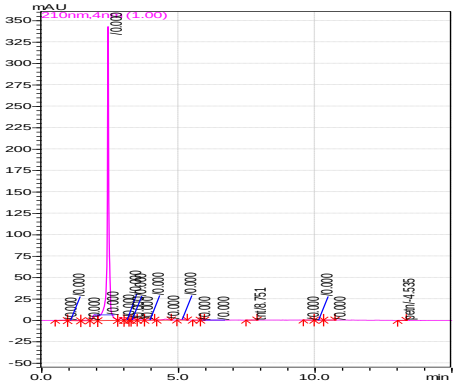


Tabla 5. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P1- Día5- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,127	17,465	Ch2 210nm	1131	104

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

$$y = 2.310315^{-05}(131) + 8.706775$$

$$y = 8.7328 \times 2\, mg/l$$

$$y = 17,465 \frac{mg}{l}$$

Replica 2

Tabla 6. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P1- Replica 2.

Día	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
1	13,126	19,349	Ch2 210nm	41842	2326
2	13,139	18,788	Ch2 210nm	29761	1681
3	13,126	18,554	Ch2 210nm	24683	1399
4	13,082	17,585	Ch2 210nm	3704	273
5	-	0	Ch2 210nm	0	0

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Replica 3

Tabla 7. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P1- Replica 3.

Día	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
1	13,133	19,115	Ch2 210nm	36845	2194
2	13,147	18,642	Ch2 210nm	26588	1467
3	13,111	18,636	Ch2 210nm	26467	1406
4	13,095	17,613	Ch2 210nm	4317	273
5	-	0	Ch2 210nm	0	0

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Aislamiento P23 resultados de los 5 días del bioensayo:

Replica 1

- Día 1

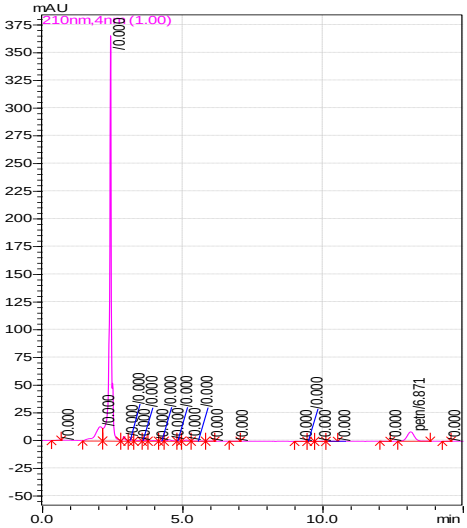


Tabla 8. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P23- Día1- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,12	24,461	Ch2 210nm	152522	8468

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 2

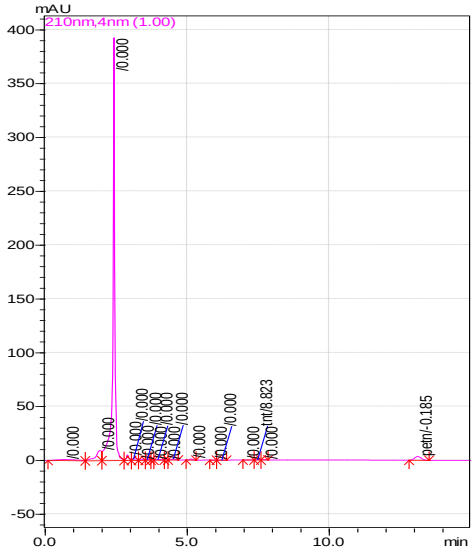


Tabla 9. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P23- Día2- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,111	20,133	Ch2 210nm	58867	3481

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 3

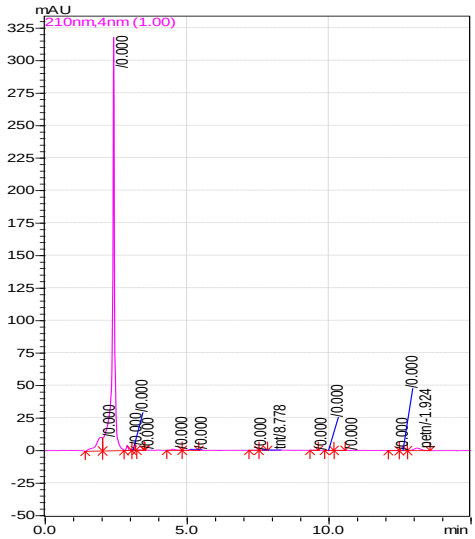


Tabla 10. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P23- Día3- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,092	19,066	Ch2 210nm	35783	1989

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 4

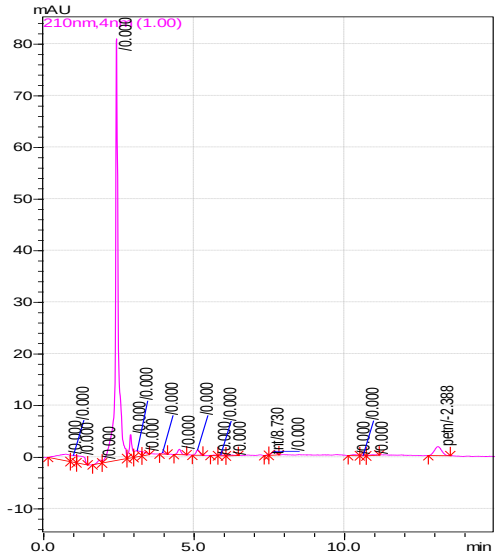


Tabla 11. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P23- Día4- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,097	18,782	Ch2 210nm	29625	1764

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 5

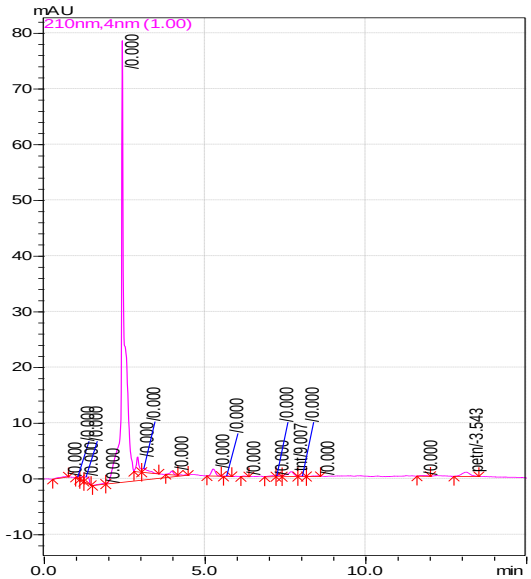


Tabla 12. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P23- Día5- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,125	17,469	Ch2 210nm	14295	762

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Los cromatogramas anteriores del aislamiento P23, muestran el pico de concentración del sustrato para cada día en un tiempo de retención entre 10 y 12 minutos. Los datos del área obtenidos de cada lectura son reemplazados en la ecuación de la curva de calibración para obtener el resultado de la concertación del sustrato correspondiente.

Replica 2

Tabla 13. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P23- Replica 2.

Día	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
1	13,109	19,224	Ch2 210nm	39144	2174
2	13,103	19,082	Ch2 210nm	36112	2077
3	13,102	18,790	Ch2 210nm	29798	1812
4	13,1	18,607	Ch2 210nm	25836	1435
5	12,994	18,181	Ch2 210nm	16627	913

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Replica 3

Tabla 14. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P23- Replica 3.

Día	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
1	13,109	27,679	Ch2 210nm	222183	12672
2	13,079	18,755	Ch2 210nm	29033	1536
3	13,076	18,748	Ch2 210nm	28885	1683
4	13,064	18,657	Ch2 210nm	26929	1453
5	13,065	18,217	Ch2 210nm	17392	1063

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Aislamiento P26 resultados de los 5 días del bioensayo:

<u>Replica 1</u>

- Día 1

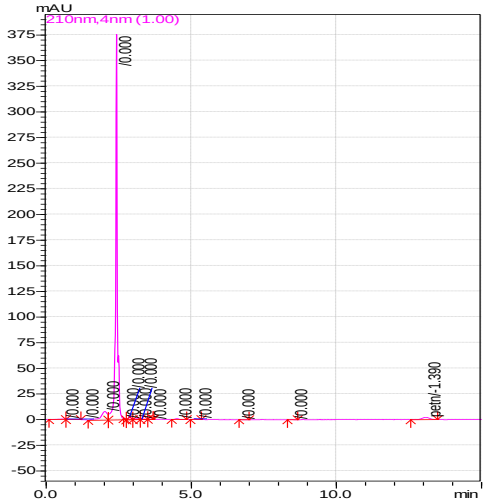


Tabla 15. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P26- Día1- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,078	19,394	Ch2 210nm	42873	231

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 2

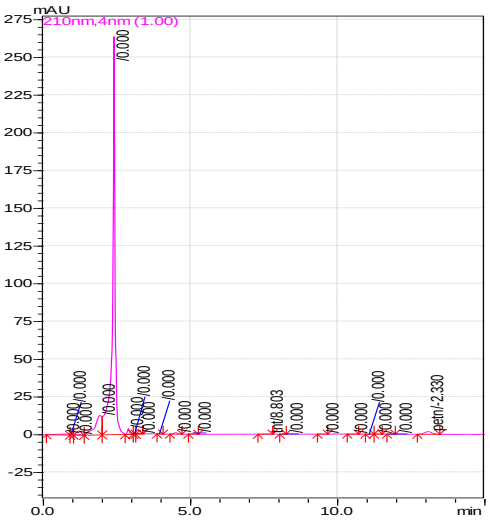


Tabla 16. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P26- Día2- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,078	18,818	Ch2 210nm	30397	1741

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 3

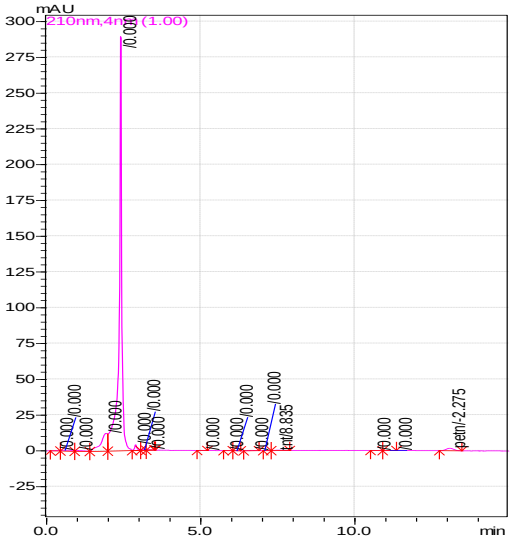


Tabla 17. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P26- Día3- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,071	18,851	Ch2 210nm	31131	1784

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 4

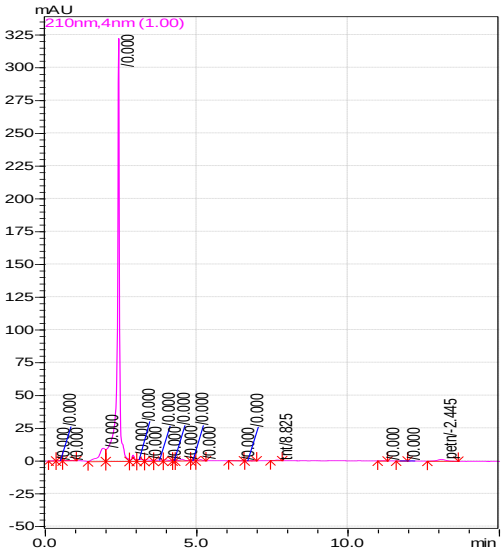


Tabla 18. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P26- Día4- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,074	18,7476	Ch2 210nm	28872	1416

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 5

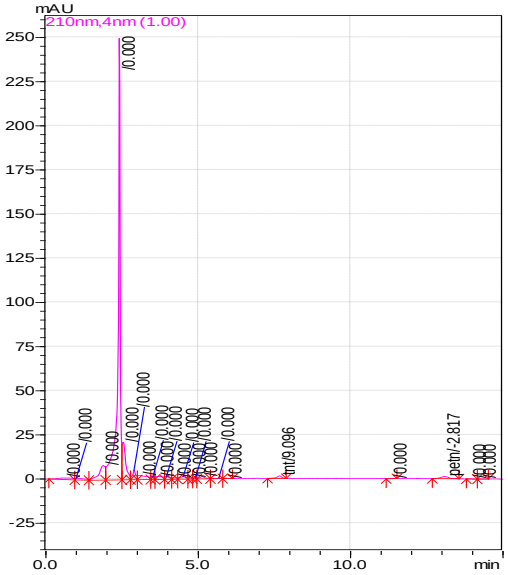


Tabla 19. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P26- Día5- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,07	18,518	Ch2 210nm	23924	1296

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Los cromatogramas anteriores del aislamiento P26, muestran el pico de concentración del sustrato para cada día en un tiempo de retención entre 10 y 12 minutos.

<u>Replica 2</u>

Tabla 20. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P26- Replica 2.

Día	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
1	13,084	24,677	Ch2 210nm	375944	20673
2	13,077	20,687	Ch2 210nm	70861	3865
3	13,064	18,500	Ch2 210nm	23530	1278
4	13,065	18,213	Ch2 210nm	17319	868
5	13,043	18,033	Ch2 210nm	13426	780

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Replica 3

Tabla 21. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P26- Replica 3.

Día	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
1	13,081	24,677	Ch2 210nm	157203	8758
2	13,061	18,792	Ch2 210nm	29852	1503
3	13,069	19,228	Ch2 210nm	39284	2236
4	13,082	18,581	Ch2 210nm	25267	1283
5	13,074	18,509	Ch2 210nm	23680	1218

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Aislamiento P37 resultados de los 5 días del bioensayo:

Replica 1

- Día 1

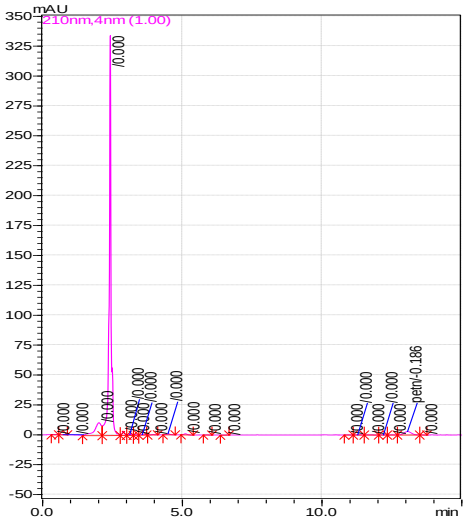


Tabla 22. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P37- Día1- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,058	20,132	Ch2 210nm	58852	3030

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 2

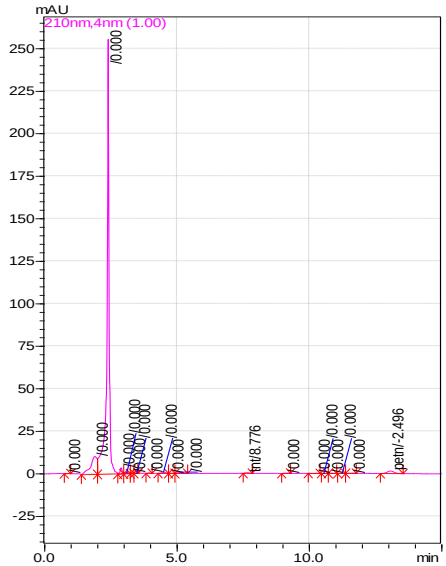


Tabla 23. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P37- Día2- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,052	17,413	Ch2 210nm	28192	1521

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 3

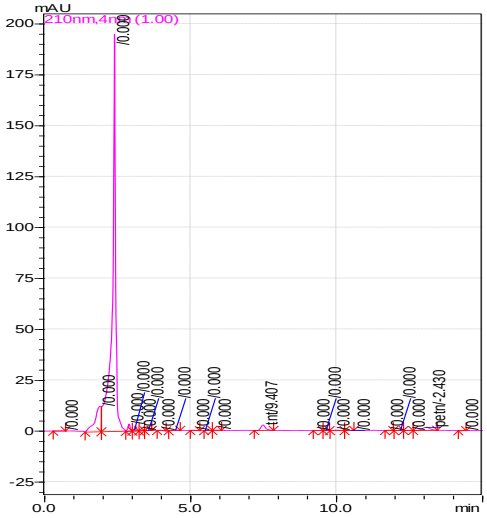


Tabla 24. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P37- Día3- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,053	18,756	Ch2 210nm	29069	1514

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 4

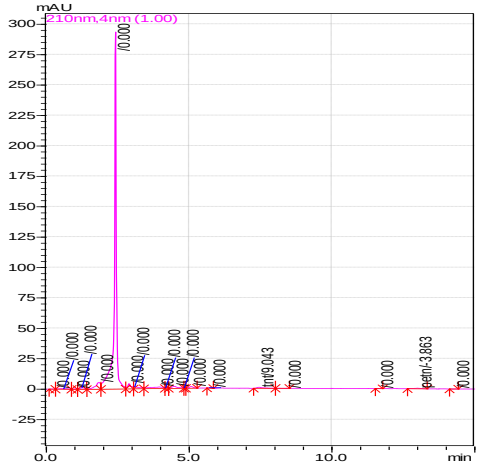


Tabla 25. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P37- Día4- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	12,979	17,877	Ch2 210nm	10050	514

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 5

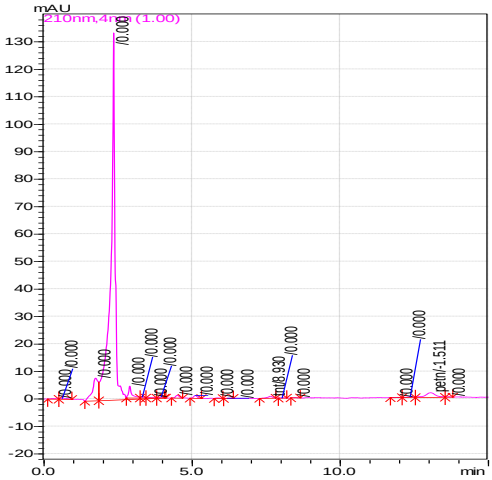


Tabla 26. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P37- Día5- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,042	19,320	Ch2 210nm	41261	1693

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Los cromatogramas anteriores del aislamiento P37, muestran el pico de concentración del sustrato para cada día en un tiempo de retención entre 10 y 12 minutos.

Replica 2

Tabla 27. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P37- Replica 2.

Día	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
1	13,063	23,788	Ch2 210nm	51399	2778
2	13,06	18,503	Ch2 210nm	23578	1303
3	13,099	18,705	Ch2 210nm	27951	1439
4	13,065	18,860	Ch2 210nm	31309	1648
5	-	0	Ch2 210nm	0	0

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Replica 3

Tabla 28. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P37- Replica 3.

Día	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
1	13,07	24,290	Ch2 210nm	148822	8039
2	13,081	18,610	Ch2 210nm	25912	1366
3	13,089	18,675	Ch2 210nm	27320	1360
4	13,084	18,581	Ch2 210nm	31408	1681
5	13,068	17,699	Ch2 210nm	6196	398

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Aislamiento P38 resultados de los 5 días del bioensayo:

<u>Replica 1</u>

- Día 1

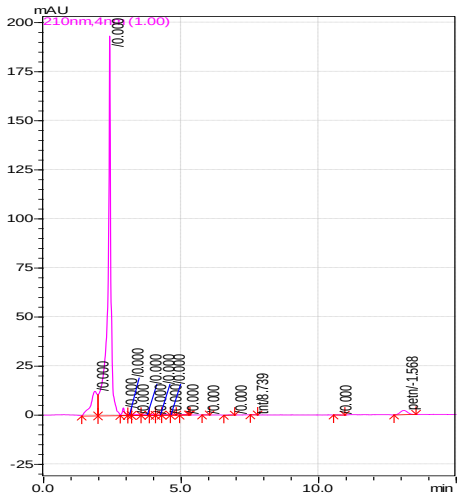


Tabla 29. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P38- Día1- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,092	19,285	Ch2 210nm	40512	2199

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 2

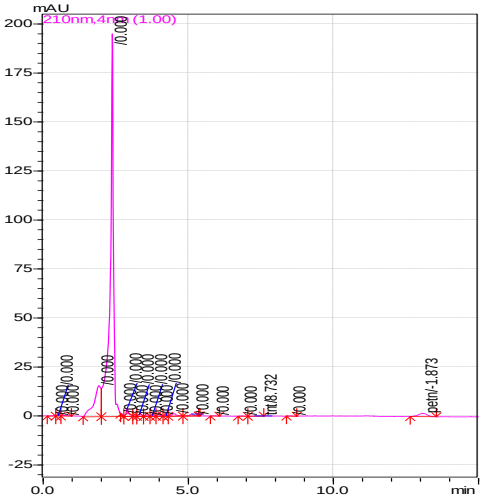


Tabla 30. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P38- Día2- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,074	19,098	Ch2 210nm	36460	1699

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 3

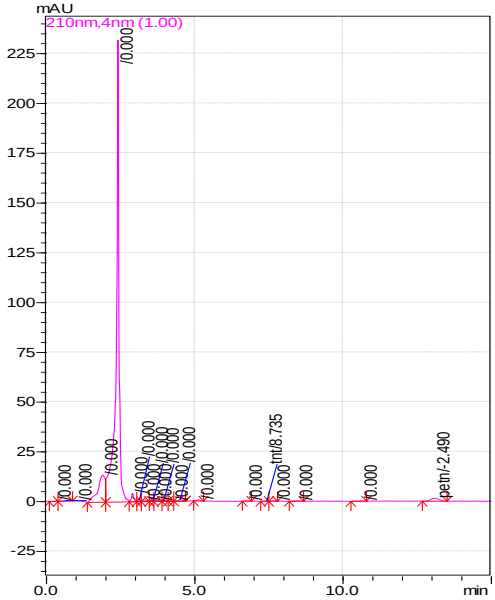


Tabla 31. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P38- Día3- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,081	18,719	Ch2 210nm	28265	1485

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

- Día 4

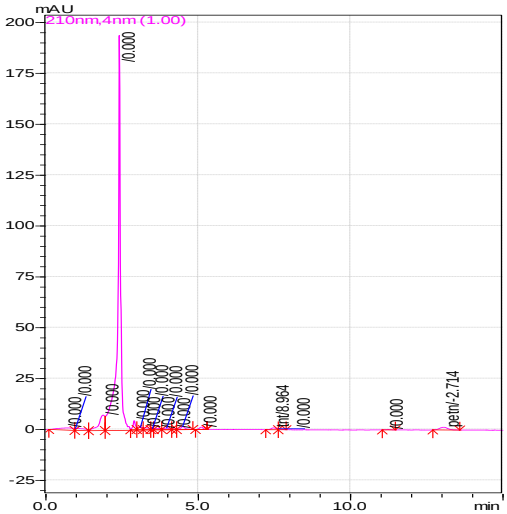


Tabla 32. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P38- Día4- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,052	18,582	Ch2 210nm	25298	1342

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

-Día 5

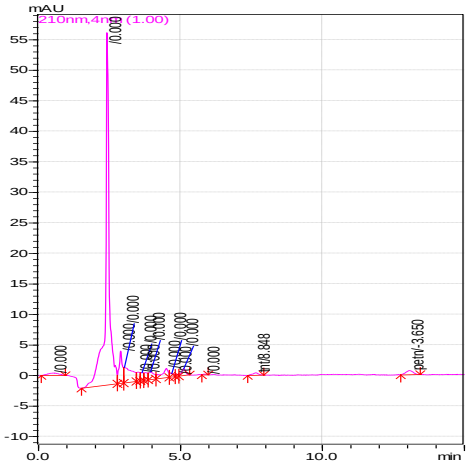


Tabla 33. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P38- Día5- Replica 1.

	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
PETN	13,044	18,008	Ch2 210nm	12868	691

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Los cromatogramas anteriores del aislamiento P38, muestran el pico de concentración del sustrato para cada día en un tiempo de retención entre 10 y 12 minutos.

Replica 2

Tabla 34. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P38- Replica 2.

Día	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
1	13,088	28,537	Ch2 210nm	240756	12564
2	13,062	18,583	Ch2 210nm	25324	1331
3	13,062	18,583	Ch2 210nm	25324	1331
4	13,073	18,583	Ch2 210nm	25323	1300
5	13,061	17,903	Ch2 210nm	10601	558

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

Replica 3

Tabla 35. Resultados de la lectura en HPLC aislamiento P38- Replica 3.

Día	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/l)	Longitud de onda	Área	Altura
1	13,081	21,226	Ch2 210nm	82526	4139
2	13,074	19,326	Ch2 210nm	41395	2235
3	13,076	18,690	Ch2 210nm	27638	1487
4	13,071	18,393	Ch2 210nm	21198	1140
5	13,071	18,393	Ch2 210nm	21198	1140

Fuente: Las Autoras referencia equipo HPLC, Universidad Javeriana, 2010.

ANEXO 9

<table>
<tr><td colspan="3">PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO FUENTE DE CARBONO – NITRÓGENO</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="3">Grupo de Investigación Biorremediación de Explosivos</td><td>Fecha: Abril 2009.</td></tr>
<tr><td>Lugar</td><td colspan="3">Laboratorio Universidad de la Salle</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Responsables</td><td colspan="2">Sandra Milena Carvajal</td><td>Cod. 41041071</td></tr>
<tr><td colspan="2">Yohana Herrera Castillo</td><td>Cod. 41042037</td></tr>
<tr><td rowspan="8">Materiales y métodos</td><td rowspan="7">Soluciones stock</td><td colspan="2">Buffer</td></tr>
<tr><td colspan="2">Sales</td></tr>
<tr><td colspan="2">Carbono</td></tr>
<tr><td colspan="2">Trazas</td></tr>
<tr><td colspan="2">Vitaminas</td></tr>
<tr><td colspan="2">Hierro</td></tr>
<tr><td colspan="2">Explosivo PETN</td></tr>
<tr><td colspan="3">Herlenmeyer y/o frascos tapa azul
Agar - Agar
Cajas de petri con su respectiva nomenclatura
Pipetas estériles
Pipeteador
Espátula
Vidrio reloj
Balanza analítica
Estufa
Autoclave
Agua destilada</td></tr>
<tr><td>Procedimiento</td><td colspan="3">Preparación para 1000 ml

1. Limpiar la cabina de flujo laminar con etanol (apagada), luego encender las luz UV durante 15 min, trabajar con luz blanca en la cabina.
2. Lavar y esterilizar pipetas para no contaminar las soluciones.
3. En 1 frasco tapa azul y pipeta estéril agregar:
• Solución búfer 10ml
• Solución sales 10ml
• Según el caso Solución de Carbono o Nitrógeno
4. Se pesa 15 gr de agar – agar, se agrega en el frasco y se lleva a 1000ml con agua destilada
5. Se calienta en la estufa después de que el medio llegue al punto de ebullición mezclar constantemente.
6. Posteriormente se esteriliza en la autoclave 1 hora.
7. Después adicionar al medio 1ml de vitaminas, 1 ml de trazas, 1 ml de hierro y 2,5 ml del explosivo.
8. Por ultimo se sirve en las cajas de petri.</td></tr>
</table>

PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES STOCK	
Grupo de Investigación Biorremediación de Explosivos	Fecha: Abril 2009.

Lugar	Laboratorio Universidad de la Salle	
Responsables	Sandra Milena Carvajal	Cod. 41041071
	Yohana Herrera Castillo	Cod. 41042037
Materiales y reactivos	Frascos tapa azul (500ml) Vidrio reloj Espátula Reactivos para cada solución	

Procedimiento

Solución stock sales

1. Adicionar a un frasco tapa rosca:

Reactivo	Cantidad
HCL (1M)	3ml
NaCl (8,5Mm)	12,5gr
$MgSO_4$ ($7H_2O$ 0,81mM)	5gr
$CaCl_2$($2H_2O$ 0,27mM)	1gr

2. Llenar el frasco hasta 250ml con agua destilada
3. Esterilizar en autoclave.

Solución stock buffer

1. Adicionar a un frasco tapa rosca:

Reactivo	Cantidad
K_2HPO_4 (4,02 Mm)	17,5gr
$K_2H_2PO_4$ (2,2Mm)	7,5gr

2. Llenar el frasco hasta 250ml con agua destilada
3. Esterilizar en autoclave.

Solución stock Nitrógeno

1. Adicionar a un frasco tapa rosca:

Reactivo	Cantidad
NH_4NO_3	1gr

2. Llenar el frasco hasta 250ml con agua destilada
3. Esterilizar en autoclave.

Solución stock Carbono

1. Adicionar a un frasco tapa rosca:

Reactivo	Cantidad

$C_6H_{12}O_6$	5gr
$C_3H_8O_3$	2ml
$C_2H_4O_2$	2,5gr

2. Llenar el frasco hasta 100ml con agua destilada
3. Esterilizar en autoclave.

Solución stock Hierro

1. Adicionar a un frasco tapa rosca:

Reactivo	Cantidad
HCl (1M)	3ml
$FeSO_4$ $7H_2O$ (10,8mm)	0,36gr

2. Llenar el frasco hasta 100ml con agua destilada
3. Esterilizar en autoclave.

Solución stock vitaminas

1. Adicionar a un frasco tapa rosca:

Reactivo	Cantidad
Piridoxina HCl	0,05gr
P- acido Aminobenzoico	0,025gr
Acido nicótico	0,025gr
Calcium pantothenale	0.025gr
Riboflavina	0,025gr
Vitamina B12	0,025gr
Tiamina HCl	0,025gr
Biotina	0,01gr
Acido fólico	0,01gr
Acido lipótico	0,01gr

2. Llenar el frasco hasta 800ml con agua destilada
3. Esterilizar en autoclave.

<table>
<tr><td colspan="2">PROTOCOLO PARA LA SIEMBRA DE MUESTRAS Y PREPARACION SOLUCIÓN SALINA</td><td></td></tr>
<tr><td colspan="2">Grupo de Investigación Biorremediación de Explosivos</td><td>Fecha: Abril 2009.</td></tr>
<tr><td>Lugar</td><td colspan="2">Laboratorio Universidad de la Salle</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Responsables</td><td>Sandra Milena Carvajal</td><td>Cod. 41041071</td></tr>
<tr><td>Yohana Herrera Castillo</td><td>Cod. 41042037</td></tr>
<tr><td>Materiales y reactivos</td><td colspan="2">Medio sólido servido en cajas de petri (fuente N, C y solo explosivo)
Tubos de ensayo
NaCl
Agua destilada
Micropipetas
Puntas para micropipeta estériles
Mecheros</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Procedimiento</td><td colspan="2">Preparación solución salina

1. Adicionar 0,36gr de NaCl en un frasco tapa rosca
2. Llenar hasta 100ml con agua destilada
3. Dispensar 10ml en cada tubo de ensayo a utilizar
4. Esterilizar en autoclave 1 hora.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Siembra de muestras

1. Organizar los medios de cultivo y sus correspondientes soluciones.
2. Realizar diluciones en base 10, adicionando 0,5ml de cada muestra del pre-enriquecimiento en 1 tubo con solución salina (corresponde a la dilución 10^{-2})
3. Luego adicionar 0,5ml de la dilución anterior en otro tubo con solución salina (corresponde a la dilución $10^{-3,}$) siguiendo hasta la dilución $10^{-6.}$
4. seleccionar las diluciones de 10^{-3} a 10^{-6}
5. Sembrar las anteriores diluciones en cajas de petri
6. adicionar utilizando la micropipeta 0,5 microlitros en los medios de cultivo y esparcir uniformemente el liquido.

Nota: La dilución 10^{-3} al momento de realizar la siembra correspondería a una dilución de 10^{-4}.</td></tr>
</table>