

**ANÁLISIS DE LA BIODEGRADACIÓN DE PESTICIDAS
ORGANOCORADOS BAJO CONDICIONES REDUCTORAS Y OXIDATIVAS
SECUENCIALES APLICADAS A UNA MUESTRA DE SUELO
CONTAMINADO DEL MUNICIPIO DE AGUSTÍN CODAZZI, CESAR**

ANGELA MARÍA PLATA ESCOBAR

DIRIGIDO POR:

PhD. MARÍA KOPYTKO

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

SECCIONAL BUCARAMANGA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL

FLORIDABLANCA, COLOMBIA

2015

**ANÁLISIS DE LA BIODEGRADACIÓN DE PESTICIDAS
ORGANOCORADOS BAJO CONDICIONES REDUCTORAS Y OXIDATIVAS
SECUENCIALES APLICADAS A UNA MUESTRA DE SUELO
CONTAMINADO DEL MUNICIPIO DE AGUSTÍN CODAZZI, CESAR**

ANGELA MARÍA PLATA ESCOBAR

Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniera Ambiental

DIRIGIDO POR:

PhD. MARÍA KOPYTKO

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

SECCIONAL BUCARAMANGA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL

FLORIDABLANCA, COLOMBIA

2015

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

BUCARAMANGA, MARZO DE 2015

Dedico este logro a mi padre, por ser mi superhéroe en la Tierra, a mi madre, porque solo por el hecho de ser ella me es imposible no amarla, a mi hermanita Pola, porque sé que más que eso es mi única mejor amiga. Pero principalmente, quiero dedicar y hacer honor de este triunfo, a mi pilar, mi soporte, mi guía y mi sustento, a mi Dios, mi superhéroe en los cielos, que me ha traído hasta aquí y sé que me llevará mucho más lejos. A ti sea la Gloria y la Honra Señor.

“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece” filipenses 4:13.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por poner en mi camino a todas y cada una de las personas que de una u otra manera han contribuido a que este triunfo sea posible. Desde las personas que levantaron la primera piedra para tomar las muestras, hasta los que hicieron sus análisis en los laboratorios. Le doy gracias a mi padre, quién fundó la idea en mí, a mi madre y mi hermana por apoyarme y darme aliento en cada paso.

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a mi Directora María Kopytko, por ser mi guía en este proceso, y porque desde siempre supo dar en mí una visión de lo que podía alcanzar; a mi súper compañera Martha Estévez, por ser incondicional en cada paso que se dio para llegar hasta aquí; y a la profesora Sandra Correa, por estar ahí desde la concepción de la idea. A mi amiga y también compañera Shirley Ávila, que desde que empezó la carrera y hasta hoy, seguimos dando "lora". Doy gracias especiales a Naidu Villamizar por prestarme su colaboración en cada proceso realizado en los laboratorios; y al ingeniero Álvaro Cajigas, por aclararme cada duda que se me ocurría y sacarme de los primeros errores que cometí.

También quiero agradecer a las personas que no participaron en el desarrollo de este proyecto, pero hicieron parte importante de mi vida universitaria: a mis amigos Natha y Juan, porque al juntarnos, cada momento en la U fue mucho mejor.

Por último, pero no menos importante, le doy gracias a las personas que estuvieron y están siempre a mi lado, y que sé que mi logro también lo es para ellos: a mi abuela María, mi tía Ocha, a mis primos Daniela y Raúl y mi gran amiga Melissa y al resto de mis familiares y amigos cercanos.

Gracias a todos por hacer parte de esto.

TABLA DE CONTENIDO

1	OBJETIVOS	18
1.1	OBJETIVO GENERAL	18
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2	MARCO TEÓRICO	19
2.1	El suelo: propiedades y características	19
2.1.1	Formación del recurso suelo	19
2.1.2	Propiedades físicas	21
2.1.3	Propiedades químicas	21
2.1.4	Importancia de las propiedades del suelo en el desarrollo de técnicas de remediación biológica	23
2.2	Contaminación del suelo	23
2.2.1	Pesticidas organoclorados	24
2.3	Técnicas de remediación de suelos	28
2.4	Bioteología en técnicas de remediación de suelos	29
2.4.1	Biorremediación	29
2.4.2	Fitorremediación	30
2.4.3	Bioventeo	30
2.5	Tecnología de <i>redox</i> en la degradación de organoclorados del suelo	30
2.6	Actividad Metanogénica Específica	32
3	MARCO LEGAL	33
4	METODOLOGÍA	34
4.1	Muestreo	34
4.2	Determinación de las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas iniciales del suelo	36
4.2.1	Análisis de las propiedades fisicoquímicas del suelo	36
4.2.2	Detección de compuestos organoclorados	37
4.2.3	Identificación microbiológica inicial	37
4.3	Dimensionamiento del sistema	40

4.3.1	Diseño de reactores	40
4.3.2	Ensayo de Actividad Metanogénica Específica	41
4.3.3	Fase reductora	42
4.3.4	Fase oxidativa	43
4.4	Evaluación de la efectividad del sistema en la remoción de pesticidas organoclorados	44
4.4.1	Identificación microbiológica final del suelo de interés	44
4.4.2	Análisis de remoción de compuestos organoclorados en el suelo de interés	44
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
5.1	Determinación de las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas iniciales del suelo	45
5.1.1	Propiedades fisicoquímicas del suelo	45
	Resumen de las propiedades fisicoquímicas del suelo	55
5.1.2	Identificación microbiológica inicial del suelo de interés	56
5.1.3	Detección de compuestos Organoclorados.....	60
5.2	Dimensionamiento del sistema tratamiento	62
5.2.1	Ensayo de Actividad Metanogénica Específica	62
5.2.2	Fase reductora	63
5.2.3	Fase oxidativa	64
5.3	Evaluación de la efectividad del sistema en la remoción de pesticidas organoclorados	66
5.3.1	Identificación microbiológica final del suelo de interés	66
5.3.2	Análisis de remoción de organoclorados del suelo de interés.....	68
6	CONCLUSIONES	71
7	RECOMENDACIONES.....	73
8	BIBLIOGRAFÍA.....	74
9	ANEXOS.....	79
	ANEXO A. Estadística de las propiedades fisicoquímicas del suelo evaluado	80
	ANEXO B. Cepas identificadas en la muestra inicial del suelo evaluado	

ANEXO C. Cepas identificadas en las muestras finales del suelo evaluado	
84	
ANEXO D. Resultados test API® 20 NE a las cepas del suelo evaluado	85
ANEXO E. Cromatogramas de las muestras de suelo evaluado	86

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación de los suelos
- Tabla 2.** Grupos de los POP's y sus características
- Tabla 3.** Clasificación de los pesticidas organoclorados
- Tabla 4.** Clasificación de Toxicidad Aguda, OMS
- Tabla 5.** Normativa ambiental sobre pesticidas en Colombia
- Tabla 6.** API® 20 NE
- Tabla 7.** Porcentajes de arena, arcilla y limo
- Tabla 8.** Características de los tamices
- Tabla 9.** Porcentaje de grava, arena y limo
- Tabla 10.** Porcentaje de Humedad Gravimétrica
- Tabla 11.** Porcentaje de Humedad Gravimétrica
- Tabla 12.** Densidad real
- Tabla 13.** Densidad aparente
- Tabla 14.** Porosidad total
- Tabla 15.** pH del suelo
- Tabla 16.** Conductividad eléctrica del suelo
- Tabla 17.** Capacidad de Intercambio Catiónico del suelo
- Tabla 18.** Parámetro de comparación para contenido de MO de un suelo
- Tabla 19.** Concentraciones de Nutrientes del suelo (N y P)
- Tabla 20.** Clasificación del suelo según el contenido de Nitrógeno Total
- Tabla 21.** Clasificación del suelo según el contenido de Fósforo Total
- Tabla 22.** Resumen de las propiedades del suelo

Tabla 23. Características morfológicas y taxonómicas (según API) de las bacterias aisladas

Tabla 24. Características morfológicas y taxonómicas (según bibliografía) de las bacterias aisladas

Tabla 25. Concentración inicial de compuestos organoclorados en la muestra de suelo

Tabla 26. Concentración de compuestos OC finalizada la fase reductora

Tabla 27. Concentración de compuestos OC finalizada la fase oxidativa

Tabla 28. Características morfológicas y taxonómicas (según API) de las bacterias al finalizar el tratamiento del suelo.

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva granulométrica

Gráfica 2. Curva de pérdida de humedad

Gráfica 3. Contenido de agua por masa de suelo seco

Gráfica 4. Comportamiento AME

Gráfica 5. Tendencia de cambio de concentraciones de OC en RT1

Gráfica 6. Tendencia de cambio de concentraciones de OC en RT2

Gráfica 7. Tendencia de cambio de concentraciones de OC en AN

Gráfica 8. Porcentajes de remoción de OC en RT1, RT2 y AN

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de reacciones de deshalogenación de compuestos OC en condiciones reductoras.

Figura 2. Esquema de montaje Reducción/Oxidación

Figura 3. Esquema de montaje para ensayos de AME

Figura 4. Relación de porcentajes en el Triángulo Textural para clasificación de suelos

Figura 5. Patrones de comparación de uniformidad y continuidad de una curva granulométrica.

Figura 6. Reacción de deshalogenación de una molécula de OC en condiciones reductoras

Figura 7. Reacción de oxidación de un compuesto orgánico cíclico alifático deshalogenado

Figura 8. Reacción de oxidación de un compuesto orgánico aromático deshalogenado

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Muestreo

Imagen 2. Extracción de las muestras

Imagen 3. API® 20 NE, pruebas positiva y negativa

Imagen 4. Montaje de AME

Imagen 5. Montaje de Fase Reductora

Imagen 6. Montaje Fase Oxidativa

Imagen 7. Patrón de detección de compuestos organoclorados

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Estadística de las propiedades del suelo evaluado

ANEXO B. Cepas identificadas en la muestra inicial del suelo de interés

ANEXO C. Cepas identificadas en las muestras finales del suelo de interés

ANEXO D. Resultados test API® 20 NE a las cepas del suelo de interés

ANEXO E. Cromatogramas de las muestras de suelo analizado

RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO

TITULO: Análisis de la biodegradación de pesticidas organoclorados bajo condiciones reductoras y oxidativas secuenciales aplicadas a una muestra de suelo contaminado del municipio de Agustín Codazzi, Cesar.

AUTOR(ES): Angela María Plata Escobar

FACULTAD: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR(A): María Irena Kopytko

RESUMEN

La generación de condiciones reductoras y oxidativas secuenciales resulta poco usual en la degradación de compuestos organoclorados del suelo. Con el presente estudio se evaluó la eficiencia de esta técnica, dimensionando un sistema que generó secuencialmente dichas condiciones con el fin de estimular los procesos metabólicos de las bacterias nativas del suelo. En una muestra de suelo extraída del municipio de Agustín Codazzi, Cesar, cuyas características corresponden a un suelo franco, con bajo contenido de nutrientes y ligera compactación, se realizaron ensayos variando los tiempos de exposición de un ambiente Reductor/Oxidativo. Se alcanzaron remociones entre el 70 y 78,9% de compuestos como 4, 4'-DDT, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, trans-Clordano y Endrín, detectados por análisis de cromatografía de gases. Se hizo un análisis de identificación de las bacterias presentes en el suelo y se encontraron *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Burkholderia cepacia* y *Bacillus sp.* de las cuales se tiene indicio de su potencial para resistir condiciones adversas y metabolizar compuestos organoclorados.

PALABRAS CLAVE: Fase reductora, Fase oxidativa, Deshalogenación, Compuestos Organoclorados

GENERAL SUMMARY OF WORK OF GRADE

TITLE: Analysis of biodegradation of organochlorine pesticides under sequential reducing and oxidative conditions applied to a sample of polluted soil municipality of Agustín Codazzi, Cesar.

AUTHOR(S): Angela María Plata Escobar

FACULTY: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR: María Irena Kopytko

ABSTRACT

Generating sequential reducing and oxidative conditions is unusual in degradation of organochlorines in soils. In this study the efficiency of this technique was evaluated through dimensioning of a system that sequentially generated such conditions to stimulate metabolic processes of the native soil bacteria. In a soil sample taken from the municipality of Agustín Codazzi, Cesar, whose characteristics correspond to a loam soil with low nutrient and light compaction, tests were performed by varying the exposure time of a reducer/oxidative environment. Removals between 70 and 78.9% of compounds such as 4, 4'-DDT, 4,4'-DDD, 4,4'-DDE, Endrin trans-Chlordane, detected by gas chromatography analysis were achieved. Was made an analysis identification of bacteria present in the soil and was found *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Burkholderia cepacia* and *Bacillus sp.* of which are known their potential to withstand adverse conditions and metabolize organochlorines.

KEYWORDS: Reductive phase, Oxidative phase, Dehalogenation, Organochlorine compounds.

INTRODUCCIÓN

La introducción de compuestos agroquímicos para la eliminación de plagas de cultivos en las últimas décadas, ha generado un grupo de contaminantes tendientes a persistir en el ambiente (Suflita et al. 1991). Los pesticidas organoclorados como el DDT, Toxafeno, Aldrín, Endrín, entre otros han causado revuelo mundial desde que se tuvo conocimiento de lo nocivos que resultan para la salud humana y el medio ambiente; tanto así que en 1997 el Concejo de Administración del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) inició negociaciones con el Foro Intergubernamental de Seguridad Química (FISQ) con el fin de reducir los riesgos que generaban estos compuestos, mediante el establecimiento de la primera lista de los doce Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP's) (Fredrix et al. 2002).

En Colombia aún quedan secuelas del uso inadecuado de los compuestos organoclorados durante las décadas de 1960 a 1980. El municipio de Agustín Codazzi fue catalogado como el principal productor y exportador del país en esa época (Barrios, 2013), luego de la decadencia de la bonanza algodonera, se generó la contaminación de la zona con los restos de los insumos (pesticidas y demás agroquímicos) lo cual desató un incremento en los casos de cáncer, enfermedades congénitas y mortalidad debido a la inadecuada disposición de los mismos (Rodríguez, Mario; Revista Semana, 1999).

La Corporación Autónoma Regional del Cesar (Corpocesar), Geosísmica y Ambiente y la Secretaría de Agricultura del Cesar en el período de 1990 a 1994, realizaron estudios donde revelaron que muchos de los agroquímicos (principalmente pesticidas organoclorados) fueron enterrados en gran parte del terreno aledaño a las zonas de cultivo (Corpocesar, 1997), entre ellas el recién creado Instituto Técnico Agropecuario Antonio Galo Lafaurie.

A pesar de que a este hecho se le atribuye la mayoría de casos de enfermedades cancerígenas y degenerativas de dicha época e incluso de la actualidad, no se ha efectuado ninguna alternativa de solución para remediar el impacto causado por el evento.

Por esta razón, con el presente proyecto se pretende desarrollar una técnica (a escala de laboratorio) que permita la estimulación de la microbiota nativa para acelerar el proceso de biodegradación de organoclorados en suelos contaminados.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la biodegradación de pesticidas organoclorados bajo condiciones reductoras y oxidativas secuenciales aplicadas a una muestra de suelo contaminado del municipio Agustín Codazzi, Cesar.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas de la muestra de suelo extraído de la zona de interés.
- Dimensionar un sistema que proporcione condiciones reductoras y oxidativas para el proceso de biodegradación de pesticidas organoclorados de la muestra de suelo.
- Evaluar la efectividad del sistema para la remoción de pesticidas organoclorados en el suelo de interés, sometido a condiciones reductoras y oxidativas secuenciales.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 El suelo: propiedades y características

La definición de *Suelo* es relativa y varía de acuerdo al contexto en que se desenvuelva cada disciplina. Por ejemplo, para un agrónomo, el suelo es considerado como el lugar donde viven y se desarrollan plantas y animales necesarias para el sustento del ser humano. Por su parte, un ingeniero civil considera que el suelo es la base para la construcción de estructuras (edificios, puentes, vías, etc.) (Casanova, 2005). Mientras que para un ingeniero ambiental, este recurso es el lugar donde la naturaleza lleva a cabo cada uno de los ciclos de intercambio de materia y energía y los procesos evolutivos que facilitan el albergue de una gran diversidad de organismos vivos, los cuales, a su vez conforman los diferentes tipos de ecosistemas.

2.1.1 Formación del recurso suelo

En materia de formación, el suelo se define como el resultado del proceso que se lleva a cabo en la naturaleza, a lo largo de millones de años, donde el material parental (roca madre), a través de múltiples coaliciones se transforma en una capa delgada y superficial, y que mediante el intercambio de energía entre materiales vivos e inertes, producto de la descomposición y el reciclaje de nutrientes, forman una enorme complejidad que facilita el albergue para una variada comunidad de organismos vivos. Este proceso es conocido como *Meteorización*, y en él actúan todas las capas de la Tierra (atmósfera, litosfera, hidrosfera y biosfera) (Jaramillo, 2002).

Murthy, 2009, expone que las características de cada tipo de suelo son dependientes de los componentes que conforma la roca madre y de los tipos de meteorización. La meteorización mecánica o física, se lleva a cabo mediante cambios físicos, como temperatura, presión y factores climáticos como el viento, los cuales tienen lugar en climas áridos donde la radiación produce cambios extremos en la temperatura del día y la noche. Por su parte, la meteorización química se da mediante la interacción de compuestos como el CO₂ y O₂ presentes en la atmósfera, que combinados con agua y los elementos presentes en la roca madre, dan como resultado un suelo suave y fácilmente erosionable (Murthy, 2009).

La tabla 1, muestra de manera resumida las diferentes calificaciones del suelo: según su origen, composición y tamaño de partícula.

Tabla 1. Clasificación de los suelos

FACTOR	TIPO DE SUELO	CARACTERÍSTICAS
Origen	Residual	Es el resultado directo de la meteorización de la roca madre. Se originan en zonas de temperaturas muy variables y poseen tamaños de partículas indefinidos.
	Aluvial	Son depósitos producto del arrastre de por escorrentía. Por lo general son de partículas finas.
	Lacustre	Se depositan en aguas lenticas y poseen alto contenido de nutrientes.
	Marino	Se depositan en océanos. Son arenosos y tienen alto contenido de minerales.
	Eólico	Se originan mediante el arrastre de partículas por acción del viento.
	Coluvial	Se forman a raíz de los deslizamientos de tierra por acción gravitacional.
	Glacial	Son depósitos encontrados en los glaciares producto del enfriamiento de las capas superficiales.
Composición	Orgánico	Poseen alto contenido de materia orgánica (mayor a 2,5%) producto de la descomposición y reciclaje de nutrientes, provenientes de escombros de compuestos carbonados.
	Mineral	Poseen menos cantidad de materia orgánica y mayor cantidad de compuestos inorgánicos y minerales.
Tamaño de partícula	Grava	Diámetro entre 76.2 mm a 4.75 mm
	Arena	Diámetro entre 4.75 mm a 0.075 mm
	Limo	Diámetro entre 0.075 mm a 0.002 mm
	Arcilla	Diámetro menor a 0.002 mm

Fuente: Murthy, 2009

2.2 Caracterización de suelos

Al momento de llevar a cabo un proyecto que implique la utilización de un suelo específico, la caracterización del mismo es fundamental y debe anexarse como primer ensayo preliminar. Cuando se caracteriza un suelo, básicamente lo que se hace es corroborar en el laboratorio lo que se presumió que era el tipo de suelo al momento del muestreo. Los resultados de una caracterización hacen posible determinar los usos que se le dará posteriormente, o como pudo haber evolucionado un evento que generó un impacto al recurso.

2.2.1 Propiedades físicas

La determinación de las propiedades físicas del suelo permite establecer el estado del suelo a nivel estructural, es decir la forma y tamaño de las partículas, la consistencia y resistencia y la capacidad de retención de líquidos (Volke y Velasco, 2002).

La textura de un suelo, determina las proporciones del coloide del suelo en materia de tamaño y forma de las partículas (gravas, arenas, limos y arcillas) (USDA, 1987).

Por su parte, *La Humedad* de suelo puede definirse como la cantidad de agua que es capaz de almacenar su componente sólido. Mientras que *La Porosidad (Pt)* de un suelo depende de manera directa de la textura del mismo (Rawls et al. 1992). Esta propiedad se basa en la cantidad de espacio libre que deja el componente sólido para permitir el paso de líquidos y gases, por tanto, a mayor tamaño de partícula, mayor será la porosidad del suelo y por ende se hará más factible la permeabilidad en el mismo.

2.2.2 Propiedades químicas

Las propiedades químicas del suelo son aquellas que hacen posible las interacciones entre la matriz del suelo y los diferentes elementos agregados, a nivel iónico y molecular (FAO, 2015). Tanto la cantidad de agua como los organismos vivos influyen directamente en el tipo de enlace o rompimiento que se lleve a cabo en el suelo, y estos a su vez, intervienen en el desarrollo de las propiedades biológicas del mismo.

El pH es esencial para la disponibilidad de nutrientes del suelo y determinante para la cantidad y tipo de microorganismos que tendrán lugar en este. Un pH óptimo para el suelo oscila entre 6 y 8 unidades. Un suelo demasiado ácido ($\text{pH} < 6.0$) indica una posible toxicidad por metales y por tanto inhibición de la actividad microbiana, mientras que en uno demasiado alcalino ($\text{pH} > 8.0$) es probable que la concentración de sales sea demasiado alta e insalubre para el crecimiento radicular (Thompson M. y Troeh F. 2002).

La Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) se define como la capacidad para retener iones de carga positiva (aniones) y está determinada por la cantidad de carga negativa presente en el coloide del suelo, y esta, a su vez por el porcentaje de arcilla y materia orgánica presentes en el mismo (Núñez Solís, 1985).

El contenido de *Carbono Orgánico (CO)* del suelo es esencial para la constitución de un suelo sano. Este viene dado por el reciclaje de nutrientes producto de la descomposición de la *Materia Orgánica (MO)*, que junto con el coloide se transforma en una mezcla húmica altamente fértil e influye directamente en las demás propiedades del suelo (Núñez Solís, 1985).

Los *Nutrientes* del suelo, específicamente Nitrógeno y Fósforo constituyen la base para la nutrición de las plantas. El primero puede encontrarse en forma de cationes nitratos o aniones de amonio, y ambos son fijados por los microorganismos dentro del Ciclo del Nitrógeno. El segundo se deriva de la meteorización de las rocas volcánicas, cuyo arrastre llega hasta el fondo del mar, sedimentándose y siendo absorbido por el plancton en forma de sales de fósforo.

Mientras que el Nitrógeno se encuentra en abundancia en casi todos los tipos suelos (debido a la alta concentración de N_2 en la atmósfera), el fósforo en forma de sales se considera un elemento escaso, a causa del tiempo que acarrea el proceso de formación este nutriente en la naturaleza (Urbano Terrón. 1995).

2.2.3 Importancia de las propiedades del suelo en el desarrollo de técnicas de remediación biológica

Las propiedades del suelo influyen directamente al momento de elegir una técnica de descontaminación. En cuanto a técnicas biológicas se da relevancia a propiedades como pH, porcentaje de humedad, contenido de *CO*, *MO*, *CIC* y *Nutrientes* del suelo, ya que, principalmente, de estas depende el desarrollo de los organismos que abarcarán cualquier tipo de proceso de biorremediación (Ver numeral 2.3.1).

2.3 Contaminación del suelo

Los contaminantes del suelo varían según su composición química y existe una amplia diversidad entre ellos. El grupo denominado COP's (Contaminantes Orgánicos Persistentes), como su nombre lo dice, son compuestos cuyas características los hace persistentes en el ambiente, ya que tienen la propiedad de resistirse a la degradación microbiológica debido a la fuerza con la que se enlazan los elementos que constituyen las moléculas (Ritter et al. 1995). Esto les otorga la particularidad de establecerse, permanecer y aumentar su concentración al interior de las células y a su vez, transmitirse a lo largo de las generaciones; fenómeno comúnmente conocido como *Bioacumulación*, y en él influye la apolaridad de los compuestos por la afinidad con las membranas celulares (EPA, 2003). La tabla 2, enuncia algunos de los contaminantes del grupo de los POP's más comunes presentes en los suelos.

Tabla 2. Grupos de los POP's y sus características

GRUPO	DEFINICIÓN	EFFECTOS EN EL SER HUMANO Y/O AMBIENTE	EJEMPLOS
Polihalobifenilos	Mezcla de cientos de compuestos clorados. Son netamente xenobióticos y su uso tuvo lugar como aislantes eléctricos y refrigerantes.	<ul style="list-style-type: none"> - Presencia de acné clórico. - Alteraciones hepáticas tanto en humanos como en animales. - En altas concentraciones puede causar la muerte de especies vulnerables como peces. 	Policlorobifenilos (PCB's), Polibromobifenilos (PBB's)

Dibenzo-p-Dioxinas y Dibenzo Furanos Policlorados	Comúnmente conocidas como dioxinas y furanos. Son una familia de 8 átomos de cloro unidos a un anillo bencénico, y se diferencian en que las primeras son un dímero unido por enlace éter.	<ul style="list-style-type: none"> - Pueden acumularse hasta 10 mil veces en especies como los peces. - En humanos causa diarreas y vómitos, anemia e hinchazones en la piel y los ojos. 	
Pesticidas Organoclorados	Utilizados para la eliminación y control de plagas como hongos, insectos, maleza, etc. Existe un amplio grupo cuyo nivel de toxicidad varía dependiendo del número de iones de cloro que presente la molécula.	<ul style="list-style-type: none"> - Altas concentraciones pueden ocasionar la 	Clordano, Endrín, DDT, Toxafeno.

Fuente: Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).

2.3.1 Pesticidas organoclorados

Se denomina pesticida a toda sustancia cuya propiedad toxicológica permite eliminar, prevenir, repeler o aislar plagas de un sitio específico (Aguilar, 2007). Inicialmente este tipo de compuestos tuvo lugar en actividades agrícolas para el control de diversas plagas en los cultivos; no obstante, en la actualidad, muchos de ellos son utilizados a nivel doméstico para la eliminación de insectos, mohos, malezas y roedores en los hogares (Mörner, Bos y Fredrix, 2002).

Los pesticidas *Organoclorados* (OC), están conformados por una parte orgánica (carbonos cíclicos o aromáticos) y una inorgánica (iones Cl⁻). Estos tienen la característica de ser muy poco solubles en agua y solubles en disolventes orgánicos (Ritter et al. 1995). Debido a su composición altamente estable (por sus enlaces con iones cloro) los hace resistentes a la degradación microbiana, a tal punto que pueden permanecer por décadas recalcitrados en el suelo o acumulados en organismos vivos (Sims J. L. et al.1991).

La tabla 3, enuncia la clasificación de los pesticidas OC según su estructura molecular, propiedades fisicoquímicas y usos.

Tabla 3. Clasificación de los pesticidas organoclorados

GRUPO	PESTICIDA	PROPIEDADES	USOS
Aromáticos clorados	DDT	Posee un aspecto incoloro o polvo blanco, generalmente inodoros. Presenta un tiempo de vida media en suelos mayor a 15 años y una Dosis Letal 50 ¹ (DL ₅₀) de 113 - 118 mg/Kg en ratas (Gamboa, 2014). Puede descomponerse lentamente con exposición a rayos UV (Aguilar, 2007).	Insecticidas para control de enfermedades causadas por vectores como mosquitos.
	DDD	Presenta menor toxicidad que el DDT, al ser su primer metabolito (menos Cl ¹) (Aguilar, 2007).	Derivado del uso del DDT.
	DDE	Presenta menor toxicidad que el DDT y el DDD (menos 2Cl ²) (Aguilar, 2007).	Derivado del uso del DDT.

¹ Dosis Letal 50, es la dosis mínima que se necesita para matar al 50% de la población expuesta una sustancia tóxica (Nieto Z, OMS/OPS, 2001).

Cicloalcanos clorados	Lindano	Existen ocho isómeros de su tipo, el más usado es el de la gama HCH. Es un sólido blanco que al evaporarse presenta un leve olor a moho (ATSDR, 2005). DL ₅₀ : 88 – 270 mg/Kg (Nieto Z, OMS/OPS, 2001).	Plaguicidas para cultivos de frutas. También es usado en la cosmética medicinal para tratar piojos y sarna en la piel (ASTDR, 2005).
Ciclodienos clorados	Aldrín y Dieldrín	Son sustancias sólidas de color canela y olor suave. Por acción microbiana el Aldrín se transforma en Dieldrín, son insolubles en agua y estables ante compuestos como agentes oxidantes, disolventes orgánicos y alcoholes (PISSQ, 1996). DL ₅₀ : 46 – 67 mg/Kg en ratas (Nieto Z, OMS/OPS, 2001).	Insecticidas para el control de plagas de cultivos de semillas y algodón. También se usó para controlar la proliferación de la mosca Tse-Tsé y otros vectores tropicales (PISSQ, 1996).
	Endrín	Sustancia solida blanca e inodora. Cuando se expone a la luz genera subproductos como aldehído de endrina o cetona de endrina. DL ₅₀ : 5.6 mg/Kg en ratas (ATSDR, 1997).	Empleado como para eliminar insectos, roedores y pájaros (ASTDR 1997).
	Clordano	Sustancia líquida espesa de color trasparente a ámbar (dependiendo de su pureza). Lo constituye una mezcla de aproximadamente 10 sustancias (<i>cis-Clordano</i> , <i>trans-Clordano</i> , heptacloro, <i>trans-nonacloro</i> , etc.) (ASTDR, 1994). DL ₅₀ : 355 – 590 mg/Kg en ratas (Nieto Z, OMS/OPS, 2001).	Insecticida de uso industrial y doméstico para el control de plagas como termitas, arañas, cucarachas y chinches (ASTDR, 1994).

Terpenos clorados	Toxafeno	Sólido ceroso de color amarillento con olor a pino. Lo constituye una mezcla de cientos de compuestos clorados y es muy soluble en agua, por tal razón tiene la capacidad de transportarse largas distancias (ASTDR, 1997). DL ₅₀ : 90 mg/Kg en ratas (Nieto Z, OMS/OPS, 2001).	Utilizado como insecticida para la eliminación y control de plagas en cultivos de algodón, nueces y cereales (ASTDR, 1997).
-------------------	----------	--	---

Fuente: Gamboa, 2014; Aguilar, 2007; ATSDR², (1994, 1997, 2005); PISSQ³, 1996, Nieto Z, OMS/OPS, 2001

En la tabla 4, se expone la clasificación de nivel de Toxicidad Aguda de los pesticidas organoclorados (desglosados en la tabla 3) según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Tabla 4. Clasificación de Toxicidad Aguda, OMS

COMPUESTO	CLASIFICACIÓN
DDT	Clase II, moderadamente peligroso
Endrín	Pesticida obsoleto. Anteriormente clasificado Clase Ib, altamente peligroso.
Aldrín y Dieldrín	Pesticida obsoleto. Anteriormente clasificado Clase Ib, altamente peligroso.
Lindano	Clase II, moderadamente peligroso
Clordano	Clase II, moderadamente peligroso
Toxafeno	Pesticida obsoleto. Anteriormente clasificado Clase II, moderadamente peligroso.

Fuente: Nieto Z, OMS/OPS, 2001

² Agency for Toxic Substances and Disease Registry

³ Programa Internacional de Seguridad de Sustancias Químicas

2.4 Técnicas de remediación de suelos

En la actualidad, el término “descontaminación” se ha vuelto común, y en el caso particular del suelo es una actividad recurrente casi en todos los entornos que promueven el desarrollo (Volke y Velasco, 2002). Existen muchas maneras por las cuales un contaminante puede penetrar el suelo, como son: rompimiento de tuberías transportadoras de compuestos tóxicos, derrames y/o fugas de tanques o por disposición inadecuada e incontrolada de dichos compuestos (Barbosa, 2011).

Por tales situaciones, ha surgido la necesidad de “remediar”, que según la RAE, 2015, textualmente significa “*Corregir o enmendar algo que ha sido dañado, alterado o estropeado*”. En el caso de los suelos, la mejor forma de remediar es aquella que se realice en menor tiempo y que evite, a toda costa, que se el daño se incremente. Con respecto a los tipos de tratamiento, también influyen factores como el tipo de suelo, la generación de subproductos, porcentaje de contaminante removido y costos de operación, de esto depende la eficiencia de la utilización de una o varias técnicas.

Para la elección de una técnica adecuada se deben tener en cuenta otros factores de incidencia como son: El tipo de suelo (sus propiedades y características), los procesos fisicoquímicos y biológicos entre el contaminante y el suelo, la magnitud de la contaminación, el tipo de contaminante (propiedades fisicoquímicas del compuesto) y la concentración del mismo (a mayor concentración, mayor cinética de remoción) (Barbosa, 2011).

Las técnicas o tratamientos de remediación de suelos se pueden clasificar según el lugar donde se realicen, de la siguiente manera:

- *In situ*: Significa “en el sitio o lugar”, es decir, estas técnicas se llevan a cabo en el mismo lugar donde se generó el evento de contaminación, sin necesidad de extraer y trasladar muestras del mismo (Volke y Velasco, 2002).
- *Ex situ*: Significa “fuera del sitio o lugar”, en este tipo de técnicas se requiere de dragado y extracción del suelo, o muestras de él para implementar el tratamiento pertinente. Pueden ser *in site*, cuando el suelo se extrae del foco de contaminación a una zona aledaña no contaminada, u *off site*, cuando se

toman muestras y se emplea la técnica en otro lugar alejado de la zona contaminada, casi siempre en un laboratorio a escala piloto (Volke y Velasco, 2002).

2.5 Biotecnología en técnicas de remediación de suelos

Consiste en la utilización del potencial de organismos vivos fácilmente adaptables a condiciones de alta toxicidad, para acelerar los procesos de degradación del contaminante. La base de estas técnicas está dada por los procesos bioquímicos entre contaminante-célula, es decir, esta última toma los electrones del tóxico para llevar a cabo sus procesos metabólicos internos (Volke y Velasco, 2002). En este tipo de tratamiento influyen factores como: disponibilidad de carbono, humedad del suelo y disponibilidad o ausencia de oxígeno (esto en caso de utilización de microorganismos). Las técnicas que abarca la biotecnología se consideran de suma importancia, ya que estas presentan un valor agregado al no generar subproductos (cuyo impacto puede ser mayor al inicial), como en el caso de las técnicas químicas, además de no alterar la estructura del suelo como lo hacen algunas físicas. Finalmente, la biotecnología juega un papel fundamental para devolver, en cuanto más se pueda, el recurso a sus condiciones originales.

2.5.1 Biorremediación

Consiste en la utilización de microorganismos (hongos y bacterias) para acelerar los procesos de degradación natural de las sustancias y convertirlas en menos tóxicas (Toledo, 2009). Por lo general, las bacterias se utilizan con más frecuencia en este tipo de tratamiento debido a su amplio rango de estudio. Existen diferentes métodos de acelerar los procesos bioquímicos de estos microorganismos en pro de la remediación del suelo, entre los cuales se encuentran: La Bioaumentación, que se basa en incrementar el número de células bacterianas que se adaptaron a las condiciones extremas de toxicidad (Volke y Velasco, 2002); y la Bioestimulación que consiste en proveer al medio de nutrientes esenciales (como Nitrógeno y Fósforo) para estimular la actividad metabólica de las bacterias autóctonas y por ende la degradación del contaminante (Volke y Velasco, 2002).

2.5.2 Fitorremediación

Se utilizan plantas con capacidad de crecer en medios tóxicos y que son capaces de absorber, retener, acumular, inmovilizar e incluso degradar (en algunas ocasiones) los contaminantes del suelo. Esta es una de las técnicas biológicas más lentas, debido a que el campo de acción de las plantas llega hasta donde llegan sus raíces (Toledo, 2009).

2.5.3 Bioventeo

Simplemente consiste en la inyección de oxígeno a la zona contaminada del suelo, con el fin de estimular la degradación del contaminante, en este caso por microorganismos aerobios (Barbosa, 2011).

2.6 Tecnología de *redox* en la degradación de organoclorados del suelo.

Esta tecnología se considera relativamente nueva, sin embargo su esencia está basada en reacciones químicas *redox*, pero en este caso impulsadas por los microorganismos del suelo.

Se comprende de la fase *Reductora*, cuando se introduce al suelo un donador de electrones que reemplazará el halógeno (Cl^-), casi siempre por un catión de hidrógeno (H^+); y la fase *Oxidativa* cuando un aceptor se induce al medio y capta electrones, rompiendo la molécula y haciéndola menos estable (Sims J. L. et al. 1991).

Sims J. L. et al. 1991, han llevado a cabo investigaciones en la degradación de compuestos halogenados a través de la técnica Reducción/Oxidación; y en estos estudios afirmaron que en la etapa reductora se da un proceso de deshalogenación de la molécula clorada, el cual le otorga una característica menos tóxica. Por su parte Häggblom et al. 2003, concluyeron acerca de la importancia de garantizar unas condiciones reductivas para que se realice el proceso de deshalogenación, las cuales se pueden generar mediante metanogénesis. Ellos consideran que un paso crucial en la degradación de organoclorados es el rompimiento del enlace carbono-halógeno y que este se hace efectivo mediante una fuente de reducción (metano) que actúa sobre la molécula, cual asume el rol de aceptor de electrones.

A lo largo de este proceso interviene la enzima deshalogenasa (producida por las bacterias adaptadas a las condiciones tóxicas del suelo), responsable de las reacciones bioquímicas de degradación de los OC.

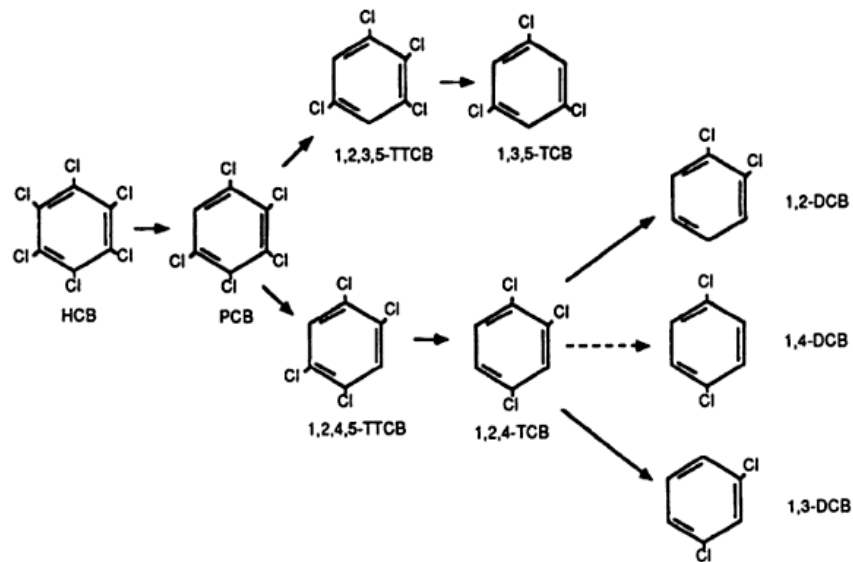
Según Suflita et al. 1991, en la fase de deshalogenación reductiva influyen factores como:

- *Electronegatividad*, entre más electronegativo sea el compuesto OC, es más susceptible a ser reducido.
- *Número de halógenos*, a mayor cantidad de Cl⁻, existe mayor cinética de reacción en el proceso de deshalogenación.
- *Potencial redox*, capacidad de transferencia de electrones, que a su vez depende de las propiedades fisicoquímicas del suelo.

En la figura 1, se esquematiza un ejemplo de las reacciones de deshalogenación de compuestos OC generadas en condiciones reductoras. Como se observa en dicha figura (1), es improbable que se llegue a una declorinación total, ya que como en toda reacción no existe un 100% de eficiencia, y por tanto, el proceso no degradará del todo el contaminante, solo disminuirá su potencial de toxicidad.

En lo referente a la fase oxidativa, generalmente se efectúa en condiciones oxigénicas. En esta fase el O₂ actúa como el agente oxidante de la molécula una vez se ha dado el proceso de deshalogenación reductiva (Suflita et al. 1991), rompiendo los enlaces carbono-carbono y generando CO₂.

Figura 1. Ejemplo de reacciones de deshalogenación de compuestos OC en condiciones reductoras.



Fuente: Sufлита, Joseph M. 1991

2.7 Actividad Metanogénica Específica

La Actividad Metanogénica Específica (AME) es un mecanismo que evalúa la capacidad de los microorganismos anaerobios para producir biogás a partir de un sustrato (Torres et al. 2002). El ensayo de AME, permite cuantificar máxima cantidad de metano producido a partir de un tipo de biomasa y la carga óptima que se debe aplicar a un sistema de digestión anaerobia (Pérez y Torres, 2010).

El proceso de AME comprende las fases de la digestión anaerobia: Hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis, y finalmente metanogénesis, siendo esta última indicador de la biodegradación del sustrato (Pérez y Torres, 2010).

La aplicación de esta herramienta como técnica en la degradación de OC del suelo, se basa en la utilización del biogás obtenido como agente reductor para el contaminante, de tal manera que, al generarse esta condición, las bacterias del suelo sean estimuladas para acelerar el proceso de deshalogenación de los OC (Ver numeral 1.5).

3 MARCO LEGAL

El Gobierno de Colombia ha implantado una serie de normas en lo que refiere al expendio, uso, transporte y/o almacenamiento de plaguicidas (cuyos residuos se encuentran dentro de la lista de Peligrosos), estas se muestran en la tabla 5, a continuación:

Tabla 5. Normativa ambiental sobre pesticidas en Colombia

NORMA	ENTIDAD Y FECHA DE EXPEDICIÓN	OBJETO
Decreto No. 4368 de 2006	Ministerio de Protección Social, Diciembre 4 de 2006	<i>“Por medio del cual se modifica parcialmente el Decreto No. 1843 de 1991, sobre aplicación aérea de plaguicidas.”</i>
Decreto No. 1843 de 1991	Presidencia de la República Julio 22 de 1991	<i>“Por el cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII y XI de la ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas.”</i>
Resolución No. 3079 de 1995.	Instituto Colombiano Agropecuario ICA Octubre 19 de 1995	<i>“Por la cual se dictan disposiciones sobre la industria, comercio y aplicación de biosumos y productos afines, de abonos o fertilizantes, acondicionadores de suelo y plaguicidas.”</i>
Decreto 1443 de 2004	Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial	<i>“Por el cual se reglamenta parcialmente el Decreto-ley 2811 de 1974, la Ley 253 de 1996, y la Ley 430 de 1998 en relación con la prevención y control de la contaminación ambiental por el manejo de plaguicidas y desechos o residuos peligrosos provenientes de los mismos, y se toman otras determinaciones.”</i>
Decreto 4741 de 2005	Presidencia de la República de Colombia	<i>“Por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y el manejo de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral.”</i>

Fuente: minambiente.gov.co; alcaldiabogota.gov.co; ica.gov.co

4 METODOLOGÍA

Para responder al objetivo general planteado en el presente proyecto, fueron realizadas tres etapas, cada una de ellas correspondiente a los tres objetivos específicos propuestos. Para efectuar dichas fases, primero se llevó a cabo un muestreo del suelo en cuestión, cuyas especificaciones se muestran en el numeral 4.1.

4.1 Muestreo

El muestreo del suelo se realizó en las antiguas instalaciones del Instituto Técnico Agropecuario Antonio Galo Lafaurie, un colegio del municipio Agustín Codazzi, donde estudios anteriores revelaron la presencia de pesticidas en dicho terreno (Corpocesar, 1997). Para llevar a cabo el proceso de muestreo, se tuvo en cuenta la siguiente información:

- Temperatura media anual: 28.4 °C (IDEAM, 2008)
- Precipitación media anual: 961 mm (IDEAM, 2008)
- Latitud: 10 01 16.6 N (Google Earth)
- Longitud: 73 14 24.1 O (Google Earth)
- Cauce cercano: Arroyo el Pozón (Corpocesar, 1997)
- Cobertura vegetal: Gramíneas forrajeras (Corpocesar, 1997)
- Uso anterior: Actividades académicas (Corpocesar, 1997)
- Signos de contaminación: leve a severa (Corpocesar, 1997)

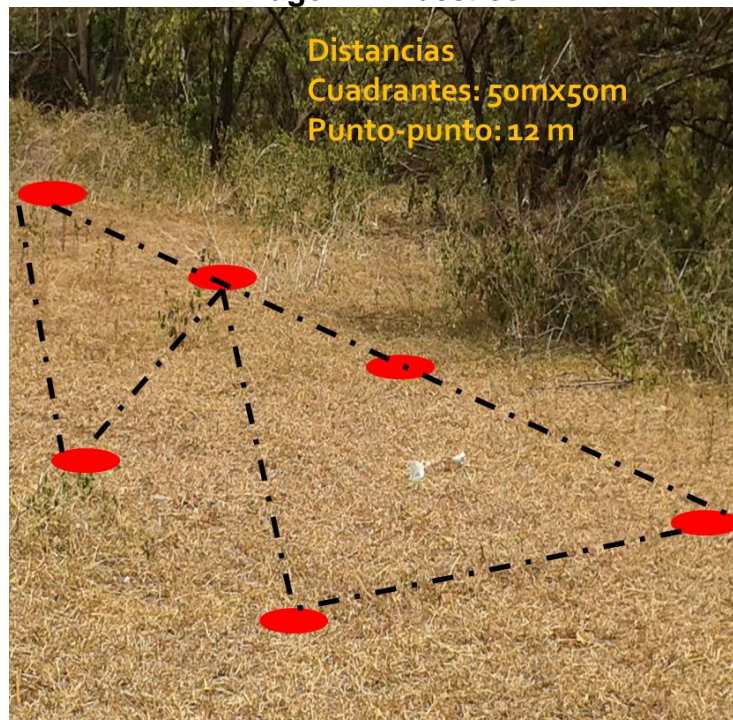
La toma de muestras, se basó en la metodología planteada por Corpoica⁴, en la cual se delimitó la zona en dos cuadrantes de 50x50 metros y en cada uno se ubicaron puntos a manera de *zigzag* cada 12 metros, como se muestra en la imagen 1.

⁴ CORPOICA (2014). Guía para la toma de muestras de suelos COROPICA FEDEGAN [en línea]. Disponible en: [http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Servicios/Documentos/GUIA_PARA_LA_TOMA_DE_MUES TRAS_DE_SUELOS_CORPOICA-FEDEGAN.pdf](http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Servicios/Documentos/GUIA_PARA_LA_TOMA_DE_MUES_TRAS_DE_SUELOS_CORPOICA-FEDEGAN.pdf)

En cada punto se tomaron muestras a 40 cm de profundidad (Corpocesar, 1997), en total 80 unidades de aproximadamente 3 Kg (Ver imagen 2).

Una vez tomadas las muestras, estas fueron transportadas hacia la ciudad de Bucaramanga, en las instalaciones de la Universidad Pontificia Bolivariana, donde se preparó una muestra compuesta, mediante los procesos de trituración, tamización y homogenización.

Imagen 1. Muestreo



Fuente: Autora

Imagen 2. Extracción de las muestras



Fuente: Autora

4.2 Determinación de las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas iniciales del suelo

Estos análisis comprendieron una serie de pruebas de caracterización e identificación del estado inicial del suelo, una vez tomadas y preparadas las muestras del mismo. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado con el fin de obtener una estadística de datos (Ver anexo 5).

4.2.1 Análisis de las propiedades fisicoquímicas del suelo

Esta fase comprendió la caracterización de las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del suelo para su clasificación. Las propiedades físicas comprendieron la Textura, Humedad, Densidad, Porosidad total y Capacidad de Campo (máxima capacidad de retención de agua del suelo). Las químicas fueron pH, Conductividad y CIC, CO y MO y Nutrientes; y de las microbiológicas se identificaron géneros bacterianos adaptados a las condiciones del suelo. En todas las pruebas aplicadas se utilizaron métodos estandarizados y/o propuestos la normativa de la Sociedad de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés), la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM, por sus siglas en inglés), el Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC), entre otras.

4.2.2 Detección de compuestos organoclorados

En esta fase, la muestra fue sometida a un análisis a través del método de Cromatografía de Gases para la detección e identificación de compuestos OC, llevada a cabo en las instalaciones del Laboratorio CROMASS de la Universidad Industrial de Santander. Mediante esta prueba se pudieron determinar las concentraciones iniciales de varios tipos de organoclorados en la muestra de suelo antes de iniciar la aplicación de la técnica.

Para determinar la concentración de OC de la muestra, se empleó la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS). Se utilizó un cromatógrafo AT® 6890 *Series Plus*, adaptado a un detector de masas que fue operado en modo SIM (Selected Ion Monitoring, por sus siglas en inglés). Se empleó una columna DB-5MS (5%-fenil-poli (metilsiloxano), 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) y la inyección se realizó en modo *Splitless* con un volumen de 2 µL.

4.2.3 Identificación microbiológica inicial

Esta extensa fase comprendió la identificación de la microbiota adaptada a las condiciones del suelo, específicamente bacterias. La identificación del género bacteriano, se llevó a cabo aplicando el sistema Índice de Perfil Analítico (API®) (por sus siglas en inglés), que se basa en las reacciones bioquímicas de las bacterias hacia diferentes sustratos, es decir, la actividad metabólica y enzimática, específica en un grupo de bacterias (Shoeb, 2006). Se tomaron 10 g de suelo y se mezclaron con 100 mL de medio basal⁵ en un Erlenmeyer de 1000 mL, esta mezcla se incubó durante 6 días en un Shaker KS 4000i® a una temperatura de 29°C⁶ y a 100 rpm.

Una vez finalizada la agitación e incubación, se procedió a la siembra del sobrenadante del suelo en medios de cultivo sólido agar McConkey y Tripicasa de Soya, a través de la siembra por agotamiento. Con este paso se obtuvo gran cantidad de colonias de diferentes tipos, formas, colores y tamaños. El paso a seguir fue el aislamiento, en el cual se tomaba una sola colonia y se repicaba en

⁵ Medio de cultivo que suministra nutrimentos (como sales de fosfatos, nitratos, sulfatos e hidratos de carbono) para necesarios para el crecimiento de los microorganismos (Krikorian, 1993).

⁶ Se estableció esta condición para simular la temperatura de la zona de donde se tomaron las muestras (Ver numeral 4.1)

otro medio (de la misma clase) con el fin del obtener un cultivo totalmente axénico.

Al lograr aislar totalmente las cepas, se aplicó el test de API® 20 NE, para bacterias *No Entéricas* o no fermentadoras del medio. Este test comprende 20 sustratos para la identificación de bacterias y solo es válido para las colonias cuya enzima Oxidasa sea positiva. La lectura de los resultados se llevó a cabo a las 24 y 48 horas de incubación a 29°C, siguiendo las instrucciones del sistema. En la imagen 3, se muestra el test API® 20 NE con resultados positivos y negativos.

Durante este tiempo pudo notarse en varias ocasiones la factibilidad de variación de las reacciones entre uno y dos días, por lo que es esencial hacer ambas lecturas. Después de obtener los códigos, estos fueron ingresados al Software API®, en el cual se obtuvo el género y especie de microorganismo aislado. La tabla 6, enseña los sustratos correspondientes al API® 20 NE, la composición de los mismos y la reacción enzimática en la revelación de los resultados.

Tabla 6. API® 20 NE

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
NO ₃	potassium nitrate	0.136	reduction of nitrates to nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min colorless pink-red	
			reduction of nitrates to nitrogen	Zn / 5 min pink colorless	
TRP	L-tryptophane	0.2	indole production (TRyptOPhane)	JAMES / immediate colorless pink pale green / yellow	
GLU	D-glucose	1.92	fermentation (GLUcose)	blue to green	yellow
ADH	L-arginine	1.92	Arginine DiHydrolase	yellow	orange / pink / red
URE	urea	0.76	UREase	yellow	orange / pink / red
ESC	esculin ferric citrate	0.56 0.072	hydrolysis (β-glucosidase) (ESCulin)	yellow	grey / brown / black
GEL	gelatin (bovine origin)	0.6	hydrolysis (protease) (GELatin)	no pigment diffusion	diffusion of black pigment
PNPG	4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	0.22	β-galactosidase (Para-NitroPhenyl-β-D-Galactopyranosidase)	colorless	yellow
GLU	D-glucose	1.56	assimilation (GLUcose)	transparent	opaque
ARA	L-arabinose	1.4	assimilation (ARAbinose)	transparent	opaque
MNE	D-mannose	1.4	assimilation (ManNosE)	transparent	opaque
MAN	D-mannitol	1.36	assimilation (MANnitol)	transparent	opaque
NAG	N-acetyl-glucosamine	1.28	assimilation (N-Acetyl-Glucosamine)	transparent	opaque
MAL	D-maltose	1.4	assimilation (MALtose)	transparent	opaque
GNT	potassium gluconate	1.84	assimilation (potassium GlucoNate)	transparent	opaque
CAP	capric acid	0.78	assimilation (CAPric acid)	transparent	opaque
ADI	adipic acid	1.12	assimilation (ADIpic acid)	transparent	opaque
MLT	malic acid	1.56	assimilation (MaLaTe)	transparent	opaque
CIT	trisodium citrate	2.28	assimilation (trisodium CITrate)	transparent	opaque
PAC	phenylacetic acid	0.8	assimilation (PhenylACetic acid)	transparent	opaque
OX	(see oxidase test package insert)	-	cytochrome oxidase	(see oxidase test package insert)	

Fuente: <http://www.biomerieux.com.ar/>

Imagen 3. API® 20 NE, pruebas positiva y negativa



Fuente: <http://www.biomerieux.com.ar/>

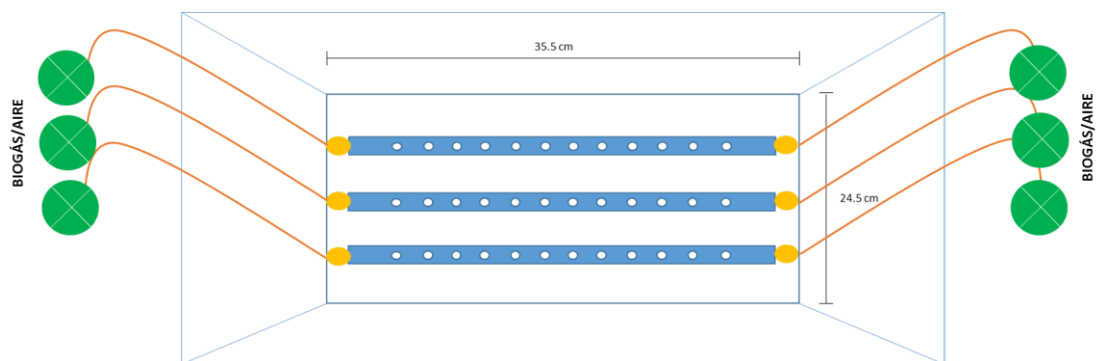
4.3 Dimensionamiento del sistema

Se realizaron los ensayos previos de Actividad Metanogénica Específica, el diseño de reactores y las fases, reductora y oxidativa. En esta etapa se centró el objetivo general de la investigación.

4.3.1 Diseño de reactores

La figura 2, muestra el esquema del diseño de los reactores utilizados en las fases de Reducción/Oxidación. Para ello se tomaron 8.5 Kg (15 cm de profundidad) de la muestra de suelo en un recipiente de plástico (con las medidas que muestra la figura 2) cubierto externamente con papel Kraft, con el fin de simular las condiciones al interior del suelo en campo y evitar el paso de luz. Al interior del recipiente se colocaron tres tubos de PVC de media pulgada ($\frac{1}{2}$ "") perforados al estilo "flauta", a cada extremo se le adaptó un racor que, a su vez, fue conectado a una manguera que sobresalía hacia la superficie. Esta manguera fue conectada: primero a un digestor anaerobio para bombear biogás y luego a un sistema de bombeo de aire (Ver numerales 4.3.3 y 4.3.4).

Figura 2. Esquema de montaje Reducción/Oxidación



Fuente: Autora

Se manejó una única variable: El tiempo. Tres reactores fueron sometidos a 40 días de Biogás más 80 días de Aire, estos fueron llamados **RT1 (REACTORES TIEMPO 1, A; B; C)**; y a otros tres les fueron aplicados 80 días de Biogás y 40 días de Aire y se nombraron **RT2 (REACTORES TIEMPO 2, A; B; C)**. Adicional a esto se tomó la misma cantidad de suelo en tres recipientes con las mismas características, pero sin el diseño de la figura 2, los cuales fueron dejados a

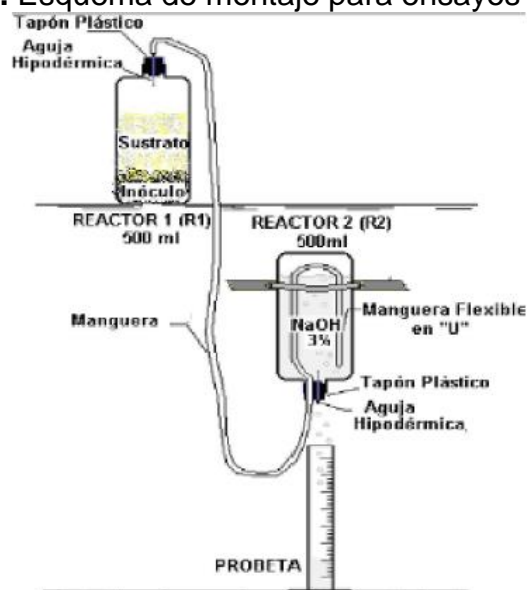
condiciones ambientales, solo efectuando el riego diario requerido (Ver numeral 5.1.1). Se denominaron AN (Atenuación Natural 1, 2 y 3) y correspondieron al control o blanco de comparación del tratamiento.

4.3.2 Ensayo de Actividad Metanogénica Específica

En el ensayo de Actividad Metanogénica Específica (AME) se determinó la tendencia de generación de biogás producto de la digestión anaerobia de un sustrato (estiércol de vaca fresco) tomado de la zona de jardinería de la Universidad Pontificia Bolivariana. Posteriormente se realizó la prueba de Sólidos Volátiles Totales (SVT) (Mediante el Método Estándar para Aguas Residuales) para determinar la cantidad de estiércol que garantizaba una concentración de 2.5 gSVT/L, ya que esta se considera la concentración óptima para lograr la máxima capacidad de generación de metano a partir de dicho sustrato (Cajigas et. al, 2007). Luego se procedió a realizar el montaje que se muestra en la figura 3.

En este caso, la concentración que garantizaba las condiciones de SVT óptima fue de 1.32% p/v (aproximadamente 4.609 g de estiércol por cada 350 mL de agua). Este esquema fue replicado seis veces para obtener una tendencia estadística (Ver imagen 4).

Figura 3. Esquema de montaje para ensayos de AME



Fuente: Cajigas et al. 2007

Imagen 4. Montaje de AME



Fuente: Autora

4.3.3 Fase reductora

Esta fase comprendió la inducción de Biogás (una vez efectuado el ensayo de AME) al suelo para que se cumpliera la etapa de Reducción de los compuestos organoclorados. Para ello se adaptaron seis entradas de Biogás (tres a cada lado) a cada reactor, como se muestra en la imagen 5.

Imagen 5. Montaje de Fase Reductora



Fuente: Autora

Cada entrada de biogás generaba aproximadamente 300 cm³ de metano cada 15 días (después de transcurrido este tiempo se hacía una renovación del

sustrato), por tanto, en promedio, con las seis entradas se inyectaba aproximadamente 120 cm³ de metano por día a cada reactor. Simultáneamente se realizó un riego diario manteniendo entre el 50 y el 80% de la capacidad de campo, humedad necesaria para la actividad de los microorganismos (Ver numeral 5.1.1.) En cada finalización de fase se preparó una muestra compuesta (una de cada tipo de reactor: RT1; A, B, C y RT2; A, B, C) y se envió a análisis por Cromatografía de Gases.

4.3.4 Fase oxidativa

En esta fase se procedió a la inducción de Aire al suelo. Una vez finalizada la fase de reducción, las mangueras se adaptaron a una bomba de aire comprimido. A partir de esta se cumplió la fase de oxidación de los compuestos organoclorados, como se observa en la imagen 6.

Imagen 6. Montaje Fase Oxidativa



Fuente: Autora

Cada entrada de aire proporcionaba un flujo de 178,4 m³ por día, lo que equivalía a 1070 m³ de aire por recipiente al día. Al igual que en la fase reductora, se realizó un riego con las mismas características.

Al finalizar la fase, se preparó muestra compuesta (de igual manera que en la fase reductora) y se envió a análisis por Cromatografía de Gases.

4.4 Evaluación de la efectividad del sistema en la remoción de pesticidas organoclorados

La evaluación comprendió la etapa de análisis y comparación de las concentraciones de organoclorados en las muestras de suelo al término de cada fase y la caracterización microbiológica.

4.4.1 Identificación microbiológica final del suelo de interés

La identificación microbiológica final se realizó con el mismo proceso planteado en la numeral 4.2.3, con las muestras de suelo al terminar las etapas de Reducción/Oxidación.

4.4.2 Análisis de remoción de compuestos organoclorados en el suelo de interés

Para conocer el porcentaje de remoción de compuestos organoclorados del suelo de interés, se realizaron los cálculos y análisis de la variación de las concentraciones obtenidas de los compuestos organoclorados en la etapa inicial, intermedia y final de todo el procedimiento.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinación de las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas iniciales del suelo

En los numerales 5.1.1, 5.1.2 y 5.1.3, se reportan los resultados obtenidos a partir de los análisis de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo de interés.

5.1.1 *Propiedades fisicoquímicas del suelo*

Las propiedades fisicoquímicas analizadas en el suelo de interés fueron: La Textura, Humedad Gravimétrica (HG), Humedad Volumétrica (HV), Densidad Real (Dr), Densidad Aparente (Da), Porosidad Total (Pt), Capacidad de campo, pH, Conductividad eléctrica, Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC), Carbono Orgánico (CO), Materia Orgánica (MO), Nutrientes y Compuestos Organoclorados (OC).

- **Textura**

La textura del suelo fue determinada por dos métodos: Bouyoucos y Granulometría. El primero se basa en la ley de Stokes de la velocidad de caída de las partículas dentro de un fluido viscoso y el segundo en su distribución por tamaño. Con el método de Bouyoucos se calcularon los porcentajes de arena, arcilla y limo, cuyos resultados se reportan en la tabla 7.

Es de observarse la predominancia de arena y limo, con un porcentaje de 45.76 y 41.28, respectivamente, mientras que de arcilla solo se obtuvo 12.96%. Estos valores fueron relacionados en el Triángulo Textural desarrollado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés), como se muestra en la figura 4.

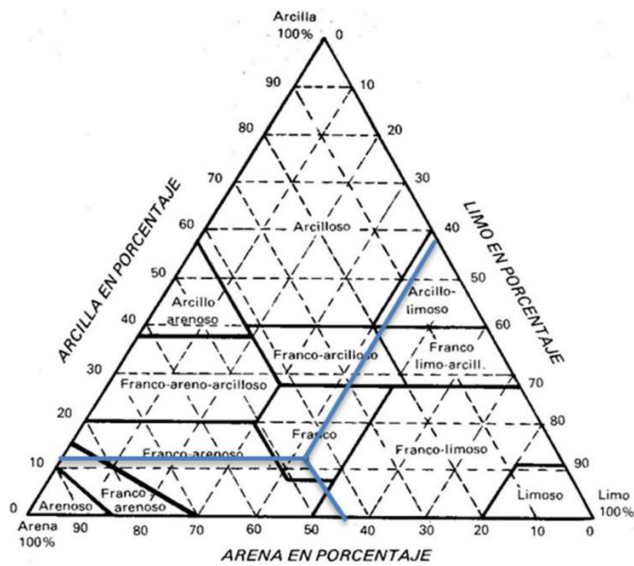
Según este método el suelo fue clasificado como Franco, de tamaño de partícula intermedio.

Tabla 7. Porcentajes de arena, arcilla y limo

ARENA	Porcentaje
Muestra 1	49,28
Muestra 2	44
Muestra 3	44
Promedio	45,76
ARCILLA	Porcentaje
Muestra 1	12,72
Muestra 2	14,72
Muestra 3	11,44
Promedio	12,96
LIMO	Porcentaje
Muestra 1	38
Muestra 2	41,28
Muestra 3	44,56
Promedio	41,28

Fuente: Autora

Figura 4. Relación de porcentajes en el Triángulo Textural para clasificación de suelos



Fuente: www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey

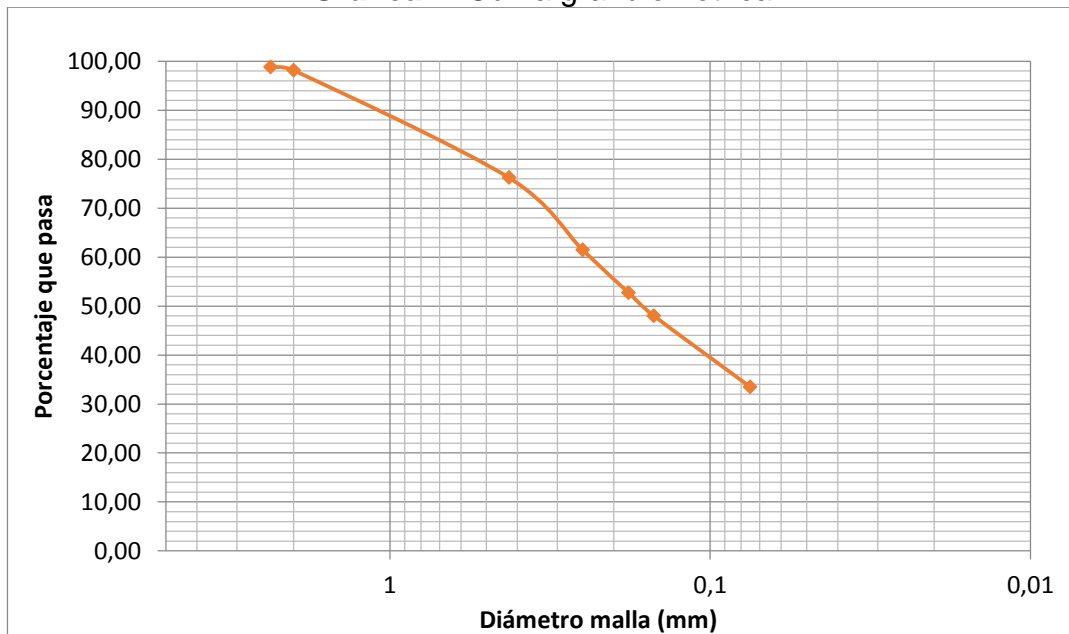
La textura por *Granulometría* se basó en la construcción de una curva logarítmica que representa la distribución de las partículas del suelo que pasan a través de un juego de tamices de diferentes diámetros de malla, según lo planteado por la norma ASTM 136 – 2005. En la tabla 8 se observan las características de los tamices (diámetro de malla y peso). Por su parte, la gráfica 1 corresponde a la curva granulométrica del suelo en cuestión, teniendo en cuenta los datos de la tabla 8 y el porcentaje de muestra analizada que pasa a través de cada tamiz.

Tabla 8. Características de los tamices

No. Tamiz	Peso (g)	Diámetro malla ⁷ (mm)
8	487,6	2,36
10	491	2
40	372,9	0,425
60	362,5	0,25
80	354,3	0,18
100	348,5	0,15
200	337,8	0,075
Base	364,4	0

Fuente: Autora

Gráfica 1. Curva granulométrica



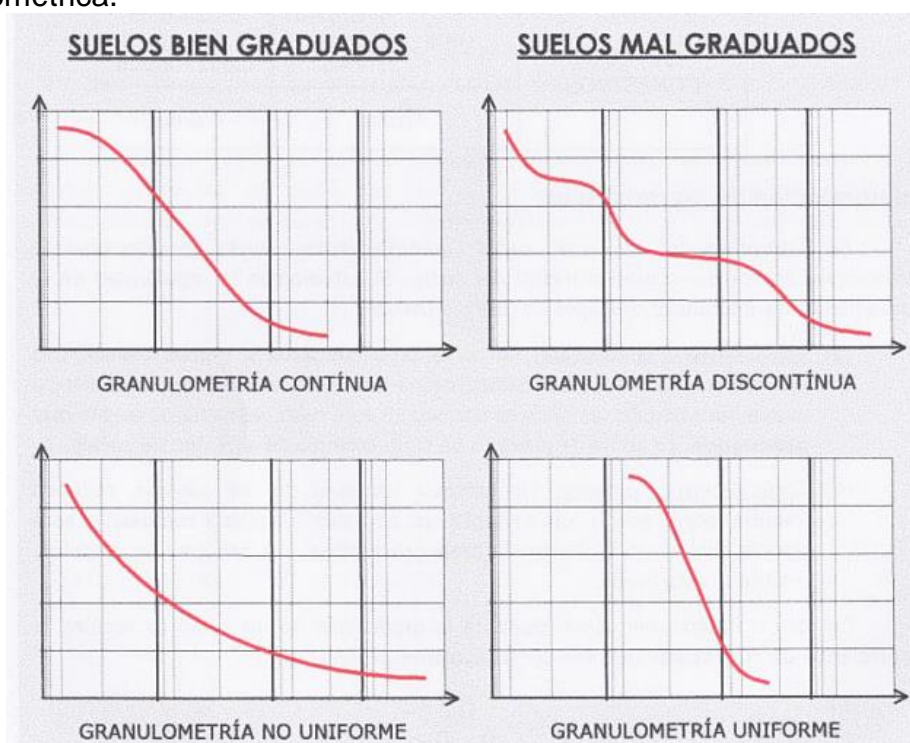
Fuente: Autora

⁷ Diámetro estandarizado (ASTM E11)

Se calculó el Coeficiente de Uniformidad (Cu) y Coeficiente de Curvatura a partir de la gráfica 1, obteniéndose valores de 13 y 0.48, respectivamente. El Cu (> 5) indica un suelo “bien graduado”, es decir que existe una amplia variación entre el tamaño de partícula máximo y mínimo. El Cc representa una curva continua y bien distribuida, lo que demuestra un equilibrio en los diferentes tamaños de partícula del suelo (Bañón y Beviá, 2000).

En la figura 5, se ilustran varios patrones de comparación para el tipo de curva granulométrica, en lo referente a uniformidad y continuidad. En este caso, la curva que se ajusta más las características granulométricas del suelo de interés es la primera, que corresponde a un suelo bien graduado.

Figura 5. Patrones de comparación de uniformidad y continuidad de una curva granulométrica.



Fuente: Bañón y Beviá, 2000

Mediante el método granulométrico, se determinó la cantidad de grava, arena y limo en el suelo analizado (Ver tabla 9). Con estos datos se identificó el porcentaje de las partículas de mayor tamaño. Se observa una predominancia de partículas limosas, con tamaños medianos. Esto indica la relación entre el resultado obtenido por el método de Bouyoucos y granulometría.

Tabla 9. Porcentaje de grava, arena y limo

Grava (%)	%No. 4	0,00
Arena (%)	%No. 4 + %No. 200	14,63
Limo (%)	%No. 200	85,37

Fuente: Autora

- Humedad

Se determinó el porcentaje de Humedad Gravimétrica (HG) mediante la relación entre la masa de agua y la masa de suelo seco. Los resultados obtenidos se reportan la tabla 10.

Tabla 10. Porcentaje de Humedad Gravimétrica

MUESTRA	1	2	3	PROMEDIO
HG (%)	2.6	2.5	2.2	2.43

Fuente: Autora

La Humedad Volumétrica (HV) se calculó con el producto entre la HG y la Densidad aparente. Los resultados se resumen en la tabla 11.

Tabla 11. Porcentaje de Humedad Gravimétrica

MUESTRA	1	2	3	PROMEDIO
HV (%)	4.18	4.05	3.48	3.9

Fuente: Autora

Ambos valores indican un suelo con baja humedad. Se considera un porcentaje de HG bajo si es menor a 25 (González et al. 1990), lo que indica un suelo con escasez de humedad con base en peso seco. Por su parte, el valor HV revela que solo el 3.9% corresponde a la fase líquida del suelo.

- Densidad

El valor de la Densidad real (Dr) se obtuvo mediante la aplicación del principio de Arquímedes. La Dr no tiene en cuenta el espacio ocupado por los poros ni por

el componente líquido, solo considera la relación entre el componente sólido y el volumen ocupado por el mismo. La tabla 12, reporta los valores de Dr.

Tabla 12. Densidad real

MUESTRA	1	2	3	PROMEDIO
Dr (g/cm³)	2.0	1.9	1.9	1.93

Fuente: Autora

La Densidad aparente (Da) se determinó por el método del cilindro. Se calculó con la relación entre la masa del suelo seco y el volumen total ocupado por la muestra en el cilindro (Ver tabla 13).

Tabla 13. Densidad aparente

MUESTRA	1	2	3	PROMEDIO
Da (g/cm³)	1.607	1.623	1.583	1.604

Fuente: Autora

La Dr, generalmente posee un valor promedio de la partícula de 2.65 g/cm³. La Da es muy variable y depende de otras propiedades como la textura, materia orgánica y humedad del suelo. En este caso, el valor de 1.604 g/cm³ define un suelo mineral ligeramente compactado y que puede afectar el crecimiento radicular (Núñez Solís, 2000).

- Porosidad total

La Porosidad total (Pt) se determinó mediante el cociente entre la Da y la Dr, equivalente al porcentaje de poros ocupado en el suelo. La tabla 14, resume los resultados.

Tabla 14. Porosidad total

MUESTRA	1	2	3	PROMEDIO
Pt (%)	19.65	22.7	28	23.45

Fuente: Autora

El valor promedio de Pt indica una ligera compactación del suelo analizado. Teniendo en cuenta su textura (Franca) y Da (1.604 g/cm^3), un óptimo porcentaje de poros oscila entre 30 y 46.3% (Rawls et al. 1992). El valor promedio de Pt (23.45%) hallado en el suelo de interés indica una bajo nivel del componente gaseoso en esta matriz.

- **Capacidad de campo y pérdida de humedad**

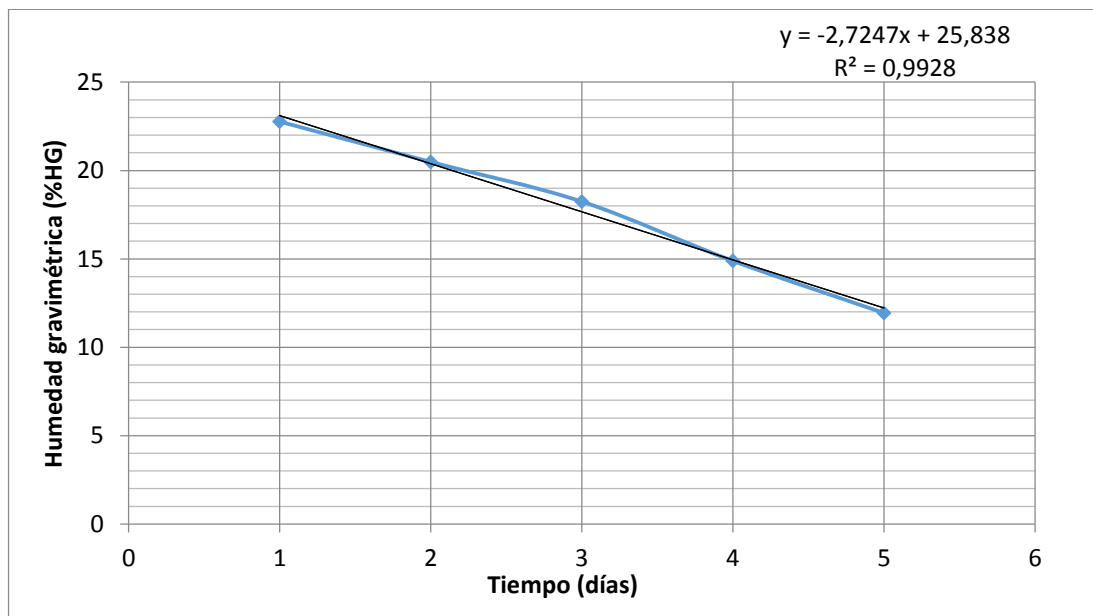
La capacidad de campo se determinó experimentalmente, al igual que la HG, con la relación entre la masa húmeda y seca del suelo; solo que esta vez, el suelo fue inundado 24 horas antes con el fin de lograr su máxima capacidad de retención de agua. De este proceso fue hallado un valor de 227.7 mL de agua/Kg de suelo o 22.77 %HG, lo cual señala una capacidad de campo media (rango entre 20 y 30%) según Garrido Valero, 1994. La pérdida de humedad del suelo en estudio, se determinó aplicando el mismo método durante cinco días para generar la tendencia, con estos datos se construyeron las gráficas 2 y 3.

En la gráfica 2, se muestra la tendencia de pérdida de humedad por día, que se genera según las características del suelo en cuestión. Esta curva experimental, genera una función matemática que permite determinar el porcentaje de HG para cualquier día. En la ecuación de la gráfica 2, la variable x , corresponde al número de días transcurridos, mientras que el valor de y , es el porcentaje actual de HG acorde con este tiempo.

Para determinar el volumen de agua faltante en el suelo, se toma como referencia el valor de y , hallado con la ecuación de la gráfica 2 y se extrapola a la gráfica 3 (construida con los mismos valores experimentales), con esto se obtiene la cantidad de agua (mL) por masa de suelo (Kg) correspondiente al día actual. Por tanto, si se quiere llegar a un porcentaje de HG determinado, se halla un valor de y *faltante* (lo que se requiere para alcanzar la humedad óptima), que consiste en la resta entre el valor de y *alcanzable* (al valor de humedad que se desea llegar) menos el valor de y *actual*, cuyo resultado se aplica a la ecuación de la gráfica 3 (esta vez como la variable x) y se multiplica por la cantidad de kilogramos de suelo para finalmente obtener el volumen de agua que se debe agregar, y que garantizan la humedad óptima para una actividad metabólica microbiana eficiente.

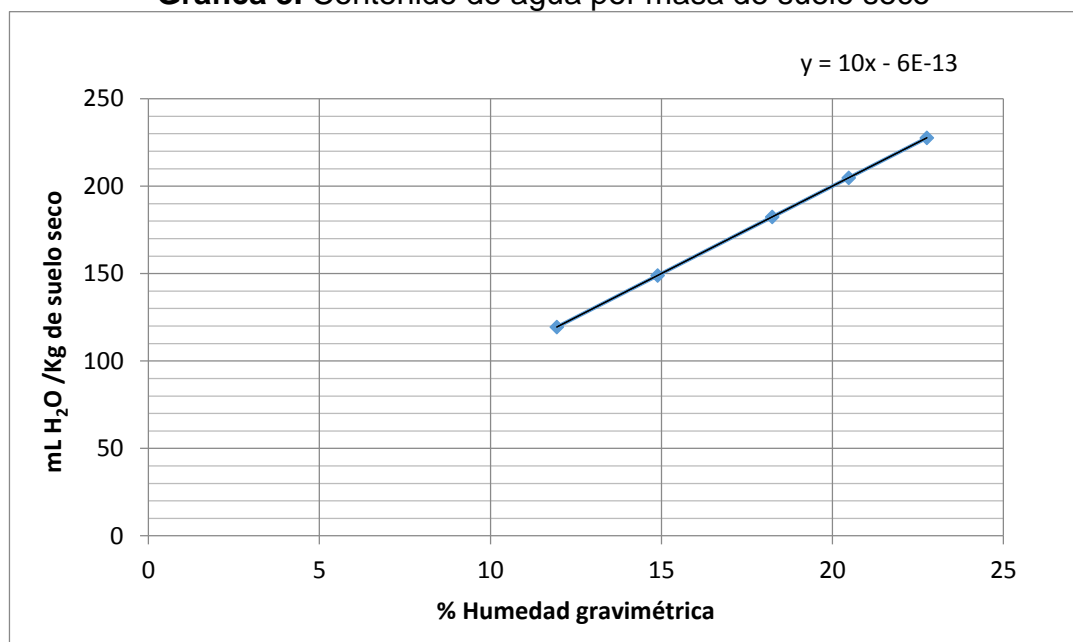
Para el caso del suelo en estudio, el porcentaje de HG que garantiza estas condiciones se encuentra en un rango entre 11.385 y 18.216% (entre 50 y 80%) (Ramos y Zúñiga, 2008).

Gráfica 2. Curva de pérdida de humedad



Fuente: Autora

Gráfica 3. Contenido de agua por masa de suelo seco



Fuente: Autora

- pH y Conductividad eléctrica

La tabla 15, muestra los valores de pH del suelo en agua y KCl. Se obtuvo un pH neutro en ambas soluciones, lo que indica disponibilidad de nutrientes facilitando la absorción de las plantas (Thompson M. y Troeh F. 2002). Además el Δ pH negativo indica que la carga generada en el coloide es negativa, por tanto favorece el intercambio de cationes.

Por su parte, la conductividad eléctrica se mantiene en un valor promedio de 204.6 μ s/cm (Ver tabla 16). Rioja Molina, 2002, plantea que una conductividad menor a 350 μ s/cm es despreciable en la alteración del crecimiento de todo tipo de vegetación, lo cual califica al suelo de interés bajo este parámetro como inalterable para las plantas.

Tabla 15. pH del suelo

MUESTRA	VALOR DE pH H₂O	VALOR DE pH KCL 1N	ΔpH
1	6.71	6.29	-0.42
2	6.77	6.20	-0.57
3	6.55	6.28	-0.27
PROMEDIO	6.68	6.26	-0.42

Fuente: Autora

Tabla 16. Conductividad eléctrica del suelo

MUESTRA	Conductividad (μs/cm)
1	198.3
2	203.9
3	211.5
PROMEDIO	204.6

Fuente: Autora

- Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)

La CIC se determinó por el método de saturación con Acetato de Amonio. La tabla 17, muestra los resultados obtenidos. El resultado promedio obtenido (17.6 meqg/100 g Suelo) da a conocer un suelo con una CIC media, es decir que presenta disponibilidad de cationes esenciales (nutrientes) pero son limitados y propensos a agotarse rápidamente (Rioja Molina, 2002).

Tabla 17. Capacidad de Intercambio Catiónico del suelo

MUESTRA	CIC (meqg/100 g)
Blanco	-
1	18.2
2	17.2
3	17.4
PROMEDIO	17.6

Fuente: Autora

- **Carbono Orgánico y Materia Orgánica**

El porcentaje de Carbono Orgánico (CO) fue hallado según lo establecido en la Norma Técnica Colombiana (NTC) 5403, cuyo valor fue de 1.06%. A partir de este se calculó el porcentaje de Materia Orgánica (MO) equivalente al producto del porcentaje de CO por la constante K igual a 1.7, establecida en este método. El valor obtenido de MO fue de 1.802%.

Los porcentajes de CO y MO evidencian una concentración de componente orgánico bajo, calificado como tal, según la tabla 18.

Tabla 18. Parámetro de comparación para contenido de MO de un suelo

CONTENIDO DE MO (%)	CLASIFICACIÓN
<0.9	Muy bajo
1.0 – 1.9	Bajo
2.0 – 2.5	Normal
2.6 – 3.5	Alto
>3.6	Muy alto

Fuente: Rioja Molina. A. (2002)

- **Nutrientes**

Con el fin de determinar la disponibilidad de nutrientes requeridos por los microorganismos, se hallaron las concentraciones de Nitrógeno y Fósforo, en el suelo de interés. La tabla 19 muestra los resultados.

Tabla 19. Concentraciones de Nutrientes del suelo (N y P)

PARÁMETRO	UNIDAD	VALOR
Nitrógeno total	mg NTK/Kg	1025.55
Nitrógeno total	% P/P	0.1025
Fósforo total	mg PO ₄ /Kg	1.33

Fuente: Autora

El suelo analizado, en términos de nutrientes, se encuentra dentro del rango “Normal” con tendencia a “Baja”. La concentración de N total, se clasifica dentro de un rango normal, mientras que el P se considera dentro del rango “Muy bajo”. Urbano (1995) clasifica el suelo según contenido de nutrientes (Ver tablas 20 y 21).

Tabla 20. Clasificación del suelo según el contenido de Nitrógeno Total

NITRÓGENO (%)	CLASIFICACIÓN
> 0.18	Alto
0.15 – 0.18	Ligeramente Alto
0.10 – 0.15	Normal
0.08 – 0.10	Ligeramente Bajo
0.05 – 0.08	Bajo
< 0.05	Muy Bajo

Fuente: Urbano Terrón. 1995

Tabla 21. Clasificación del suelo según el contenido de Fósforo Total

FÓSFORO (ppm)	CLASIFICACIÓN
< 5	Suelo Pobre
5 – 10	Suelo Medio
> 10	Suelo Rico

Fuente: Urbano Terrón. 1995

Resumen de las propiedades fisicoquímicas del suelo

La tabla 22 sintetiza las propiedades fisicoquímicas del suelo en cuestión.

Tabla 22. Resumen de las propiedades del suelo

PROPIEDAD	PARÁMETRO	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Física	Textura	Franco Bien graduado	Tamaño de partícula intermedio y de amplia variación.
	Humedad (%)	HG: 2.43 HV: 3.9	Escasez de humedad.
	Densidad (g/cm ³)	Dr: 1.93 Da: 1.604	Compactación ligera a mediana.
	Porosidad (%)	23.45	
	Cap. Campo (mLH ₂ O/KgS)	227.7	Retención de líquido mediana.
Química	pH (U)	H ₂ O: 6.68 KCL: 6.26 Δ pH: -0.42	Neutro, carga de coloide negativa e intercambio de cationes.
	Conductividad (μ s/cm)	204.6	Despreciable en la alteración del crecimiento de las plantas.
	CIC (meqg/100gS)	17.6	Media, disponibilidad limitante de cationes esenciales.
	CO y MO (%)	CO: 1.06 MO: 1.802	Bajo contenido de componente orgánico
	Nutrientes (mg/Kg)	N total: 1025.55 P total: 1.33	Contenido bajo a muy pobre.

Fuente: Autora

La textura franca obtenida se considera óptima para el crecimiento radicular, sin embargo, la densidad aparente y porosidad indican que el grado de compactación que el suelo presenta, dificulta la transferencia de oxígeno, lo cual dificulta el crecimiento óptimo de la vegetación. Esto a su vez se relaciona con el bajo contenido del componente orgánico del suelo. Por su parte, la escasa humedad impide la solubilidad de los nutrientes, los cuales se encuentran limitados por la baja concentración de materia orgánica, Nitrógeno, Fósforo y CIC. Finalmente, el pH y la conductividad resultaron inapreciables, lo que beneficia la transferencia de electrones en las reacciones Reducción/Oxidación al interior del coloide del suelo.

5.1.2 Identificación microbiológica inicial del suelo de interés

Para la identificación microbiológica inicial en el suelo de interés, se llevó a cabo el proceso de aislamiento de las cepas mediante el repique en medios de cultivo sólido (Ver numeral 4.2.3). A través del sistema API® 20NE, se identificaron 20 cepas cuyas características morfológicas (a nivel macro y micro) y taxonómicas se definen en la tabla 23.

Tabla 23. Características morfológicas y taxonómicas (según API) de las bacterias aisladas

CEPA	DESCRIPCIÓN DE LA COLONIA		TAXONOMÍA SEGÚN API
	Macro	Micro	
1i*	Pequeña, rosada, brillante, redonda, convexa.	Bacilos negativos Gram	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>
2i	Mediana, rosada, irregular brillante.	Bacilos negativos Gram	<i>Burkholderia cepacia</i>
3i	Pequeña, rosada, redonda, convexa, brillante.	Bacilos negativos Gram	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>
4i	Mediana, rosada irregular, brillante, convexa.	Bacilos negativos Gram	<i>Burkholderia cepacia</i>
5i	Mediana-grande, redonda, rosada, brillante.	Bacilos negativos Gram	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
6i	Pequeña, rosada, brillante, convexa.	Bacilos negativos Gram	<i>Burkholderia cepacia</i>
7i	Pequeña, morada, brillante, convexa, mucoide.	Bacilos negativos Gram	<i>Pseudomonas putida- fluorescens</i>
8i	Pequeña, morada, brillante, dispersa.	Bacilos negativos Gram	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>
9i	Mediana, brillante, rosada, convexa, redonda.	Bacilos negativos Gram	<i>Burkholderia cepacia</i>
10i	Mediana, irregular convexa, mucoide.	Bacilos negativos Gram	Posibilidad ⁸ de <i>Pseudomonas mendocina</i>
11i	Rosada, mediana, redonda, brillante.	Bacilos negativos Gram	<i>Pseudomonas putida-mendocina</i>
12i	Rosada, mediana, redonda, brillante.	Bacilos negativos Gram	<i>Pseudomonas putida-mendocina</i>
13i	Morada, irregular, brillante, convexa.	Bacilos negativos Gram	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
14i	Rosada, pequeña, brillante, convexa, redonda.	Bacilos negativos Gram	Posibilidad de <i>Aeromonas hydrophila/caviae</i> ⁷
15i	Morada, mediana, redonda, convexa, brillante.	Bacilos negativos Gram	Posibilidad de <i>Pseudomonas fluorescens</i> ⁷
16i	Plana, rosada, pequeña, brillante.	Bacilos negativos Gram	<i>Ralstonia picketti</i>
17i	Mediana, plana, rosada, brillante.	Bacilos negativos Gram	<i>Pseudomonas putida</i>
18i	Rosada, plana, mediana, irregular.	Bacilos negativos Gram	Posibilidad de <i>Burkholderia gladioli</i> ⁷
19i	Morada, mediana, redonda, convexa, brillante.	Bacilos negativos Gram	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
20i	Morada, irregular, brillante, convexa.	Bacilos negativos Gram	<i>Burkholderia cepacia</i>

Fuente: Autora

*i, inicial

⁸ Posibilidad: El porcentaje dado por el software API® fue menor al 90%

En la tabla 23, se observa la predominancia de varios tipos de *Pseudomonas* (*fluorecens*, *putida* y *mendocina*), *Burkholderia* y *Aeromonas*, especies que la literatura ha reportado con alto potencial para degradar compuestos OC. Nawab et al. 2003, reportaron una alta degradación de Lindano, utilizando diferentes especies de *Pseudomonas* aisladas del mismo suelo contaminado. Por su parte, French, T. W. et al. 2002, demostraron la capacidad de la *Burkholderia cepacia* para degradar Tricloroetileno de los adsorbentes usados para atrapar este compuesto en los rellenos sanitarios. Xiaomin, L. et al. 2015, identificaron la presencia de *Aeromonas sp.* en un suelo contaminado con Pentaclorofenol, y concluyeron que estas bacterias optimizaron el proceso de degradación aplicando estas cepas a dicho suelo.

A pesar de que las bacterias entéricas no presentan tanta significancia en degradación de compuestos OC, como las No Entéricas, también se llevó a cabo su identificación macro y microscópica (Ver tabla 24).

A partir de las características morfológicas de las colonias, y mediante una revisión bibliográfica, se tuvo un indicio del posible tipo de bacteria encontrada. Es muy probable que la cepas fermentadora pertenezcan al tipo de las *Escherichia coli*, debido a estudios reportados sobre su capacidad degradadora de organoclorados. Por ejemplo, Kumar et al. 2013, evaluaron la biorremediación de lindano en suelos agrícolas empleando cepas de *E. coli*. Otra probable cepa dentro de este grupo es la *Alcaligenes fecalis*. Se han reportado las altas tasas de degradación de endosulfán utilizando *A. Fecalis* (Kong et al. 2013).

Por otro lado, se encontraron cepas de bacilos Gram positivos, algunos de ellos endosporados. La bibliografía no reporta muchos estudios sobre el potencial degradador de OC de estas cepas; no obstante, Harish y Bala, 2012, reportaron que cepas de especies de *Bacillus* (aisladas de suelos contaminados) lograron degradar el 70% de la molécula de endosulfán en 21 días.

Tabla 24. Características morfológicas y taxonómicas (según bibliografía) de las bacterias aisladas

CEPA	DESCRIPCIÓN DE LA COLONIA			POSIBLE TAXONOMÍA ⁹
	Macro		Micro	
21i*	Fucsia, brillante, mucoide, convexa.	irregular,	Bacilos negativos.	Gram Entéricas y/o fermentadoras de glucosa. Oxidasa negativa. Posibilidad de <i>Escherichia coli</i> . <i>Alcaligenes fecalis</i>
22i	Fucsia, mucoide, brillante, irregular.	dispersa,	Bacilos negativos.	
23i	Fucsia, brillante, redonda.	mediana,	Bacilos negativos.	
24i	Muy pequeña, puntiforme, redonda.	morada,	Bacilos negativos.	
25i	Pequeña, puntiforme, convexa, mucoide	redonda,	Bacilos negativos.	
26i	Pequeña, plana, redonda.	morada,	Bacilos negativos.	
27i	Mediana, rosada, brillante.		Bacilos negativos.	
28i	Fucsia, opaca, grande, cremosa.	redonda,	Bacilos negativos.	
29i	Pequeña, morada, puntiforme, convexa.	brillante,	Bacilos negativos.	
30i	Blanca, mediana, convexa, brillante.	redonda,	Bacilos negativos.	
31i	Blanca, pequeña, convexa, redonda.	mucoide,	Bacilos negativos.	
32i	Amarilla, redonda, mediana.	convexa,	Bacilos negativos.	
33i	Grande, irregular, translúcida.	plana, blanca	Bacilos positivos.	Gram Bacilos rectos, solos y en cadena, algunos endosporados. Posibilidad de <i>Bacillus sp.</i> <i>B. Subtilis</i> , <i>B. Licheniformis</i> , <i>B. Piliiformis</i> , <i>B. Cereus</i> .
34i	Blanca, opaca, irregular, plana.		Bacilos Gram positivos endosporados.	
35i	Mediana, blanca, redonda, brillante.	convexa,	Bacilos positivos.	
36i	Grande, irregular, plana, brillante.	filamentosa,	Bacilos positivos.	

Fuente: Autora *i, inicial

Las imágenes de las cepas bacterianas identificadas y los test API aplicados en la muestra inicial del suelo, se muestran en los Anexo 2 y 4, respectivamente.

⁹ Se hizo una revisión bibliográfica de acuerdo a las características morfológicas de la colonia y de la bacteria vista en placa.

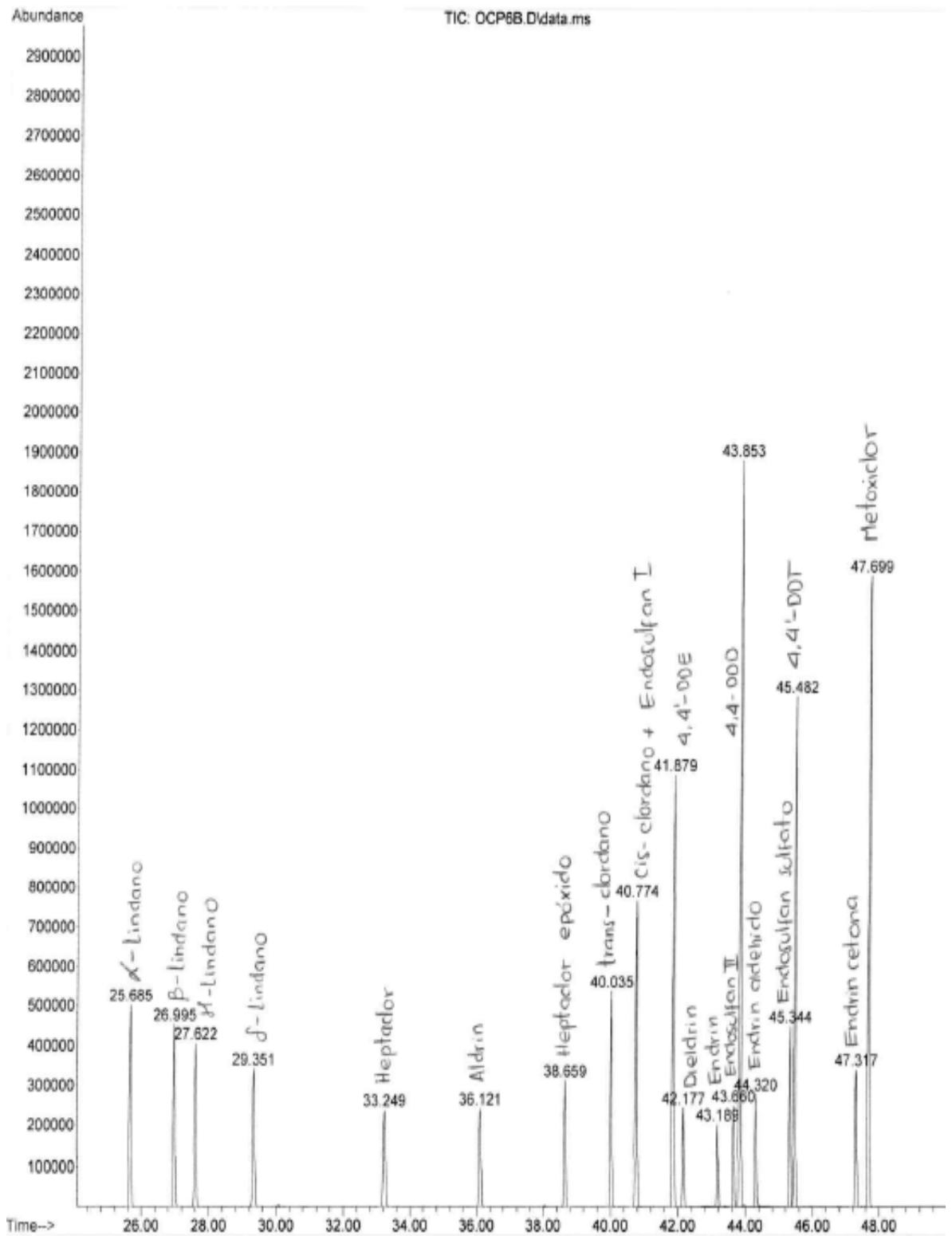
Lo anterior demuestra que existe una alta probabilidad de degradación compuestos OC a partir de cepas bacterianas nativas. Sims J. L et al. 1991, comprobaron que la estimulación de estas bacterias, generando condiciones reductoras, permite la deshalogenación de la molécula disminuyendo su toxicidad y facilitando el rompimiento de los enlaces carbono-carbono, a través de condiciones oxidativas.

5.1.3 Detección de compuestos Organoclorados

La detección de compuestos OC se realizó aplicando la técnica de Análisis Cromatográfico descrita en el numeral 4.2.2. La imagen 7 muestra el cromatograma utilizado como patrón de detección de compuestos organoclorados.

Por su parte, en la tabla 25 se dan a conocer las concentraciones de los compuestos organoclorados en el suelo antes de iniciar el respectivo tratamiento, donde los OC que se detectaron fueron: 4.4' – DDT, 4.4' – DDD, 4.4' – DDE, *trans* – Clordano y Endrín.

Imagen 7. Patrón de detección de compuestos organoclorados



Fuente: Laboratorio CROMASS, Universidad Industrial de Santander, 2015

Tabla 25. Concentración inicial de compuestos organoclorados en la muestra de suelo

MUESTRA	COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mg/Kg)
Inicial	<i>trans</i> -Clordano	0.1
	4.4'-DDE	1.1
	Endrín	1.9
	4.4'-DDD	2.4
	4.4'-DDT	9.1

Fuente: Autora

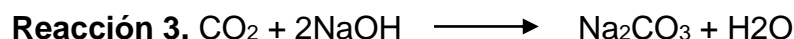
Se observa que la muestra de suelo extraída presenta altas concentraciones de DDT y sus derivados, producto de la metabolización microbiana, lo cual corrobora la persistencia de estos contaminantes, dado que el evento de contaminación se presentó hace varias décadas.

5.2 Dimensionamiento del sistema tratamiento

En el dimensionamiento del sistema de tratamiento se tuvo en cuenta la importancia de las ejecuciones de la fase reductora y oxidativa, aplicadas consecutivamente. Antes del montaje principal se realizó el ensayo de Actividad Metanogénica Específica (AME), cuyos resultados se muestran en la numeral 5.2.1.

5.2.1 Ensayo de Actividad Metanogénica Específica

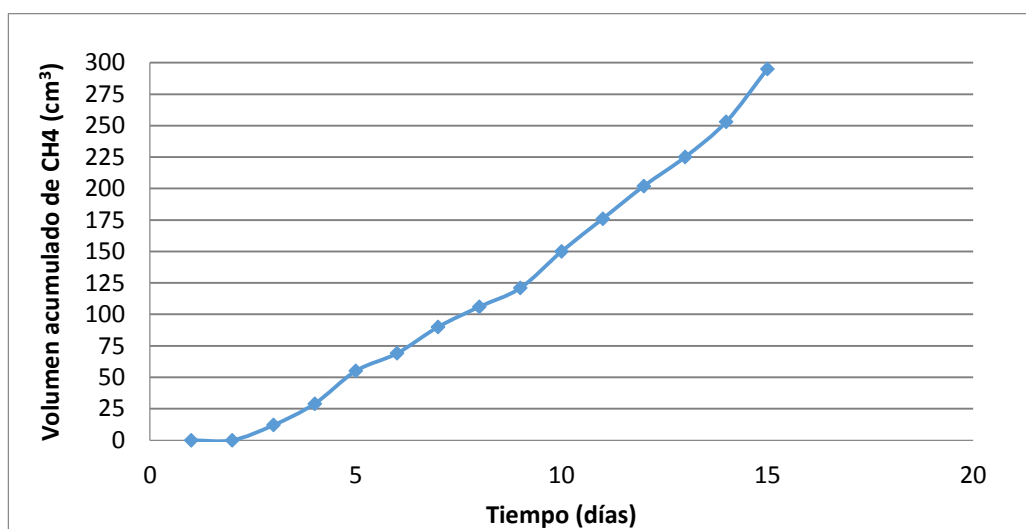
Con este ensayo se determinó la tasa de generación de metano producto de la digestión anaerobia de Estiércol de Vaca (Ver numeral 4.3.3). Esta técnica se basa en el desplazamiento de un líquido (NaOH 3%) con un gas, cuyo volumen desplazado es equivalente al volumen del gas producido (Torres et al. 2010). Al interior de este proceso se llevan a cabo las siguientes reacciones:



La serie de reacciones 1, 2 y 3, demuestran que la base de la AME es la reacción entre el CO_2 y el NaOH . Al cumplirse dicha reacción se elimina el CO_2 (componente secundario del biogás) permitiendo medir el volumen de metano a través del desplazamiento del líquido (Na_2CO_3) (Torres et al. 2010). El metano constituye la mayor parte del biogás y es un generador de condiciones reductoras que son de interés para el presente proyecto.

La gráfica 4 muestra la curva (en promedio) de comportamiento de la AME utilizando como sustrato estiércol de vaca de la zona de jardinería de la UPB.

Gráfica 4. Comportamiento AME



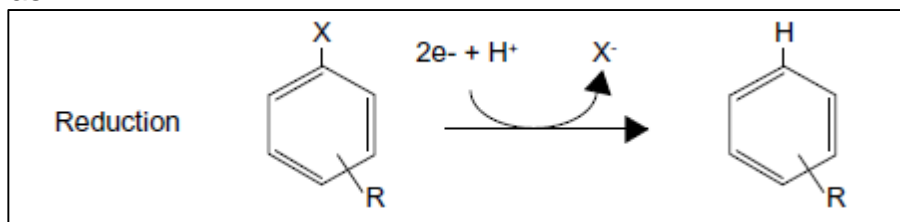
Fuente: Autora

En la gráfica 4 se observa que en un periodo de 15 días se generó un volumen aproximado de 300 cm^3 de metano con el sustrato ensayado. A partir de este dato se determinó la frecuencia de cambio de la solución de estiércol preparada para garantizar el volumen de biogás requerido para mantener las condiciones reductoras.

5.2.2 Fase reductora

En esta fase, el metano actúa como agente oxidante (donador de electrones), ya que reduce la molécula OC transfiriendo un H^+ y rompiendo el enlace con el ion Cl^- (Ver numeral 2.5). La figura 6, describe la posible reacción reportada por la literatura, que se presenta al interior de los reactores durante la fase reductora.

Figura 6. Reacción de deshalogenación de una molécula de OC en condiciones reductoras



Fuente: Sims J. L. et al. 1991

En la tabla 26 se observan altos porcentajes de remoción de todos los compuestos OC detectados en el suelo, una vez finalizada la fase reductora, y los porcentajes de remoción con respecto a la concentración inicial. Es probable que el aumento en la concentración de 4,4'-DDD en el ensayo RT1 se deba a la degradación del 4,4'-DDT, ya que el primero constituye un metabolito del segundo.

Tabla 26. Concentración de compuestos OC finalizada la fase reductora

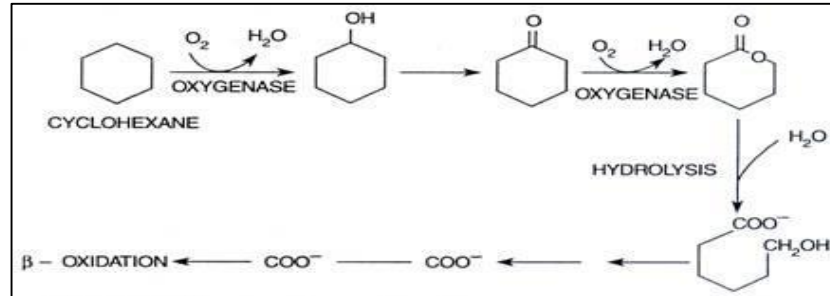
COMPUESTO	MUESTRA	CONCENTRACIÓN (mg/Kg)	REMOCIÓN (%)
trans-Clordano	RT1	0,04	60,0
	RT2	0,03	70,0
4,4'-DDE	RT1	0,82	25,5
	RT2	0,52	52,7
Endrín	RT1	1,12	41,1
	RT2	0,6	68,4
4,4'-DDD	RT1	3,43	-42,9
	RT2	1,16	51,7
4,4'-DDT	RT1	4,06	55,4
	RT2	3,46	62,0

Fuente: Autora

5.2.3 Fase oxidativa

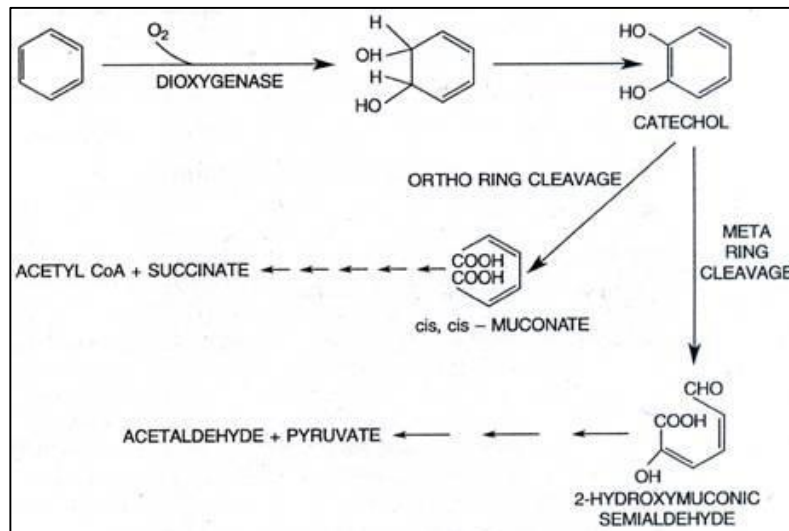
La fase oxidativa se llevó a cabo una vez finalizada la fase reductora. Para generar un ambiente oxidativo se realizó la inducción de aire comprimido. Las figuras 7 y 8 describen un ejemplo de la posible reacción de oxidación de la molécula del contaminante después del proceso de su deshalogenación.

Figura 7. Reacción de oxidación de un compuesto orgánico cíclico alifático deshalogenado



Fuente: www.yourarticlelibrary.com

Figura 8. Reacción de oxidación de un compuesto orgánico aromático deshalogenado



Fuente: www.yourarticlelibrary.com

Es importante aclarar que hay poca probabilidad de una total deshalogenación de la molécula del organoclorado, por lo tanto, la fase oxidativa puede revertirse y unirse nuevamente con el Cl⁻ libre, aumentando así la concentración del compuesto OC inicial que había sido deshalogenado (EPA, 2012). Este reporte de la literatura permite explicar algunos de los resultados en los cuales se “repunta” la concentración de los OC después de la fase reductora. En específico, se observó que varios de estos compuestos en los reactores RT1, diseñados para un tiempo de reducción (deshalogenación) menor, aumentaron significativamente su concentración (Ver tabla 26). Por lo anterior se puede deducir que probablemente no se presentó una deshalogenación total de las moléculas y pudo estimularse el efecto reversible de la reacción. De igual manera

se considera la posibilidad de una desorción de los compuestos OC encapsulados en los poros del suelo, debido a la magnitud del flujo de aire, causando el aumento de su concentración (EPA, 1994).

Por esta razón, es conveniente analizar la remoción de los compuestos OC en la fase oxidativa como una etapa independiente de la fase reductora y a un término más largo para poder percibir los cambios de su concentración en el tiempo.

Tabla 27. Concentración de compuestos OC finalizada la fase oxidativa

COMPUESTO	MUESTRA	CONCENTRACIÓN (mg/Kg)	REMOCIÓN (%)
<i>trans</i> -Clordano	RT1	0,08	-100
	RT2	0,03	0,0
4,4'-DDE	RT1	0,99	-20,73
	RT2	0,3	42,3
Endrín	RT1	1,22	-8,93
	RT2	0,4	33,3
4,4'-DDD	RT1	1,7	50,4
	RT2	0,57	50,9
4,4'-DDT	RT1	6,09	-50
	RT2	2,41	30,3

Fuente: Autora

5.3 Evaluación de la efectividad del sistema en la remoción de pesticidas organoclorados

Finalmente, con esta fase se dio cumplimiento del último y más relevante de los objetivos, correspondiente a la evaluación de la efectividad del sistema propuesto para el tratamiento de suelos contaminados con organoclorados. Esta evaluación comprende la identificación final de los microorganismos y el análisis de la remoción de organoclorados.

5.3.1 Identificación microbiológica final del suelo de interés

Una vez finalizada la técnica aplicada al suelo de interés, se realizó el proceso de identificación final de las bacterias presentes en los tres tipos de reactores

(RT1, RT2 y AN). En la tabla 28 se muestra la descripción de las cepas encontradas al finalizar el tratamiento del suelo.

Se observa la permanencia de especies de *Pseudomonas* desde el inicio hasta el final del tratamiento. No obstante, la especie *Achromobacter Xylooxidans* (no identificada en la muestra inicial) se encontró en los RT1 y RT2. Li et al. 2009, demostraron que una enzimas segregadas por *A. Xylooxidans*, metabolizaron endosulfán en condiciones oxidativas; por tanto, es probable que el desarrollo de esta bacteria se haya dado durante la fase de oxidación contribuyendo a la degradación de los OC presentes en la muestra de suelo.

También hubo permanencia de las especies de *Bacillus*, pero se encontró una cepa cuyas características morfológicas (macro y microscópicas) son coincidentes con la de *B. Subtilis*. Esta bacteria tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes adversos de contaminación a través de la formación de endosporas. Además contribuye en el ciclo de nutrientes bajo condiciones aerobias (EPA, 1997). Aunque son muy pocas las referencias sobre el potencial degradador de *B. Subtilis*, es probable que esta bacteria, al ser estimulada por la aireación, haya utilizado la fuente primaria de carbono de los OC del suelo en sus procesos metabólicos, contribuyendo con la degradación de la molécula.

Tabla 28. Características morfológicas y taxonómicas (según API) de las bacterias al finalizar el tratamiento del suelo.

CEPA	DESCRIPCIÓN DE LA COLONIA		TAXONOMÍA
	Macro	Micro	
1f* (AN)	Pequeña, morada, convexa, redonda, brillante.	Bacilos Gram negativos.	Posibilidad de <i>Pseudomonas putida-fluorecens</i>
2f (RT1-RT2)	Pequeña, irregular, morada, brillante, plana.	Bacilos Gram negativos.	Posibilidad de <i>Achromobacter Xylooxidans</i>
3f (RT1-RT2)	Mediana, brillante, blanca, convexa, redonda.	Bacilos Gram positivos.	Posibilidad de <i>Bacillus sp.</i>
4f (RT1-RT2)	Grande, plana, blanca, irregular, opaca.	Bacilos Gram positivos	
5f (RT1)	Irregular, blanca, opaca, sobresaliente, mucoide.	Bacilos Gram positivos	Posibilidad de <i>Bacillus Subtilis</i>

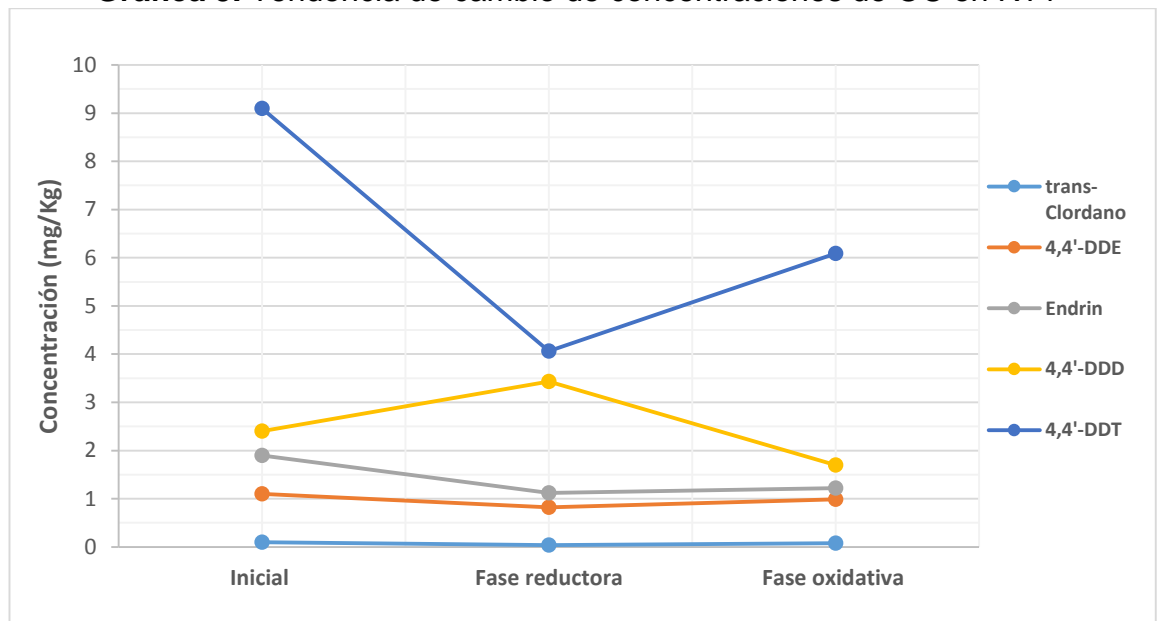
Fuente: Autora *f, final

Las imágenes de las cepas bacterianas identificadas y los test API aplicados en la muestra inicial del suelo, se muestran en los Anexo 3 y 4, respectivamente.

5.3.2 Análisis de remoción de organoclorados del suelo de interés

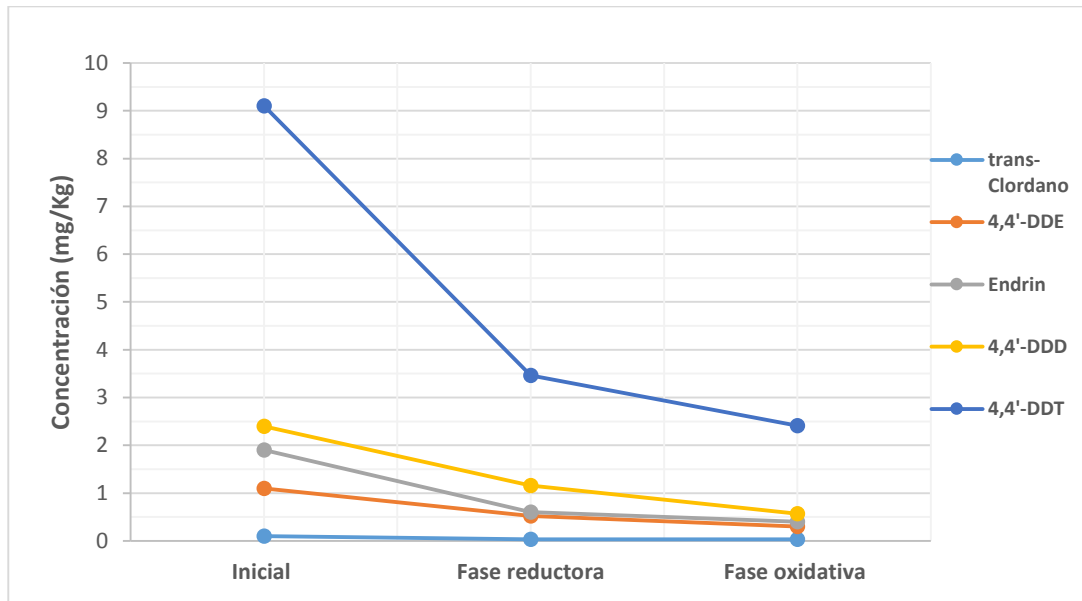
Con base a las concentraciones detectadas por el análisis de cromatografía de gases se analizaron las tendencias de remoción de OC del suelo de interés durante cada fase y en cada reactor. Las gráficas 5, 6 y 7, muestran la tendencia del cambio de las concentraciones de los OC a lo largo de cada fase, en los reactores RT1, RT2 y AN, respectivamente.

Gráfica 5. Tendencia de cambio de concentraciones de OC en RT1



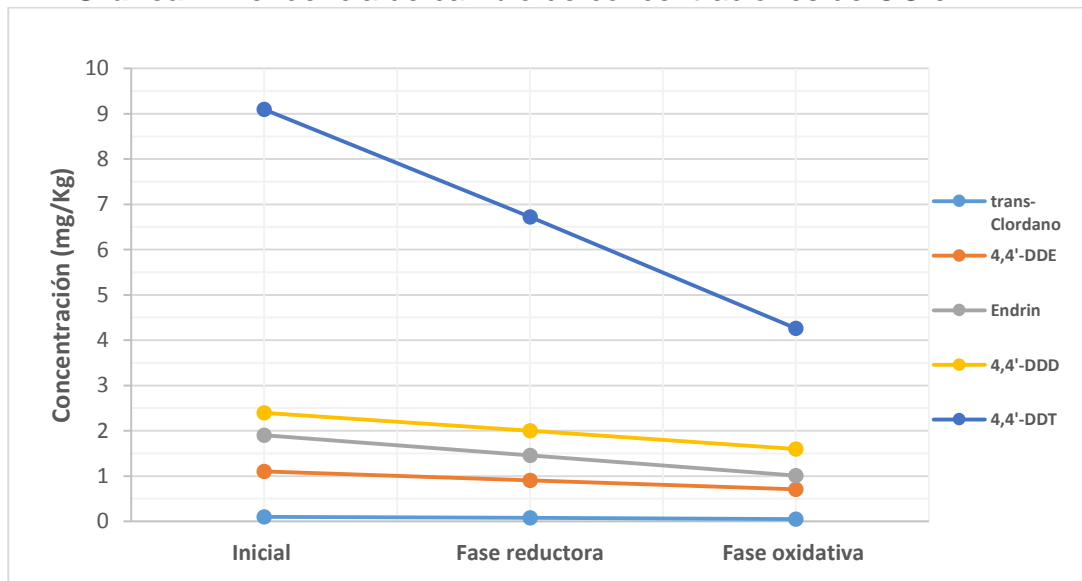
Fuente: Autora

Gráfica 6. Tendencia de cambio de concentraciones de OC en RT2



Fuente: Autora

Gráfica 7. Tendencia de cambio de concentraciones de OC en AN



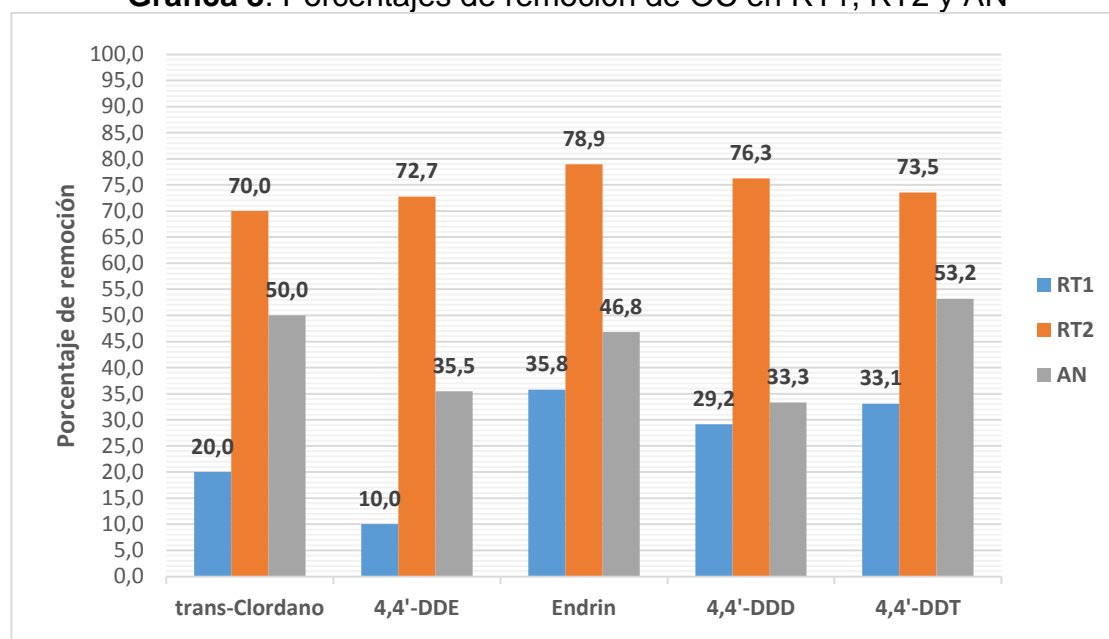
Fuente: Autora

En los RT1 (gráfica 5) se observa una tendencia de aumento en la concentración de DDT en la fase oxidativa. Este resultado puede indicar la eliminación de este compuesto de los poros del suelo y la posible reversibilidad de reacción sustentada en el numeral 5.2.3. Por su parte, la gráfica 6 muestra una tendencia de disminución de la concentración de todos los compuestos OC detectados por la cromatografía con respecto a la concentración inicial, en los RT2. Lo cual indica que el mayor tiempo de exposición a condiciones reductoras favorece la

deshalogenación de los OC. Los resultados obtenidos en los reactores AN, corroboran el potencial degradativo de las bacterias adaptadas a condiciones adversas. No obstante, se debe destacar la diferencia de condiciones climáticas del laboratorio donde se controló la humedad del suelo para favorecer el crecimiento de los microorganismos, en contraste con las severas condiciones de sequía en la zona contaminada (Ver numeral 4.1) (Corpocesar, 1995).

Finalmente, en la gráfica 8 se muestran los porcentajes de remoción de los compuestos OC detectados en el suelo de interés.

Gráfica 8. Porcentajes de remoción de OC en RT1, RT2 y AN



Fuente: Autora

Se destaca la remoción entre 70% y 78.9% de OC en el tratamiento correspondiente a los RT2, donde el tiempo de exposición a las condiciones reductoras fue de 80 días, seguido por 40 días de fase oxidativa. De igual manera se demuestra lo desfavorable que resulta un corto tiempo en la fase reductora (40 días) aplicados a los RT1. Por lo anterior se corrobora que esta etapa es crucial para la deshalogenación de los OC (Sims J. L. et al. 1991).

Aunque el resultado de la remoción de OC en el tratamiento por la Atenuación Natural (AN) parezca alentador, se deben considerar las diferencias de las condiciones de humedad que recibe el suelo tratado en el laboratorio en comparación con el mismo en campo.

6 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización fisicoquímica del suelo, dan un indicio del deterioro de sus propiedades. Aunque la textura del suelo se considera óptima para el crecimiento radicular, el valor de la D_a (1.604 g/cm^3) y porosidad total (23.45%) evidencian un grado de compactación ligera a mediana, las cuales, a su vez, ocasionan la retención del contaminante en los poros del suelo. Las concentraciones de Nitrógeno y Fósforo (1025.55 y 1.33 mg/Kg de suelo, respectivamente) revelan un suelo pobre en nutrientes esenciales, al igual que en intercambio de cationes ($17.6 \text{ meqg/100 g Suelo}$) y contenido de materia orgánica (1.08%).

El suelo analizado presenta un selecto grupo de bacterias adaptadas a las condiciones de contaminación por organoclorados, de las cuales se tienen referencias bibliográficas en cuanto al potencial degradativo de estos compuestos (Nawab et al. 2003, French, T. W. et al. 2002, Xiaomin, L. et al. 2015, Kumar et al. 2013, Li et al. 2009). Entre las que coinciden con la literatura fueron: *P. Putida*, *P. Fluorecens*, *B. Cepacia*, *E. Coli*, *Bacillus sp*, *A. Xylooxidans*, *B. Cepacia*.

El estiércol de vaca genera un ambiente reductor a partir de la digestión anaerobia. En promedio de 20 cm^3 de metano por día, por tanto en cada reactor la fase reductora se generó con la inyección de aproximadamente 120 cm^3 de metano.

La fase reductora resultó esencial en la degradación de los OC de suelo analizado. Esto corrobora lo expuesto en referencias bibliográficas anteriores, acerca de que dicha fase es crítica en un tratamiento redox para degradar este tipo de compuestos (Sims J. L. et al. 1991). Por su parte, se demostró que no es favorable para la degradación de OC, la exposición a un tiempo largo de la fase oxidativa (por aireación inducida) tras corto tiempo de la fase reductora.

La degradación de compuestos organoclorados manteniendo las condiciones naturales del suelo, es un proceso lento y tarda mucho tiempo en observarse

una disminución de la concentración. Por tanto, resulta favorable la estimulación de la microbiota mediante la generación de condiciones reductoras y oxidativas secuenciales para acelerar el proceso de biodegradación.

Los mayores porcentajes de remoción de organoclorados se obtuvieron en los RT2, que presentaba un mayor tiempo en condiciones reductoras (80 días) y menor en oxidativas (40 días). Se demostró que el alargamiento de la fase reductora favorece el metabolismo de las bacterias degradadoras, optimizando el proceso de deshalogenación de los OC.

7 RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar otro tipo de sustrato (o combinaciones de varios) para realizar el ensayo de AME, con el fin de optimizar las condiciones reductoras. Por otro lado, sería conveniente alargar la fase reductora y disminuir la fase oxidativa, tanto en el flujo de aire como en el tiempo de exposición a estas condiciones.

Se sugiere un estudio más profundo del consorcio bacteriano encontrado en el suelo, a través de un análisis molecular del material genético de la cepa.

Por último, al considerar la técnica de reducción-oxidación prometedora para la degradación de compuestos organoclorados del suelo, se recomienda su perfeccionamiento y aplicación al campo, ya que pese a que las condiciones climáticas presentadas en la zona tropical favorecen aún más la biodegradación de estos compuestos, este proceso no ha sido evaluado para su posible implementación en esta zona.

8 BIBLIOGRAFÍA

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, ATSDR. (1994). Clordan. *United States Department of Health and Human Service*. Obtenido de http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs31.pdf
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, ATSDR. (1997). Endrin. *Department of Health and Human Service*.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, ATSDR. (1997). Toxaphene. *Department of Health and Human Services*.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, ATSDR. (2005). Hexachlorocyclohexane. *Department of Health and Human Service*. Obtenido de http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts43.pdf
- AGUILAR MARTINEZ, J. (2007). *Determinación de pesticidas organoclorados en Cyprinus carpio Linnaeus, 1758 del lago de Tecocomolco*. Hidalgo, Estado de Hidalgo, México.
- AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. (30 de June de 2006). *Microbe Library*. Obtenido de <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/2878-bacterial-identification-by-the-analytical-profile-indexsystem-analytical-profile-index-e20-for-enterobacteriaceae>
- BAÑÓN BLÁZQUEZ, L., & BEVIÁ GARCÍA, J. F. (2000). *Manual de carreteras*. Alicante: Ortiz e Hijos, Contrastista de Obras, S.A., Vol. 2. ISBN 84-607-0123-9.
- BARBOSA AMAYA, H. F. (Agosto de 2011). *Remediación de Suelos*. Los Reyes, Estado de México, México.
- BARRIOS, M. (17 de marzo de 2013). En Codazzi solo quedan ruinas de la bonanza algodonera. *El Heraldo*, pág. 1.
- CAJIGAS, A., Á., TORRES, P., PÉREZ, A., JURADO, C., & ORTIZ, N. (2007). Selección de inóculos para el tratamiento anaerobio de aguas residuales en el proceso de extracción de almidón de yuca. *Redalyc.org*, 2-8.
- CASANOVA OLIVO, E. F. (2005). *Introducción a la ciencia del suelo*. Caracas, Venezuela: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.

- CORPOCESAR, & GEOSÍSMICA Y AMBIENTE. (1997). Estudio de diagnóstico y evaluación del enterramiento de pesticidas en el municipio de Agustín Codazzi y procedimiento de descontaminación y disposición final de los mismos. Valledupar, Cesar, Colombia.
- CORPORACIÓN COLOMBIANA DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA, CORPOICA. (2014). *Guía para la toma de muestras de suelo*.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, FAO. (2015). *Propiedades químicas*. Obtenido de Portal de Suelos: <http://www.fao.org/soils-portal/levantamiento-de-suelos/propiedades-del-suelo/propiedades-quimicas/es/>
- FRENCHA, T. W., BROWN, L. R., DOWNER, D. N., FREDRICKSON, H. L., & TEETER, C. L. (2002). Effects of n-hexadecane and PM-100 clay on trichloroethylene degradation by *Burkholderia cepacia*. *Science Direct*, 89-102.
- GAMBOA FUENTES, N. (2014). DDT, una revisión histórica. *Revista Química PUCP*, 10-13.
- GIBSON, S., & SUFLITA, J. (1986). *Extrapolation of biodegradation results to groundwater aquifers: Reductive*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:681-688.
- H., H. R., & CHAUHAN, J. B. (2012). Bioremediation of Organochlorine Pesticide-Endosulfan by a Soil Bacteria. *Samanthi Publications*, 1-4.
- HÄGGBLUM, M. M., AHN, Y.-B., E, F. D., KERKHOF, L. J., & RHEE, S.-K. (2003). Anaerobic Dehalogenation of Organohalide Contaminants in the Marine Environment. *Science Direct*, 61-84.
- INSTITUTO DE GEOLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES, IDEAM. (11 de julio de 2008) Atlas climatológico de Colombia.
- Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. (19 de Octubre de 1995). Resolución No. 3079. República de Colombia.
- JARAMILLO J., D. F. (25 de Septiembre de 2006). Introducción a la Ciencia del Suelo. Medellín, Antioquia, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- JARAMILLO, D. F. (2002). Introducción a la Ciencia del Suelo. Universidad Nacional de Colombia.

- KONGA, L., ZHUB, S., ZHUA, L., XIEA, H., SUA, K., YANA, T., . . . SUNA, F. (2013). Biodegradation of organochlorine pesticide endosulfan by bacterial strain *Alcaligenes faecalis* JBW4. *Science Direct*, 2257–2264.
- KUMAR CHAURASIAA, A., KUMAR ADHYAC, T., & KUMAR APTEA, S. (2013). Engineering bacteria for bioremediation of persistent organochlorine pesticide lindane (γ -hexachlorocyclohexane). *Science Direct*, 439-445.
- LABORATORIO CROMMAS (2015). Informe de resultados de Análisis de Cromatografía de Gases. *Universidad Industrial de Santander*, 1-5
- L. RITTER, K. S. (3 de December de 1995). A Review of Selected Persistent Organic Pollutants. Canadian Network of Toxicology Centres .
- LIB, W., DAID, Y., XUEE, B., LIF, Y., PENG, X., ZHANG, J., & YANA, Y. (2009). Biodegradation and detoxification of endosulfan in aqueous medium and soil by *Achromobacter xylosoxidans* strain CS5. *Science Direct*, 209-216.
- MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. (2004). Decreto 1443 . República de Colombia.
- MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL. (4 de Diciembre de 2006). Decreto No. 4368. República de Colombia.
- MÖRNER, J., BOS, R., & FREDRIX, M. (2002). Reducing and Eliminating the use of Persistent Organic Pesticides. *Guidance on alternative strategies for sustainable pest and vector management*. Geneva, Switzerland: UNEP, FAO and WHO.
- MURTHY, V. (June 26, 2009.). *Geotechnical Engineering: Principles and Practices of Soil Mechanics*. Second Edition (Civil and Environmental Engineering): Hardcover.
- NAWAB, A., ALEEM, A., & MALIK, A. (2003). Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to γ -HCH degradation by *Pseudomonas* strains. *Science Direct*, 41-46.
- NIETO, O. Z. (Julio de 2001). Fichas técnicas de plaguicidas a prohibir o restringir incluidos en el acuerdo No. 9 de la XVI Reunión del Sector Salud de Centroamérica y República Dominicana . San José, Costa Rica: Organización Mundial de la Salud, OMS.

- NUÑEZ SOLÍS, J. (1985). En *Fundamentos de Edafología* (págs. 67, 68). San José de Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.
- PORGRAMA INTERNACIONAL DE SEGURIDAD DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS, PISSQ. (1996). *Guía para la Salud y la Seguridad*. Metepec, México: Organización Mundial de la Salud.
- PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA . (22 de Julio de 1991). Decreto No. 1843 . República de Colombia.
- PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA. (2005). Decreto 4741. República de Colombia.
- PUJARI, S. (2015). *Types of Recalcitrant Xenobiotic Compounds*. Obtenido de Your Article Library: <http://www.yourarticlelibrary.com/biotechnology/types-of-recalcitrant-xenobiotic-compounds/33859/>
- RAMOS VÁSQUEZ, E., ZÚÑIGA DÁVILA, D. (2008). Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Redalyc.org*, 1-5.
- SIMS, J. L., RUSELL, H., & SUFLITA, J. M. (1991). Reductive Dehalogenation of Organic Contaminants in Soils and Ground Water. *EPA Ground Water Issue*, 1-12.
- THOMPSON, L. M., & TROEH, F. R. (2002.). *Los Suelos y su fertilidad*. Barcelona, España: Reverté.
- TIMLIN, D. J. (1999). Use of Brooks-Corey Parameters to Improve Estimates of Saturated Conductivity. *SOIL SCI. SOC. AM. J.*, VOL. 63, 2, 3, 4.
- TOLEDO MORÁN, B. K. (2009). *Aplicación de procesos biológicos como medida de remediación para recuperar suelos Limo-Arcillosos contaminados co Gasolina*. Guayaquil, Ecuador.
- TORRES LOZADA, P., & PÉREZ, A. (2010). ACTIVIDAD METANOGENICA ESPECÍFICA: UNA HERRAMIENTA DE CONTROL Y OPTIMIZACIÓN DE SISTEMAS DE TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES. *EIDENAR*, 1-3.
- U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, EPA. (December de 2003). Methodology for Deriving Ambient Water Quality Criteria for the Protection of Human Health. Washington D.C.: Office of Science and Technology.

- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, EPA. (February de 1997). *Bacillus subtilis Final Risk Assessment*. Obtenido de Biotechnology Program under the Toxic Substances Control Act (TSCA): http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, USDA. (February de 1987). Soil Mechanics Level 1. *Textural Soil Clasification*.
- VOLKE SEPÚLVEDA, T., & VELASCO TREJO, J. A. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. México D.F., México: INESEMARNAT.
- XIAOMIN, L., ZHONG, L., CHUNLING, L., JING, B., YINGTAO, S., & YONGTAO, L. (2015). Enhanced microbial degradation of pentachlorophenol from soil in the presence of earthworms: Evidence of functional bacteria using DNA-stable isotope probing. *Science Direct*, 168-177.

9 ANEXOS

ANEXO A. Estadística de las propiedades fisicoquímicas del suelo evaluado

PROPIEDAD	MEDIA	%ERROR	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Textura (arena) (%)	45,76	1,76	3,04841
Textura (arcilla) (%)	12,96	0,95443	1,65312
Textura (limo) (%)	41,28	1,89371	3,28
HV (%)	2,43	0,1202	0,20816
HG (%)	3,903	0,215	0,372335
Dr (g/cm3)	1,93	0,033	0,05773
Da (g/cm3)	1,6043	0,01163	0,020133
Pt (%)	23,45	2,43943	4,2252
pH	6,7433	0,01764	0,03055
Conductividad eléctrica (µs/cm)	204,5667	3,825	6,62520
CIC (meqg/100 g)	17,6	0,3055	0,52915

Fuente: Autora

ANEXO B. Cepas identificadas en la muestra inicial del suelo evaluado

Posibilidad de *Escherichia Coli*



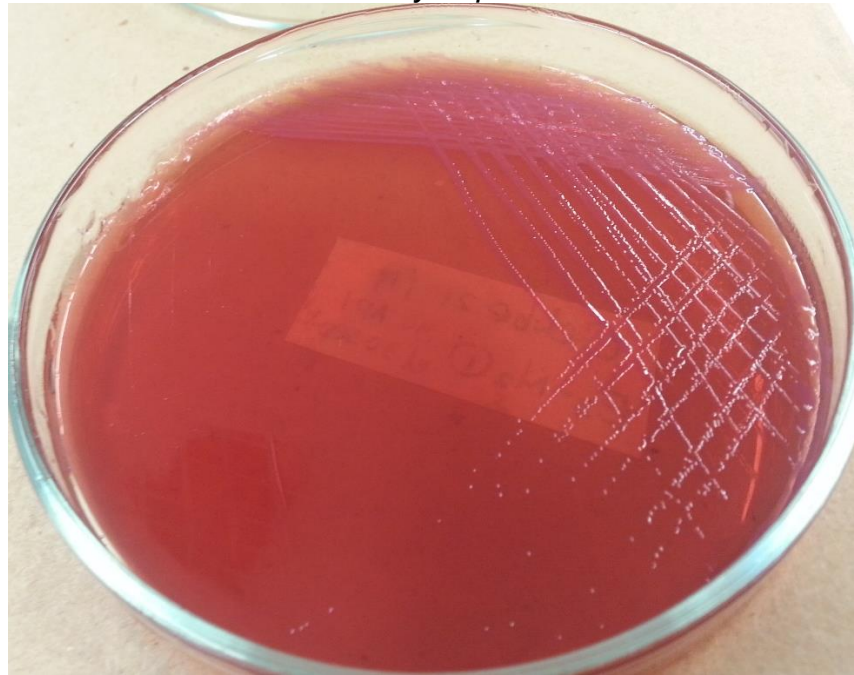
Fuente: Autora

Pseudomonas Putida



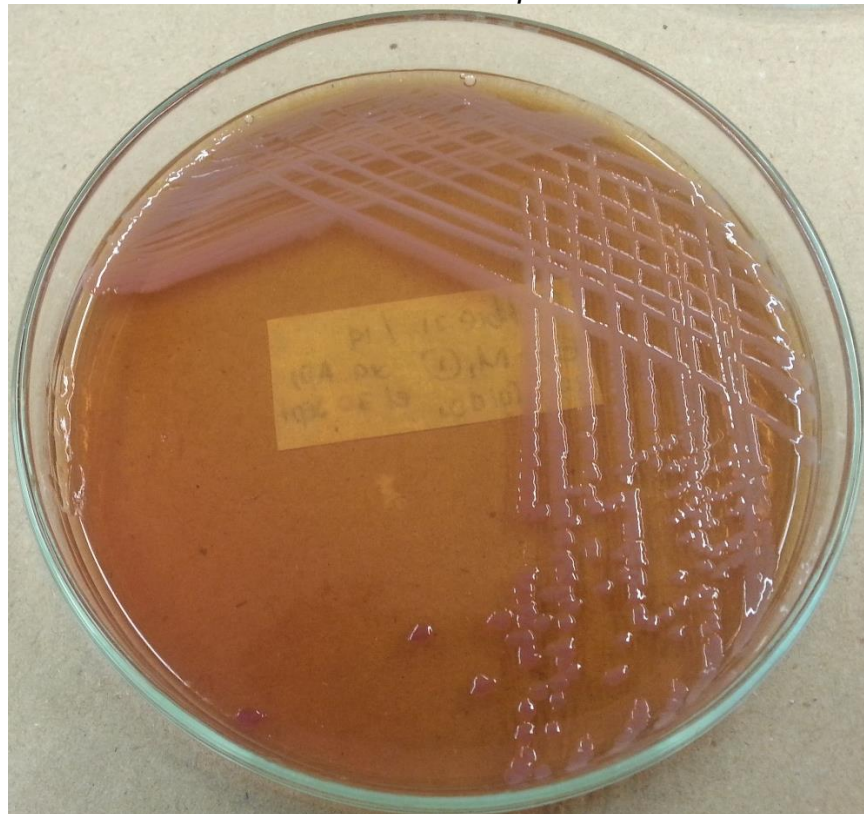
Fuente: Autora

Aeromonas Hydrophila Caviae



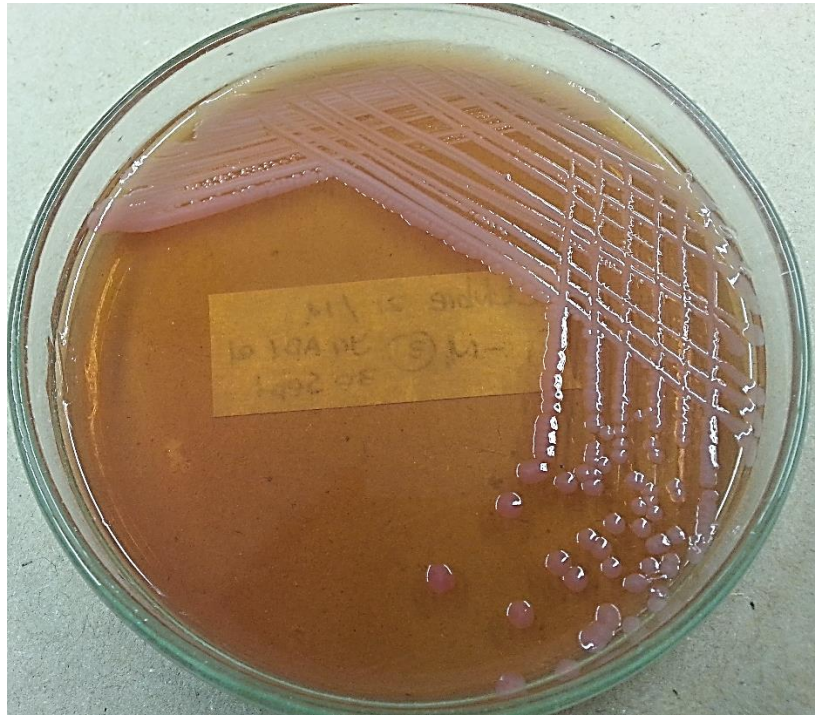
Fuente: Autora

Burkholderia Cepacia



Fuente: Autora

Pseudomonas Fluorecens



Fuente: Autora

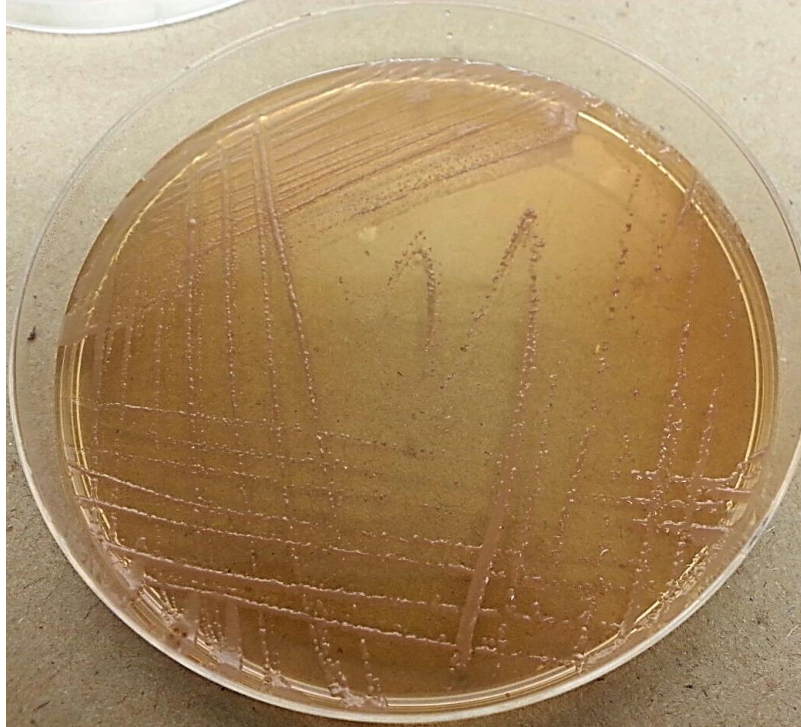
Bacillus Sp.



Fuente: Autora

ANEXO C. Cepas identificadas en las muestras finales del suelo evaluado

Achromobacter Xylooxidans



Fuente: Autora

Posibilidad de *Bacillus Subtilis*



Fuente: Autora

ANEXO D. Resultados test API® 20 NE a las cepas del suelo evaluado

Cepa: *Burkholderia Cepacia*



Fuente: Autora

Cepa: *Aeromonas Hydrophila Caviae*



Fuente: Autora

Cepa: *Pseudomonas Fluorecens*



Fuente: Autora

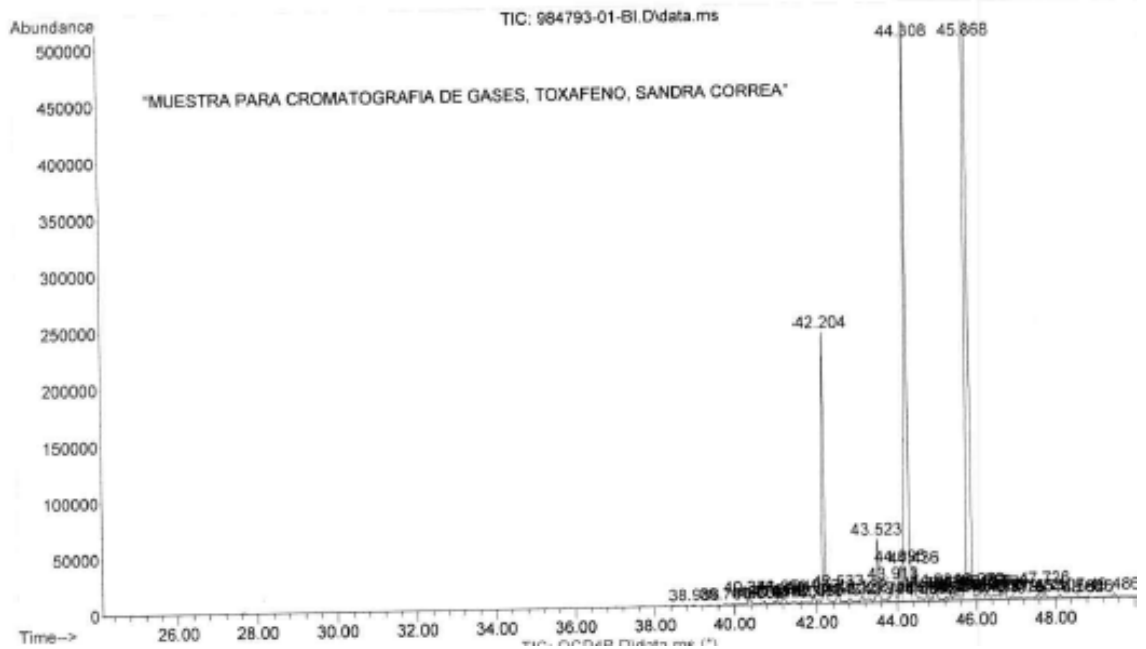
Cepa: *Achromobacter Xylooxidans*



Fuente: Autora

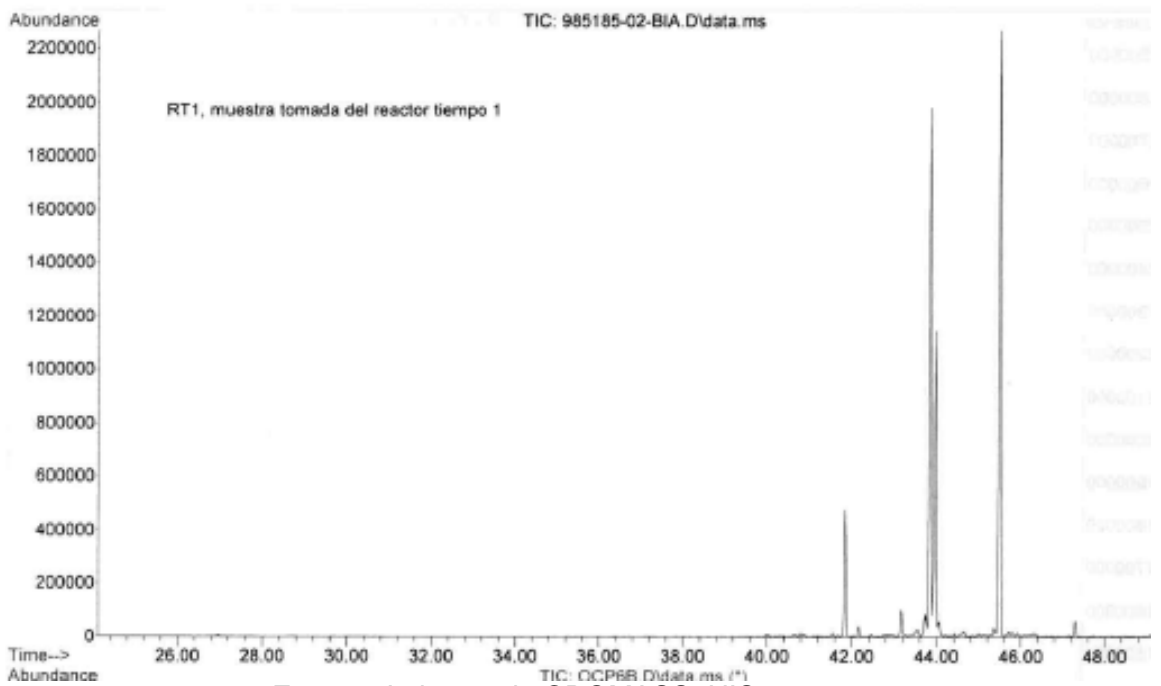
ANEXO E. Cromatogramas de las muestras de suelo evaluado

Muestra: Inicial, antes del tratamiento



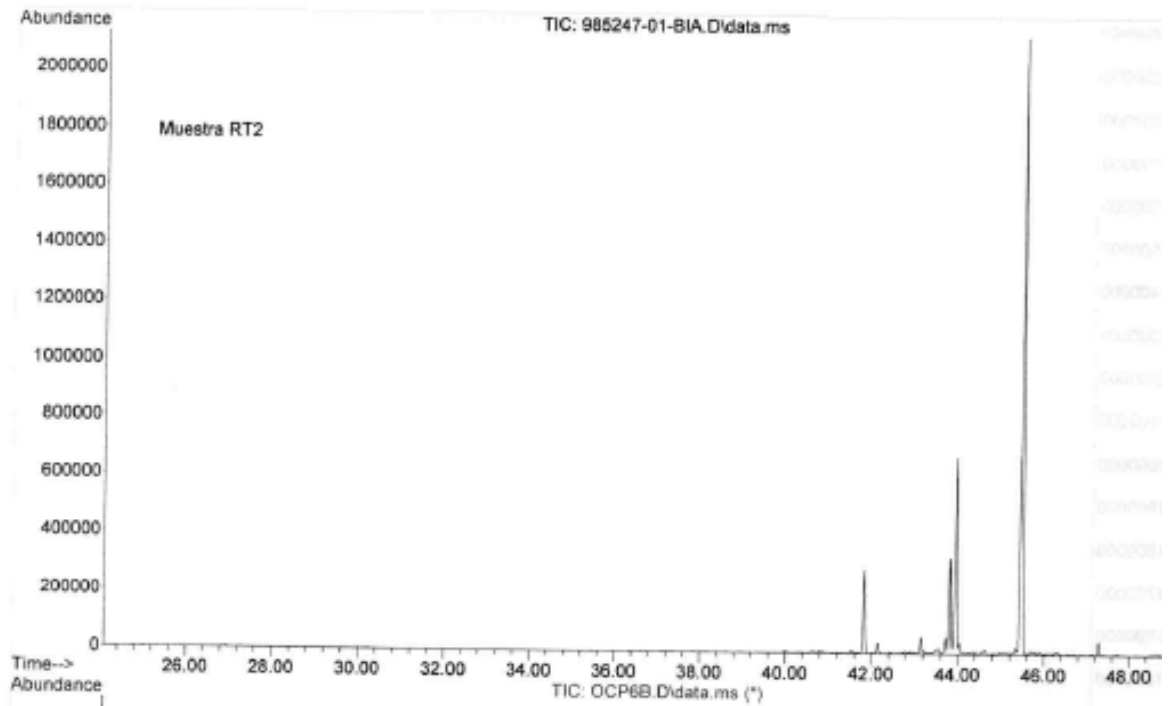
Fuente: Laboratorio CROMASS, UIS, 2015

Muestra: RT1, finalizada la fase reductora



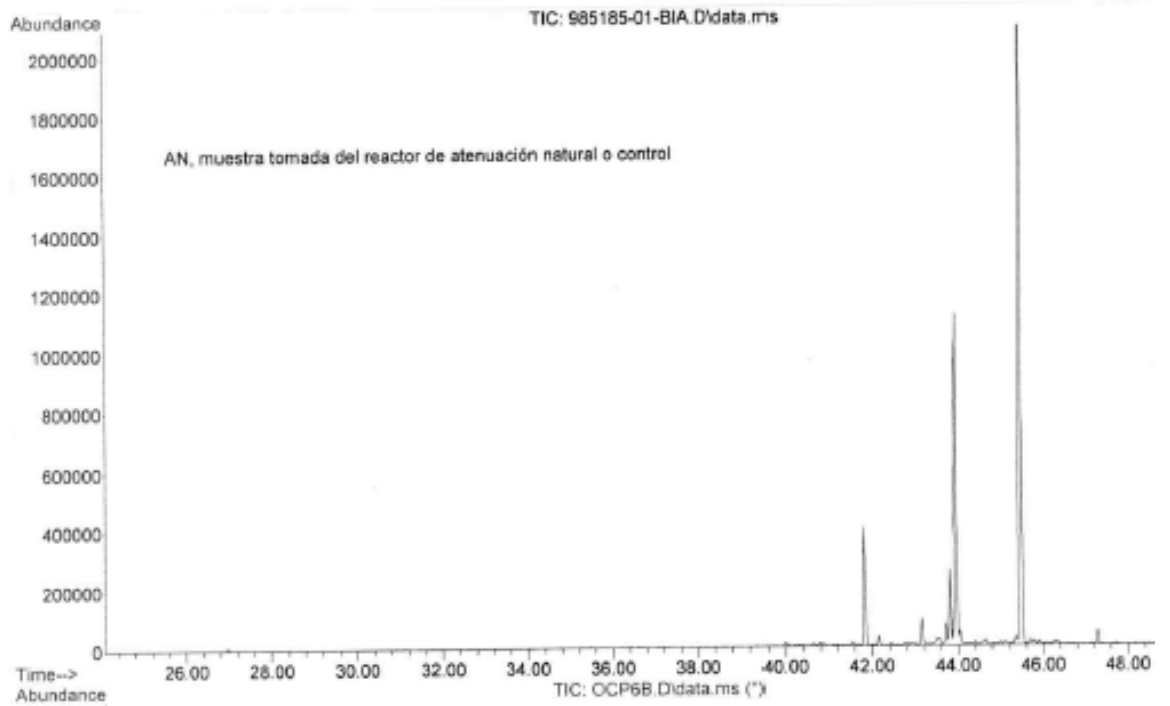
Fuente: Laboratorio CROMASS, UIS, 2015

Muestra: RT2, finalizada la fase reductora



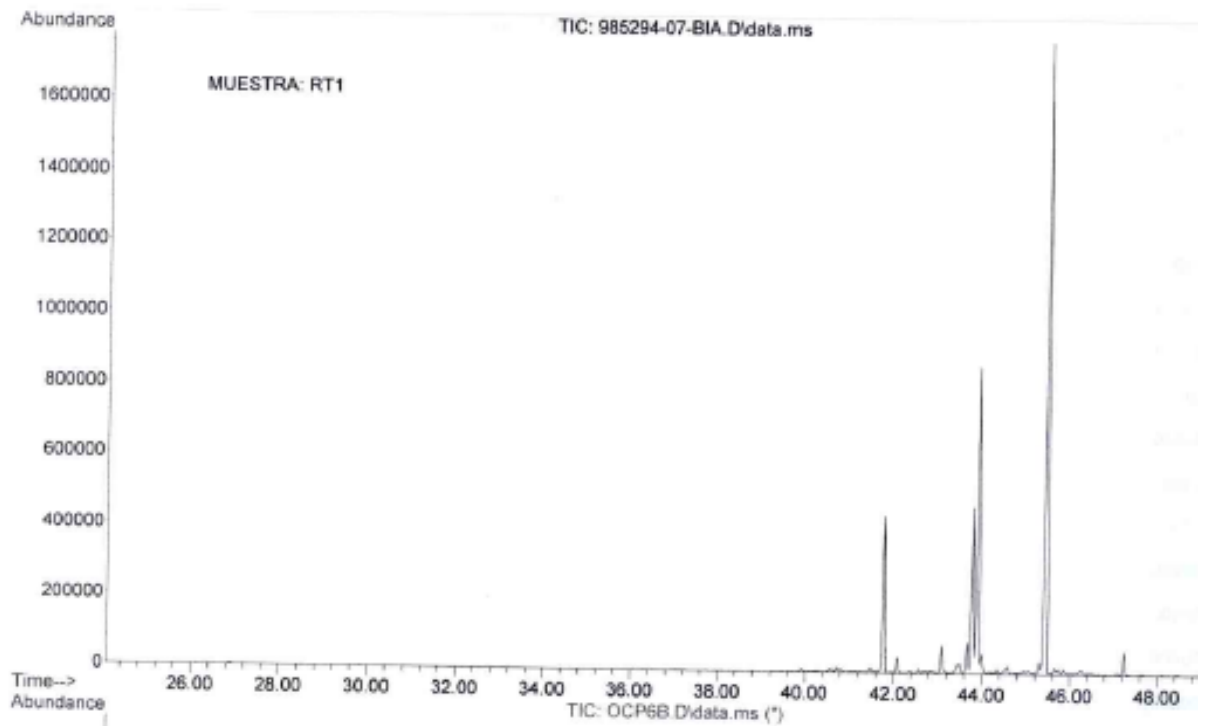
Fuente: Laboratorio CROMASS, UIS, 2015

Muestra: AN, finalizada la fase reductora



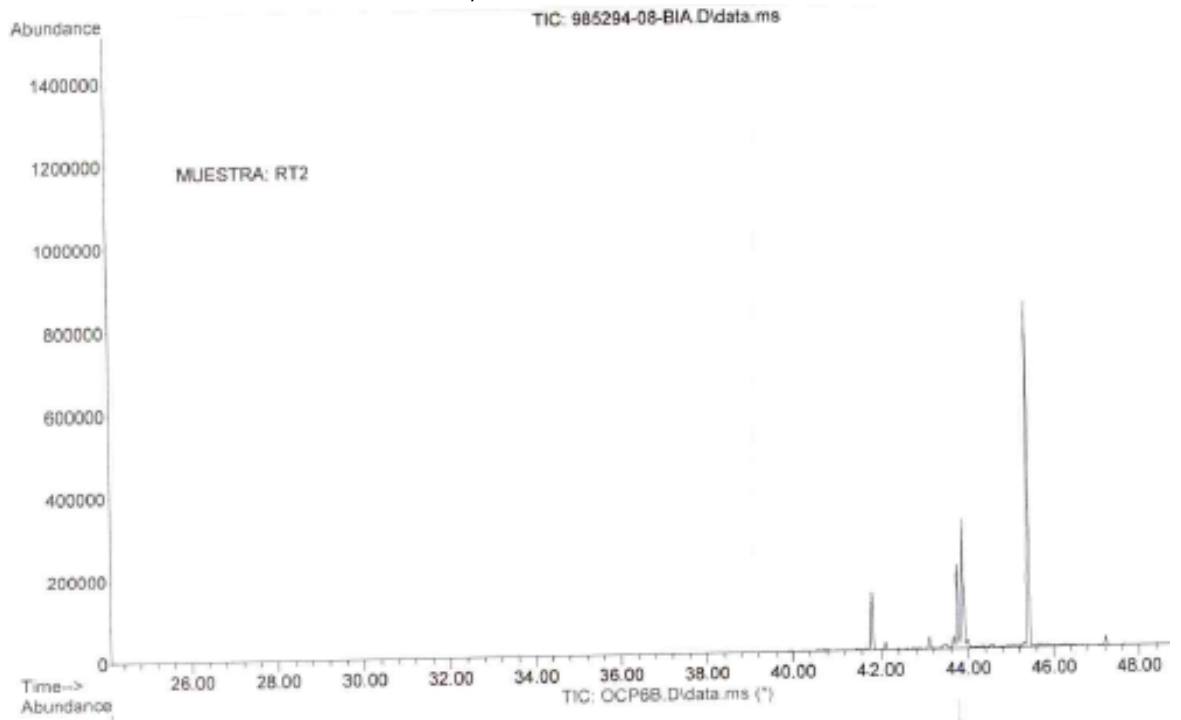
Fuente: Laboratorio CROMASS, UIS, 2015

Muestra: RT1, finalizada la fase oxidativa



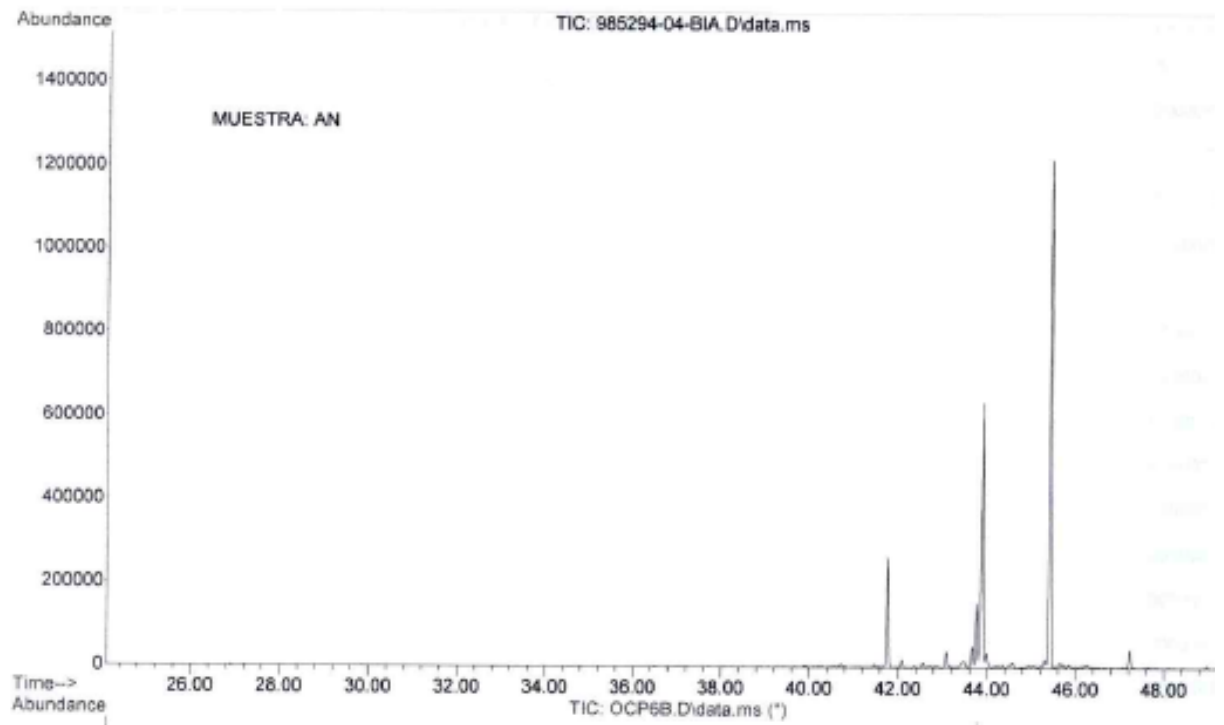
Fuente: Laboratorio CROMASS, UIS, 2015

Muestra: RT2, finalizada la fase oxidativa



Fuente: Laboratorio CROMASS, UIS, 2015

Muestra: AN, finalizada la fase oxidativa



Fuente: Laboratorio CROMASS, UIS, 2015