



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Un modelo de gestión ambiental para biorremediar suelos contaminados con 1,1,1- tricloro-2,2-bis (4-clorofenil)-etano (DDT) mediante un reactor de lecho estático

María Angélica Prada Vásquez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Geociencias y Medio Ambiente
Medellín, Colombia
2016

Un modelo de gestión ambiental para biorremediar suelos contaminados con 1,1,1- tricloro-2,2-bis (4-clorofenil)-etano (DDT) mediante un reactor de lecho estático

María Angélica Prada Vásquez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Medio Ambiente y Desarrollo

Director

Santiago Alonso Cardona Gallo, PhD, MSc. Ing. Sanitario

Línea de investigación
Biorremediación de suelos

Grupo de Investigación:
Biorremediación y desarrollo tecnológico

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Geociencias y Medio Ambiente
Medellín, Colombia
2016

A mis padres por el gran apoyo que me brindaron. Por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se puede lograr.

Agradecimientos

Agradezco inmensamente mi familia, mis padres y hermanos por su gran impulso durante toda mi maestría.

Al profesor Santiago Cardona, por su acompañamiento como director de esta tesis y por sus importantes sugerencias durante el desarrollo de este estudio.

A Santiago Campuzano por su apoyo incondicional.

A María Catalina Trejos por compartir sus conocimientos y por sus buenos consejos a lo largo de esta investigación.

A Ángela Uscategui por todas sus enseñanzas en temas microbiológicos.

A Edison Alexander Agudelo por su gran apoyo y colaboración.

A Brinton Urina por su apoyo y amistad.

A la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín, especialmente a la Facultad de Minas, por el apoyo a través de la infraestructura del Laboratorio de Biorremediación y Desarrollo Tecnológico.

A la Corporación Autónoma Regional Del Cesar, Corpocesar por el apoyo brindado en la recolección del suelo.

Al departamento administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación–COLCIENCIAS por el apoyo con la beca Jóvenes Investigadores de la convocatoria nacional N° 645 de 2014.

A Hermes por la financiación de este proyecto con código quiyu 200000013887.

Y a todas aquellas personas que no alcanzo a mencionar, pero que con su apoyo y cariño hicieron posible la realización de este proyecto.

Resumen

El DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil)-etano) constituye una gran parte de los plaguicidas en desuso, el cual se caracteriza por su alta resistencia a la degradación y que aún se encuentra almacenado en muchos países. Es considerado mundialmente como tema de interés investigativo debido principalmente a sus efectos colaterales en el medio ambiente y de salud a los cuales se le asocia.

Medidas biocorrectoras se han empleado en la descontaminación de suelos hace décadas ofreciendo un gran potencial la estrategia de biorremediación. Esta amigable tecnología ofrece ventajas frente a otras tecnologías de carácter químico o físico para eliminar y/o reducir los niveles de concentración de plaguicidas clorados vertidos al suelo debido a su bajo costo.

En la presente investigación se propuso un modelo de gestión ambiental para la degradación de DDT a través de estrategias de biorremediación en condiciones anaerobias. El estudio se realizó sobre un suelo agrícola perteneciente al municipio de Codazzi, Cesar, el cual contaba con un amplio historial de contaminación con DDT.

El estudio constó de dos etapas, una primera desarrollada a escala de laboratorio y una segunda etapa a escala piloto.

Para la primera etapa se evaluaron diferentes tratamientos de biorremediación en condiciones anaerobias: atenuación natural y la aplicación de estrategias de bioestimulación con adición de un co-sustrato: melaza y un aceptor de electrones, KNO_3 . Se evaluó la degradación del contaminante teniendo en cuenta la suplementación de nutrientes de forma individual y combinada. Para cada tratamiento se midieron variables de control como humedad, potencial redox, temperatura y recuento de colonias durante 33 días. Así mismo se midió la concentración de DDT inicial y final de cada tratamiento por cromatografía de gases.

Se estableció una diferencia significativa en los tratamientos aplicados a escala de laboratorio. Para el tratamiento de atenuación natural la concentración de DDT se redujo en un 38.5% con respecto a la concentración inicial del suelo; un 72.3% para el tratamiento con adición de melaza; para el tratamiento con adición únicamente de KNO_3 la concentración de DDT se redujo al 70.2 % y finalmente un porcentaje de remoción de 92.5 %, para el tratamiento con adición de melaza- KNO_3 , siendo este el tratamiento más efectivo.

La segunda etapa consistió en evaluar la tasa de degradación de DDT en condiciones anaerobias aplicando la estrategia de bioestimulación seleccionada en la etapa 1 en un reactor de lecho estático (RLE). En el estudio se conservó el escalado geométrico de las bandejas, relación C:N:P y condiciones anaerobias. Se monitoreó la concentración de DDT cada 4 días durante un periodo de 4 semanas.

La concentración final en el reactor se redujo en un 91.54 % con respecto a la concentración inicial. Se obtuvo una velocidad de biodegradación de 0.077 d^{-1} y un tiempo de vida media de 8.9 días.

Se lograron aislar e identificar a través de pruebas bioquímicas y moleculares cepas microbianas predominantes al inicio y después del tratamiento de bioestimulación en el reactor. Como resultado, se identificaron secuencias para ambas cepas del género: *Bacillus*.

Finalmente, con la información obtenida en el estudio investigativo se formuló un modelo de gestión ambiental que permitiera la incorporación de esta estrategia en la biorremediación de suelos contaminados con DDT.

PALABRAS CLAVES: DDT, bioestimulación, nutrientes, reactor de lecho estático, tratamiento anaerobio, modelo ambiental, atenuación natural.

Abstract

DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane) constitutes a large part of obsolete pesticides characterized by high resistance to degradation and is still stored in many countries. It is regarded worldwide as a subject of research interest mainly due of its side effects on the environment and health to which they are associated

Bio-corrective measures have been used in soil decontamination for decades offering a great potential bioremediation strategy. This friendly technology offers advantages over other chemical or physical based technologies to eliminate and / or reduce the concentration levels of chlorinated pesticides discharges to ground due to its low cost.

In this research is proposed an environmental model for the degradation of DDT through bioremediation strategies under anaerobic conditions. The study used a soil from Codazzi, Cesar which had a long history of DDT contamination.

The study consists of two stages, the first stage was developed to laboratory scale where bioremediation treatments were evaluated in microcosm and a second stage to pilot scale where DDT contaminated soil were treated in a packed- bed reactor.

For the first stage different bioremediation treatments were evaluated under anaerobic conditions: natural attenuation and implementation of biostimulation strategies with addition of a co-substrate: molasses and an electron acceptor KNO_3 . It was evaluated pollutant degradation considering the combination of both nutrients and individually. For each treatment control variables such as moisture, redox potential, temperature and colony counts were measured for 4 weeks. Also the initial and final concentration of DDT and end of each treatment by gas chromatography was measured.

A significant difference was established in the treatments applied to laboratory scale, the concentration of DDT reduced 38.5% compared to the initial concentration of the soil by treating natural attenuation, treatment with addition of molasses concentration reduced DDT to 72.3%, for treatment with only adding KNO_3 was reduced to 70.2% and finally for the treatment addition of molasses and KNO_3 DDT concentration was reduced by 92.5%, which is the most effective treatment.

The second stage involved to evaluate the strategy biostimulation selected in step 1 in a fix bed reactor. It was retained the geometric scaling of the trays, relation C:N:P and the anaerobic conditions. Similarly, DDT concentration was monitored every 4 days for a period of 4 weeks.

The final concentration in the reactor was reduced by 91.54% compared to the initial concentration. It was shown that the kinetics of degradation of DDT is set to a first order kinetic model and daily disappears 0.077 d^{-1} parts of contaminant and half-life of 8.9 days.

Predominant microbial strains were isolated and identified through tests biochemical and molecular tests in contaminated agricultural soil and soil after being applied biostimulation treatment. As a result, the following microorganisms were identified: *Bacillus*.

Finally, with the information obtained in the experimentation was formulated a model of environmental management that allow the incorporation of this strategy in the bioremediation of soils contaminated with DDT.

KEYWORDS: DDT, biostimulation, nutrients, packed bed reactor, anaerobic treatment, environmental model, natural attenuation.

Contenido

Resumen	5
Abstract	7
INTRODUCCIÓN	1
1. Planteamiento del problema.....	4
2. Justificación	5
3. Antecedentes.....	6
4. MARCO REFERENCIAL	9
4.1 Generalidades del suelo	9
4.2 Dinámica de los plaguicidas en el suelo.....	9
4.3 Características del DDT.....	10
4.4 Origen y usos del DDT	11
4.5 Existencias de DDT almacenados en Colombia.....	12
4.6 Impactos del DDT en el ambiente.....	13
4.6.1 Efectos en la salud	13
4.6.2 Efectos a la fauna.....	14
4.7 Destino y comportamiento del DDT en el suelo.....	14
4.8 Degradación del DDT	15
4.8.1 Procesos metabólicos en la degradación anaerobia	16
4.8.2 Ruta de degradación anaerobia del DDT.....	17
4.8.3 Ruta de degradación aerobia del DDT	17
4.9 Biorremediación del DDT	20
4.9.1 Factores que intervienen en la biorremediación.....	20
4.10. Estrategias para aumentar la biodegradación	24
4.10.1 Surfactantes	24
4.10.2 Co-sustratos.....	24
4.11 Tratamientos de biorremediación.....	25
4.11.1 Atenuación natural.....	25
4.11.2 Bioestimulación	26

4.12 Reactor anaerobio de lecho estático	27
4.12.1 Requerimientos ambientales	27
4.12.2 Evaluación de la actividad microbiana.....	28
4.12.3 Modelo cinético de degradación	28
4.12.4 Tiempo de vida media.....	30
5. OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo General.....	31
5.2 Objetivos Específicos	31
5.3 Preguntas de investigación.....	31
5.4 Hipótesis	31
6. METODOLOGÍA.....	32
6.1 Materiales y métodos	33
6.1.1 Equipos	33
6.1.2 Reactivos	33
6.1.3 Recolección de la muestra de suelo	33
6.1.4 Pretratamiento de la muestra de suelo	35
6.2 Desarrollo del estudio.....	35
6.2.1 Montaje a escala de laboratorio	35
6.2.2 Diseño experimental	35
6.2.3 Ensayos de biodegradación	36
6.3 Caracterización físico-química y microbiológica del suelo	37
6.3.1 Técnicas de análisis	37
6.4 Montaje a escala piloto	41
6.4.1 Parámetros de medición en el reactor.....	42
6.4.2 Evaluación de la actividad metanogénica.....	42
7. RESULTADOS.....	43
7.1 Caracterización del suelo	43
7.1.1 Determinación de parámetros físicos	43
7.2 Calculo dosificación de nutrientes.....	45
7.3 Ensayos de biodegradación a escala de laboratorio	46
7.3.1 Concentración de DDT en las bandejas	46

7.3.2	Análisis de Datos	47
7.3.3	Comportamiento de los parámetros físicos en las bandejas	49
7.3.3	Recuento de bacterias heterótrofas para los protocolos	53
7.4	Resultados montaje a escala piloto	54
7.4.1	Comportamiento de parámetros físicos y químicos en el reactor	54
7.4.2	Medición de la actividad metanogénica	56
7.4.3	Cinética de degradación en el reactor	57
7.4.4	Recuento de bacterias heterótrofas en el reactor a lo largo del estudio.....	58
7.4.5	Caracterización bioquímica de las bacterias aisladas.....	59
7.4.6	Identificación de las bacterias aisladas del tratamiento más efectivo	60
8.	DISCUSIÓN.....	62
8.1	Formulación de un plan de manejo ambiental para biorremediar suelos contaminados con DDT mediante bioestimulación ex situ.....	68
8.1.1	Revisión ambiental inicial.....	68
8.1.2	Referentes normativos	69
8.1.3	Participación comunitaria.....	71
8.1.4	Medida de gestión planteada	71
8.1.5	Costos gestión ambiental	72
8.1.6	Implementación de la medida de gestión.....	72
8.1.7	Plan monitoreo y seguimiento.....	73
9.	CONCLUSIONES.....	75
10.	RECOMENDACIONES	77
ANEXOS.....		78
Anexo 1.	Fotografías punto de muestreo. Municipio Codazzi, Cesar	78
Anexo 2.	Montajes en las bandejas	79
Anexo 3.	Fotografías aislamiento de las bacterias predominantes en el tratamiento	80
Anexo 4.	Árbol filogenético muestras B1 y B2	81
Anexo 5.	Gel de agarosa con fragmentos amplificados mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) de colonias aisladas	82
BIBLIOGRAFÍA.....		83

Lista de figuras

Figura 1. Estructura de DDT, DDE y DDD y sus isómeros correspondientes

Figura 2. Vías alternativas en la degradación del DDT

Figura 3. Fases de la degradación anaerobia

Figura 4. Vía anaerobia en la degradación de DDT como sustrato propuesto por la Universidad de Minnesota

Figura 5. Vía aerobia en la degradación de DDT como sustrato propuesto por la Universidad de Minnesota

Figura 6. Esquema de la metodología de trabajo

Figura 7. Puntos de muestreo en el municipio de Codazzi, Cesar

Figura 8. Imagen tridimensional de la zona de muestreo

Figura 9. Parámetros a controlar en cada tratamiento de biorremediación

Figura 10. Reactor de lecho estático

Figura 11. Concentración final de DDT para cada tratamiento en las bandejas

Figura 12. Comparación de medias usando Test Tukey

Figura 13. Comportamiento del pH para los tratamientos en las bandejas durante los días de medición

Figura 14. Comportamiento de la humedad para los protocolos de biorremediación durante los días de medición

Figura 15. Comportamiento de la conductividad en los tratamientos durante el tiempo de muestreo

Figura 16. Crecimiento bacteriano en los en los protocolos de biorremediación para cada tiempo de muestreo

Figura 17. Comportamiento del potencial redox en el reactor para cada tiempo de muestreo

Figura 18. Comportamiento del pH el en el reactor para cada tiempo de muestreo

Figura 19. Valores de temperatura en el reactor para cada tiempo de muestreo

Figura 20. Cinética de la concentración de DDT residual en el reactor

Figura 21. Gráfica de $\ln (C/C_0)$ vs tiempo en el reactor

Figura 22. Crecimiento bacteriano en el reactor durante el tiempo de muestreo

Figura 23. Microscopia óptica en objetivo 100x. (a) Bacterias suelo contaminado. (b) bacterias después del tratamiento de bioestimulación

Figura 24. Esquema del plan de manejo ambiental para biorremediar suelos contaminados con DDT

Lista de tablas

Tabla 1. Ejemplos de bacterias y hongos degradadoras de DDT en un cultivo puro

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del DDT

Tabla 3. Cantidades almacenadas de DDT en Colombia hasta 2006

Tabla 4. Suelo contaminado con COP hasta 2006

Tabla 5. Factores que intervienen en la biorremediación del DDT en suelos

Tabla 6. Composición de la melaza de caña de azúcar

Tabla 7. Tiempos de vida media del DDT

Tabla 8. Tratamientos evaluados a escala de laboratorio.

Tabla 9. Matriz de diseño experimental

Tabla 10. Pruebas experimentales para la caracterización físico-química y microbiológica del suelo.

Tabla 11. Caracterización físico-química del suelo

Tabla 12. Índice de Shannon antes de aplicar el tratamiento.

Tabla 13. Valores medios de la concentración final de DDT en los tratamientos

Tabla 14. Análisis de varianza

Tabla 15. Prueba de homogeneidad de varianzas

Tabla 16. Valores de potencial redox para los tratamientos a escala de laboratorio

Tabla 17. Valores de temperatura en los tratamientos para cada tiempo de muestreo

Tabla 18. Valores de la humedad en el reactor

Tabla 19. Resultados de las pruebas de tinción de Gram y catalasa para los dos morfotipos

Tabla 20. Resultados de la identificación molecular de los aislados B1 y B2

Tabla 21. Normatividad ambiental colombiana en torno a la protección del suelo

Tabla 22. Parámetros de influencia en la bioestimulación

Tabla 23. Etapas a seguir en la fase de implementación del plan de manejo para biorremediar suelos contaminados con DDT

Lista de fotografías

Fotografía 1. Punto de muestreo en el municipio Codazzi, Cesar.

Fotografía 2. Recolección de las muestras de suelo en el municipio Codazzi, Cesar.

Fotografía 3. Montaje de los tratamientos de biorremediación en las bandejas.

Fotografía 4. Montaje del tratamiento de bioestimulación con melaza y KNO_3 .

Fotografía 5. Siembra de colonias para el tratamiento de bioestimulación melaza y KNO_3 .

Fotografía 6. Aislamiento de colonias para el tratamiento de bioestimulación melaza y KNO_3 .

Abreviaturas

ATP: trifosfato de adenosina

ATSDR: Agencia para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades

C:N:P: Proporción molar de carbono, nitrógeno y fosforo

COP: Compuestos orgánicos persistentes

CIC: Capacidad de intercambio catiónico

DDD: Dicloro difenil dicloroetano

DDE: Dicloro difenildicloro etileno

DDT: Dicloro difenil tricloroetano

ICA: Instituto Colombiano Agropecuario

K_{oc}: Coeficiente de adsorción

LB: Medio Luria Bertani

LD₅₀: Dosis letal mediana

MAVDT: Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial

mg: miligramo

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCBs: policlorobifenilos

pH: Potencial de hidrogeno

ppm: Partes por millón

UFC/g: Unidades formadoras de colonias por gramo

16S rRNA: RNA Ribosomico 16S.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se reconoce que la tierra contaminada es una amenaza potencial para la salud humana y su continuo descubrimiento en los últimos años ha llevado a esfuerzos internacionales para remediar muchos de estos sitios, ya sea como una respuesta a riesgos ambientales o para permitir la recuperación del sitio.

El 1,1,1 - tricloro - 2,2-bis (4 - clorofenil) etano (DDT) es un insecticida perteneciente a la familia de los organoclorados con alta toxicidad, persistencia y capacidad bioacumulativa que fue ampliamente utilizado para mantener la productividad de los cultivos, controlar plagas y erradicar vectores transmisores de enfermedades tales como la malaria, tifus y la fiebre amarilla (Sánchez et al., 2006).

Sin embargo, la intención detrás de la utilización de plaguicidas organoclorados fue matar o ahuyentar la plaga objetivo, investigaciones demostraron que su amplio uso dio lugar a varios efectos toxicológicos entre las especies no objetivo, incluidos los seres humanos y el medio ambiente, asociando su exposición con enfermedades cancerígenas y malformaciones genéticas, motivo por el cual la utilización de este compuesto fue prohibido en la mayoría de países desde 1972 (Turusov et al., 2013).

Para el caso colombiano la prohibición de DDT se estableció con cerca de veinte años de diferencia entre países como Estados Unidos y Colombia para el cual en 1986 el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario) restringió su uso a campañas de salud pública contra la malaria, hasta que el año 1993 el Ministerio de Salud prohibió su importación, formulación, comercialización y uso debido a su persistencia prolongada y bioacumulabilidad (Defensoría del pueblo, 2001).

A pesar de su prohibición en muchos países, el DDT aún se encuentra almacenado en varias regiones del mundo. En Colombia se han reportado sitios contaminados por COP (compuestos orgánicos persistentes) en los departamentos de Cesar, Tolima y Atlántico y se estima un total de 5000 m³ de suelo contaminado con DDT (MAVD, 2006).

El municipio de Codazzi, Cesar representa uno de los principales lugares afectados por el remanente desuso de diferentes pesticidas y se estima que entre 1974 y principios de la década de los 90 en el municipio de se dio el uso intensivo de pesticidas entre estos el DDT por la aparición del gusano bellotero *Heliothis virescens*, lo cual empezó a presentar resistencia conllevando a una crisis en la producción de algodón y logrando la acumulación de plaguicidas obsoletos en la zona (Rodríguez, 1999).

El DDT además de presentar una estructura altamente estable es un compuesto hidrófobo lo que limita su degradación en el suelo a través de los procesos físico-químicos. Su baja solubilidad permite que el pesticida sea adsorbido en la superficie del suelo o en la materia orgánica haciéndose menos biodisponible. Como el compuesto objetivo se vuelve menos biodisponible, la descontaminación por microorganismos también disminuye propiciando que el DDT y sus

metabolitos persistan en el ambiente, principalmente en suelos y sedimentos con tiempos de vida media entre 10-50 años (ASTDR, 2002).

Las técnicas convencionales usadas para eliminar contaminantes órgano-persistentes ha sido realizada mediante la incineración, técnicas de contención y confinamiento. Sin embargo, estas alternativas de gestión no resultan ser tan eficientes ya que se pueden producir gases y partículas con un grado de toxicidad incluso mayor al de la sustancia original para el caso de la incineración. En cuanto la alternativa de confinamiento de áreas contaminadas se da una solución ligeramente provisional, pero la contaminación permanece en el sitio e involucra grandes costos al requerir vigilancia y barreras de aislamiento (FAO,1996).

De esta manera la eliminación de DDT en suelos se ha convertido en una prioridad ambiental, utilizando tanto más procesos de remediación fisicoquímicos como biológicos. Aunque estos tratamientos fisicoquímicos resulten ser más rápidos que los tratamientos biológicos, son generalmente más destructivos para los suelos afectados, y a menudo son más costosos que la biorremediación debido a los altos requerimientos de energía (Foght et al., 2001).

En busca de una tecnología amigable con el medio ambiente y que sea viable tanto técnica como económicamente se propone la biorremediación de suelos, la cual aprovecha las propiedades de adaptación de los microorganismos para resistir ambientes desfavorables, tal como se ve que sucede en un suelo contaminado, donde la flora microbiana correspondiente adopta una maquinaria enzimática y ciertas rutas metabólicas específicas que le permiten sobrevivir en presencia de determinados compuestos.

La biodegradación de DDT en suelos puede darse en sistemas aerobios y anaerobios, y estudios reportan que las bacterias anaerobias pueden dechlorar compuestos más fácilmente que las bacterias aerobias, lo cual representa una gran ventaja ya que con este proceso no se requiere la adición de oxígeno y hay menor oportunidad de generar compuestos de hierro como precipitados que puedan contaminar los acuíferos (Litchfield, 2005).

Aun no se reportan investigaciones para biorremediar suelos contaminados con DDT en un reactor de lecho estático, lo que pretende contribuir de forma significativa a la comunidad científica que trabaja en esta área de investigación al ofrecer información en la biorremediación de suelos contaminados con DDT a escala piloto y la posibilidad de la integración de estrategias que permitan finalmente dar solución a problemas ambientales, asociados al recurso suelo.

Dado al limitado conocimiento de la biodegradación anaerobia de DDT a escala piloto, esta investigación tiene como objetivo proponer un modelo de gestión ambiental que permita biorremediar suelos contaminados con este pesticida en ausencia de oxígeno mediante un reactor de lecho estático empleando la técnica de bioestimulación con nutrientes. Para el estudio se utilizó muestras de suelo proveniente del municipio Codazzi, Cesar el cual se caracterizaba por presentar contaminación con DDT.

En el estudio se llevó a cabo una primera fase a escala de laboratorio que consistió en la evaluación de la biodegradación de DDT cuando se aplicaban diferentes protocolos de biorremediación al suelo contaminado. Se utilizó un diseño estadístico completamente al azar

con un factor y 5 niveles correspondientes a los tratamientos en cada bandeja 1) control, 2) atenuación natural, bioestimulación con adición de nutrientes 3) Melaza, 4) Melaza y KNO_3 y 5) KNO_3). La dosificación de nutrientes fue calculada mediante relaciones estequiométricas establecidas por el método de McCarthy entre la concentración de DDT presente en el suelo y la cantidad de nitrógeno y fosforo requeridos para producir biomasa.

Una fase posterior permitió estudiar la tasa de biodegradación de DDT aplicando el mejor tratamiento de bioestimulación obtenido en la primera fase y llevada a cabo a escala piloto en un reactor de lecho estático. Se tuvo en cuenta un escalado geométrico de las bandejas, relaciones de C:N:P y condiciones anaerobias. Para esta etapa se utilizó 60 kilos de suelo contaminado con una concentración inicial de DDT conocida y se mantuvo el suelo a la capacidad de campo, con el fin de conservar condiciones anaerobias.

El tiempo de duración de los tratamientos de biorremediación fue de 33 días para ambas fases de la investigación. Se cuantificó una concentración de DDT inicial y final a través de cromatografía de gases para los tratamientos a escala de laboratorio, a diferencia del estudio a escala piloto donde se midió la concentración de DDT cada 4 días. Se realizó la caracterización físico-química del suelo al inicio y final del tratamiento, donde se midieron parámetros de interés como textura, índice de Shannon, pH, materia orgánica, conductividad, contenido de nitrógeno y fosforo, entre otros.

Se realizó además el recuento de microorganismos heterótrofos cada 4 días durante el tiempo de experimentación para ambas etapas de este estudio. Se aislaron y se identificaron colonias predominantes durante el proceso del mejor protocolo de bioestimulación a través de pruebas bioquímicas y moleculares mediante secuenciación de fragmentos de la subunidad 16S ADNr.

Finalizado la estrategia de bioestímulo se formuló un modelo de gestión ambiental para biorremediar suelos contaminados con DDT, teniendo en cuenta la tecnología valorada. Se plantearon lineamientos para la formulación del plan de manejo ambiental basados en las condiciones iniciales del sitio a descontaminar, aspectos normativos y requerimientos técnicos.

A continuación, en la segunda sección se presentan los antecedentes sobre procesos biológicos que se han utilizado recientemente en la biodegradación del DDT y cuales microorganismos se han identificado como degradadores de este compuesto. En la tercera sección en el marco referencial se describe generalidades del DDT, técnicas de biorremediación, impactos al medio ambiente. Así mismo se detallan los reactores para biorremediar suelos contaminados con DDT y el comportamiento de un reactor de lecho estático. En la cuarta sección se presentan los objetivos generales y específicos que se plantearon en esta investigación. En la quinta sección se describe la metodología, parámetros y métodos utilizados en el desarrollo de la investigación. En la sexta sección se presentan los resultados obtenidos, análisis estadísticos y la significancia de los datos, además los resultados de identificación bioquímica y molecular de las bacterias. La séptima sección se expone la discusión de los resultados y se propone el plan de manejo ambiental para biorremediar sitios contaminados con DDT y finalmente en la última sección se presentan las conclusiones de este estudio.

1. Planteamiento del problema

La necesidad de tener un control efectivo, económico y viable sobre las plagas que afectaron a los seres humanos o a sus actividades económicas en los últimos años, hizo que el uso de plaguicidas e insecticidas se expandiera en el mundo gradualmente. No obstante, la inspección ambiental en aquel tiempo, no proporcionaba estudios evidentes que permitieran identificar los posibles efectos que traería los plaguicidas en un futuro.

El DDT es un plaguicida organoclorado que fue ampliamente usado contra la lucha del paludismo en la década de los 40's y considerado por la EPA (US Environmental Protection Agency) como un compuesto persistente, bioacumulativo y tóxico para el medio ambiente. Este compuesto que puede tardar más de 15 años en degradarse naturalmente representa una gran amenaza a la población, ya que altera la dinámica de la cadena trófica y causa desórdenes genéticos en humanos y animales (Purnomo et al., 2011).

Para el caso de Colombia, desde el año 2007 el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo ha trabajado en la construcción de planes y políticas ambientales que estén en concordancia con lo firmado en el Convenio de Estocolmo en el 2001 sobre la restricción total de las sustancias que se encuentren dentro del grupo COP (Contaminantes Orgánicos Persistentes) y que se caracterizan por ser moléculas orgánicas cloradas, persistentes en el ambiente y de difícil degradación. En este grupo se encuentra el DDT (MAVD, 2006).

En la actualidad, se han encontrado suelos contaminados con este compuesto en algunos departamentos de Colombia entre estos Cesar, Bolívar, Cundinamarca, Tolima y Atlántico; y se estima que hasta el año 2006 un total de 5000 m³ de suelo contaminado en todo el territorio colombiano. Sin embargo, las alternativas de gestión para descontaminar suelos con este pesticida son limitadas debido a que los procesos físico-químicos representan altos costos de tratamiento. (MAVD, 2006).

La biorremediación constituye una de las alternativas más económicas y sostenible para el tratamiento de suelos contaminados con DDT, donde los microorganismos son capaces de degradar estos compuestos o convertirlos a otros menos tóxicos para el medio ambiente (Atlas & Bartha, 2002).

Frente a esta panorámica y con el propósito de ofrecer un modelo de gestión ambiental eficiente que permita dar solución a la problemática asociada a la contaminación de suelos con DDT, se generan algunas preguntas de investigación:

¿Cuáles son los valores de parámetros fisicoquímicos óptimos en el proceso de biorremediación que permiten biodegradar el DDT en condiciones anaerobias en un reactor de lecho estático?

¿La gestión ambiental aplicada a suelos contaminados con DDT permitirá disminuir o atenuar el impacto generado por este pesticida hacia la salud humana y medio ambiente?

2. Justificación

El DDT además de considerarse ubicuo, persistente en el ambiente y acumulable en tejidos de animales y humanos, se ha estudiado que este y sus metabolitos pueden traer serias consecuencias sobre la salud del ser humano (Turusov et al., 2013). Enfermedades como desarrollo de tumores estrógenos, problemas en la función testicular, defectos congénitos en el feto, son atribuidas a la exposición directa o indirecta de los humanos al DDT o por algunos de sus metabolitos (Torres et al., 2007).

Estudios citados hasta ahora en el departamento del Cesar donde se analizó la incidencia de 6 tipos de cáncer, formularon la hipótesis sobre ciertas enfermedades en esas poblaciones tales como: cáncer de vejiga en mujeres, en Agustín Codazzi y El Copey; cáncer de vejiga en hombres, solo en El Copey, y cáncer de piel no melanomas en hombres; puedan estar relacionados con la exposición ambiental a plaguicidas en desuso (Rojas, 2010).

Por otra parte, si bien el suelo es considerado como un recurso necesario para el desarrollo industrial, ha sufrido un deterioro considerable debido principalmente a los compuestos químicos usados en las diferentes industrias. Algunos de estos compuestos han sido reemplazados con el desarrollo de otros plaguicidas menos persistentes pero las consecuencias sobre los ecosistemas permanecen debido a que su efecto tóxico luego de diez años conserva el 50% de la cantidad aplicada, y este el caso del DDT (Fisher, 1989).

Aunque desde 1993 la prohibición y suspensión del DDT fue impuesta por agencias ambientales entre estas la EPA, aún en Colombia quedaron algunos excedentes de plaguicidas COP, bien sea porque su fecha de vencimiento había expirado o porque no se alcanzaron aplicar. Este problema se agravó como consecuencia de algunas prácticas inadecuadas para eliminar dichas existencias, que consistían en enterrar los excedentes y/o los materiales de empaque y envase. Por tanto, se hace necesaria la implementación de un modelo de gestión ambiental que incorpore nuevas tecnologías permitiendo disminuir la toxicidad y concentración de DDT en suelos de una manera viable técnica y ambientalmente amigable por medio de la biorremediación como estrategia de destoxificación.

Muchos estudios se han planteado hasta el momento para la recuperación de suelos contaminados con este pesticida, donde han aprovechado como fuente de carbono y energía algunos compuestos policlorados, entre estos el DDT. Sin embargo, aún no se reporta en Colombia estudios para biorremediar suelos contaminados con DDT a escala piloto en condiciones anaerobias.

De esta forma, en la búsqueda del mejoramiento continuo, se considera necesario realizar estudios investigativos que implementen un modelo de gestión ambiental aplicables a suelos contaminados con DDT, con la finalidad de lograr disminuir los efectos tóxicos que éste plaguicida tiene sobre ecosistemas terrestres y acuáticos y que, hasta la actualidad han sido traducidos en múltiples impactos.

3. Antecedentes

Teniendo en cuenta el potencial de efectos negativos del DDT, se han determinado algunos métodos para eliminar este compuesto del medio ambiente. Dentro de estos métodos se encuentra la biorremediación de suelos el cual ha sido utilizado para degradar o transformar el DDT en compuestos menos tóxicos a través del uso intencional de la biodegradación del contaminante aprovechando algunas propiedades de los microorganismos del suelo (Odukkathil & Vasudevan, 2013).

Algunas bacterias y hongos de la pudrición blanca han demostrado mejorar el proceso de degradación en el suelo. Recientemente, un enfoque biológico ha sido utilizado como un tratamiento respetuoso del medio ambiente y como uso de nuevas fuentes biológicas para degradar el DDT (Purnomo et al., 2011).

(Subba-Rao & M., 1977) emplearon cultivos de *Pseudomonas putida* y sustratos análogos no clorados de metabolitos del DDT como el difenilmetano (DPM), benzidrol (BH) y la benzofenona (BP) con el fin de obtener información sobre las posibles rutas metabólicas. Sin embargo, sólo propusieron la formación de intermediarios posibles a través de tres vías diferentes. En un trabajo posterior de estos mismos autores (Subba-Rao & M., 1985) incluyeron además de bacterias, hongos y usaron el DDT, junto con productos de degradación de este compuesto como sustrato y obtuvieron resultados similares, ya que encontraron más de 20 compuestos diferentes a los introducidos en el medio de cultivo y sugirieron que el metabolismo del DDT puede ocurrir por dos rutas; una deshidrocloración para formar DDE y una decloración reductiva para formar DDD ó una decloración reductiva de DDT a DDD bajo condiciones aerobias.

Dentro del proceso aerobio se ha identificado la participación de algunas especies bacterianas tales como: *Alcaligenes sp.* DG5 (Gao et al., 2011), *Bacillus cereus* (Mwangi et al., 2010), *Pseudomonas putida* (Barragán-Huerta et al., 2007), *Pseudoxanthomonas jiangsuensis* ((Wang et al., 2011), *Sphingobacterium sp* D6 (Fang et al., 2010). Mientras que en la degradación anaerobia se han reportado las especies bacterianas: *Alcaligenes sp.* (Beunink & Rehm, 1988), *Clostridium sp.* (Bao et al., 2012), *Eubacterium limosum* (Sudharshan et al., 2012)

Se ha reportado que *Agrobacterium tumefaciens* acumula el 100% de DDT y el 90% de la dieldrina. Las células de levadura también han sido reportadas para acumular altas concentraciones de DDT, con porcentajes que van desde 94% hasta 97%. Un protozoo ciliado, *Blepharisma intermedium*, acumula más de 90% respecto a la concentración inicial del DDT (Boush & Batterton, 1972). También se ha registrado la degradación del DDT a través de hongos marrón mediante la reacción Fenton, dentro de los cuales los más importantes por su capacidad para degradar el contaminante son *G. trabeum*, *F. pinicola* y *D. dickinsii* (Purnomo et al., 2011).

De esta manera, la mejora del proceso de degradación o mineralización de DDT por microorganismos ha ido ganando popularidad en las últimas décadas y una gran variedad de bacterias y hongos de pudrición blanca han demostrado mejorar el proceso de degradación tanto en cultivos puros como en los suelos naturales (Bo Gao et al., 2011; Purnomo et al., 2011).

Una de las ventajas sobre las que prima la biorremediación es que dado que es un método biológico, es superior a métodos fisicoquímicos en el tratamiento de compuestos clorados, ya que tienen mayores costos de tratamiento y podrían causar contaminación secundaria (Yang et al., 2005). Sin embargo, esta tecnología también presenta algunos limitantes como la capacidad de los microorganismos para degradar el contaminante en campo, la biodisponibilidad del contaminante a diferentes escalas espaciales y temporales.

Además, la experiencia del país en remediación de suelos contaminados se limita a los derrames de hidrocarburos. En cuanto a suelos contaminados por COPs, algunas universidades han hecho investigaciones a nivel de laboratorio, inclusive directamente sobre plaguicidas organoclorados, como reactivo Fenton (Iones ferrosos en presencia de peróxido de hidrógeno), luz ultra violeta y catalizadores, pero aun carecemos de estudios sobre la remediación de suelos contaminados por COPs en cantidades mayores a 1 kg (MAVD, 2006).

Para compuestos como BTEX se han reportado resultados satisfactorios que presentan una alta eficiencia de eliminación de estas sustancias bajo condiciones impuestas en el reactor (Gusmão et al., 2007). Igualmente, para el compuesto 2,4,6 triclorofenol se ha reportado una alta tasa de degradación en un reactor de lecho empacado teniendo en cuenta las características del soporte, forma, tamaño y porosidad, alcanzando altas velocidades de transferencia de oxígeno y la eliminación del 99% del 2,4,6 TCP (Jesús et al., 2009).

(Feidieker et al., 1995) propusieron el uso de biorreactores para remediación de suelos superficiales contaminados con compuestos aromáticos clorados debido a las limitaciones que se encuentran *in situ*, ya que en este último no se tiene control sobre parámetros como pH, temperatura, contenido de agua, aireación y la mejora de nutrientes. El biorreactor construido por (Beunink & Rehm, 1988) logró decloración sincrónica reductiva de DDT a DDD y la oxidación del metabolito DDM con el uso de un cultivo mixto de *Alcaligenes* sp. y *Enterobacter cloacae* co-inmovilizada en alginato de calcio.

En reactores de lecho estático se ha empleado biomasa inmovilizada con el fin de degradar sustancias tóxicas como clorofenoles; tal es el caso del uso de cubos de madera para inmovilizar *Phanerochaete chrysosporium*, estudio en el cual se reportó la degradación de 4-clorofenol, en un rango de 71.1 – 83 % en condiciones de ausencia de fuente de carbono y nitrógeno adicional (Yum & Peirce, 1998).

Además, se ha reportado en la literatura que la presencia de co-sustratos aumenta la degradación del DDT, DDE y DDD en suelo, por aumento de la actividad microbiana (Ortíz et al., 2013). El cometabolismo ha demostrado que ocurre bajo condiciones de laboratorio y podría ser un proceso importante en la eliminación de estos pesticidas desde el medio ambiente (Aislabie et al., 2010). Por lo tanto, la justificación detrás de la utilización de co-sustratos biodegradables para promover la degradación de moléculas persistentes es que estas pueden favorecer el crecimiento microbiano e inducir la activación de enzimas que participan en la degradación del contaminante (Ortíz et al., 2013).

A continuación, en la tabla 1 se presentan ejemplos de algunas bacterias y hongos degradadores de DDT que se han identificado en un cultivo puro.

Tabla 1. Ejemplos de bacterias y hongos degradadoras de DDT en un cultivo puro.

Mecanismo de degradación	Microorganismo	Procedencia	Referencia
Bacteria:			
Declaración reductiva de DDT a DDD	<i>Proteus vulgaris</i>	Intestino de ratón	(Barker et al., 1965)
	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter</i> (anteriormente <i>Enterobacter) aerogenes</i>	Heces de ratas	(Mendel & Walton, 1966)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Bacillus spp. Sludge</i> <i>Flavobacterium sp.</i>	Lodo activado	(Kanta Sharma et al., 1987)
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Lodos de depuradora	(Beunink & Rehm, 1988)
Declaración reductiva del DDT y el anillo escisión de metabolitos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>640X</i>	Suelo	(Golovleva & Skryabin, 1981)
Desciclización meta del DDT	<i>Ralstonia entropba</i>	Suelo	(Nadeau et al., 1994)
Fungi:			
Declaración reductiva de DDT a DDD	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura de cerveza	(Bridges et al., 2011)
Conversión DDT a dicofol	<i>Basidiomycete</i>	Madera	(Katayama et al., 1993)

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 Generalidades del suelo

El suelo es un cuerpo natural que consiste en capas de suelo (horizontes del suelo) compuestas de materiales de minerales meteorizados, materia orgánica, aire y agua. Es importante para la preservación de la biodiversidad, ya que en él se desarrollan procesos fundamentales para el sostenimiento de la vida del planeta. Es un sistema estructurado, biológicamente activo, habitado por una gamma casi infinita de organismos, y en el cual se dan un sinnúmero de interrelaciones de carácter químico, físico y biológico (Utadeo et al., 2002).

La importancia del suelo radica en que es un elemento natural dinámico y vivo que constituye la interfaz entre la atmósfera, la litosfera, la biosfera y la hidrosfera, sistemas con los que mantienen un continuo intercambio de materia y energía. Esto lo convierte en una pieza clave en el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos superficiales, y le confiere la capacidad para desarrollar una serie de funciones esenciales en la naturaleza de carácter ambiental (Alexander, 1981).

Un suelo contaminado es aquel cuyas características han sido alteradas negativamente por la presencia de compuestos químicos de carácter tóxico y que representan un riesgo tanto para la salud como para el medio ambiente. Por lo tanto, es necesario la creación de modelos de gestión ambiental que incluyan de forma integrada componentes físicos, químicos y biológicos del suelo en pro de la recuperación y restauración del suelo (Polo & Hernández, 2002).

4.2 Dinámica de los plaguicidas en el suelo

La dinámica de plaguicidas en los suelos hace referencia a su comportamiento en el mismo, dependiente de numerosos procesos que se llevan a cabo en la matriz edáfica. A su vez, está relacionada con el tiempo de permanencia del plaguicida en los suelos. La presencia de los plaguicidas en los suelos produce por diferentes causas. Independientemente del uso específico que se haga del mismo, el suelo es el que recibe la mayoría de los plaguicidas usados para la protección de los cultivos (Arnold & Briggs, 1990) y dependiendo del método de aplicación entre un 30% y 100% del plaguicida llega directamente hasta él (Fernandes, 2004).

El plaguicida, una vez incorporado al suelo, entra en un ecosistema dinámico y empieza a moverse en el mismo, a degradarse "*in situ*", a desplazarse del sistema inicial a otros sistemas o a mantenerse en él con su estructura original o más o menos degradada durante un período de tiempo variable.

Cuando un plaguicida se introduce en el suelo, una parte de él se adhiere a las partículas del suelo (especialmente a la materia orgánica) a través de un proceso llamado adsorción, y otra parte se disuelve y se mezcla con el agua del suelo. La adsorción de un plaguicida determinado será mayor en suelos con un alto contenido de materia orgánica. Por consiguiente, se considera que la lixiviación del plaguicida será más lenta en esos suelos que en los suelos con un contenido inferior de materia orgánica (Bailey et al., 1973).

4.3 Características del DDT

En la literatura ambiental, el término DDT se usa para referirse a la mezcla de tres formas de DDT: *p,p'*-DDT (85%), *o,p'*-DDT (15%) y pequeñas cantidades de *o,o'*-DDT. Sus productos de degradación o metabolitos son todavía tóxicos, el DDE (diclorodifenildicloroetileno) y el DDD (diclorodifenildicloroetano) (Torres et al., 2007).

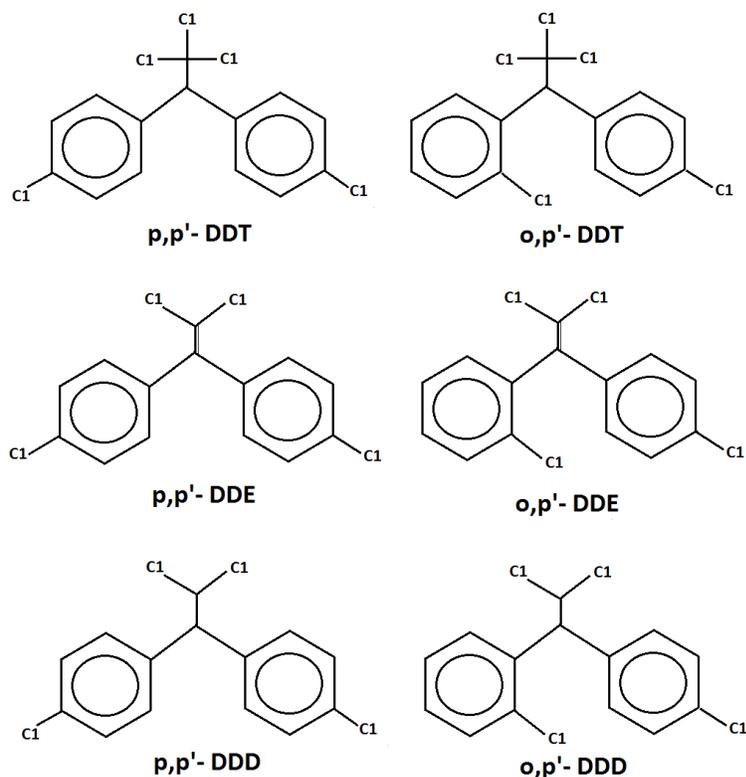


Figura 1. Estructura de DDT, DDE y DDD y sus isómeros correspondientes. Fuente: (Rogan et al., 1979)

El DDT es un insecticida clorado que en su forma pura existe a temperatura ambiente y es incoloro con un ligero olor aromático. Este compuesto es altamente soluble en lípidos, además es muy estable y muy persistente en el medio ambiente (National Toxicology Program, 2011). El DDT y sus derivados se reconocen como perturbadores endocrinos y son muy persistentes en el medio ambiente adquiriendo la característica de compuestos recalcitrantes (Turusov et al., 2013).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del DDT. (National Toxicology Program, 2011)

Propiedad	Valor
Peso molecular	354.5
Gravedad específica	0.98 to 0.99
Punto de fusión	108.5°C
Punto de ebullición	260°C
Log K_{OW}	6.91
Solubilidad en agua	5.50×10^{-6} g/l at 25°C
Presión de vapor	1.6×10^{-7} mm Hg at 20°C

El coeficiente de partición K_{OW} es el índice más apropiado para cuantificar la bioacumulación de un plaguicida. Cuanto es mayor es el coeficiente, mayor es la probabilidad de que el compuesto químico este unido a la materia orgánica de suelos y sedimentos, y en ultimo termino migre a los tejidos grasos de organismos vivos (Baird & Cann, 2014). De la tabla 2 se observa que la molécula del DDT se encuentra en un rango de $\text{Log } K_{OW} > 5$, lo que explica la toxicidad, alta persistencia y carácter no móvil del compuesto.

4.4 Origen y usos del DDT

El insecticida 1,1,1 - tricloro - 2,2-bis - (4 - clorofenil) etano (DDT) ha sido utilizado ampliamente para el control de plagas agrícolas, aunque su síntesis inicial fue en 1874 por un estudiante alemán llamado Othmar Zeidler, las propiedades insecticidas del DDT fueron explotadas mucho más tarde, en 1939 (Smith, 1991; Turusov et al., 2013). Se utilizó en la Segunda Guerra Mundial para combatir la malaria y luego fue empleado por civiles para proteger los cultivos de algunos insectos. Sin embargo, debido a los impactos que se empezaron a notar en 1970, este compuesto fue prohibido por la EPA en EEUU y en la mayoría de países en 1972.

A pesar de que muchos contaminantes han estado presentes desde tiempos inmemoriales debido a fenómenos naturales, la industrialización y el uso intensivo de ciertas sustancias químicas contribuyeron a la contaminación del medio ambiente (Megharaj et al., 2011). A raíz de este hecho en los últimos años ha surgido la necesidad de replantear modelos ambientales que permitan la recuperación de suelos que han sido contaminados con diferentes compuestos ya sean de origen químico o biológico.

El DDT fue utilizado por el Ministerio de Salud en campañas de salud pública para el control de vectores de la malaria; pero debido a su impacto medioambiental se prohibió mediante la resolución 10255 de 1993 del entonces Ministerio de Salud. Entre los años 1994 y 1995 el Ministerio de Salud recogió el producto que había quedado en poder de las unidades regionales y ubicó la mayor parte en la sede del municipio de Honda (Departamento del Tolima), quedando una menor proporción en las bodegas de Bogotá y Cartagena (MAVD, 2006).

Acerca del DDT y de su característica como contaminante orgánico persistente (COP), en el convenio de Estocolmo se estableció que:

“Los contaminantes orgánicos persistentes tienen propiedades tóxicas, son persistentes a la degradación, se bioacumulan y son transportados por el aire, el agua y las especies migratorias, a través de las fronteras internacionales y depositados lejos del lugar de su liberación, acumulándose en ecosistemas terrestres y acuáticos”

Dicho convenio fue firmado por el Gobierno Nacional en el año 2001 y en proceso actual de ratificación busca proteger a los ecosistemas y a la salud humana de la presencia de doce compuestos altamente persistentes en el medio ambiente, dentro de los cuales se encuentra el DDT.

4.5 Existencias de DDT almacenados en Colombia

En Colombia se han encontrado existencias almacenadas hasta el año 2006 de 159812 kg de DDT en las ciudades de Bogotá, Cartagena, Honda y Puerto Inírida, en su mayoría propiedad del Ministerio de la Protección Social, debido a su uso para el control de la malaria. Se estima un total de 5000 m³ de suelo colombiano contaminado con DDT (MAVD, 2006). En la Tabla 3 se presentan las cantidades almacenadas en Colombia.

Tabla 3. Cantidades almacenadas de DDT en Colombia hasta 2006, Fuente: (MAVD, 2006)

Departamento	Lugar	DDT kg
Bolívar	Cartagena	1.890
Cundinamarca	Bogotá	21.920
Tolima	Honda	135.402
Guainía	Inírida	600
Total kg		159.812

En cuanto a la existencia de sitios contaminados, el estudio realizado por (MAVD, 2006) confirmó la presencia de suelo contaminado en los departamentos de César, el cual posee la mayor cantidad de suelo contaminado, Bolívar, Tolima y Atlántico, tal como se muestra en la tabla 4 .La ubicación de estos sitios coincide con las zonas en las que se cultivan productos en los que se hizo un uso intensivo de estos plaguicidas, principalmente las zonas algodoneras del país.

Tabla 4. Suelo contaminado con COP hasta 2006, Fuente: (MAVD, 2006)

Departamento	Cesar	Bolívar	Tolima	Atlántico	
Municipio	Codazzi	Copey	Córdoba	Flandes	Barranquilla
Cantidad estimada de suelo (m ³)	1.983,5	61.2	72	202	60

4.6 Impactos del DDT en el ambiente

4.6.1 Efectos en la salud

Con el amplio uso de los plaguicidas en el mundo, las preocupaciones sobre sus efectos en la salud están creciendo rápidamente. Hay una enorme cantidad de evidencia sobre la relación entre la exposición a los pesticidas y la tasa elevada de enfermedades crónicas tales como diferentes tipos de cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), defectos congénitos y trastornos de la reproducción; además de la evidencia de problemas respiratorios, principalmente asma (Mostafalou & Abdollahi, 2013).

Los efectos tóxicos de DDT y sus análogos han sido estudiados ampliamente en animales de laboratorio, por lo cual la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, IARC, clasifica el DDT como “probablemente cancerígeno para los humanos” en el Grupo 2A.

La exposición a una alta dosis de DDT puede ocasionar la muerte. Dentro de sus efectos en animales se han encontrado aumento en el peso del hígado, daño del citocromo P450, hipertrofia de células hepáticas y necrosis (Smith, 1991). Como el efecto insecticida del DDT prima sobre el sistema nervioso del insecto, se ha observado que, en animales de laboratorio el DDT provoca hiperactividad, temblores y convulsiones (Rogan & Chen, 2005). También se ha reportado el DDT como cancerígeno en ratas y ratones en los cuales ocasiona principalmente tumores hepáticos (Smith, 1991).

El DDT en el cuerpo humano normalmente da lugar a parestesias, mareos, dolor de cabeza, temblores, confusión y fatiga (Smith, 1991). La exposición ocupacional se asoció con una reducción de atención, de respuesta verbal, de velocidad visual, así como el aumento de los síntomas neuropsicológicos y psiquiátricos (van Wendel de Joode et al., 2001).

Varios estudios han reportado que los contaminantes ambientales, incluyendo los contaminantes orgánicos persistentes (COP), son factores importantes que pueden afectar la susceptibilidad a las infecciones y el desarrollo de alergias y asma durante el primero año de vida (Winans et al., 2011). Es así como la exposición infantil a compuestos orgánicos persistentes implica la interrupción del desarrollo adecuado tanto del sistema inmunológico como del sistema respiratorio disminuyendo de esta manera la capacidad para combatir enfermedades, generando un mayor riesgo al desarrollo de manifestaciones alérgicas (Gascon et al., 2013) este efecto es observado principalmente en exposiciones al DDE.

El DDT y el DDE se han encontrado en muestras de sangre, tejido adiposo y leche materna (Torres et al., 2007). Esto se debe a que además de la exposición de los seres humanos al DDT por cuestiones ocupacionales las cuales se dan a través de inhalación y por contacto dérmico, está se da por ingesta de alimentos contaminados (Snedeker, 2001) y al interior del cuerpo se acumula en el tejido adiposo por sus propiedades lipofílicas. Es así como la eliminación de estos compuestos en el cuerpo humano se da mediante la leche materna y a través de la vía urinaria.

Un estudio en México sobre los daños ocasionados por el DDT en la salud humana, determinó que la relación de los efectos tóxicos y de sus metabolitos asociados alteran la reproducción y el

adecuado desarrollo del feto (Torres et al., 2007). Con esto se sugiere la posibilidad de que este compuesto actúe como antagonista del embarazo en la etapa prenatal ocasionando el parto prematuro, además se considera fetotóxico debido a que altera el sistema nervioso y como consecuencia el desarrollo neuroconductual. En América Central y América del Sur, además de algunos países en África y Asia en los cuales el DDT ha sido usado en los últimos años para el control de vectores, las concentraciones en tejidos humanos siguen siendo altas (Rogan et al., 1979).

4.6.2 Efectos a la fauna

El principal problema del DDT es su característica recalcitrante y su capacidad de bioacumularse en la cadena alimentaria; es así como en las aves, la exposición al DDT se produce a través de la cadena trófica debido a la depredación de las especies acuáticas y /o terrestres que tienen carga corporal de DDT, como los peces, lombrices y otras aves. Los efectos sobre las aves se han dado a nivel de reproducción, afectación en la cascara de huevo y muerte de embriones (WHO, 1989). La reducción en el espesor de las cascara de huevo en aves se atribuyó a efectos hormonales y cambios en el metabolismo del calcio ocasionados por la presencia de DDT (Peakall, 1969). Otros reportes indican la feminización de lagartos masculinos en el Lago Apopka en Florida (Guillette et al., 1994), partos prematuros en conejos (Hart et al, 1971) y en leones marinos con altos niveles de residuos de DDT (DeLong et al., 1973).

El uso indiscriminado de compuestos organoclorados en el suelo ha ocasionado fuertes impactos sobre los ecosistemas agrícolas, es así como la presencia del DDT en el suelo causa lesiones en plantas y reduce la productividad de los cultivos (Perfect et al., 1979). La presencia del DDT y de sus metabolitos en el suelo conduce a una reducción en la fertilidad (Mitra & Raghu, 1998).

4.7 Destino y comportamiento del DDT en el suelo

Los productos de degradación del DDT en el medio ambiente del suelo son DDE y DDD, que también son altamente persistentes y tienen propiedades químicas y físicas similares; debido a su baja solubilidad en agua, el DDT se conservará en un mayor grado en los suelos y las fracciones de suelo con una mayor proporción de materia orgánica (WHO, 1989).

En el suelo, el DDT y sus metabolitos permanecen mucho tiempo. La degradación en el suelo ocurre por acción de microorganismos autóctonos. Como estos compuestos se adhieren fuertemente al suelo, algunas partículas de tierra pueden llegar hasta ríos y lagos por escorrentía, contaminando además aguas subterráneas (ASTDR, 2002).

El DDT desaparece más rápidamente cuando recién ha entrado al suelo. Posteriormente, la evaporación se hace más lenta y cierta cantidad de DDT pasa a espacios en el suelo tan pequeños que los microorganismos no pueden alcanzar al DDT para degradarlo. En climas tropicales, el DDT puede desaparecer en mucho menos de un año. En climas templados, la mitad del DDT inicialmente presente generalmente desaparece en cerca de 5 años. Sin embargo, en ciertos casos, la mitad del DDT inicialmente presente permanecerá por 20 o 30 años o más (ASTDR, 2002).

4.8 Degradación del DDT

Aunque los compuestos de degradación del DDT pueden ser generados por reacciones fotoquímicas, los microorganismos juegan un papel importante en su formación en centenares de ecosistemas. Estos microorganismos pueden estar presentes de manera natural o ser inoculados (Quensen et al., 1998). La degradación del DDT en el ambiente puede tomar vías diferentes en función de las condiciones a las cuales se someta, como se puede observar en el esquema de la figura 2.

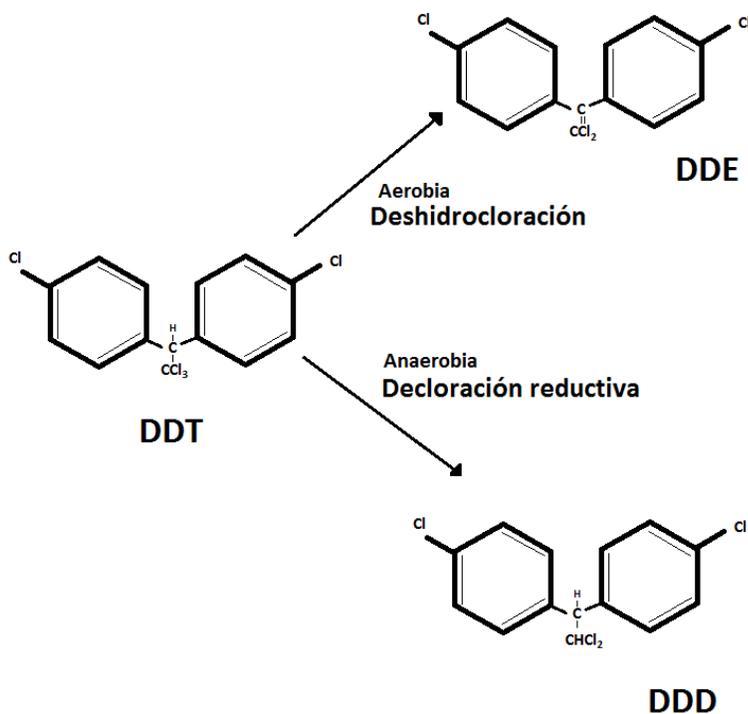


Figura 2. Vías alternativas en la degradación del DDT

En lo que concierne la biodegradación del DDT recientemente ha recibido la atención de diversos estudios. La biodegradación bajo condiciones aerobias se presenta una lenta conversión a DDE, mientras que bajo condiciones anaerobias la conversión hasta DDD resulta mucho más rápida por reacciones de decloración reductiva (R. M. Atlas & Bartha, 1993). Así, se ha reportado que en suelos inundados el DDT se transforma a DDD, con una degradación de 31 días en suelos de rico contenido orgánico. De hecho, el reporte demuestra que la cinética de degradación en este ambiente anaeróbico se incrementa con el contenido orgánico. Asimismo, el estudio prueba que la degradación aerobia es mucho más lenta (Castro & Yoshida, 2002).

El ambiente anaeróbico reduciría el potencial oxido-reductor del suelo, que activaría a las bacterias anaeróbicas presentes en el medio, en tanto el mayor contenido orgánico facilitaría actividad de dichas bacterias al actuar como receptores de los electrones o hidrógenos que resultarían de la función bacteriana. Es más, en condiciones anaerobias el incremento de DDD

en el suelo aumenta el contenido bacteriano del suelo, aunque es capaz de inhibir enzimas tan importantes como la deshidrogenasa (Mitra & Raghu, 1998).

4.8.1 Procesos metabólicos en la degradación anaerobia

La degradación anaerobia describe diferentes procesos de tratamiento anaerobio. El principio básico común entre ellos es el hecho de que la degradación de la materia orgánica presente en los residuos se logra sin requerimientos de oxígeno molecular; es un proceso natural en el cual una variedad de especies de dos reinos totalmente diferentes trabajan juntos para convertir los residuos orgánicos a metano, el cual es una excelente fuente de energía (Rittmann & McCarty, 2001).

Los estudios bioquímicos y microbiológicos realizados hasta ahora, dividen el proceso de descomposición anaerobia de la materia orgánica en cuatro fases o procesos: hidrólisis, etapa fermentativa o acidogénica, etapa acetogénica y etapa metanogénica.

La primera fase es la hidrólisis de partículas y molécula complejas (proteínas de carbono y lípidos) que son hidrolizadas por enzimas extracelulares producidas por los microorganismos acidogénicos o fermentativos. Como resultado se producen compuestos solubles más sencillos (aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga) que son fermentados por las bacterias acidogénicas dando lugar, principalmente, a ácidos grasos de cadena cota, alcoholes, hidrogeno, dióxido de carbono y otros productos intermedios. Los ácidos grasos de cadena corta son transformados en ácido acético, hidrogeno y dióxido de carbono, mediante la acción de los microorganismos acetogénicos. Por último, los microorganismos metanogénicos producen metano a partir de acético, H_2 Y CO_2 .

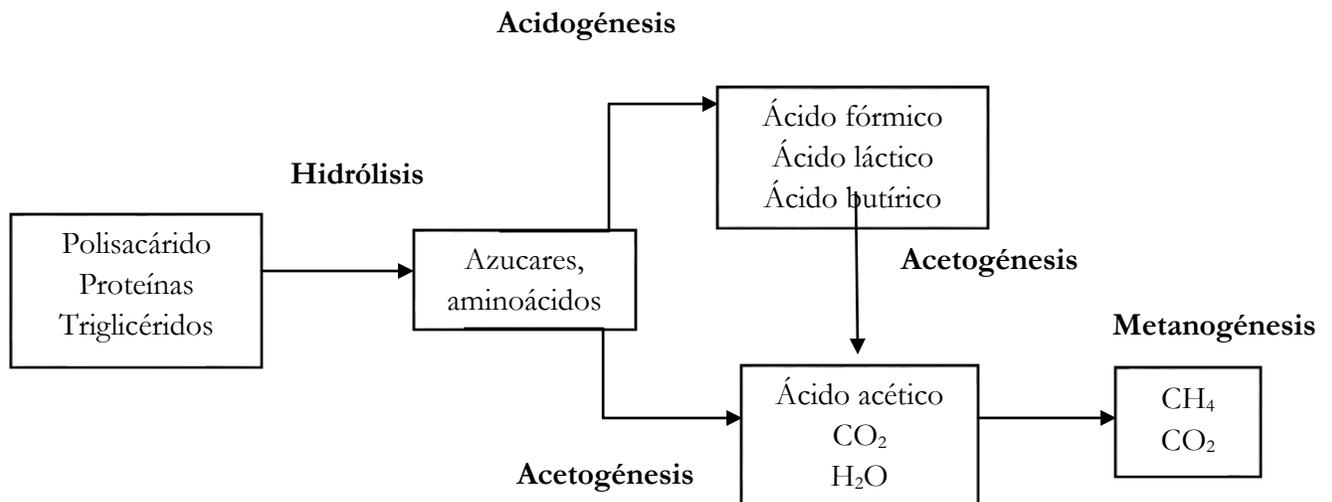


Figura 3. Fases de la degradación anaerobia. Fuente (Nayono, 2009).

4.8.2 Ruta de degradación anaerobia del DDT

La degradación del DDT bajo condiciones anaerobias sigue la ruta propuesta por (Wedemeyer, 1967), que se muestra en la Figura 4. Se propuso la dechloración reductiva para involucrar la degradación anaerobia de DDT. El paso inicial en la ruta de la biodegradación anaeróbica implica deshalogenación reductiva de DDT para formar DDD.

En la figura 4 las reacciones A, D, E y F son pasos múltiples cuyos intermediarios no han sido plenamente identificados, los cuales son catalizados por la enzima dehalogenasa DDT reductiva para producir DDD. El paso E y sus sucesores degradan DDM aeróbicamente. Los pasos B y C pueden ser reacciones no enzimáticas. *Synechococcus sp.* y *Klebsiella pneumoniae subsp.*, son los organismos que pueden iniciar esta ruta de degradación, pero otros microorganismos también pueden llevar a cabo los pasos sucesivos posteriores (Betancur, 2013).

Las condiciones anaerobias optiman la descomposición de algunos pesticidas clorados o su conversión a otros compuestos en el suelo, demostrándose que la adición de residuos de alfalfa incrementa la conversión de DDT a DDD, ya que provee a los microorganismos de nutrientes como carbohidratos solubles y aminoácidos que ejercen un efecto favorable sobre la transformación (Ko & Lockwood, 1968).

4.8.3 Ruta de degradación aerobia del DDT

La ruta de degradación aerobia de DDT se presenta en la Figura 5. En condiciones aerobias, el DDT sufre deshidrocloración, que implica la eliminación de HCl y la formación de un doble enlace entre los átomos de carbono en la cadena de alquilo de DDT.

En el paso A, el DDE es atacado por una dioxigenasa en las posiciones orto y meta. Este ataque da como resultado al intermediario 2,3-dihidrodiol-DDE. En los pasos B y D, el 2-(4'-clorofenil)-3,3-dicloropropenoato produce, vía decarboxilación, el 1,1-dicloro-(4'-clorofenil) etano, el cual sufrirá oxidación en el lado alifático de la cadena para producir 1,1-dicloro-(4'-clorofenil) etanol, que es nuevamente oxidado a 4-cloroacetofenona.

El grupo metilo terminal del 1,1-dicloro-(4'-clorofenil) etano, sufrirá también oxidación para producir ácido fenilacético. En el paso C, la transformación de 4-cloroacetofenona a 4-cloronenzaldehído puede darse mediante oxidación y subsecuente decarboxilación del grupo metilo terminal. En el paso E, el producto resultante del rompimiento del anillo será degradado a un ácido clorado de 5 o 6 carbonos, dependiendo del sitio donde ocurra el rompimiento hidrolítico (Betancur, 2013).

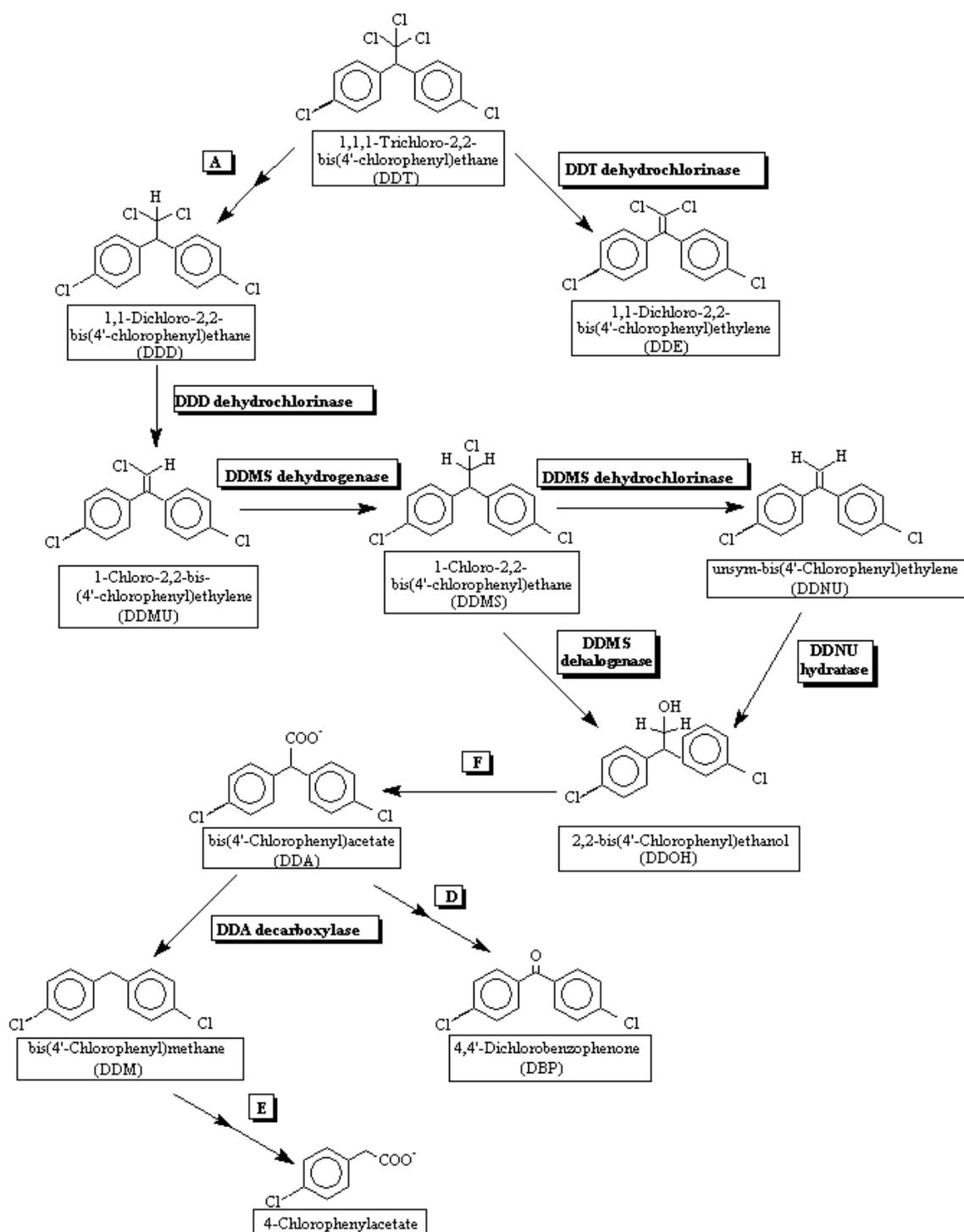


Figura 4. Vía anaerobia en la degradación de DDT como sustrato propuesto por la Universidad de Minnesota (University of Minnesota Biocatalysis, 1998).

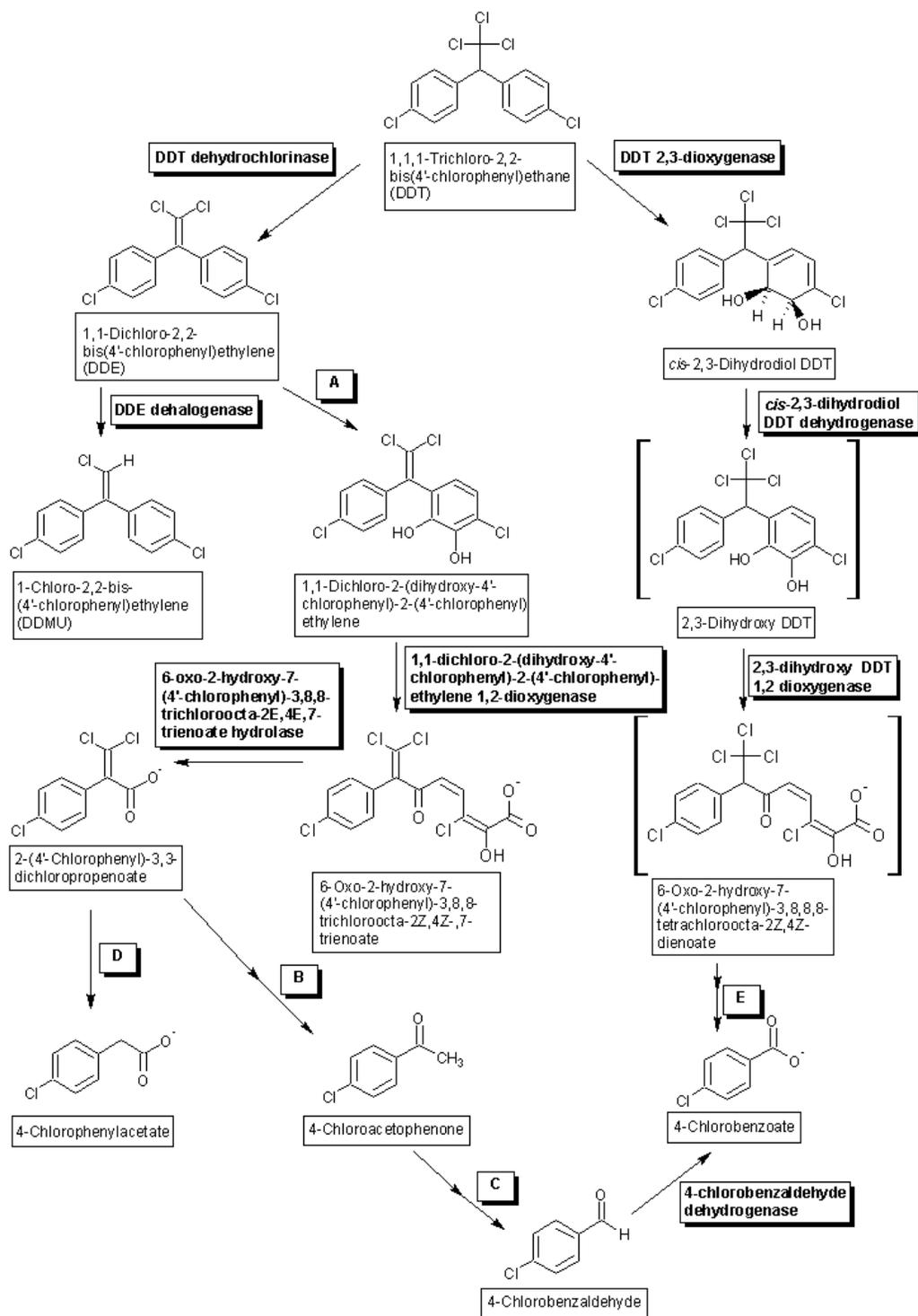


Figura 5. Vía aerobia en la degradación de DDT como sustrato propuesto por la Universidad de Minnesota (University of Minnesota Biocatalysis, 1998).

4.9 Biorremediación del DDT

La biorremediación es la aplicación de los procesos biológicos para el tratamiento de aguas residuales, suelos y lodos. (Cookson, 1995) propone que la biorremediación conlleva el uso de enzimas provenientes de microorganismos, como catalizadores de la destrucción de un compuesto peligroso específico, esta sustancia puede o no ser el sustrato. Para que un proceso de biorremediación sea exitoso se requiere que los contaminantes sean biodegradables y estén disponibles para los microorganismos.

Un enfoque mejor que estos métodos tradicionales es destruir completamente los contaminantes, o si es posible, al menos transformarlos a sustancias inocuas (Shinde, 2013). Es así como la biorremediación implica la capacidad de los microorganismos para eliminar contaminantes y se ha presentado como la tecnología más prometedora, relativamente eficiente y rentable para llevar a cabo el proceso de eliminación de contaminantes (Megharaj et al., 2011).

Así como en los tratamientos físico-químicos, las técnicas de biorremediación se pueden clasificar en *in situ* o *ex situ*. En los tratamientos *ex situ* el suelo es excavado y transportado hasta la localización donde se implementará la tecnología, mientras que en los tratamientos *in situ* el suelo es tratado en su emplazamiento natural. Para la selección del sistema de biorremediación y su integración con otras tecnologías, es importante el conocimiento de las propiedades químicas y físicas del xenobiótico o contaminante.

La biorremediación del DDT en los suelos o sedimentos, presenta una complicación ya que existe una fuerte unión entre el contaminante y las partículas sólidas, de manera que la disponibilidad de éste para ser degradado por microorganismos no es siempre posible.

4.9.1 Factores que intervienen en la biorremediación

De acuerdo a sus propiedades y las características químicas del plaguicida como en el entorno en el que se encuentra depositado, la vida media de ellos puede variar de días a meses. Muchos plaguicidas se degradan rápidamente en el suelo, proceso denominado mineralización, en el cual el plaguicida es transformado en compuestos más simples, como CO₂, NH₃ y H₂O. El resultado de este proceso es causado por reacciones de hidrólisis, fotólisis y también por procesos de degradación metabólica mediada por microorganismos, los cuales utilizan los plaguicidas como fuente de carbono. Según el tipo de plaguicida del que se trate, su presencia en el suelo puede generar una selección e inducción de microorganismos que pueden descomponer más rápidamente producto (Noguera Solís, 2008).

Los factores que influyen en la biodegradación del DDT suelo está en función de varios aspectos, pero principalmente de: su contenido de nutrientes, del tipo de suelo, de sus características fisicoquímicas, materia orgánica, ciclos anaerobios/aerobios, así como, de las precipitaciones pluviales y de la temperatura ambiental.

Tabla 5. Factores que intervienen en la biorremediación del DDT en suelos Fuente: (Sudharshan et al., 2012)

Factor	Propiedad	Efecto sobre los microorganismos	Efecto sobre el contaminante
Tipo de suelo	Textura	Diversidad de microorganismos presentes	Biodisponibilidad del contaminante
	Materia orgánica	Actividad microbiana	Sorción: incremento de la materia orgánica en suelo
Condiciones del suelo	Humedad	Efectos en Hidratación y metabolismo	Incremento biodisponibilidad
	Potencial redox	Importante en metabolismo anaerobio	Decloración
	pH	Actividad microbiana	
	Temperatura	Actividad metabólica varía con la temperatura	Afecta solubilidad, sorción, viscosidad y volatilización.

A continuación, se describen detalladamente los factores y su influencia tanto en los microorganismos como en el contaminante.

4.9.1.1 Tipo de suelo

La textura se refiere a la composición del mismo en grupos de partículas de diferentes tamaños, de ahí que los suelos puedan clasificarse en arenosos, limosos y arcillosos, dependiendo del grupo de partículas que predominen en ellos.

Los suelos de textura fina (arcillosos) se compactan con más facilidad. Esto reduce el espacio poroso, lo que limita tanto el paso del aire como del agua a través del suelo, limitándose así el transporte de nutrientes y proliferación de microorganismos aerobios (Foundation for Agronomic Research, 1988).

4.9.1.2 Disponibilidad de nutrientes

Entre los nutrientes de mayor relevancia en el suelo se encuentran, el nitrógeno el fósforo y el potasio. Diversas citas coinciden en señalar al nitrógeno como el principal limitante por su intervención en la formación de proteínas (Foundation for Agronomic Research, 1988).

Nitrógeno: es un componente esencial de proteínas para las bacterias; la necesidad de nitrógeno puede afectar la velocidad del crecimiento. Cuando hay poco nitrógeno, la población microbiana no tendrá un desarrollo óptimo. En contraste, demasiado nitrógeno permite el crecimiento microbiano rápido y acelera la descomposición, pero éste puede crear problemas serios de olor en condiciones anaerobias. Se debe considerar que el nitrógeno puede perderse rápidamente en el suelo debido a la lixiviación del amonio y el nitrato, y por la desnitrificación del suelo (Refugio et al., 2011).

Fosforo: El fósforo es necesario para formar los ácidos nucleicos; forma parte de las membranas celulares y necesario para el ATP (Adenosin trifosfato). En general, los suelos tienen un bajo contenido de fósforo debido a su baja solubilidad y biodisponibilidad, pues precipita en presencia de cationes como Ca^{+2} , Mg^{+2} y Fe^{+3} en un pH desde neutro, hasta alcalino. El fósforo orgánico en suelos se encuentra principalmente en los ácidos húmicos, mientras que el fósforo inorgánico se encuentra en combinación con el Fe, Al, Ca, F. El fósforo es un elemento deficiente en los suelos contaminados (Refugio et al., 2011).

4.9.1.3 Disponibilidad de donantes y aceptores de electrones

La respiración microbiana no es más que la energía que requieren para desarrollar sus funciones vitales, mediante una secuencia compleja de reacciones oxidación y reducción. Mediante la respiración, los electrones son transferidos desde un donante a un aceptor a través de un transportador biológico de electrones, produciendo energía química, la cual es almacenada en moléculas de trifosfato de adenosina (ATP). Por ende, la oxidación se refiere a la remoción de electrones de un átomo o una molécula y la reducción es el proceso inverso (adición de electrones). El tipo de aceptor de electrones utilizado establece el tipo de metabolismo, determinado las reacciones específicas pueden ocurrir o no ocurrir (Noguera Solís, 2008).

En muchos casos de deshalogenación reductiva el compuesto halo-orgánico juega el papel de aceptor final de electrones en respiración anaeróbica, donde la energía liberada en la oxidación del donador de electrones se utiliza para formar gradiente de protones y posteriormente para sintetizar ATP. Este proceso se conoce con el nombre de halorespiración o deshalorespiración y las bacterias implicadas en él normalmente son anaeróbicas obligatorias. En este sentido, para estimular la halorespiración es necesario asegurar las condiciones anaeróbicas y adicionar fuentes de carbono y un donador de electrones (Arbeli, 2009).

En condiciones anaerobias los aceptores de electrones son con frecuencia el limitante, lo que significa que existe una competencia entre el aceptor y poblaciones indígenas. Por lo tanto, el aceptor de electrones en condiciones anaerobias afectará la composición de la comunidad. Así el aceptor final, con mayor generación de energía será preferible al de menor generación.

Los aceptores de electrones con potenciales de reducción más altas que se utilizan preferentemente: $\text{O}_2 > \text{NO}_3^- > \text{halo-orgánicos} > \text{SO}_4^{2-} > \text{HCO}_3^-$.

4.9.1.4 pH

Los microorganismos se desarrollan adecuadamente entre un pH alrededor del neutro (6-7), debido al hecho que las enzimas (al ser aminoácidos) requieren un grado de protonación para controlar su actividad, donde está a su vez es controlada por el pH (Alvarado et al., 2003). Es por esto razón que muchos microorganismos no son capaces de tolerar valores extremos de pH, debido a que algunos compuestos naturales tienden a hidrolizarse o se desnaturalizan algunas enzimas (Atlas & Bartha, 2002).

4.9.1.5 Temperatura

La temperatura adecuada es uno de los factores más importantes en la actividad microbiana o su metabolismo. El metabolismo suele acelerarse con el aumento de temperatura hasta alcanzar un valor óptimo, donde el crecimiento es mayor. Según (Chapelle, 2001), la mayoría de las bacterias presentes en ambientes subsuperficiales son muy bajas.

4.9.1.6 Materia orgánica

La fracción húmica del suelo proviene del metabolismo de la materia orgánica en el suelo. Se divide en: ácidos húmicos, ácidos fulvicos y la fracción insoluble de humus. La importancia de la presencia de estos ácidos radica en el hecho de que el DDT puede unirse químicamente a esos sin modificar considerablemente su estructura y a través de las variaciones de pH que favorezcan la solubilización de estos ácidos el DDT puede verse conjuntamente solubilizado con ellos. Entre ambos, el DDT presenta mayor afinidad por los ácidos húmicos. No se ha reportado interacción química con la fracción insoluble del humus (Lichtenstein et al., 2002).

4.9.1.7 Biodisponibilidad

La biodisponibilidad se verá incrementada en suelos inundados como el resultado del arrastre del DDT unido a la fracción orgánica transformada. Esto se ve sostenido por resultados que han arrojado numerosos bioensayos, en los cuales el incremento en la LD₅₀ demuestra una mayor biodisponibilidad de DDT para ser incorporado en organismos para casos de suelo inundados (Noguera Solís, 2008).

4.9.1.8 Humedad

La humedad es un factor prioritario en la biodegradación de contaminantes del suelo, debido a que la actividad microbiana, como el número de microorganismos, puede disminuir cuando el contenido de la humedad se encuentra por debajo de los niveles óptimos.

Los microorganismos requieren de un medio acuoso para transportar los nutrientes y llevar a cabo su metabolismo. Debido a que el agua es el mayor componente del citoplasma de las células, una cantidad adecuada permitirá el movimiento de nutrientes tanto al interior de las células, como en la matriz del sistema. De acuerdo con ello, la humedad afecta entonces el crecimiento y actividad microbiana: una baja cantidad de agua dará origen a zonas secas lo cual disminuiría dicha actividad, mientras que una alta cantidad de agua inhibirá el intercambio de gases y por lo

tanto la transferencia de oxígeno dentro y a través del suelo (lo cual dará origen a zonas anaerobias). El contenido de humedad también depende de la materia orgánica y de la textura del suelo: uno con alta cantidad de materia orgánica retiene más agua y, por el contrario, suelos arenosos retienen menos agua. El rango óptimo de contenido de agua en un suelo, para la biodegradación, suele estar entre el 30 y el 80% de la capacidad de campo (Refugio et al., 2011).

Bajo condiciones de inundación de suelos, la materia orgánica acelera el consumo de oxígeno por la flora de del suelo y provee un potencial reductor para la conversión de DDT a DDD. El papel de la materia orgánica es el de enlazarse al DDT y solubilizarla (Noguera Solís, 2008).

4.10. Estrategias para aumentar la biodegradación

4.10.1 Surfactantes

Una posible forma de aumentar la biodisponibilidad de compuestos orgánicos hidrofóbicos, como los compuestos organoclorados, en un suelo contaminado es mediante el uso de surfactantes, que se caracterizan por tener una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica.

Es un factor que controla el ataque microbiano de los compuestos xenobióticos. Muchos de ellos son bastante hidrofóbicos y, por tanto, no muy solubles en agua. La adsorción de esos compuestos xenobióticos a la materia orgánica y a la arcilla de suelos y sedimentos impide que los microorganismos accedan a ellos.

La adición de tensoactivos o emulsionantes suele aumentar la biodisponibilidad, y por ende la biodegradación de compuestos xenobióticos (Madigan et al., 2004). Sin embargo, estudios realizados para biorremediar suelos contaminados con DDT demostraron que el efecto de la adición de un surfactante fue inhibitorio, al comparar con la remoción obtenida por tratamientos de bioestímulo (Betancur, 2013).

4.10.2 Co-sustratos

Un número considerable de compuestos (glucosa, melaza, extracto de levadura, etanol, metanol, piruvato, acetato, etc.) han sido usados en la literatura como co-sustratos en la degradación de pesticidas en suelos y sedimentos (Chang et al., 2008; Liang et al., 2007).

Generalmente, la presencia de estos sustratos podría incrementar la presencia de bacterias heterótrofas en el suelo, así como hongos autóctonos, y como consecuencia aumentar la biodegradación de compuestos organoclorados. Además, el co-sustrato puede hacer variar la relación C:N en el suelo, favoreciendo el crecimiento microbiano e incrementando la producción de enzimas involucrados en la degradación de compuestos organoclorados y sus intermediarios (Lu et al., 2011). Sin embargo, el efecto de los co-sustratos también puede ser adverso, al competir como fuente de carbono y energía con el contaminante presente en el suelo (Quantín et al., 2005).

4.10.2.1 Melaza

La melaza es conocida por ser una eficiente fuente de carbono utilizada como co-sustrato para la remediación de contaminantes en el suelo. Siendo un subproducto importante de la producción de azúcar, la melaza contiene acerca del 50% de azúcar en forma de sacarosa, glucosa y fructosa incluido carbono, nitrógeno, fósforo, vitaminas y minerales que pueden favorecer significativamente un aumento en la actividad bacteriana.

La composición de las melazas es muy heterogénea y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad de caña de azúcar, suelo, clima, periodo de cultivo, eficiencia de la operación de fábrica, sistema de ebullición de azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores entre otros. Por otro lado, la melaza de caña se caracteriza por tener grados Brix o sólidos disueltos de 68- 75% y un pH de 5.0-6.1 (Castro, 1993). Los valores promedio de la melaza se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Composición de la melaza de caña de azúcar. Fuente (Vega-Baudrit et al., 2008)

Componente	Composición (%)
Agua	20
Sacarosa	35
Glucosa	7
Levulosa	9
Sustancias reductoras	3
Otros carbohidratos	4
Cenizas	12
Compuestos nitrogenados	4.5
Compuestos no nitrogenados	5
Ceras, esteroides y esterofosfolípidos	0.4

Se han realizados estudios con adición de melaza para remediar suelos contaminados con PCBs y explosivos (2,4,6-trinitrotolueno). (In et al., 2008) demostraron buenos resultados con porcentajes de degradación de TNT de aproximadamente de 97% con la adición del co-sustrato.

4.11 Tratamientos de biorremediación

Dos métodos llevados a cabo para biorremediar suelos contaminados con DDT o con este tipo de contaminantes como lo son los PCBs son la atenuación natural y la bioestimulación y se describen a continuación:

4.11.1 Atenuación natural

La atenuación natural es un método de remediación pasiva que depende de los procesos naturales para degradar y disminuir los contaminantes en el suelo y el agua subterránea (Kao et

al., 2001). Los resultados de la atenuación natural dependen de la presencia o ausencia de los microorganismos degradadores adecuados, oxígeno disuelto y el nivel de nutrientes y de la biodisponibilidad de los contaminantes (Menendez-Vega et al., 2007).

Los contaminantes durante el proceso de atenuación natural se transforman en compuestos menos tóxicos mediante una serie de procesos que incluyen degradación debida al metabolismo microbiano, dispersión, dilución, sorción y volatilización (Brown et al., 2007).

Es más frecuente, utilizar la atenuación natural como una segunda etapa de recuperación, tras una primera fase en la que se aplica alguna otra tecnología y se elimina con ella la mayor parte de la contaminación. En general, funciona mejor en los casos en que es posible eliminar la fuente de contaminación y, por tanto, dejan de incorporarse contaminantes al terreno.

Existe también la atenuación natural monitoreada la cual consiste en controlar las condiciones de la biodegradación para crear un ambiente adecuado y permitir que se dé con mayor velocidad la degradación del DDT. Kaštánek et al. (1999) reportaron atenuación natural en un terreno industrial contaminado con una mezcla de PCBs; se muestra que en condiciones de campo ocurren algunos pequeños cambios en la composición de los PCBs, explicada como algún tipo de biodegradación principalmente en las capas superficiales del suelo (Kaštánek, Demnerová, Pazlarová, Burkhard, & Maléterová, 1999).

4.11.2 Bioestimulación

La bioestimulación consiste en estimular a los microorganismos autóctonos de un ambiente natural por medio de la adición de nutrientes y otros aditivos, de humedad y la aireación del sistema para así mejorar la eliminación de los contaminantes. En lo que se refiere a la adición de nutrientes, la biorremediación requiere que estos entren en contacto con el área impregnada por el contaminante y que su concentración sea suficiente para soportar el crecimiento máximo previsto de la población degradadora en el transcurso de las operaciones de remediación.

La degradación microbiana del DDT en el suelo puede ser mejorada mediante la adición de nutrientes, así lo demuestran estudios como el de Bidlan et. al en el que concluyen que el enriquecimiento del medio permite la degradación del contaminante por el microorganismo *Serratia marcescens* DT-1P (Bidlan & Manonmani, 2002).

La presencia de micronutrientes puede también afectar la reacción de dechloración, como ha sido demostrado con la presencia de hierro con estado de oxidación cero, que actuando como agente reductor y eficiente donador de electrones puede efectivamente ayudar en la dechloración de DDT y sus metabolitos por parte de microorganismos del suelo (Yao et al., 2006). Caso similar se observó para *Shewanella decolorationis* S12, la cual fue capaz de reducir DDT a DDD bajo condiciones anaerobias, en la que la tasa de transformación de DDT fue acelerada por la adición de α -FeOOH, siendo la dechloración reductiva mejorada por el Fe(II) biogénico en la superficie del α -FeOOH (Li et al., 2010).

Para determinar la cantidad de nutrientes a suministrar en el suelo se utiliza el modelo conceptual de McCarty (Rittmann & McCarty, 2005) el cual consiste en proponer la degradación del

contaminante hasta su forma más oxidada y ajustar el balance estequiométrico con fuentes de fósforo y nitrógeno.

4.12 Reactor anaerobio de lecho estático

El éxito de un proceso de biorremediación a escala piloto depende significativamente de la comprensión de aspectos ingenieriles como la biocinética, transferencia de masa (nutrientes y oxígeno) y el diseño del biorreactor (Huang et al., 2012).

Un reactor de lecho estático o fijo consiste básicamente en una columna de relleno sobre la cual se desarrollan y fijan las bacterias anaeróbicas. El desarrollo de los microorganismos sobre un medio sólido hace que se logren tiempos de retención celular muy elevados con bajos tiempos de retención hidráulica.

Los biorreactores pueden usarse para tratar suelos heterogéneos y poco permeables, o cuando es necesario disminuir el tiempo de tratamiento, ya que es posible combinar controlada y eficientemente, procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoren y aceleren la biodegradación (Riser-Roberts, 1998). Es la tecnología más adecuada cuando existen peligros potenciales de descargas y emisiones.

El diseño y el modo de operación del reactor deberá ser tal que permita monitorear estos parámetros para controlar la degradación del DDT y mantener activos los microorganismos allí presentes. Un factor importante es el coeficiente de transferencia de masa ya que la determinación de este permite conocer la etapa que controla el proceso de degradación y sirve para investigar la cinética química de la degradación del producto orgánico contaminante (Valverde García et al., 1998).

4.12.1 Requerimientos ambientales

Algunos requerimientos de que se deben tener en cuenta en la operación del reactor:

✓ Nutrientes

Se requiere la presencia de macronutrientes (N, P, S) y micronutrientes (Fe, Zn, etc) en proporciones adecuadas para atender las necesidades de los microorganismos. Estos elementos se encuentran presentes en el líquido residual doméstico.

✓ Temperatura

La temperatura es una de las variables que más influyen en el proceso, cuya eficacia decrece por debajo de 15°C ya que la depuración se debe fundamentalmente a la sedimentación, mientras que por encima de 15 °C la biodegradación se incrementa. La temperatura afecta la actividad de los microorganismos, determina la cantidad de energía neta producida e influye en la relación pH-alcalinidad. Los ambientes anaeróbicos en relación con la temperatura pueden subdividirse en tres categorías: psicrófilico (0 a 20°C), mesófilico (20 a 40°C) y termófilico (45 a 65°C). Si el

intervalo de temperatura en el reactor cambia, es necesario arrancar el reactor de nuevo. En el rango mesofílico, la actividad y el crecimiento de las bacterias disminuye a la mitad por cada 10°C de descenso por debajo de 35°C.

Los cambios de temperatura en el intervalo mesofílico pueden tolerarse normalmente, pero cuando la temperatura desciende la carga también debe disminuirse de acuerdo con el descenso de la actividad esperada.

✓ pH

La influencia del pH sobre la producción de metano está relacionada con la concentración de AGV (ácidos grasos volátiles). Los diferentes grupos bacterianos presentan niveles de actividad satisfactorios a pH próximos pero un poco diferentes; los hidrolíticos entre 7.2 y 7.4, los acetogénicos entre 6.5 y 7.5. Las bacterias metanogénicas disminuyen su actividad si el pH aumenta por encima de 7.8. Cuando la capacidad metanogénica está continuamente sobrecargada y no se añade la base necesaria para neutralizar los AGV presentes, el sistema de tratamiento se convertirá en un reactor de acidificación, el pH de este efluente estará entre 4.5 y 5.

- ✓ Ausencia de oxígeno
- ✓ Ausencia de sustancias tóxicas, tales como metales pesados, sulfuros.

4.12.2 Evaluación de la actividad microbiana

Para evaluar la actividad microbiana se utiliza el test de AME (Actividad Metanogénica Específica).

La AME puede definirse como la máxima capacidad de producción de metano por un grupo de microorganismos anaerobios, realizada en condiciones controladas de laboratorio que permita la máxima actividad bioquímica de conversión del sustrato orgánico a metano (Chernicharo, 2007).

La determinación de la actividad metanogénica es una prueba de biodegradabilidad de gran utilidad para el control del proceso de un tratamiento en un reactor anaerobio. El ensayo no solo resulta aplicable para selección del inóculo sino también para la puesta en marcha y el seguimiento del proceso.

Para cuantificar la producción de metano, existen métodos sofisticados con medición manométrica o cromatografía o tan simples como el uso de mediciones volumétricas. El primero demanda equipos con especificaciones técnicas especiales (Ej. Sistema OXITOP para AME) y el segundo necesita de un montaje sencillo, sin mayores requerimientos (Amaral et al., 2008).

4.12.3 Modelo cinético de degradación

Las reacciones de degradación de los pesticidas en suelos pueden seguir cinéticas de distinto orden. Pero de forma general, se pueden describir como modelos cinéticos de primer orden que describe la degradación del plaguicida en función del tiempo.

La velocidad de degradación dependerá principalmente de parámetros como pH, temperatura y humedad. El pH generalmente ideal es el neutro, aunque en algunos procesos puede oscilar entre 6 y 9. En cuanto a la temperatura define el tipo de microorganismos presentes en el proceso y la humedad es el medio de transporte del sustrato; estos parámetros son cruciales en el proceso de degradación por lo que deben estimarse de tal manera que se obtenga una velocidad máxima de conversión del DDT a sus metabolitos y de sus metabolitos a compuestos menos tóxicos.

Se describen a continuación las ecuaciones que llevan al modelo cinético de primer orden:

Balance de masa

La ecuación general para el balance de masa es:

$$V \frac{dC}{dt} = \sum Q_{entra} C_{entra} - \sum Q_{sale} C_{sale} \pm (V \times \gamma) \quad (4.1)$$

Donde:

V: es el volumen del reactor, C: Concentración del DDT. γ : Velocidad de reacción.

Q: Velocidad de flujo.

Por ende, si el sistema opera en modo batch la ecuación de balance de masa (4.1) se tendrá un término de masa acumulada igualada a masa generada o destruida. Así:

$$V \frac{dC}{dt} = \pm (V \times \gamma) \quad (4.2)$$

Ecuación de velocidad

$$\gamma = \frac{dC}{dt} = -kC^n \quad (4.3)$$

La velocidad de reacción en este caso estará en términos de la concentración del DDT que es la sustancia de interés. En este caso, n es el orden de la reacción y k es la constante de reacción. Para este estudio se puede tomar n igual a uno (reacción de primer orden) lo que implica que la velocidad de reacción depende sólo de la concentración de las especies. Integrando la ecuación 4.3, se tiene lo siguiente:

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt \quad (4.4)$$

$$\frac{C}{C_0} = e^{-kt} \quad (4.5)$$

Donde:

C_0 es la concentración inicial del DDT, o sea la concentración en el tiempo cero.

C: concentración en el tiempo t.

Por lo tanto, una representación gráfica del logaritmo de las concentraciones en función del tiempo arroja una línea recta, cuya pendiente se puede relacionar con la constante de degradación (k).

Reordenando la ecuación 4.5, se obtiene la siguiente expresión:

$$t = \frac{\text{Ln } [C_0/C]}{k} \quad (4.6)$$

4.12.4 Tiempo de vida media

El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) del contaminante, definido como el periodo requerido para reducir la concentración del contaminante a la mitad, se puede calcular con la siguiente ecuación

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln } [2]}{k} = \frac{0,693}{k} \quad (4.7)$$

Los valores de ($t_{1/2}$) calculados para un determinado plaguicida pueden obtenerse a partir de las numerosas tablas publicadas. Es de destacar que estos valores corresponden a medidas realizadas a una temperatura y contenido de humedad específico y normalmente a una actividad microbiana óptima. Sin embargo, la biodegradación tiende a disminuir en suelos secos y cuando la temperatura disminuye (debido al descenso de la actividad microbiana). Por esta razón, para un determinado compuesto cabe la posibilidad de poder encontrar un rango de variabilidad de $t_{1/2}$ importante, que en algunos casos puede llegar a alcanzar varios ordenes de magnitud (Noguera Solís, 2008).

Tabla 7. Tiempos de vida media del DDT de diferentes investigaciones

Especificaciones tratamiento	Concentración DDT (mg/kg)	Tiempo de vida media (días)	Referencia
Estudio de degradación de DDT aplicando lacasa de hongo de podredumbre blanca	4.8	24.75	(Zhao et al., 2010)
Biodegradación anaerobia y aerobia de DDT por fermentación en medio sólido	15.34	14	(Corona, 2000)
Decloración anaerobia del DDT en suspensión usando ácido cítrico y antraquinona-2, 6-disulfonato (AQDS)	80	12	(Liu, Xu, & Fan, 2015)

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Formular un modelo de gestión ambiental para biorremediar y/o recuperar suelos contaminados con 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil) etano (DDT).

5.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente el suelo antes y después del tratamiento de biorremediación mediante diferentes análisis físicos y químicos recopilados de diversos protocolos.
- Evaluar protocolos de biorremediación en condiciones anaerobias a escala de laboratorio, permitiendo establecer el tratamiento más eficiente en la degradación del contaminante.
- Evaluar la tasa de remoción o degradación del DDT en el reactor utilizando el proceso de biorremediación estimulada *ex situ*.
- Identificar las poblaciones bacterianas presentes en el suelo antes y después del tratamiento de biorremediación mediante técnicas bioquímicas y moleculares.
- Formular un protocolo ambiental que involucre la tecnología de biorremediación estimulada *ex situ* a escala piloto mediante la incorporación de un plan de manejo ambiental para suelos contaminados con DDT.

5.3 Preguntas de investigación

La problemática a abordar con esta propuesta es el tratamiento de un suelo contaminado con DDT aplicando métodos de biorremediación, lo cual permitan dar respuesta a los siguientes interrogantes:

- ¿Cuáles son los valores de parámetros fisicoquímicos óptimos en el proceso de biorremediación que permiten degradar el DDT en un reactor anaerobio?
- ¿La gestión ambiental aplicada a suelos contaminados con DDT permitirá disminuir o atenuar el impacto generado por este pesticida hacia la salud humana y medio ambiente?

5.4 Hipótesis

La biorremediación en condiciones anaerobias a través de bioestimulación con melaza y nitrato de potasio mediante un reactor de lecho estático es un modelo de gestión ambiental útil para tratar suelos contaminados con DDT.

6. METODOLOGÍA

Esta propuesta se llevó a cabo en el Laboratorio del grupo de Investigación de Biorremediación y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín ubicado en el bloque M2 de la Facultad de Minas.

Las pruebas analíticas para cuantificar concentración de DDT a través de cromatografía de gases fueron determinadas en el laboratorio del Grupo Diagnostico y Control de la Contaminación GDCON. La caracterización molecular de los microorganismos aislados se identificaron en el Grupo Centro Nacional Secuenciación Genómica de la Universidad de Antioquia en la Sede de Investigación Universitaria SIU.

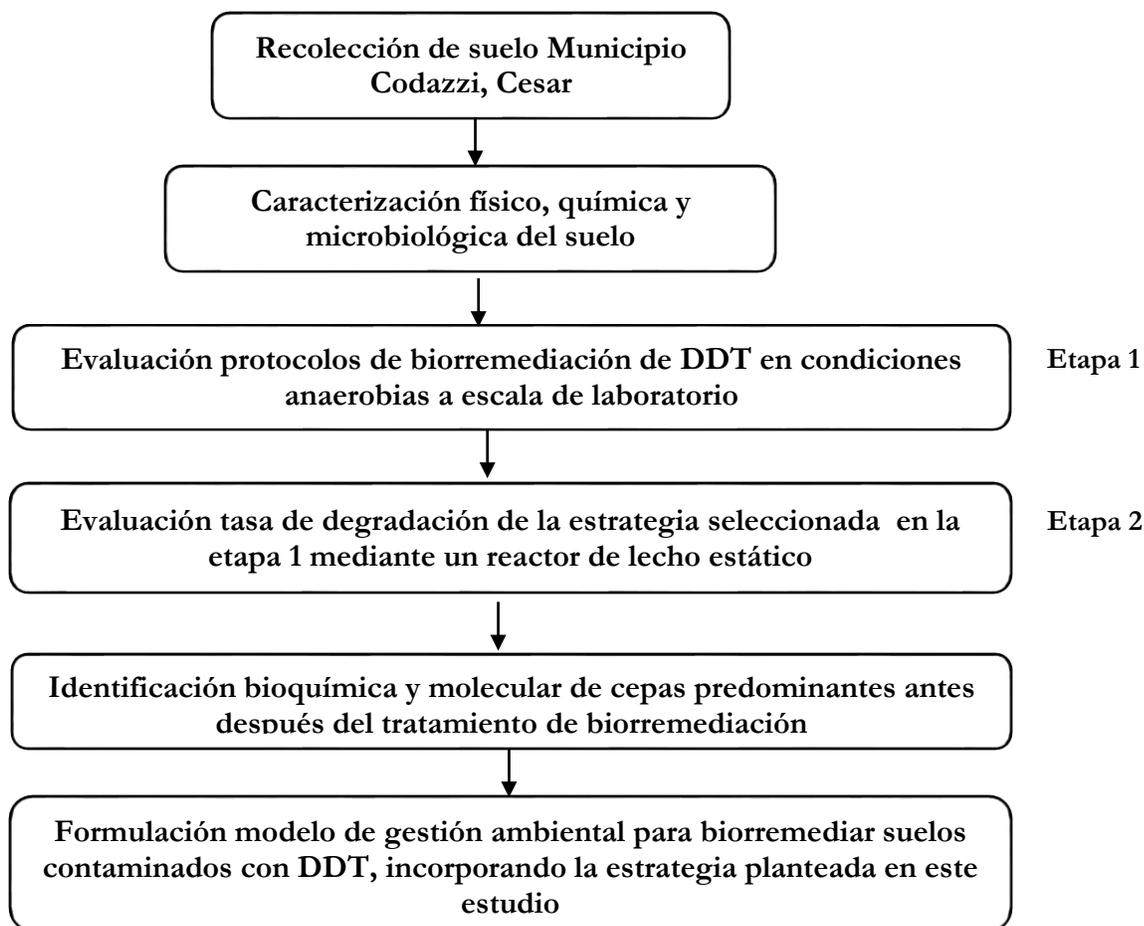


Figura 6. Esquema de la metodología de trabajo.

6.1 Materiales y métodos

6.1.1 Equipos

Cromatografo Agilent GC, Medidor multiparámetro portátil Modelo: HQ40d de pH, conductividad y potencial redox, Ro-tap, Cabina de flujo laminar horizontal, Plancha de calentamiento, Balanza analítica APX-203, Schott, Horno de secado, espectrofotómetro HACH termocupla, ultrasonido Branson 2510-DTH, Microscopio NIKON.

6.1.2 Reactivos

Para los ensayos de biodegradación se usó melaza adquirido de Tierragro, nitrato de potasio *Chemí*. Para el recuento en placa de bacterias heterótrofas Agar Luria Bertani Difco™ como medio de cultivo y solución salina al 0,9%. Para determinar el carbono orgánico se utilizó ácido sulfúrico concentrado J.T Baker, dicromato de potasio Carlo Erba y sacarosa J.T Baker. Para la determinación de fósforo disponible en el suelo se emplearon molibdato de amonio Merck, ácido clorhídrico Merck, cloruro estannoso dihidratado Merck, fluoruro de amonio Merck y fosfato monopotásico Merck. Las tinciones de Gram se efectuaron con Safranina Merck, Violeta de Gram Albor, Etanol cetona MolLabs y Lugol MolLabs. Para la preparación del gel y de la electroforesis se utilizó Tert-butil-alcohol Merck y Bioline para la electroforesis. La reacción en cadena de polimerasa fue efectuada empleando kit Bioline. Agarosa grado molecular.

6.1.3 Recolección de la muestra de suelo

El suelo utilizado para esta investigación fue recolectado en marzo de 2015 en el municipio Agustín Codazzi, Cesar en el antiguo Colegio “Instituto Técnico Agropecuario Antonio Galo Lafaurie Celedón”. Se tomaron muestras de 3 puntos diferentes donde se removieron los primeros 40 cm superficiales del suelo. Las imágenes del sitio de muestreo se encuentran en el **anexo 1**.

El predio seleccionado se encuentra dentro del perímetro urbano en la parte sur del municipio y tiene un área total aproximada de 2.4 Ha. Presenta un suelo de tipo franco y su uso había sido dedicado a la producción de algodón hasta que en 1984 el centro administrativo y operativo de la Federación Nacional de Algodoneros dejó de operar allí. En 1997 CORPOCESAR realizó estudios donde se detectaron concentraciones de plaguicidas en muestras de suelo tales como Toxafeno, DDT y Endosulfán.

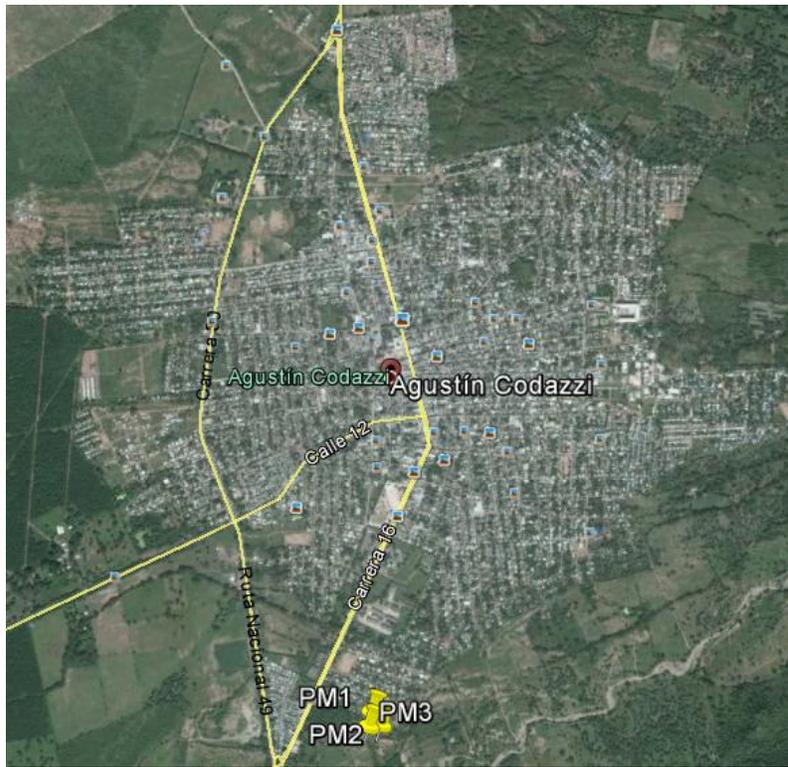


Figura 7. Puntos de muestreo en el municipio de Codazzi, Cesar. (Fuente: Google Earth)

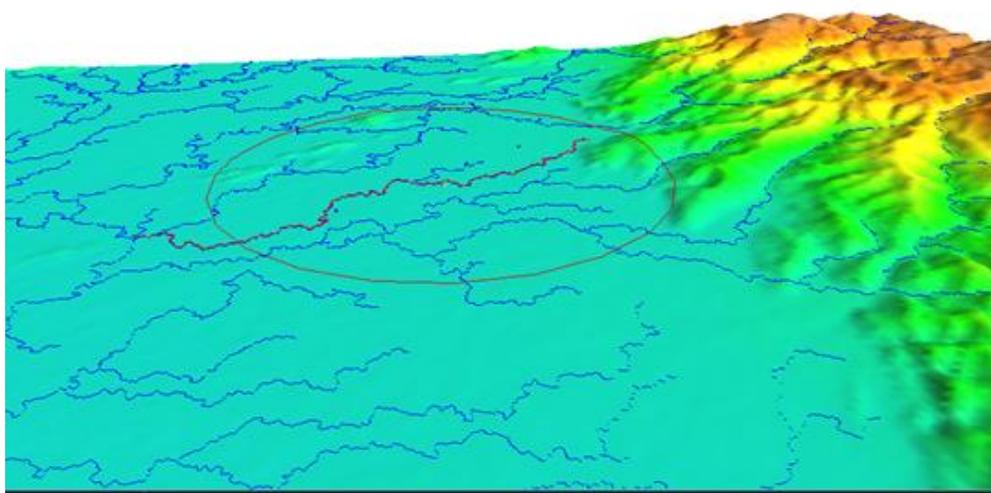


Figura 8. Imagen tridimensional de la zona de muestreo. Fuente: (Realizada en software Grass Gis)

6.1.4 Pretratamiento de la muestra de suelo

Las muestras de suelo recolectadas presentaban terrones de gran tamaño y con el fin de mejorar la homogeneidad de los contaminantes, el suelo fue triturado y posteriormente tamizado en un equipo mecánico Ro-Tap, donde se redujo a tamaños de partícula de 2 mm.

6.2 Desarrollo del estudio

6.2.1 Montaje a escala de laboratorio

En la primera fase de este estudio se analizó el porcentaje de remoción de DDT utilizando la melaza como sustrato secundario y nitrato de potasio (KNO_3) como aceptor de electrones. El montaje fue realizado en bandejas o microcosmos donde se depositó 1kg de suelo en cada una.

Tabla 8. Tratamientos evaluados a escala de laboratorio.

Tratamiento	Especificaciones
1-Control	Suelo estéril
2-Atenuación natural	Suelo con DDT.
3-Bioestimulación con melaza	Suelo con DDT + co-sustrato
4-Bioestimulación con melaza + KNO_3	Suelo con DDT +co-sustrato y aceptor
5-Bioestimulación con KNO_3	Suelo con DDT + aceptor de electrones

6.2.2 Diseño experimental

El diseño de experimentos es completamente al azar con un factor (concentración del DDT en el suelo) y 5 niveles (correspondientes a los tratamientos en cada bandeja).

Tabla 9. Matriz de diseño experimental

Numero de experimento	Nivel de tratamiento				
	1	2	3	4	5
$[\text{DDT}]_0$	X01	X01	X01	X01	X01
$[\text{DDT}]_f$	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3	Xf1,Xf2,Xf3

Donde: X: factor medible (Concentración de DDT en suelo)

0: estado inicial

F: estado final

6.2.3 Ensayos de biodegradación

Cada tratamiento se hizo por triplicado para obtener datos estadísticos confiables. Se mantuvo el suelo a la capacidad de campo que correspondió una humedad del 30% con el fin de generar una baja transferencia de oxígeno dentro y a través del mismo. La dosificación de nutrientes fue calculada mediante relaciones estequiométricas establecidas por el método de McCarthy entre la concentración de DDT presente en el suelo y la cantidad de nitrógeno y fósforo requeridos para producir biomasa. Solo se adicionó los nutrientes a los tratamientos 3, 4 y 5. Se cuantificó la concentración inicial y final de DDT a través de cromatografía de gases para todos los tratamientos. En el anexo 2 se encuentran las fotografías del montaje.

Los parámetros de medición para cada tratamiento son las mostradas en la figura 9. Se monitorearon cada 4 días durante 1 mes

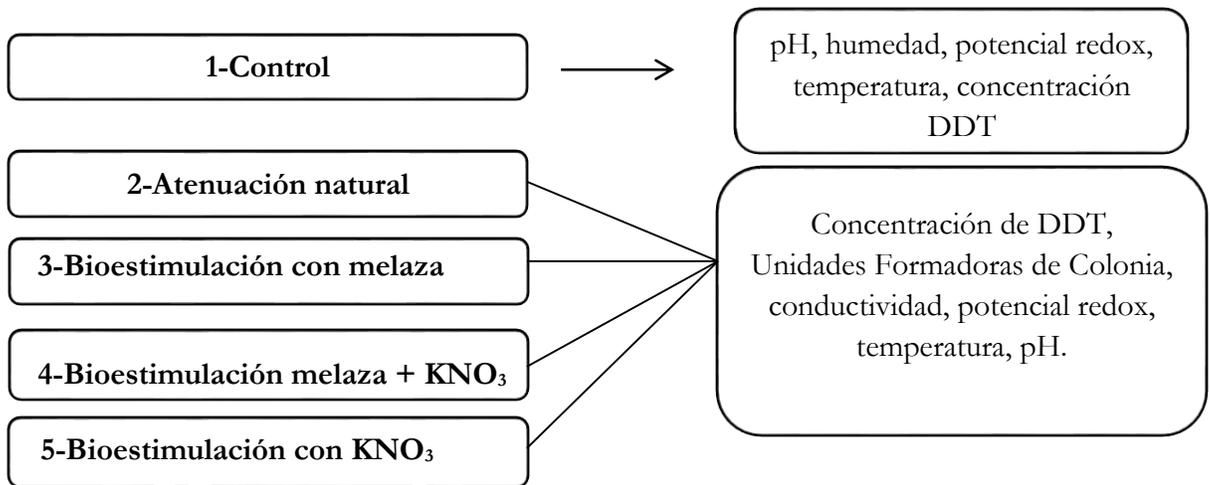


Figura 9. Parámetros a controlar en cada tratamiento de biorremediación.

A continuación se describe las especificaciones de cada estrategia de biorremediación aplicada.

6.2.3.1 Control

Este tratamiento fue necesario para controlar otras vías de degradación de DDT diferente a la biológica. Se esterilizó 3kg de suelo en un autoclave operando a una temperatura de 121°C y una presión de 1.5 kg/cm³ durante 4 horas para evitar que el suelo se contaminara con microorganismos. Adicionalmente se agregó una dosis de HCl 2M como inhibidor microbiano. Para este tratamiento no se realizó recuento de bacterias heterótrofas.

6.2.3.2 Atenuación natural

Este tratamiento mantuvo el suelo contaminado bajo las mismas condiciones ambientales y no se adicióno ninguna fuente de carbono o energía. La humedad se mantuvo a la capacidad de campo.

6.2.3.3 Bioestimulación

Para los tratamientos 3, 4 y 5 se mantuvo una relación de C:N:P de 100:5:1. La melaza adicionada en las tratamientos 3 y 4 fue tomada con base a estudios realizados por (In et al., 2008) que representa el 5% del suelo a tratar. Se adicionó un total de 1.5 g de KNO_3 como fuente de nitrógeno y aceptor de electrones. Los nutrientes fueron administrados en el agua empleada para controlar la humedad.

El cálculo de los nutrientes se pudo establecer a través del método de McCarthy entre la relación estequiometrica de nitrógeno y fosforo requeridas para que las bacterias puedan mediante reacciones anaerobias utilizar el contaminante presente en el suelo como fuente de carbono.

6.3 Caracterización físico-química y microbiológica del suelo

Con el propósito de llevar a cabo un tratamiento de biorremediación eficaz se deben identificar parámetros físicos y químicos que permitan condicionar el proceso. Esta caracterización físico-química del suelo se realizó en el Laboratorio de suelos de la Universidad Nacional de Colombia-Medellín y se hizo al inicio y al final del tratamiento de biorremediación. Se determinaron los siguientes parámetros físicos y químicos:

6.3.1 Técnicas de análisis

Tabla 10. Pruebas experimentales para la caracterización físico-química y microbiológica del suelo

Prueba experimental	Técnica analítica
Textura	Método del hidrómetro (Bouyoucos, 1962)
Densidad real	Método del picnómetro (Aguilera, 1989)
Potencial hidrógeno, pH	Método de dilución (Jackson, 1964)
Contenido de agua	Método del horno (Jackson, 1964)
Carbono orgánico total	Método Walkley-Black (Walkley & Black, 1934)
Nitrógeno total	Nitrógeno Kjendahl (Jackson, 1964)
Contenido nitrato	Sulfato de aluminio
Contenido nitrógeno amoniacal	Método de Nessler (Nessler, 1999)
Contenido de fósforo P	Método Bray II (Bray & Kurtz, 1945)
Recuento en placa de bacterias	(American Society of agronomy, 1982)
Coloración Gram	(Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2010)

6.3.2 Potencial Redox

Se determinó mediante una dilución de 10 g de muestra de suelo de cada uno de los microcosmos en 25 ml de agua destilada, en una relación de 1:2.5. La mezcla se agitó en vórtex durante 90 segundos, posteriormente se introdujo el electrodo, verificando que estuviera en contacto directo con el suelo, se esperó a que alcanzara un equilibrio térmico para registrar los milivolts y la temperatura inicial. Después de 30 minutos se introdujo el electrodo y se hizo la lectura hasta que se estabilizara. Para la determinación de este parámetro se empleó una sonda redox (orp = potencial de óxido-reducción) MTC10101, marca Hach.

6.3.3 Medición humedad

Se realizó en cada uno de las bandejas, para ello se pesaron 5g de suelo. Posteriormente se pesó el recipiente que contiene la muestra, éste debe estar limpio y seco (P_c). Se pesó el recipiente y la muestra de suelo (P_{sh}). Se secó a 105°C por 24 horas hasta obtener peso constante. Luego se llevó al desecador hasta peso constante. Finalmente se pesó el recipiente y la muestra de suelo (P_{ss}). El contenido de agua se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(P_{sh} - P_{ss})}{(P_{ss} - P_c)} * 100$$

6.3.4 Potencial de hidrogeno pH

Se determinó mediante el método de dilución. Se pesaron 10 g de muestra de suelo de cada uno de los microcosmos en 25 ml de agua destilada, en una relación de 1:2.5. Se solución se agitó en vórtex durante 90 segundos, posteriormente se midió el pH con el electrodo de vidrio pre-calibrado con multiparámetro portátil Modelo HQ40d.

6.3.5 Capacidad de retención de agua en el suelo

Se realizó en el laboratorio un ensayo que permitiría determinar la cantidad máxima de agua capilar retenida en la muestra de suelo. Para esto se midió la masa del recipiente más el papel filtro húmedo ubicándolo en la parte inferior del recipiente. Seguidamente se adicionó a la capsula una masa de suelo seco de manera que no superara una altura de 1.5 cm con respecto a la base del recipiente se tomaron un vaso con agujeros en la parte inferior y se agregó una cantidad de suelo que no superara determinando la masa del conjunto cápsula + papel + suelo seco ($M_{cp} + M_{ss}$). Se golpeó suavemente la base de la cápsula sobre madera para compactar el suelo y mantener la continuidad de los poros. Luego, se transfirió el conjunto a una cámara de humedad, de manera que la base de la cápsula estuviera en contacto con la superficie de la lámina de agua y se esperó hasta que el agua alcanzara la superficie del suelo tapando la cámara de humedad y se mantuvo en un lugar fresco durante toda la noche. Luego de 12 horas se removió el agua de la cámara y se colocó nuevamente la tapa, permaneciendo así durante 2 horas. Finalmente, se determinó la masa del conjunto incluyendo la masa del suelo saturado.

La máxima capacidad de retención de humedad del suelo se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\text{MCRH} = \frac{((\text{Mcp} + \text{Msat}) - (\text{Mcp} + \text{Mss}))}{((\text{Mcp} + \text{Mss}) - \text{Mcp})} * 100$$

6.3.6 Cuantificación concentración de DDT

La metodología seguida para determinar concentración de DDT se llevó a cabo en 2 fases, una primera fase de extracción ultrasónica basada en el método 3550C de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos para la extracción ultrasónica y una fase de limpieza del extracto.

6.3.6.1 Extracción ultrasónica

Se pesó 1g de suelo que fue transferido a un erlenmeyer de 125 ml. Posteriormente se agregó 1 g de sulfato anhidro de sodio para homogenizar la muestra. Luego se adicionaron 10 ml de una mezcla de hexano y acetona 1:1. Los erlenmeyer fueron llevados dentro del ultrasonido evitando contacto directo de los recipientes con la superficie del equipo, la extracción se realizó durante 6 minutos. Luego de la extracción, se permitió que el suelo sedimentara, y utilizando pipetas Pasteur se transfirió el solvente de los Erlenmeyer a balones tipo pera. La extracción con nuevas fracciones de solvente se repitió dos veces más y se colectó el solvente en balones tipo pera para posterior realizar la rotaevaporación. Las muestras fueron rotaevaporadas a 55°C hasta obtener un volumen aproximado de 2 ml de extracto (Betancur, 2013).

6.3.6.2 Limpieza del extracto

La limpieza del extracto se llevó a cabo con base en el método 3630 C de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos para la limpieza con sílica gel (EPA, 1996). El extracto rotaevaporado se transfirió a una columna cromatográfica de vidrio provista con 1.5 g de sílica gel (desactivada y activada al 3.3% con agua ultrapura tipo milliQ) y 0.5 g de sulfato anhidro de sodio. Posteriormente se eluyó la columna con tres fracciones de solvente, una primera fracción de 8 ml de hexano, la segunda de 6 ml de hexano y una tercera de 1.5 ml de diclorometano. Las tres fracciones se recolectaron y el solvente fue intercambiado a hexano luego de que el extracto fuera secado con nitrógeno (EPA, 1996a).

6.3.6.3 Análisis de cromatografía de gases

Los análisis fueron realizados en un cromatógrafo de gases de marca Agilent GC con detector de micro captura de electrones y una columna capilar ZB35HT Inferno Zebtron Phenomenex (30 m x 0.25 mm de diámetro interno y un grosor de película de 0.25). Esta columna fue seleccionada dada su habilidad de separar DDT. El programa de temperatura fue: empezando a 80°C, con un gradiente de 15°Cmin⁻¹ hasta 160°C y luego a 2.5°Cmin⁻¹ hasta 180°C, en cuya temperatura se mantuvo por 7 minutos. El gas de arrastre fue Helio. Los análisis confirmatorios se hicieron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies acoplado a un espectrómetro de masas. El programa de temperatura fue: empezando a 80°C, con un gradiente de 15°Cmin⁻¹ hasta 160°C y luego a 2.5°Cmin⁻¹ hasta 180°C, en cuya temperatura se mantuvo por 7 minutos. El volumen de inyección fue de 1µl de extracto, en modo *splitless* (Uniliner, Restek). Como estándar interno se utilizó pentacloronitrobenzeno marca Chemservice en tolueno. Se preparó una solución de 100 ppm. Los estándares de calibración y extractos finales de suelo posterior al

paso de limpieza e intercambio de solvente eran dopados con 4 µl de esta solución. La determinación de los límites de detección y cuantificación se realizó mediante el método de la relación señal/ruido planteado por US EPA. Method 8000B. Este método indica que el límite de cuantificación de un compuesto es aquella concentración que produzca una señal diez veces superior a la señal producida por el solvente (EPA, 1996b).

6.3.7 Recuento en placa de bacterias heterótrofas

Se utilizó el método de recuento en placa por siembra en profundidad donde se utilizó el Medio Luria Bertani, LB. Se preparó una dilución de 1 gr de suelo en 9 ml de una solución NaCl al 0.9% previamente esterilizada (10^{-1}). Posteriormente se tomó 1ml de la muestra y se transfirió a un tubo con 9 ml de la solución salina estéril (10^{-2}) y a partir de allí se hicieron diluciones sucesivas hasta llegar a la dilución 10^{-4} . Se realizó la siembra a partir de la dilución 10^{-4} donde se tomó 0.1 ml de la dilución seleccionada y se colocó en la superficie del medio de cultivo. La siembra se hizo por triplicado. Se incubaron una temperatura de 36°C por un periodo de 3 días.

A partir de diluciones seriadas se establece cultivo en superficie en medio Luria-Bertani (LB) para realizar el posterior conteo en placa mediante la ecuación:

$$\frac{UFC}{g_{suelo}} = \frac{N^{\circ}colonias}{ml_{dilución}} * \frac{Volumen_{dilución}}{factor_{dilución}} * \frac{1}{g_{suelo}}$$

6.3.8 Caracterización bioquímica de bacterias aisladas

Después de ser aisladas las bacterias predominantes en el tratamiento se identificaron bioquímicamente las colonias representativas a través de pruebas primarias como la tinción de Gram y la prueba de catalasa.

6.3.8.1 Prueba de Catalasa

Para la detección de la catalasa se seleccionó una colonia aislada y se colocó sobre un portaobjetos limpio y seco, y se agregó una gota de peróxido (H_2O_2 al 3%). La lectura se realizó inmediatamente. Se considera una reacción positiva la presencia de burbujas inmediatamente después de adicionar el peróxido.

6.3.8.2 Coloración Gram

Se fijó sobre una placa de vidrio una muestra de la colonia aislada y se dejó secar. Posteriormente se agregó cristal violeta solo el suficiente hasta que cubriera el extendido bacteriano. Se dejó actuar durante 1 minuto y se lavó con agua destilada. Seguidamente se agregó lugol y se dejó actuar durante 1 minuto. Se agregó alcohol-acetona por 30 segundos y se lavó con abundante agua. Finalmente se agregó fuscina por un minuto y se lavó con agua. La placa fue puesta en un Microscopio (90x-100x) y se agregó una gota de inmersión.

6.3.9 Caracterización molecular de los microorganismos

Esta fase de la metodología se realizó en el Centro Nacional de Secuenciación Genómica-CNSG ubicado en la Sede de Investigación Universitaria, a través de la técnica de extracción de DNA del suelo y posterior análisis mediante amplificación del gen ribosomal 16S (16S ADN_r) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De esta manera se pretende secuenciar los microorganismos presentes al inicio y final del tratamiento mediante búsqueda y análisis de secuencias en GenBank.

6.3.9.1 Extracción del DNA a partir del cultivo bacteriano.

La extracción se realizó usando el kit de Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification siguiendo el protocolo para bacterias Gram negativas. Para hacer la extracción se tomaron aproximadamente cinco colonias. Al finalizar el proceso de extracción, se hizo la cuantificación del DNA por el método de absorción de luz a 260 nm (Nanodrop), además se observó el DNA en un gel de agarosa.

6.3.9.2 Amplificación gen 16

Para la amplificación del gen 16S ARN_r se usaron los primers universales 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' y 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') que amplificaron un fragmento de 1500 pares de bases (pb).

6.3.9.3 Secuenciación y análisis de los productos PCR

Las muestras fueron secuenciadas por el método de Sanger/capilar. Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa Geneious 5.6.5 creado por Biomatters, disponible en <http://www.geneious.com/>. Utilizando este programa se editaron las secuencias, eliminando fragmentos del cromatograma de baja calidad. A partir de la secuencia editada se realizó búsqueda en la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), utilizando Standard Nucleotide BLAST, con la base de datos de secuencias de ARN ribosomal 16S. Esta búsqueda se optimizó mediante la opción megablast, que permite la búsqueda de secuencias altamente similares.

6.4 Montaje a escala piloto

En la segunda fase de esta investigación se evaluó la mejor estrategia de bioestímulo obtenida a escala de laboratorio un reactor de lecho estático. La degradación se llevó a cabo por microorganismos inmovilizados en la fase sólida (suelo). En la figura 10, se muestra el montaje del reactor de lecho estático usado en la bioestimulación. El reactor conservó un escalado geométrico de las bandejas, relaciones de McCarthy y condiciones anaerobias. Para su diseño se amplió a una escala 3:1 y se mantuvo a la capacidad de campo del suelo. Así mismo, la cantidad de nutrientes a adicionar se calculó de acuerdo a la relación de McCarthy utilizada en el ensayo a escala de laboratorio (relación de C:N:P de 100:5:1).



10a



10b

Figura 10. Reactor de lecho estático (a). Dosificación de nutrientes melaza y KNO_3 . (b). Puesta en marcha del reactor.

Las dimensiones del reactor fueron, 50 cm de ancho, 77 cm de largo por 27 cm de alto con volumen total de 0.1 m^3 . El material del reactor fue elaborado en acrílico con un espesor de 5 mm. La cantidad de suelo que se agregó al reactor fue de 60 kg con un 30% de humedad correspondiente a la capacidad de campo del suelo. Cada lado del reactor contaba con 4 puertas de $2 \times 2 \text{ cm}$ con el fin de verificar parámetros físicos, químicos y biológicos en diferentes puntos de muestreo. Dentro del reactor se instalaron tuberías con pequeños agujeros para capturar el metano producido en el proceso anaerobio y calcular la actividad metanogénica por desplazamiento de la solución NaOH al 5%.

6.4.1 Parámetros de medición en el reactor

La duración de la estrategia fue de 33 días. Se monitorean variables de medición tales como pH, potencial redox, humedad, conductividad, recuento de bacterias heterótrofas, temperatura. Así mismo se tomaron muestras de suelo cada 4 días para cuantificar concentración de DDT y de esta manera determinar la cinética de degradación del contaminante.

6.4.2 Evaluación de la actividad metanogénica

El método volumétrico se basa en la cuantificación del volumen de metano producido mediante el uso de una sustancia desplazante, como el NaOH (Field et al., 1987), por su propiedad de reaccionar con el CO_2 presente en el biogás, permitiendo una medición más aproximada del volumen de metano producido (Chernicharo, 2007).

Para esta prueba se preparó una solución de NaOH y se verificó que el pH fuese mayor a 12 con el fin de capturar el CO_2 . El biogás producido en el reactor fue conducido a través de las tuberías instaladas hasta llegar a la botella con la solución alcalina. El CO_2 es absorbido y el volumen de gas metano desplaza un volumen igual de la solución alcalina. El volumen de solución alcalina desplazada fuera de la botella es equivalente al volumen de biogás generado en el sistema. El NaOH desplazado fue recolectado en una probeta para medir el volumen.

7. RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización físico-química y microbiológica realizada a escala de laboratorio y a escala piloto. Se analiza el porcentaje de remoción de DDT en las bandejas en presencia del co-sustrato y el aceptor de electrones. Así mismo el comportamiento de la tasa de degradación de DDT en el reactor a lo largo del tiempo de experimentación. Se presenta la identificación de las bacterias antes y después del tratamiento de degradación. Finalmente se detalla el plan de manejo ambiental para biorremediar suelos contaminados con DDT con la información obtenida en este estudio.

7.1 Caracterización del suelo

7.1.1 Determinación de parámetros físicos

A. Caracterización físico-química

En la tabla 11 se presentan los resultados de la caracterización físico-química del suelo antes y después de la aplicación de estrategias de biorremediación. La caracterización del suelo después de aplicar el tratamiento fue determinada para el suelo tratado en el reactor.

Tabla 11. Caracterización físico-química del suelo

Características	Suelo contaminado sin tratamiento	Suelo con tratamiento (Reactor)
Textura		
A%	38	40
L%	36	36
Ar%	26	24
Clase	Franco	Franco
pH	6.6	7.3
Contenido de agua %	1.4	34.5
Conductividad eléctrica dSm ⁻¹	0.12	1.2
Densidad real g/cm ³	2.67	2.68
Materia orgánica %	1.9	1.7
Nitrógeno total %	0.05	0.2
N-NO ₃ mg kg ⁻¹	4	3
N-NH ₄ mg kg ⁻¹	14	23
P mg kg ⁻¹	120	127
Capacidad de intercambio catiónico	9.7	-
[] DDT mg kg ⁻¹ (bandejas)	72.35	5.41
[] DDT mg kg ⁻¹ (reactor)	72.35	6.12

Para analizar la caracterización físico-química inicial del suelo a tratar es necesario mencionar algunas propiedades presentes en esta región, la cual la diversidad en los procesos de formación de suelos ha determinado una amplia variabilidad en las características edáficas. En esta región existen desde suelos con incipiente desarrollo como es el caso de los Inceptisoles, hasta suelos con alto grado de meteorización como los Oxisoles (Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 1986). Esto se traduce en una amplia variabilidad de sus propiedades químicas y físicas y su caracterización lo demuestra. En cuanto al régimen de humedad son zonas secas y de buen drenaje, lo que indica que en estos suelos posiblemente han determinado tasas más altas de mineralización de la materia orgánica. La textura predominante es de tipo franco arenoso y franco.

De acuerdo a los resultados obtenidos guarda una relación con la variabilidad en las propiedades físico-químicas de los suelos en esta zona. Se obtuvo que el suelo recolectado es de clase franco, con textura relativamente suelta y por la característica que se le asocia a este tipo de suelo presentan una adecuada retención de humedad por la arcilla presente, lo que indica una ventaja para la aplicación del tratamiento anaerobio. Su pH inicial muestra que está en un rango adecuado para llevar a cabo los tratamientos de biorremediación. Sin embargo, su contenido de humedad es muy bajo y es necesario aplicar una humedad entre el 30 - 40 % para poder proporcionar condiciones anaerobias en el suelo. En cuanto a la cantidad inicial de materia orgánica, nitrógeno total, N como NO_3 , y N como NH_4 está entre valores medios. El valor inicial de fósforo disponible indica que tiene un valor alto y es característico de suelos en esta zona. Se obtuvo un valor de CIC (capacidad de intercambio catiónico) medio, lo que implica que la capacidad de retener nutrientes no es tan buena y esto explica la concentración inicial de nutrientes en el suelo.

Posterior a la aplicación del tratamiento de bioestimulación en el reactor, se puede comparar con la caracterización inicial del suelo sin tratamiento. El pH aumentó de 6.6 a 7.3 y esto se debe a la aplicación de nutrientes en solución (nitrato de potasio) con valores de pH que varían en el rango de 7,5-8. Así mismo el nitrógeno total y N como NH_4 aumentaron debido a la adición de melaza y nitrato de potasio, fuentes constituidas por compuestos nitrogenados.

B. Índice de Shannon

Se determinó la diversidad microbiana del suelo expresada con el índice de Shannon el cual refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa.

El análisis microbiológico arrojó que la muestra de suelo contaminada con DDT contenía 1.54×10^4 unidades formadoras de colonia y un índice de Shannon de 1.38 ± 0.22 estimado por permutaciones. Este índice es bajo y representa que tiene poca diversidad microbiana.

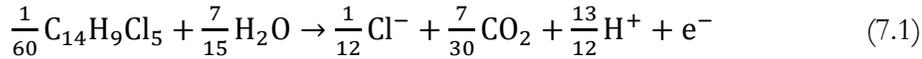
Tabla 12. Índice de Shannon antes de aplicar el tratamiento

Unidades formadoras de colonia	Índice de Shannon	Numero de morfotipos
1.54×10^4	1.38 ± 0.22	6

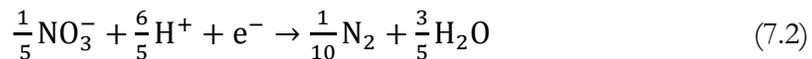
7.2 Calculo dosificación de nutrientes

El procedimiento para calcular la dosis de nutrientes a través de la ecuación de McCarthy:

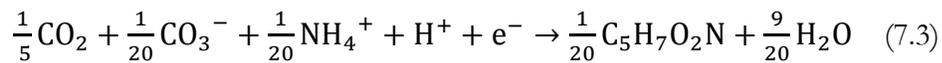
Semi-reacción donador de electrones Rd



Semi-reacción de aceptor de electrón Ra



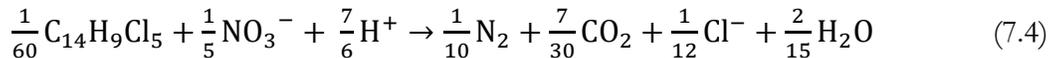
Semi-reacción de síntesis de células Rc



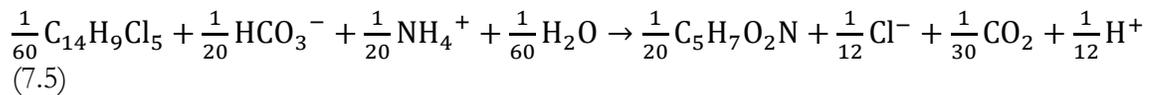
La reacción de energía es $Re = Ra - Rd$

La reacción de síntesis es $Rs = Rc - Rd$

Calculando la reacción de energía Re obtenemos:



Calculando la reacción de síntesis Rs se obtiene:



La reacción global se obtiene a través de la siguiente ecuación:

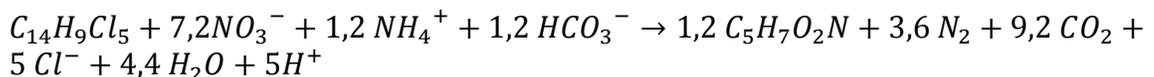
$$R = f_e R_e + f_s R_s$$

Donde f_e , fracción de la oxidación para energía

f_s , fracción asociada con la generación de biomasa.

$f_e + f_s = 1$, y para este caso se tomará el valor de $f_e=0,60$

Aplicando el método de McCarthy para el DDT, se obtiene la siguiente reacción global (7.6.)



Los pesos moleculares de las especies que participan son:

$$C_{14}H_9Cl_5 = 354,49 \frac{g}{mol}, NH_4 \text{ como } N = 14, NO_3 = 60$$

Las relaciones moleculares de las especies reactantes son:

$$1: 7.2 \times \left(\frac{60}{354.49}\right) : 1.2 \times \left(\frac{14}{354.49}\right) : 1/6 \times 1/2 \times \left(\frac{14}{354.49}\right)$$

$$1: 1.12: 0.0473: 0.79$$

Por lo tanto, por cada 100 gr de DDT se necesitan 112 gramos de NO_3^- como aceptor de electrones, 4,73 gramos de nitrógeno y 0,79 gramos de fosforo.

La relación aproximada de C:N:P es de 100:5:1.

7.3 Ensayos de biodegradación a escala de laboratorio

7.3.1 Concentración de DDT en las bandejas

En la figura 11 se presenta una gráfica de la concentración residual de DDT para cada uno de los tratamientos evaluados. La concentración final se obtuvo a partir de promedios de cada replica realizada del tratamiento. Las barras de error positivo y negativo corresponden a las desviaciones estándar de la medición.

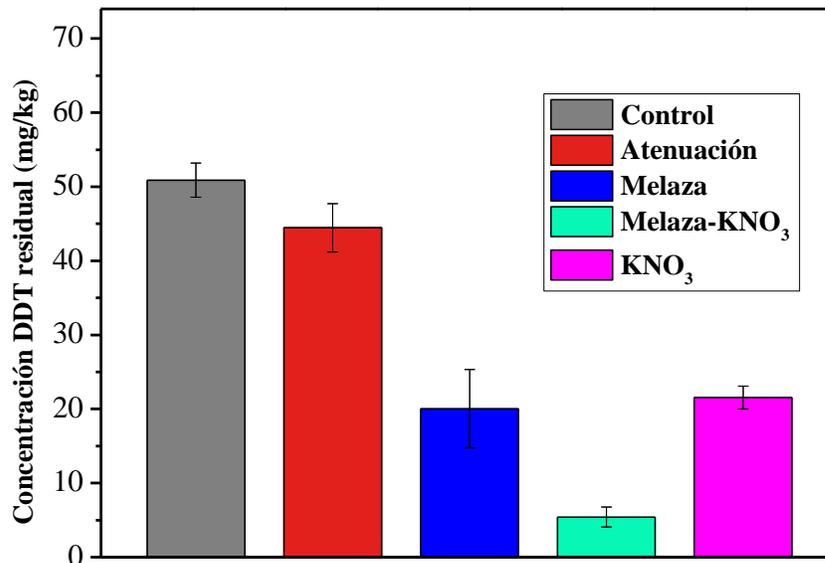


Figura 11. Concentración final de DDT para cada tratamiento en las bandejas

Tabla 13. Valores medios de la concentración final de DDT (mg kg^{-1}) en los tratamientos

Tratamientos	Media	Desviación estándar
Control	50.89	1.87
Atenuación	44.46	3.25
Melaza	20.02	8.29
Melaza-KNO ₃	5.41	1.36
KNO ₃	21.55	1.23

En el tratamiento de atenuación natural la concentración de DDT disminuyó desde una concentración inicial de 72.35 mg/kg a un valor medio de 44.46 ± 3.25 mg/kg indicando un porcentaje de remoción del 32.85%. Para los tratamientos, 3) bioestimulación con melaza hubo una reducción en la concentración desde 72,35 mg/kg hasta un valor medio de 20.02 mg/kg ± 8.29 . A diferencia de la estrategia 4) bioestimulación con melaza-KNO₃, la concentración se redujo a un valor medio de 5.41 mg/kg ± 1.36 . Para la bioestimulación únicamente con adición de KNO₃ la concentración de DDT logró reducirse hasta 21.55 ± 1.23 mg/kg.

Los porcentajes de remoción para las estrategias aplicadas 3), 4) y 5) fueron de 72.3, 92.5 y 70.2% respectivamente. El tratamiento de control presentó una disminución en la concentración de DDT luego de 33 días desde una concentración inicial de 72.35 mg/kg a un valor medio de 50.4 mg/kg ± 1.88 (porcentaje de remoción de 30.3 %).

De acuerdo lo anterior el tratamiento más efectivo fue la estrategia de bioestímulo con adición de melaza y KNO₃ (tratamiento 4). Esto indica la necesidad de un co-sustrato para mejorar el metabolismo del contaminante.

7.3.2 Análisis de Datos

Se determinó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con el propósito de comparar si los tratamientos de biorremediación aplicados presentan diferencias significativas en la degradación del DDT. El resultado del análisis fue elaborado en el software *Statgraphics Centurion* y se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Análisis de varianza

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Modelo	4	4227.81	1056.95	62.06	5.05×10^{-7}
Error	10	170.31	17.03		
Total	14	4398.12			

De acuerdo a los resultados obtenidos, el valor alto de F es un indicio de que la aplicación de los nutrientes en forma individual y combinada produce un efecto en el porcentaje de remoción de DDT en los diferentes protocolos de biorremediación, lo que indica que si existe diferencia significativa entre las medias de los 5 tratamientos.

Para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utilizó el test de Brown y Forsythe. El valor-p es menor que 0.05, lo que indica la igualdad de las varianzas en los tratamientos aplicados.

Tabla 15. Prueba de homogeneidad de varianzas

	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor P
Modelo	4	48.72	12.18	4.27	0.25
Error	10	76.18	7.62		

En la figura 12 se muestra una comparación de todas las posibles combinaciones dos a dos de los valores medios obtenidos en cada estrategia de biorremediación.

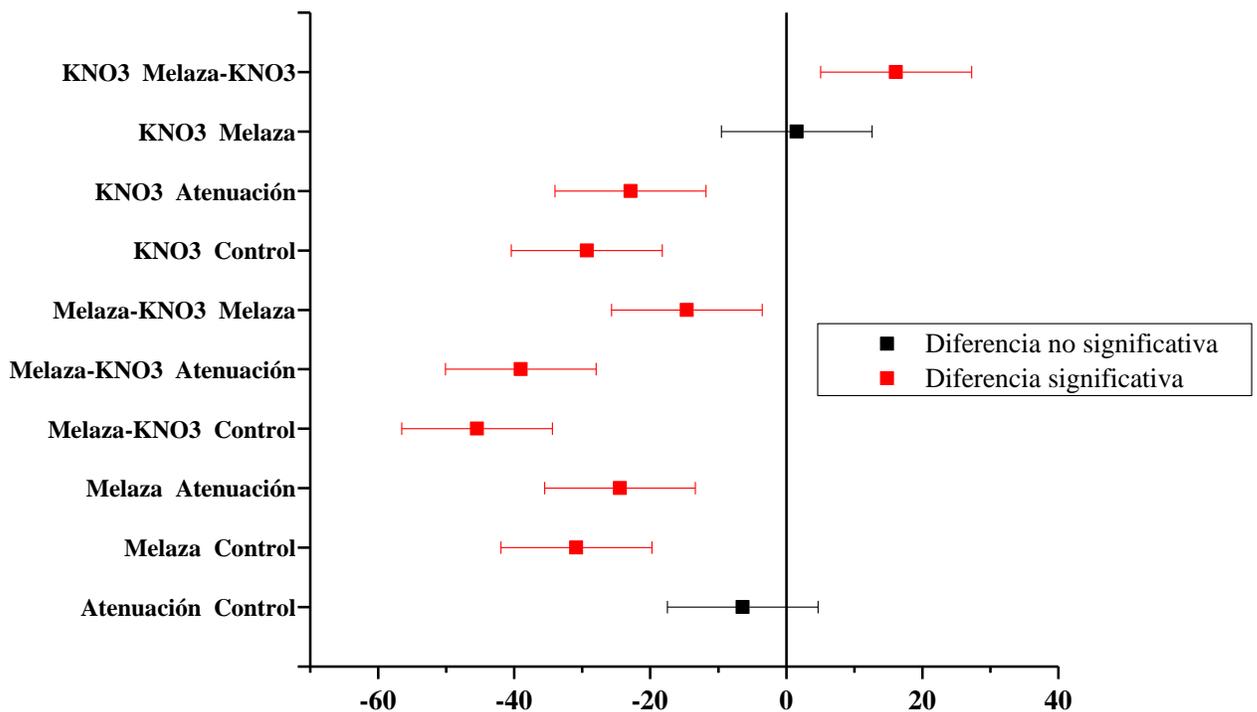


Figura 12. Comparación de medias usando Test Tukey

En los resultados arrojados demuestra que no hay diferencia significativa al aplicar los tratamientos 3) melaza, 5) KNO₃ y los tratamientos 1) control, 2) atenuación. Esto indica que el efecto de suplementar nitrato de potasio (KNO₃) y melaza de forma individual producen relativamente el mismo efecto en la biodegradación de DDT en el suelo. A diferencia de los tratamientos 3)-4), 4)-5), 2)-4), 2)-3) que si presentan una diferencia significativa en la concentración final del contaminante.

7.3.3 Comportamiento de los parámetros físicos y químicos en las bandejas

- **Potencial redox en las bandejas**

En la tabla 16 se muestra los valores de potencial redox para cada tratamiento durante el tiempo de muestreo. Para los ensayos se observa que las medidas de Eh (mV) fueron significativamente diferentes en los tratamientos 1, 2 y 5.

Tabla 16. Valores de potencial redox para los tratamientos a escala de laboratorio

Tratamientos	Potencial redox(mV)								
	Tiempo (días)								
	1	4	8	13	17	21	25	29	33
1.Control	150.7	140.6	120	82.3	70.6	30.5	20.3	8.34	-1.5
2.Atenuación natural	122	95.9	80.3	50.7	45.3	20	-1.5	-5.1	-18.3
3.Melaza	-10.1	-13.6	-63.1	-125.8	-140	-160.2	-176	-180	-185
4.Melaza + KNO ₃	-89.4	-90.2	-105	-113.9	-119	-124	-163	-231	-265
5.KNO ₃	73.5	65.8	56.5	34.3	1.5	-35.5	-50.3	-72.2	-80.8

Este parámetro indica una medida cuantitativa del estado de oxidación de las sustancias en el sistema, y permite representar el estado de oxidación de los compuestos susceptibles de ser empleados como principal aceptor de electrones para los microorganismos.

Un valor Eh positivo (condiciones aerobias) y de alta magnitud es indicativo de un ambiente que favorece las reacciones de oxidación. Del otro lado, un valor Eh negativo (condiciones anaerobias) y de baja magnitud es indicativo de un ambiente altamente reductor.

- **Variación del pH en las bandejas**

En la figura 13 se muestra la variación del pH para cada uno de los protocolos. El tratamiento control descendió a pH 2 debido a la adición de HCl. Para el tratamiento 3 el pH del suelo disminuyó a valores cercanos a 5 y esto se debió a la aplicación de melaza el cual tiene un rango de pH de 5.5-6. Los tratamientos 2 y 5 presentaron un pH neutro.

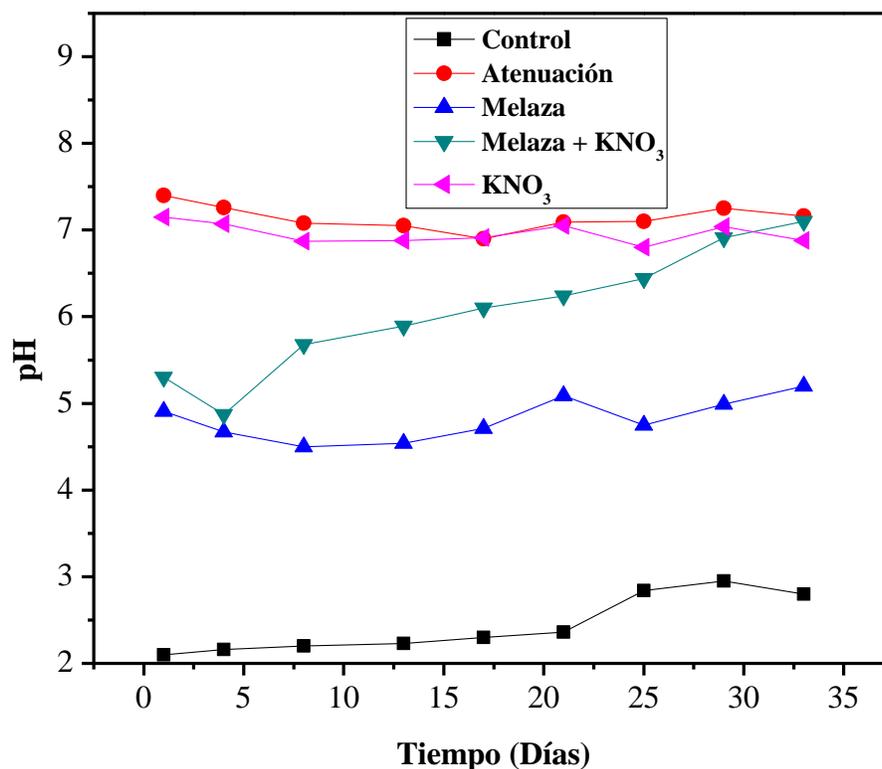


Figura 13. Comportamiento del pH para los tratamientos en las bandejas durante los días de medición

- **Variación de la humedad en las bandejas**

En la figura 14 se muestra la variación de la humedad para cada día de muestreo. Los rangos de sus valores iniciales estuvieron comprendidos entre una humedad del 27% y el 31 % para todos los tratamientos. La humedad nunca estuvo por debajo del 23% ni por encima de su nivel de saturación 40%, ya que no se observó lixiviado.

En los primeros días de tratamiento se observa que el protocolo 4 presenta mayor porcentaje de humedad con un rango de variación de 31-26%, y se debió a la cantidad de agua presente en la solución de melaza-KNO₃. En la segunda semana hubo una disminución de la humedad en todos los ensayos de biodegradación asociado posiblemente a procesos físicos, lo cual fue necesario la dosificación de agua a todos los tratamientos el día 12, con el fin de mantener la humedad requerida. Dentro de este intervalo, se mantuvo una adecuada hidratación de los microorganismos, favoreciendo a su vez el mantenimiento de una temperatura óptima del suelo.

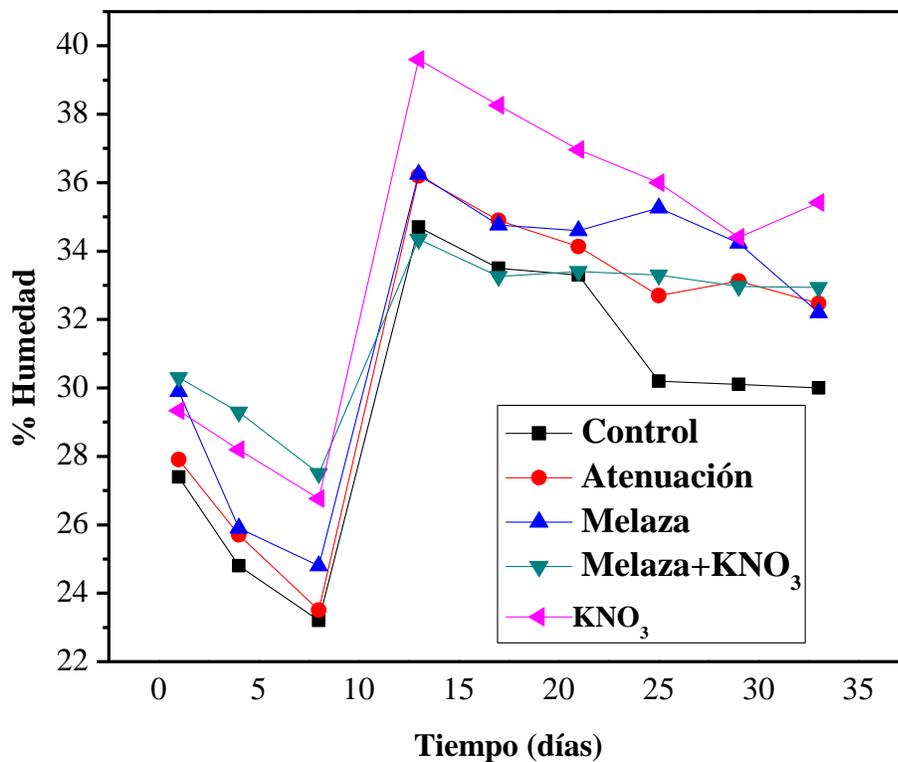


Figura 14. Comportamiento de la humedad para los protocolos de biorremediación durante los días de medición

- **Variación de la conductividad en las bandejas**

En la figura 15 se presenta la variación de la conductividad medida en cada tratamiento durante los 33 días de experimentación. El tratamiento de control arrojó valores altos comprendidos entre un rango de (9500 – 8000) $\mu\text{S}/\text{cm}$ y esto se debió a la adición de HCl el cual es un electrolito fuerte. Los tratamientos 2 y 5 presentaron un comportamiento similar en sus valores.

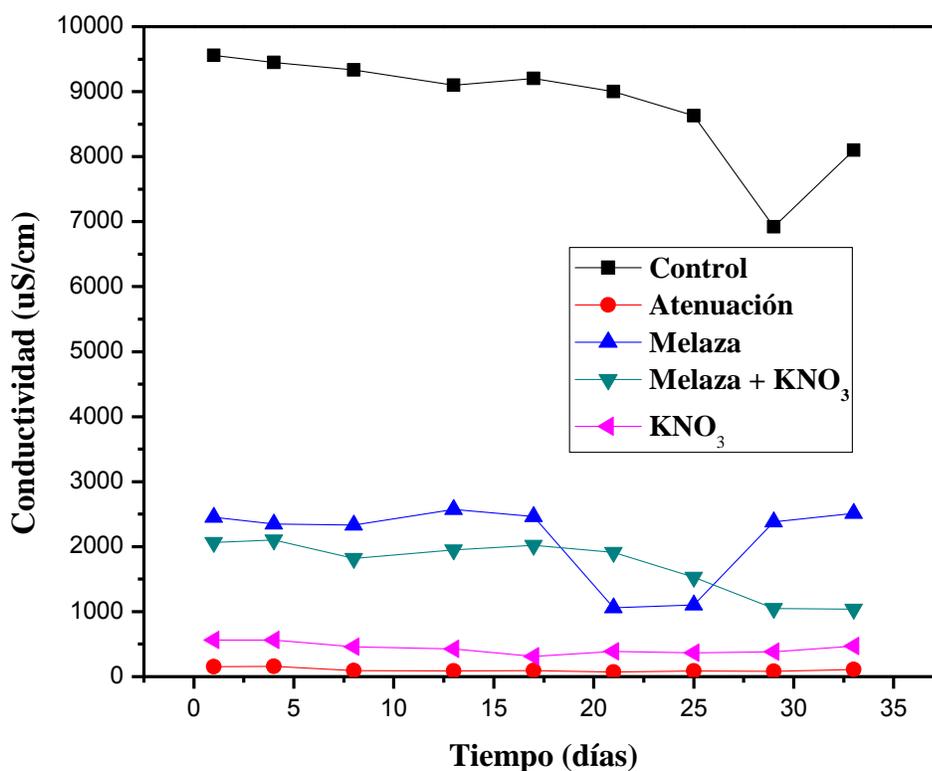


Figura 15. Comportamiento de la conductividad en los tratamientos durante el tiempo de muestreo

- Variación de la temperatura en las bandejas

Tabla 17. Valores de temperatura en los tratamientos para cada tiempo de muestreo

Tratamientos	Temperatura (°C)								
	Tiempo (días)								
	1	4	8	13	17	21	25	29	33
1.Control	29	29.2	28.4	28.7	29.1	28.5	28.9	29	29.3
2.Atenuación natural	28.1	28.4	28.8	28.1	28.3	28	28.7	28.3	28.5
3.Melaza	28.2	28.7	28	28.1	28.6	28.1	28	28.2	28.3
4.Melaza + KNO ₃	29	28.9	28.7	28.8	28.9	28.8	28.6	28.9	28.8
5.KNO ₃	28.1	28.4	28.2	28.6	28	28.1	28.3	28.5	28.4

En la tabla 17 se presentan los valores de temperatura para cada tratamiento. Los valores oscilaron en un rango similar (28°C-29°C) para cada estrategia de biorremediación.

7.3.3 Recuento de bacterias heterótrofas para los protocolos

La figura 16 se presenta el recuento de bacterias heterótrofas durante el tiempo de seguimiento de las estrategias. Se realizaron siembras en profundidad cada cuatro días en Agar Luria Bertani.

Se observó un notable incremento de UFC (unidades formadoras de colonias) en la primera semana de tratamiento que se mantuvo hasta la segunda semana para los tratamientos 3) Melaza, 4) Melaza y KNO_3 y 5) KNO_3 . Para la 3 semana la cantidad de bacterias heterótrofas disminuyó considerablemente. Para el tratamiento de atenuación natural las UFC presentaron un comportamiento estable durante el tratamiento debido a que no hubo adición de fuentes de carbono.

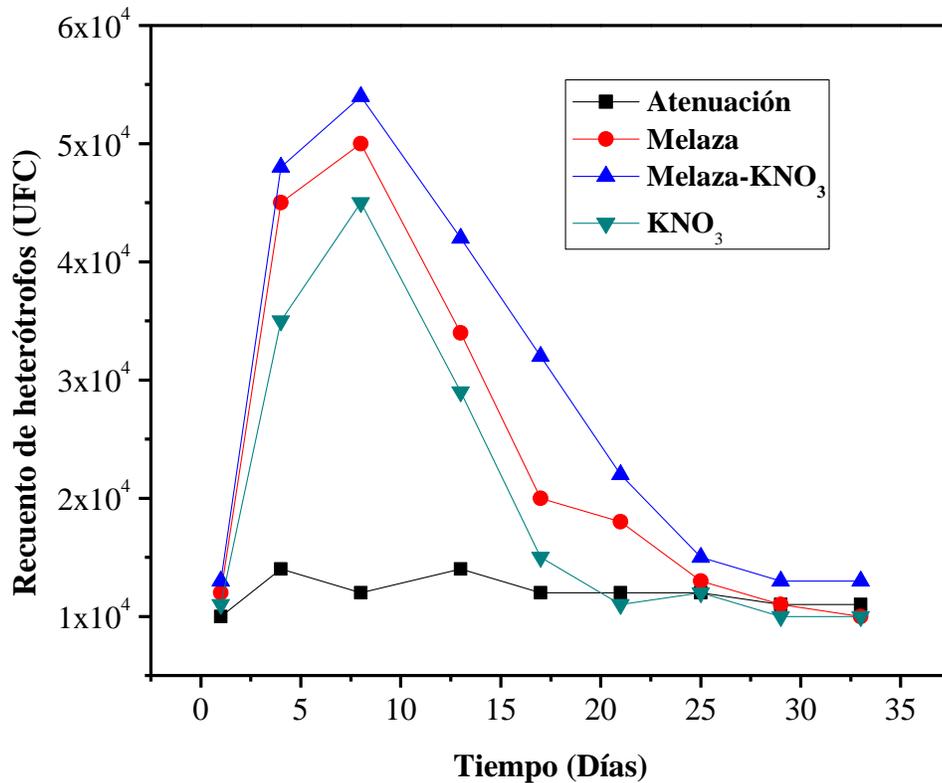


Figura 16. Crecimiento bacteriano en los protocolos de biorremediación para cada tiempo de muestreo

7.4 Resultados montaje a escala piloto

En esta segunda fase de la investigación se presentan los resultados obtenidos del tratamiento 4 evaluados a una escala mayor. Se detallan la variación de los parámetros físicos y microbiológicos medidos en 4 puntos del reactor. Así mismo se muestran los resultados obtenidos en la identificación molecular.

7.4.1 Comportamiento de parámetros físicos y químicos en el reactor

En la figura 17 se presenta una gráfica sobre el comportamiento de los valores de potencial redox en el reactor. Se observa que los valores de Eh (mV) en esta escala difieren un poco en los valores obtenidos a escala de laboratorio. El rango de variación del potencial estuvo entre -70 mV y -125 mV.

- **Potencial redox en el reactor**

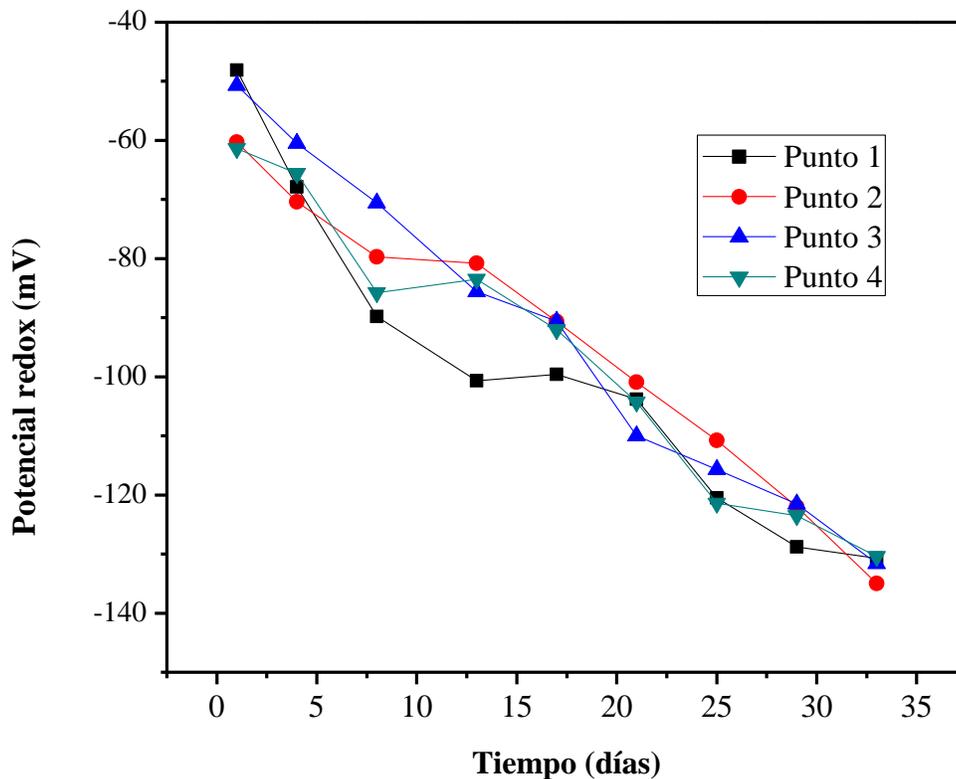


Figura 17. Comportamiento del potencial redox en el reactor para cada tiempo de muestreo

- **Variación del pH en el reactor**

En la figura 18 se presenta los valores de pH en los 4 puntos de muestreo en el reactor de lecho estático. Los valores varían entre un valor inicial de 5-5.5 hasta alcanzar un pH en el suelo de 7.2. Durante la primera semana se presenta un pH ácido, incrementándose hasta la tercera semana con valores neutros. Para las últimas semanas el pH presenta un notable cambio.

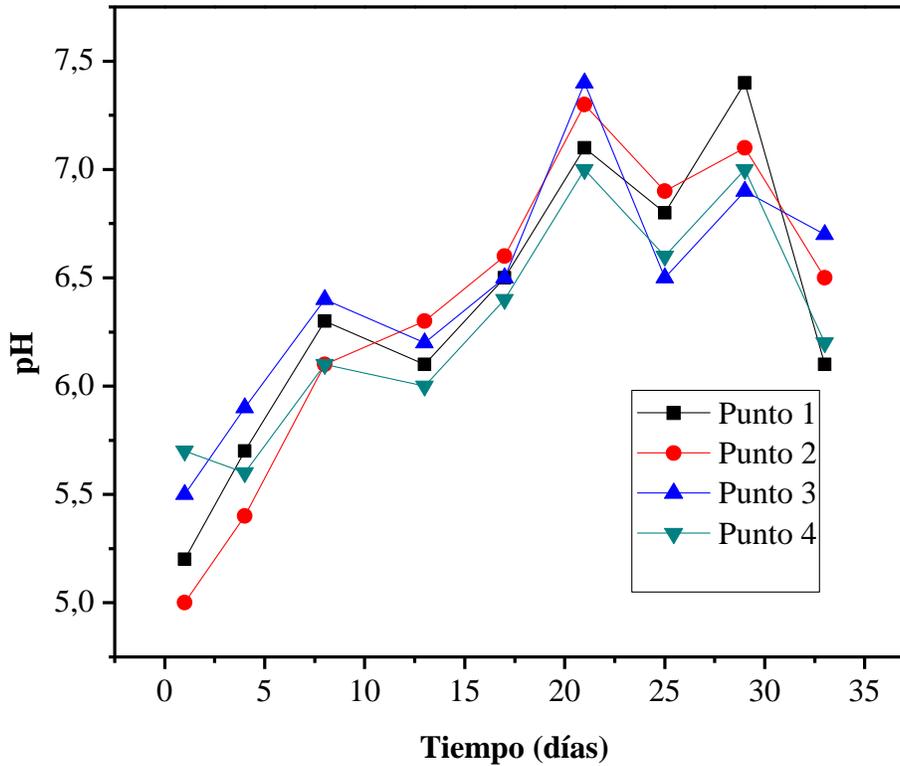


Figura 18. Comportamiento del pH el en el reactor para cada tiempo de muestreo

- **Variación de la humedad en el reactor**

Tabla 18. Valores de la humedad en el reactor

Puntos de medición	Humedad (%)								
	Tiempo (días)								
	1	4	8	13	17	21	25	29	33
Punto 1	33	34,5	33,4	32,3	32,1	32,3	32,1	31,3	31,2
Punto 2	34,4	34,2	33,2	33,4	33,2	32,5	31,4	31,2	31,2
Punto 3	35,3	34,6	33,4	33,1	32,3	32,6	32,6	32,2	31,2
Punto 4	34,3	34,2	34,3	32,7	33,2	32,7	31,3	31,2	31,1

• Variación de la temperatura en el reactor

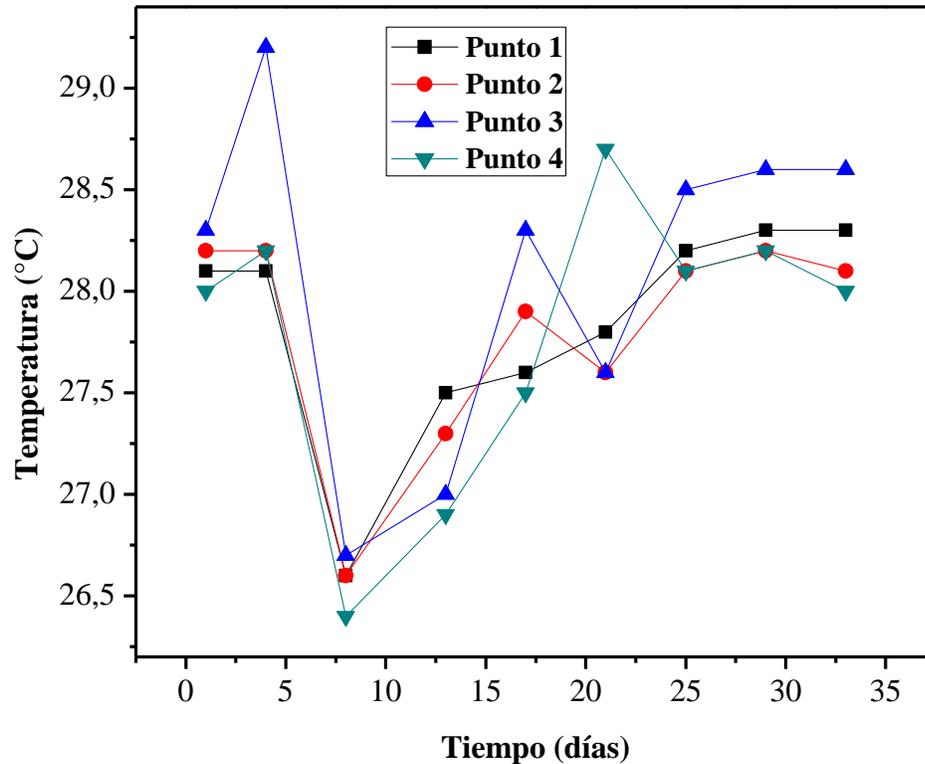


Figura 19. Valores de temperatura en el reactor para cada tiempo de muestreo

En la figura 19 se presentan los valores de temperatura en los 4 puntos de muestreo del reactor. La temperatura se mantuvo inicialmente en un rango cercano a 28°C durante los primeros días de tratamiento. En la primera semana hubo un descenso en la temperatura en todos los puntos debido a cambios climáticos presentados en el día de medición. El punto 3 fue el que reportó valores más altos de temperatura y esto se debió a la ubicación del sitio de muestreo de este punto en el reactor.

7.4.2 Medición de la actividad metanogénica

La producción de metano en el reactor fue casi nula. Durante el tiempo de ensayo, solo se pudo recolectar 5 ml de solución desplazante (NaOH) los días 13 y 14, esto significa que aún bajo condiciones anaerobias la metanogénesis no es dominante en el sistema, indicando la no presencia significativa de una población de microorganismos metanogénicos entre la flora nativa.

7.4.3 Cinética de degradación en el reactor

Con el objeto de estudiar la tasa de biodegradación de DDT en el reactor de lecho estático., se tomaron muestras a diferentes tiempos del tratamiento de bioestimulación (4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, y 32 días).

En la figura 20, se presentan los resultados de la concentración de DDT residual para cada día de muestreo

Se observa que la concentración DDT decrece hasta la segunda semana, sin embargo, para el día 24 se presenta un aumento leve de la concentración de DDT (14%). En la semana 3 y 4 la concentración del contaminante disminuye y permanece constante hasta finalizar el tiempo del tratamiento.

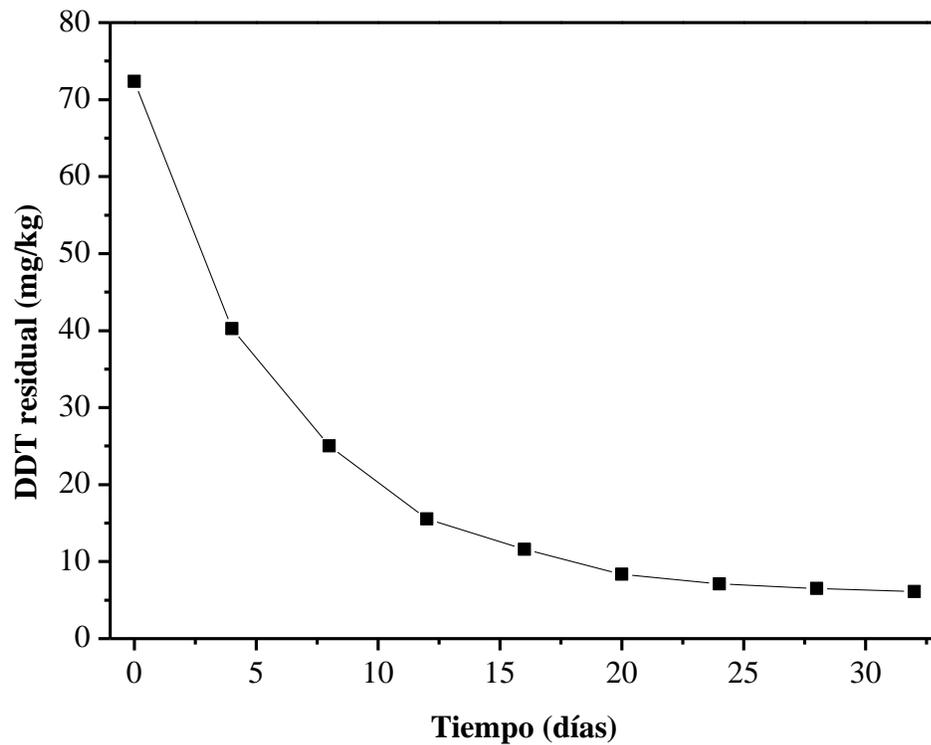


Figura 20. Gráfico de la concentración de DDT residual en el reactor

En la figura 21 se muestra la gráfica $\ln(C/C_0)$ vs tiempo de muestreo. Los valores negativos representan el decaimiento de la concentración a lo largo del estudio y se observa que la concentración de DDT decrece con el incremento del tiempo de tratamiento.

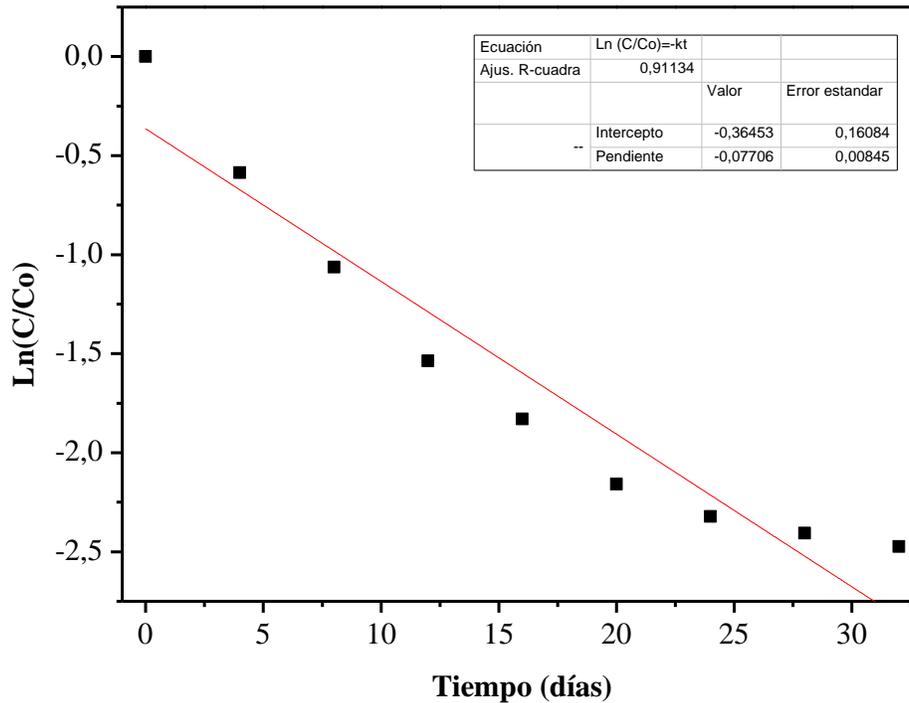


Figura 21. Gráfica de Ln (C/Co) vs tiempo en el reactor

De acuerdo a la gráfica anterior se observa que la biodegradación de DDT se ajusta a una cinética de pseudo-primer orden ($r^2=0.91$). A partir de la ecuación (4.4) planteada anteriormente se obtuvo de la pendiente, una constante de degradación de $k=0.077/\text{día}$ y un tiempo de vida media de $t_{1/2}= 8.9$ días.

7.4.4. Recuento de bacterias heterótrofas para el tratamiento en el reactor

En la figura 22 se observa el comportamiento del crecimiento bacteriano en el reactor aplicando la bioestimulación con melaza- KNO_3 . Para la primera semana hay un aumento en la cantidad de unidades formadoras de colonia, mientras que en la tercera semana se observa un descenso. El punto 3 de muestreo es el de mayor crecimiento bacteriano y es debido al aumento de temperatura en ese punto. Se observa que el valor máximo de microorganismo es de 3.8×10^4 UFC/g suelo.

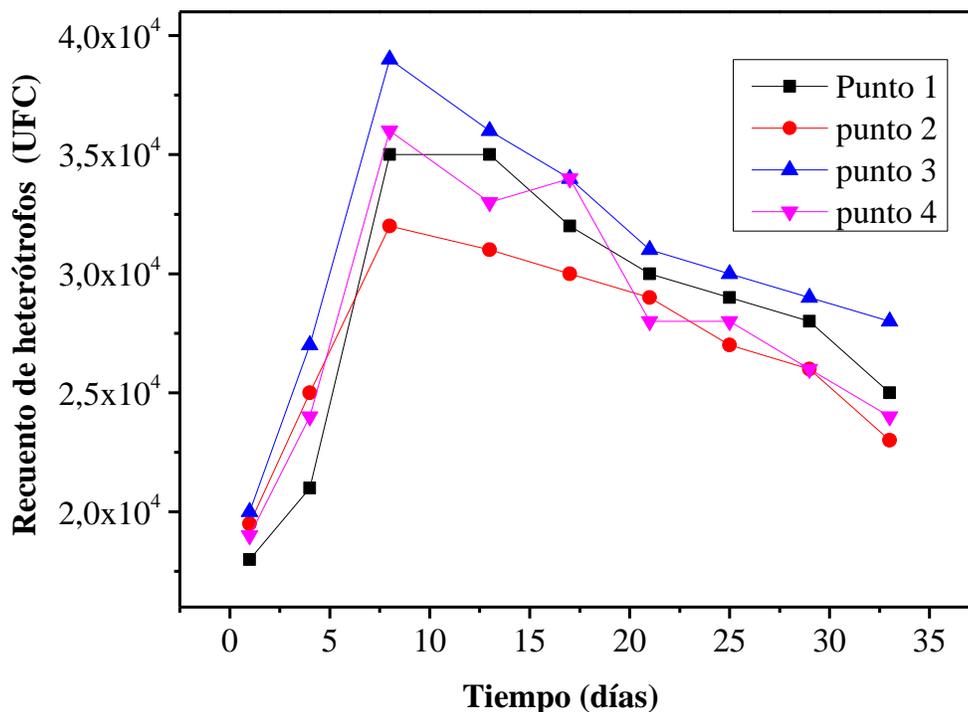


Figura 22. Crecimiento bacteriano en el reactor durante el tiempo de muestreo

7.4.5 Caracterización bioquímica de las bacterias aisladas

Se identificaron bacterias predominantes a través de pruebas bioquímicas tales como Coloración Gram y prueba de la catalasa. En la figura 23a (suelo contaminado con DDT) se puede apreciar Gram positivos que se encuentran en forma de barra o vara (bacilos) y de color violeta característico que se les denomina a las bacterias que lo presentan “Gram positivas”.

Para la figura 23b (suelo después del tratamiento de bioestimulación) presenta características similares a las de la figura 23a: bacterias bacilos Gram positivos.

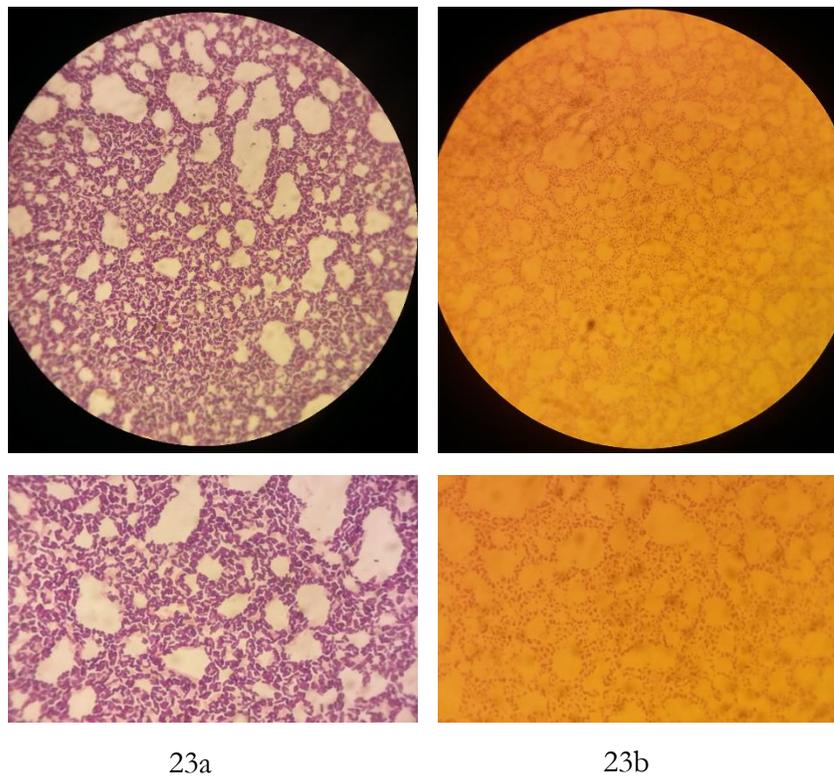


Figura 23. Microscopia óptica en objetivo 100x. (a) Bacterias suelo contaminado. (b) bacterias después del tratamiento de bioestimulación.

En la tabla 19 se presenta los resultados obtenidos de la tinción de Gram y prueba de la catalasa para los morfotipos aislados. Para la B1 la prueba de la catalasa arrojó un valor positivo. A diferencia de B2 negativo indicando que la bacteria no contiene la enzima catalasa.

Tabla 19. Resultados de las pruebas de tinción de Gram y catalasa para los dos morfotipos aislados.

	B1	B2
Gram	+	+
Morfología	Bacilo	Bacilo
Catalasa	+	-

B1: Bacterias suelo contaminado

B2: Bacterias suelo después del tratamiento

7.4.6 Identificación de las bacterias aisladas

Se logró extraer el DNA y amplificar exitosamente el gen 16S de las muestras en estudio. Según la herramienta Blastn, se detectaron secuencias homologas para las muestras B1 (bacteria suelo contaminado) y B2 (bacteria suelo después del tratamiento) al género

Bacillus, las cuales se usaron como referencias para el posterior análisis filogenético para las muestras.

De acuerdo con la matriz de distancia, la secuencia B1 es muy cercana a la secuencia de referencia de *Bacillus circulans* con una distancia de 0,010. Esto fue corroborado en el árbol filogenético realizado por el método de Neighbor joining, en el cual se observan estas secuencias formando un grupo hermano con un bootstrap de 50. En el anexo se muestra el árbol filogenético.

La secuencia B2 es muy cercana a la secuencia de referencia de *Bacillus megaterium* con una distancia de 0,002. Esto fue corroborado en el árbol filogenético realizado por el método de Neighbor joining, en el cual se observan estas secuencias formando un grupo hermano con un bootstrap de 99. En el anexo se muestra el Árbol filogenético de la muestra B1 y B2.

Tabla 20. Resultados de la identificación molecular de los aislados B1 y B2

Aislado	Descripción	Porcentaje de identidad
B1: Suelo contaminado	<i>Bacillus</i> sp. S20403 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%
B2: Suelo después del tratamiento	<i>Bacillus</i> sp. strain BPR176 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%

Por tanto, se plantea que las bacterias identificadas en el suelo contaminado es *Bacillus circulans* y para el suelo después de la aplicación del tratamiento de bioestimulación es *Bacillus megaterium*.

8. DISCUSIÓN

El planteamiento de modelos de gestión ambiental enfocados en el tratamiento de suelos contaminados con plaguicidas es aún un tema de investigación debido a los múltiples factores que se requieren a la hora de descontaminar suelos. Aunque actualmente en Colombia se ha avanzado en el establecimiento de normativas de regulación para la gestión de residuos peligrosos, entre estos los plaguicidas, las metodologías de tratamiento para este tipo de residuos que integren soluciones económicas y ambientalmente favorables son relativamente escasas.

Para contribuir a la solución de esta problemática, en el presente trabajo se ensayaron tratamientos de biorremediación *ex situ*, a través de enriquecimiento al suelo con fuentes de carbono y energía, con el fin de mejorar el metabolismo del contaminante y proporcionar un crecimiento de las poblaciones nativas presentes en el suelo. Se evaluaron tratamientos a escala de laboratorio y escala piloto con la adición de melaza y nitrato de potasio. El suelo empleado para los tratamientos fue caracterizado a través de parámetros físicos, químicos y microbiológicos al inicio y final del tratamiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos se estableció la fuerte relación que existe entre las propiedades físico-químicas y microbiológicas que tiene el suelo a la hora de plantear tratamientos de biorremediación. En la zona donde se recolectó el suelo, presentó una textura de clase franco, lo que indicó una gran ventaja para aplicar estrategias en condiciones anaerobias debido a la adecuada retención de humedad que posee este tipo de suelo. Aunque la concentración inicial de los nutrientes presentes en el suelo tales como materia orgánica, nitrógeno total, N como NO_3 y NH_4 estuvo en un rango medio, por lo que debió ser suplementada a través de una relación de C:N:P (100:5:1) planteada por el método de McCarthy. A diferencia de la cantidad de fósforo (P) el cual fue relativamente alta y característica en suelos de esta zona, no fue necesario la adición de una fuente de fósforo. Por otra parte, la evaluación del índice de Shannon del suelo contaminado determinó un promedio de riqueza observada con seis morfotipos de colonias, lo que se infiere poca riqueza.

La aplicación de los protocolos de tratabilidad a escala de laboratorio permitió seleccionar el mejor tratamiento de biorremediación. El mejor desempeño en la biodegradación del DDT fue evidenciado por el tratamiento 4 con adición de la solución melaza- KNO_3 . Se obtuvo una disminución en la concentración de 72.35 mg DDT/ kg suelo hasta 5.41 mg DDT/ kg suelo lo que representa un porcentaje de remoción de 92.5%. A diferencia de los tratamientos de atenuación natural, adición de melaza y adición de KNO_3 que reportaron porcentajes de remoción del 32.8, 72.3% y 70.2% respectivamente.

La degradación del tratamiento control presentó una tasa de remoción del 30.2% que se puede atribuir a factores abióticos como transformaciones químicas por la adición de HCl. De igual forma existe la posibilidad de que algunas comunidades de microorganismos pueden llegar a tolerar ambientes extremos, como es en este caso donde el suelo presentó un pH ácido.

La efectividad del tratamiento 4 radica principalmente en que la presencia de un co-sustrato puede incrementar la presencia de bacterias heterótrofas en el suelo, y como consecuencia

aumentar la biodegradación del DDT. Esta solución suplementada, melaza-KNO₃, produce un efecto sinérgico ya que la melaza al tener una compleja composición de azúcares, proteínas, minerales, entre otros, contenga una alta carga microbiana y combinado con un aceptor final de electrones con un alto potencial reductor (NO₃⁻), hace que el metabolismo del contaminante se acelere, y se produzcan altas tasas de degradación, como se obtuvo en este tratamiento 4.

Es de notar que después de tan solo 33 días de tratamiento el DDT logró degradarse a un porcentaje de remoción alto (92.5%). Esto verifica estudios previos, donde se comprobó que la dechloración reductiva de DDT en condiciones anaerobias es mucho más rápida que la deshidrocloración en condiciones aerobias (Atlas & Bartha, 1993).

Aunque el alcance de esta investigación no abarcó la cuantificación de los metabolitos DDD y DDE. Estudios realizados por (Atlas & Bartha, 1993), demostraron que bajo condiciones aerobias ocurre la formación de DDE, mientras que en condiciones anaerobias se forma DDD y es mucho más rápida que la transformación a DDE. El metabolito DDE es un compuesto más persistente y tóxico que el mismo DDT por lo tanto no es deseable que se acumule en el suelo, lo que justifica la aplicación de tratamientos anaerobios en el proceso de biodegradación del DDT.

En cuanto a los parámetros físicos, químicos y microbiológicos medidos a lo largo de la experimentación a escala de laboratorio fueron determinantes para conocer el comportamiento de la tasa de biodegradación del DDT. Se monitorearon los parámetros de pH, potencial redox, temperatura, humedad, conductividad y recuento de biomasa.

Para los tratamientos a escala de laboratorio, el potencial redox desde el inicio fue significativamente diferente para las estrategias 1), 2) y 5) con valores positivos hasta la tercera semana. Estos resultados mostraron que la aplicación de un co-sustrato y un compuesto aceptor de electrones podrían mejorar la capacidad de reducción del sistema de reacción. El efecto de los valores Eh en la solución de melaza- KNO₃ fue mayor que en el tratamiento donde se adicionó solo la melaza. Esto se debe a que la reacción sinérgica entre estos dos nutrientes produce la disminución en los valores de Eh (mV). Por otra parte, teniendo en cuenta la relación ya mencionada anteriormente entre el potencial redox y tratamientos en condiciones anaerobias, se infiere que para el tratamiento 4 donde se obtuvo valores de Eh más negativos entre un rango de -89.4 mV y -295 mV, se presentó un notable aumento en la tasa de dechloración reductiva de DDT y se explica debido a que este compuesto se degrada más fácil en ausencia de oxígeno.

El pH es un factor físico importante que influye en la biodegradación de compuestos organoclorados, ya que puede afectar la actividad microbiana y la biodisponibilidad de las fuentes de carbono y energía (J T Dibble, 1979). En previas investigaciones se ha demostrado que la degradación de DDT y metabolitos es más favorable a pH cercano a 7, que a valores de pH básicos cercanos a 9 (Alexander, 1981).

Durante los tratamientos en las bandejas se presentaron variaciones en los valores de pH. Para el tratamiento control, el pH varió en un rango de 2-2.5 debido a la adición de una solución de HCl. Esta condición genera toxicidad a los microorganismos y afecta la degradación de compuestos organoclorados. Para el tratamiento 3 el pH del suelo disminuyó a valores cercanos

a 5 y esto fue causado por la aplicación de una solución de melaza el cual tiene un rango de pH de 5.5-6. El tratamiento 2 mantuvo el valor de pH de 7.1 y su comportamiento fue similar a lo largo del estudio, debido a que no se le adicionaron nutrientes.

El comportamiento del pH para el tratamiento 4 tuvo aumento de pH 5.5 a 7.2, esto se pudo haber dado por la adición de los nutrientes. Es de notar que el efecto de una mayor tasa de degradación de DDT se pudo asociar al comportamiento del pH ya que el tratamiento 4 se desarrolló en el rango óptimo. Para el tratamiento con adición de nitrato de potasio (KNO_3) presentó un rango de variación de pH entre 7-7.5 y se explica a que este nutriente en una solución con agua provoca un efecto prácticamente neutro en el suelo, de aquí porque el rango de variación de estos valores.

La temperatura y la humedad son factores físicos que afectan directamente la biodegradabilidad de los plaguicidas, puesto que son dos condiciones ambientales indispensables a tener en cuenta para el desarrollo microbiano (Casellas et al., 1995).

El comportamiento de la temperatura en los protocolos de tratabilidad se mantuvo alrededor de 28°C - 29°C el cual se encuentra en el rango óptimo para que la actividad microbiana, se mantenga en condiciones ambientales estables y permita llevar a cabo la biodegradación del DDT.

Para la humedad, los valores iniciales en todos los tratamientos variaron entre un 27% y 31 % de humedad. Esto pudo proporcionar condiciones anaerobias necesarias en el sistema. Se observa que los tratamientos 3 y 4 mostraron valores más altos en el tiempo de degradación, y esto se debió a la adición de soluciones de melaza, el cual contiene cantidades de agua que aportaron al tratamiento. Para la segunda semana hubo una disminución en la humedad del suelo a causa de procesos físicos, lo cual fue necesario la dosificación de agua el día 12 a todos los tratamientos y esto se evidencio en la gráfica. Este parámetro influyó notablemente en el potencial redox, debido a que el tratamiento 4, que presento mayor humedad reportó valores más altos en su Eh.

La conductividad eléctrica (CE) medida a lo largo del estudio presentó valores con diferencias considerables para los tratamientos 1, 3 y 4. Para el control los valores de CE oscilaron entre (9500-8000) $\mu\text{S}/\text{cm}$ y se debió a la adición de una solución de HCl el cual es un electrolito fuerte. Para el tratamiento 4, entre la primera y segunda semana el valor de CE se mantuvo en un rango alto de (2300-2500) $\mu\text{S}/\text{cm}$, que se debió principalmente al contenido de sales presentes en la melaza, provocando consigo un aumento en la conductividad. Este rango clasifica a un suelo ligeramente salino, el cual no es adecuado ya que la acumulación de sales solubles puede afectar la biodisponibilidad del contaminante e inhibir la capacidad de biodegradación de la microflora autóctona (Kästner et al., 1994). Sin embargo, para la tercera semana y hasta el final del tratamiento, la CE del suelo disminuyó a 1200 $\mu\text{S}/\text{cm}$, valor que se encuentra en un rango adecuado de acuerdo a la clasificación planteada por (Laboratorio de Salinidad, 1974). El tratamiento 3 presentó un comportamiento similar con valores de CE entre un rango de (2500-2500-2600) $\mu\text{S}/\text{cm}$.

A diferencia de los tratamientos 2 y 5, los valores de CE fueron inferiores. Para la estrategia 2, la conductividad estuvo en un rango de (110-112) $\mu\text{S}/\text{cm}$, valor que coincide con la conductividad inicial del suelo sin la adición de nutrientes. Para el tratamiento 5, la CE estuvo

en un rango óptimo de 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Esto se explica a la fuerte afinidad que existe entre el catión K^+ y anión NO_3^- que lo hace altamente soluble, por lo que la aplicación de KNO_3 deja muy pocos iones disueltos en el suelo que puedan generar un aumento de la salinidad.

El recuento de heterótrofos a escala de laboratorio presentó un aumento en la primera semana de UFC (unidades formadoras de colonias) y que se mantuvo hasta la segunda semana para los tratamientos 3) Melaza, 4) Melaza- KNO_3 y 5) KNO_3 . Para la 3 semana la cantidad de bacterias heterótrofas disminuyó considerablemente. Se observó que el tratamiento 4 presentó una densidad de población bacteriana mayor en comparación con las estrategias 3) y 5) con un valor máximo de 5.4×10^4 UFC/g suelo, este resultado pone de manifiesto una vez más el porcentaje de remoción alcanzado para este tratamiento debido a la biomasa generada. Para el tratamiento de atenuación natural las UFC presentaron un comportamiento estable durante el tratamiento debido a que no hubo adición de fuentes de carbono y energía.

Para la fase dos de este estudio, se evaluó el tratamiento 4 a escala piloto mediante un reactor de lecho estático durante un periodo de 33 días. Se conservó un escalado geométrico, la relación C:N:P de 100:5:1 y una humedad del 30 %. Se determinaron en 4 puntos de muestreos ubicados dentro del reactor parámetros físicos, químicos y microbiológicos que fueron medidos a lo largo del estudio.

Los resultados obtenidos a escala piloto evidencian un comportamiento similar en los valores de los parámetros físicos y químicos medidos a escala de laboratorio.

La concentración de DDT en el reactor se redujo desde una concentración inicial de 72.35 mg/kg hasta una concentración final de 6.12 mg kg^{-1} , lo que representa un porcentaje de remoción de 91.54%. Este valor es relativamente similar al porcentaje obtenido en el tratamiento aplicado en la bandeja. Sin embargo, se esperaba que el porcentaje de remoción fuese más alto debido a que se mejoraron las condiciones anaerobias.

En cuanto a la cinética de degradación en el reactor se ajustó a una ecuación cinética de primer orden, lo que indica concordancia a estudios reportados anteriormente por (Chiu et al., 2004). La constante de degradación obtenida indica que diariamente desaparece 0.0784 partes de contaminante y el tiempo de vida media es de 8,8 días. Este valor pudo determinar que la tasa de biodegradación de DDT aumenta con la aplicación de tratamientos en condiciones anaerobias y la importancia de adicionar al suelo un co-sustrato y un aceptor de electrones con alto potencial reductor, el cual permitan aumentar la actividad enzimática.

Estos resultados coinciden con estudios recientes realizados por (Liu et al., 2015) para la descontaminación de suelos con DDT en condiciones anaerobias, donde se lograron obtener tiempos de vida de entre 8 y 12 días con la adición de ácido cítrico y 2,6- disulfonato antraquinona.

Cabe mencionar que algunos estudios de laboratorio muestran que la cinética de la degradación calculada a partir de las reacciones normalmente utilizadas en estudios no se puede aplicar cuando la concentración de plaguicidas es extremadamente baja o muy alta (Fernandes, 2004),

ya que las tasas de biodegradación dependen tanto de la concentración de plaguicida en el suelo como la actividad de los microorganismos o sistemas enzimáticos presentes.

Posterior a la aplicación del protocolo de bioestimulación las características físico-químicas del suelo presentaron una variación. El pH aumento de 6.6 a 7.3 y esto se debe a la aplicación de nutrientes en solución (nitrato de potasio) con valores de pH que varían en el rango de 7.5-8. Así mismo el nitrógeno total y N como NH₄ aumentaron debido a la adición de melaza y nitrato de potasio, fuentes constituidas por compuestos nitrogenados.

Para los 4 puntos de muestreo la temperatura se mantuvo entre rangos de 27°C y 28°C. Solo se reportó una disminución en la temperatura la primera semana, debido a cambios climáticos presentados en el día de medición. Así mismo la humedad tuvo un comportamiento similar en los 4 puntos de muestreo. El valor del pH al inicio del tratamiento presento valores ácidos hasta alcanzar un rango en la primera semana de 6.0- 6,4 hasta estabilizarse con un pH neutro en la tercera semana. Se notó un cambio en los valores para la última semana entre un rango de 6.5-7.0. Sin embargo, permanece en el rango favorable para la degradación del contaminante.

En cuanto a los valores de potencial redox obtenidos en el reactor, presentaron un cambio notable, con respecto a los valores de Eh en los tratamientos a escala de laboratorio. Al inicio los valores presentan un rango de -80 y -100 mV entre la primera y segunda semana respectivamente. Esto se podría explicar debido a la mayor cantidad de suelo a descontaminar, donde la actividad anaerobia requiere un tiempo mayor de incubación de 1-2 semanas para llegar realmente ser eficaz. Por otra parte, se puede considerar el hecho de que en el proceso entro a una fase aerobia/anaerobia, donde existe hay una disminución de los potenciales redox.

En cuanto a la caracterización bioquímica y molecular, se pudo aislar 2 colonias representativas del suelo contaminado con DDT y del suelo después de haber sido aplicado el tratamiento de bioestimulación en el reactor de lecho estático. Para la prueba de Coloración de Gram se obtuvo bacilos Gram positivos en ambas bacterias.

Se logró extraer el DNA y amplificar exitosamente el gen 16S de las muestras en estudio. Según la herramienta *Blastn*, se detectaron secuencias homologas para las muestras B1 (bacteria suelo contaminado) y B2 (bacteria suelo después del tratamiento) al género *Bacillus*, las cuales se usaron como referencias para el posterior análisis filogenético para las muestras.

Estudios han reportado a partir de tratamientos experimentales en el suelo la habilidad de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas de tener capacidad metabólica de atacar el DDT. (Katayama et al., 1993) demostró que bacterias anaerobias han degradado DDT a través de mecanismos de dechloración reductiva tales como: *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeuriginosa*, *Escherichia Coli*, *Proteus vulgaris*.

De acuerdo a la matriz de distancia se pudo identificar para la bacteria B1 *Bacillus circulans* y la secuencia B2 a la secuencia de referencia de *Bacillus megaterium*. Lo que indica la gran resistencia que tiene el género *Bacillus* contra el contaminante presente en el suelo

Los microorganismos del género *Bacillus* son bacilos de gran tamaño, Gram positivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos encapsulados. Una característica importante es que forman esporas extraordinariamente resistentes a condiciones desfavorables. Aunque la mayoría de las especies de *Bacillus* son inocuas, algunas son patógenas para las personas y los animales. Se pueden encontrar en ambientes naturales, como el agua y el suelo.

Es de gran relevancia realizar un análisis cualitativo de la toxicidad del suelo al inicio y después del tratamiento de biorremediación, que permita determinar si el tratamiento aplicado en este estudio ha sido eficiente puede ser planteado como un modelo de gestión ambiental eficiente en la descontaminación de suelos con DDT.

Para ello se tomaron valores de referencia planteados por la (EPA, 2014), donde se tuvo en cuenta el tipo de suelo residencial, para el cual genera toxicidad crónica por ingesta de suelo a partir de concentraciones de 39 mg DDT /kg suelo y riesgo cancerígeno por contacto dérmico para concentraciones de 19 mg DDT/kg suelo. Esto indica que el suelo contaminado al inicio del estudio representa un riesgo para la salud, principalmente a las personas que puedan estar directamente expuestas al sitio contaminado.

Por otra parte, posterior a la aplicación del protocolo de bioestimulación demostró que el suelo es menos tóxico si se compara con los niveles de concentración mencionados, y se infiere que la tecnología valorada en este estudio puede minimizar el impacto generado por este pesticida a la salud humana y el medio ambiente.

La investigación experimental permitió establecer condiciones operacionales para un efectivo protocolo de biorremediación en la descontaminación de suelos con DDT. Los valores óptimos de los parámetros más influyentes en el proceso en condiciones anaerobias fueron el potencial redox, pH, recuento de heterótrofas y humedad. Los valores negativos en los potenciales (-89.4 mV, -295 mV) para los tratamientos en ausencia de oxígeno mejoran considerablemente la tasa de biodegradación de DDT. El pH óptimo para la bioestimulación fue de 6.5-7. El valor de la capacidad de campo del suelo que correspondió al 30 % de humedad permitió asegurar condiciones anaerobias.

Esta alternativa de gestión ambiental representa ser útil por su viabilidad económica y ambiental en el tratamiento de suelos contaminados con DDT, por lo cual a continuación se formula un plan de manejo ambiental que permita involucrar los factores normativos y sociales.

8.1 Formulación de un plan de manejo ambiental para biorremediar suelos contaminados con DDT mediante bioestimulación *ex situ*

La gestión ambiental contempla de manera integrada todos los aspectos que componen el medio humano y el medio natural en cuanto a vectores que introducen modificaciones significativas al mismo, estas modificaciones denominadas impactos ambientales: identificación, evaluación, prevención, mitigación o compensación constituyen el objeto de la gestión ambiental (Angel et al., 2010).

El planteamiento de un protocolo ambiental que involucre la tecnología de biorremediación estimulada *ex situ* a escala piloto para el tratamiento de suelos contaminados con DDT, debe contener medidas que permitan reducir y controlar riesgos e impactos al ambiente. Este protocolo contempla elementos normativos, sociales y técnicos, que se detallan a continuación:

8.1.1 Revisión ambiental inicial

La primera fase para la formulación de un plan de manejo ambiental para la descontaminación de suelos con DDT es la realización de una completa investigación del medio que se ha afectado. Esto incluye principalmente el estudio exhaustivo de la caracterización del emplazamiento mediante trabajo de campo. Así mismo se deben establecer:

- **Delimitaciones del lugar contaminado**

Este es el primer paso a dar al momento de plantear un plan de gestión ambiental, el cual debe considerar la totalidad de suelo degradado por el pesticida a través de muestreos y análisis químicos que permitan identificar la concentración del organoclorado presente en el sitio. Sin embargo, existen múltiples factores que dificultarían el éxito de esta primera fase, por lo tanto, delimitar el área de suelo contaminada requiere de la aplicación de herramientas de gestión.

De acuerdo a los valores de referencia planteados por la (EPA, 2014), si la concentración de DDT en el suelo contaminado es menor a 19 mg/kg el suelo no representa ningún riesgo a la salud y al medio ambiente. Por lo contrario si la concentración es mayor a 19 mg/kg es necesario llevar a cabo el protocolo de gestión ambiental planteado que incluya los aspectos mencionados a continuación:

- **Fuente de contaminación**

Determinar de dónde proviene la contaminación a través análisis de muestras en laboratorio, perforaciones exploratorias y evaluación geofísica mediante las técnicas de geomagnetismo y georadar. De acuerdo a lo mencionado por (MAVD, 2006) la hipótesis más probable sería el enterramiento de canecas con este pesticida.

- **Receptores**

Identificar tanto a los receptores humanos y ecológicos (suelo, fauna y vegetación) cercanos a la zona afectada.

- **Rutas de migración del contaminante**

Plantear rutas de migración que proporcionen datos precisos sobre el comportamiento del contaminante. Para el caso del DDT debido a la baja solubilidad en el agua, es poco probable que se detecten concentraciones en el agua subterránea y que esta ruta sea de poca importancia. Sin embargo, la bioacumulación de este plaguicida organoclorado puede representar una ruta relevante para las especies que habitan en el área.

- **Vías de exposición**

Identificar las vías de exposición más relevantes. Para el caso del contaminante las más probables serían inhalaciones de vapores y partículas de suelo contaminado, ingestión accidental partículas de suelo contaminado, contacto dérmico, riesgo ecotoxicológico.

- **Análisis de riesgo**

Recopilación de datos para realizar el análisis cuantitativo de riesgos existentes, donde su objetivo es alcanzar un diagnóstico medioambiental sobre el estado del suelo del emplazamiento que incluyan la exposición a la contaminación de las personas por diferentes vías. Para esto se han planteado diferentes métodos para el análisis de riesgo y para este protocolo se propone el método holandés CSoil (Geosísmica y Ambiente, 1997).

Para compuestos cancerígenos el riesgo se caracteriza por el parámetro Riesgo Cancerígeno (RC), que es el producto de la dosis de exposición (mg/kg día) por el factor cancerígeno (Kg día/mg)

$$\text{Riesgo Cancerígeno (RC)} = \text{Dosis Exposición} * \text{Factor Cancerígeno}$$

El rango de aceptabilidad del riesgo cancerígeno está entre 1×10^{-4} (un cáncer adicional a lo largo de una vida en una población de 10000 personas) y 1×10^{-6} .

8.1.2 Referentes normativos

La normatividad ambiental proferida a nivel mundial con respecto a la protección del recurso suelo, es relativamente nueva. Hasta los años 1970 sólo se hablaba de la contaminación del aire y del agua, y al suelo se le atribuía una capacidad de autodepuración casi infinita (Silva & Correa, 2009). En este sentido, se plantea entonces que, en Colombia, si bien existen normativa e instituciones ambientales, hay una débil regulación ambiental, puesto que el acople entre estos dos elementos, aunado con el uso de instrumentos económicos y de comando y control aún no se encuentra plenamente realizado (A. Silva & Correa, 2009).

Para el planteamiento del modelo de gestión ambiental se deben tomar como base las referencias legales recogidas en los siguientes apartados en torno al control de la contaminación del suelo:

Tabla 21. Normatividad ambiental colombiana en torno a la protección del suelo y la regulación de sustancias químicas peligrosas.

Norma	Contenido
Artículo 80 Desarrollo sostenible	La Constitución Nacional en desarrollo de este principio, consagró: “El Estado planificará el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales para garantizar su desarrollo sostenible, su conservación o sustitución. Además, deberá prevenir y controlar los factores de deterioro”.
ley 99 de 1993	El Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial debe expedir las regulaciones ambientales para la distribución y uso de sustancias químicas utilizadas en actividades agropecuarias y dictar regulaciones para impedir la fabricación, importación, posesión y uso de armas químicas, biológicas y nucleares.
Decreto 2811 de 1974	Se contempla al ambiente como patrimonio común, en este contexto el estado y los particulares deben participar en su preservación y manejo. Así mismo, se regula el manejo de los recursos naturales renovables y no renovables, la defensa del ambiente y sus elementos.
Decreto 1843 de 1991	Reglamenta el uso y adecuado manejo de plaguicidas a nivel nacional, incluyendo aproximaciones sobre parámetros técnicos y niveles de toxicidad.
Ley 9ª de 1979	Código sanitario nacional. Desarrolla múltiples temas entre los cuáles se destacan los residuos sólidos, emisiones atmosféricas, sustancias químicas peligrosas, sustancias tóxicas, plaguicidas, etc
Resolución 0631	Por lo cual se establecen los parámetros y los valores máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de agua superficiales, entre estos plaguicidas.

8.1.3 Participación comunitaria

En planes de manejo ambiental para el tratamiento de suelos contaminados con DDT es de suma importancia involucrar a la comunidad desde su etapa de formulación, con el fin de dotar el mismo de pertinencia, de reconocer el saber tradicional relacionado con el manejo del suelo como recurso natural, y de estimular el trabajo comunitario mediante la capacitación y la orientación con directrices científicas prácticas. La participación comunitaria se convierte en un instrumento clave que viabiliza la continuidad de cualquier plan de manejo.

8.1.4 Medida de gestión planteada

Existen diversas alternativas en el tratamiento de suelos contaminados con DDT; técnicas físico-químicas para controlar y mitigar este tipo de contaminación, sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que la aplicación de métodos biológicos ha resultado ser eficientes y adecuados, debido a que causan menor impacto en el sitio del problema. Una de estas metodologías eficientes es la bioestimulación con nutrientes, lo cual es una técnica de tratamiento que puede realizarse tanto en el sitio (in situ) o fuera del sitio (ex situ), y consiste en la estimulación de las poblaciones nativas con la adición de nutrientes o cualquier otro componente ajeno capaces de mejorar la degradación del contaminante.

Si por las condiciones del lugar no se puede realizar remediación *in situ* o si se quiere simplemente optimizar la técnica, se puede recurrir a técnicas *ex situ* alternativas tales como el compostaje, el landfarming y las biopilas. Cuando sea posible, los suelos contaminados se suelen tratar de manera más eficaz si el tratamiento biológico se realiza *ex-situ*, ya que la adición de nutrientes necesarios como el nitrógeno y el fósforo, la humedad, los surfactantes, las bacterias, y el oxígeno, así como la monitorización de los parámetros que controlan la evolución del proceso, se pueden realizar más fácilmente que *in situ* (Alexander M., 1994).

El protocolo propone la biorremediación a través del uso de un reactor de lecho estático. Sin embargo, las opciones de que se dispone para el diseño de reactores están determinadas básicamente por las propiedades físicas del sitio contaminado, así como de las propiedades químicas y bioquímicas de los contaminantes.

En la tabla 22 se presentan los parámetros más influyentes que se deben tener en cuenta de plan y sus rangos adecuados.

Tabla 22. Parámetros de influencia en la bioestimulación

Parámetro ambiental	Rango adecuado
pH	6-8
Temperatura	20°C-40°C
% Humedad	25%-75% de la capacidad de campo
Biomasa	10 ³ -10 ⁴ UFC/g
Nutrientes	100:10:1 a 100:2:0.2

8.1.5 Costos gestión ambiental

Se deben establecer costos en la implementación de la medida de gestión. Esto dependerá básicamente de varios factores: i) cantidad y fracción de suelo a tratar, ii) disponibilidad de agentes de volumen, iii) nutrientes a utilizar, iv) necesidad de tratamientos previos y posteriores y, v) necesidad de equipos de control para monitorear parámetros.

El método de gestión planteado representa una gran ventaja a la hora de descontaminar suelos ya sea a través de tecnologías in situ o ex situ, debido a que los nutrientes aquí mencionados son fuentes económicas de carbono que podría ser usada a escalas mayores a bajo costo.

8.1.6 Implementación de la medida de gestión

Para llevar a cabo un tratamiento de biorremediación eficaz, se deben cumplir unos requisitos y se deben identificar con anterioridad los factores específicos que condicionan el proceso para así conocer las características microbianas, edafológicas y fisicoquímicas del terreno.

En primer lugar, se debe realizar una investigación exhaustiva del emplazamiento en relación con los contaminantes y en relación con el tipo de suelo. En segundo lugar, se deben realizar unos ensayos de tratabilidad a nivel de laboratorio, seguidos si es factible de la implantación de dicha técnica. Estos ensayos de tratabilidad permiten evaluar el nivel y la actividad de las poblaciones microbianas presentes, la biodegradabilidad de los contaminantes presentes por parte de las poblaciones microbianas indígenas y, finalmente, encontrar aquellas condiciones medioambientales que permitan optimizar la actividad metabólica de las poblaciones microbianas responsables de la eliminación de los contaminantes.

La comprensión de los diferentes procesos de adsorción y degradación natural de contaminantes en el suelo se constituye en punto de partida dentro del diseño de estrategias para la biorremediación con DDT.

Escenarios de afectación por contaminantes de alta solubilidad en suelos de texturas gruesas y bajos contenidos de materia orgánica, indican alertas, por la posibilidad de que los contaminantes alcancen los mantos acuíferos subterráneos, incrementando la magnitud del problema. El potencial genético que albergan los microorganismos posibilita la biodegradación de una amplia gama de sustancias que llegan al suelo mediante su actividad enzimática, por ello la importancia de mantener las poblaciones microbianas a través de la adición permanente de materia orgánica fresca.

Por otra parte, se debe tener en cuenta la dosificación de nutrientes que se aplicara en el tratamiento de biorremediación ya que un exceso de nutrientes puede inhibir el crecimiento bacteriano y provocar una disminución en el rendimiento en la medida de gestión a utilizar.

Tabla 23. Etapas a seguir en la fase de implementación del plan de manejo para biorremediar suelos contaminados con DDT

ETAPAS DE IMPLEMENTACIÓN
Información del sitio a descontaminar
Caracterización físico-química del suelo
Calculo de la dosificación de nutrientes
Aplicación del tratamiento de biorremediación
Monitoreo de parámetros físicos y químicos del sitio descontaminado

8.1.7 Plan monitoreo y seguimiento

En esta fase es necesario monitorear periódicamente los parámetros físicos y químicos, determinando de esta manera un control en el tratamiento de biorremediación. Así mismo se pueden aplicar pruebas de toxicidad en el suelo, que permita verificar la no presencia de compuestos tóxicos en el suelo.

Formulación protocolo ambiental para biorremediar suelos contaminados con DDT

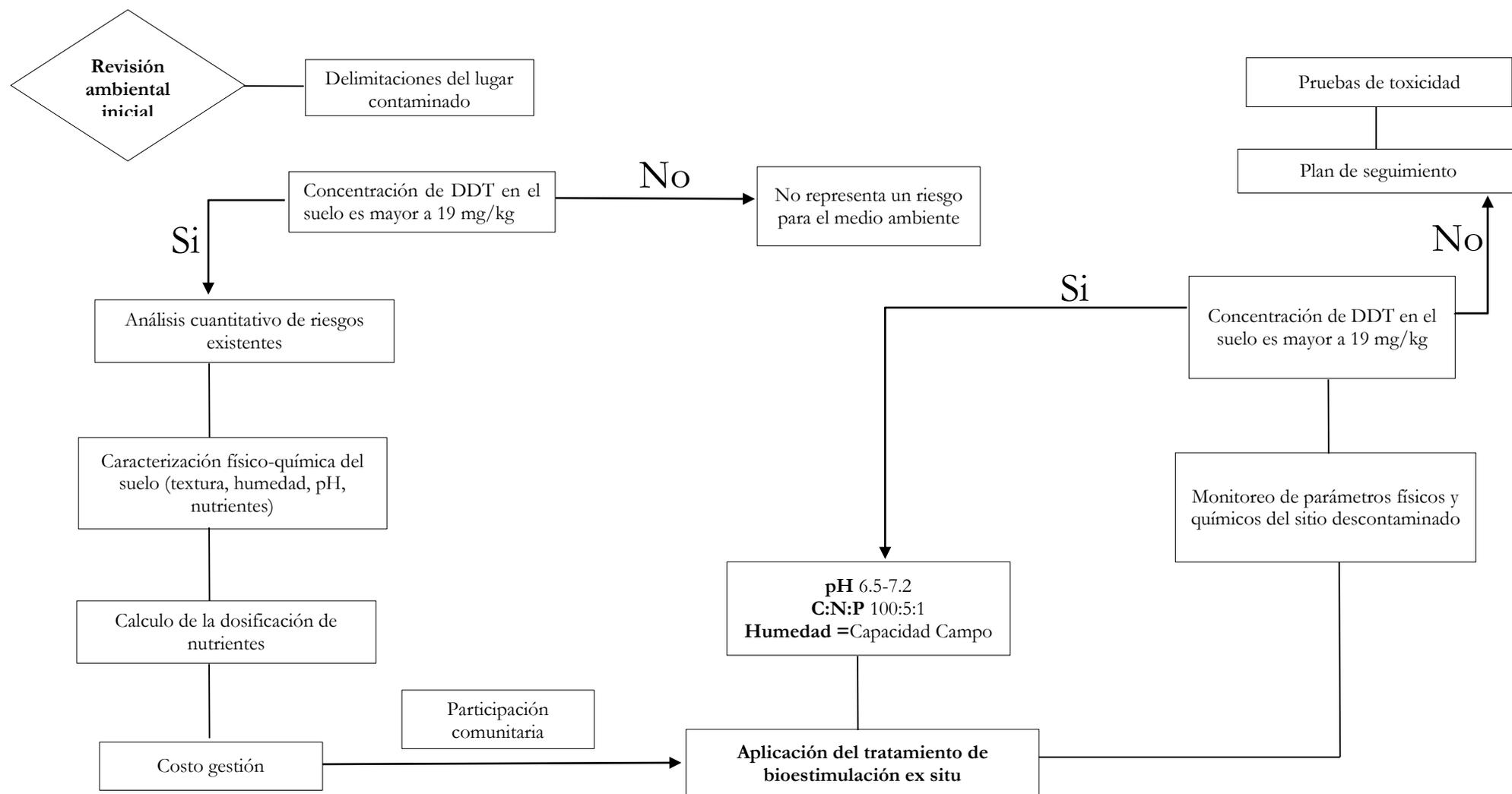


Figura 24. Esquema del plan de manejo ambiental para biorremediar suelos contaminados con DDT

9. CONCLUSIONES

Los satisfactorios porcentajes de degradación obtenidos en la presente investigación, permiten formular un modelo de gestión ambiental para biorremediar suelos contaminados con DDT. La bioestimulación con melaza-KNO₃ constituye un método de gestión alternativo de gran potencial para el tratamiento de suelos contaminados con este pesticida, y representa una gran ventaja ya que los nutrientes son fuentes de carbono y energía que podrían ser usados a escalas mayores a bajo costo.

La caracterización físico- química del suelo antes y después del tratamiento de biorremediación revelan la importancia de conocer características iniciales y finales presentes en el suelo ya que estos condicionan los procesos de biorremediación. Así mismo existe la gran ventaja a la hora de aplicar estrategias de remediación que permitan establecer puntos de partida en los métodos de gestión ambiental en la descontaminación de sitios.

Los resultados demostraron una relación con la variabilidad en las propiedades físico-químicas iniciales con la zona donde se recolecto el suelo. De igual forma características como textura, concentración de nutrientes, pH, conductividad, permitieron plantear parámetros adecuados para la aplicación de tratamientos de biorremediación.

El tratamiento con adición de melaza - KNO₃ representó el mayor porcentaje de remoción con un 92,5%. Esto demostró que la presencia de un co-sustrato incrementa notablemente la presencia de bacterias heterótrofas en el suelo, y como consecuencia aumentan la biodegradación del contaminante.

Aunque el contaminante actúa como fuente de carbono y energía en la mayoría de los casos, los microorganismos presentes en el suelo son incapaces de metabolizar un compuesto como fuente única de carbono. Por tanto, la suplementación de un sustrato secundario aumenta significativamente la densidad de población microbiana y consigo la producción de enzimas degradadoras.

La tasa de degradación demuestra la eficiencia de la aplicación de tratamientos en condiciones anaerobias para biorremediar suelos contaminados con DDT en un reactor de lecho estático. Se pudo concluir que diariamente desaparece 0,0784 partes de contaminante durante los 33 días de estudio, lo cual verifica que es posible llevar a cabo la biorremediación de DDT a través de la bioestimulación a una mayor escala.

Se pudo determinar que la tasa de biodegradación de DDT aumenta con la aplicación de tratamientos en condiciones anaerobias y la importancia de adicionar al suelo un co-sustrato y un aceptor de electrones con alto potencial reductor. Sin embargo, las tasas de biodegradación dependen tanto de la concentración de plaguicida en el sustrato como la actividad de los microorganismos o sistemas enzimáticos presentes, infiriendo que la cinética de la degradación

calculada a partir de las reacciones normalmente utilizadas en estudios no se puede aplicar cuando la concentración de plaguicidas es extremadamente baja o muy alta.

La identificación bioquímica y molecular de las cepas que predominaron al inicio y final del tratamiento por bioestímulo con melaza - KNO_3 demostraron que la bacteria del genero *Bacillus* logro ser resistente al contaminante presente en el suelo. Así mismo se comprobó con estudios previos la capacidad que tiene este género para degradar DDT.

Se planteó un plan de gestión ambiental que integrara la estrategia de bioestimulación para el tratamiento de suelos contaminados con DDT. A partir de ensayos experimentales con biorremediación *ex situ*, se establecieron parámetros de operación que permitieron desarrollar la estructura enfocada hacia la descontaminación de suelos. El modelo demuestra que es necesario conformar un conjunto de componentes que se integren de forma funcional, teniendo en cuenta básicamente las características propias del sitio, el tipo de contaminante, la normativa vigente, tratamientos aplicados a pesticidas, costos de gestión y control de acciones correctivas.

10. RECOMENDACIONES

Los puntos relevantes para futuras investigaciones enfocados en el planteamiento de modelos ambientales que puedan ayudar a comprender la biodegradación de suelos contaminados con DDT se deben considerar los siguientes aspectos:

Sería pertinente realizar investigaciones que vayan encaminadas a la actualización y consolidación de la información relacionada con las existencias de compuestos órgano-persistentes el país entre estos el DDT.

Evaluar la biodegradación de DDT en un reactor de lodos. Así mismo analizar el comportamiento de las variables físico-químicas que ocurren en el sistema de reacción.

Se recomienda realizar un ensayo conjunto de posibles estudios de biodegradación de DDT *ex situ*, bajo condiciones aerobias y anaerobias intercaladas, o bien sea considerado un ambiente aerobio anaerobio facultativos para evaluar el potencial de degradación de DDT.

Plantear modelos de gestión ambiental que permitan biorremediar suelos contaminados con cualquier tipo de compuesto organoclorado.

ANEXOS

Anexo 1. Fotografías punto de muestreo. Municipio Codazzi, Cesar



Fotografía 1. Punto de muestreo en el municipio Codazzi, Cesar



Fotografía 2. Recolección de las muestras de suelo en el municipio Codazzi, Cesar

Anexo 2. Montajes en las bandejas

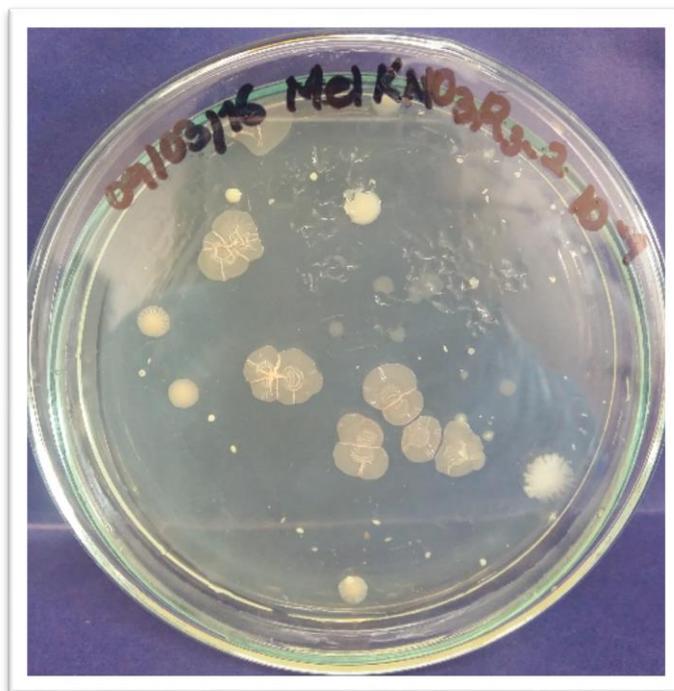


Fotografía 3. Montaje de los tratamientos de biorremediación en las bandejas

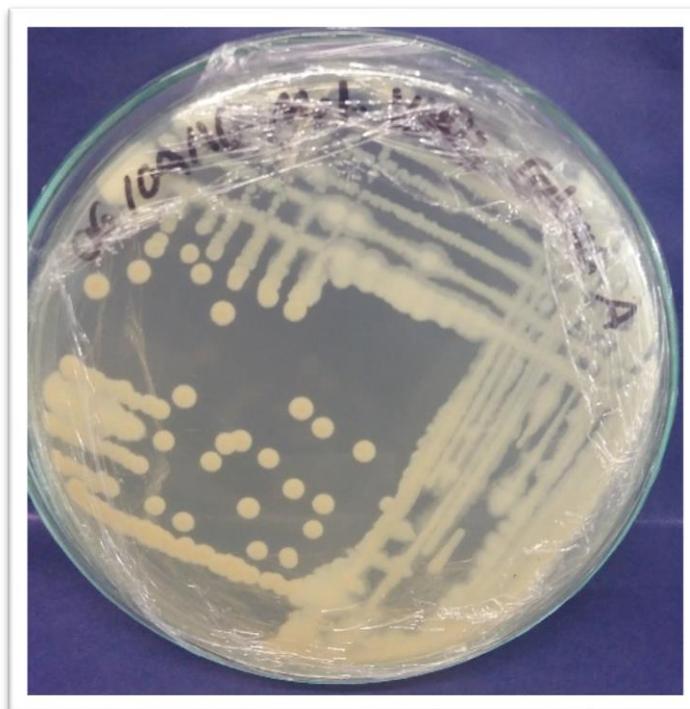


Fotografía 4. Montaje del tratamiento de bioestimulación con melaza y KNO_3

Anexo 3. Fotografías aislamiento de las bacterias predominantes en el tratamiento

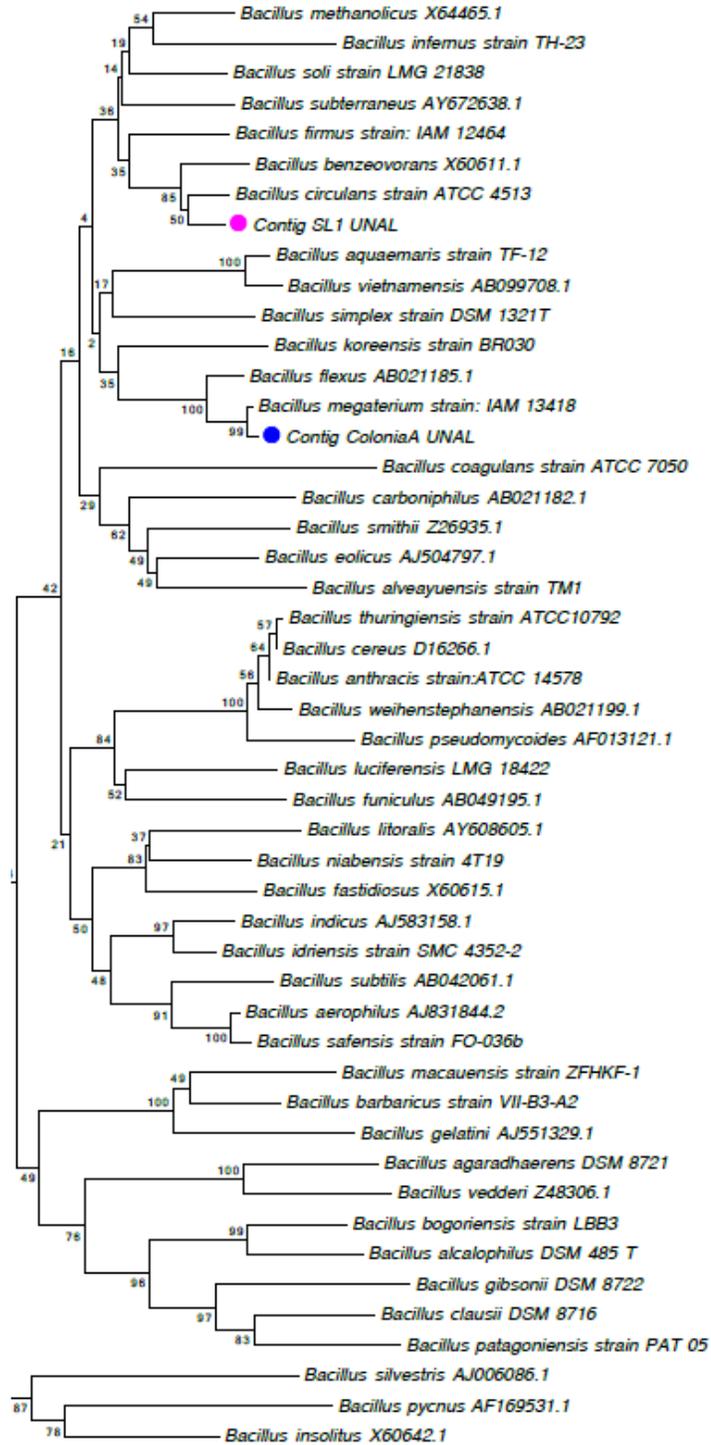


Fotografía 5. Siembra de colonias para el tratamiento de bioestimulación melaza y KNO_3

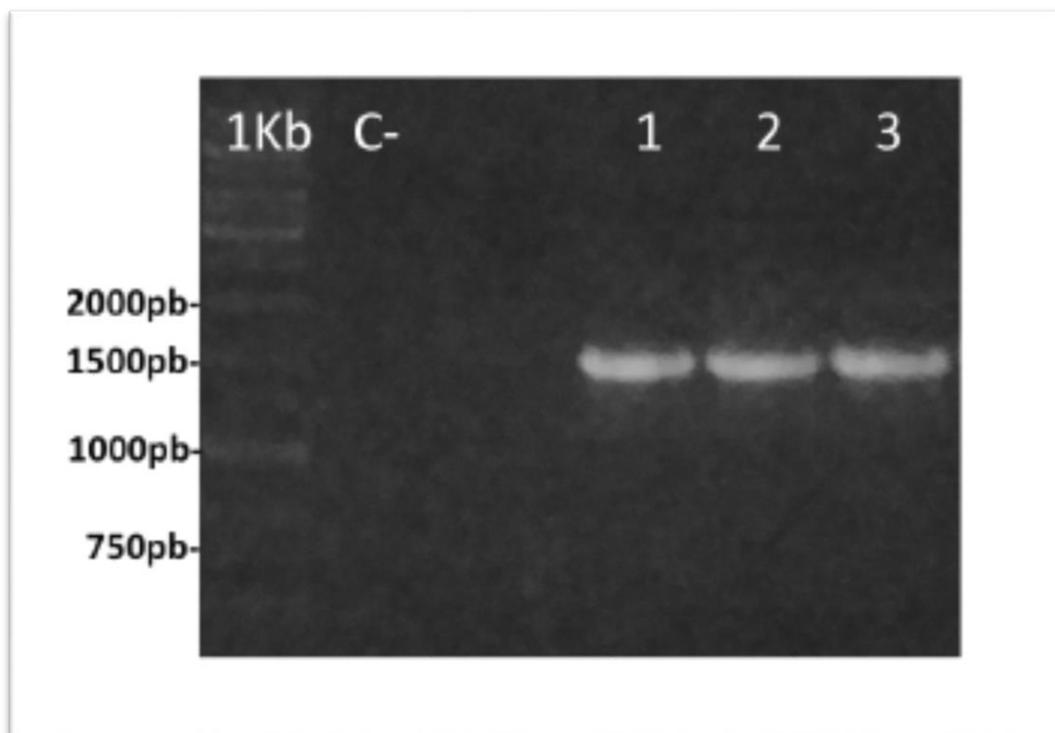


Fotografía 6. Aislamiento de colonias para el tratamiento de bioestimulación melaza y KNO_3

Anexo 4. Árbol filogenético muestras B1 y B2. Fuente: Identificación obtenida en el Centro Nacional Secuenciación Genómica de la Universidad de Antioquia



Anexo 5. Gel de agarosa con fragmentos amplificados mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) de colonias aisladas. Fuente: Identificación obtenida en el Centro Nacional Secuenciación Genómica de la Universidad de Antioquia



BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, N. (1989). Tratado de Edafología de México. Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México.
- Aislabie, J. M., Richards, N. K., & Boul, H. L. (2010). Microbial degradation of DDT and its residues—A review. <http://dx.doi.org/10.1080/00288233.1997.9513247>.
- Alexander, M. (1981). Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science (New York, N.Y.)*, 211(4478), 132–8. <http://doi.org/10.1126/science.7444456>
- Alexander M. (1994). *Biodegradation and Bioremediation*. (Academic Press, Ed.). San Diego.
- Alvarado, A., José, P., Pérez, G., & Edilberto. (2003). *Biorremediación y atenuación natural de acuíferos contaminados por sustancias químicas peligrosas*. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo.
- Amaral, M. C. S., Ferreira, C. F. A., Lange, L. C., & Aquino, S. F. de. (2008). Avaliação da biodegradabilidade anaeróbica de lixiviados de aterro sanitários. *Engenharia Sanitaria E Ambiental*, 13(1), 38–45. <http://doi.org/10.1590/S1413-41522008000100006>
- American Society of agronomy. (1982). *Methods of Analysis part, 2* (2da ed.). USA.
- Andersen, H. R., Andersson, A.-M., Arnold, S. F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N. A., ... Grandjean, P. (1999). Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals. *Environmental Health Perspectives*, 107, 89. <http://doi.org/10.2307/3434476>
- Angel, S., Carmona, S., & Villegas, L. (2010). *Gestión ambiental en proyectos de desarrollo* (4ta ed.). Medellín, Colombia.
- Arbeli, Z. (2009). Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): I. El caso de los bifenilos policlorados (PCB). *Acta Biológica Colombiana*, 14(1), 57–88.
- Arnold, D. J., & Briggs, G. G. (1990). *Fate of pesticides in soil: predictive and practical aspects*. (D. . Hutson & T. R. Roberts, Eds.).
- ASTDR. (2002). Toxicological profile for DDT, DDE and DDD. *Agencia de Sustancias Tóxicas Y Registro de Enfermedades*.
- Atlas, R., & Bartha, R. (2002). *Microbial Ecology Fundamentals and Applications*. (Fourth editi). The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (1993). *Microbial Ecology-Fundamentals and Applications* (Benjamin-C). Redwood City.

- Bailey, N. J. L., Jobson, A. M., & Rogers, M. A. (1973). Bacterial degradation of crude oil: Comparison of field and experimental data. *Chemical Geology*, 11(3), 203–221. [http://doi.org/10.1016/0009-2541\(73\)90017-X](http://doi.org/10.1016/0009-2541(73)90017-X)
- Baird, C., & Cann, M. (2014). *Química ambiental*. Reverté.
- Bao, P., Hu, Z. Y., Wang, X. J., Chen, J., Ba, Y. X., Hua, J., ... Wu, C. Y. (2012). Dechlorination of p,p'-DDTs coupled with sulfate reduction by novel sulfate-reducing bacterium *Clostridium* sp. BXM. *Environmental Pollution*, 162, 303–310.
- Barker, P. S., Morrison, F. O., & Whitaker, R. S. (1965). Conversion of DDT to DDD by *Proteus vulgaris*, a Bacterium isolated from the Intestinal Flora of a Mouse. *Nature*, 205(4971), 621–622. <http://doi.org/10.1038/205621b0>
- Barragán-Huerta, B. E., Costa-Pérez, C., Peralta-Cruz, J., Barrera-Cortés, J., Esparza-García, F., & Rodríguez-Vázquez, R. (2007). Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(3 SPEC. ISS.), 239–244. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.11.001>
- Betancur, B. (2013). *Biorremediación De Suelo Contaminado Con El Pesticida 1,1,1-Tricloro 2,2'bis(P-Clorofenil)Etano (Ddt) Mediante Protocolos De Bioestimulación Y Adición De Surfactante*. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.
- Beunink, J., & Rehm, H. J. (1988). Synchronous anaerobic and aerobic degradation of DDT by an immobilized mixed culture system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 72–80.
- Bidlan, R., & Manonmani, H. K. (2002). Aerobic degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT-1P. *Process Biochemistry*, 38(1), 49–56. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00066-3](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00066-3)
- Boush, G. M., & Batterton, J. C. (1972). *Ecological aspects of pesticide microbial relationship. Environmental toxicology of pesticides* (Academic P). New York.
- Bouyoucos, G. J. (1962). Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analyses of Soils. *Agronomy Journal*, 54(5), 464. <http://doi.org/10.2134/agronj1962.00021962005400050028x>
- Bray, R., & Kurtz, L. T. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science*, 59(1), 39–46.
- Bridges, W. R., Kallman, B. J., & Andrews, A. K. (2011). Persistence of DDT and its Metabolites in a Farm Pond. [http://dx.doi.org/10.1577/1548-8659\(1963\)92\[421:PODAIM\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1577/1548-8659(1963)92[421:PODAIM]2.0.CO;2)
- Brown, R. A., Wilson, J. T., & Ferrey, M. (2007). Monitored natural attenuation forum: The case for abiotic MNA. *Remediation Journal*, 17(2), 127–137. <http://doi.org/10.1002/rem.20128>
- Casellas, M., Fernández, P., Bayona, J. M., & Solanast, A. M. (1995). Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona

- (Spain). *Chemosphere*, 30(4), 725–740. [http://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)00438-Z](http://doi.org/10.1016/0045-6535(94)00438-Z)
- Castro, M. (1993). *Estudio de la melaza de caña como sustrato de la fermentación acetobutilica*. Universidad Nacional de Colombia.
- Castro, T. F., & Yoshida, T. (2002). Degradation of organochlorine insecticides in flooded soils in the Philippines.
- Chang, B.-V., Chang, I. T., & Yuan, S. Y. (2008). Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(2), 145–9. <http://doi.org/10.1007/s00128-007-9333-1>
- Chapelle, F. (2001). *Ground-water microbiology and geochemistry*. Wiley.
- Chernicharo, C. (2007). Principios do tratamento biológico de águas residuárias, 5.
- Chiu, T.-C., Yen, J.-H., Liu, T.-L., & Wang, Y.-S. (2004). Anaerobic Degradation of the Organochlorine Pesticides DDT and Heptachlor in River Sediment of Taiwan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(4), 821–828. <http://doi.org/10.1007/s00128-004-0318-z>
- Clinical Microbiology Procedures Handbook. (2010). *Clinical Microbiology Procedures Handbook, 3rd Edition*. (L. S. Garcia, Ed.) (3a ed.). American Society of Microbiology. <http://doi.org/10.1128/9781555817435>
- Cookson, J. T. (1995). *Bioremediation engineering: design and application*. McGraw-Hill.
- Corona, A. (2000). *Biodegradación anaerobia y aerobia de DDT por fermentación en medio sólido*. Universidad Autónoma metropolitana Iztalpa.
- Defensoría del pueblo. (2001). Uso, almacenamiento y disposición inadecuado de plaguicidas, *Resolución*(11), 1–37.
- DeLong, R., Gilmartin, W. G., & Simpson, J. G. (1973). Premature births in California sea lions: association with high organochlorine pollutant residue levels. *Science (New York, N.Y.)*, 181(4105), 1168–70. <http://doi.org/10.1126/science.181.4105.1168>
- EPA. (1996a). Method 3630C:Silica gel cleanup.
- EPA. (1996b). Method 8000B: Determinative chromatographic separations.
- EPA. (2014). *Regional Screening Levels (RSLs)*.
- Fang, H., Dong, B., Yan, H., Tang, F., & Yu, Y. (2010). Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 184(1–3), 281–289.
- FAO. (1996). Eliminación de grandes cantidades de plaguicidas en desuso en los países en desarrollo. *Colección FAO: Eliminación de Plaguicidas*.

- Feidieker, D., Kämpfer, P., & Dott, W. (1995). Field-scale investigations on the biodegradation of chlorinated aromatic compounds and HCH in the subsurface environment. *Journal of Contaminant Hydrology*, 19(2), 145–169. [http://doi.org/10.1016/0169-7722\(95\)00013-L](http://doi.org/10.1016/0169-7722(95)00013-L)
- Fernandes, M. da C. (2004). *Comportamiento de Plaguicidas en Suelos de Andalucía Occidental y Bajo Alentejo: Efecto de la adición de enmiendas orgánicas*. Universidad de Sevilla.
- Field, J., Wageningen, A. U. of, Cauca, C. A. R. del, & Wageningen, A. U. of. (1987). Parámetros operativos del reactor de manto de lodos anaeróbicos de flujo ascendente. *Curso Arranque Y Operación de Sistemas de Flujo Ascendente Con Manto de Lodo UASB*, 1–35.
- Fisher, A. (1989). DDT and DDE: Sources of Exposure and How to Avoid Them. *World*, (1), 1–6.
- Foght, J., Trevor, A., Kevin, B., & Jackie, A. (2001). Bioremediation of DDT-Contaminated Soils: A Review. *Bioremediation Journal*, 225–246.
- Foundation for Agronomic Research. (1988). *Soil Fertility Manual. Potash & Phosphate Institute and the Potash & Phosphate Institute of Canada*.
- Gao, B., Liu, W.-B., Jia, L.-Y., Xu, L., & Xie, J. (2011). Isolation and characterization of an *Alcaligenes* sp. strain DG-5 capable of degrading DDTs under aerobic conditions. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 46(3), 257–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21462053>
- Gao, B., Liu, W.-B., Jia, L.-Y., Xu, L., & Xie, J. (2011). Isolation and characterization of an *Alcaligenes* sp. strain DG-5 capable of degrading DDTs under aerobic conditions. *Journal of Environmental Science and Health*, 46(3), 257–263.
- Gascon, M., Morales, E., Sunyer, J., & Vrijheid, M. (2013). Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: A systematic review. *Environment International*, 52, 51–65. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2012.11.005>
- Geosísmica y Ambiente. (1997). Estudio de diagnóstico y evaluación del enterramiento de plaguicidas en el municipio de Agustín Codazzi y procedimiento de descontaminación y disposición de los mismos.
- Golovleva, L. A., & Skryabin, G. K. (1981). Microbial degradation of DDT. *Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds*, 287–292.
- Guillette, L. J., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F., & Woodward, A. R. (1994). Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenile Alligators from Contaminated and Control Lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives*, 102(8), 680. <http://doi.org/10.2307/3432198>
- Gusmão, V. R., Chinalia, F. A., Sakamoto, I. K., & Varesche, M. B. A. (2007). Performance of a reactor containing denitrifying immobilized biomass in removing ethanol and aromatic hydrocarbons (BTEX) in a short operating period. *Journal of Hazardous Materials*, 139(2), 301–309. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.028>

- Hart, M. M., Adamson, R. H., & Fabro, S. (1971). Prematurity and intrauterine growth retardation induced by DDT in the rabbit. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*.
- Huang, J., Nemati, M., Hill, G., & Headley, J. (2012). Batch and continuous biodegradation of three model naphthenic acids in a circulating packed-bed bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 201, 132–140. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.11.052>
- In, B.-H., Park, J.-S., Namkoong, W., Hwang, E.-Y., & Kim, J.-D. (2008). Effect of co-substrate on anaerobic slurry phase bioremediation of TNT-contaminated soil. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25(1), 102–107. <http://doi.org/10.1007/s11814-008-0018-1>
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi. (1986). Estudio semidetallado de suelos de los municipios del sur del departamento del Cesar.
- Jackson, M. (1964). *Análisis Químico del Suelo* (Omega). Barcelona-España.
- J T Dibble, R. B. (1979). Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(4), 729.
- Jesús, A. G.-D., Romano-Baez, F. J., Leyva-Amezcuca, L., Juárez-Ramírez, C., Ruiz-Ordaz, N., & Galíndez-Mayer, J. (2009). Biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol in a packed-bed biofilm reactor equipped with an internal net draft tube riser for aeration and liquid circulation. *Journal of Hazardous Materials*, 161(2–3), 1140–1149. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.077>
- Kanta Sharma, S., Sadasivam, K. V., & Dave, J. M. (1987). DDT degradation by bacteria from activated sludge. *Environment International*, 13(2), 183–190. [http://doi.org/10.1016/0160-4120\(87\)90088-2](http://doi.org/10.1016/0160-4120(87)90088-2)
- Kao, C. ., Chen, S. ., Liu, J. ., & Wang, Y. . (2001). Application of microbial enumeration technique to evaluate the occurrence of natural bioremediation. *Water Research*, 35(8), 1951–1960. [http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00482-6](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00482-6)
- Kaštánek, F., Demnerová, K., Pazlarová, J., Burkhard, J., & Maléterová, Y. (1999). Biodegradation of polychlorinated biphenyls and volatile chlorinated hydrocarbons in contaminated soils and ground water in field condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44(1), 39–47. [http://doi.org/10.1016/S0964-8305\(99\)00051-7](http://doi.org/10.1016/S0964-8305(99)00051-7)
- Kästner, M., Breuer-Jammali, M., & Mahro, B. (1994). Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 267–273. <http://doi.org/10.1007/BF00186971>
- Katayama, A., Fujimora, Y., & Kuwatsuka, S. (1993). Microbial Degradation of DDT at Extremely Low Concentrations. *Journal of Pesticide Science*, 18(4), 353–359. http://doi.org/10.1584/jpestics.18.4_353
- Ko, W. H., & Lockwood, J. L. (1968). Accumulation and concentration of chlorinated

- hydrocarbon pesticides by microorganisms in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 14(10), 1075–1078.
- Laboratorio de Salinidad. (1974). *Suelos salinos y sodicos. Diagnostico y rehabilitación*. (Limusa, Ed.), United States Department of Agriculture (USDA). Mexico.
- Li, F. B., Li, X. M., Zhou, S. G., Zhuang, L., Cao, F., Huang, D. Y., ... Feng, C. H. (2010). Enhanced reductive dechlorination of DDT in an anaerobic system of dissimilatory iron-reducing bacteria and iron oxide. *Environmental Pollution*, 158(5), 1733–1740. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.020>
- Liang, Y., Britt, D. W., McLean, J. E., Sorensen, D. L., & Sims, R. C. (2007). Humic acid effect on pyrene degradation: finding an optimal range for pyrene solubility and mineralization enhancement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1368–75. <http://doi.org/10.1007/s00253-006-0769-8>
- Lichtenstein, E. P., Fuhremann, T. W., & Schulz, K. R. (2002). Persistence and vertical distribution of DDT, lindane, and aldrin residues, 10 and 15 years after a single soil application.
- Litchfield, C. (2005). Thirty Years and Counting: Bioremediation in Its Prime? *BioScience*, 273–279.
- Liu, C., Xu, X., & Fan, J. (2015). Accelerated anaerobic dechlorination of DDT in slurry with Hydragric Acrisols using citric acid and anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS). *Journal of Environmental Sciences (China)*, 38, 87–94. <http://doi.org/10.1016/j.jes.2015.05.005>
- Lu, X.-Y., Zhang, T., & Fang, H. H.-P. (2011). Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1357–71. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-3072-7>
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos* (10a edición).
- MAVD. (2006). Inventario Nacional de Existencias de Plagucidas COP, (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial), 1–32.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*, 37(8), 1362–1375. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.003>
- Mendel, J. L., & Walton, M. S. (1966). Conversion of p,p'-DDT to p,p'-DDD by intestinal flora of the rat. *Science (New York, N.Y.)*, 151(3717), 1527–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5326183>
- Menendez-Vega, D., Gallego, J. L. R., Pelaez, A. I., Fernandez de Cordoba, G., Moreno, J., Muñoz, D., & Sanchez, J. (2007). Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology*, 43(5), 310–321. <http://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.03.005>

- Mitra, J., & Raghu, K. (1998). Long Term DDT Pollution in Tropical Soils: Effect of DDT and Degradation Products on Soil Microbial Activities Leading to Soil Fertility. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(4), 585–591. <http://doi.org/10.1007/S001289900665>
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157–177. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>
- Mwangi, K., Boga, H., Muigai, A., Kiiyuikia, C., & Tsanuo, M. K. (2010). Degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by bacterial isolate from cultivated and uncultivated soil. *African J Microbiology Research*, 4, 184–196.
- Nadeau, L. J., Menn, F. M., Breen, A., & Sayler, G. S. (1994). Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 51–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8117093>
- National Toxicology Program. (2011). Dichlorodiphenyltrichloroethane, Report on Carcinogens.
- Nayono, S. E. (2009). *Anaerobic digestion of organic solid waste for energy production*. Universitat Fridericiana zu Karlsruhe.
- Nessler. (1999). Determination of ammonia-nitrogen. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.
- Noguera Solís, C. E. (2008). Potencial de biodegradación de DDT y sus metabolitos en suelos agrícolas de fincas pertenecientes al Ingenio Monte Rosa, "Zona Sur Los Millonarios", Chinandega, 2007.
- Odukkathil, G., & Vasudevan, N. (2013). Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(4), 421– 444.
- Ortíz, I., Velasco, A., Le Borgne, S., & Revah, S. (2013). Biodegradation of DDT by stimulation of indigenous microbial populations in soil with cosubstrates. *Biodegradation*, 24(2), 215–25. <http://doi.org/10.1007/s10532-012-9578-1>
- Peakall, D. B. (1969). Effect of DDT on Calcium Uptake and Vitamin D Metabolism in Birds. *Nature*, 224(5225), 1219–1220. <http://doi.org/10.1038/2241219a0>
- Perfect, T. J., Cook, A. G., Critchley, B. R., Critchley, U., Davies, A. L., Swift, M. J., ... Yeadon, R. (1979). The Effect of DDT Contamination on the Productivity of a Cultivated Forest Soil in the Sub-Humid Tropics. *The Journal of Applied Ecology*, 16(3), 705. <http://doi.org/10.2307/2402847>
- Polo, A., & Hernández, D. (2002). Contaminación y restauración de suelos. *Ciencia Y Medio Ambiente*, 110–114.

- Purnomo, A. S., Mori, T., Takagi, K., & Kondo, R. (2011). Bioremediation of DDT contaminated soil using brown-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(5), 691–695. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.04.004>
- Quantin, C., Joner, E. J., Portal, J. M., & Berthelin, J. (2005). PAH dissipation in a contaminated river sediment under oxic and anoxic conditions. *Environmental Pollution*, 134(2), 315–322. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.07.022>
- Quensen, J. F., Mueller, S. A., Jain, M. K., Tiedje, J. M., Niedoroda, A. W., Swift, D. J. P., ... Tiedje, J. M. (1998). Reductive dechlorination of DDE to DDMU in marine sediment microcosms. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5364), 722–4. <http://doi.org/10.1126/science.280.5364.722>
- Refugio, P., Vázquez, R., & Mx, R. (2011). Biorremediación de suelos con residuos agroindustriales.
- Riser-Roberts, E. (1998). *Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes*. Lewis Publishers.
- Rittmann, B. E., & McCarty, P. L. (2001). *Environmental biotechnology: principles and applications*.
- Rittmann, B., & McCarty, P. (2005). Stoichiometry and bacterial energetics”. In *Environmental Biotechnology: Principles and Applications* (pp. 126–158). McGraw Hill editorial.
- Rodríguez, H. (1999). La maldición del oro blanco. *Revista CROMOS N° 4.217*.
- Rogan, W. J., & Chen, A. (2005). Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *The Lancet*, 366(9487), 763–773. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67182-6](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67182-6)
- Rogan, W. J., Chen, A., Organization, W. H., Registry), Atsdr. (Agency for T. S. and D., Turusov, V., Rakitsky, V., ... Mutabingwa, T. (1979). Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *Lancet (London, England)*, 366(9487), 763–73. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67182-6](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67182-6)
- Rojas, M. P. (2010). Incidencia y tendencia de seis cánceres en poblaciones expuestas ambientalmente a plaguicidas en desuso en el departamento del Cesar. *Revista Colombiana de Cancerología*, 14(2), 88–101.
- Sánchez, N., Rodríguez, M., & Sarria, V. (2006). Pesticidas Obsoletos en Colombia, Situación actual y alternativas de tratamiento y disposición. *Revista de Ingeniería de La Universidad de Los Andes*, 23, 13–22. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/ring/n23/n23a2.pdf>
- Shinde, S. (2013). Bioremediation. An overview. *Recent Research in Science and Technology*, 5(5).
- Silva, A., & Correa, F. (2009). Análisis de la contaminación del suelo: revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica. *Semestre Ecomico*, 12(23), 13–34.
- Silva, S. ., & Correa, F. . (2009). Análisis de La contaminación del suelo: Revisión de la normativa

- y posibilidades de regulación económica. Artículo publicado en la revista Semestre Económico., *Semestre Económico*, 12(23), 13–34.
- Smith, A. G. (1991). Chlorinated Hydrocarbon Insecticides. *Handbook of Pesticides Toxicology*, 731–915.
- Snedeker, S. M. (2001). Pesticides and Breast Cancer Risk: A Review of DDT, DDE, and Dieldrin. *Environmental Health Perspectives*, 109, 35. <http://doi.org/10.2307/3434845>
- Subba-Rao, R., & M., A. (1977). Products formed from analogues of I , 1,1 -trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl) ethane (DDT) metabolites by *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol*, 30(1), :101-10.
- Subba-Rao, R., & M., A. (1985). Bacterial and fungal cometabolism of 1 ,I, 1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) and its breakdown products. *Environ Microbiol*, 49(3), 509–516.
- Sudharshan, S., Naidu, R., Mallavarapu, M., & Bolan, N. (2012). DDT remediation in contaminated soils: A review of recent studies. *Biodegradation*.
- Tiemann, U. (2008). In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: A review. *Reproductive Toxicology*, 25(3), 316–326. <http://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.03.002>
- Torres, S., Luisa, Lopez, C., & Lizbeth. (2007). Efectos a la salud y exposición a p , p ' -DDT y p , p ' -DDE . El caso de México Human health effects and p , p ' -DDE and p , p ' -DDT exposure . The case of Mexico. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12, 51–60.
- Turusov, V., Rakitsky, V., Tomatis, L., Ubiquity, D. D. D. T., Turusov, V., Rakitsky, V., & Tomatis, L. (2013). Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, Persistence, and Risks. *Environmental Health Perspectives*, 110(2), 125–128. <http://doi.org/10.1289/ehp.9549>
- University of Minnesota Biocatalysis. (1998). (DDT) Pathway Map.
- Utadeo, W., Edu, L., & Tadeo. (2002). Un refugio de la vida.
- Valverde García, A., Instituto de Estudios Almerienses., A., & Universidad de Almería., R. (1998). *Residuos de plaguicidas'96 Pesticide residues'96. Residuos de plaguicidas 96 = Pesticide residues 96 : IV Seminario Internacional sobre Residuos de Plaguicidas, 1998, ISBN 84-8240-090-8, págs. 141-155.* Instituto de Estudios Almerienses.
- van Wendel de Joode, B., Wesseling, C., Kromhout, H., Monge, P., Garcia, M., & Mergler, D. (2001). Chronic nervous-system effects of long-term occupational exposure to DDT. *The Lancet*, 357(9261), 1014–1016. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04249-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04249-5)
- Vega-Baudrit, J., Delgado-Montero, K., Sibaja Ballesteros, M., Aguilar, P. A., & Barrientos Ramírez, S. (2008). Empleo de melaza de caña de azúcar para la obtención y caracterización de poliuretanos potencialmente biodegradables. *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen Iberoamer. Polím*, 9(94), 408–421.

- Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37(1), 29–38.
- Wang, G. L., Bi, M., Liang, B., Jiang, J. D., & Li, S. P. (2011). *Pseudoxanthomonas jiangsuensis* sp. nov., a DDT-degrading bacterium isolated from a long-term DDT-polluted soil. *Current Microbiology*, 62(6), 1760–1766.
- Wedemeyer, G. (1967). Dechlorination of 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(p-chloro- phenyl)ethane by *Aerobacter aerogenes* I. Metabolic Products. *APPLIED MICROBIOLOGY*, 15(3), 569–574.
- WHO. (1989). DDT and its Derivatives in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. *World Health Organization*, 1–15.
- Winans, B., Humble, M. C., & Lawrence, B. P. (2011). Environmental toxicants and the developing immune system: A missing link in the global battle against infectious disease? *Reproductive Toxicology*, 31(3), 327–336. <http://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.09.004>
- Yang, C. F., Lee, C. M., & Wang, C. C. (2005). Degradation of chlorophenols using pentachlorophenol-degrading bacteria *Sphingomonas chlorophenolica* in a batch reactor. *Current Microbiology*, 51(3), 156–160.
- Yao, F. X., Jiang, X., Yu, G. F., Wang, F., & Bian, Y. R. (2006). Evaluation of accelerated dechlorination of p,p'-DDT in acidic paddy soil. *Chemosphere*, 64(4), 628–633. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.10.066>
- Yum, K.-J., & Peirce, J. J. (1998). Biodegradation kinetics of chlorophenols in immobilized-cell reactors using a white-rot fungus on wood chips. *Water Environment Research*, 70(2), 205–213. <http://doi.org/10.2175/106143098X127053>
- Zhao, Y. C., Yi, X. Y., Zhang, M., & Liu, L. (2010). Fundamental study of degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane in soil by laccase from white rot fungi, 7(2), 359–366.