

Artículo de investigación

# Criterios de monitoreo ambiental empleado para la biorremediación de suelos contaminados por químicos explosivos

Richard Gutierrez

Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Sede Orellana; El Coca Ec220001, Ecuador

Correspondencia: [richard.gutierrez@esPOCH.edu.com](mailto:richard.gutierrez@esPOCH.edu.com);

**Recibido:** 03 septiembre 2019; **Aceptado:** 06 octubre 2019; **Publicado:** 13 octubre 2019

DOI/URL: <https://www.greenworldjournal.com/doi-010-rg-2019>



**Resumen:** La biorremediación es una tecnología respetuosa con el medio ambiente porque utiliza los propios microbios de la naturaleza para degradar los contaminantes de interés. Se ha llevado a cabo una amplia investigación sobre esta tecnología de eliminación de residuos para degradar los contaminantes explosivos. Esta investigación describe los métodos de monitoreo ambiental utilizados en la biorremediación de suelos contaminados por explosivos. Factores biogeoquímicos destacados, a saber, la presencia y la viabilidad de microorganismos, la biodisponibilidad de contaminantes, el pH, la temperatura, el contenido de humedad, las condiciones redox, la presencia/adición de sustratos y nutrientes y, según se informa, intermedios en el entorno del suelo. Los contaminantes pueden afectar la biorremediación de explosivos. También resume el progreso de la nueva aplicación y las perspectivas de investigación futuras de la tecnología avanzada de instrumentos analíticos, y presenta algunas sugerencias, que aclararán la selección de instrumentos de monitoreo apropiados para evaluar la posibilidad de biorremediación.

**Palabras claves:** Bioremediación de suelos; factores biogeoquímicos; supervisión; herramientas moleculares; tecnología de instrumentos.

## Environmental monitoring criteria used for the bioremediation of soils contaminated by explosive chemicals.

**Abstract:** Bioremediation is an environmentally friendly technology because it uses nature's own microbes to degrade the contaminants of concern. Extensive research has been conducted on this waste disposal technology to degrade explosive contaminants. This research describes the environmental monitoring methods used in the bioremediation of soil contaminated by explosives. Outstanding biogeochemical factors, namely the presence and viability of microorganisms, bioavailability of contaminants, pH, temperature, moisture content, redox conditions, presence/addition of substrates and nutrients and, reportedly, intermediates in the soil environment. Contaminants may affect the bioremediation of explosives. It also summarizes the progress of new application and future research prospects of advanced analytical instrument technology, and presents some suggestions, which will clarify the selection of appropriate monitoring instruments to evaluate the possibility of bioremediation.

**Keywords:** Soil bioremediation, biogeochemical factors, monitoring, molecular tools, instrument technology.

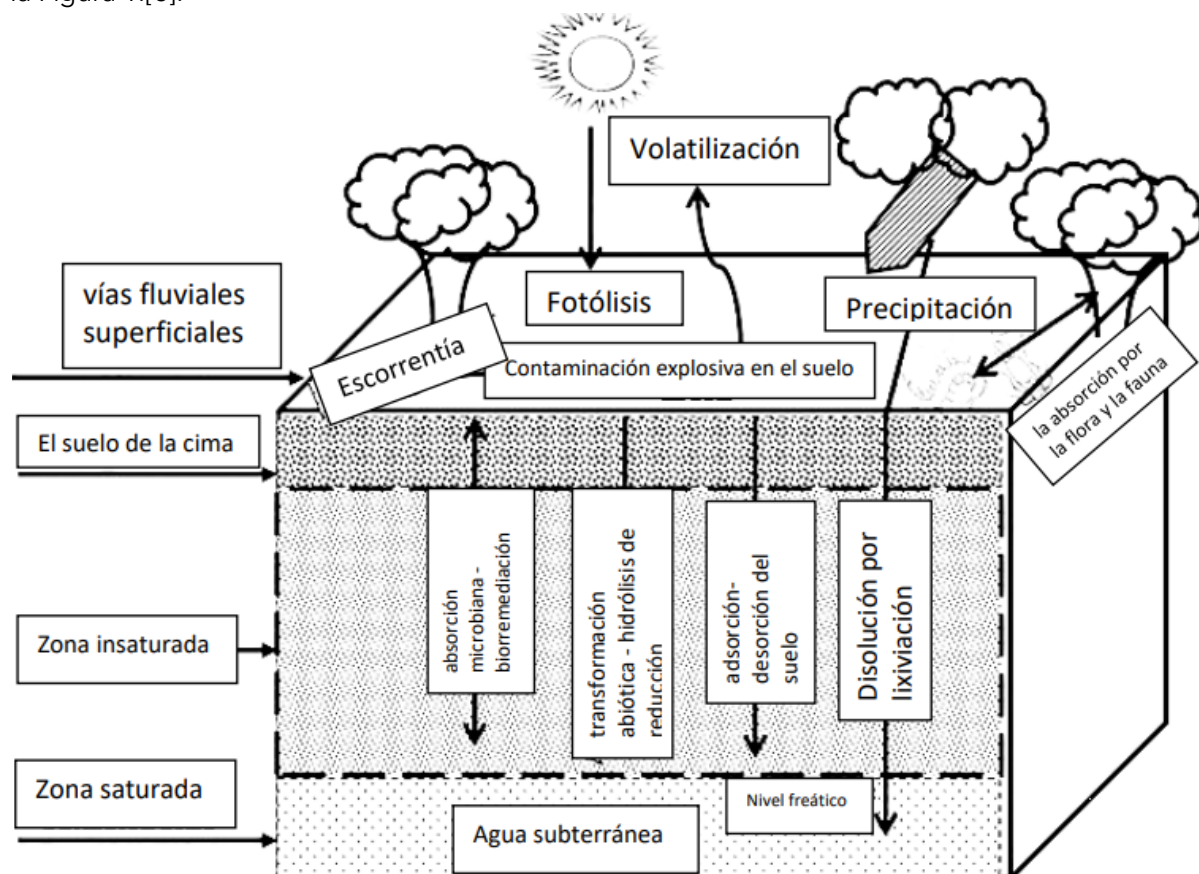
### 1 Introducción

Los productos químicos explosivos se utilizan ampliamente para satisfacer las necesidades de los sectores militar y civil. En las operaciones de producción, manipulación, capacitación, pruebas, desmilitarización y minería de municiones, puede producirse contaminación del medio ambiente por explosivos.[1]. En los Estados Unidos, Alemania, Australia, Suecia y Asia, ha habido informes de

contaminación del suelo por explosivos. Según un informe de 2006, aproximadamente 4,000,000 hectáreas de tierra en bases militares de EE. UU. Estaban contaminadas con municiones sin explotar (UXO) [2].

Desde la antigüedad, los humanos han estado tratando de mejorar sus niveles de vida mediante la creación de diversas herramientas que facilitan su trabajo, sin importar las actividades que realizan: caza, agricultura, ganadería, minería, construcción, etc. Sin embargo, cuando hablamos del desarrollo y la fabricación de explosivos, debemos mencionar el período de guerra, porque es durante estos períodos que el desarrollo de explosivos es más dinámico.[3]. El gran progreso de los explosivos durante la guerra se debió a su poderoso poder destructivo y su poder destructivo. Es precisamente por esta característica que su aplicabilidad industrial está aquí, porque ninguna otra reacción puede producir una mayor potencia mecánica que la explosión, por lo que es muy adecuada para la minería y la ingeniería civil. A los humanos les tomó siglos darse cuenta de que los materiales explosivos no solo se pueden usar en la guerra, sino que también mejoran el rendimiento laboral[4].

Los explosivos existen en forma de partículas o escombros de explosiones/explosiones parciales, o en forma disuelta en el suelo debido a las actividades de fabricación. El suelo que contiene más del 10% de explosivos secundarios en peso seco es fácil de causar o propagar[5]. Debido a que los explosivos y sus metabolitos en el suelo tienen propiedades tóxicas y tóxicas, tendrán un efecto adverso en animales y plantas. La contaminación del agua subterránea por explosivos es un grave problema de salud, ya que los contaminantes pueden ingresar a los recursos de agua potable. La distribución, el destino y el transporte de explosivos en el suelo se muestran en la Figura 1.[6].



**Fig. 1.** Distribución, destino y transporte de explosivos en el suelo.

Por lo tanto, la contaminación ambiental y los efectos tóxicos de los explosivos requieren un tratamiento efectivo. Se han desarrollado varios métodos de tratamiento (Figura 2) para controlar la contaminación de explosivos en el suelo.[7]. Cuando un método de tratamiento es ecológico sin generar contaminantes secundarios, el método de tratamiento será sostenible, técnicamente factible y económico en operación. La biorremediación de suelos y lodos contaminados con explosivos es

cada vez más importante debido a su sostenibilidad.[8]. El proceso de biorremediación utiliza los propios degradadores de la naturaleza (como bacterias y hongos) para degradar los contaminantes presentes en el ecosistema. Las estrategias de tratamiento biológico aeróbico y anaeróbico se han utilizado ampliamente para probar y evaluar la degradación de explosivos en el suelo.[9]. Hoy en día, los problemas ambientales se extienden más a las instituciones nacionales, por lo que en el proceso de tratar de cumplir con las normas y proteger el medio ambiente, la policía está investigando para encontrar diferentes alternativas de destrucción para la confiscación de explosivos.[10]. En los últimos tres años, el Estado colombiano ha neutralizado aproximadamente 22 (22) toneladas de sustancias explosivas a través de sus agencias de seguridad. De acuerdo con el artículo 256 del Código de Procedimiento Penal, estas sustancias explosivas deben destruirse inmediatamente según lo ordene el fiscal o los miembros de la Policía judicial[11].

El monitoreo ambiental es un paso inevitable en la evaluación del desempeño de cualquier sistema de gestión ambiental, ya que se basa en la observación científica de los cambios relacionados con el proceso. Por lo tanto, se convierte en una parte importante del cumplimiento de la normativa y los requisitos de seguridad. Los objetivos principales del monitoreo ambiental incluyen medir la concentración de contaminantes de fondo para evaluar el grado de contaminación, determinar el destino y el transporte de contaminantes, y evaluar la eficiencia de los sistemas de remediación.[12].

En este artículo de revisión, resumimos los métodos de monitoreo ambiental utilizados en la evaluación de biorremediación de explosivos en el suelo. Muestreo de suelos, factores que afectan la tasa de biorremediación, parámetros físicos, químicos y biológicos monitoreados durante el proceso de remediación. También ilustra las aplicaciones clave de las herramientas de análisis molecular y la aplicación de herramientas avanzadas de análisis de alto rendimiento en la degradación de explosivos por medios microbianos. El propósito de esta revisión es guiar a los futuros investigadores a seleccionar tecnologías apropiadas de monitoreo ambiental en sitios web específicos para diseñar, desarrollar y aplicar estrategias de biorremediación para suelos contaminados por explosivos.

## 2 Muestreo de suelo.

El uso de métodos de muestreo científicos, los procedimientos de procesamiento de muestras y las estrategias de preparación de muestras pueden proporcionar resultados analíticos de laboratorio precisos para el tipo y el alcance de la contaminación explosiva. Cuando el suelo está contaminado con explosivos, debido a varios destinos y procesos de transporte, el agua subterránea subyacente también está contaminada con explosivos (Figura 1). El cumplimiento de las normas y directrices para muestras de suelo y agua subterránea asegurará que se recojan muestras representativas de lugares contaminados.[13].

Para evaluar la remediación a escala del sitio, el muestreo del suelo debe realizarse desde el área apropiada del sitio de tratamiento y sus alrededores para garantizar la eliminación de contaminantes. Según los informes, el muestreo a escala proporcionará el mayor beneficio al realizar muestras para estudios de remediación[14]. Si el marco de muestreo destinado a la remediación es homogéneo, se deben considerar procedimientos de muestreo sistemáticos y aleatorios, y si es heterogéneo y estratificado, se pueden seleccionar procedimientos de muestreo compuestos, grupales y de etapas múltiples para garantizar que La precisión del análisis. Contaminante[15].

Cuando se planea realizar estudios de biorremediación en el muestreo de suelo/agua subterránea, se debe tener cuidado para evitar la contaminación cruzada causada por el uso de equipos de muestreo estériles. Debe garantizarse que no haya oxígeno durante el muestreo de la flora microbiana anaerobia. Las muestras de suelo con microorganismos anaerobios deben tomarse muestras y transportarse en cilindros llenos de nitrógeno/ helio, o transportarse en hielo seco. En el laboratorio, estas muestras deben procesarse en una guantera anaeróbica.[16].

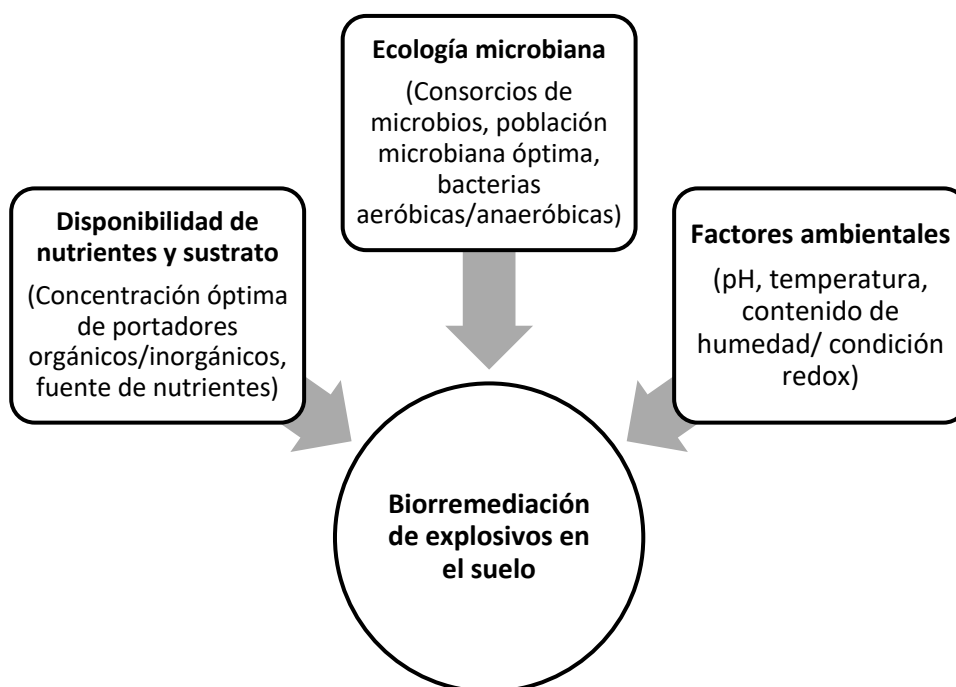
Dado que los explosivos nitroaromáticos (es decir, TNT y DNT) son propensos a la transformación fotográfica y microbiana, se debe tener cuidado de mantener las muestras de suelo / agua subterránea contaminadas con explosivos protegidas de la luz y colocadas bajo refrigeración. Los recipientes de vidrio/plásticos ámbar con tapas revestidas de teflón son adecuados para la

recolección de muestras. Según los informes, DNT, TNT y TNB (trinitrobenceno) se pueden estabilizar en muestras de suelo durante ocho semanas en condiciones de congelación, mientras que en condiciones de refrigeración, el tiempo máximo de retención de nitramina (RDX, HMX) es de ocho semanas[17].

Para recolectar muestras de suelo, se pueden usar muestreadores eléctricos o manuales. Los muestreadores manuales generalmente se usan para tomar muestras de suelo superficial con una profundidad de menos de 5 m. En general, la elección del muestreador depende de la profundidad de muestreo requerida, las condiciones del suelo, el tamaño de la muestra, el contenido de humedad, la accesibilidad en el sitio, el costo y la dotación de personal.[18]. Las muestras de agua contaminada/agua subterránea se pueden almacenar utilizando acidificantes para extender el tiempo de retención. Según los informes, la acidificación de muestras de agua (pH 2.0) con bisulfato de sodio puede preservar los explosivos nitroaromáticos durante tres meses, incluso a temperatura ambiente.[19].

### 3 Factores que afectan a la biorremediación de explosivos en el suelo

Factores ambientales como la presencia / adición de inóculos microbianos, nutrientes y sustratos, pH, temperatura, contenido de humedad del suelo, propiedades del suelo y potencial redox, la presencia de metabolitos secundarios y adyuvantes han demostrado ser los principales



factores que controlan los explosivos en el suelo. Factores en la biodegradación (Figura 2)[20].

**Fig. 2.** Factores que influyen en la biorremediación de explosivos en el suelo

#### 3.1 Papel de los microorganismos

Los microorganismos deben estar presentes en grandes cantidades en lugares contaminados para la biorremediación, y los contaminantes objetivo también deben tener biodisponibilidad. La mayoría de las tecnologías de biorremediación se basan en las capacidades inherentes de los microorganismos naturales presentes en sitios contaminados sin ningún concepto de ingeniería. Estos microorganismos naturales pueden degradar o transformar contaminantes explosivos a través del proceso de descomposición natural. La descomposición natural es un proceso lento y puede no ser adecuado para suelos con contaminación a largo plazo o alta concentración de contaminantes. A través de la exposición repetida al nivel real de concentración de explosivos en el suelo, las bacterias naturales se adaptan al medio ambiente, y luego se aplica el cultivo microbiano adaptado, que tiene un mejor potencial de biodegradación.

### 3.2 Presencia de sustrato y nutrientes

Aunque los hallazgos de estos estudios indican que los microorganismos pueden usar el contenido de carbono y nitrógeno de los químicos explosivos para metabolizar y reproducirse, la disponibilidad de carbono es el factor limitante para la biodegradabilidad de los explosivos.[21]. La adición de nutrientes y la adecuada modificación orgánica / inorgánica son esenciales para mantener la población microbiana en el medio ambiente. Evaluación de subproductos de residuos industriales, como la glicerina, el suero de queso y el sulfonato de lignina, como un sustrato de carbono alternativo para degradar el RDX en el suelo[22].

Los residuos de glicerina y suero de queso mejoran la degradación del RDX, mientras que el lignosulfonato actúa como inhibidor. Enfermedades y otros. Agregar acetato y aceite vegetal al medio contaminado con RDX como fuente de carbono y nutrientes puede aumentar la tasa de degradación de RDX y el crecimiento microbiano que lo acompaña.[23]. Fuller y otros informaron un estudio similar para mejorar la mineralización RDX mediante la adición de sustratos (es decir, aceite de soja en melaza y turba en aceite de soja). Cuando se agregaron musgo sphagnum y aceite de soja al medio del suelo contaminado como fuente de carbono y nutrientes, se observó que tres explosivos secundarios TNT, RDX y HMX se degradaban mejor.[24].

### 3.3 Factores ambientales

#### 3.3.1 El pH, la temperatura y el contenido de humedad del suelo

En el mundo microscópico del suelo recogido del Ártico, se evaluó el efecto de la temperatura sobre las actividades metabólicas del suelo. La quitina extraída de las cáscaras de cangrejo se usó como un modificador de carbono y se evaluó la biodegradación de RDX y DNT a 2, 12 y 22 ° C en presencia y ausencia de quitina.[25].

#### 3.3.2 Condición de redoblante

Los cultivos anaerobios cultivados en condiciones reductoras de sulfato y nitrato se evaluaron con TNT como la única fuente de carbono y nitrógeno y la melaza y el extracto de levadura como subsustratos. En comparación con las condiciones de reducción de nitrato, las condiciones de reducción de sulfato y la melaza como co-sustrato pueden eliminar TNT más rápido. A una concentración inicial del suelo de 10,000 mg / kg, más del 90% se mineraliza, mientras que el ácido acético, el amoníaco y el CO<sub>2</sub> se consideran productos finales. [26].

## 4 Parámetros vigilados durante la biorremediación de suelos contaminados con explosivos

### 4.1 Parámetros físicos del suelo

El suelo es el medio básico que apoya el crecimiento y el mantenimiento de la biota. La interacción saludable entre el suelo y la biota es esencial para mantener el equilibrio del ecosistema. La descarga de contaminantes en el suelo perturbará las características físicas, químicas y biológicas del suelo. En el estudio de la biorremediación de la columna del suelo, se analizaron la densidad aparente, el contenido de agua, la porosidad total y la porosidad llena del suelo Garnet Ridge.[27].

### 4.2 Parámetros químicos del suelo

#### 4.2.1 Contenido de carbono orgánico

Se realizó un estudio de lizozima experimental a gran escala en una instalación militar en Hawaii, EE. UU., Para evaluar el aumento en el contenido biológico de melaza de la degradación de RDX y HMX en melazas en la zona de filtración en aproximadamente 240 días. La concentración de explosivos y el contenido de carbono orgánico total y nitrógeno total son los parámetros monitoreados.[28]. Los resultados de la investigación mostraron que no había explosivos o sus productos de degradación en el suelo y las muestras de agua de poro. Dependiendo de la profundidad del suelo, las mayores concentraciones de TOC y TN en la zona de filtración del suelo muestran una mayor degradación de RDX. La mayor concentración de TN se atribuye a la liberación de nitrógeno en la degradación de explosivos.[29].

#### 4.2.2 El contenido de nitrito y nitrato

El análisis de nitrito se realizó por cromatografía iónica. El contenido de nitrito juega un papel importante en el control de la velocidad y el alcance de la degradación de DNT. 2,4 DNT se consume continuamente en 24 horas, y luego se libera nitrito. En el estudio de la biorremediación de lodo anaeróbico de RDX, la eliminación de RDX fue acompañada por la producción de nitrito, formaldehído, amoníaco y óxido nitroso. El análisis estequiométrico mostró que cada molécula RDX producía un ion nitrito, y el balance de masa de carbono y nitrógeno alcanzaba el 91% y el 92%, respectivamente.[30].

#### 4.2.3 Concentración de explosivos

Los métodos de análisis in situ basados en el inmunoensayo enzimático (EIA) y la colorimetría se utilizan cada vez más para detectar explosivos y caracterizarlos en el sitio. El método de prueba 8515 de EPA SW-846 es un método colorimétrico, y el método 4050 de SW-846 de EPA es un inmunoensayo enzimático (EIA) para TNT. Los métodos colorimétricos y EIA para RDX incluyen el método EPA SW-846 8510 y el método EPA SW-846 4051, respectivamente[31].

### 4.3 Parámetros biológicos del suelo

#### 4.3.1 Análisis microbiano - técnicas convencionales

La dinámica de la población microbiana, la respiración del suelo y la actividad enzimática son métodos tradicionales utilizados para evaluar la relación entre la degradación de contaminantes y la sostenibilidad microbiana durante la biorremediación. Se utilizan herramientas microbiológicas cada vez más avanzadas para comprender mejor el proceso de tratamiento.[32].

##### 4.3.1.1 Enumeración de unidades formadoras de colonias (CFU).

En el estudio de invernadero, el efecto combinado de la proporción de melaza y guinea de 1:40 aumentó significativamente la densidad de células microbianas, y el suelo contaminado con RDX y HMX no se trató hasta el final del período de investigación de 15 semanas. En el estudio de biorremediación in situ de la degradación de TNT en el suelo inflado de melaza, el número de bacterias de la placa aumentó de 3 a 5 órdenes de magnitud.[33].

##### 4.3.1.2 Vigilancia y evaluación de la actividad de las enzimas

La medición de la actividad enzimática durante la biorremediación proporciona evidencia del metabolismo microbiano. Factores como las características físicas del medio ambiente, la composición química del microorganismo y el estado fisiológico afectan la actividad enzimática. La determinación del diacetato de fluoresceína (FDA) mide la actividad enzimática total en sistemas de biorremediación[34].

**Tabla 1.** Resumen de los métodos analíticos utilizados durante la biorremediación de contaminantes explosivos en el suelo.

Estrategia	Detalles del estudio	Parámetros analíticos evaluados	La supervisión del medio ambiente	Estrategia
Bioaumentación	Estudio de la columna de suelo	El contenido de CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> Bacterial population Concentración de explosivos	Analizador de O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> equipado con un detector infrarrojo Método estándar de recuento de placas PHLC de fase inversa (RPHPLC)	La concentración inicial de TNT de 3839 mg/kg de suelo después del tratamiento con melaza como cosustrato se redujo a 0,5 mg/kg de suelo el día 305 del experimento.

		Concentración de explosivos Nitrite	HPLC Colorimetría	Eliminación del 99 % de DNT
		Nitrato	Cromatografía iónica	
<b>Bioaumentación</b>	Estudios de lodo del suelo inoculados con bacterias mineralizantes DNT	Proteína	Ensayo de proteína BCA Pierce	
		Toxicidad	TCLP y prueba de bacterias luminiscentes	
		Radioactividad	Contador de centelleo	
<b>El papel de bioaumentación de enmiendas</b>	Estudio de la columna del suelo Diferentes enmiendas a saber, almidón, acetato, etanol, acetato con amonio probadas para inducir la transformación reductora de RDX	Acetato, cloruro, sulfato y nitrato	Cromatografía iónica Colorimetría RP-HPLC (EPA, 8330) Analizador de toxicidad de microtoxinas	El acetato fue el mejor sustrato de carbono, lo que dio como resultado el máximo Degradación del RDX

## 5 Instrumentos analíticos avanzados para la vigilancia de la biorremediación de explosivos en el suelo

### 5.1 Técnicas cromatográficas - Cromatografía de gases y líquidos (GC y LC)

Las técnicas de cromatografía de gases y de cromatografía líquida se han utilizado para analizar explosivos en el suelo durante la biodegradación. Aunque las técnicas basadas en GC se utilizan para el análisis de explosivos, no son competentes para la mayoría de los explosivos porque estos explosivos son térmicamente inestables y se degradan a altas temperaturas. La tecnología basada en LC es la más adecuada para el análisis de explosivos en diferentes sustratos[35]. La cromatografía líquida es beneficiosa para extraer el cultivo contaminado de suelo / células por inmersión en agua para controlar la tasa de degradación de los explosivos, ya que la tasa de recuperación promedio de la mayoría de los contaminantes explosivos está en el rango sub-ppm del 95% al 98%. En todos estos estudios, el detector de matriz de fotodiodo de modo cromatográfico inverso isocrático realiza la mayor parte de la detección[36].

**Tabla 2.** Resumen de los instrumentos de análisis molecular utilizados durante la biorremediación de explosivos en el suelo.

Detalle del estudio	Herramienta de análisis molecular	Los resultados del estudio
<i>Diversidad microbiana en RDX transformando cultivos anaeróbicos</i>	Análisis filogenético de extracción de ADN y secuenciación del gen del ARNr 16S	Dominio de Enterobacteriaceae y
<i>Análisis filogenético de las bacterias psicofílicas degradantes RDX y HMX</i>	16S rRNA gene sequencing	Clostridiaceae
<i>Confirmación de transformación/degradación RDX por medio de una herramienta de análisis molecular</i>	Reacción en cadena de la polimerasa TaqMan (PCR) para la vigilancia de la degradación de RDX El gen XplA y el test de Southern blot	Los aislamientos identificados pertenecen a las Proteobacterias,

<i>Estudio sobre las capacidades de degradación RDX degradando las bacterias aeróbicas</i>	Perfil fenotípico y genotípico de <i>Rhodococcus</i> sp .	Entre las 19 cepas de <i>Rhodococcus</i> sp aisladas, se encontró que 18 tenían un sistema de citocromo P450 consistente en XplA-XplB que es responsable de la descomposición del RDX
<i>Cambios estructurales y funcionales en la comunidad microbiana del suelo sometido a una exposición de corto plazo de TNT</i>	DGGE, perfil fisiológico a nivel comunitario (CLPP)	En altas concentraciones de TNT, se observó una tolerancia de la comunidad inducida por la contaminación. Denitrificadores se encontraron <i>Pseudomonas</i>
<i>Evaluación de la degradación del TNT por arrastre del genoma de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i></i>	16S rRNA gene sequencing and proteomic analysis by two-dimensional electrophoresis	Secuenciación de genes de ARNr 16S y análisis proteómico por electroforesis bidimensional
<i>Efecto de los sulfatos en la dinámica de la comunidad bacteriana durante la biorremediación con RDX</i>	Polimorfismo de restricción terminal de longitud de fragmentos (T-RFLP)	Predominio de <i>Geobacter</i> sp., <i>Acetobacterium</i> sp. inicialmente y luego <i>Clostridiaceae</i> se convirtió en dominante
<i>Evaluación de la degradación del RDX en el agua subterránea -Rol de las bacterias dominantes</i>	16S rRNA gene sequencing	<i>Clostridium</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.

## 5.2 Técnicas analíticas con guión

Las ventajas de los instrumentos analíticos combinados son la velocidad y la precisión, el alto rendimiento de la muestra, la repetibilidad óptima y el más alto grado de automatización. Los datos de monitoreo obtenidos a través de estos instrumentos analíticos avanzados ayudan a aclarar la vía de degradación y determinar la bioconversión o mineralización de los contaminantes objetivo.[37].

### 5.2.1 Sistemas LC-MS/MS y GC-MS/MS

El análisis por GC-MS confirmó la formación de óxido nitroso, hidrazina y dimetilhidrazina y metano. Cromatografía líquida combinada con barrera dieléctrica de ionización de espectrometría de masas de ionización (LC-DBDI-TOFMS) e ionización química utilizando cromatografía líquida de espectrometría de masas de atmósfera para evaluar explosivos presentes en suelos contaminados y medios líquidos. Obtenga una mejor sensibilidad en modo DBDI[38]. Se utiliza un cromatógrafo de gases combinado con un espectrómetro de masas con relación isotópica para estudiar el carbono, el nitrógeno y el hidrógeno presentes en explosivos nitroaromáticos en el suelo subterráneo. A partir del modelo de relación de isótopos, se evaluó la vida media y la biodegradación / transformación de TNT y sus isómeros.[39].

### 5.2.2 Equipo MALDI-TOF

Esta es una herramienta avanzada de identificación microbiana, que es superior a los métodos convencionales, a saber, la secuenciación del gen 16S rRNA y 18S rRNA. La visualización simultánea de especies iónicas en el espectro y las mejores capacidades de ionización de MALDI-TOF ayudan a mejorar la identificación de metabolitos. Atraiga células microbianas o extractos celulares para obtener los detalles necesarios. Khilyas et al. utilizaron el analizador MALDI-TOF para estudiar la transformación de TNT por levadura *Yarrowia lipolytica*[40]. El análisis proteómico indicó que se han identificado proteínas aumentadas de membrana y citoplasmáticas. La vía de conversión de TNT incluye la formación del complejo monohidruro Meissenheimer TNT en el primer paso, y luego la formación del dihidruro Meissenheimer en el segundo paso, y la desnitrificación que finalmente conduce a la liberación de ácido nitroso en el tercer paso. La sal como producto final que pasó[41]. MALDI-TOF se utilizó para estudiar el análisis proteómico del genoma transformado de *Maltophilia maltophilia*. Estos hallazgos proporcionan una mejor comprensión de la degradación de TNT por cepas mutantes. En comparación con LC-MS, MALDI-TOF tiene ventajas en costo, tiempo y mano de



obra. Tiene altas capacidades de automatización y requiere menos pasos de procesamiento de muestras[42].

## 6 Conclusión

En el campo militar, el problema de la contaminación ambiental causada por explosivos ha atraído cada vez más la atención de las personas. La biorremediación es una opción ecológica para el manejo sostenible de estos sitios. La evaluación de estrategias de biorremediación implica pruebas y evaluaciones sistemáticas utilizando varios métodos de monitoreo ambiental para ayudar a los investigadores a formular estrategias más apropiadas para una aplicación exitosa.

Caracterizar los sitios contaminados con explosivos para evaluar el tipo y el alcance de la contaminación es un requisito previo para aplicar cualquier estrategia de biorremediación. Por lo tanto, una comprensión de los factores físicos, químicos y biológicos del entorno objetivo es inevitable para la prueba y evaluación exitosas de la biorremediación de explosivos. Elegir métodos de muestreo apropiados, estrategias de preparación de muestras y métodos analíticos son esenciales para obtener información confiable sobre el monitoreo ambiental. Dado que los microorganismos son los principales protagonistas de la biorremediación, mantener las poblaciones microbianas necesarias en los sitios contaminados es crítico y debe monitorearse durante todo el proceso. El contenido de carbono y nitrógeno en el suelo, la liberación de nitrato / nitrito y la concentración de explosivos en el suelo son otros parámetros clave que deben monitorearse.

El uso del método integrado "omics" para analizar la función y la diversidad estructural de los microorganismos puede comprender mejor el mecanismo bioquímico y las vías de degradación. Durante la biorremediación de explosivos, los metabolitos formados son a veces más tóxicos que los explosivos originales presentes en el suelo. La mineralización final de contaminantes para cumplir con los requisitos reglamentarios justifica el uso de tecnología avanzada de instrumentos. Los estudios realizados con radiomarcaje, LC-MS / MS y MALDI-TOF son esenciales para dilucidar las vías de degradación y mineralización de contaminantes objetivo.

**Contribución de autores:** El desarrollo de la investigación corresponde a aportes únicos del autor.

**Financiamiento:** Los autores financiaron a integridad el estudio.

**Conflictos de interés:** Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Referencias

1. Rylott, E.L.; Bruce, N.C. Right on target: Using plants and microbes to remediate explosives. *Int. J. Phytoremediation* **2019**, *21*, 1051-1064.
2. Macdonald, J.A.; Small, M.J. Assessing sites contaminated with unexploded ordnance: Statistical modeling of ordnance spatial distribution. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 931-938, doi:10.1021/es051168t.
3. Dávila Abellán, A. Estudio De Los Riesgos Generados Por Agentes Químicos En La Fabricación De Explosivos. *Trab. Fin Máster* **2013**, *1*, 124.
4. Leyva Pajuelo, G.C. Consideraciones de seguridad en el manipuleo de explosivos en la actividad minera. **2015**.
5. Sisk, W. *Granular Activated Carbon; Approaches for the Remediation of Federal Facility Sites Contaminated with Explosive or Radioactive Wastes*; EPA/625/R-93/013, pp38-39, 1993;
6. Craig, H.D.; Sisk, W.E.; Nelson, M.D.; Dana, W.H. Bioremediation of explosives-contaminated soils: A status review. In Proceedings of the Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research, Kansas State University, Manhattan, NY, USA; 1995; pp. 164-179.
7. Wingfors, H. *Evaluation of the Contamination by Explosives and Metals in Soils at the Älvdalen Shooting Range: Part II: Results and Discussion*; Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI), 2006;
8. Martel, R.; Mailloux, M.; Gabriel, U.; Lefebvre, R.; Thiboutot, S.; Ampleman, G. Behavior of Energetic Materials in Ground Water at an Anti-Tank Range. *J. Environ. Qual.* **2009**, *38*, 75-92,

- doi:10.2134/jeq2007.0606.
9. Clark, B.; Boopathy, R. Evaluation of bioremediation methods for the treatment of soil contaminated with explosives in Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *143*, 643–648, doi:https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.01.034.
  10. Ullmann, F. Enciclopedia de química industrial. **1931**.
  11. Peña Jiménez, Y.Z.; Silva Riaño, R.E. Determinación del impacto ambiental al recurso agua ocasionado por la desactivación de los explosivos pólvora y anfo con el método de disolución química y valoración del ruido producido por la destrucción de los explosivos incautados por la policía nacion. **2008**.
  12. García, J.M.G. *La industria de explosivos en España: UEE (1896-1936)*; Fundación Empresa Pública, 2000;
  13. Alef, K. 6 - Anaerobic microbial activities in soil. In; Alef, K., Nannipieri, P.B.T.-M. in A.S.M. and B., Eds.; Academic Press: London, 1995; pp. 271-310 ISBN 978-0-12-513840-6.
  14. Imam, A.; Suman, S.K.; Ghosh, D.; Kanaujia, P.K. Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *118*, 50–64, doi:https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.023.
  15. Grant, C.L.; Jenkins, T.F.; Golden, S.M. *Experimental assessment of analytical holding times for nitroaromatic and nitramine explosives in soil*; COLD REGIONS RESEARCH AND ENGINEERING LAB HANOVER NH, 1993;
  16. Douglas, T.A.; Johnson, L.; Walsh, M.; Collins, C. A time series investigation of the stability of nitramine and nitroaromatic explosives in surface water samples at ambient temperature. *Chemosphere* **2009**, *76*, 1–8, doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.050.
  17. Crockett, A.B.; Craig, H.D.; Jenkins, T.F.; Sisk, W.E. *Field sampling and selecting on-site analytical methods for explosives in soil*; Idaho National Engineering Lab., Idaho Falls, ID (United States), 1996;
  18. Fan, J.; Shao, L.; Hu, Y.; Wang, J.; Wang, J.; Ma, J. Classification and chemical compositions of individual particles at an eastern marginal site of Tibetan Plateau. *Atmos. Pollut. Res.* **2016**, *7*, 833–842, doi:https://doi.org/10.1016/j.apr.2016.04.007.
  19. Thiboutot, S.; Ampleman, G.; Hewitt, A.D. Guide for characterization of sites contaminated with energetic materials. **2002**.
  20. Kao, C.M.; Lin, B.H.; Chen, S.C.; Wei, S.F.; Chen, C.C.; Yao, C.L.; Chien, C.C. Biodegradation of trinitrotoluene (TNT) by indigenous microorganisms from TNT-contaminated soil, and their application in TNT bioremediation. *Bioremediat. J.* **2016**, *20*, 165–173, doi:10.1080/10889868.2016.1148007.
  21. Kwon, M.J.; O'Loughlin, E.J.; Antonopoulos, D.A.; Finneran, K.T. Geochemical and microbiological processes contributing to the transformation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) in contaminated aquifer material. *Chemosphere* **2011**, *84*, 1223–1230, doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.027.
  22. Kim, H.Y.; Song, H.G. Comparison of 2,4,6-trinitrotoluene degradation by seven strains of white rot fungi. *Curr. Microbiol.* **2000**, *41*, 317–320, doi:10.1007/s002840010142.
  23. Ziganshin, A.M.; Naumova, R.P.; Pannier, A.J.; Gerlach, R. Influence of pH on 2,4,6-trinitrotoluene degradation by *Yarrowia lipolytica*. *Chemosphere* **2010**, *79*, 426–433, doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.01.051.
  24. Fuller, M.E.; Hatzinger, P.B.; Rungmakol, D.; Schuster, R.L.; Steffan, R.J. Enhancing the attenuation of explosives in surface soils at military facilities: Combined sorption and biodegradation. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23*, 313–324, doi:10.1897/03-187.
  25. Kwon, M.J.; Finneran, K.T. Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) biodegradation kinetics amongst several Fe(III)-reducing genera. *Soil Sediment Contam.* **2008**, *17*, 189–203, doi:10.1080/15320380701873132.
  26. Waisner, S.; Hansen, L.; Fredrickson, H.; Nestler, C.; Zappi, M.; Banerji, S.; Bajpai, R. Biodegradation of RDX within soil-water slurries using a combination of differing redox incubation conditions. *J. Hazard. Mater.* **2002**, *95*, 91–106, doi:https://doi.org/10.1016/S0304-3894(02)00052-3.
  27. Stenuit, B.A.; Agathos, S.N. Microbial 2,4,6-trinitrotoluene degradation: Could we learn from (bio)chemistry for bioremediation and vice versa? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 1043–1064, doi:10.1007/s00253-010-2830-x.
  28. Shin, J.H.; Song, H.G. Nitroreductase II involved in 2,4,6-trinitrotoluene degradation: Purification and characterization from *Klebsiella* sp. cl. *J. Microbiol.* **2009**, *47*, 536–541, doi:10.1007/s12275-008-0171-6.
  29. Payne, Z.M.; Lamichhane, K.M.; Babcock, R.W.; Turnbull, S.J. Pilot-scale in situ bioremediation of HMX and RDX in soil pore water in Hawaii. *Environ. Sci. Process. Impacts* **2013**, *15*, 2023–2029, doi:10.1039/c3em00320e.

30. Karakaya, P.; Christodoulatos, C.; Koutsospyros, A.; Balas, W.; Nicolich, S.; Sidhoum, M. Biodegradation of the high explosive hexanitrohexaazaiso- Wurtzitane (CL-20). *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2009**, *6*, 1371-1392, doi:10.3390/ijerph6041371.
31. Yu, H.A.; Daeid, N.N.; Dawson, L.A.; DeTata, D.A.; Lewis, S.W. Explosive detonation causes an increase in soil porosity leading to increased TNT transformation. *PLoS One* **2017**, *12*, 1-18, doi:10.1371/journal.pone.0189177.
32. Won, J.; Borden, R.C. Laboratory Column Evaluation of High Explosives Attenuation in Grenade Range Soils. *J. Environ. Qual.* **2017**, *46*, 968-974, doi:10.2134/jeq2017.05.0180.
33. Sharma, P.; Mayes, M.A.; Tang, G. Role of soil organic carbon and colloids in sorption and transport of TNT, RDX and HMX in training range soils. *Chemosphere* **2013**, *92*, 993-1000, doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.028.
34. Erkelens, M.; Adetutu, E.M.; Taha, M.; Tudararo-Aherobo, L.; Antiabong, J.; Provatas, A.; Ball, A.S. Sustainable remediation - The application of bioremediated soil for use in the degradation of TNT chips. *J. Environ. Manage.* **2012**, *110*, 69-76, doi:https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.022.
35. Wijker, R.S.; Bolotin, J.; Nishino, S.F.; Spain, J.C.; Hofstetter, T.B. Using compound-specific isotope analysis to assess biodegradation of nitroaromatic explosives in the subsurface. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 6872-6883, doi:10.1021/es3051845.
36. Indest, K.J.; Hancock, D.E.; Crocker, F.H.; Eberly, J.O.; Jung, C.M.; Blakeney, G.A.; Brame, J.; Chappell, M.A. Biodegradation of insensitive munition formulations IMX101 and IMX104 in surface soils. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *44*, 987-995, doi:10.1007/s10295-017-1930-3.
37. Numbera, A.A.C.A.S. Method 8330B nitroaromatics, nitramines, and nitrate esters by high performance liquid chromatography (HPLC). *US Environ. Prot. Agency, Washington, DC* **2006**.
38. Gledhill, M.; Beck, A.J.; Stamer, B.; Schlosser, C.; Achterberg, E.P. Quantification of munition compounds in the marine environment by solid phase extraction - ultra high performance liquid chromatography with detection by electrospray ionisation - mass spectrometry. *Talanta* **2019**, *200*, 366-372, doi:https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.050.
39. Gilbert-López, B.; Lara-Ortega, F.J.; Robles-Molina, J.; Brandt, S.; Schütz, A.; Moreno-González, D.; García-Reyes, J.F.; Molina-Díaz, A.; Franzke, J. Detection of multiclass explosives and related compounds in soil and water by liquid chromatography-dielectric barrier discharge ionization-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2019**, *411*, 4785-4796, doi:10.1007/s00216-019-01627-2.
40. Indest, K.J.; Crocker, F.H.; Athow, R. A TaqMan polymerase chain reaction method for monitoring RDX-degrading bacteria based on the xplA functional gene. *J. Microbiol. Methods* **2007**, *68*, 267-274, doi:https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.08.008.
41. Zhao, J.-S.; Spain, J.; Thiboutot, S.; Ampleman, G.; Greer, C.; Hawari, J. Phylogeny of cyclic nitramine-degrading psychrophilic bacteria in marine sediment and their potential role in the natural attenuation of explosives. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2004**, *49*, 349-357, doi:https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.04.008.
42. Zhao, J.-S.; Spain, J.; Hawari, J. Phylogenetic and metabolic diversity of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX)-transforming bacteria in strictly anaerobic mixed cultures enriched on RDX as nitrogen source. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2003**, *46*, 189-196, doi:https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00216-2.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).