

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA BIODEGRADACIÓN DE PESTICIDAS
ORGANOCORADOS MEDIANTE LA ATENUACIÓN NATURAL,
BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN, EN UN SUELO CONTAMINADO
DEL MUNICIPIO DE AGUSTÍN CODAZZI CESAR, A ESCALA DE
LABORATORIO.**

MARTHA JHOANA ESTÉVEZ GÓMEZ

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA SECCIONAL BUCARAMANGA
ESCUELA DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
MARZO DE 2015**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA BIODEGRADACIÓN DE PESTICIDAS
ORGANOCORADOS MEDIANTE LA ATENUACIÓN NATURAL,
BIOAUMENTACIÓN Y BIOESTIMULACIÓN, EN UN SUELO CONTAMINADO
DEL MUNICIPIO DE AGUSTÍN CODAZZI CESAR, A ESCALA DE
LABORATORIO.**

MARTHA JHOANA ESTÉVEZ GÓMEZ

**Proyecto de grado como requisito para optar al título de Ingeniera
Ambiental**

**Directora:
PhD. MARIA KOPYTKO**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA SECCIONAL BUCARAMANGA
ESCUELA DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
MARZO DE 2015**

Nota de aceptación

Firma del Presidente del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Bucaramanga, Marzo de 2015

Dedicado a Dios, a mis padres, a mi hermana y a J.C.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios, quien me dio la oportunidad de poder formarme como Ingeniera Ambiental, quien me lleno de sabiduría para cumplir mis metas y me bendijo en cada paso que di en esta gran experiencia.

Gracias a Él, por darme unos padres ejemplares que me formaron en valores y han sido mí modelo a seguir, quienes siempre han puesto su confianza en mí y me han apoyado incondicionalmente. Ellos son el motor de mi vida, la razón de seguirlos llenando de alegría y orgullo.

A mi hermana, quien siempre ha sido mi compañía en los buenos y malos momentos, quien me comprende y me aconseja, con quien he crecido como persona y quien me llena de orgullo.

A Joseph Cubides, la persona con quien he compartido grandes experiencias, quien fue mi compañía en mi paso por la universidad, y me apoyó inmensamente. Agradezco su paciencia, comprensión y amor.

A Ángela Plata, por su compañía, sus sabios consejos, y su voz de aliento en los momentos difíciles. Gracias a ella por su apoyo y colaboración en la realización de mi investigación. Gracias por formar parte de mi formación y contribuir en ella.

A la PhD. María Kopytko, quien ha sido mi guía en este proceso, gracias por sus enseñanzas, conocimientos, su apoyo incondicional, su disponibilidad en todo momento, y por la confianza que siempre depositó en mí.

A la PhD. Sandra Correa por sus asesorías, sus conocimientos y su apoyo en la realización de la investigación.

A la Facultad de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad de Santander UDES, por sus valiosas asesorías en microbiología.

A todo el personal de los laboratorios, quienes siempre se mostraron atentos a solucionar cualquier inconveniente, quienes me brindaron su colaboración y servicio. Gracias a ellos por permitir facilitar el desarrollo mi investigación, en especial a Naidu Villamizar por su paciencia, sus conocimientos y apoyo.

A mis compañeros de carrera, quienes fueron pieza importante en este camino, gracias a ellos por contribuir en mi formación profesional y por llenarme de experiencias inolvidables.

A todos los docentes de la Universidad, quienes contribuyeron en mi formación profesional y personal, gracias a sus conocimientos y experiencias. Al Ing. Álvaro Cajigas por su colaboración en la realización de los montajes de la investigación y sus valiosos aportes.

Agradezco a todas aquellas personas que hicieron parte de este gran proceso, y quienes me ayudaron en la construcción de este sueño.

CONTENIDO

Pág.

INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS	17
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	17
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1 EL SUELO	18
2.1.1 Composición del suelo	18
2.2 PROPIEDADES FISICAS DEL SUELO.....	19
2.2.1 Textura.....	19
2.2.2 Color.....	20
2.2.3 Porosidad.	21
2.2.4 Humedad.....	21
2.2.5 Capacidad de campo.....	21
2.2.6 Densidad real.....	21
2.2.7 Densidad aparente.....	22
2.2.8 Estructura.	22
2.2.9 Permeabilidad.....	22
2.2.10 Infiltración.....	22
2.2.11 Conductividad hidráulica.....	22
2.3 PROPIEDADES QUIMICAS DEL SUELO.....	23
2.3.1 Capacidad de intercambio catiónico.	23
2.3.2 pH.....	23
2.3.3 Conductividad eléctrica.....	23
2.3.4 Carbono orgánico.....	23
2.3.5 Materia orgánica.....	24
2.3.6 Nutrientes.....	25

2.4	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL SUELO	25
2.4.1	Microbiología del suelo.....	25
2.4.2	Población Bacteriana del suelo.....	26
2.5	CONTAMINACIÓN DEL SUELO	27
2.5.1	Contaminación del suelo por compuestos orgánicos.....	28
2.6	BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS	30
2.6.1	Técnicas aplicadas para la Biorremediación de Suelos.	33
2.6.2	Biodegradación de Pesticidas Organoclorados.	34
3.	METODOLOGÍA	42
3.1	CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA INICIAL DEL SUELO CONTAMINADO CON PESTICIDAS ORGANOCORADOS.....	42
3.1.1	Caracterización fisicoquímica inicial del suelo contaminado con pesticidas organoclorados.....	42
3.1.2	Caracterización microbiológica inicial del suelo contaminado con pesticidas organoclorados.....	44
3.2	EVALUACIÓN DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.....	47
3.2.1	Evaluación de la bioestimulación como un método para la biodegradación de los pesticidas organoclorados en el suelo contaminado.....	51
3.2.2	Evaluación de la bioaumentación como una técnica para la eliminación de los pesticidas organoclorados en el suelo contaminado.....	51
3.3	DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE LOS PESTICIDAS ORGANOCORADOS Y EL CAMBIO DE LA MICROBIOTA, DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN EN LAS DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES	53
3.3.1	Variación de la concentración de los cloruros en el suelo durante el proceso de biorremediación.	53
3.3.2	Comparación del porcentaje de remoción de los compuestos organoclorados, durante el proceso de biorremediación.	53
3.3.3	Determinación del cambio de la población bacteriana durante el proceso de biorremediación.....	53
3.4	RESUMEN DE LA METODOLOGÍA	54
4.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	55
4.1	CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA INICIAL DEL SUELO CONTAMINADO CON PESTICIDAS ORGANOCORADOS.....	55
4.1.1	Caracterización fisicoquímica inicial del suelo contaminado con pesticidas organoclorados.....	55

4.1.2 Caracterización microbiológica inicial del suelo contaminado con pesticidas organoclorados.....	70
4.2 EVALUACIÓN DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN	74
4.2.1 Evaluación de la bioestimulación como un método para la biodegradación de los pesticidas organoclorados en el suelo contaminado.....	76
4.2.2 Evaluación de la bioaumentación como una técnica para la eliminación de los pesticidas organoclorados en el suelo contaminado.....	79
4.3 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE LOS PESTICIDAS ORGANOCORADOS Y EL CAMBIO DE LA MICROBIOTA, DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN EN LAS DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES	85
4.3.1 Variación de la concentración de los cloruros en el suelo durante el proceso de biorremediación.	85
4.3.2 Comparación del porcentaje de remoción de los compuestos organoclorados, durante el proceso de biorremediación.	86
4.3.3 Determinación del cambio de la población bacteriana durante el proceso de biorremediación.....	89
5. CONCLUSIONES	91
6. RECOMENDACIONES	92
7. BIBLIOGRAFÍA.....	93
ANEXOS.....	98

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Composición del suelo.....	19
Figura 2. Triángulo de texturas para la clasificación de suelos según la USDA.....	20
Figura 3. Pesticidas clorados típicos muy utilizados en el pasado.	29
Figura 4. Método de siembra por extensión para recuento en placa.....	31
Figura 5. Método de siembra por vertido en placa para recuento.....	32
Figura 6. Método de Miles y Misra para recuento en placa.....	32
Figura 7. Procedimiento para obtener diluciones seriadas para realizar recuento en placa.....	33
Figura 8. Deshalogenación reductora de compuestos organoclorados	35
Figura 9. Ruta de degradación anaerobia del DDT.	37
Figura 10. Degradación aerobia de los pesticidas organoclorados.	38
Figura 11. Ruta de degradación aerobia del DDT.	39
Figura 12. Curva de patrones para la detección de pesticidas organoclorados Part N° OCP508-1JM.	43
Figura 13. Resultados correspondientes a pruebas negativas y positivas del API 20 NE.....	47
Figura 14. Condiciones experimentales para la biorremediación del suelo.....	48
Figura 15. Montaje experimental de la biorremediación bajo condiciones anaerobias.....	49
Figura 16. Montaje experimental de la biorremediación bajo condiciones aerobias....	50
Figura 17. Procedimiento Pruebas de Compatibilidad de cepas.....	52
Figura 18. Resumen de la metodología.....	54
Figura 19. Recipientes utilizados en la biorremediación.....	75
Figura 20. Consorcio microbiano para bioaumentación.....	80
Figura 21. Prueba de compatibilidad de cepas.	81
Figura 22. Bioaumentación de consorcio bacteriano.	82

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Propiedades de la materia orgánica y los efectos asociados en el suelo.....	24
Tabla 2. Proporciones relativas de géneros bacterianos aerobios y anaerobios facultativos encontrados en suelos.	27
Tabla 3. Clasificación de los pesticidas organoclorados según su estructura química.	29
Tabla 4. Caracterización fisicoquímica del suelo.	44
Tabla 5. Especificaciones técnicas Shaker.	46
Tabla 6. Especificaciones técnicas Air Blower.....	50
Tabla 7. Resultados lecturas del hidrómetro para la determinación de la textura por el método de Bouyoucos.....	55
Tabla 8. Determinación de la textura por el método de Bouyoucos.....	56
Tabla 9. Porcentajes tamizado para la determinación de la granulometría del suelo. .	56
Tabla 10. Determinación del pH en el suelo.	58
Tabla 11. Determinación de la Conductividad Eléctrica.	59
Tabla 12. Determinación de la densidad real en el suelo.	59
Tabla 13. Determinación de la densidad aparente.....	60
Tabla 14. Determinación del contenido de Humedad (Método Gravimétrico).	61
Tabla 15. Determinación de la capacidad de campo.....	61
Tabla 16. Determinación del Carbono Orgánico y Materia Orgánica.....	65
Tabla 17. Interpretación de resultados de Carbono Orgánico.....	65
Tabla 18. Interpretación de resultados de Materia Orgánica.....	65
Tabla 19. Interpretación de resultados de Materia Orgánica.....	65
Tabla 20. Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).....	66
Tabla 21. Determinación de Nitrógeno total, Nitrógeno orgánico y Fósforo.	66
Tabla 22. Interpretación de resultados de Nitrógeno.....	67
Tabla 23. Interpretación de resultados de Fósforo.....	67
Tabla 24. Determinación inicial de los Cloruros en el suelo.	67
Tabla 25. Determinación inicial de los Pesticidas Organoclorados en el suelo.	68
Tabla 26. Resumen de la caracterización fisicoquímica del suelo.	69
Tabla 27. Caracterización macroscópica de cepas aisladas.....	71
Tabla 28. Caracterización microscópica de cepas aisladas.	72
Tabla 29. Identificación bioquímica a través de API 20NE de cepas aisladas.	73
Tabla 30. Posible taxonomía según bibliografía de las cepas aisladas no identificadas por API 20 NE.....	74
Tabla 31. Condiciones de riego en la fase anaerobia.	75

Tabla 32. Condiciones de riego en la fase aerobia.....	76
Tabla 33. Contenido de Carbono, Nitrógeno, y Fósforo en el suelo.	76
Tabla 34. Identificación microbiológica.	90

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Curva de granulometría del suelo	57
Gráfica 2. Curva de Pérdida de Humedad diaria en condiciones anaerobias.....	63
Gráfica 3. Curva de contenido de agua por kilogramo de suelo, versus el porcentaje de humedad gravimétrica en condiciones anaerobias.....	63
Gráfica 4. Curva de Pérdida de Humedad en condiciones aerobias.....	64
Gráfica 5. Curva de contenido de agua por kilogramo de suelo, versus el porcentaje de humedad gravimétrica en condiciones aerobias.....	64
Gráfica 6. Comportamiento de los Cloruro en el suelo durante la bioestimulación.....	77
Gráfica 7. Determinación de los pesticidas organoclorados durante la bioestimulación.....	78
Gráfica 8. Comportamiento de los Cloruro en el suelo durante la bioaumentación.....	83
Gráfica 9. Determinación de los Pesticidas organoclorados durante la bioaumentación.....	84
Gráfica 10. Variación de los cloruros en suelo durante la biorremediación.....	85
Gráfica 11. Remociones de los pesticidas organoclorados durante las primeras 8 semanas (Fase anaerobia).....	86
Gráfica 12. Variación del DDT durante la biorremediación.....	87
Gráfica 13. Variación del DDD durante la biorremediación.....	88
Gráfica 14. Variación del DDE durante la biorremediación.....	88

LISTA DE ANEXOS

Pág.

Anexo A. Análisis estadístico de los resultados de la caracterización fisicoquímica del suelo evaluado.....	98
Anexo B. Análisis químicos nitrógeno orgánico, nitrógeno total, fósforo total y carbono orgánico total.	99
Anexo C. Resultados de los análisis de la concentración de los cloruros en el suelo evaluado	101
Anexo D. Resultados de los análisis de los pesticidas organoclorados en el suelo evaluado	103
Anexo E. Tabla de tests y reacciones del API 20 NE.....	108
Anexo F. Resultados de los recuentos bacterianos en el suelo evaluado.....	109
Anexo G. Aislamiento e identificación de cepas	111

RESUMEN GENERAL DE TRABAJO DE GRADO

TITULO: Estudio comparativo de la biodegradación de pesticidas organoclorados mediante la atenuación natural, bioaumentación y bioestimulación, en un suelo contaminado del municipio de Agustín Codazzi Cesar, a escala de laboratorio.

AUTOR(ES): Martha Jhoana Estévez Gómez

FACULTAD: Facultad de Ingeniería Ambiental

DIRECTOR(A): María Irena Kopytko

RESUMEN

Este estudio evaluó cuatro condiciones experimentales, para la degradación de pesticidas organoclorados (DDT, DDD y DDE) de un suelo procedente del municipio de Agustín Codazzi, Cesar, cuya contaminación se produjo hace décadas. Los tratamientos de bioestimulación, bioaumentación y un control de procesos, se llevaron a cabo bajo condiciones anaerobias y aerobias secuenciales, en comparación con la biorremediación natural del suelo, conocida como atenuación natural. El proceso de biorecuperación tuvo una duración de 13 semanas, 8 bajo condiciones anaerobias y 5 en ambientes aerobios. La bioestimulación consistió en la adición de nutrientes para optimizar la relación C: N: P del suelo. En la bioaumentación se realizó una caracterización microbiológica para identificar bacterias nativas con potencial para degradar los compuestos organoclorados. Se estableció un consorcio bacteriano conformado por cuatro cepas, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas caviae*, y *Bacillus sp*, que fue bioaumentado en el laboratorio e inoculado al suelo a una concentración de 108ufc/ml. Durante la biorremediación se realizaron riegos para mantener la humedad entre el 50 y 70% de la capacidad de campo del suelo, mediante un sistema de microaspersión por gravedad. Se determinó la concentración de DDT, DDD y DDE mediante cromatografía de gases, y se cuantificó el aumento de los iones cloruros en el suelo, como evidencia de la deshalogenación de los pesticidas organoclorados. Los mejores resultados se obtuvieron durante la fase anaerobia, por la deshalogenación reductora de los compuestos organoclorados, siendo la bioaumentación la más efectiva por la remoción del DDT, DDD y DDE en un 56.2, 17.1 y 44.5 % respectivamente. Además, en la bioaumentación se evidenció la adaptación de las cepas inoculadas, a partir del seguimiento hecho mediante recuentos de células viables. Las dos fases reportaron un aumento en los cloruros del suelo, comprobando la degradación de los pesticidas por pérdida de sus halógenos.

PALABRAS CLAVES: Pesticidas organoclorados, biorremediación, DDT, DDD, DDE, bioaumentación, bioestimulación, deshalogenación reductora.

GENERAL SUMMARY OF WORK OF GRADE

- TITLE:** Comparative study of the Organochlorines Pesticides through natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation in a contaminated soil in the municipality of Agustín Codazzi Cesar, a laboratory scale.
- AUTHOR(S):** Martha Jhoana Estévez Gómez
- FACULTY:** Facultad de Ingeniería Ambiental
- DIRECTOR:** María Irena Kopytko

ABSTRACT

This study evaluated four experimental conditions for degradation of organochlorine pesticides (DDT, DDD and DDE) of soil from the municipality of Agustín Codazzi, Cesar, whose contamination occurred decades ago. Biostimulation, bioaugmentation and processcontrol treatments were carried out under anaerobic and aerobic sequential conditions compared with the natural bioremediation of soil, known as natural attenuation. The bioremediation process lasted 13 weeks, 8 under anaerobic conditions and 5 in aerobic environments. Biostimulation consisted of the addition of nutrients to optimize the C: N: P soil. In the bioaugmentation a microbiological characterization was performed, and the native bacteria with potential to degrade organochlorines were identified. . A bacterial consortium of four strains *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromona caviae*, and *Bacillus sp*, which was bioaugmented in the laboratory and inoculated at soil with a concentration of 108ufc / ml was established. During the bioremediation irrigations were made to keep the moisture between 50 and 70% of field capacity of the soil, through a system of microaspersión by gravity. The concentration of DDT, DDD and DDE was determined by gas chromatography, and the increase of chloride ions in the soil was measured as evidence of the dehalogenation of organochlorines. The best results were obtained during the anaerobic phase for the reductive dehalogenation of organochlorines, being the bioaugmentation the most effective for the removal of DDT, DDD and DDE at 56.2, 17.1 and 44.5% respectively. Furthermore, in the bioaugmentation the adaptation of inoculated strains was evident, from the monitoring made by viable counts. The two phases reported increased soil chlorides, checking the pesticide degradation through loss of halogen.

KEYWORDS:

Organochlorine pesticides, bioremediation, DDT, DDD, DDE, bioaugmentation, biostimulation, reductive dehalogenation.

INTRODUCCIÓN

Los Pesticidas Organoclorados forman parte de los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) debido a su estabilidad, lenta biodegradación y bioacumulación en los tejidos grasos. La producción y uso intensivo de estos compuestos inició en los años 30, y actualmente muchos de ellos están prohibidos, sin embargo, siguen manifiestos en el ambiente dada sus características de persistencia y uso en países menos desarrollados.

En Colombia, a mediados de los 70 y con 60 mil hectáreas de campo forradas de blanco, el Municipio de Agustín Codazzi se convirtió en el principal productor de algodón del país. Pero llegó la crisis y todo el dinamismo económico se vino a pique, debido principalmente, a problemáticas relacionadas con el fenómeno de El Niño, la apertura de la economía, el recrudecimiento de la violencia y la aparición de cultivos ilegales a pocos kilómetros de allí.

El proceso empleado hasta los años 90, correspondía a una agricultura extensiva, determinada por la utilización indiscriminada de insumos químicos para el desarrollo de los monocultivos. Esto provocó la degradación del suelo y la pérdida de miles de hectáreas ahora infértiles, además de las consecuencias que se han desarrollado a causa también de los agroquímicos que fueron enterrados en zonas aledañas.

Como consecuencia de esto, la Corporación Autónoma Regional del Cesar (CORPOCESAR) ha realizado estudios que muestran la presencia de gran cantidad de pesticidas enterrados, y a los que se les atribuye la responsabilidad de los casos de cáncer y otras enfermedades presentadas en la región.

Dadas las consecuencias en el medio ambiente y en la salud humana que ha traído consigo la contaminación de terrenos a gran escala, como efecto directo del desarrollo de nuestra sociedad; surge la necesidad de proponer métodos de *biorecuperación* de suelos para su restauración a través de la acción de los microorganismos, los cuales suponen un tratamiento económico y eficiente, desde el punto de vista ambiental.

Por lo anterior, este proyecto pretende estudiar la aceleración de la biodegradación de los pesticidas organoclorados, través de diferentes condiciones experimentales que promueven la estimulación de los microorganismos nativos en la recuperación del suelo contaminado.

Las técnicas utilizadas en la investigación, se fundamentan en la implementación de condiciones anaerobias (reductoras) y aerobias (oxidativas) secuencialmente. Esta sucesión facilita la biodegradación de los compuestos orgánicos altamente clorados y persistentes que se encuentran en el suelo de interés.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio comparativo de la biodegradación de pesticidas organoclorados mediante la atenuación natural, bioaumentación y bioestimulación, en un suelo contaminado procedente del municipio de Agustín Codazzi, Cesar, a escala de laboratorio.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar la caracterización fisicoquímica y microbiológica inicial del suelo contaminado con Pesticidas Organoclorados, procedentes del municipio Agustín Codazzi, Cesar.
- Evaluar la Bioestimulación como un método para la biodegradación de los Pesticidas Organoclorados en el suelo contaminado de la zona de interés.
- Estimar la efectividad de la técnica de bioaumentación para la eliminación de los Pesticidas Organoclorados del suelo contaminado, objeto de estudio.
- Comparar el porcentaje de remoción de los Pesticidas Organoclorados y el cambio de la microbiota, durante el proceso de biorremediación, mediante la atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación.

2. MARCO TEÓRICO

Los problemas de contaminación de suelos y aguas subterráneas a gran escala, son consecuencia directa del desarrollo de nuestra moderna sociedad industrializada. Desde 1900, la producción de compuesto químicos orgánicos se ha incrementado excesivamente (Eweis et al., 1999).

A comienzos del siglo XX los compuestos químicos empleados en la agricultura eran obtenidos principalmente por residuos animales y vegetales, y a partir de minerales. Hoy en día, se emplean una gran variedad de compuestos derivados del petróleo como pesticidas y herbicidas. Compuestos altamente tóxicos que ocasionan la alteración del equilibrio de especies de fauna y flora, así como consecuencias en la salud humana (Eweis *et al.*, 1999).

2.1 EL SUELO

El suelo es la interface en donde interactúan la atmosfera, litosfera, hidrosfera y biosfera. Proporciona soporte físico y nutriente para el crecimiento de las plantas y los microorganismos.

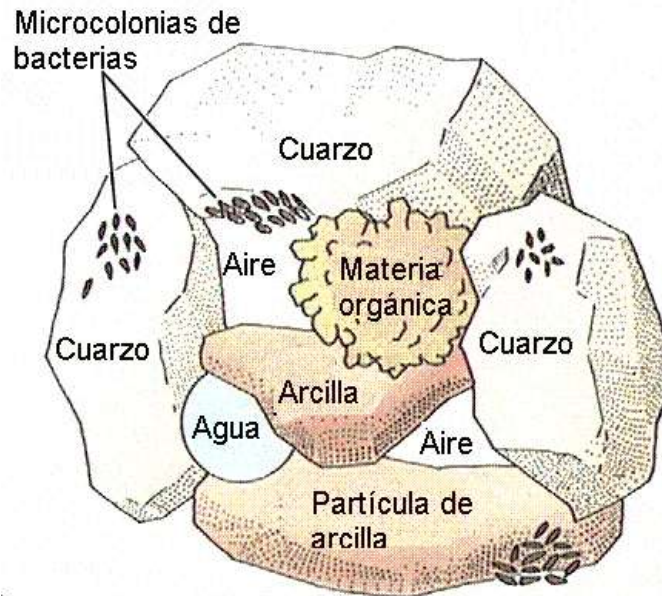
Los suelos son sistemas ecológicos dinámicos que proporcionan los requisitos esenciales para la vida de las plantas y de todos los ecosistemas terrestres incluyendo una gran población de microorganismos; ofreciendo nutrientes, agua (H₂O), oxígeno (O₂), y soporte. El suelo también es necesario para sostener la vida humana, ya que proporciona los recursos naturales, el sitio y soporte para las viviendas y carreteras; y actúa como un medio de reciclaje o desintoxicante de materiales de desecho que se producen diariamente, para la protección de las aguas subterráneas por el filtrado de químicos y tóxicos (Pierzynski *et al.*, 2005).

Existe una gran variedad de microorganismos (bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoos) que están presentes en los suelos, pero las densidades de población de éstos varían considerablemente. Los microorganismos contribuyen en gran manera a la fertilidad de los suelos, es decir, a su capacidad para sostener el crecimiento vegetal (Atlas y Bartha, 2002).

2.1.1 Composición del suelo. Los suelos, por lo general, están compuestos por cinco componentes: minerales, aire, agua, materia orgánica y organismos vivos (Figura 1). Los materiales minerales constituyen los principales componentes estructurales del suelo y suponen más del 50% del volumen total. El aire y el agua en conjunto, constituyen el volumen de poros que, generalmente ocupan

entre el 25 y 50% del volumen total. Sin embargo, la proporción aire-agua varía ampliamente con la humedad del suelo. Por su parte, la materia orgánica oscila entre el 3 y 6% del volumen; mientras que los organismos vivos ocupan menos del 1% (Eweis *et al.*, 1999).

Figura 1. Composición del suelo.



Fuente: ATLAS, Ronald y BARTHA, Richard. Ecología microbiana y Microbiología ambiental, 2002.

Las propiedades físicas y químicas de los suelos influyen en gran manera sobre la aireación, la disponibilidad de nutrientes y la retención de agua, y por lo tanto, en la actividad biológica.

2.2 PROPIEDADES FÍSICAS DEL SUELO

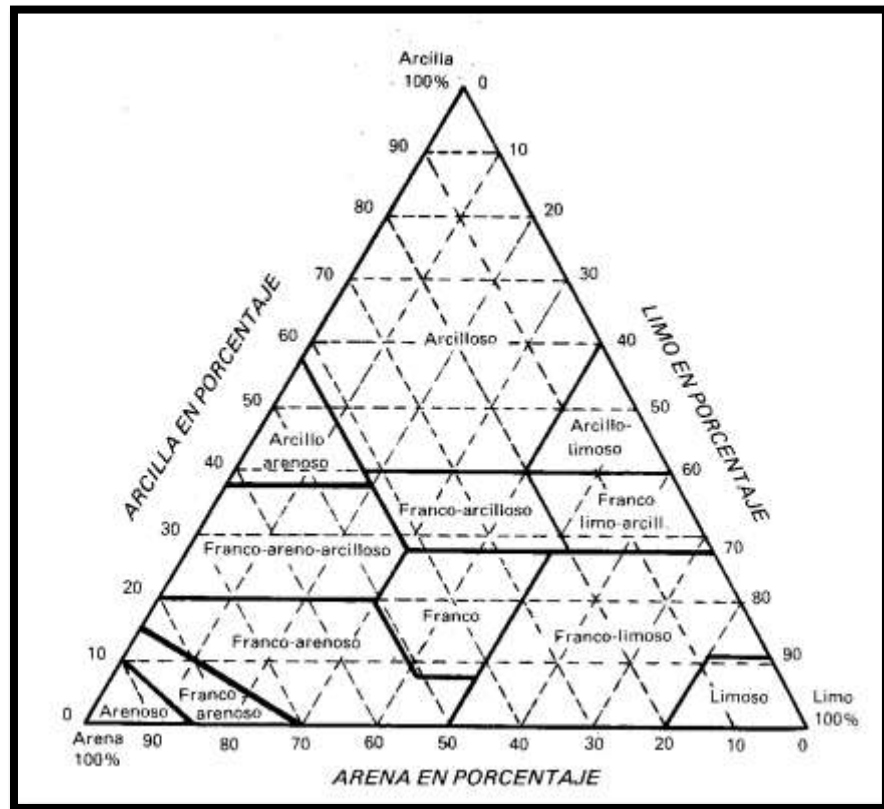
Algunas de las propiedades del suelo que se describen en esta sección, tienen gran importancia en los procesos de biodegradación así como en la presencia de diferentes tipos de microorganismos.

2.2.1 Textura. Establece las relaciones de arena, limo y arcilla presentes en el suelo. Esta composición influye en la aireación, movimiento del agua, retención de humedad, retención y liberación de iones, disponibilidad de nutrientes y por ende su productividad, uso y manejo (Mirsal, 2008).

Con la ayuda del diagrama triangular de clasificación de un suelo del departamento de Agricultura de los EE.UU (Figura 2), y de la proporción relativa

de las partículas, puede determinarse el tipo y la clase textural del suelo (Atlas y Bartha, 2002).

Figura 2. Triángulo de texturas para la clasificación de suelos según la USDA.



Fuente: ATLAS, Ronald y BARTHA, Richard. Ecología microbiana y Microbiología ambiental, 2002.

La proporción en que se encuentren los diferentes tamaños o tipos de partículas del suelo, constituyen una propiedad importante para la ecología de los microorganismos, ya que determina el área de la superficie disponible como hábitat para el crecimiento de los microorganismos en el suelo. Los suelos con mayor composición en arcilla ofrecen mayor área de superficie disponible que aquellos en los que predominan las partículas de arena, cuyo tamaño es mayor que las partículas de arcilla (Atlas y Bartha, 2002).

2.2.2 Color. Es una característica muy notoria del suelo, y se relaciona directamente con los componentes sólidos del mismo. Además, ésta característica ayuda a identificar el efecto de algunos procesos pedogenéticos y se relaciona con la composición de suelo.

El típico color oscuro de muchos suelos es causado por la materia orgánica; parámetro que permite predecir a simple vista, su estado y calidad.

El color del suelo puede determinarse mediante espectrofotómetros, pero para fines prácticos, se emplea un catálogo de colores conocido como "La tabla de colores Munsell" mediante comparación con el suelo en estudio (Mirsal, 2008).

2.2.3 Porosidad. Hace referencia al volumen o espacio disponible en el suelo para la fase líquida y gaseosa, es decir, al espacio que no está ocupado por sólidos. Esta característica dependerá de la textura, contenido de materia orgánica y la estructura del suelo, pudiéndose presentar micro o macroporosidad. Los macroporos permiten un drenaje rápido y mejor aireación en el suelo. Los microporos, por su parte, favorecen el almacenamiento de agua así como de los contaminantes (Mirsal, 2008).

En términos de volumen, los suelos minerales tienen aproximadamente un 35-55% de espacio poroso, mientras que los suelos orgánicos 80-90% de espacio de poros. Pero el espacio total de poros del suelo puede variar considerablemente por una variedad de razones, incluyendo la mineralogía del suelo, la densidad aparente, el contenido de materia orgánica, y la perturbación. Suelos de textura arenosa, a pesar de tener un tamaño de poros mayor, tienden a tener menos espacio total de poros que en los suelos arcillosos. Aunque el espacio poroso total es importante, esencialmente es el tamaño, la forma y la interconexión de los poros del suelo que son la clave para determinar la habitabilidad del suelo, porque ellos controlan directamente las relaciones de aireación del suelo y del agua; esto es en gran medida una función de la textura y estructura del suelo (Paul, 2007).

2.2.4 Humedad. La humedad hace referencia a la cantidad de agua que posee el suelo, y está directamente influenciada por la textura, contenido de materia orgánica, fracción mineral y orgánica, aporte natural o artificial de agua y el gasto por evapotranspiración en el suelo. Suelos arcillosos y/o con altos contenidos de materia orgánica, presenta una mayor humedad.

La humedad de un suelo influye en gran medida en la actividad biológica. El agua es el componente principal del protoplasma bacteriano y un suministro adecuado de agua resulta fundamental para el crecimiento y la estabilidad microbiana. Se ha reportado que la actividad microbiana procede de manera óptima en la presencia de entre 50 y 70% de humedad a capacidad de campo (Betancourt, 2013). Un suelo con una humedad baja da lugar a una disminución en la actividad microbiana. Sin embargo, una humedad muy alta inhibe el intercambio de gases y el movimiento del oxígeno a través del suelo, provocando la eliminación de bacterias aerobias y por ende, el aumento de microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos (Eweis *et al.*, 1999).

2.2.5 Capacidad de campo. Es una propiedad asociada a la humedad del suelo, pues se refiere a la cantidad de agua retenida en el suelo, luego de que sus macroporos han drenado completamente. Se llega a esta condición de humedad después de dejar drenar el suelo saturado (después de lluvia o riego), entre 48 y 72 horas; el agua en esta condición está retenida a tensiones comprendidas entre -0.1 y -0.3 atm (Eweis *et al.*, 1999).

La capacidad de campo de un suelo oscila normalmente entre el 18 y 30% en peso y es función del contenido de arcilla (Eweis *et al.*, 1999).

2.2.6 Densidad real. Corresponde al peso de las partículas sólidas del suelo, en relación con el volumen que éstas ocupan, sin tener en cuenta el volumen ocupado por los poros.

La densidad real del suelo es la masa de una partícula por volumen (mg/m^3 o g/cm^3); el volumen ocupado por los poros y el peso del agua no está incluido en la medición. La densidad real de los suelos varía, por lo general, entre 2,60 y 2,75 g/cm^3 , con un valor medio de 2.65 g/cm^3 (Pierzynski *et al.*, 2005).

2.2.7 Densidad aparente. Contrario a la densidad real, la densidad aparente corresponde al peso de las partículas sólidas del suelo, en relación con el volumen de la muestra inalterada, es decir, teniendo en cuenta el volumen que es ocupado por los poros (aire y agua). La densidad aparente es una medida dada en masa por volumen

La densidad aparente resulta útil para estimar el tipo de minerales presentes en el suelo y el grado de compactación de éste.

La densidad aparente es una medida dada en masa por volumen (mg/m^3 o g/cm^3) de un suelo. Los suelos, por lo general, tienen densidades aparentes entre 1,0 g/cm^3 y 1.8 g/cm^3 . Los suelos con densidades altas (por ejemplo, 2,0 g/cm^3) probablemente tendrán una permeabilidad e infiltración del agua lenta, lo cual puede resultar en encharcamiento o escorrentía superficial, y causar una reducción en el crecimiento de las raíces de las plantas y un limitado flujo o intercambio de gas (O_2) (Pierzynski *et al.*, 2005).

2.2.8 Estructura. Corresponde a la unión de las partículas del suelo (arena, limo y arcilla), para formar agregados o unidades estructurales. La estructura es una propiedad genética del suelo y se describe a partir del tipo, clase y grado de desarrollo (Mirsal, 2008).

La estructura afecta en gran medida a las propiedades mecánicas del suelo, principalmente al movimiento de fluidos, incluidas la infiltración, la retención de agua y la aireación. Suelos cuyas partículas están sueltas y no adheridas entre sí, tales como los depósitos no consolidados de polvo del desierto, se definen como carentes de estructura o poseedores de una estructura de grano simple. Mientras que suelos con partículas estrechamente unidas, frecuentemente se definen como poseedores de estructura en masa (Eweis *et al.*, 1999).

2.2.9 Permeabilidad. Es la facilidad con que cualquier fluido pasa a través del suelo. Está directamente relacionada con la textura, estructura y porosidad del suelo.

Suelos arcillosos y/o con altos contenidos de materia orgánica, mejoran las propiedades de retención de agua y aumenta la permeabilidad, favoreciendo la actividad biológica del suelo.

2.2.10 Infiltración. Propiedad del suelo que evalúa la velocidad de entrada del agua al suelo. Se ve afectada por el contenido de humedad, la permeabilidad y tipo de poros, homogeneidad del perfil, presencia de materiales hidrofóbicos en el suelo y el tiempo que tarda el suministro de agua (Mirsal, 2008).

2.2.11 Conductividad hidráulica. Indica las posibilidades que tiene el agua para moverse al interior del suelo, más conocida como conductividad hidráulica. Ésta depende del contenido de humedad y el tamaño de poros, y obtiene valores

máximos cuando el suelo se encuentra saturado debido a que todos los poros se encuentran llenos de agua y actúan como conductores (Mirsal, 2008).

2.3 PROPIEDADES QUÍMICAS DEL SUELO

Los contenidos de arcilla y materia orgánica son los principales factores que contribuyen a las reacciones químicas en los suelos, en procesos que incluyen la retención de agua, intercambio catiónico y aniónico, la sorción de compuestos inorgánicos y orgánicos, amortiguamiento de pH, así como la creación de numerosas interacciones físicas, químicas y biológicas del suelo, que son esenciales para la fertilidad, estructura y calidad ambiental de los suelos (Pierzynski *et al.*, 2005).

2.3.1 Capacidad de intercambio catiónico. Es aquella capacidad que posee un suelo para adsorber e intercambiar cationes y es equivalente a la carga negativa presente por las partículas de arcilla y la materia orgánica. Mediante esta propiedad, se definen la cantidad de sitios disponibles para almacenar cationes en el suelo. Los cationes más importantes en los procesos de intercambio catiónico son Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , y Na^{2+} (bases del suelo) y NH_4^+ (en suelos ácidos) (Mirsal, 2008).

2.3.2 pH. El pH del suelo es la medida de la concentración de iones H^+ en la solución que se halla en los poros del suelo, la cual se encuentra en equilibrio con las superficies cargadas negativamente de las partículas que lo conforman. En suelos, el pH es el parámetro químico más importante, ya que puede intervenir tanto en la disponibilidad de ciertos nutrientes y por tanto en el desarrollo de organismos vivos en el suelo (Mirsal, 2008).

2.3.3 Conductividad eléctrica. La conductividad eléctrica indica la cantidad de sales presentes en el suelo en mezcla agua-suelo. Generalmente los suelos contienen sales, las cuales son esenciales para el crecimiento de las plantas, sin embargo, un exceso de éstas inhiben el crecimiento. El exceso de sales puede darse de forma natural por composición original del suelo, o como resultado del uso y manejo de éste (USDA, 1999).

La conductividad eléctrica detecta la cantidad de cationes o aniones (sales) en el suelo. Los iones asociados con salinidad son Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ , Na^+ , H^+ (cationes), o NO_3^- , SO_4^- , Cl^- , HCO_3^- , OH^- (aniones) (USDA, 1999).

2.3.4 Carbono orgánico. Es el conjunto de todas las formas bajo las que se presenta el carbono, es decir, el carbono total del suelo. No obstante, este análisis se refiere únicamente a la fracción oxidable. La importancia de este Carbono está dada por su influencia directa e indirecta en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Jaramillo, 2002).

2.3.5 Materia orgánica. Está constituida por los desechos de origen animal y vegetal, que contienen sustancias químicas que contribuyen a mejorar la composición del suelo. Algunos de los beneficios que trae consigo el contenido de materia orgánica en el suelo son: reducir la escorrentía superficial y la erosión; favorecer el factor de agregación en el suelo; mejorar la capacidad de retención de humedad; actuar como depósito de nutrientes, fuente de energía y alimento para los microorganismos; ayudar a la solubilización de nutrientes y mejorar la capacidad de intercambio catiónico.

La materia orgánica desempeña un papel importante en la dinámica química de los suelos. Está compuesta por una mezcla muy compleja de compuestos de C que también contienen nitrógeno (N), azufre (S), y fósforo (P). Las propiedades de la materia orgánica y su efecto en los suelos se observan en la Tabla 1 (Pierzynski *et al.*, 2005).

Tabla 1. Propiedades de la materia orgánica y los efectos asociados en el suelo.

PROPIEDAD	OBSERVACIONES	EFFECTOS EN EL SUELO
Color	El típico color oscuro de muchos suelos es causado por la materia orgánica.	Puede facilitar el calentamiento
Retención de agua	La materia orgánica puede contener hasta 20 veces su peso en agua.	Mejora las propiedades de retención de agua, principalmente en suelos arenosos.
Combinación con minerales de arcilla	Formación de unidades estructurales llamados agregados.	Permite el intercambio de gases; estabiliza la estructura; aumenta la permeabilidad.
Quelación	Forma complejos estables con Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , y otros cationes polivalentes.	Mejora la disponibilidad de nutrientes para las plantas superiores.
Solubilidad en agua	La insolubilidad de la materia orgánica es debido a su asociación con la arcilla.	No ocurre pérdida de materia orgánica por lixiviación.
Acción Buffer	Efecto buffer en rangos ligeramente ácidos, neutros y alcalinos.	Ayuda a mantener uniforme el pH del suelo.
Intercambio catiónico	La acidez total de la materia orgánica va desde 300 a 1400 cmol/kg.	Incrementa la capacidad de intercambio catiónico del suelo
Mineralización	Descomposición de los productos de la materia orgánica CO_2 , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , y SO_4^{2-} .	Fuente de nutrientes para el crecimiento de las plantas.
Combinación con xenobióticos	Afecta la persistencia y biodegradabilidad de los pesticidas.	Fuerte afinidad a la materia orgánica, aumenta persistencia y acumulación en el suelo.

Fuente: PIERZYNSKI, Gray M; THOMAS SIMS, J y VANCE, George F. Soils and Environmental Quality, 2005.

2.3.6 Nutrientes. Los nutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos son: C, N, P, K, S, Fe, Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, Mb, Na y Co. Todos a excepción del C, N y P, se requieren en pequeñas cantidades y generalmente se encuentran en concentraciones suficientes en el suelo. Por su parte, el nitrógeno y fósforo en el suelo son factores que limitan el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos, en procesos de biorremediación (Ríos, 2005).

La adición del nitrógeno con respecto a la fuente de carbono en un sistema, determina la relación C: N como un balance o ajuste de requerimientos nutricionales que permite orientar el metabolismo. En biorremediación la relación C: N se ha utilizado para el manejo de las concentraciones de nutrientes que permite mantener un proceso de biodegradación eficiente (Alexander, 1994).

En procesos de biorremediación, se sugiere establecer la adición de fuentes de nitrógeno y fósforo, permitiendo así, compensar desbalance de la relación C: N: P causado por el exceso de carbono proveniente de los compuestos orgánicos contaminantes y favoreciendo su biodegradación (Ríos, 2005).

2.4 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DEL SUELO

Las plantas, animales y microorganismos juegan un papel importante en la formación de los suelos y en sus características físicas, químicas y biológicas. Las comunidades biológicas varían de un suelo a otro y van desde las raíces de las plantas, roedores, gusanos e insectos, los cuales son visibles al ojo, hasta los microorganismos (bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoos), que requieren el uso del microscopio para verlos.

Los organismos que habitan en los suelos se pueden agrupar en dos grandes categorías. Los *autótrofos*, que asimilan el Carbono del CO₂ y obtienen energía de la luz solar o por medio de la oxidación de compuestos inorgánicos, y los *heterótrofos*, que utilizan Carbono orgánico como fuente de energía y Carbono primario. Los autótrofos se consideran productores debido a su capacidad de convertir el CO₂ y la energía del sol en productos de Carbono orgánico, en un proceso denominado fotosíntesis. Sólo las plantas vasculares, algunas bacterias y algas se consideran productores. Los heterótrofos, por el contrario, se consideran consumidores y descomponedores. A esta última categoría pertenecen los animales del suelo y la mayoría de los microorganismos (Pierzynski *et al.*, 2005).

2.4.1 Microbiología del suelo. Los microorganismos del suelo incluyen bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoos (Pierzynski *et al.*, 2005).

El crecimiento microbiano más significativo se desarrolla en las superficies de las partículas del suelo. Un pequeño agregado del suelo puede manifestar muchos microambientes diferentes, lo cual favorece el desarrollo de una gran variedad de tipos de microorganismos (Madigan *et al.*, 2009).

Uno de los principales factores que alteran la actividad microbiana del suelo es la disponibilidad de agua, pues el agua es un elemento muy variable que depende de la composición del suelo, de la lluvia, permeabilidad e infiltración (drenaje) y de la cubierta vegetal del suelo. Otro de los factores que intervienen es la cantidad de recursos presente, pues gran parte del dinamismo microbiano se desarrolla en las capas de la superficie ricas en materia orgánica (Madigan *et al.*, 2009).

La cantidad de microbiota presente en el suelo, está relacionada en gran medida por el tipo de nutrientes presentes y su abundancia; pues en muchas ocasiones el nutriente limitante en los suelos no es el carbono, sino los nutrientes inorgánicos como el nitrógeno y fósforo (Madigan *et al.*, 2009).

La actividad microbiana se puede dividir en real y potencial. La primera significa que los microorganismos se desarrollan cuando las condiciones necesarias para su metabolismo no son óptimas, como ocurre en el campo abierto. Por su parte, la actividad potencial hace referencia a la función metabólica, incluidas las acciones enzimáticas que los microorganismos del suelo son capaces de desarrollar bajo condiciones óptimas de temperatura, humedad, nutrientes y sustratos (Benedetti y Dilly, 2006).

2.4.2 Población Bacteriana del suelo. Las bacterias son los microorganismos más numerosos del suelo, y las células bacterianas son las más pequeñas y difíciles de ver bajo el microscopio (Pierzynski *et al.*, 2005).

El número de bacterias y la presencia de especies dominantes presentes en el suelo dependen de las características del suelo y los ambientes específicos. Las bacterias son un grupo enormemente diverso y son los degradadores primarios de compuestos orgánicos naturales y xenobióticos depositados en el suelo. Algunas especies son degradadoras primarias, es decir, son las que inician la degradación de la materia orgánica del suelo; otras especies se desarrollan gracias a la presencia de compuestos resultantes de la degradación parcial de productos orgánicos complejos (Eweis *et al.*, 1999).

La capacidad de las bacterias para reproducirse rápidamente y adaptarse a nuevas condiciones ambientales resulta importante para la descomposición y transformación de productos naturales y antropogénicos. Algunas de las funciones que realizan o participan las bacterias incluyen el ciclo de nutrientes, la descomposición de materia orgánica, fijación de Nitrógeno, y reacciones de óxido-reducción.

La Tabla 2, muestra las proporciones relativas de géneros bacterianos encontrados en suelos.

Tabla 2. Proporciones relativas de géneros bacterianos aerobios y anaerobios facultativos encontrados en suelos.

Género	Porcentaje
Arthrobacter	5 – 60
Bacillus	7 – 67
Pseudomonas	3 – 15
Agrobacterium	1 – 20
Alcaligenes	1 – 20
Flavobacterium	1 – 20
Corynebacterium	2 – 12
Micrococcus	2 – 10
Staphylococcus	< 5
Xanthomonas	< 5
Mycobacterium	< 5

Fuente: ATLAS, Ronald y BARTHA, Richard. Ecología microbiana y Microbiología ambiental, 2002.

2.5 CONTAMINACIÓN DEL SUELO

“La contaminación hace referencia al resultado de una acción que modifica las características naturales del medio” (Navarrete, 1995).

La contaminación se produce cuando grandes cantidades de sustancias o productos indeseados y potencialmente tóxicos son dispuestos en el suelo intencionalmente, acumuladas en depósitos de almacenamiento subterráneo que con el tiempo pueden desarrollar fugas, o enterrados en terrenos privados para evadir la responsabilidad de estos desechos peligrosos (Eweis *et al.*, 1999).

La polución del suelo es producto del desarrollo de la humanidad y resultante de actividades antrópicas como los derrames de contaminantes, descarte o eliminación de productos químicos, o el uso excesivo de pesticidas y fertilizantes que además, pueden resultar en el agua superficial o en el agua subterránea y causar daños a los seres humanos y demás seres vivos. Existen también otros signos de degradación causados por la contaminación del suelo tales como la erosión, la compactación, y la salinización. Los suelos frecuentemente han sido deteriorados debido a que son usados como vertederos para la eliminación de desechos químicos y materiales peligrosos. Aunque la mayoría de los suelos pueden considerarse como un sistema depurador, en cierto grado (dependiendo las características propias del suelo), de muchos contaminantes a través de procesos bióticos y abióticos, existen límites en la capacidad de un suelo para aceptar los desechos y productos

tóxicos, sin algún efecto negativo sobre el medio ambiente (Pierzynski *et al.*, 2005).

Eweis *et al* 1999, clasifican los principales tipos de contaminación de suelo, entre los que se incluyen los compuestos orgánicos de la agricultura, provenientes de industrias manufactureras, distribuidores de compuestos químicos, granjas, aeropuertos destinados a vuelos de fumigación.

2.5.1 Contaminación del suelo por compuestos orgánicos. Los compuestos orgánicos responsables de la contaminación del suelo, tienen su origen en los sectores industrial, municipal y agrícola. En el primero, se generan contaminantes orgánicos producto de la extracción y procesado de materias primas (minerales y combustibles), y en la producción y transformación de materiales y productos químicos. El sector municipal, por su parte, genera desechos (sólidos y líquidos) de carácter doméstico, industrial y hospitalario, con alta carga orgánica y deficiencias en remoción por parte de los tratamientos. Finalmente, el sector agrícola representa un foco de contaminación importante para el suelo, debido al empleo masivo e incontrolado de plaguicidas para el control de insectos, malezas y enfermedades en los cultivos, así como la aplicación de fertilizantes químicos y la disposición inadecuada de residuos y embalajes de los productos empleados (Navarrete, 1995).

Entre los compuestos orgánicos que contribuyen a la contaminación del suelo se encuentran los hidrocarburos (petróleo, combustibles), compuestos alifáticos halogenados, y aromáticos halogenados (pesticidas, disolventes) (Rittmann y McCarty, 2001).

2.5.1.1 Pesticidas. Los pesticidas son sustancias destinadas a combatir agentes u organismos nocivos para las plantas y cultivos, prevenir su proliferación y desarrollo (Navarrete, 1995).

Los pesticidas se pueden clasificar según su uso, grado de peligrosidad capacidad de producir efectos secundarios, organismos que controlan, y composición química. Según ésta última, se encuentran: Pesticidas inorgánicos; Extractos vegetales; Organoclorados, Organofosforados; Carbamatos; Organomercuriales; Derivados del fenol; Ácidos Orgánicos; Derivados de la urea; Derivados de la amida; Otros (Navarrete, 1995).

❖ **Pesticidas Organoclorados.** Los pesticidas organoclorados son compuestos químicos orgánicos en donde algunos o la totalidad de sus átomos de hidrógeno se substituyen por cloro. Se dividen en naturales y sintéticos. Dentro de los pesticidas orgánicos sintéticos se encuentran los *organoclorados*. La Tabla 3 muestra la clasificación de los pesticidas organoclorados según su estructura química.

Tabla 3. Clasificación de los pesticidas organoclorados según su estructura química.

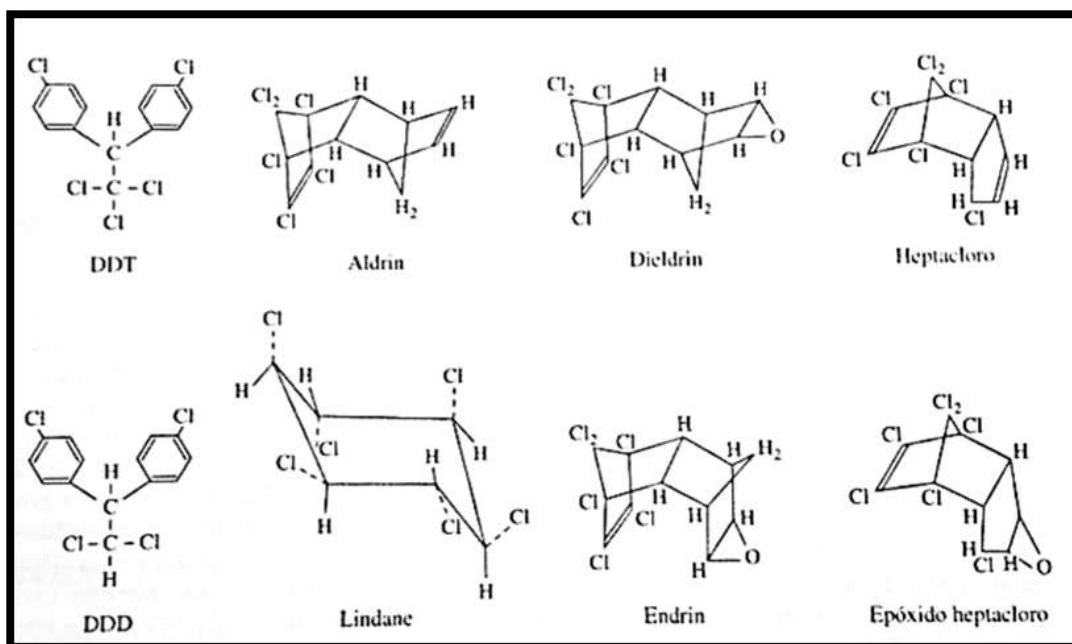
Grupo	Ejemplos
Aromáticos clorados	DDT, DDD, DDE, Dicofol, Metoxicloro, Clorobencilato.
Cicloalcanos clorados / alicíclicos	Lindano, Hexaclorociclohexano (HCH)
Ciclodiénicos clorados	Aldrín, Dieldrín, Endrín, Heptacloro, Clordano (<i>trans-clordano</i>), Endulsofán.
Terpenos clorados	Toxafeno

Fuente: CALVA, Laura; TORRES, María del Rocío. Plaguicidas organoclorados, 1998.

Los pesticidas organoclorados se encuentran en el medio ambiente (suelo y agua) producto de su uso excesivo para prevenir, destruir o controlar cualquier plaga (incluyendo organismos vectores de enfermedades humanas y animales), malezas o animales no deseados. Por lo general, los organoclorados se utilizan como insecticidas, acaricidas, herbicidas y fungicidas. Éstos se aplican durante la siembra de algodón, trigo, maíz, frijol, arroz, soya, sorgo y cártamo; en frutales como la naranja, mango, melón, sandía y piña (Calva y Torres, 1998).

La Figura 3 ilustra las estructuras químicas de los pesticidas clorados relativamente resistentes a la biodegradación, que fueron de gran uso en el pasado y que ahora están prohibidos.

Figura 3. Pesticidas clorados típicos muy utilizados en el pasado.



Fuente: RITTMANN, Bruce y McCarty, Perry. Biotecnología del medio ambiente: Principios y aplicaciones, 2001 p 640.

Los pesticidas organoclorados tienen propiedades fisicoquímicas que los hacen resistentes al ataque microbiano y poseen estructuras químicas muy estables, por lo que se degradan lentamente y son muy persistentes en el ambiente. Entre los compuestos más persistentes se destacan el Toxafeno (11 años), el DDT y Endrín (10 años), Clordano (8 años), Dieldrín (7 años), Aldrín (5 años), Heptacloro (4 años) y Lindano (2 años) (Calva y Torres, 1998). En general, cuantos más cloros sustituidos tenga la molécula, más persistente es el compuesto (Atlas y Bartha, 2002).

Los organoclorados presentan baja solubilidad en agua. Este carácter hidrofóbico los hace acumularse en el tejido adiposo de los organismos y bioacumularse (Calva y Torres, 1998).

2.6 BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS

La transformación biológica de contaminantes, o biorecuperación, permite eliminar compuestos inorgánicos y orgánicos mediante la acción de los microorganismos. El tiempo requerido para la degradación es función de las características del suelo, la temperatura y la presencia de los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano. La mayoría de los microorganismos utiliza el oxígeno para oxidar y biodegradar la materia orgánica (biodegradación aerobia); otros emplean nitratos, sulfatos, metano u otros aceptadores de electrones (biodegradación anaerobia) (Eweis *et al.*, 1999).

En la biodegradación, los microorganismos transforman contaminantes mediante reacciones metabólicas. Estas transformaciones están catalizadas por acción de las enzimas. La biodegradación de un compuesto específico es frecuentemente un proceso que se realiza paso a paso en el cual se involucran muchas enzimas y muchos organismos. Las enzimas son específicas en términos de los compuestos que atacan y las reacciones que catalizan. Más de una enzima es requerida para romper una sustancia orgánica. Frecuentemente, los organismos que tienen las enzimas para degradar el contaminante están presentes ya en el suelo por la presencia de diversos microorganismos nativos. Sin embargo, la degradación de otros contaminantes no ocurre debido a limitaciones ambientales tales como oxígeno, nutrientes, humedad o pH (McBain *et al.*, 1996).

Muchos de los contaminantes se degradan bajo condiciones aerobias, debido a que, la degradación anaerobia se produce a menores velocidades y resulta más difícil mantener unas condiciones anaerobias en un proceso de biorrecuperación. Sin embargo, se suelen elegir procesos anaerobios en el caso de aquellos grupos de contaminantes que son fáciles de degradar en estas condiciones, tales como los compuestos altamente clorados (Eweis *et al.*, 1999).

Un proceso de biorremediación apropiado, debe incluir controles abióticos para poder analizar de manera aislada la biodegradación real de las transformaciones

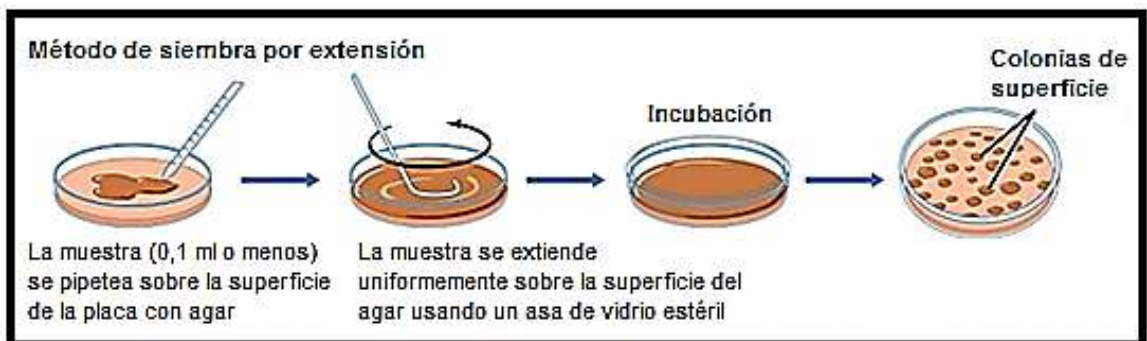
de los contaminantes por efectos de la evaporación, fotodegradación o lixiviación (Atlas y Bartha, 2002).

La eficiencia de la biorremediación se debe medir a través de variables como el aumento en la población microbiana, aumento en la emisión de dióxido de carbono, aumento en el consumo de oxígeno, disminución de los contaminantes o presencia de productos metabólicos (Eweis *et al.*, 1999).

La medida del crecimiento de una población microbiana se calcula estimando los cambios en el número de células, en la cantidad de algún componente de las mismas, como proteínas, ácidos nucleicos o el peso seco de las células. Uno de los métodos más usado frecuentemente para determinar este crecimiento, es el recuento de células viables (*una célula viable es aquella que puede dividirse y originar descendencia*). Esta técnica calcula el número de células que es capaz de formar colonias sobre un medio sólido adecuado, por tal razón, es también denominada **recuento en placa** o **recuento de colonias** (Madigan *et al.*, 2009). Existen al menos tres maneras de realizar un recuento en placa para células viables: *método de extensión en placa*, *método de vertido en placa* (Madigan *et al.*, 2009), y *método de la gota o de Miles y Misra* (Olivas y Alarcón, 2004).

El método de extensión en placa consiste en extender sobre la superficie del medio sólido, un volumen de cultivo diluido (no superior a 0,1 ml) utilizando un asa estéril de vidrio (Madigan *et al.*, 2009) (Figura 4).

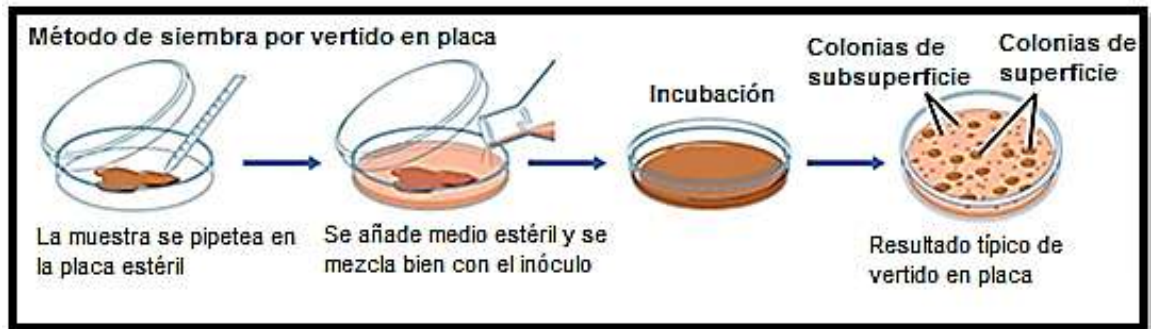
Figura 4. Método de siembra por extensión para recuento en placa



Fuente: MADIGAN, Michael T, *et al.* Brock: Biología de los microorganismos, 2009 p 169.

En el método de vertido en placa, se debe agregar un volumen conocido de cultivo (entre 0,1 – 1 ml) en una placa Petri estéril, sobre la que se adiciona posteriormente el medio con agar fundido y se mezcla todo con suaves movimientos de la placa sobre la superficie del mesón de trabajo (Madigan *et al.*, 2009) (Figura 5).

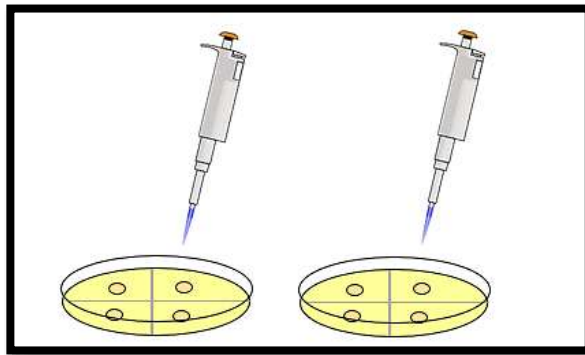
Figura 5. Método de siembra por vertido en placa para recuento



Fuente: MADIGAN, Michael T, *et al.* Brock: Biología de los microorganismos, 2009 p 169.

Finalmente, el método de Miles y Misra consiste en la separación de las placas Petri estériles en sectores, en donde se hará la inoculación de un volumen conocido de cultivo (gota que puede ir desde: 0,01 – 0,05 ml), empleando una pipeta Pasteur calibrada o micropipetas (Wachsman y Degrossi, 2012) (Figura 6).

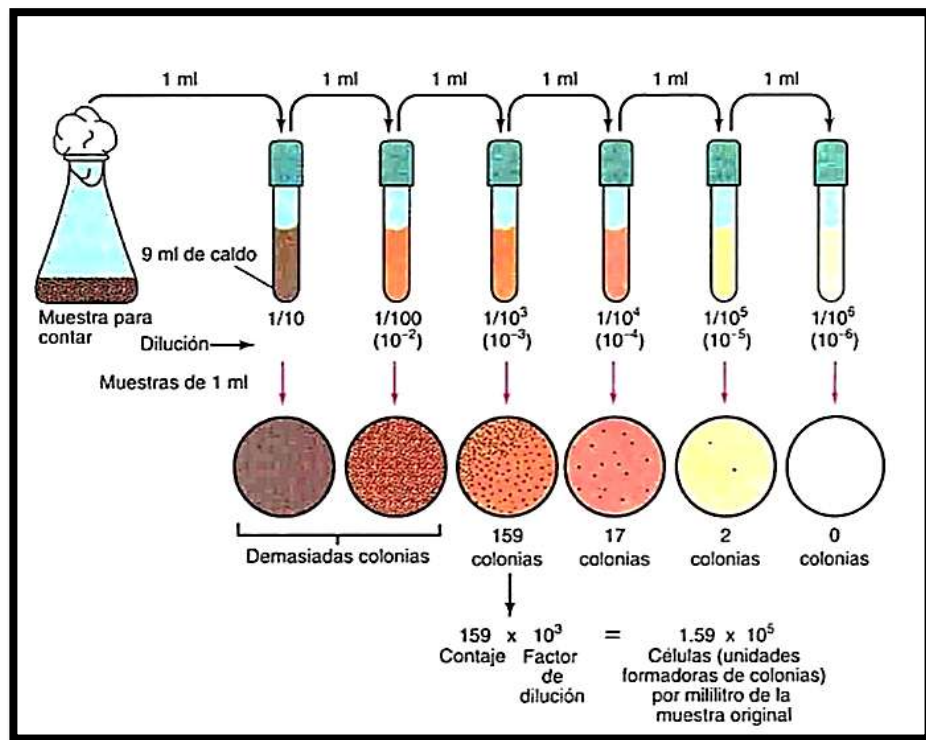
Figura 6. Método de Miles y Misra para recuento en placa



Fuente: WACHSMAN, Mónica y DEGROSSI María C. Microbiología: Guía de trabajos prácticos de laboratorio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2012.

Para la realización de cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, se deben realizar una dilución de las suspensiones celulares antes de la siembra en placa, ya que se debe garantizar que el número de colonias que se desarrollen en cada medio de cultivo no sea muy grande o muy pequeño. El líquido estéril para realizar la dilución puede ser agua, solución salina o agua peptonada. (Madigan *et al.*, 2009). La Figura 7 muestra el procedimiento para la hacer las diluciones.

Figura 7. Procedimiento para obtener diluciones seriadas para realizar recuento en placa.



Fuente: MADIGAN, Michael T, *et al.* Brock: Biología de los microorganismos, 2009 p 169.

2.6.1 Técnicas aplicadas para la Biorremediación de Suelos. Las dos estrategias generales de la biorremediación son la modificación ambiental, como pueden ser la aplicación de nutrientes y aireación, y la inoculación de organismos degradadores de los contaminantes (Atlas y Bartha, 2002).

2.6.1.1 Bioaumentación. La bioaumentación corresponde a la inoculación o siembra de bacterias específicas que degradan los contaminantes del medio y que se han reproducido en un laboratorio, con el fin de aumentar la velocidad y la extensión, o ambas, de la biodegradación (Atlas y Bartha, 2002). Estas cepas con potencial biodegradador pueden ser tomadas a partir de la microbiota nativa del sitio contaminado y aisladas; de una colección de microorganismos especializados (ICSS, 2006), o de especies modificadas genéticamente para tal fin (Pierzynski *et al.*, 2005).

2.6.1.2 Bioestimulación. La bioestimulación es un método que consiste en modificar las condiciones ambientales para acelerar el proceso de biorremediación y estimular los microorganismos capaces de degradar los contaminantes. En la bioestimulación se busca adicionar compuestos de nitrógeno y fósforo, con el fin de asegurar un crecimiento microbiano activo durante largos periodos de tiempo (Pierzynski *et al.*, 2005). La disponibilidad de

estos nutrientes en el medio contaminado es fundamental, y su deficiencia puede limitar la tasa de biodegradación (Atlas y Bartha, 2002).

Una relación C: N: P recomendada en varios estudios para la biodegradación de compuestos orgánicos es 100:10:1 (Fuentes, 1999; Blaine, 1993).

2.6.1.3 Atenuación Natural. La atenuación natural es una técnica de remediación basada en el potencial biodegradativo natural del suelo. Es un método de remediación pasiva que depende de los procesos naturales para degradar y disminuir los contaminantes presentes en el suelo. Los resultados de la atenuación natural dependen de la presencia o ausencia de microorganismos degradadores adecuados, concentración de oxígeno disuelto, contenido de nutrientes y de la biodisponibilidad de los contaminantes (KAO, C et al., 2001).

2.6.2 Biodegradación de Pesticidas Organoclorados. Algunos de los contaminantes como los pesticidas organoclorados inhiben el crecimiento de los microorganismos, por lo cual hacen difícil su biodegradación. Sin embargo durante largo tiempo de permanencia de estos componentes en el suelo se desarrolla la adaptación de los microorganismos a este tipo de sustancia y la posibilidad de su uso como la fuente de carbono primario. Esto conlleva a un crecimiento microbiano y el proceso de biodegradación consecuente. (Timmis and Pieper, 1999)

Muchas bacterias y hongos pueden metabolizar pesticidas. Algunos pesticidas pueden servir como fuente de energía y de carbono y se oxidan completamente a CO₂, mientras que otros compuestos podrían ser biodegradados parcialmente obteniendo quizás, productos más tóxicos que el contaminante original (Madigan et al., 2009).

Los compuestos halogenados son contaminantes comunes del suelo, aguas subterráneas y sitios de eliminación de residuos peligrosos. Estos compuestos son generalmente más resistentes al ataque microbiano y tienden a permanecer en el ambiente. Los átomos halogenados de la molécula, incrementan los estados de oxidación del carbono y los procesos aerobios son energéticamente menos favorables para compuestos altamente halogenados. Por lo tanto, la degradación **anaerobia** resulta más conveniente, ya que cuantos más halógenos tenga sustituido la molécula más fácil se produce una deshalogenación reductiva en ambientes reductores (Eweis et al., 1999).

Los compuestos orgánicos generalmente actúan como donadores de electrones; sin embargo, debido a la electronegatividad de los sustituyentes halogenados, los compuestos polihalogenados pueden actuar como aceptores de electrones en ambientes reductores. No obstante, una molécula con un pequeño número de halógenos podrá ser biodegradada por procesos oxidativos y asumir el rol de donador de electrones, de esta forma estará en sistemas **aerobios**. Lo anterior indica, mejores resultados en la biodegradación de compuestos organoclorados, bajo sistemas de tratamiento de *deshalogenación reductiva o condiciones anaerobias, seguida de aireación* (Eweis et al., 1999).

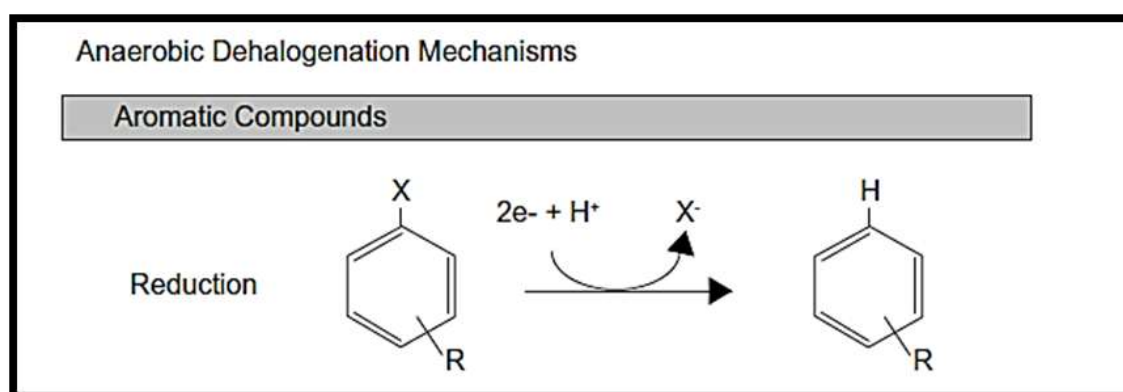
Rittmann y McCarty (2001) afirman que los productos aromáticos muy clorados, pueden deshalogenarse por reducción a productos menos halogenados. Mientras que los productos aromáticos ligeramente halogenados pueden ser biodegradados de forma aerobia por medio de reacciones de oxigenación. Por lo tanto, se puede lograr una degradación completa de los compuestos organoclorados a través de condiciones anaeróbicas y aeróbicas secuenciales.

Biodegradación anaerobia de los pesticidas organoclorados: se comprende como la *dechloración reductora*, un proceso en el que los compuestos orgánicos clorados se utilizan como aceptores de electrones finales en condiciones anóxicas (Madigan *et al.*, 2009).

Un compuesto químico orgánico se reduce si se somete a una ganancia neta de electrones como el resultado de una reacción química (aceptor de electrones), y se oxida si se somete a una pérdida neta de electrones (donador de electrones). En condiciones ambientales, el oxígeno comúnmente actúa como el aceptor de electrones cuando está presente. Cuando el oxígeno no está presente (condiciones anóxicas), los microorganismos pueden utilizar los compuestos orgánicos o aniones inorgánicos como receptores de electrones alternativos (Sims *et al.*, 1991).

Normalmente, los compuestos orgánicos presentes en un sitio contaminado representan los posibles donantes de electrones para apoyar el metabolismo microbiano. Sin embargo, los compuestos organoclorados pueden actuar como receptores de electrones, y efectuarse el proceso de deshalogenación reductora. Esta deshalogenación por reducción es la sustitución de un halógeno (cloruro), por un átomo de hidrógeno y dos electrones (Sims *et al.*, 1991), como se muestra en la Figura 8.

Figura 8. Deshalogenación reductora de compuestos organoclorados



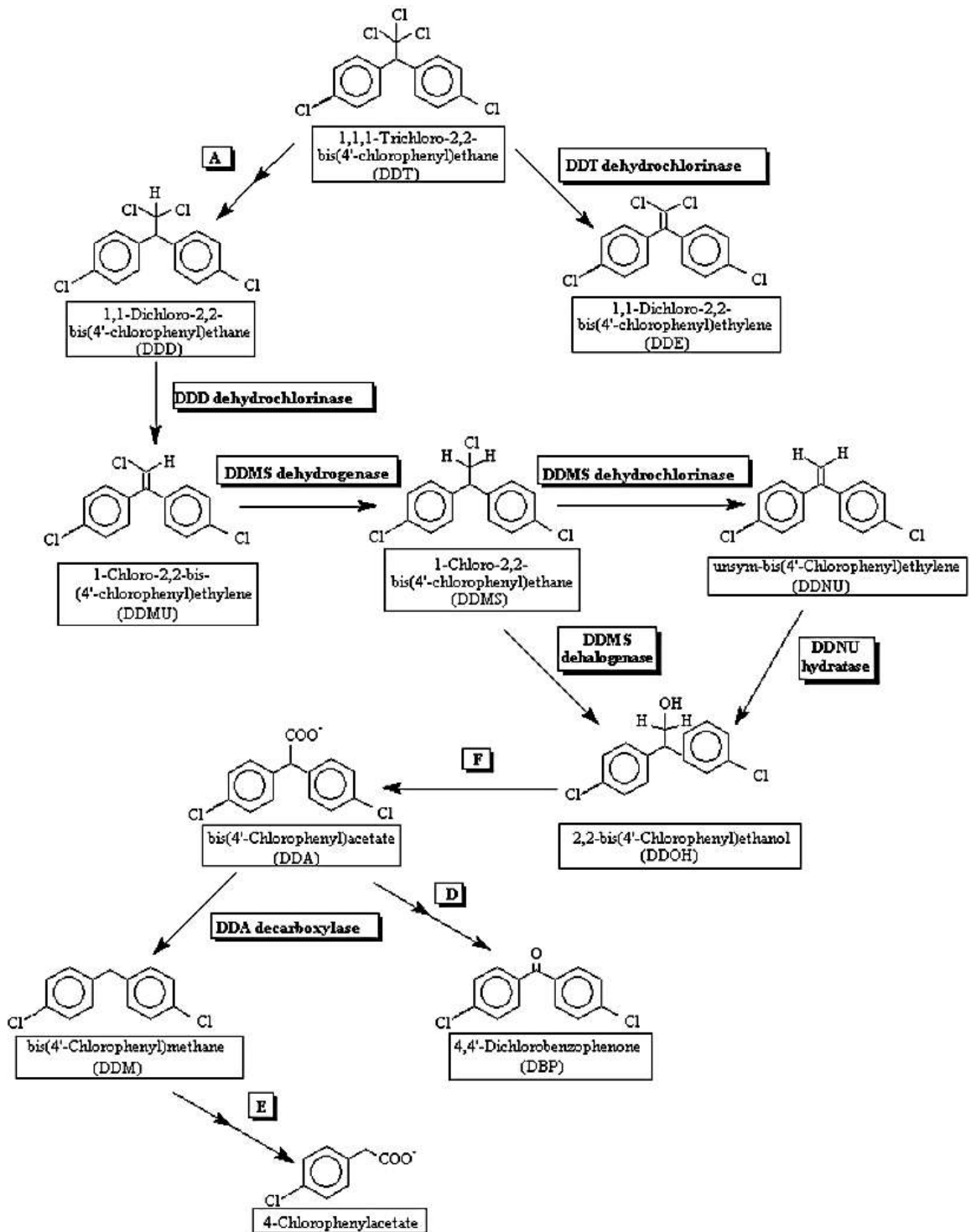
Fuente: SIMS; SUFLITA, y RUSSELL. Reductive Dehalogenation of Organic Contaminants in Soils and Ground Water, 1991.

El DDT, por ejemplo, sufre las primeras etapas de degradación en ausencia de oxígeno atmosférico (Betancourt, 2013). La Figura 9 muestra la vía de degradación bajo condiciones anaerobias.

Las reacciones A, D, E y F son pasos complejos cuyos intermediarios no han sido plenamente identificados, son catalizados por la enzima dehalogenasa DDT reductiva para producir DDD. El paso E y sus sucesores degradan DDM aeróbicamente (Betancourt, 2013).

Entre los microorganismos capaces de metabolizar DDT hasta el producto DDD, a través de un proceso de dehalogenación reductiva se encuentran *Klebsiella pneumoniae*, *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas sp* y *Bacillus sp* (Castro, 2008).

Figura 9. Ruta de degradación anaerobia del DDT.

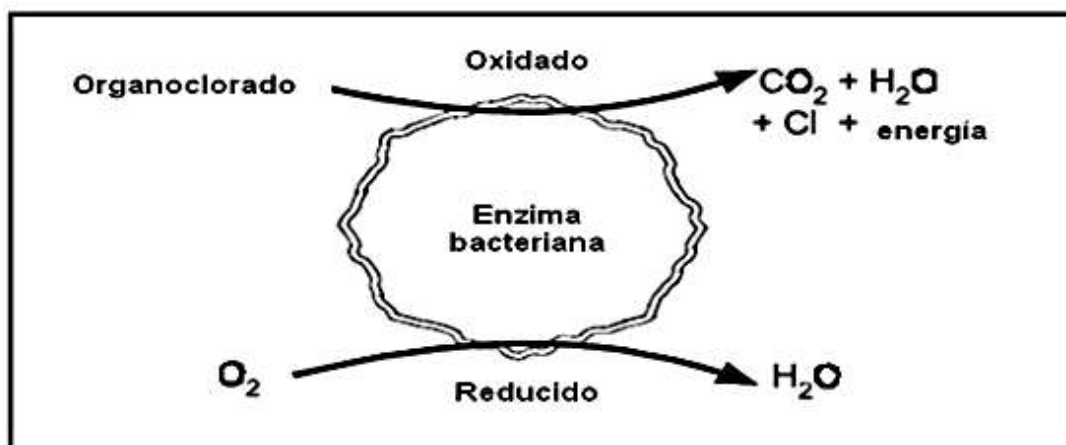


Fuente: BETANCUR, Bibiana. Biorremediación de Suelo Contaminado con el Pesticida 1,1,1-Tricloro-2,2-bis(P-Clorofenil)Etano (DDT) mediante Protocolos de Bioestimulación y Adición de Surfactante, 2013.

Biodegradación aerobia de los pesticidas organoclorados: *Declaración aerobia:* es posible declarar de forma aerobia los xenobióticos clorados. La biodegradación aerobia de los compuestos aromáticos clorados se produce mediante oxigenasas (Madigan *et al.*, 2009).

En este mecanismo, los organoclorados actuarán como donadores de electrones y como única fuente de carbono. Los electrones generados por la oxidación de estos compuestos, son transferidos a un aceptor de electrones en este caso, el oxígeno. La Figura 10 ilustra esta reacción.

Figura 10. Degradación aerobia de los pesticidas organoclorados.

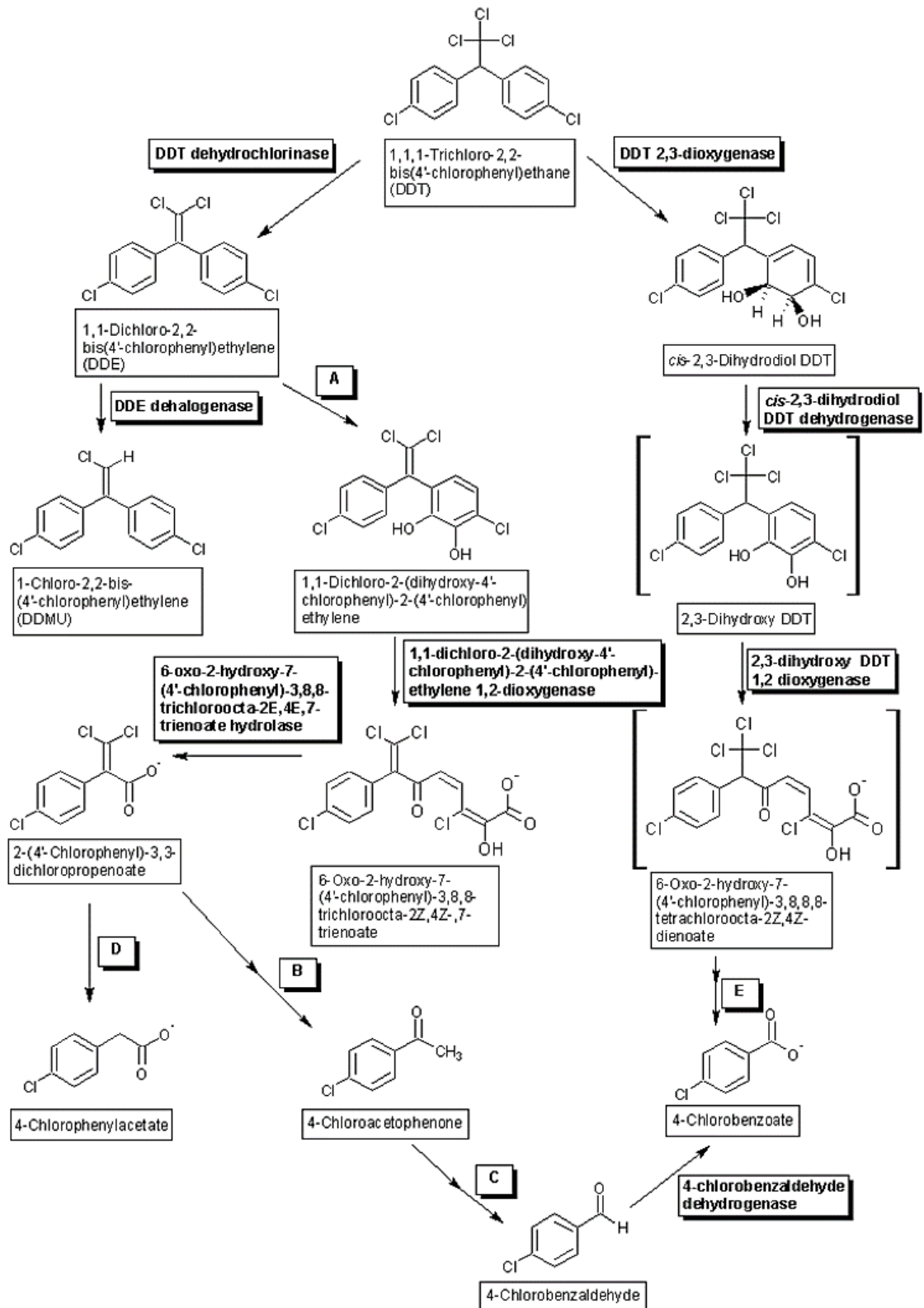


Fuente: ALFÁN, R. Efecto de los compuestos organoclorados sobre el crecimiento de una población microbiana aerobia, 2010.

La degradación aeróbica es más eficiente con un menor número de cloros (normalmente entre 1-3 cloros), lenta y limitada entre 4-6 cloros, y prácticamente ausente con un número mayor a 6 cloros (Arbeli, 2009).

En el caso del DDT, cuya estructura incluye mitades aromáticas y alicíclicas, ofrece la posibilidad de su degradación por vía aerobia, como se muestra en la Figura 11. En el paso A, el DDE es atacado por una dioxigenasa en las posiciones orto y meta. Este ataque da como resultado al intermediario 2,3-dihidrodiol-DDE. En los pasos B y D, el 2-(4'-clorofenil)-3,3-dicloropropenoato produce, vía decarboxilación, el 1,1-dicloro-(4'-clorofenil) etano, el cual sufrirá oxidación en el lado alifático de la cadena para producir 1,1-dicloro-(4'-clorofenil) etanol que es nuevamente oxidado a 4-cloroacetofenona. El grupo metilo terminal del 1,1-dicloro-(4'-clorofenil) etano sufrirá también oxidación para producir ácido fenilacético. En el paso C, la transformación de 4-cloroacetofenona a 4-cloronenzaldehído puede darse mediante oxidación y subsecuente decarboxilación del grupo metilo terminal. En el paso E, el producto resultante del rompimiento del anillo será degradado a un ácido clorado de 5 o 6 carbonos, dependiendo del sitio donde ocurra el rompimiento hidrolítico (Betancourt, 2013).

Figura 11. Ruta de degradación aerobia del DDT.



Fuente: BETANCUR, Bibiana. Biorremediación de Suelo Contaminado con el Pesticida 1,1,1-Tricloro-2,2'bis(P-Clorofenil)Etano (DDT) mediante Protocolos de Bioestimulación y Adición de Surfactante, 2013.

Según Atlas y Bartha (2002), la depuración secuencial anaeróbica y aeróbica quizá sea la mejor solución práctica para la biorremediación de los compuestos altamente clorados. Durante la fase anaeróbica inicial los compuestos de mayor peso molecular se deshalogenan para formar compuestos de menor peso molecular y con menos moléculas de cloro. En la fase aeróbica subsiguiente los congéneres de menor peso molecular se degradan a dióxido de carbono, agua e iones cloruro.

Po su parte, Betancur (2013) también asegura que las condiciones anaerobias mejoran la descomposición de algunos pesticidas clorados o su conversión a otros compuestos en el suelo. Aunque las primeras etapas de la degradación de DDT ocurren en la ausencia de oxígeno atmosférico. Los estudios *in vitro* sugieren que la etapa de ruptura del anillo del DDT requieren de una oxigenasa, por lo cual la completa destrucción de DDT necesita de condiciones aerobias.

2.6.2.2 Biodegradación de Pesticidas Organoclorados. Antecedentes:

Betancur (2013), evaluó la biorremediación de un suelo con amplio historial de contaminación con DDT mediante estrategias de bioestimulación y lavado con surfactante. Al monitorear la concentración de DDT y sus metabolitos evidenció un aumento de 57.85%, entre las semanas 5 y 6, de la concentración inicial de estas sustancias. La autora atribuye este resultado a una desorción del contaminante del suelo.

Lacayo M (2005), desarrolló una tecnología de bajo costo para la degradación del Toxafeno utilizando microorganismos. Para lograr la degradación utilizó dos enfoques: decloración anaeróbica y el uso de dos oxidantes fuertes a partir de hongos (peroxidasa / lacasa). El proceso de degradación del Toxafeno se realizó mediante un reactor anaerobio – aerobio secuencial, y tuvo una duración de 357 días. La concentración total del Toxafeno luego de 269 días se redujo en un 98%, obteniéndose la mayor remoción desde el reactor anaerobio. Sin embargo, desde el día 42 del tratamiento se encontró reducción del 87% del Toxafeno, y una remoción más lenta hasta el final del mismo. Se identificó la bacteria *Enterobacter sp*, especie anaerobia facultativa (Gram negativa) capaz de degradar el Toxafeno.

Baczynski et al., (2009) analizaron la biodegradación anaeróbica de plaguicidas organoclorados en suelos contaminados, y reportaron la importancia de la temperatura durante el proceso. Se realizaron pruebas a 12, 22 y 30° C en condiciones anaerobias. Los contaminantes organoclorados se eliminaron con bastante eficacia a todas las temperaturas, sin embargo, su tasa de eliminación aumentó a mayor temperatura. Se reportaron las mayores remociones al inicio de la biodegradación, y se mantuvieron casi constantes hasta el final del experimento.

Madigan y McCarty, (2009) indicaron que las *Pseudomonas* son organismos ecológicamente importantes tanto en el agua como en el suelo y son probablemente responsables de la degradación de numerosos compuestos

solubles derivados del material vegetal y animal en ambientes aerobios. Así mismo, son microorganismos capaces de degradar numerosos compuestos xenobióticos (de origen sintético) como pesticidas y otros productos químicos tóxicos, por lo cual se les considera importantes agentes medioambientales de biorremediación.

Atlas y Bartha, (2001) reportaron a través de trabajo de Kellog et al., 1981, la capacidad de la *Pseudomonas Burkholderia cepacia*, para alimentarse del herbicida 2,4,5-T, a partir de un estudio que revela la desaparición de este compuesto y el crecimiento simultáneo de la *Burkholderia* en el suelo.

Lacayo et al., (2005) aislaron la cepa *Enterobacter* sp (bacteria gram negativa, anaerobia facultativa) de un suelo contaminado con toxafeno en Nicaragua, mediante estudios filogenéticos y taxonómicos; evidenciando que era capaz de degradar el toxafeno, cuando se complementa como única fuente de carbono en el medio en condiciones anaeróbicas. Observaron una lenta degradación de los componentes clorados del suelo por la cepa, durante los primeros 20 días.

Kamanavalli y Ninnekar (2003), aislaron una cepa bacteriana de un suelo agrícola contaminado con pesticidas y fue identificada como *Pseudomonas* sp. La bacteria demostró degradar el DDT hasta formar ácido 4-clorobenzoico, como un metabolito estable.

Nezha et al., (2013), reportan que la eliminación de pesticidas como el DDT, en suelos agrícolas contaminados, resulta exitosa mediante adición de bacterias aisladas del mismo suelo como *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*. Así mismo, indican que otras bacterias responsables en la degradación de compuestos organoclorados son principalmente, cepas gram negativas, y pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Achromobaacter*, *Sphingomonas* y *Comamonas*; otras gram positivas, como *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*.

Tomasini (2011), recopila de la literatura que las especies *Shinogobium* y *Novoshingomonas*, bacterias Gram-negativas, toleran y degradan Pentaclorofenoles. Bacterias del género *Pseudomonas* y *Sphingomonas* pueden degradarlo por vía aeróbica. Además, los herbicidas del grupo n-clorofenoxi-propiónico, compuestos halogenados, son degradados por las enzimas oxigenasas producidas por la bacteria *Delftia acidovorans*. Otros compuestos organoclorados son los bifenilos policlorados (BPC) que tienen un amplio uso industrial, y pueden ser degradados hasta clorobenzoato mediante la acción de las bacterias como *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*.

3. METODOLOGÍA

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos, se llevó a cabo la siguiente metodología.

3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA INICIAL DEL SUELO CONTAMINADO CON PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS

Para dar inicio al presente proyecto, se llevó a cabo la toma de muestras del suelo contaminado con pesticidas organoclorados originarios del municipio de Agustín Codazzi, Cesar.

El muestreo se realizó en las antiguas instalaciones del Instituto Técnico Agropecuario Antonio Galo Lafaurie, zona que según informes de la Corporación Autónoma Regional del Cesar (Corpocesar), registró la existencia de una gran variedad de concentraciones de pesticidas.

Las muestras se tomaron según la metodología expedida por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) en la guía para la toma de muestras de suelo. Estas fueron trasladadas a la Universidad Pontificia Bolivariana, donde se preparó una muestra compuesta a partir del secado, molido, tamizado y homogenizado del suelo.

Una vez preparado el suelo se realizaron las actividades correspondientes para el desarrollo de la biorremediación.

3.1.1 Caracterización fisicoquímica inicial del suelo contaminado con pesticidas organoclorados. Las diferentes características fisicoquímicas determinadas en el suelo contaminado se muestran en la Tabla 4.

Los ensayos que fueron llevados a cabo en el laboratorio de suelos de la Facultad de Ingeniería Ambiental de la Universidad Pontificia Bolivariana, seccional Bucaramanga, incluyen las pruebas de textura, granulometría, pH, conductividad eléctrica, densidad real y aparente, capacidad de intercambio catiónico, humedad, capacidad de campo, y la pérdida diaria de humedad del suelo. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, para fines estadísticos (Ver Anexo A).

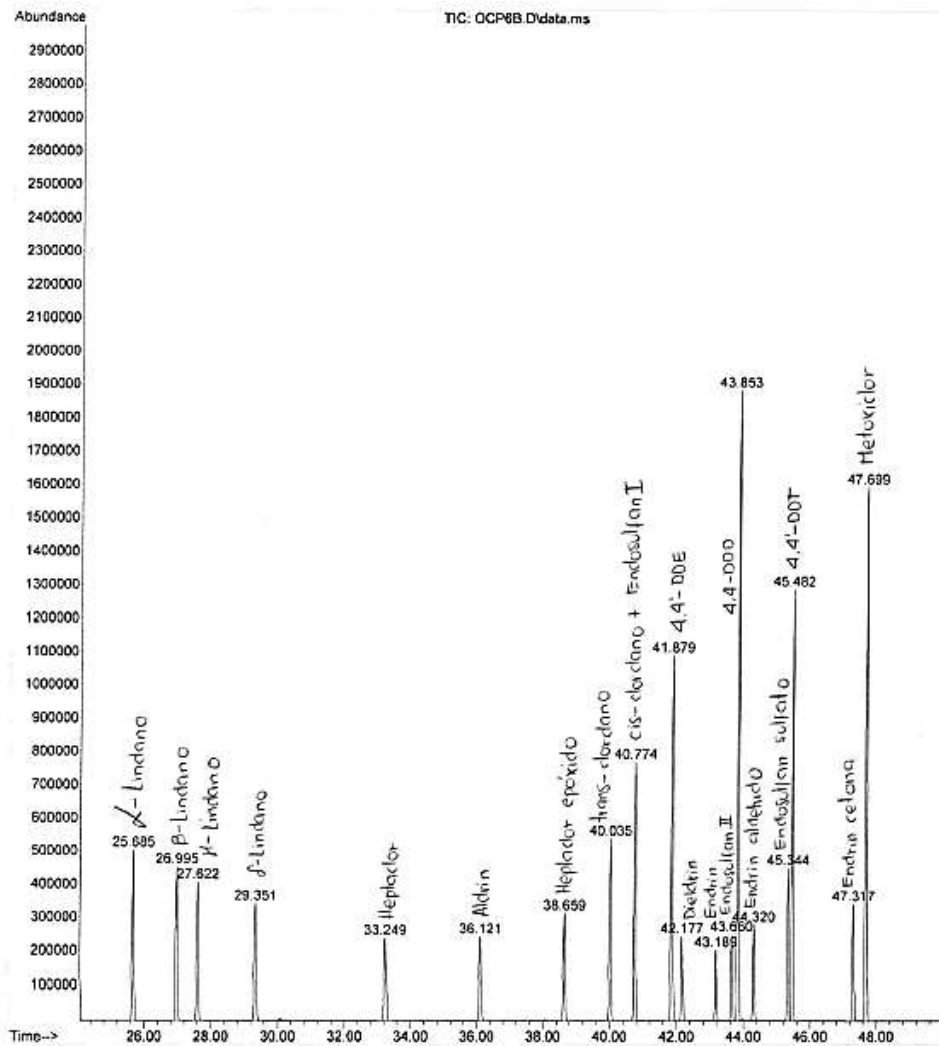
Por su parte, la determinación de nitrógeno orgánico, nitrógeno total, fósforo y carbono orgánico total, fueron analizados por el Laboratorio de Análisis Químico de Aguas Residuales de la Universidad Pontificia Bolivariana (Anexo B).

Además, el Laboratorio del Grupo de Investigación en Minerales, Biohidrometalurgia – GIMBA de la Universidad Industrial de Santander (UIS),

realizó la determinación de Cloruros en el suelo por el método Volumétrico, según el Estándar métodos numeral 4500-Cl⁻ B (Anexo C).

Finalmente, la identificación de los pesticidas organoclorados fue analizada por el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas de la Universidad Industrial de Santander (Anexo D). Para la detección de estos compuestos, se utilizó una técnica de dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD), empleando como material de referencia la mezcla certificada de pesticidas organoclorados Part N° OCP508-1JM (ChemService, West Chester, PA 19381 PO BOX 599, EE.UU), cuya curva de patrones se muestra en la Figura 12. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases AT 6890 Series Plus (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (Agilent Technologies, MSD 5973), operado en modo SIM [monitoreo de ion(es) seleccionado(s)]. La columna empleada en el análisis fue DB-5MS [5%-fenil-poli (metilsiloxano), 60 m x 0.25 m x 0.25 µm]. La inyección se realizó en modo *splitless* ($V_{iny} = 2 \mu\text{L}$).

Figura 12. Curva de patrones para la detección de pesticidas organoclorados Part N° OCP508-1JM.



Fuente: Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, UIS.

Tabla 4. Caracterización fisicoquímica del suelo.

Parámetro	Método empleado
pH	Medición con Potenciómetro en solución con KCl y agua destilada.
Conductividad Eléctrica	Conductímetro.
Textura	Método de Bouyoucos (Bouyoucos, 1962)
Determinación de la Granulometría	Prueba de cribado – Tamizado
Densidad real	Volumen desplazado de agua por una cantidad conocida de suelo. Principio de Arquímedes
Densidad aparente	Método del cilindro, en campo. Relación entre el peso del suelo seco y el volumen del cilindro.
Contenido de Humedad	Método gravimétrico: diferencia entre el peso del suelo húmedo y seco.
Capacidad de campo	Humedad gravimétrica 24-48 horas después de saturar el suelo con agua.
Curva pérdida de humedad	Determinación de la humedad gravimétrica diaria (por 5 días) llevando llevando el suelo a su máxima capacidad de campo en el día 1 y dejando los 6 días restantes sin riego (<i>Sección 4.1.1.9</i>).
N orgánico	SM 4500 – Norg-B
N total	SM 4500 – Norg-D
Fósforo	SM 4500 – P –B-E
Carbono Orgánico Total Materia Orgánica	Combustión seca NTC 5403
Cloruros en el suelo	SM 4500 – Cl ⁻ B.
Pesticidas organoclorados	Cromatografía de gases con el detector de captura electrónica

Fuente: Manual de Laboratorio de Análisis de Suelos, Universidad Pontificia Bolivariana, 2009. Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, UIS. Laboratorio de Análisis Químico de Aguas Residuales, UPB.

3.1.2 Caracterización microbiológica inicial del suelo contaminado con pesticidas organoclorados. Para el análisis microbiológico del suelo contaminado con pesticidas organoclorados, específicamente de bacterias, se dividió en tres etapas:

Primera etapa: recuento inicial de células viables.

Segunda etapa: aislamiento de bacterias nativas del suelo.

Tercera etapa: identificación de los géneros bacterianos.

Esta determinación tuvo lugar en los Laboratorios de la Facultad de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad de Santander UDES, con el apoyo del Instituto de Investigación MASIRA – UDES.

Toda siembra fue realizada por triplicado e incubada a temperatura ambiente.

3.1.2.1 Recuento inicial de células viables. El recuento de células viables o recuento en placa, se realizó por el método de la gota o de Miles y Misra (Olivas y Alarcón, 2004) (Véase Figura 6), utilizando como medio de cultivo agar Plate Count (Merck®), e inoculando 10 µl de muestra por cuadruplicado en cada caja de Petri, a partir de diluciones seriadas del suelo contaminado. En total se aplicó la siembra de tres diluciones para observar la mejor opción de crecimiento para el conteo. Luego de 48 horas de incubación a temperatura ambiente, se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC).

3.1.2.2 Aislamiento e identificación de bacterias nativas. Para el aislamiento e identificación de las bacterias nativas del suelo contaminado en estudio, se tuvo en cuenta el siguiente procedimiento.

- ❖ **Preparación de medios de cultivo.** Se prepararon medios de cultivo modificado con extractos de suelo al 10, 20 y 30% de concentración, a base de Agar agar (Oxoid®); Agar McConkey (Merck®), un medio selectivo que se utiliza para el aislamiento de bacilos gram negativos aerobios y anaerobios facultativos, fermentadores o no de la lactosa; y agar Tripticasa de soya (Oxoid®), el cual favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos.
- ❖ **Preparación del Medio de Preenriquecimiento y aislamiento de cepas.** Se realizó la siembra de 100 gramos de suelo contaminado en 500 ml de un medio de pre-enriquecimiento con sales por un período de 12 días a temperatura ambiente y en constante agitación (110 rpm). A partir del sexto día se tomaron muestras para sembrar en placas de agar modificado con suelo contaminado a diferentes concentraciones (10, 20 y 30%), agar McConkey y agar Tripticasa de soya. Esta siembra de inóculos se realizó introduciendo un asa de argolla en el medio de pre-enriquecimiento, y se realizaron siembras por agotamiento para obtener colonias separadas y así poder repicar y obtener cultivos axénicos. Este procedimiento comprendió un total de 30 medios sembrados, a partir de los cuales se realizaron repiques y aislamientos e incubaciones que duraron un mes, hasta obtener los 37 cultivos axénicos, de los cuales solo 19 fueron identificadas mediante el sistema de identificación API 20NE debido a su afinidad con esta prueba y el interés en su potencial para la biodegradación de organoclorados.

El preenriquecimiento del suelo con un medio basal salino tuvo como finalidad, establecer condiciones que favorecieran el crecimiento de bacteria que podían metabolizar los contaminantes presentes en el suelo. Esta solución de sales contenía en g/L de agua destilada: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 2.7; Na_2HPO_4 , 4.3; KH_2PO_4 , 4.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.06. (Vásquez, 2010; Lacayo 2005)

Para la agitación constante del suelo en el medio basal salino, se utilizó un agitador Shaker con incubación cuyas especificaciones se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Especificaciones técnicas Shaker.

Marca	IKA
Modelo	KS 400 i control
Tipo de movimiento	Circular
Peso a agitar permitido	20 kg
Rango de velocidad	10 – 500 rpm
Temperatura de calefacción	Temp. Ambiental – 80°C
Potencia de calefacción	1000 W

Fuente: Instrucciones Shaker.

- ❖ **Identificación de población bacteriana.** La clasificación e identificación bacteriana se llevó a cabo una vez se obtuvieron los cultivos axénicos de las 37 cepas aisladas, y se realizó mediante los siguientes procedimientos:
 - ❖ **Evaluación de morfotipos macroscópicos:** se realizó mediante el uso del estereoscopio para la caracterización macroscópica de las colonias obtenidas. Las colonias fueron descritas de acuerdo a su tamaño, forma, superficie, color, textura y elevación (Sahm y Weissfeld, 2009; Granados y Villaverde, 2003).
 - ❖ **Evaluación de morfotipos microscópicos:** a partir de la tinción de Gram, se realizó la clasificación de las bacterias aisladas e identificación de sus características morfológicas, a través de su observación en el microscopio,
 - ❖ **Identificación bioquímica a través de sistemas miniaturizados API 20 NE (No Fermentadoras):** la galería API 20 NE (Índice Analítico de Perfil) es un sistema estandarizado que permite la identificación de bacilos Gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias como por ejemplo *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, entre otros. Este sistema cuenta con 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados, que incluyen 8 ensayos convencionales y 12 ensayos de asimilación.

Los ensayos convencionales se inoculan con una suspensión bacteriana salina que reconstituye los medios. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color de manera espontánea, o provocados mediante la acción de reactivos.

Por su parte, los ensayos de asimilación se inoculan con un medio mínimo y las bacterias crecen solamente si son capaces de utilizar el correspondiente sustrato, y se evidencia por una cúpula turbia.

En el Anexo E se presenta los diferentes test que componen la galería API 20NE y sus respectivas reacciones enzimáticas.

Los resultados positivos y negativos correspondientes al sistema API 20 NE se muestran en la Figura 13.

Figura 13. Resultados correspondientes a pruebas negativas y positivas del API 20 NE.



Fuente: Apiweb, biomérieux [en línea]. En: <https://apiweb.biomerieux.com/jsp/color_check/strip3.jsp>

La interpretación de los resultados, se hace mediante el Catálogo Analítico (anexo al producto) o con la ayuda de un Software de Identificación.

Se seleccionó este tipo de identificación bacteriana, ya que anteriores investigaciones reportan que la mayoría de los microorganismos responsables de la degradación de compuestos organoclorados, son géneros pertenecientes a los Bacilos Gram negativos, los cuales pueden ser identificados a través de este test. Tomasini (2011), reporta que se han aislado de suelos contaminados tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas, y se ha observado que las bacterias Gram negativas toleran mayor concentración de los compuestos organoclorados que las positivas.

3.2 EVALUACIÓN DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Se establecieron cuatro (4) condiciones experimentales para llevar a cabo la biodegradación de los pesticidas organoclorados del suelo procedente del municipio de Agustín Codazzi Cesar. Éstas fueron la atenuación natural, bioestimulación, bioaumentación y control de condiciones (anaerobio – aerobio), como se muestra en la Figura 14. Para cada una de las condiciones experimentales evaluadas, se emplearon recipientes plásticos de 14L de volumen y se realizaron los montajes por triplicado. Cada bioreactor contenía 8,5kg de suelo contaminado, previamente homogenizado.

Figura 14. Condiciones experimentales para la biorremediación del suelo.

<p>Atenuación natural:</p> <p>Suelo contaminado, Microorganismos nativos, Riego con agua.</p>	<p>Control de condiciones:</p> <p>Suelo contaminado, Microorganismos nativos, Riego con agua. Condiciones anaerobias (8 semanas) y aerobias (5 semanas) secuenciales</p>	<p>Bioestimulación:</p> <p>Suelo contaminado, Microorganismos nativos, Adición de nutrientes, Riego con agua. Condiciones anaerobias (8 semanas) y aerobias (5 semanas) secuenciales</p>	<p>Bioaumentación:</p> <p>Suelo contaminado, Adición de nutrientes, Inoculación de bacterias aisladas del suelo, Riego con agua Condiciones anaerobias (8 semanas) y aerobias (5 semanas) secuenciales</p>
--	---	---	---

Fuente: Autora

La atenuación natural correspondió a una condición, en donde los microorganismos nativos presentes en el suelo contaminado realizaban un proceso de biodegradación sin estímulos externos. Por su parte, los métodos de bioestimulación y bioaumentación, se realizaron bajo dos etapas, esto es, mediante una depuración secuencial anaeróbica y aeróbica de los pesticidas organoclorados. Así mismo, se tuvo en cuenta un control de cambio de condiciones (anaerobias – aerobias).

El proceso se inició bajo condiciones anaerobias, recomendadas por la literatura. Durante esta etapa anaeróbica inicial, los compuestos con mayor peso molecular se deshalogenan para formar compuestos de menor peso molecular. Posteriormente, en la etapa aeróbica, los compuestos de menor peso molecular se degradan a dióxido de carbono, agua e iones cloruros (Atlas y Bartha, 2002).

Por otra parte, dado que la composición microbiana de especies en un suelo depende de la disponibilidad de agua, se ha reportado que la actividad microbiana procede de manera óptima en la presencia de entre 50 y 70% de la capacidad de campo (Betancourt, 2013). Por lo anterior, al inicio del proceso de biorremediación se llevaron los reactores al 60% de su capacidad de campo, mediante la adición de un volumen de agua que se determinó, según los resultados obtenidos en los análisis iniciales del suelo, en cuanto a su capacidad de campo (Véase sección 4.1.1.7).

Así mismo, se estableció una frecuencia de riego con agua destilada para cada una de las fases del proceso, teniendo en cuenta la curva de pérdida de humedad diaria del suelo que se realizó antes de iniciar los ensayos de biorremediación (Véase sección 4.2). El agua fue adicionada en los bioreactores mediante un sistema de microaspersión por gravedad.

Fase 1: Condiciones anaerobias

Para mantener estas condiciones anaerobias, se colocaron las tapas de cada uno de los recipientes empleados en los tratamientos de la biorremediación, y se hermetizaron mediante cubrimiento del suelo con parafina, como se observa en

la Figura 15. Esto garantizaba el impedimento del paso del oxígeno y la formación de una atmosfera reductora dentro del suelo.

Esta fase tuvo una duración de 8 semanas. La determinación del tiempo estipulado para la fase anaerobia se tomó con base a resultados reportados en la literatura. Muchos autores coinciden en que se logra una degradación de compuestos organoclorados más rápida, entre 2 y 4 semanas, en los suelos cuyas concentraciones de contaminantes son altas y/o su contaminación ha sido reciente (Baczynski et al., 2009); mientras que para suelos con un mayor tiempo de contaminación y/o concentraciones más bajas de los compuestos organoclorados, Lacayo (2005), encontró una máxima remoción de los organoclorados a las 7 semanas de tratamiento bajo condiciones anaerobias, y a partir de ahí, una degradación más lenta.

Figura 15. Montaje experimental de la biorremediación bajo condiciones anaerobias.



Fuente: Autora

Fase 2: Condiciones aerobias

Una vez terminada la fase anaerobia, se cambiaron las condiciones en los sistemas de biodegradación para proporcionar un ambiente aerobio, durante un periodo de 5 semanas. El tiempo establecido para esta fase, se determinó a partir de que la literatura reporta una degradación muy lenta para los metabolitos

producto de la biodegradación de los compuestos altamente halogenados (Lacayo, 2005).

Esta transformación implicó la inducción de aire al sistema mediante un blower que garantizó las condiciones oxidativas. Las especificaciones de la bomba utilizada se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Especificaciones técnicas Air Blower.

Marca	Air Supply
Modelo	C – 2000
Referencia	1-3210120F V2
Potencia	1 hp
Voltaje	120 V
Caudal de salida	2973 L/min

Fuente: Instrucciones Air Blower.

El aire era inyectado al suelo mediante unas mangueras que se encontraban adaptadas a un tubo de PVC de ½” perforado “tipo flauta”, ubicado de forma horizontal en el fondo del recipiente. A cada uno de los reactores se le adaptaron tres (3) tubos en su interior, recibiendo en total, un caudal de aire de 330L/min. La Figura 16 ilustra el montaje experimental de la fase aerobia del sistema.

Figura 16. Montaje experimental de la biorremediación bajo condiciones aerobias.



Fuente: Autora

3.2.1 Evaluación de la bioestimulación como un método para la biodegradación de los pesticidas organoclorados en el suelo contaminado.

En la técnica de *bioestimulación*, se adicionaron nutrientes con el fin de estimular el desarrollo de los microorganismos degradadores de los organoclorados. Para determinar la dosis del requerimiento de nutrientes, se determinó la relación C: N: P, a partir de la caracterización inicial del suelo, en donde la literatura recomienda una relación 100:10:1 (Fuentes, 1999; Blaine, 1993).

Una vez finalizó cada fase del tratamiento de biorremediación (anaerobia y aerobia), se tomaron muestras de suelo y fueron enviadas a los respectivos análisis. La determinación de Cloruros en el suelo, productos de la deshalogenación de los pesticidas evaluados se realizó en el Laboratorio del Grupo de Investigación en Minerales, Biohidrometalurgia – GIMBA de la Universidad Industrial de Santander (UIS). Mientras que el análisis de la concentración remanente de los organoclorados en el suelo tratado fue realizado en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas de la Universidad Industrial de Santander.

3.2.2 Evaluación de la bioaumentación como una técnica para la eliminación de los pesticidas organoclorados en el suelo contaminado.

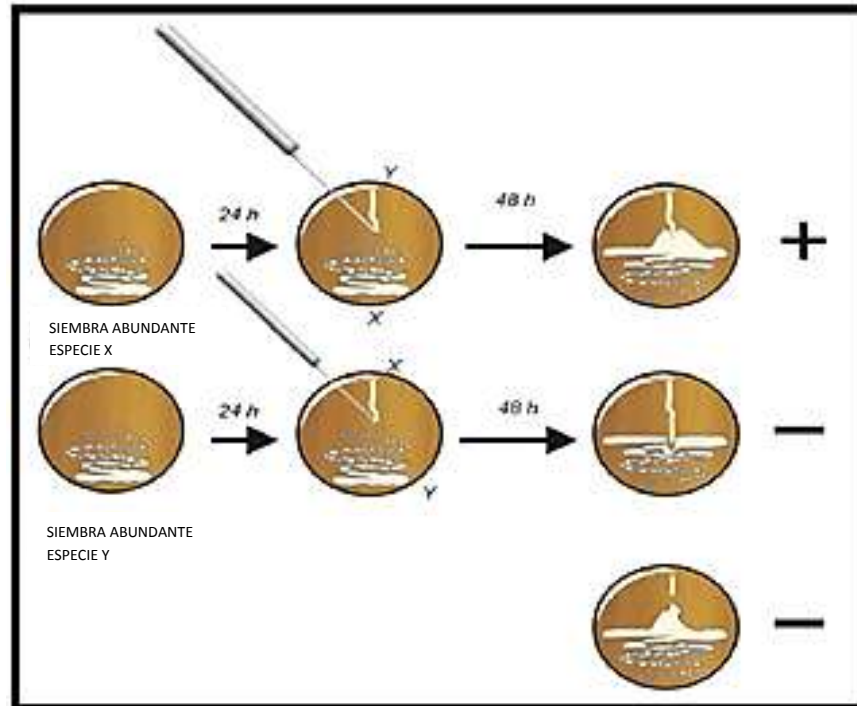
Este tratamiento consistió en la adición de un consorcio de bacterias nativas, que fueron aisladas del suelo contaminado con pesticidas organoclorados al inicio del proceso de biorremediación. Así mismo, se nivelaron los requerimientos nutricionales del suelo, tal como se realizó en la bioestimulación, conservando las mismas condiciones de tratamiento.

3.2.2.1 Selección del consorcio bacteriano degradador de los pesticidas organoclorados. La selección de las bacterias para generar un consorcio con alta eficiencia en la biodegradación de pesticidas organoclorados se basó en reportes de la literatura, lo cual coincidió con las bacterias nativas encontradas inicialmente en el suelo contaminado.

3.2.2.2 Pruebas de compatibilidad. Con el fin de comprobar la compatibilidad entre las cepas seleccionadas, se realizó una prueba en un medio de cultivo específico, para determinar si existía inhibición de crecimiento.

La prueba consistió en el cultivo de diferentes combinaciones de bacterias en un mismo medio con Agar tripticosa de soya, comenzando por una siembra masiva de una cepa hasta la mitad de la caja e incubando a temperatura ambiente por 24 horas. Pasadas las 24 horas, en la mitad de la caja Petri no sembrada, se realizó una estría de otra cepa y se incubó por 24 horas más, como se muestra en la Figura 17.

Figura 17. Procedimiento Pruebas de Compatibilidad de cepas.



Fuente: BRICEÑO L, A; BUENAHORA R, M. (2006).

En la Figura 17 se observa que dos cepas que son compatibles (+) cuando presentan un crecimiento proporcional las dos. Mientras que una inhibición (-) ocurre cuando el crecimiento de una cepa impide el desarrollo de la otra.

3.2.2.3 Bioaumentación de las bacterias degradadoras de los pesticidas organoclorados. A partir de los resultados de las pruebas de compatibilidad, fue seleccionado el consorcio de bacterias biodegradadoras de los compuestos organoclorados. Este consorcio fue bioaumentado a partir de 100ml de caldo nutritivo al cual se agregó cada cepa en una cantidad equivalente a su crecimiento en una caja de Petri. Posteriormente se adicionó más caldo nutritivo para estimular el crecimiento de los microorganismos presentes, hasta obtener una concentración bacteriana de 10^8 ufc/ml (determinada por recuento en placa) recomendada por la literatura (Vásquez, 2010; Ríos, 2005)

Una vez logrado el caldo deseado, fue adicionado al suelo tratado un volumen de 300 ml en frecuencia de cada mes. Este volumen se completaba con agua destilada el día de riego, según los requerimientos del suelo para mantener una humedad entre el 50 – 80% de su capacidad de campo, con base en la curva de pérdida de humedad diaria (Véase sección 4.1.1.8).

3.2.2.4 Determinación y análisis de la degradación de los compuestos organoclorados durante el proceso de bioaumentación. Una vez finalizó cada fase del tratamiento por bioaumentación (anaerobia y aerobia), se tomaron muestras de suelo y fueron enviadas a los respectivos análisis. La determinación de Cloruros en el suelo, productos de la deshalogenación de los pesticidas

evaluados se realizó en el Laboratorio del Grupo de Investigación en Minerales, Biohidrometalurgia – GIMBA de la Universidad Industrial de Santander (UIS). Mientras que el análisis de la concentración remanente de los organoclorados en el suelo tratado fue realizado en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas de la Universidad Industrial de Santander.

3.3 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE LOS PESTICIDAS ORGANOCORADOS Y EL CAMBIO DE LA MICROBIOTA, DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN EN LAS DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES

Para el efecto de comparación de la eficiencia de la remoción de pesticidas organoclorados en las diferentes condiciones experimentales, se tuvo en cuenta la variación de la concentración de los cloruros, porcentaje de remoción de los compuestos organoclorados y el cambio de la población bacteriana en el suelo en estudio.

3.3.1 Variación de la concentración de los cloruros en el suelo durante el proceso de biorremediación. En cada uno de los cuatro (4) tratamientos evaluados para la remoción de pesticidas organoclorados, fue analizado el contenido de iones cloruros luego de 8 semanas de tratamiento y al finalizar el proceso de biorremediación. La metodología correspondiente se citó en la sección 3.1.1

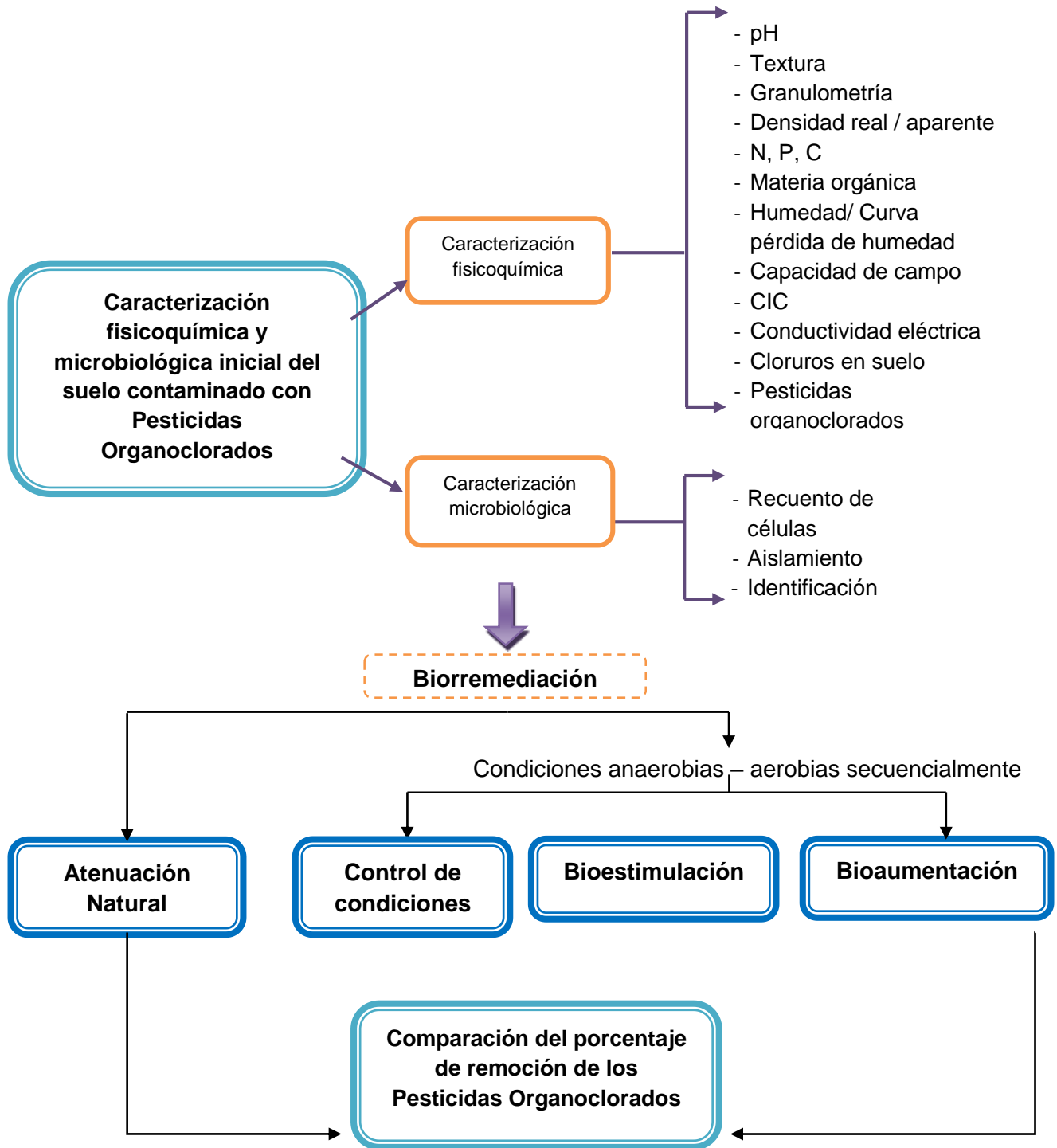
3.3.2 Comparación del porcentaje de remoción de los compuestos organoclorados, durante el proceso de biorremediación. Para cada condición experimental (atenuación natural, bioestimulación, bioaumentación y control), se analizaron las concentraciones de los pesticidas organoclorados presentes en el suelo al inicio, luego de 8 semanas de tratamiento, y al finalizar el proceso de biorremediación. Con estos datos, se realizaron los cálculos de remoción de los contaminantes y la comparación de los resultados obtenidos en cada tratamiento. La metodología correspondiente se citó en la sección 3.1.1

3.3.3 Determinación del cambio de la población bacteriana durante el proceso de biorremediación. De la misma manera en que se llevó a cabo el análisis microbiológico inicial del suelo, se realizó el análisis de la población bacteriana para cada condición experimental. Este análisis tuvo en cuenta un recuento de células viables, aislamiento de cepas y su identificación macroscópica, microscópica y bioquímica (a través del API 20 NE) (Véase sección 3.1.2).

3.4 RESUMEN DE LA METODOLOGÍA

La metodología que se llevó a cabo en el presente estudio se resume en la ilustración de la Figura 18.

Figura 18. Resumen de la metodología.



Fuente: Autora

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA INICIAL DEL SUELO CONTAMINADO CON PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS

Al suelo proveniente del municipio de Agustín Codazzi, Cesar, se le fue realizado el análisis de las características fisicoquímicas y microbiológicas que se muestran en los numerales 4.1.1 y 4.1.2.

4.1.1 Caracterización fisicoquímica inicial del suelo contaminado con pesticidas organoclorados.

4.1.1.1 Determinación de Textura: Método de Bouyoucos. La determinación de la textura del suelo se realizó por el método de Bouyoucos, el cual consistió en determinar los porcentajes de partículas de arena, limo y arcilla; y se fundamenta en la Ley de Stokes. La Tabla 7 muestran los resultados registrados de las lecturas del hidrómetro a los 40 segundos y a las 2 horas.

Tabla 7. Resultados lecturas del hidrómetro para la determinación de la textura por el método de Bouyoucos.

Muestra	Lectura a los 40 segundos			Lectura a las 2 horas		
	Hidrómetro (g/L)	Termómetro (°C)	Hidrómetro corregida (g/L)	Hidrómetro (g/L)	Termómetro (°C)	Hidrómetro corregida (g/L)
1	23	24	24,64	4	26	6,36
2	20	25	22	5	26	7,36
3	20	25	22	3	27	5,72

Fuente: Autora

A partir de los datos anteriores, se calcularon los porcentajes correspondientes aplicando las siguientes formulas, resumidos posteriormente en la Tabla 8.

$$\% \text{Arena} = 100 - \frac{\text{Lectura corregida a los 40 segundos} \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

$$\% \text{Arcilla} = \frac{\text{Lectura corregida a las 2 horas} \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

$$\%Limo = 100 - (\%Arena + \%Arcilla)$$

Tabla 8. Determinación de la textura por el método de Bouyoucos.

Muestra	% ARENA	% ARCILLA	% LIMO	CLASE TEXTURAL
1	49,28	12,72	38	Suelo Franco
2	44	14,72	41,28	
3	44	11,44	44,56	
Promedio	45,76	12,96	41,28	

Fuente: Autora

Con la ayuda del diagrama triangular de clasificación de un suelo del departamento de Agricultura de los EE.UU (Véase Figura 2), y la proporción relativa de las partículas, se determinó el tipo y la clase textural del suelo. Como resultado, el suelo se clasificó como *franco*, con predominancia de arena y limo. Alta cantidad de limo (42,28%) y el aporte en 12,96% de arcilla, se esperaría un suelo con una baja capacidad de infiltración, alta retención de humedad y drenaje lento, con una tendencia a compactación por la significativa presencia de partículas finas.

4.1.1.2 Determinación de la Granulometría. El análisis de la granulometría del suelo permitió determinar la proporción de los granos del suelo en función de su tamaño, es decir, la gradación del suelo.

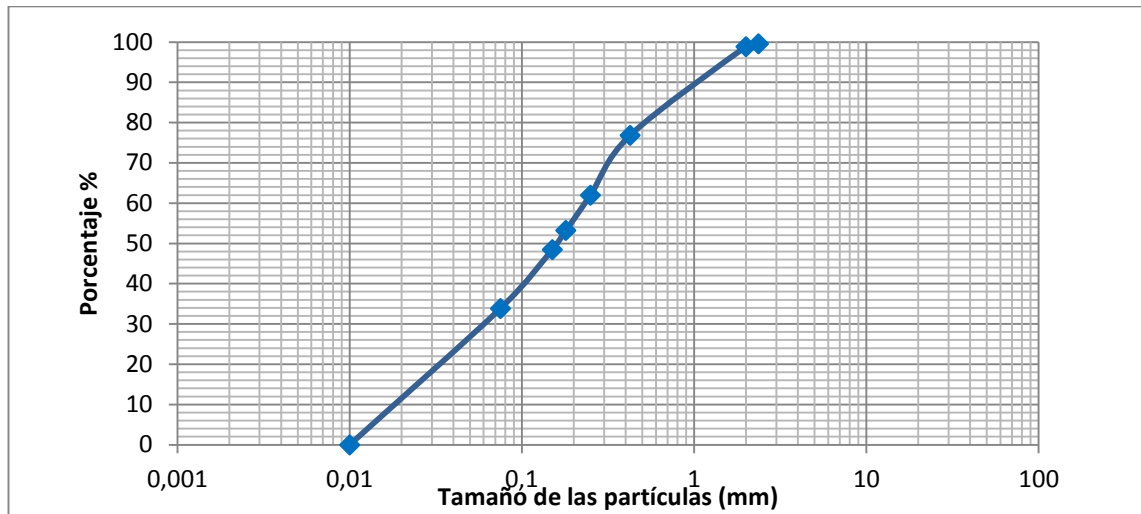
La determinación se realizó por medio del cribado del suelo mediante el paso de la muestra por una serie de tamices con diámetros conocidos, decrecientes y el peso correspondiente de cada porción. La Tabla 9 muestra los porcentajes de las partículas presentes en el suelo. Relacionando el tamaño de las partículas con el porcentaje que representan en el suelo, se generó la *curva granulométrica* (Gráfica 1).

Tabla 9. Porcentajes tamizado para la determinación de la granulometría del suelo.

Muestra	Limo y arcilla (Fondo)	Arena fina			Arena media		Arena gruesa	Gravas
Diámetro de malla (mm)	<0,075	0,075	0,15	0,18	0,25	0,425	2	2,36
Diámetro tamiz (#)	Fondo	200	100	80	60	40	10	8
Porcentaje en masa de la fracción retenida (%)	33,83	14,63	4,75	8,76	14,86	22,05	0,69	1,16

Fuente: Autora

Gráfica 1. Curva de granulometría del suelo



ARCILLA	FINO	MEDIO	GRUESO	FINA	MEDIA	GRUESA	FINA	MEDIA	GRUESA
	LIMO			ARENA			GRAVA		

Fuente: Autora

La gráfica 1 evidencia un suelo bien gradado debido a la distribución de la curva en todos los diámetros de partícula, con porcentajes equitativos en partículas finas (limos) y gruesas (arenas).

La gradación del suelo se puede expresar numéricamente a través de la determinación del coeficiente de uniformidad (Cu) y el coeficiente de curvatura (Cc), a través de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Coeficiente de uniformidad (Cu)} = \frac{D_{60}}{D_{10}}$$

$$\text{Coeficiente de curvatura (Cv)} = \frac{D_{30}^2}{D_{10} * D_{60}}$$

Donde:

D₁₀ = Diámetro de la partícula para el 10%

D₃₀ = Diámetro de la partícula para el 30%

D₆₀ = Diámetro de la partícula para el 60%

Un suelo bien gradado se da cuando:

$$Cu > 4 \text{ a } 6 \quad \text{y} \quad 1 < Cc < 3$$

El coeficiente de uniformidad (Cu) hace referencia al grado de distribución de las partículas de un suelo, y el coeficiente de curvatura (Cc) al equilibrio entre los diversos tamaños de partícula y la homogeneidad de éstas.

Para el suelo en estudio, estos coeficientes resultaron:

$$C_u = \frac{0,24}{0,02} = 12 \quad C_c = \frac{(0,05)^2}{0,02 \cdot 0,24} = 0,5$$

Un valor de 12 en el C_u , indicia que el suelo está bien gradado y que presenta una distribución equitativa en los tamaños de partículas, característico de los suelos franco.

El coeficiente de curvatura resultó menor a 1, lo que confirma la presencia de cantidades diferentes de tamaño de partículas, es decir, la heterogeneidad en el suelo.

De esta manera, la granulometría del suelo en estudio presentó resultados similares a los arrojados en la determinación de textura por el método de Bouyoucos, clasificando al suelo como franco, es decir, un suelo bien gradado.

4.1.1.3 Determinación del pH. El pH del suelo se determinó por el método potenciométrico, a partir de una solución suelo- H_2O y suelo-KCl, cuyos resultados se reportan en la Tabla 10. El valor de la variación del pH (ΔpH) se halló para la identificación del tipo de carga de los coloides, donde: $\Delta pH = pH$ en KCl – pH en agua.

Tabla 10. Determinación del pH en el suelo.

MUESTRA	VALOR DE pH H_2O	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

La determinación del pH en agua, en promedio define al suelo como neutro, y el pH obtenido en KCl lo muestra moderadamente ácido; por lo que se puede clasificar como un tipo de suelo neutro o casi neutro. Este resultado se puede asociar con una adecuada disponibilidad de nutrientes, ya que en general, a dicho pH se evidencia la presencia de gran cantidad de nutrientes y elementos esenciales para el crecimiento de las plantas y el desarrollo de microorganismos, favoreciendo la biodegradación. De igual manera, la disponibilidad de los iones H^+ en este suelo, puede favorecer el proceso de una deshalogenación reductora.

Resultado de ΔpH negativo en las tres pruebas, indica que en este tipo de suelo predomina la carga negativa y por ende, es un intercambiador catiónico, es decir, que intercambia cationes con la fase acuosa del mismo (Jaramillo, 2002). Es muy probable que los aniones presentes en el suelo se deban a una deshalogenación

en curso, que se lleva a cabo por los microorganismos nativos durante la cual se elimina el ion Cl⁻.

4.1.1.4 Determinación de la Conductividad Eléctrica (CE). La conductividad eléctrica se analizó por el método del conductímetro a partir de una solución suelo – agua, con la finalidad de conocer la cantidad de sales presentes en el suelo. Los resultados obtenidos se reportan en la Tabla 11.

Tabla 11. Determinación de la Conductividad Eléctrica.

MUESTRA	CONDUCTIVIDAD (ds/m)
1	0,198
2	0,204
3	0,212
Promedio	0,205

Fuente: Autora

La CE resultó en promedio 0,205 ds/m, lo cual le confiere al suelo características de poca a nula salinidad, que además, representa un valor aceptable para el crecimiento de la mayoría de las plantas y poca afectación a la microbiota del suelo (USDA, 1999). Sin embargo, este valor también indica una baja capacidad de intercambio catiónico, debido a la poca cantidad de cationes en solución disponibles para intercambiar con el suelo.

4.1.1.5 Determinación de la Densidad Real (Dr). La densidad real obtenida para el suelo contaminado con pesticidas organoclorados se midió mediante el método del principio de Arquímedes, y se resumen los resultados en la Tabla 12.

La ecuación requerida para determinar la densidad real es:

$$Dr = \frac{\text{Masa de suelo seco}}{\text{Volumen de suelo seco}}$$

Tabla 12. Determinación de la densidad real en el suelo.

Muestra	Peso de la muestra de suelo (g)	Volumen del líquido desplazado (ml)	Densidad Real (g/ml)
1	20	10	2
2	20	10,5	1,9
3	20	10,5	1,9
Promedio	20	10,33	1,9

Fuente: Autora

Por lo general, una densidad real adecuada para suelos minerales varía entre 2,6 y 2,75 g/ml. La densidad real promedio obtenida para el suelo contaminado

en estudio fue de 1,93 g/ml, un resultado que puede indicar la presencia de alto contenido de aluminosilicatos no cristalinos en el suelo (Jaramillo, 2002).

4.1.1.6 Determinación de la Densidad Aparente (Da). La densidad aparente se determinó por el método del cilindro biselado, teniendo en cuenta el peso del suelo uno vez seco y el volumen total del cilindro, es decir, se tuvo en cuenta el espacio ocupado por la fase sólida y los poros, lo cual depende de la organización del suelo. Por lo tanto, cuanto mayor es la densidad aparente, menor es el espacio poroso (USDA, 1999). La Tabla 13 presenta los resultados obtenidos de la densidad aparente, para el suelo contaminado en estudio.

$$Da = \frac{\text{Peso muestra seca (g)}}{\text{Volumen total (cm}^3\text{)}}$$

Tabla 13. Determinación de la densidad aparente.

Muestra	Peso de la muestra de suelo seco(g)	Volumen del cilindro (m ³)	Densidad aparente (g/m ³)
1	488,85	304,02	1,607
2	493,5	304,02	1,623
3	481,5	304,02	1,583
Promedio	487,95	304,02	1,6

Fuente: Autora

Para suelos franco, la densidad aparente ideal según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 1999) debería ser menor a 1,4 g/cm³. El resultado en promedio, de la densidad aparente del suelo analizado fue de 1,6 g/cm³, un valor alto que evidencia un grado de deterioro del suelo asociado a la compactación y/o pérdida de materia orgánica, afectando el crecimiento radicular (USDA, 1999; Jaramillo, 2002). Este resultado también es característico para suelos minerales (Núñez, 2000). De la misma manera, se nota la coherencia de este resultado con la granulometría del suelo analizado, donde se encontró más del 50% de grano fino, cuya distribución tiende a ocupar el espacio poroso.

4.1.1.7 Determinación del contenido de Humedad (HG). La determinación del contenido de humedad se halló relacionando el peso del suelo húmedo y una vez secado al horno por 24 horas a 105°C, expresando el resultado en porcentaje (%HG), como se muestra en la Tabla 14.

$$\%HG = \frac{\text{Peso muestra húmeda} - \text{Peso muestra seca}}{\text{Peso muestra seca}} \times 100$$

Tabla 14. Determinación del contenido de Humedad (Método Gravimétrico).

Muestra	Peso de la muestra de suelo húmedo(g)	Peso de la muestra de suelo seco(g)	%HG
1	502,0	488,85	2,6
2	505,9	493,5	2,5
3	492,1	481,5	2,2
Promedio	500,0	487,95	2,5

Fuente: Autora

El resultado de la humedad del suelo fue 2,5% en promedio, lo cual se califica como baja. Poco almacenamiento de agua es evidencia de una alta infiltración y baja retención de humedad. Este resultado está directamente relacionado con partículas gruesas en el suelo, ya que el 45,76% está conformado por arena. Sin embargo, aunque la clase textural del suelo resultó franco, y debería presentar una mediana capacidad retención de agua, se le puede atribuir este resultado a las condiciones climáticas y ambientales de la zona en estudio. Se debe tener en cuenta que el municipio de Agustín Codazzi, Cesar, presenta altas temperaturas en promedio, y poca pluviosidad en la temporada en que se realizó el muestreo, según registros históricos del IDEAM.

4.1.1.8 Determinación de la capacidad de campo del suelo en estudio. La capacidad de campo hace referencia al contenido de agua en el suelo, luego de que sus macroporos se han drenado completamente. El resultado se obtuvo mediante la medición de la humedad por el método gravimétrico (Véase Sección 4.1.1.6), después de 72 horas de haber saturado el suelo con agua. Los resultados de la capacidad de campo del suelo contaminado expresados en el porcentaje de humedad gravimétrica (%HG) se registran en la Tabla 15.

Tabla 15. Determinación de la capacidad de campo.

Muestra	% HG a capacidad de campo
1	28,20
2	21,95
3	21,07
Promedio	23,7

Fuente: Autora

La capacidad de campo de un suelo oscila normalmente entre el 18 y 30% y es función del contenido de arcilla (Eweis *et al.*, 1999). El suelo contaminado presentó una capacidad de campo de 23,7% en promedio; valor que está dentro del rango habitual, y que se relaciona con la clase textural obtenida, pues los

suelos francos con predominancia de arenas y limos, presentan en su mayoría, este valor de humedad a capacidad de campo (Thompson, L y Troeh, F., 1988).

Debido a que la literatura ha reportado criterios en los rangos de humedad óptimos para el desarrollo de los microorganismos, especialmente en procesos de biorremediación, se establece mantener un suelo entre el 50 y 70% de la capacidad de campo (Betancourt, 2013). Por lo tanto, para el suelo en estudio se mantuvo la humedad entre el 11,85% HG y 16,59% HG durante el desarrollo del proyecto.

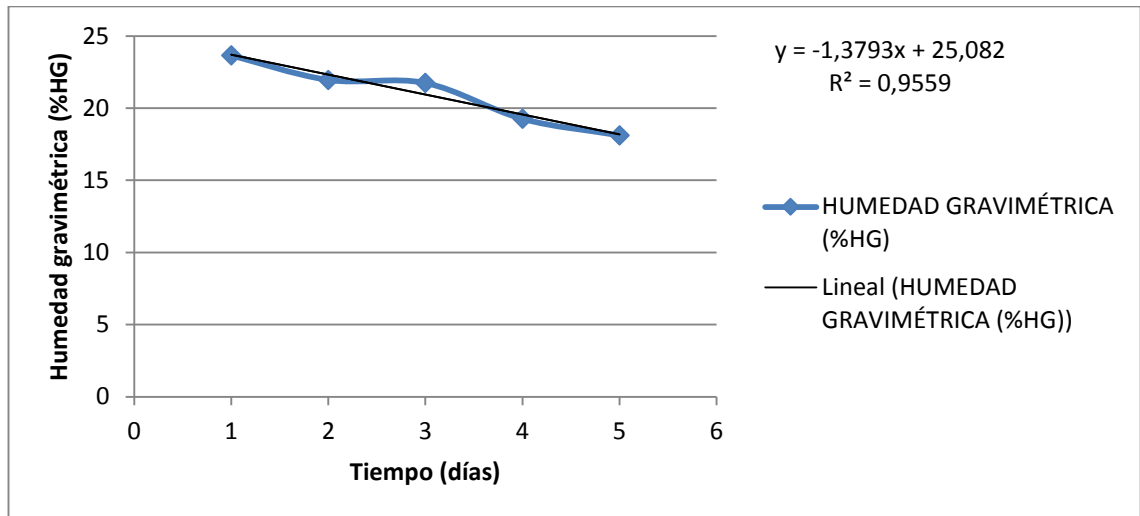
4.1.1.9 Determinación de la Curva de Pérdida de Humedad. La determinación de la curva de pérdida de humedad diaria, tuvo como finalidad, la simulación del comportamiento del suelo en términos de pérdida de agua, con el fin de establecer los volúmenes de riego requerido durante el proceso y evitar la pérdida de las condiciones óptimas para el desarrollo de los microorganismos. Esta curva se elaboró bajo las dos (2) diferentes condiciones de tratamiento que fueron: anaerobias durante la cual el reactor fue sellado con parafina y aerobias donde el reactor fue aireado.

Para la elaboración de cada curva, se analizó la humedad del suelo por el método gravimétrico (Véase Sección 4.1.1.6) durante 5 días, llevando el suelo al inicio del proceso a la capacidad de campo y dejándolo de regar por los cinco días que duró el ensayo.

❖ **Condiciones anaerobias.** La Gráfica 2 relaciona los resultados del porcentaje de humedad gravimétrica (%HG) versus el tiempo, los cuales permitieron establecer la ecuación de la función lineal generada. Aplicando esta ecuación, fue posible predecir la humedad del suelo en cualquier día.

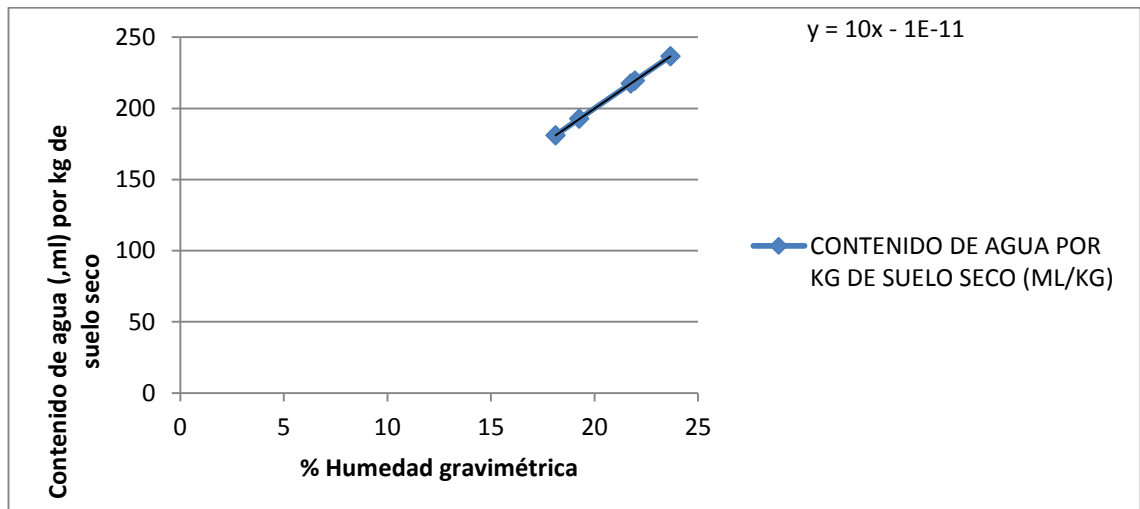
Conociendo el porcentaje de humedad gravimétrica a la capacidad del campo del suelo, en la Gráfica 3 se relacionó ésta con los mililitros de agua que contiene un kilogramo de suelo; es decir, los 23,7% HG corresponden a 237 ml/kg suelo. De la misma manera, se relacionaron los valores de %HG determinados durante el ensayo con los mililitros de agua correspondientes. Para saber la cantidad de agua que se debe agregar en un día determinado durante el tratamiento, se buscó en la Gráfica 2 el %HG correspondiente para este día, luego se halló los mililitros de agua al cual corresponde y se restó de la capacidad de campo este valor.

Gráfica 2. Curva de Pérdida de Humedad diaria en condiciones anaerobias.



Fuente: Autora

Gráfica 3. Curva de contenido de agua por kilogramo de suelo, versus el porcentaje de humedad gravimétrica en condiciones anaerobias.

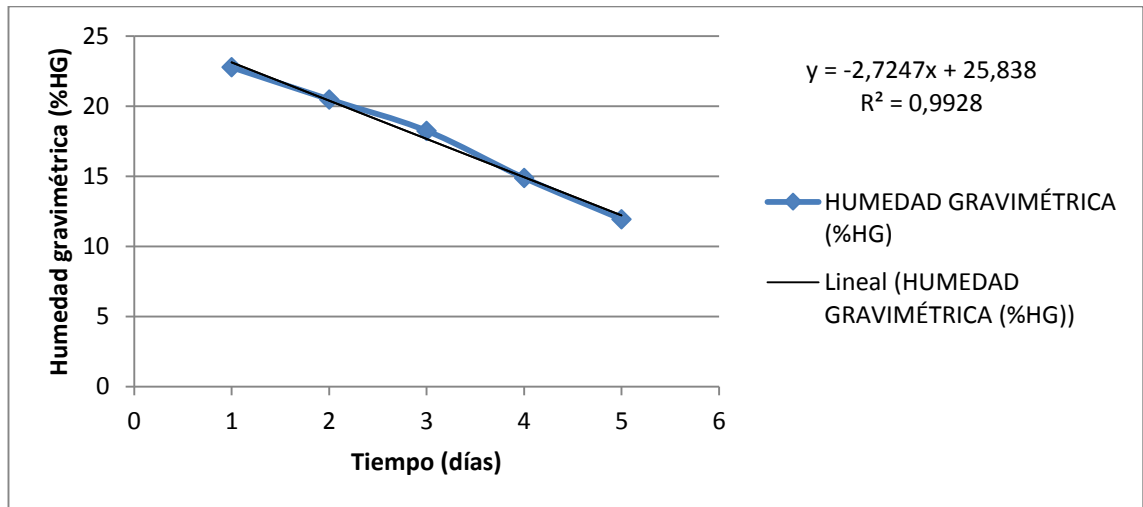


Fuente: Autora

❖ **Condiciones aerobias.** De la misma forma como se llevó a cabo la prueba de pérdida de humedad del suelo bajo condiciones anaerobias, se realizó la misma prueba simulándose las condiciones aerobias.

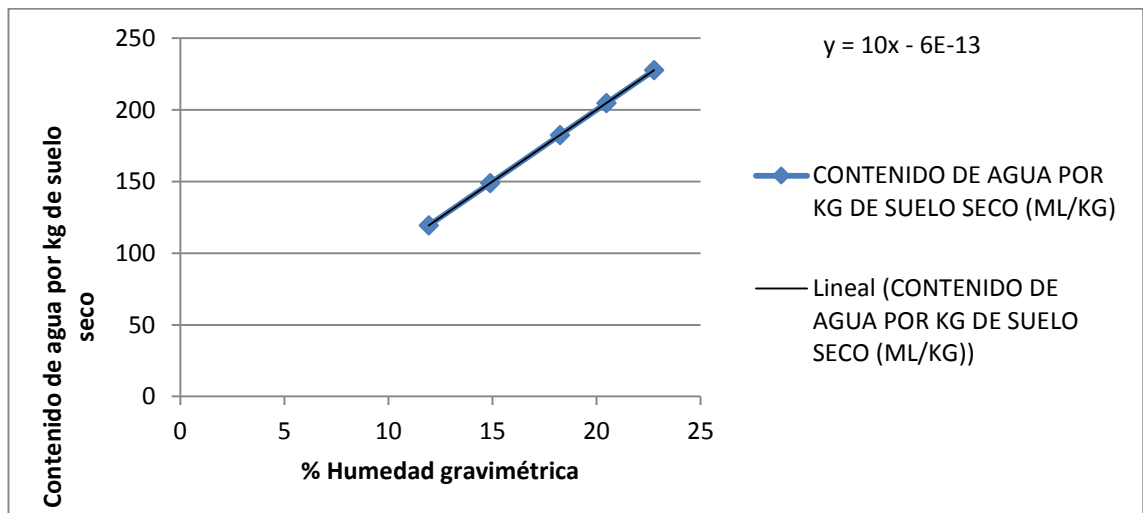
La Gráfica 4 muestra la curva de pérdida de humedad de suelo en condiciones aerobias, y por su parte, la Gráfica 5, representa el volumen de agua contenido en el suelo a determinados porcentajes de humedad gravimétrica.

Gráfica 4. Curva de Pérdida de Humedad en condiciones aerobias.



Fuente: Autora

Gráfica 5. Curva de contenido de agua por kilogramo de suelo, versus el porcentaje de humedad gravimétrica en condiciones aerobias.



Fuente: Autora

4.1.1.10 Determinación del Carbono Orgánico y Materia Orgánica. El carbono orgánico se determinó mediante combustión seca, según la Norma Técnica Colombia NTC 5403. Una vez cuantificado el carbono orgánico, se calculó el contenido de materia orgánica aplicando el factor de Van Bemmelen cuyo valor es de 1.724, deducido estadísticamente y que supone que la materia orgánica contiene un 58% de carbono orgánico (González *et al.*, 2010). La Tabla 16 muestra los resultados obtenidos para el suelo en estudio.

$$\%MO = \% C \times 1,724$$

Tabla 16. Determinación del Carbono Orgánico y Materia Orgánica.

Muestra	%Carbono Orgánico	%Materia Orgánica
Promedio	1,06	1,83

Fuente: Autora

Para el análisis de los valores obtenidos en el suelo analizado correspondientes al carbono y materia orgánica se tuvo en cuenta las interpretaciones señaladas en la literatura y depositadas en las Tablas 17, 18 y 19.

Tabla 17. Interpretación de resultados de Carbono Orgánico.

Interpretación	%Carbono Orgánico
Muy alta	7.90 – 4.90
Alta	4.90 – 3.50
Medio	3.5 – 1.90
Bajo	1.90 – 0.50
Muy bajo	>0.50

Fuente: Ruiz, 2012

Tabla 18. Interpretación de resultados de Materia Orgánica.

Interpretación	%Materia Orgánica
Extremadamente pobre	0 – 0.2
Pobre	0.8 – 2
Regular	2.0 – 4.0
Medianamente rico	4.0 – 8.0
Rico	8.0 – 15.0
Muy rico	15.0 – 30.0
Extremadamente rico	>30.0

Fuente: Ríos, 2005.

Tabla 19. Interpretación de resultados de Materia Orgánica.

Clima	Contenido de Materia Orgánica (%)		
	BAJO	MEDIO	ALTO
Cálido	<2	2 – 3	>3
Medio	<3	3 – 5	>5
Frio	<5	5 – 10	>10

Fuente: Jaramillo, 2002.

Según los resultados obtenidos, se clasificó el suelo con un bajo contenido de carbono orgánico y pobre en contenido de materia orgánica. Como estos parámetros influyen sobre la mayoría de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, por lo tanto, se puede deducir que, el suelo tiene una baja

macroporosidad, baja permeabilidad y poca retención de agua, disminución de la capacidad de intercambio catiónico, y poca fijación de nutrientes en el suelo; lo cual está acorde con los resultados anteriormente expuestos.

4.1.1.11 Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC). A partir del análisis de la CIC se determinó la capacidad del suelo para adsorber cationes e intercambiarlos con la solución del suelo, importante para la nutrición de las plantas. La Tabla 20 muestra los resultados obtenidos para el suelo en estudio.

Tabla 20. Determinación de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).

Muestra	Capacidad de Intercambio Catiónico CIC (meq/100g)
1	18.2
2	17.2
3	17.4
Promedio	17.6

Fuente: Autora

Según el Instituto Geográfico Agustín Codazzi IGAC, un suelo con un resultado entre 10 y 20 meq/100g, se califica como mediana Capacidad de Intercambio Catiónico, es decir, se logra retener una parte de las bases del suelo y la otra se estará perdiendo por procesos de lixiviación, quedando éste con poca reserva de cationes intercambiables.

Este resultado también indica bajos contenidos de materia orgánica y arcillas, pues estas últimas son las partículas más finas del suelo y de carácter coloidal, las que atraen y adsorben los cationes (González *et al*, 2010). De esta forma se da coherencia en el bajo contenido de materia orgánica que presentó el suelo y, la clase textural franca con bajo porcentaje de arcillas y predominancia de arenas y limos, que permiten poca fijación de los cationes intercambiables.

4.1.1.12 Determinación del Nitrógeno total, Nitrógeno orgánico y Fósforo.

Los resultados del porcentaje de nitrógeno total y nitrógeno orgánico, como también el porcentaje de fósforo, se reportan en la Tabla 21.

Tabla 21. Determinación de Nitrógeno total, Nitrógeno orgánico y Fósforo.

Muestra	%Nitrógeno total	%Nitrógeno orgánico	Fósforo (mg/kg)
Promedio	0,12075	0,10256	1,33

Fuente: Autora

Las Tablas 22 y 23, registran las interpretaciones para los contenidos de nitrógeno y fósforo en los suelos según Ríos (2005) y Fuentes (1999).

Tabla 22. Interpretación de resultados de Nitrógeno.

Interpretación	%Nitrógeno
Extremadamente pobre	<0.032
Pobre	0.032 – 0.063
Regular	0.064 – 0.095
Medianamente rico	0.096 – 0.126
Rico	0.127 – 0.158
Muy rico	0.159 – 0.221
Extremadamente rico	>0.221

Fuente: Ríos, 2005.

Tabla 23. Interpretación de resultados de Fósforo.

Interpretación	Fósforo (mg/kg)
Bajo	<15
Normal	15 – 30
Alto	>30

Fuente: Fuentes, 1999.

Con base en los resultados entregados por el Laboratorio de Análisis Químico de Aguas Residuales de la Universidad Pontificia Bolivariana, se evidencia un suelo medianamente rico a rico en términos de nitrógeno, con una baja presencia de fósforo, por lo que fue necesario nivelar éste último para la bioestimulación y bioaumentación del suelo.

4.1.1.13 Determinación inicial de los Cloruros en el suelo. El resultado de la concentración de los cloruros presente al inicio del proceso de biorremediación en el suelo contaminado con pesticidas organoclorados se reporta en la Tabla 24.

Tabla 24. Determinación inicial de los Cloruros en el suelo.

Compuesto	Concentración (mg/kg)
Cloruros	4008,2571

Fuente: Autora

El valor alto de la concentración de los cloruros en el suelo analizado puede indicar la liberación de este ión, a través de un proceso de deshalogenación de los compuestos organoclorados allí presentes, por medio de los microorganismos adaptados a estas sustancias.

4.1.1.14 Determinación inicial de los Pesticidas Organoclorados. La Tabla 25 muestra los resultados reportados por el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas de la Universidad Industrial de Santander, en cuanto a los pesticidas organoclorados identificados y su concentración correspondiente al inicio del tratamiento.

Tabla 25. Determinación inicial de los Pesticidas Organoclorados en el suelo.

Compuesto	Concentración (mg/kg)
<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

Los compuestos organoclorados que fueron identificados forman parte de aquellos que están consignados en la lista de los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP), emitida por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) que se definió en el convenio de Estocolmo en el 2001. Estos COP actúan como potentes pesticidas, son altamente tóxicos, persisten en el ambiente y se acumulan en el tejido adiposo. Por lo tanto, este tratado en una de sus 5 metas busca la eliminación de las antiguas existencias acumuladas y el equipo que contenga contaminantes orgánicos persistentes (PNUMA, 2005).

En la Tabla 25 se observan altas concentraciones que presenta el compuesto DDT y sus metabolitos (DDD y DDE) en el suelo analizado, así como pesticidas Endrín y *trans*-Clordano.

Además estas altas concentraciones correspondientes a DDD y DDE, evidencian un proceso de biodegradación natural en curso del DDT.

Siendo mayores concentraciones de estos tres organoclorados (DDT, DDD y DDE), se pone mayor atención al comportamiento de estos compuestos durante el proceso de biodegradación en estudio.

Finalmente y teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de los suelos contaminados con pesticidas organoclorados en estudio, la Tabla 26 muestra un compendio de su estado inicial.

Tabla 26. Resumen de la caracterización fisicoquímica del suelo.

Propiedad	Interpretación
Textura	Suelo Franco con predominancia de arenas y limos.
Granulometría	Suelo bien gradado
pH H₂O / pH KCl	Suelo neutro – moderadamente ácido
ΔpH	Predominancia de carga negativa (-), intercambiador catiónico
Conductividad eléctrica	Suelo no salino
Densidad Aparente	Degradación del suelo por compactación, baja macroporosidad.
Humedad	Bajo almacenamiento de agua
Capacidad de campo	Buena capacidad de retención de humedad a capacidad de campo
Carbono orgánico	Bajo contenido de carbono orgánico
Materia orgánica	Suelo pobre en materia orgánica
Capacidad de intercambio catiónico	Media (regular adsorción de nutrientes esenciales para las plantas)
Nitrógeno	Suelo medianamente rico a rico en nitrógeno
Fósforo	Bajo contenido de fósforo

Fuente: Autora

Relacionando las propiedades analizadas en el suelo, se evidenció que el bajo contenido de materia orgánica y partículas coloidales, desfavorece la capacidad de intercambiar cationes con el suelo para aportar nutrientes a las plantas, además de obtenerse bajos contenidos de nutrientes esenciales como el fósforo. Debido a la baja macroporosidad de las partículas limosas que predominan en la textura del suelo en estudio como también una alta densidad aparente, se evidencia una degradación por compactación.

En general, el suelo presentó características de infertilidad, debido a la alta afectación antrópica que sufrió en el pasado, producto de actividades agrícolas extensivas. Sin embargo, es un suelo con alto potencial de restauración, debido a que presenta pH óptimos y buena gradación de las partículas que lo conforman. El pH que presenta el suelo favorece la presencia de los iones H⁺ como donadores de electrones en las reacciones de reducción (*deshalogenación reductiva*).

Finalmente, la predominancia de cargas negativas en el suelo podría estar relacionada por la eliminación de los cloruros (Cl⁻) durante un proceso de biodegradación natural de los compuestos organoclorados presentes en el suelo, lo cual confirma las altas concentraciones de los metabolitos del DDT identificados en el suelo de interés.

4.1.2 Caracterización microbiológica inicial del suelo contaminado con pesticidas organoclorados. Para la caracterización microbiológica inicial se realizó el recuento de células viables, el aislamiento e identificación taxonómica descrita en los siguientes numerales. A esta fase del proyecto se atribuyó una exhaustiva dedicación, por la importancia que ejercen los microorganismos en el proceso de biodegradación de los compuestos organoclorados, lo cual fue el foco de este proyecto.

4.1.2.1 Recuento inicial de células viables. El recuento de células viables o recuento en placa fue realizado por el método de la gota o de Miles y Misra, el cual dejó como resultado una concentración de bacterias correspondiente a 3×10^7 ufc/gss (Ver Anexo F).

Según Ríos (2005), el número de microorganismos heterótrofos totales en el suelo, por lo general, se encuentra en una cuenta de 10^7 a 10^9 UFC por gramo de suelo; para bacterias degradadoras potenciales en suelos no contaminados entre 10^5 y 10^6 ; y entre 10^6 y 10^8 en suelos contaminados. Por lo tanto, el suelo en estudio presenta un contenido de bacterias considerado como alto con respecto al valor típico de microorganismos heterótrofos totales. Estos valores también corresponden a los datos reportados sobre poblaciones microbianas adaptadas por periodos prolongados a los contaminantes (Ríos, 2005).

4.1.2.2 Aislamiento e identificación de bacterias nativas. Se aislaron 37 cepas del suelo contaminado con pesticidas organoclorados. El Anexo G presenta las imágenes correspondientes a las características e identificación de las cepas aisladas.

❖ **Evaluación de morfotipos macroscópicos:** La caracterización macroscópica se realizó a través de una descripción de las colonias aisladas. Fueron descritas de acuerdo a su tamaño, forma, superficie, color, contextura y elevación, como se muestra en la Tabla 27.

Tabla 27. Caracterización macroscópica de cepas aisladas.

Colonia	Tamaño	Forma	Elevación	Color	Superficie	Consistencia
1	Pequeña	Continua	Convexa	Morada	Brillante	Mucoide
2	Pequeña	Continua	Convexa	Morada	Brillante	Mucoide
3	Mediana	Continua	Convexa	Morada	Brillante	Mucoide
4	Mediana	Irregular	Plana	Morada	Brillante	Mucoide
5	Pequeña	Continua	Convexa	Rosada	Brillante	Mucoide
6	Pequeña	Continua	Convexa	Morada clara	Brillante	Mucoide
7	Mediana	Continua	Convexa	Morada	Brillante	Mucoide
8	Mediana	Continua	Convexa	Morada	Brillante	Creмосa
9	Mediana	Continua	Convexa	Morada	Brillante	Mucoide
10	Grande	Continua	Plana	Morada	Brillante	Mucoide
11	Mediana	Continua	Plana	Morada	Opaca	Creмосa
12	Mediana	Continua	Levemente mamelona	Morada	Brillante	Mucoide
13	Mediana	Irregular	Plana	Morada	Opaca	Creмосa
14	Mediana	Continua	Convexa	Morada	Brillante	Mucoide
15	Mediana	Continua	Plana	Café	Opaca	Mucoide
16	Mediana	Continua	Plana	Morada	Brillante	Mucoide
17	Grande	Irregular	Plana	Morada	Brillante	Mucoide
18	Mediana	Continua	Plana	Morada	Brillante	Mucoide
19	Mediana	Continua	Levemente Convexa	Morada-Café	Brillante	Mucoide
20	Grande	Irregular	Plana	Blanca	Opaca	Creмосa
21	Puntiforme	Continua	Convexa	Rosada	Brillante	Creмосa
22	Mediana	Continua	Plana	Morada	Brillante	Creмосa
23	Grande	Continua	Plana	Morada - Café	Brillante	Creмосa
24	Grande	Continua	Plana	Morada	Brillante	Mucoide
25	Grande	Continua	Plana	Morada	Brillante	Mucoide
26	Grande	Continua	Convexa	Fucsia	Brillante	Creмосa
27	Mediana	Continua	Plana	Morada	Brillante	Mucoide
28	Pequeña	Continua	Convexa	Morada	Brillante	Mucoide
29	Mediana	Continua	Levemente convexa	Morada	Brillante	Mucoide
30	Pequeña	Continua	Plana	Morada-Café	Opaca	Mucoide
31	Mediana	Continua	Plana	Morada	Brillante	Creмосa
32	Grande	Continua	Convexa	Fucsia	Opaca	Creмосa
33	Mediana	Continua	Levemente convexa	Fucsia	Opaca	Mucoide
34	Pequeña	Continua	Convexa	Morada - Café	Brillante	Mucoide
35	Mediana	Irregular	Convexa	Fucsia	Brillante	Creмосa
36	Mediana	Continua	Convexa	Morada	Brillante	Creмосa
37	Grande	Continua	Convexa	Morada	Brillante	Mucoide

Fuente: Autora

❖ **Evaluación de morfotipos microscópicos:** La clasificación de morfotipos microscópicos se realizó a partir de la tinción de Gram. La Tabla 28 reporta la identificación hecha a través de su observación en el microscopio.

Tabla 28. Caracterización microscópica de cepas aisladas.

Colonia	Gram
1	Cocobacilos Gram (-)
2	Cocobacilos Gram (-)
3	Bacilos Gram (-)
4	Bacilos Gram (-)
5	Bacilos Gram (-)
6	Bacilos Gram (-)
7	Cocobacilos Gram (-)
8	Diplobacilos Gram (-)
9	Bacilos Gram (-)
10	Bacilos Gram (-)
11	Bacilos Gram (-)
12	Bacilos Gram (-)
13	Bacilos Gram (-)
14	Diplobacilos Gram (-)
15	Bacilos Gram (-)
16	Bacilos Gram (-)
17	Bacilos Gram (-)
18	Cocobacilos Gram (-)
19	Bacilos Gram (-)
20	Estreptobacilos Gram (+)
21	Bacilos Gram (-)
22	Bacilos Gram (-)
23	Bacilos Gram (-)
24	Bacilos Gram (-)
25	Bacilos Gram (-)
26	Bacilos Gram (-)
27	Bacilos Gram (-)
28	Bacilos Gram (-)
29	Bacilos Gram (-)
30	Bacilos Gram (-)
31	Bacilos Gram (-)
32	Bacilos Gram (-)
33	Bacilos Gram (-)
34	Bacilos Gram (-)
35	Bacilos Gram (-)
36	Bacilos Gram (-)
37	Bacilos Gram (-)

Fuente: Autora

❖ **Identificación bioquímica a través de sistemas miniaturizados API 20 NE (No Fermentadoras):** Se realizó la identificación de las cepas aisladas a través del sistema API 20NE, el cual permite la tipificación de bacilos Gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias. De las 37 cepas obtenidas en cultivos axénicos, 36 de ellas estaban en un medio selectivo de bacilos gram negativos (Agar McConkey) a las cuales se les aplicó la prueba de oxidasa para poder confirmar su afinidad con este sistema. 19 cepas resultaron positivas a la oxidasa, clasificándolas como bacterias no entéricas, y las otras 17 cepas resultaron negativas a esta misma prueba, es decir, que correspondían a bacterias entéricas. La cepa restante se obtuvo en medio de cultivo Agar Tripticosa de Soya y correspondió a un bacilo gram positivo.

En la Tabla 29 se indica la especie reportada por el API 20NE para cada una de las cepas aisladas y compatibles con esta prueba. Mientras que en la Tabla 30 se presenta la posible taxonomía de las cepas que no se identificaron por este sistema.

Tabla 29. Identificación bioquímica a través de API 20NE de cepas aisladas.

Cepa	Especie de Bacteria según API 20 NE
1	<i>Aeromonas caviae</i>
2	<i>Burkholderia cepacia</i>
3	<i>Aeromonas caviae</i>
4	<i>Burkholderia cepacia</i>
5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
6	<i>Burkholderia cepacia</i>
7	Posible* <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8	<i>Aeromonas caviae</i>
9	<i>Burkholderia cepacia</i>
10	Posible* <i>Pseudomonas mendocina</i>
11	Posible* <i>Pseudomonas putida</i>
12	Posible* <i>Pseudomonas putida</i>
13	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
14	Posible* <i>Aeromonas caviae</i>
15	Posible* <i>Pseudomonas fluorescens</i>
16	Posible* <i>Pseudomonas putida</i>
17	Posible* <i>Burkholderia gladioli</i>
18	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
19	<i>Burkholderia cepacia</i>

*Posible: aquella cepa cuyo resultado arrojado por el API 20NE no corresponde a un 90% o más.

Fuente: Autora

Tabla 30. Posible taxonomía según bibliografía de las cepas aisladas no identificadas por API 20 NE.

Cepa	Posible especie de Bacteria
20	<i>Bacillus sp</i>
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	Enterobacterias:
29	<i>Serratia,</i>
30	<i>Citrobacter,</i>
31	<i>Enterobacter,, Klebsiella y Escherichia</i>
32	
33	
34	
35	
36	
37	

Fuente: Autora

Los géneros bacterianos encontrados en el suelo al inicio de la investigación, demuestra la adaptación de cepas con potencial degradativo de compuestos organoclorados, y que además, han sido reportados en la literatura como importantes en la biorremediación de suelos y agua. Entre ellas *Burkholderia cepacia*, *Pseudomona putida*, *Pseudomona fluorescens*, *Aeromona caviae*, *Bacillus sp*.

4.2 EVALUACIÓN DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Para las cuatro (4) diferentes condiciones establecidas en la biorremediación en estudio, se utilizaron recipientes plásticos de 14 L de volumen, en el cual se trataron 8,5 kg de suelo contaminado. Los recipientes fueron cubiertos con papel kraft para evitar la entrada de la luz solar y las interferencias de ésta en los procesos de degradación de los compuestos organoclorados, como se muestra en la Figura 19.

Figura 19. Recipientes utilizados en la biorremediación.



Fuente: Autora

El rango establecido para mantener la humedad del suelo durante el sistema de biorremediación fue entre el 50 y 70% de la humedad gravimétrica (%HG) a capacidad de campo, según el reporte de la bibliografía. Bajo éstas circunstancias y de acuerdo a los resultados obtenidos de la capacidad de campo del suelo en estudio, éste fue mantenido con un porcentaje de humedad entre 11,85%HG y 16,59%HG, para lograr un adecuado desarrollo del tratamiento de biorremediación.

Considerando que la capacidad de campo del suelo en estudio fue 23,7%HG, lo que corresponde a 237ml/kg de suelo (Véase Gráfica 3), se adicionó a cada recipiente 142 ml/kg suelo, es decir, un total de 1209 ml en cada bioreactor, para acondicionarlo al 60% de su capacidad de campo al inicio del proceso de biorremediación y favorecer la actividad microbiana del suelo.

Fase 1: Condiciones anaerobias

Esta fase duró 8 semanas y se manejó una frecuencia de riego a partir de los resultados que arrojó la curva de pérdida de humedad para la fase anaerobia (Véase sección 4.1.1.9), como se muestra en la Tabla 31.

Tabla 31. Condiciones de riego en la fase anaerobia.

Días de la semana	Cantidad de agua (ml)
Lunes	245
Miércoles	245
Viernes	350

Fuente: Autora

Fase 2: Condiciones aerobias

Esta fase duró 5 semanas y al igual que en la fase anaerobia, se estableció una frecuencia de riego según el análisis de pérdida de humedad bajo condiciones aerobias, detallado en la Sección 4.1.1.9. Las condiciones de riego establecidas para esta fase se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32. Condiciones de riego en la fase aerobia.

Días de la semana	Cantidad de agua (ml)
Lunes	520
Miércoles	520
Viernes	705

Fuente: Autora

El sistema de aireación se fundamentó en la inyección de aire a través de un blower a un flujo de 330L/min. Sin embargo, basados en que el aire está compuesto en un 21,5% de oxígeno, la cantidad de oxidante introducido al sistema fue de 71L/min o 102m³/día.

4.2.1 Evaluación de la bioestimulación como un método para la biodegradación de los pesticidas organoclorados en el suelo contaminado.

En esta etapa se adicionaron nutrientes con el fin de estimular el crecimiento de los microorganismos biodegradados de los pesticidas presentes en el suelo. Para determinar la dosis del requerimiento de nutrientes, se determinó una relación C: N: P recomendada por la literatura igual a 100:10:1 (Fuentes, 1999; Blaine, 1993).

El contenido inicial de carbono, nitrógeno, y fósforo en el suelo analizado se muestra en la Tabla 33.

Tabla 33. Contenido de Carbono, Nitrógeno, y Fósforo en el suelo.

%CARBONO	%NITRÓGENO	%FÓSFORO
1,06	0,1026	0,000133

Fuente: Autora

Relación C/N 100:10

$$\frac{C}{N} = \frac{1,06\%}{0,1026\%} = 10,336$$

La relación C/N encontrada cumple con la recomendación bibliográfica; por lo tanto, no fue necesario adicionar fuente de nitrógeno al sistema de biorremediación.

Relación C/P 100:1

$$\frac{C}{P} = \frac{1,06\%}{0,000133\%} = 7,97$$

Por su parte, en la relación C/P se observó una deficiencia de fósforo para lograr la relación óptima. Para ello, se determinó la cantidad necesaria de fósforo para nivelarse.

$$\frac{C}{P} = \frac{100}{1} = 100 ; \quad \text{Por lo tanto:} \quad \frac{1,06\%}{P} = 100$$

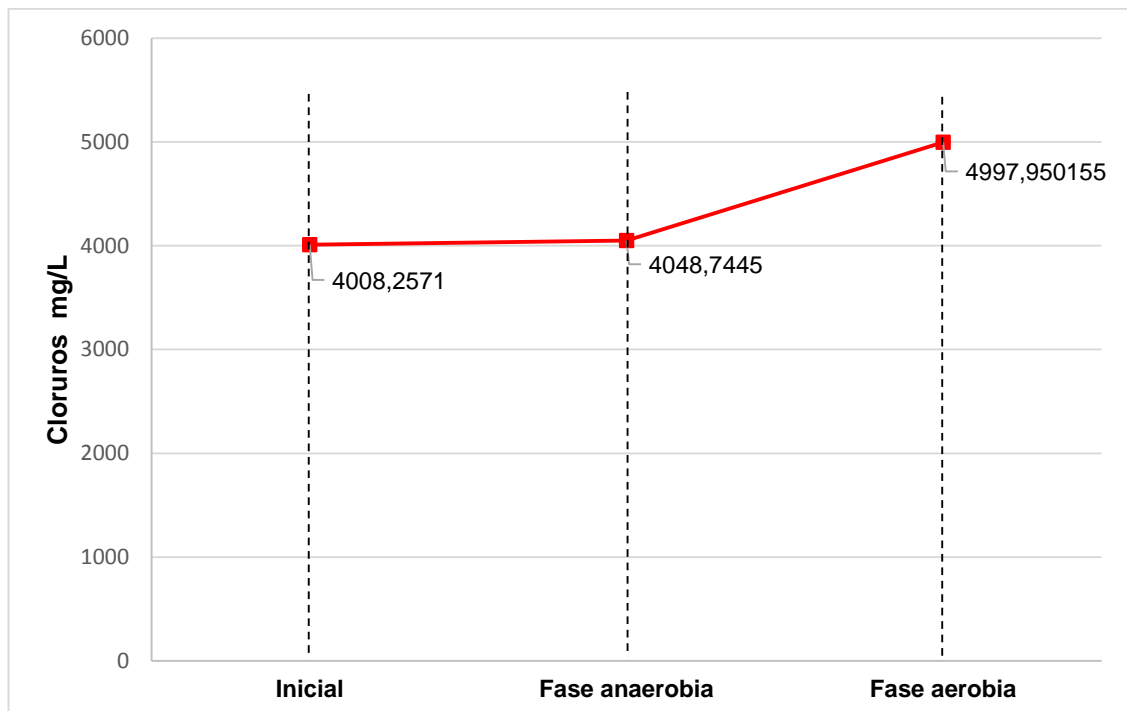
$$P = \frac{1,06\%}{100} = 0,0106\% \quad P_{\text{faltante}} = 0,0106\% - 0,000133\%$$

$$P_{\text{faltante}} = 0,010467\% \quad \text{Correspondiente a:} \quad P_{\text{faltante}} = 104,67 \text{ mg/kg}$$

Lo anterior indicó la necesidad de adicionar 104,67 mg de Fósforo por kg suelo. Debido a que los reactores contenían 8,5 kg, se agregaron en total 0,889 g de K_2HPO_4 (Merck®).

4.2.1.1 Análisis de los Cloruros remanentes en el suelo tratado. El comportamiento de los cloruros en el suelo durante el tratamiento de bioestimulación del suelo contaminado con pesticidas organoclorados, presentó una tendencia creciente, lo cual indicaría un proceso de deshalogenación en curso. El cambio en la concentración de los cloruros durante el proceso de bioestimulación se presenta en la Gráfica 6.

Gráfica 6. Comportamiento de los Cloruro en el suelo durante la bioestimulación.



Fuente: Autora

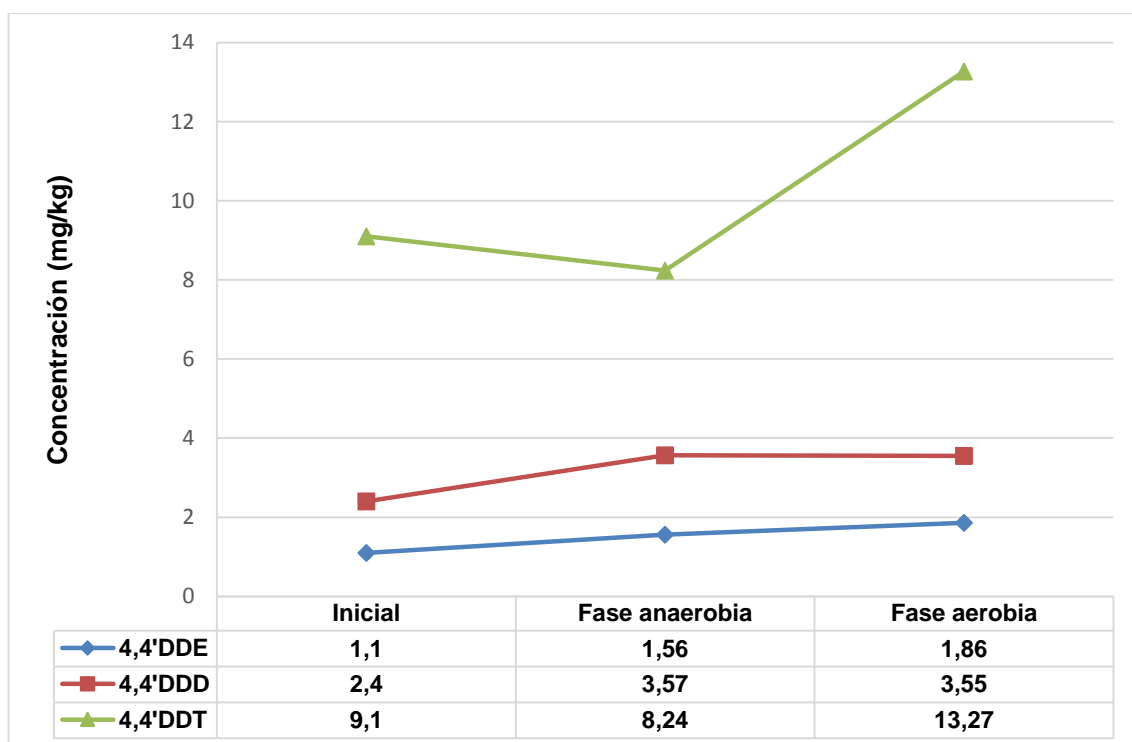
El incremento en la concentración de los cloruros durante la fase anaerobia fue de 40,5 mg/L, mientras que en la fase aerobia aumentó en un 949,2 mg/L.

El aumento de los cloruros remanentes en el suelo en las dos fases no resultó ser proporcional. Se observa menor proporción de éstos en la fase anaerobia, lo cual se podría explicar por una competitividad que presentan los microorganismos recién estimulados en el suelo por la adición de nutrientes, y su preferencia por tomar el fósforo para su metabolismo.

El sistema de tratamiento completo obtuvo un aumento total de los cloruros en 989,7 mg/L.

4.2.1.2 Análisis de los Pesticidas organoclorados remanentes en el suelo tratado. La Gráfica 7 ilustra el cambio de la concentración de los compuestos organoclorados durante el tratamiento anaerobio y aerobio por medio de la bioestimulación de las bacterias nativas.

Gráfica 7. Determinación de los pesticidas organoclorados durante la bioestimulación.



Fuente: Autora

De acuerdo a lo esperado, la fase anaerobia favoreció la deshalogenación del DDT, compuesto con más cloros en su estructura (Rittmann y McCarty, 2001). Por lo tanto, se observa una reducción de la concentración de este compuesto en esta fase en 0,86 mg/kg, lo cual representa un 9,5% de remoción. Así mismo, los compuestos DDD, y DDE incrementaron su concentración a 3,57mg/kg y 1,56 mg/kg respectivamente. Considerando que el DDD representa el principal

metabolito en la vía degradativa de DDT en condiciones anaerobias, el aumento de su concentración resulta esperado (Betancourt, 2013).

Por su parte, en la fase aerobia se presentó un aumento en el metabolito DDE, el cual representa el principal producto de degradación del DDT en condiciones oxidativas (Betancourt, 2013).

Resulta importante resaltar que durante la fase aerobia se presentó un aumento significativo en la concentración de los cloruros en el suelo, lo cual supone una degradación por deshalogenación oxidativa de los pesticidas. Por su parte, el análisis de la concentración de los compuestos organoclorados remanentes en el suelo, señala un incremento considerable de éstos, en vez de un descenso esperado. Este comportamiento se puede atribuir a una posible desorción del contaminante de la matriz del suelo (Betancourt, 2013), ya que se descartan errores en la identificación de los compuestos evaluados, debido a los controles analíticos utilizados para su cuantificación.

Por lo anterior se supone que la posible desorción de los contaminantes aumenta la biodisponibilidad de éstos, favoreciendo la deshalogenación oxidativa, la cual se manifiesta en el aumento de la concentración de los cloruros.

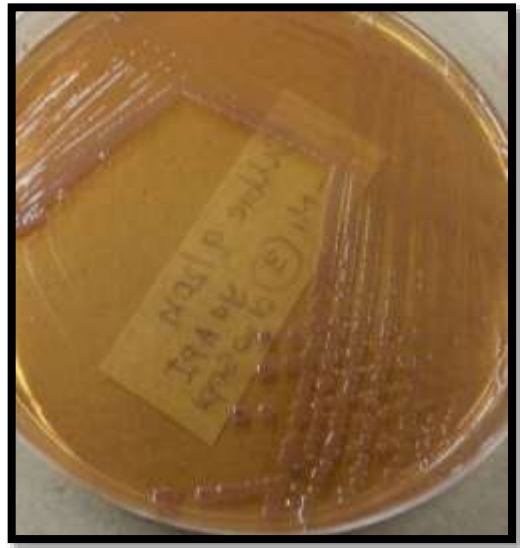
4.2.2 Evaluación de la bioaumentación como una técnica para la eliminación de los pesticidas organoclorados en el suelo contaminado. En esta condición experimental, se evaluó la incidencia para la eliminación de pesticidas organoclorados de un consorcio de microorganismos nativos, bioaumentado en laboratorio e inoculado al suelo, manteniendo a su vez las condiciones nutricionales y de riego como se explica en la Sección 4.2.

4.2.2.1 Selección del consorcio bacteriano degradador de los pesticidas organoclorados. A partir de la caracterización microbiológica inicial, se seleccionaron 4 géneros bacterianos de las 37 cepas aisladas e identificadas. Esta selección tuvo en cuenta las referencias bibliográficas, antecedentes y capacidad de la bacteria para tolerar condiciones anaerobias y aerobias. Las bacterias elegidas fueron: *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas caviae*, y *Bacillus sp.*, como se muestra en la Figura 20.

Figura 20. Consorcio microbiano para bioaumentación.



(a)



(b)



(c)



(d)

(a) *Burkholderia cepacia* (b) *Pseudomona fluorescens* (c) *Aeromona caviae*
(d) *Bacillus* sp.

Fuente: Autora

Una descripción en la literatura de las bacterias seleccionadas indica lo siguiente:

Género *Burkholderia*, es un grupo de bacterias Gram negativas no fermentadoras, aerobias y productoras de catalasa. Algunas especies *Burkholderia* pueden exhibir la respiración anaeróbica con nitrato. La cepa de algunas de las especies (*B. cepacia*, *B. vietnamiensis*) son capaces de fijar N_2 (Breed, 1948).

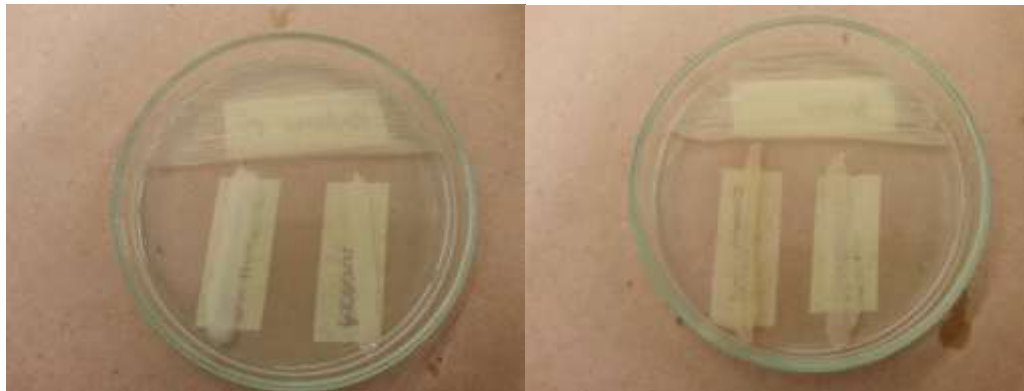
Género *Pseudomonas fluorescens* es una bacteria gram negativa. Son aerobias obligadas así lo requieren oxígeno para sobrevivir, es incapaz de crecer en condiciones anaeróbicas sin embargo, algunas cepas son capaces de utilizar el nitrógeno como el aceptor final de electrones en lugar de oxígeno durante la respiración celular.

Género *Aeromonas caviae* son bacterias anaerobias facultativas, bacilos o cocobacilos gram positivos. Reducen nitratos a nitritos.

Género *Bacillus sp*, son bacilos de gran tamaño, gram positivos, aerobios o anaerobios facultativos encapsulados. Forman esporas extraordinariamente resistentes a condiciones desfavorables.

4.2.2.2 Pruebas de compatibilidad. Las pruebas de compatibilidad se realizaron en medio de cultivo Agar Trypticasa de soya, en diferentes combinaciones de las 4 cepas seleccionadas, como se observa en la Figura 21.

Figura 21. Prueba de compatibilidad de cepas.



(a)

(b)

(a) Compatibilidad de las cepas *Bacillus sp*, *Aeromonas c.* y *Pseudomonas f.*

(b) Compatibilidad de las cepas *Aeromonas c.*, *Burkholderia c.* y *Pseudomonas f.*

Fuente: Autora

En la Figura 21 se ilustra la prueba de compatibilidad entre las bacterias señaladas, donde se percibe el crecimiento proporcional de las cepas sembradas e identificadas por una etiqueta debajo de cada caja de Petri. Luego de incubación de las cepas se observó que no hubo inhibición por parte de ninguna cepa hacia otra, por lo tanto, todas las bacterias se mostraron compatibles y se seleccionaron para formar el consorcio en el tratamiento de los suelos mediante la bioaumentación.

4.2.2.3 Bioaugmentación de las bacterias degradadoras de los pesticidas organoclorados. Las 4 cepas seleccionadas se bioaumentaron en el laboratorio en caldo nutritivo, como se muestra en la Figura 22.

Figura 22. Bioaugmentación de consorcio bacteriano.



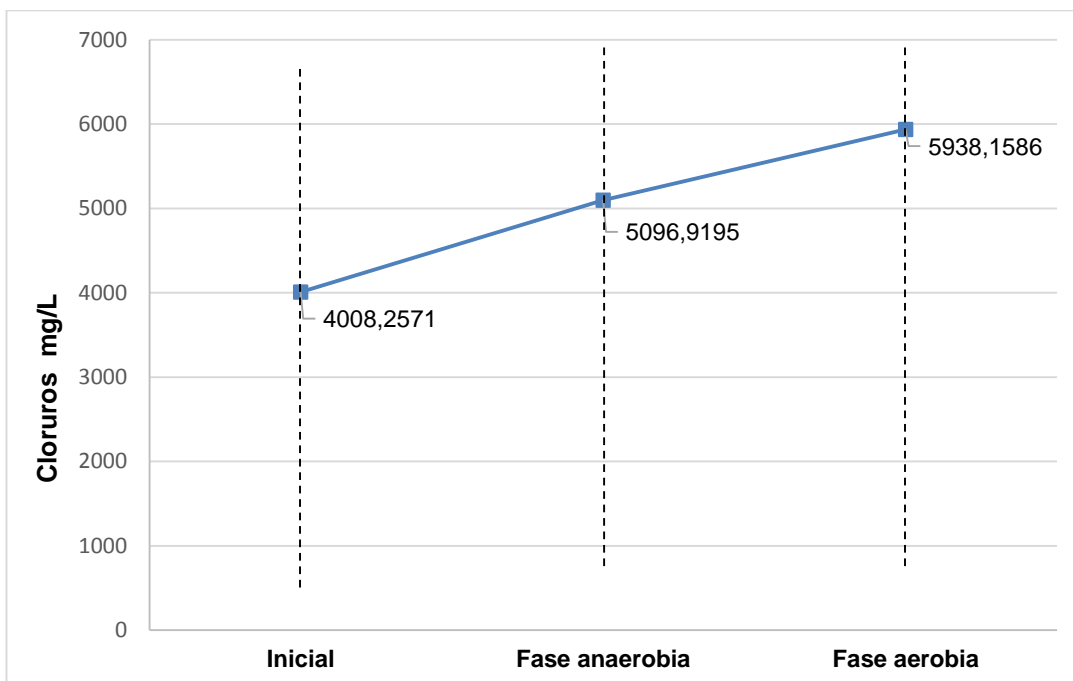
Fuente: Autora

En la Figura 22, se puede observar la turbidez que caracteriza la presencia de los microorganismos inoculados en el caldo bacteriano.

4.2.2.3 Determinación y análisis de la degradación de los compuestos organoclorados durante el proceso de bioaugmentación.

❖ **Cloruros en el suelo:** la variación de la concentración de los cloruros en el suelo, durante el tratamiento de bioaugmentación del suelo contaminado con pesticidas organoclorados se presenta en la Gráfica 8.

Gráfica 8. Comportamiento de los Cloruro en el suelo durante la bioaumentación.



Fuente: Autora

Durante la bioaumentación se presentó una liberación constante de cloruros (Cl) en el suelo presentando el aumento de 1088,7mg/L en la fase anaerobia y 841.24 mg/L en la fase aerobia, para un total de 1929,9 mg/kg desde el inicio al final del proceso de biorremediación, correspondiente a un 48%.

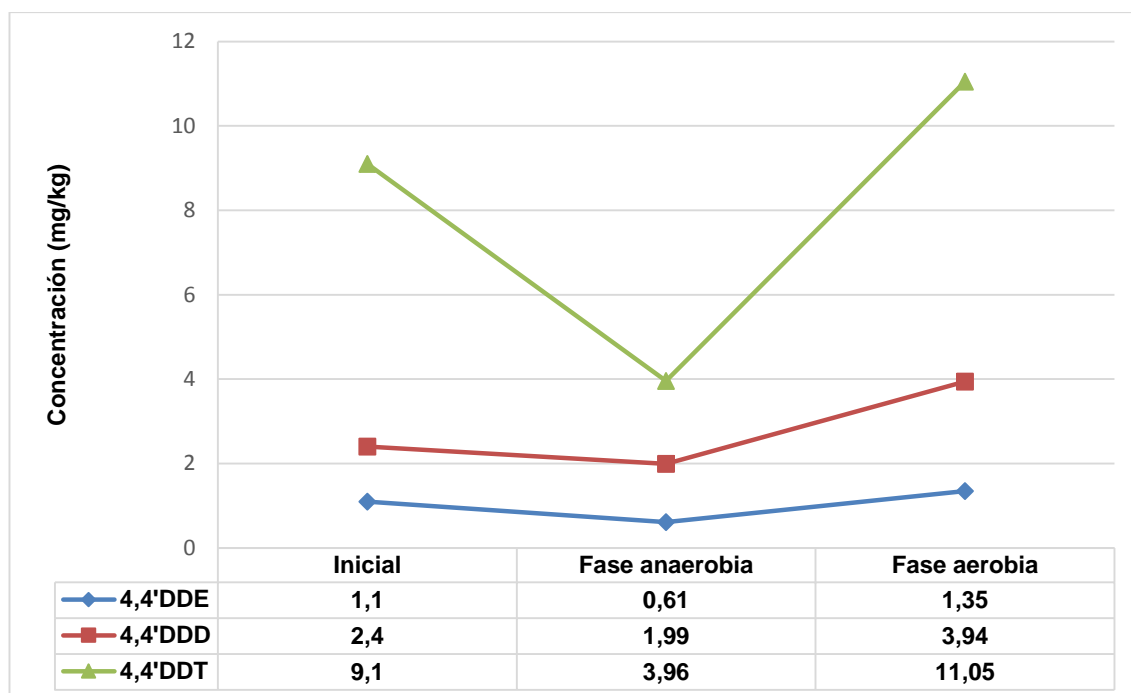
Considerando esto como un indicio de la biodegradación de los compuestos organoclorados analizados, se evidencia la efectividad de este tratamiento donde las bacterias realizan la deshalogenación reductora de los pesticidas seguida de una dechloración oxidativa.

De igual manera se puede visualizar mayor eficiencia de este tratamiento bajo las condiciones anaerobias en comparación de las condiciones aerobias (señalado en la literatura).

Es probable que la adición de los microorganismos de alta eficiencia en la remoción de los pesticidas organoclorados aumente la dinámica del proceso de degradación anaerobia.

❖ **Análisis de los Pesticidas organoclorados remanentes en el suelo tratado:** la transformación de los pesticidas organoclorados analizados durante la biorremediación del suelo mediante bioaumentación, se muestra en la Gráfica 9.

Gráfica 9. Determinación de los Pesticidas organoclorados durante la bioaumentación.



Fuente: Autora

Las condiciones anaerobias favorecieron la deshalogenación reductiva del DDT y sus metabolitos. Esto podría atribuirse al incremento de los microorganismos de alta eficiencia en la degradación de los compuestos organoclorados evaluados bajo estas condiciones, en conjunto con la nivelación de los nutrientes cuales permiten su óptimo desarrollo. La remoción de los pesticidas obtenida durante la fase anaerobia corresponde a un 56.4% para DDT, el 44.5% de DDE y una eficiencia de 17.1% correspondiente a la eliminación de DDD.

De igual manera como en el tratamiento por bioestimulación, en la fase aerobia se observa el aumento de la concentración de los pesticidas del suelo, el cual se puede justificar por un proceso de desorción de éstos (Betancourt, 2013).

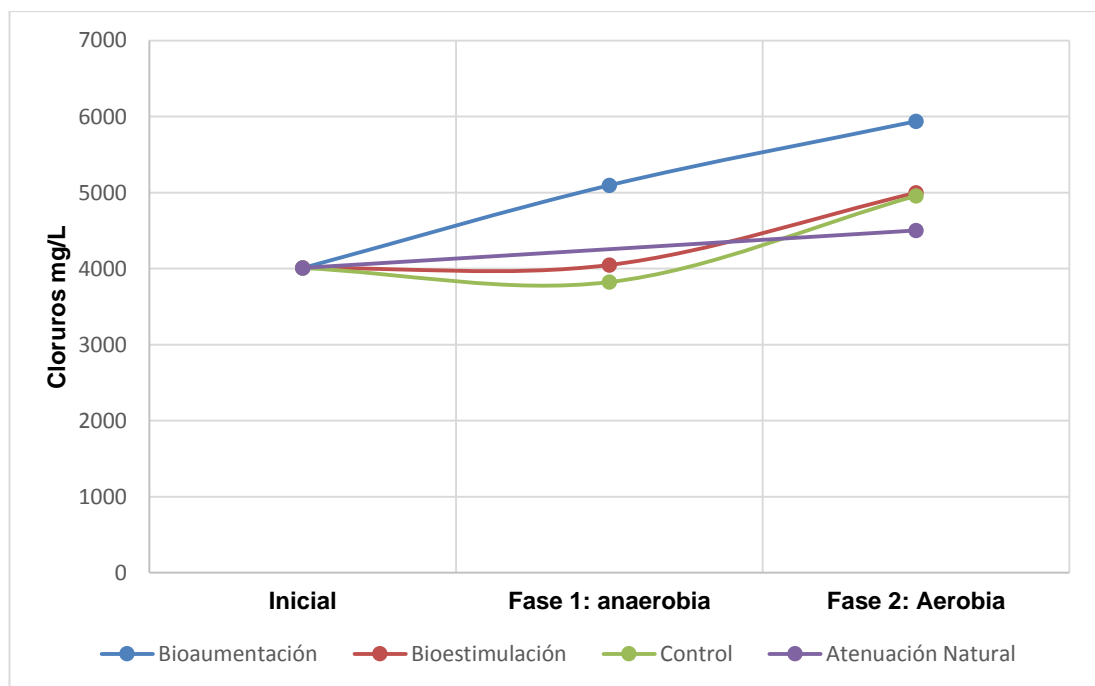
Relacionando el incremento en la concentración de los compuestos organoclorado en la fase aerobia con el crecimiento de los cloruros remanentes en el suelo de interés, se puede considerar que al iniciar esta etapa hay un proceso de desorción de los pesticidas simultáneo con un proceso de deshalogenación oxidativa, estimulado por la biodisponibilidad de los contaminantes.

4.3 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE LOS PESTICIDAS ORGANOCLORADOS Y EL CAMBIO DE LA MICROBIOTA, DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN EN LAS DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES

En esta sección se muestra la variación de la concentración de los cloruros y de los pesticidas organoclorados durante el proceso de biorremediación, y su respectiva comparación entre las diferentes condiciones experimentales evaluadas.

4.3.1 Variación de la concentración de los cloruros en el suelo durante el proceso de biorremediación. La Gráfica 10 muestra la variación de los cloruros durante el proceso de biorremediación en las cuatro (4) condiciones experimentales evaluadas.

Gráfica 10. Variación de los cloruros en suelo durante la biorremediación.



Fuente: Autora

La grafica 10 muestra importante aumento en la concentración de los cloruros remanentes al final de las biorremediaciones en todas las condiciones experimentales evaluadas, señalando una deshalogenación persistente de los pesticidas en el tiempo.

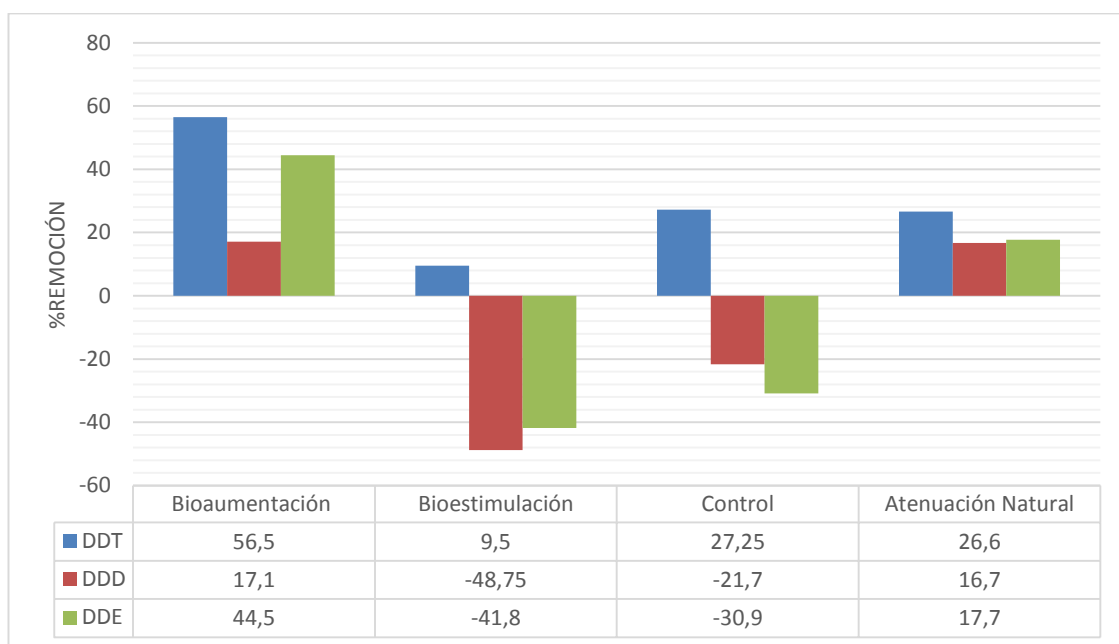
Los mejores resultados los presenta el proceso de bioaumentación, y los menos favorables llegan a ser la atenuación natural.

El reactor control muestra un mayor incremento en la concentración de los iones cloruro, en contraste con la atenuación natural. Esto deja en evidencia la necesidad de degradación de los compuestos organoclorados a través de condiciones anaeróbicas y aeróbicas secuenciales. (Rittmann y McCarty, 2001; Sims et al., 1991).

Se encuentra interesante resultado obtenido en el tratamiento, donde se aplica el control de las condiciones (anaerobias – aerobias) en comparación con la atenuación natural. En ambos casos, la biodegradación toma su ruta, pero el primer sistema se encuentra forzado por la restricción de las condiciones, lo cual inhibe el crecimiento microbiano reflejado posteriormente en un incremento de la concentración de los cloruros inferior que en el suelo de la atenuación natural.

4.3.2 Comparación del porcentaje de remoción de los compuestos organoclorados, durante el proceso de biorremediación. La Gráfica 11 presenta los porcentajes de remoción de los pesticidas organoclorados evaluados, durante las primeras 8 semanas de tratamiento, es decir, durante la fase anaerobia para la bioaumentación, bioestimulación y el control de condiciones.

Gráfica 11. Remociones de los pesticidas organoclorados durante las primeras 8 semanas (Fase anaerobia).



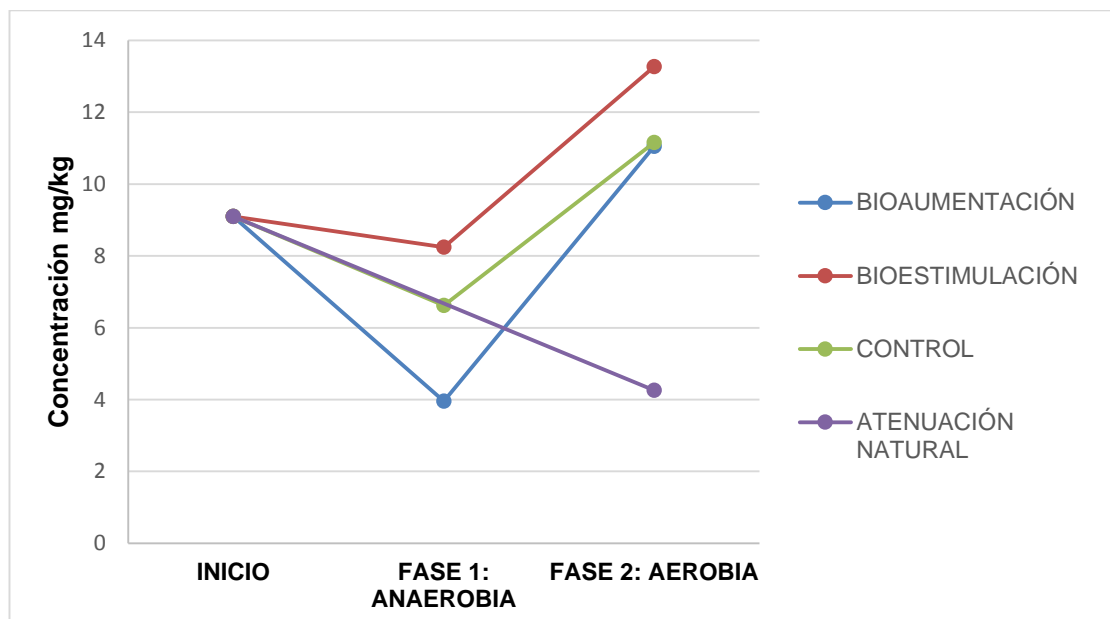
Fuente: Autora

Durante la fase anaerobia se logró la reducción del compuesto más halogenado (DDT) en las 4 condiciones experimentales, donde los mejores resultados se presentan en el tratamiento por bioaumentación.

El proceso de bioestimulación no resultó ser favorable posiblemente por la competencia entre los microorganismos estimulados por la adición de nutrientes.

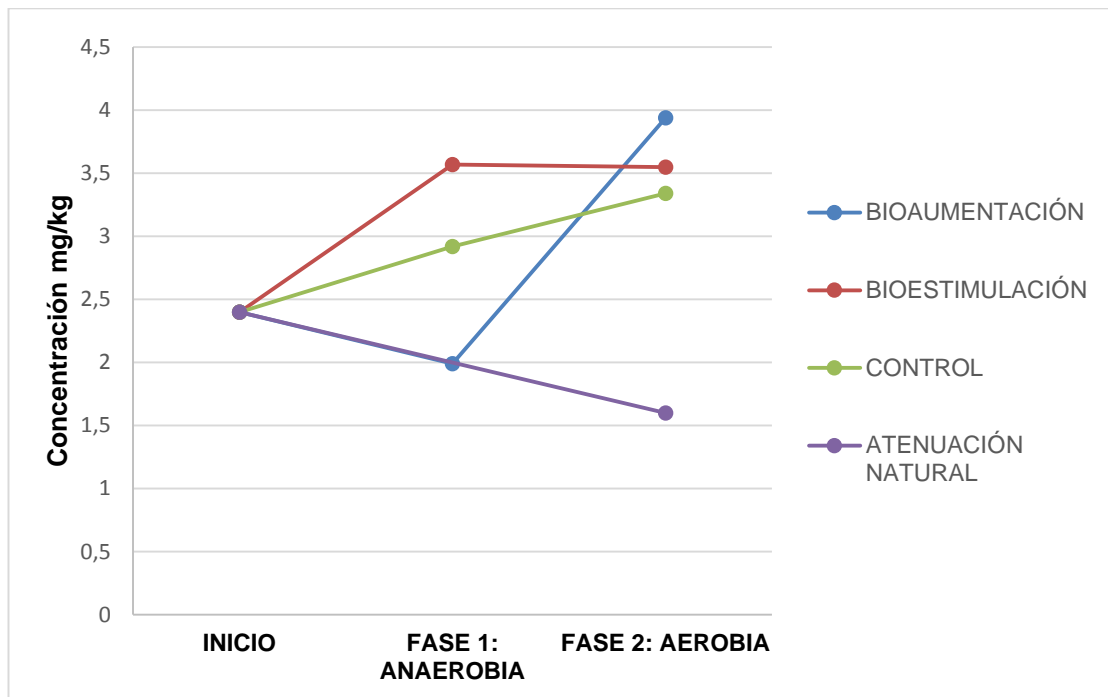
Las Gráficas 12, 13 y 14, presentan la variación de la concentración de los compuestos organoclorados evaluados, durante el tiempo que permaneció el tratamiento en condiciones anaerobias y aerobias consecutivas. Considerando el aumento de la concentración de estos pesticidas organoclorados evaluados en la fase aerobia, no es posible analizar el porcentaje de remoción en esta fase, hasta percibir el cambio.

Gráfica 12. Variación del DDT durante la biorremediación.



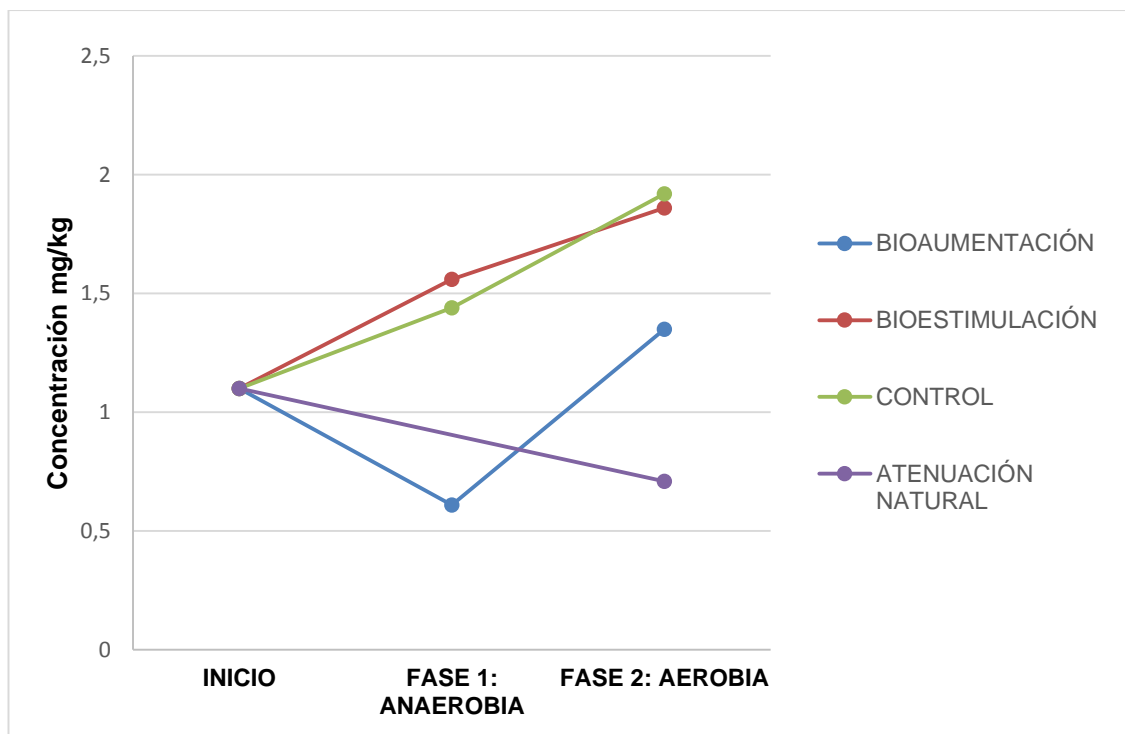
Fuente: Autora

Gráfica 13. Variación del DDD durante la biorremediación.



Fuente: Autora

Gráfica 14. Variación del DDE durante la biorremediación.



Fuente: Autora

En las gráficas 12, 13 y 14 se destaca un comportamiento diferente de la concentración de los organoclorados en la fase aerobia durante la atenuación natural, en comparación con las otras condiciones experimentales (bioaumentación, bioestimulación y control de las condiciones). Mientras que la concentración de los pesticidas aumenta en el suelo en éstas últimas condiciones, la atenuación natural presenta su disminución. Como se mencionó anteriormente, el aumento de la concentración de los contaminantes en el suelo en la fase aerobia puede ser resultado de una desorción de los pesticidas de los poros del suelo. Debido a que en la atenuación natural no se aplicó la variación de las condiciones ni estímulos externos, se puede observar un lento proceso degradativo de los pesticidas donde no hubo lugar para el fenómeno de desorción por la inyección de aire.

4.3.3 Determinación del cambio de la población bacteriana durante el proceso de biorremediación. Para la determinación del cambio de la microbiota se realizaron recuentos de células viables durante cada fase del tratamiento en las diferentes condiciones experimentales, además de una identificación bacteriana tal como se realizó la caracterización inicial.

La población bacteriana presentó un aumento durante la bioaumentación, demostrando la adaptación de las bacterias inoculadas en el suelo de interés durante este proceso. Contrario a esto, en la bioestimulación y el tratamiento control, se presentó una disminución de la población bacteriana. Mientras que en la bioestimulación se puede atribuir este resultado a una competencia entre los microorganismos estimulados con los nutrientes, en el tratamiento bajo el control de las condiciones, presenta la disminución de la población como resultado de un posible estrés generado a las bacterias por el forzamiento del sistema al introducir las condiciones anaerobias y aerobias. En el Anexo F se presenta los resultados obtenidos en los recuentos de células viables correspondientes

La Tabla 34 muestra las cepas bacterianas identificadas en cada una de las fases para las 4 condiciones experimentales evaluadas. En el Anexo G se describe la identificación microbiológica realizada a través de una evaluación de morfotipos macroscópicos y microscópicos, y su identificación por API 20NE.

Tabla 34. Identificación microbiológica.

FASE	CEPA	ESPECIE DE BACTERIA SEGÚN API 20 NE
1 (ANAEROBIA)	BIOAUMENTACIÓN	
	1	Requiere API 20 E
	2	Requiere API 20 E
	3	Posible <i>Pseudomonas putida</i>
	4	<i>Bacillus sp</i>
	5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	BIOESTIMULACIÓN	
	1	<i>Burkholderia cepacia</i>
	2	Posible <i>Pseudomonas putida</i>
	3	Enterobacteria
	4	<i>Bacillus sp</i>
	CONTROL	
	1	Enterobacteria
	2	Requiere API 20 E
	3	---
ATENUACIÓN NATURAL		
1	Posible <i>Pseudomonas putida</i>	
2 (AEROBIA)	BIOAUMENTACIÓN	
	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	2	<i>Bacillus sp</i>
	3	Requiere API 20 E
	4	<i>Pseudomonas putida</i>
	BIOESTIMULACIÓN	
	1	<i>Bacillus sp</i>
	2	<i>Pseudomonas putida</i>
	CONTROL	
	1	<i>Bacillus sp</i>
ATENUACIÓN NATURAL		
1	Posible <i>Pseudomonas putida</i>	

Fuente: Autora.

Se evidencia los mismos géneros de cepas que se identificaron al inicio del proceso de biorremediación (*Burkholderia c*, *Pseudomonas*, *Bacillus sp*), por lo que se ratifica la adaptación de las bacterias al suelo contaminado y su potencial para biodegradar los pesticidas organoclorados.

5. CONCLUSIONES

El análisis fisicoquímico inicial clasificó el suelo como franco con predominancia de limos y arenas. El bajo contenido de materia orgánica (1,83%) y partículas coloidales desfavorece la capacidad de intercambio catiónico, y por ende, se dan deficiencias nutricionales para el crecimiento de la plantas. El suelo en estudio presenta degradación por compactación, debido a la baja macroporosidad de las partículas finas (limos), evidenciada en una alta densidad aparente para suelos francos ($1,6\text{g/cm}^3$). Sin embargo, es un suelo que presenta un pH neutro (6,68), óptimo para el desarrollo de microorganismos y se favorece la deshalogenación reductora.

La presencia de altas concentraciones iniciales de los metabolitos de DDT, relacionada con el elevado contenido de los cloruros en el suelo de interés (4008,6 mg/kg), indica un proceso de deshalogenación en curso realizado por las bacterias nativas, adaptadas a los pesticidas organoclorados presentes en el suelo.

Las cepas nativas adaptadas al suelo contaminado con pesticidas organoclorados e identificadas mediante el sistema API 20 NE, corresponden a los géneros *Burkholderias cepacia*, *Pseudomonas (fluorescens, putida, mendocina)*, y *Aeromonas caviae*, los cuales se reportan en la literatura como bacterias con alto potencial degradativo de compuestos organoclorados.

En el tratamiento por bioestimulación, la remoción de los compuestos organoclorados presentó una baja eficiencia debida, posiblemente, por la competencia entre los microorganismos estimulados por la adición de nutrientes esenciales para su metabolismo.

El tratamiento por bioaumentación durante la fase anaerobia (8 semanas) resulta más favorable para la eliminación de los compuestos organoclorados del suelo de interés, dejando una remoción del 56,2% de DDT, 17,1% DDD y 44,5% de DDE.

Un aumento significativo de los compuestos organoclorados en la fase aerobia, puede indicar una desorción de los pesticidas, haciéndolos biodisponibles para una deshalogenación oxidativa manifestada por un incremento en la concentración de los cloruros en el suelo analizado. Por lo tanto, no es posible determinar los porcentajes de remoción en esta fase.

Las condiciones anaerobias y aerobias establecidas en la biorremediación de un suelo contaminado con compuestos organoclorados, generan la disminución de la población microbiana causada por un estrés debido al cambio de los entornos. Por el contrario, en la bioaumentación, los microorganismos inoculados presentan un crecimiento a causa de la adaptación al suelo bajo estas condiciones.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda prolongar la fase aerobia, para poder presenciar las remociones de los pesticidas organoclorados a partir del aumento de la concentración al inicio de esta fase, producto de la posible desorción de los contaminantes causada por la aireación.

Se sugiere hacer un pre-tratamiento para generar una biodisponibilidad de los compuestos organoclorados y evitar la desorción posterior de los compuestos durante la etapa aerobia.

Se recomienda evaluar una condición experimental que se combine con la adición de una fuente de carbono (como glucosa, molasa o almidón) y donadores de electrones, bajo condiciones anaerobia; ya que la literatura asegura que de esta forma se estimulará la deshalogenación reductiva debido a que el compuesto organoclorado actúa como aceptor de electrones y no es una fuente directa de carbono y energía para las bacterias.

Debido a la larga duración del proceso de biodegradación, se recomienda eliminar el contaminante remanente en el suelo por medio de un tratamiento químico alternativo

Se recomienda realizar la determinación de los pesticidas organoclorados inmediatamente se dé por terminada la fase oxidativa, para comprobar si el aumento en las concentraciones está asociado al tiempo que permanecen estáticas las muestras.

Se recomienda realizar una caracterización fisicoquímica del suelo al final del tratamiento de biorremediación, para establecer parámetros de comparación en términos de mejoría de la calidad del suelo y su potencial de uso.

7. BIBLIOGRAFÍA

ALEXANDER, M. Biodegradation and bioremediation. 2ed. USA: Academic Press, 1994. ISBN 978-0-12-049861-1

ALFÁN, Ricardo. Efecto de los compuestos organoclorados sobre el crecimiento de una población microbiana aerobia. Trabajo de grado (Magister en Ciencias en Bioprocesos). Instituto Politécnico Nacional. 2010.

ARBELI, Ziv. Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): el caso de los bifenilos policlorados (PCB). Acta Biológica Colombiana, 2009. Volumen 4, Número 1.

ATLAS, Ronald M; BARTHA, Richard. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Madrid: Edición PEARSON EDUCACIÓN, S.A., 2002. 696 p. ISBN 84-7829-039-7.

BACZYNSKI, Tomas; PLEISSNER, Daniel y GROTENHUIS, Tim. Anaerobic biodegradation of organochlorine pesticides in contaminated soil – Significance of temperature and availability. Elsevier, 2010. Volumen 78.

BENEDETTI, Anna y Dilly, Oliver. Approaches to Defining Monitoring, Evaluating and Managing Soil Quality: Introduction. En: BLOEM, J; HOPKINS, D y BENEDETTI, A. Microbiological Methods for Assessing Soil Quality. Oxfordshire: CABI, 2006. P. 1-70.

BETANCUR CORREDOR, Bibiana. Biorremediación de Suelo Contaminado con el Pesticida 1,1,1-Tricloro-2,2'bis(P-Clorofenil)Etano (Ddt) mediante Protocolos de Bioestimulación y Adición de Surfactante. Medellín, 2013, 143 h. Trabajo de grado (Magister en ciencias – Biotecnología). Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de ciencias. [En línea]. Disponible en: <<http://www.bdigital.unal.edu.co/9164/1/1088253581.2013.pdf>>.

BLAINE, M. F. Soil microbial ecology. Applications in agricultural and environmental management. Marcel Dekker, Inc. New York. 1993. 646pp.

BREED, Roberts S; MURRAY, E y HITCHENS, A. Parker. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 6 ed. Baltimore: WAVERLY PRESS, INC, 1948.

BRICEÑO L, Ana; BUENAHORA R, Maria. Identificación de microorganismos que pueden ser útiles en el proceso de biorremediación de suelos de cultivo de cebolla de rama (*allium fistulosum*) contaminados con plaguicidas en el corregimiento de Berlín del departamento de Santander en el año 2005. Bucaramanga, 2006, 164 h. Proyecto de grado (Bacteriología y Laboratorista Clínico). Universidad de Santander, Bucaramanga. Facultad de Salud.

BOUYOUCOS, G .J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. Agron. J. 54(5) 464-465.

CALVA, Laura Georgina; TORRES, María del Rocío. Plaguicidas organoclorados. En: contactos (1998) [en línea]. Disponible en: <<http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n30ne/pdf/plaga.pdf>>.

CASANELLAS, Jaume P; LOPEZ A, Marta; POCH C, Rosa. Introducción a la Edafología. Uso y Protección de Suelos. Madrid: Mundi-Prensa, 2010. ISBN 978-84-8476-405-2.

CASTRO, David. Caracterización de cepas bacterianas resistentes al dicloro difenil tricloroetano (DDT) y Paratión, aisladas de suelos sometidos a manejo agrícola intensivo de diferentes localidades del estado de Mérida. 2008. Tesis de grado (Licenciado en Biología). Universidad de los Andes, Mérida. Facultad de ciencias

CHENG, Yun. Exploration of Biodegradation of Toxaphene and Other Major Pesticides in the North Shore Restoration Area Soils of Lake Apopka, Fl. Trabajo de Grado Doctorado Filosofía. Universidad de Florida. 2007. 135 p.

CORPOCESAR. (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., Tomo 1, Valledupar, Cesar: Geosísmica y Ambiente.

CORPOCESAR. (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., Tomo 2, Valledupar, Cesar: Geosísmica y Ambiente.

EPA. Guía del ciudadano sobre la oxidación química in situ. Septiembre de 2012.

EWEIS, Juana B, *et al.* Principios de Biorrecuperación (Biorremediación). Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. Madrid: Edición McGraw - Hill, 1999. 284 p. ISBN 84-481-2511-8.

FUENTES, Y. J: L. 1999. El suelo y los fertilizantes. 5 ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 327 p.

GONZALES N, Víctor, *et al.* Guía de caracterización edáfica. España: Consolider tragua, 2010. ISBN 978-84-695-4037-4.

GRANADOS, Raquel; VILLAVERDE, Carmen. Microbiología. Madrid: Ediciones Paraninfo, S.A., 2003. ISBN 84-9732-123-5.

INTERNATIONAL CENTRE FOR SOIL AND CONTAMINATED SITES. Manual for Biological Remediation Techniques. Dessau: ICSS, 2006. 78p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Referencias bibliográficas: Contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá D.D.: ICONTEC, 2008. 33p.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Bogotá D.D.: ICONTEC, Sexta actualización, 2008.

JARAMILLO, Daniel F. Introducción a la Ciencia del Suelo. En: Universidad Nacional de Colombia, 2002.

KAMANAVALLI C, NINNEKAR H. Biodegradation of DDT by a *Pseudomonas* Species. *Current Microbiology* [serial online]. January 2004;48(1):10-13. Available from: Environment Complete, Ipswich, MA. Accessed March 8, 2015.

KAO, C et al. Application of microbial enumeration technique to evaluate the occurrence of natural bioremediation. *Water Res.* Elsevier Science. Vol. 35, Nº8, pp 1951-1960, 2001

Kidd, K.A., Schindler, D.W., Muir, D.C.G., Lockhart, W.L., Hesslein, R.H. High concentrations of toxaphene in fishes from a subarctic lake. *Science*. 1995, 269, 240–242.

LACAYO R, Martha L. MICROBIAL DEGRADATION OF TOXAPHENE. Tesis Doctoral Biotecnología. Sweden. Lund University, Sweden. Departamento de Biotecnología, 2005. 53 p.

LACAYO R, Martha L, *et al.* A toxaphene-degrading bacterium related to *Enterobacter cloacae*, strain D1 isolated from aged contaminated soil in Nicaragua. Elsevier, 2005.

LEÓN M, Clara E. Propiedades de los suelos. Corpoica. Bucaramanga: IMPRECOL S.A., 2000.

MADIGAN, Michael T, *et al.* Brock: Biología de los microorganismos. 12 ed. Madrid: PEARSON EDUCACIÓN, 2009. 1296p. ISBN 978-84-7829-097-0.

MAULE, A; PLYTE, S y QUIRK, AV. Deshalogenación de insecticidas organoclorados por poblaciones microbianas anaeróbicas mixtas. Elsevier, 1987. Volumen 27, Número 2.

MCBAIN, A.D.K., Senior, E., Paterson, A., du Plessis, C.A., Watson-Craik, I.A. Bioremediation of soil contaminated with 4-chloro-2- methyl-phenoxyacetic acid (MCPA): essential laboratory studies. *S. Afr. J. Sci.* 1996, 92, 426-430.

MIRSAL, Ibrahim A. Soil Pollution. Origin, Monitoring, & Remediation. Berlin: Springer, 2008. ISBN 978-3-540-70775-2.

MUSKUS, Angélica. Manual de Laboratorio de Análisis de Suelos; Facultad de Ingeniería Ambiental. Universidad Pontificia Bolivariana Seccional Bucaramanga. 2001.

NAVARRETE M, Paloma. Contaminación de suelos por productos orgánicos. Plaguicidas. En: LOPEZ S, Francisco. Contaminación y Depuración de Suelos. Madrid: Gráficas Arias Montano, 1995. P. 59 – 75.

NEZHA TAHRI *et al.* Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. Capítulo 11. En: CHAMY, R y ROSENKRANZ, F. Biodegradation life of science. 2013. ISBN 978-953-51-1154-2

NÍÑEZ, Jorge. Fundamentos de Edafología. EUSED, 2000. ISBN 978-9977-64-148-5.

OLIVAS, Evangelina y ALARCÓN, Luis R. Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos; Programa de Nutrición. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, 2004. 107p. ISBN 968-7845-28-7.

PAUL, Eldor A. Soil microbiology, Ecology, and Biochemistry. 3 ed. Burlington: Elsevier, 2007. 532p. ISBN 978-0-12-546807-7.

PNUMA. Guía del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. 2005.

PIERZYNSKI, Gray M; THOMAS SIMS, J y VANCE, George F. Soils and Environmental Quality. 3 ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. 596p. ISBN 978-0-8493-1616-6.

RITTMANN, Bruce E y McCARTY, Perry L. Biotecnología del medio ambiente: Principios y aplicaciones. Madrid: McGraw-Hill, 2001. 745p. ISBN 0-07-234553-5.

RÍOS, R. 2005. Estudio de la Estimulación Biológica Para el Tratamiento de Residuos de Perforación Petrolera Empleando Lisímetros. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Casa Abierta al Tiempo. México D.F

RUIZ, Analy. Cambios del uso del suelo y su efecto en el contenido químico de M.O., C/N y C/P, en el ejido “El Conejo”, Perote, Veracruz. Xalapa, 2012. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Universidad Veracruzana, Facultad de ciencias agrícolas.

SAHM, Daniel; WEISSFELD, A. Diagnóstico microbiológico. 12 ed. Buenos aires: Médica Panamericana, 2009. 1160p. ISBN 978-950-06-8243-5.

SALEH, M.A. Toxaphene: Chemistry, biochemistry, toxicity and environmental fate. *Rev. Environ. Contam.Toxicol.* 1991, 118, 1-85.

SIMS, Judith L; SUFLITA, Joseph M y RUSSELL, Hugh H. Reductive Dehalogenation of Organic Contaminants in Soils and Ground Water. United States. Environmental Protection Agency, 1991.

TIMMIS, K.N., PIEPER, D.H. Bacteria designed for bioremediation. *TIBTECH.* 1999, 17, 201-204.

THOMPSON, L. M; TROEH, F. R. Los suelos y su fertilidad. 4 ed. Barcelona: Editorial Reverté S.A., 1988 (Reimpresión, 2002). ISBN 84-291-1041-0.

TOMASINI, Araceli. Biorremediación de suelos contaminados por compuestos organoclorados. En: PRADO *et al.* Impacto de la biología molecular y las nuevas tecnologías en el conocimiento de la función celular y sus aplicaciones. 2011. ISBN: 978-607-477-560-0.

USDA. Guía para la Evaluación de la Calidad y Salud del Suelo. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. 1994.

VÁSQUEZ, María Cristina; GUERRERO FIGUEROA, Jennifer Thibisay; QUINTERO, Andrea del Pilar. Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. *Revista Colombiana de Biotecnología*, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 141-157, jun. 2010. ISSN 1909-8758. Disponible en: <<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15579/16340>>. Fecha de acceso: 27 feb. 2015

VÁSQUEZ, María C, *et al.* Aceleración del proceso de compostaje de residuos post-cosecha (pulpa) del café con la aplicación de microorganismos nativos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2010, Vol. 41 (número especial). [En línea]. Disponible en: <http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/files/CB-2010-4-CB-002.pdf>


WACHSMAN, Mónica y DEGROSSI María C. Microbiología: Guía de trabajos prácticos de laboratorio. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Belgrano. Buenos Aires, 2012.

ANEXOS

Anexo A. Análisis estadístico de los resultados de la caracterización fisicoquímica del suelo evaluado.

PROPIEDAD	MEDIA	%ERROR	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Textura (arena) (%)	45,76	1,76	3,048409421
Textura (arcilla) (%)	12,96	0,954428276	1,653118266
Textura (limo) (%)	41,28	1,893708883	3,28
HG (%)	3,90333333	0,214967698	0,372334975
Dr (g/cm ³)	1,93333333	0,033333333	0,057735027
Da (g/cm ³)	1,60433333	0,011623731	0,020132892
pH	6,74333333	0,017638342	0,030550505
Conductividad eléctrica (μs/cm)	204,566667	3,825063543	6,625204399
CIC (meqg/100 g)	17,6	0,305505046	0,529150262

Anexo B. Análisis químicos nitrógeno orgánico, nitrógeno total, fósforo total y carbono orgánico total.



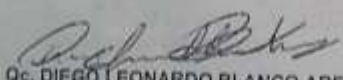
ACREDITADO ISO 17025 RESOLUCION 0184 DE 2005

LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO DE AGUAS RESIDUALES	F-5.10-01
REPORTE DE RESULTADOS DE ENSAYO	Revisión: 2 Página 1 de 1
DESCRIPCION DE LA MUESTRA	


CLIENTE: PROYECTO DE INVESTIGACION SUELOS BI 053B	
DIRECCIÓN: Km 7 VIA PIEDECUESTA	
CODIGO: 130	CODIGO: 130D
FECHA DE MUESTREO: 2014-07-13	FECHA DE MUESTREO: 2014-07-13
FECHA DE RECEPCIÓN: 2014-07-14	FECHA DE RECEPCIÓN: 2014-07-14
FECHA DE REPORTE: 2014-09-03	FECHA DE REPORTE: 2014-09-03

VARIABLES	UNIDADES	PARAMETRO		Límite de Detección	Fecha de Ejecución de Ensayo	METODO
		130	130R			
Fósforo total	mg PO ₄ /kg	1.32	1.34	0.22	2014-07-28	SM 4500 P-4-E
Nitrógeno Total	mg NTK/kg	1155	1200	0.0	2014-07-18	SM550-Norg-D

OBSERVACIONES:
L A MUESTRA FUE TOMADA POR EL CLIENTE



Qc. DIEGO LEONARDO BLANCO ARENAS
Coordinador Laboratorio de Aguas Residuales



UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
BUCARAMANGA
LABORATORIO DE ANALISIS
DE AGUAS RESIDUALES
ACREDITADO ISO 17025

Los resultados reportados corresponden unicamente a las muestras analizadas
* El contenido del reporte no se puede reproducir parcialmente solo en forma total previa autorización del Laboratorio de Aguas Residuales*.

SEDE MADRID: Campus de La Alameda Circular 1º No. 70-01 / Teléfono: (057) (4) 4190015 / Fax: (057) (4) 2302080 / Apartado Aéreo 98006 / E-mail: donrepl@uob.edu.co
SECCIONAL BUCARAMANGA: Autopista a PieDECUESTA Km. 7 / Teléfono: (057) (7) 8796220 / Fax: (057) (7) 8796221 / E-mail: info@uobga.edu.co
SECCIONAL MCINTOSH: Km. 8 Via Carraja / Teléfono: (057) (4) 7362148 / Fax: (057) (4) 7360912 / E-mail: crs@itit@uobhonda.edu.co
SECCIONAL PALMIRA: Seminario Cristo Sacramento, Km. 1 - Via Tierra Nueva / Teléfono: (057) (2) 2702545 / Fax: (057) (2) 2723121 / E-mail: uobpalmira@uob.edu.co
www.upb.edu.co / Colombia / Suramérica

LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO DE AGUAS RESIDUALES	F-5.10-01
REPORTE DE RESULTADOS DE ENSAYO	Revisión: 2 Página 1 de 1
DESCRIPCION DE LA MUESTRA	

CLIENTE: PROYECTO DE INVESTIGACION SUELOS BI 053B	
DIRECCION: Km 7 VIA PIEDECUESTA	
CODIGO: 217	CODIGO: 217R
TIPO DE MUESTRA: SUELO CONTAMINADO	TIPO DE MUESTRA: SUELO CONTAMINADO
FECHA DE RECEPCION: 2014-10-28	FECHA DE RECEPCION: 2014-10-28
FECHA DE REPORTE: 2014-11-18	FECHA DE REPORTE: 2014-11-18

VARIABLES	UNIDADES	PARAMETRO		Limite de Deteccion	Fecha de Ejecucion de Ensayo	METODO
		217	217R			
Carbón Orgánico total	% de carbón Orgánico/Kg	1.08%	—	0.005%	2014-11-8	NTC 5403
Nitrógeno Orgánico	mg Norg/Kg	1040,5	1010,6	6,0	2014-11-04	SM 4500- Norg-B

OBSERVACIONES:
L A MUESTRA FUE TOMADA POR EL CLIENTE


Qc. DIEGO LEONARDO BLANCO ARENAS
Coordinador Laboratorio de Aguas Residuales



UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
BUCARAMANGA
LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICO
DE AGUAS RESIDUALES
ACREDITADO ISO 17025

"Los resultados reportados corresponden unicamente a las muestras analizadas"
" El contenido del reporte no se puede reproducir parcialmente solo en forma total previa autorización del Laboratorio de Aguas Residuales"

Anexo C. Resultados de los análisis de la concentración de los cloruros en el suelo evaluado

CONCENTRACIÓN INICIAL DE CLORUROS EN EL SUELO

RESULTADOS		
NOMBRE DE LA MUESTRA:	INICIAL	
CÓDIGO INTERNO:	G-021-O-15	
PARÁMETRO(S) DENTRO DEL ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN:	N.A	
PARÁMETRO:	RESULTADO	UNIDAD:
Cloruros	4008,2571	mg·L ⁻¹

CONCENTRACIÓN DE CLORUROS EN EL SUELO AL FINALIZAR LA FASE ANAEROBIA

RESULTADOS		
NOMBRE DE LA MUESTRA:	BA 1	
CÓDIGO INTERNO:	G-022-O-15	
PARÁMETRO(S) DENTRO DEL ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN:	N.A	
PARÁMETRO:	RESULTADO	UNIDAD:
Cloruros	5096,9195	mg·L ⁻¹

RESULTADOS		
NOMBRE DE LA MUESTRA:	BE	
CÓDIGO INTERNO:	G-02-O-15	
PARÁMETRO(S) DENTRO DEL ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN:	N.A	
PARÁMETRO:	RESULTADO	UNIDAD:
Cloruros	4048,7445	mg·L ⁻¹

RESULTADOS		
NOMBRE DE LA MUESTRA:	C	
CÓDIGO INTERNO:	G-03-O-15	
PARÁMETRO(S) DENTRO DEL ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN:	N.A	
PARÁMETRO:	RESULTADO	UNIDAD:
Cloruros	3823,81425	mg·L ⁻¹

CONCENTRACIÓN DE LOS CLORUROS EN EL SUELO AL FINALIZAR LA FASE AEROBIA (FINAL DEL TRATAMIENTO)

RESULTADOS		
NOMBRE DE LA MUESTRA:	BA 2	
CÓDIGO INTERNO:	G-023-O-15	
PARÁMETRO(S) DENTRO DEL ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN:	N.A	
PARÁMETRO:	RESULTADO	UNIDAD:
Cloruros	5938,1586	mg·L ⁻¹

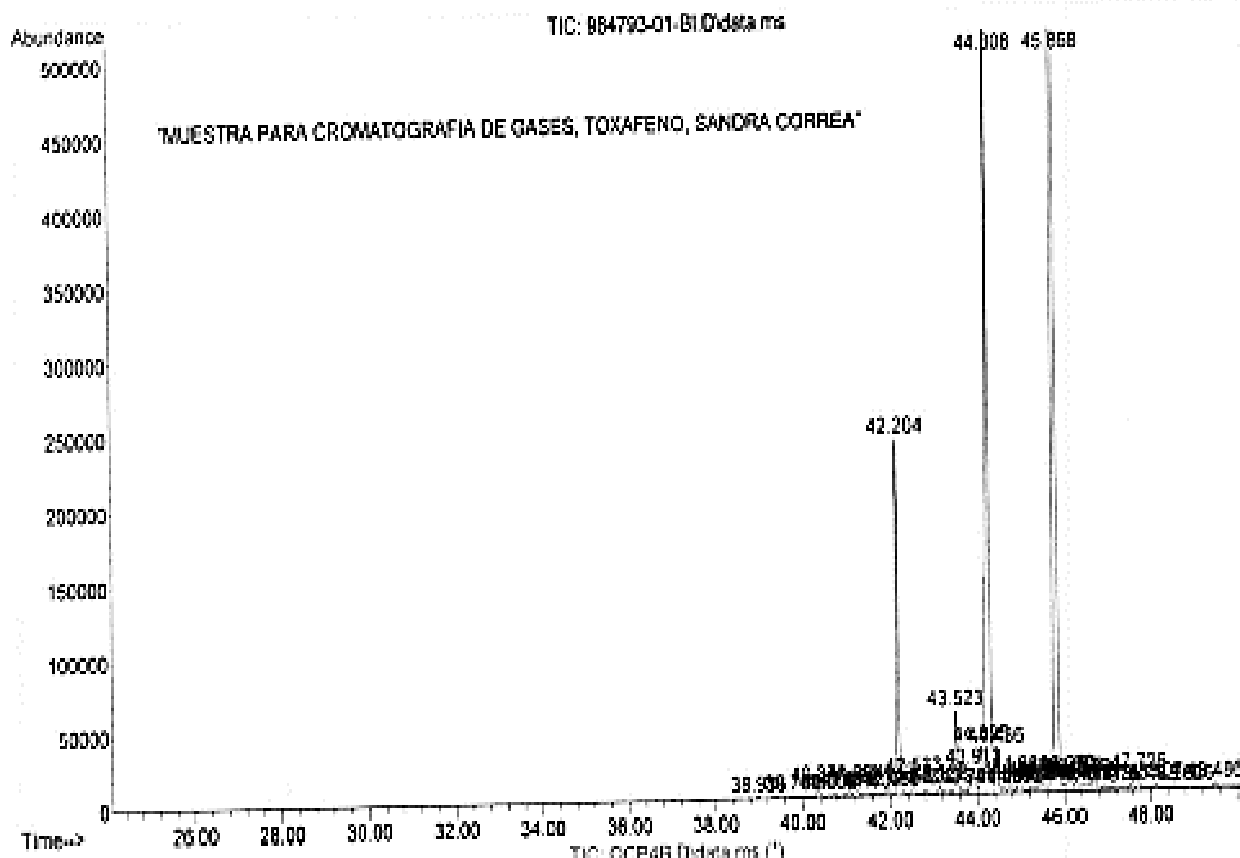
RESULTADOS		
NOMBRE DE LA MUESTRA:	BE	
CÓDIGO INTERNO:	G-021-O-15	
PARÁMETRO(S) DENTRO DEL ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN:	N.A	
PARÁMETRO:	RESULTADO	UNIDAD:
Cloruros	4997,950155	mg·L ⁻¹

RESULTADOS		
NOMBRE DE LA MUESTRA:	AN	
CÓDIGO INTERNO:	G-022-O-15	
PARÁMETRO(S) DENTRO DEL ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN:	N.A	
PARÁMETRO:	RESULTADO	UNIDAD:
Cloruros	4503,103605	mg·L ⁻¹

RESULTADOS		
NOMBRE DE LA MUESTRA:	C	
CÓDIGO INTERNO:	G-023-O-15	
PARÁMETRO(S) DENTRO DEL ALCANCE DE LA ACREDITACIÓN:	N.A	
PARÁMETRO:	RESULTADO	UNIDAD:
Cloruros	4958,362431	mg·L ⁻¹

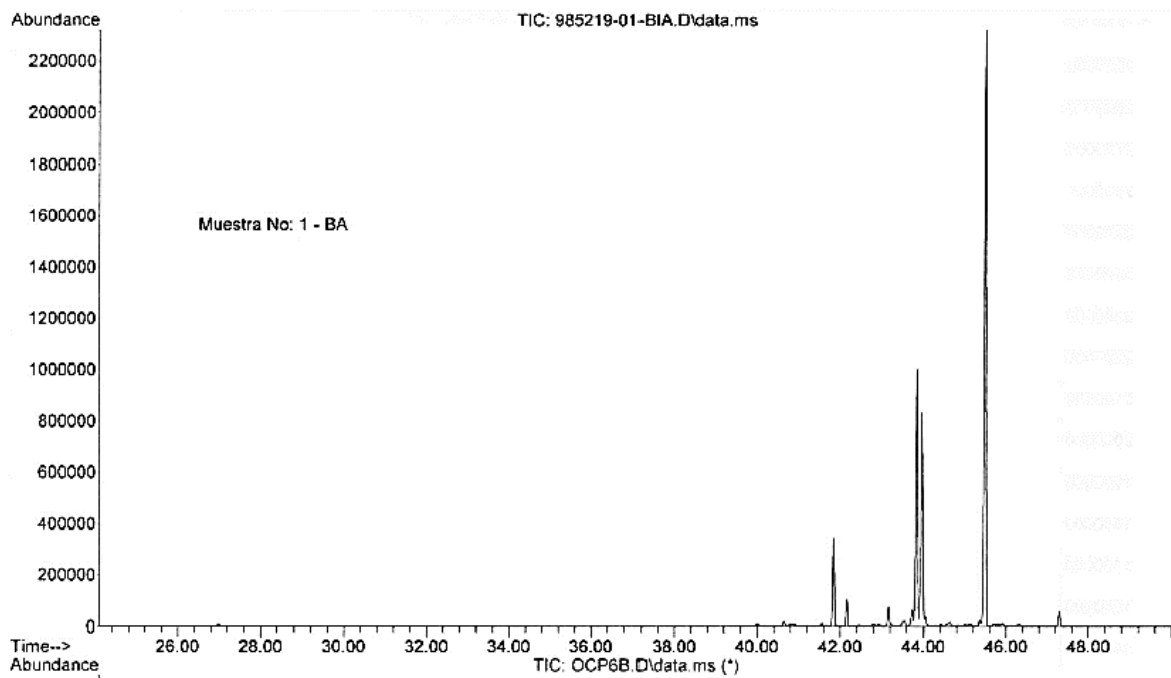
Anexo D. Resultados de los análisis de los pesticidas organoclorados en el suelo evaluado

IDENTIFICACIÓN INICIAL DE LOS PESTICIDAS EN EL SUELO

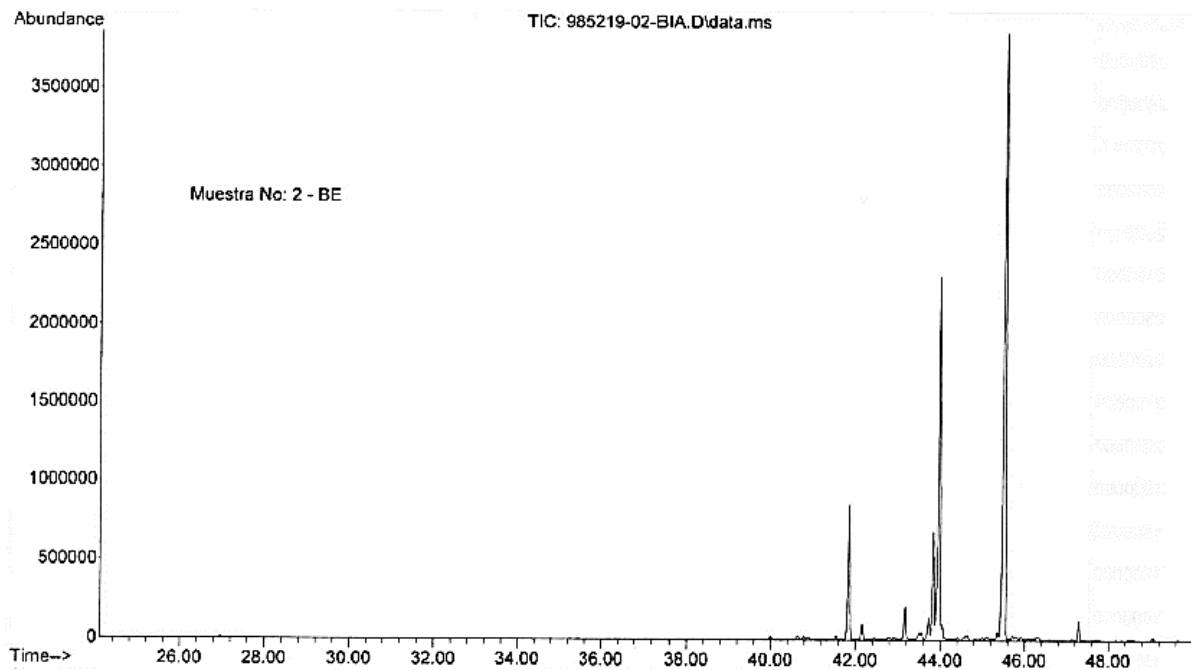


IDENTIFICACIÓN DE LOS PESTICIDAS AL FINALIZAR LA FASE ANAEROBIA

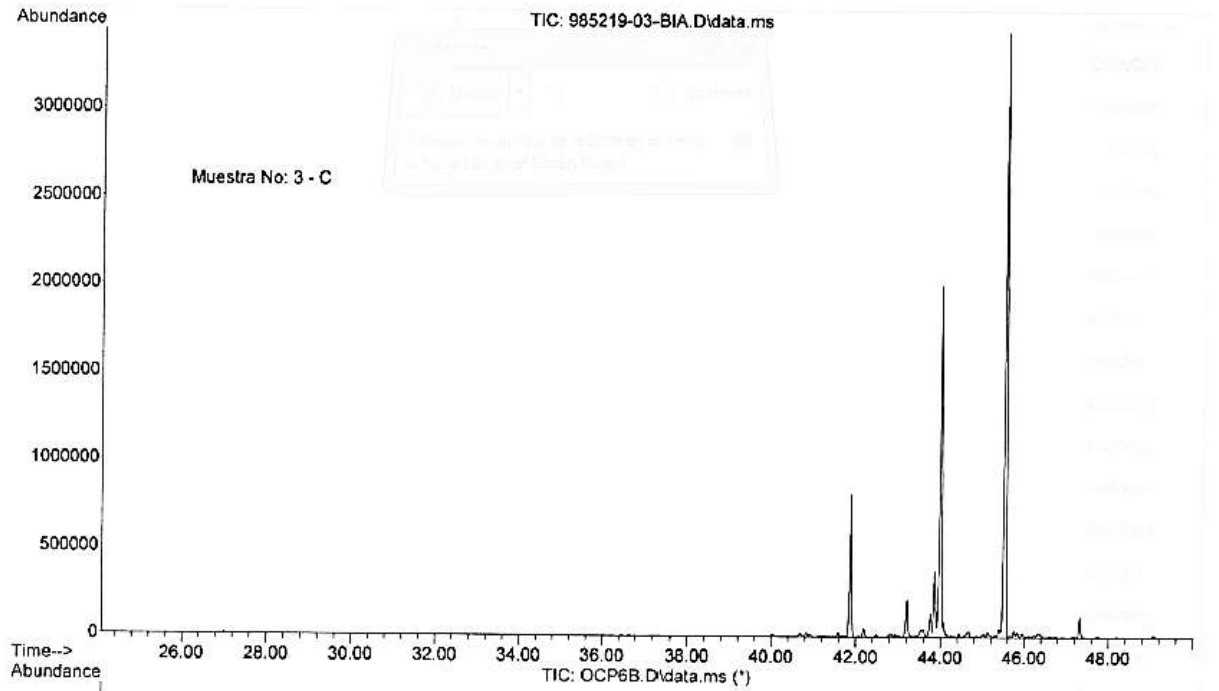
Bioaugmentación



Bioestimulación

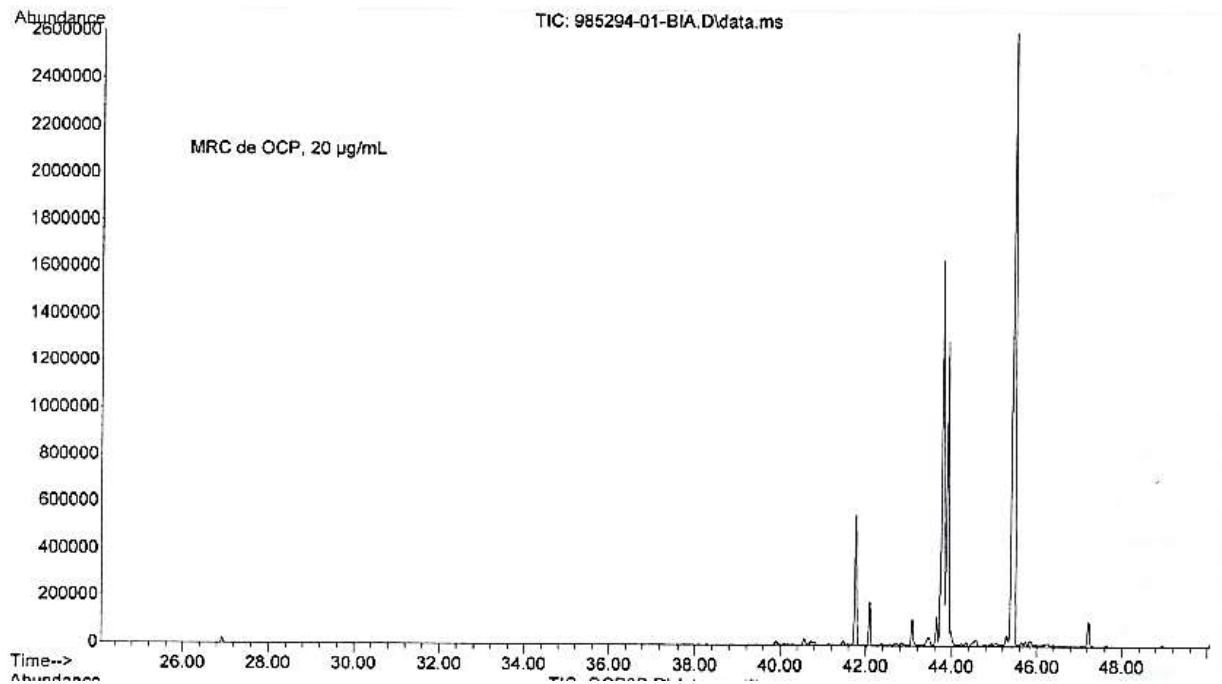


Control de condiciones

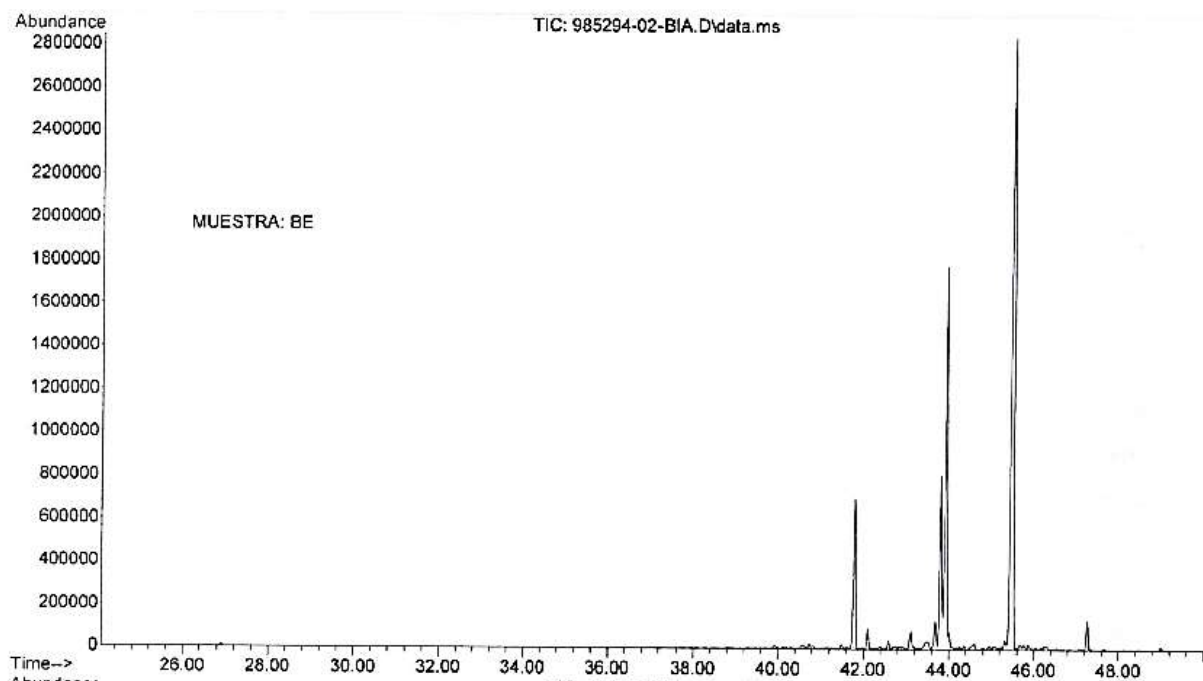


IDENTIFICACIÓN DE LOS PESTICIDAS AL FINALIZAR LA FASE AEROBIA (FINAL DEL TRATAMIENTO)

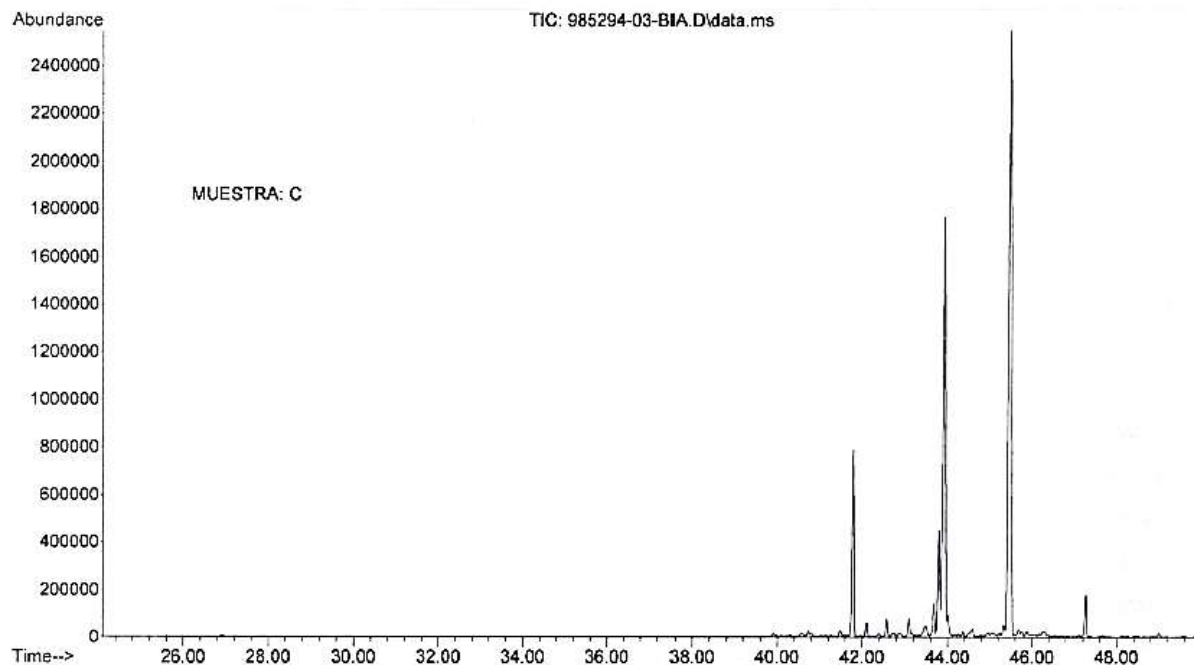
Bioaumentación



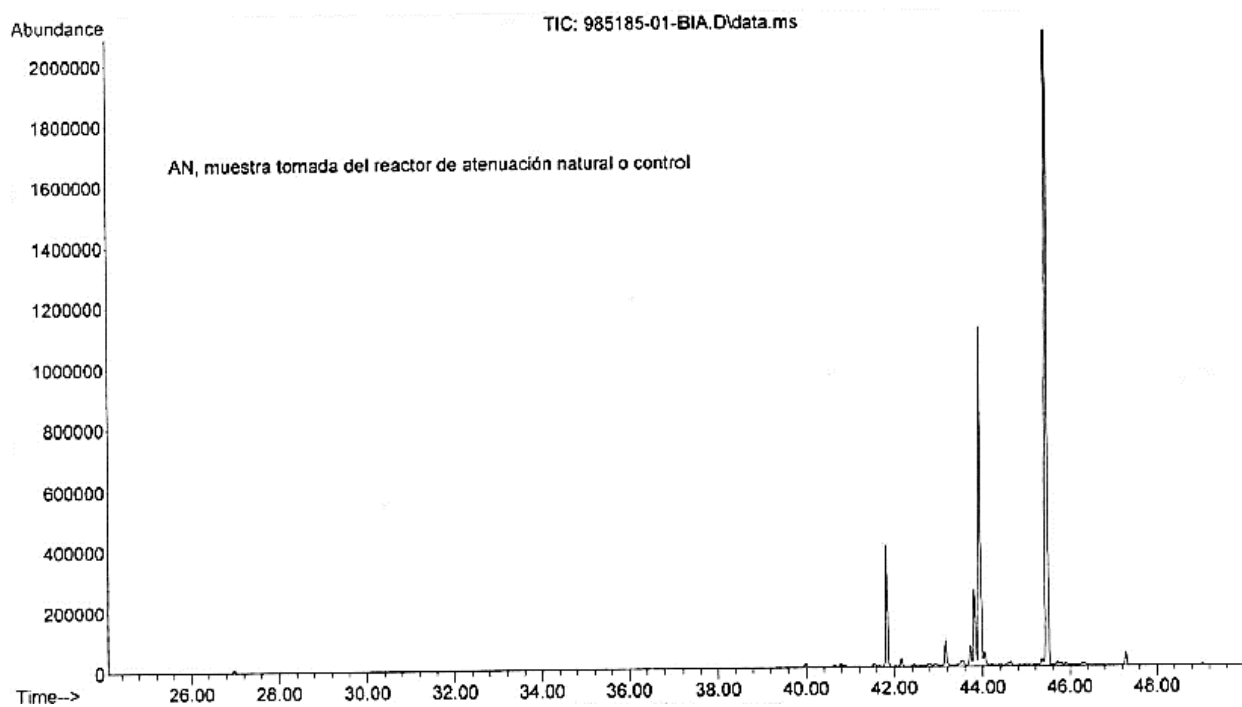
Bioestimulación



Control de condiciones



Atenuación natural



Anexo E. Tabla de tests y reacciones del API 20 NE

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	REACCIONES/ENZIMAS
NO₃	Nitrato potásico	Reducción de nitratos a nitritos
TRP	L-triptofano	Reducción de nitratos en hidrogeno
GLU	D-glucosa	Formación de índole (TRiPtofano)
ADH	L-arginina	Fermentación (glucosa)
URE	Urea	Arginina dihidrolasa
ESC	Esculina citrato férrico	Ureasa
GEL	Gelatina (origen bovino)	Hidrolisis (proteasa) (geltina)
PNPG	4-nitrofenil-βD-galactopiranosida	B-galactosidasa (Para-Nitro-Fenil-βD-Galactopiranosidasa)
GLU	D-glucosa	Asimilación glucosa
ARA	L-arabinosa	Asimilación arabinosa
MNE	D-manosa	Asimilación manosa
MAN	D-manitol	Asimilación N-Acetil-Glucosamina
NAG	N-acetil-glucosamina	Asimilación maltosa
MAL	D-maltosa	Asimilación gluconato potásico
GNT	Gluconato potásico	Asimilación ácido caprico
CAP	Ácido cáprico	Asimilación ácido adipico
ADI	Ácido adípico	Asimilación malata
MLT	Ácido málico	Asimilación citrato trisódico
CIT	Citrato trisódico	Asimilación ácido fenilacético
PAC	Ácido fenilacético	

Anexo F. Resultados de los recuentos bacterianos en el suelo evaluado.

RECUESTO INICIAL

RECUESTO INICIAL DE CELULAS VIABLES INÓCULO 10 µL					
Dilución	UFC por 10 µL				UFC/gss
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	
10 ⁻³	---	3	5	7	3 x 10 ⁷
10 ⁻⁵	3	3	---	3	
10 ⁻⁷	---	1	---	1	

RECUESTO AL FINAL FASE DE LA FASE 1 (ANAEROBIA)





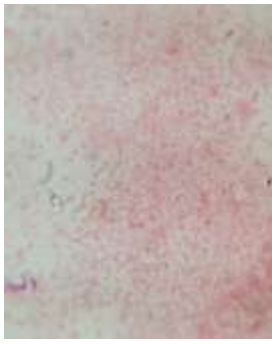


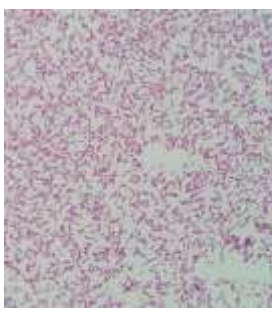




RECUESTO DE CELULAS VIABLES FINAL FASE ANEROBIA INÓCULO 10 µL					
Bioaumentación					
Dilución	UFC por 10 µL				UFC/gss
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	
10 ⁻⁵	3	3	2	4	1,7 x 10 ⁹
10 ⁻⁷	---	2	1	2	
10 ⁻⁹	---	1	---	---	
Bioestimulación					
Dilución	UFC por 10 µL				UFC/gss
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	
10 ⁻¹	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	1 x 10 ⁷
10 ⁻³	---	3	3	2	
10 ⁻⁵	1	---	1	1	
Control					
Dilución	UFC por 10 µL				UFC/gss
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	
10 ⁻¹	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	3 x 10 ⁵
10 ⁻³	1	4	3	3	
10 ⁻⁵	---	---	1	---	
Atenuación Natural					
Dilución	UFC por 10 µL				UFC/gss
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	
10 ⁻¹	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	1 x 10 ⁷
10 ⁻³	---	6	6	6	
10 ⁻⁵	1	1	---	1	


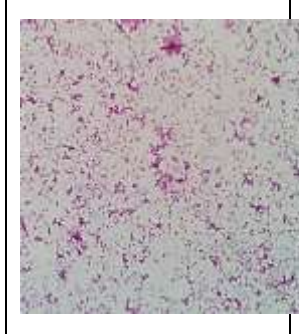


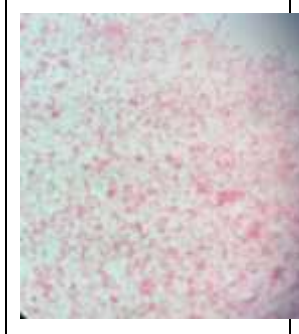


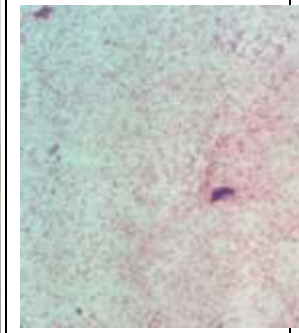


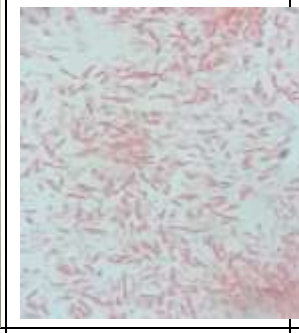




RECUENTO AL FINAL FASE DE LA FASE 2 (AEROBIA): FINAL DEL TRATAMIENTO


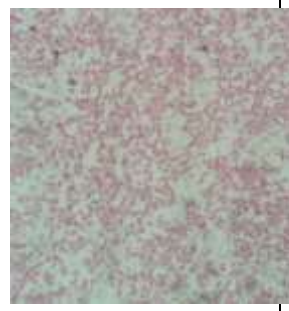


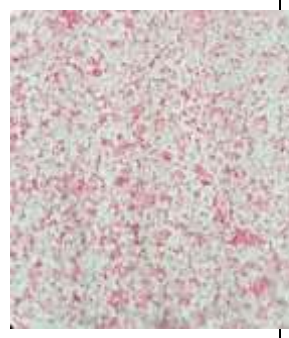


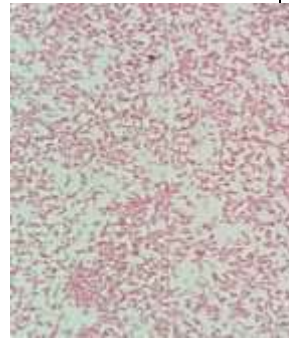







RECuento DE CELULAS VIABLES FINAL FASE ANEROBIA INÓCULO 10 µL					
Bioaumentación					
Dilución	UFC por 10 µL				UFC/gss
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	
10 ⁻⁵	Incontable	incontable	Incontable	Incontable	3,3 x 10 ⁹
10 ⁻⁷	4	4	2	3	
10 ⁻⁹	---	2	---	3	
Bioestimulación					
Dilución	UFC por 10 µL				UFC/gss
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	
10 ⁻¹	Incontables	Incontable	Incontable	Incontable	3,3 x 10 ⁵
10 ⁻³	3	4	4	2	
10 ⁻⁵	---	1	--	1	
Control					
Dilución	UFC por 10 µL				UFC/gss
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	
10 ⁻¹	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	1,5 x 10 ⁻⁵
10 ⁻³	2	1	2	1	
10 ⁻⁵	---	1	---	1	
Atenuación Natural					
Dilución	UFC por 10 µL				UFC/gss
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	
10 ⁻¹	Incontable	Incontable	Incontable	Incontable	1,3 x 10 ⁵
10 ⁻³	2	1	1	1	
10 ⁻⁵	---	---	---	1	


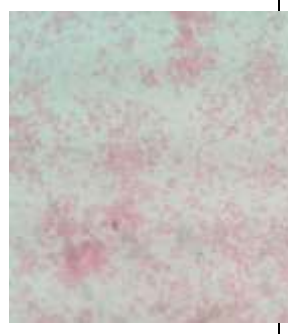


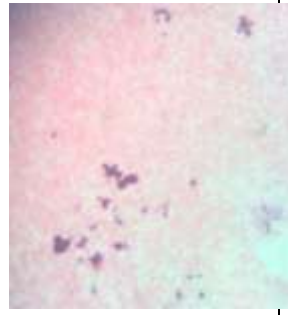




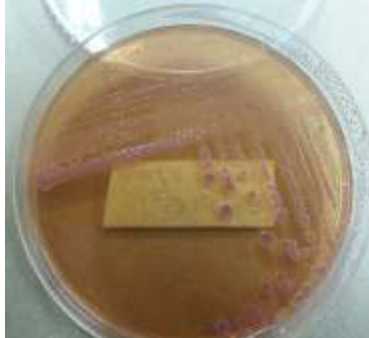



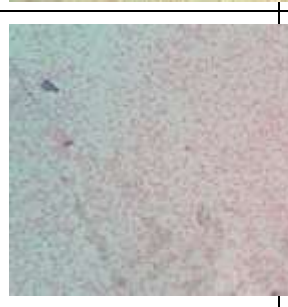

Anexo G. Aislamiento e identificación de cepas


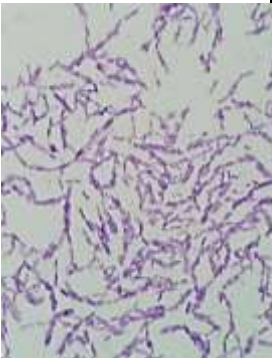
CARACTERIZACIÓN INICIAL

Cepa	Caracterización Macroscópica	Caracterización Microscópica	Identificación Api 20NE
1			<p data-bbox="1129 600 1401 633"><i>Aeromonas caviae</i></p> 
2			<p data-bbox="1114 913 1417 947"><i>Burkholderia cepacia</i></p> 
3			<p data-bbox="1137 1272 1393 1305"><i>Aeromona caviae</i></p> 
4			<p data-bbox="1114 1574 1417 1608"><i>Burkholderia cepacia</i></p> 


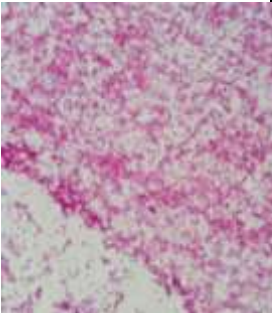
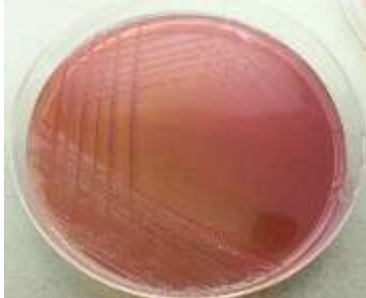
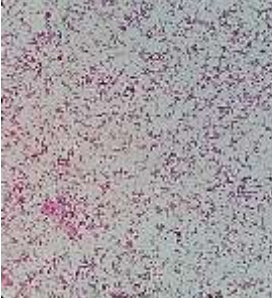
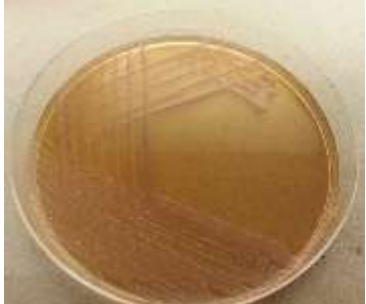


5			<p><i>Pseudomonas fluorescens</i></p> 
6			<p><i>Burkholderia cepacia</i></p> 
7			<p><i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i></p> 
8			<p><i>Aeromonas caviae</i></p> 
9			<p><i>Burkholderia cepacia</i></p> 

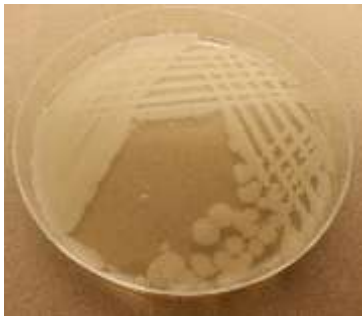
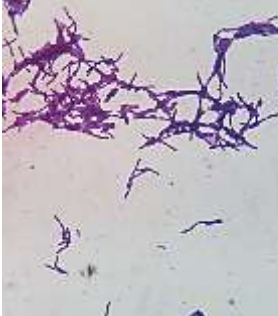

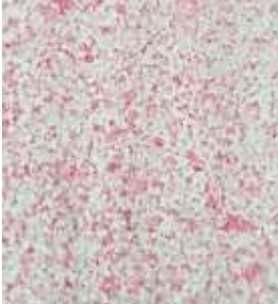




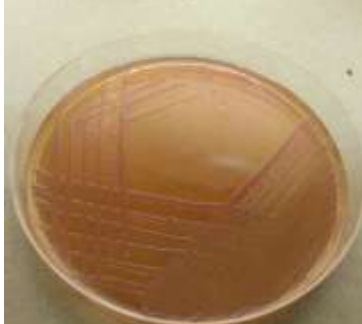
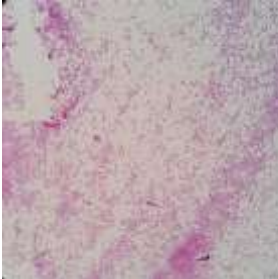


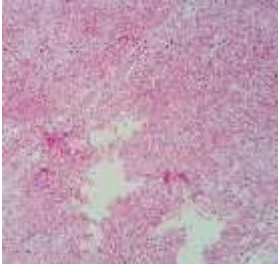
10			<p>Posibilidad de <i>Pseudomona mendocina</i></p> 
11			<p><i>Pseudomona putida</i></p> 
12			<p><i>Pseudomona putida</i></p> 
13			<p><i>Burkholderia pseudomallei</i></p> 
14			<p>Posibilidad de <i>Aeromona caviae</i></p> 










15			Posibilidad de <i>Pseudomona fluorescens</i> 
16			<i>Pseudomona putida</i> 
17			Posibilidad de <i>Burkholderia gladioli</i> 
18			<i>Pseudomona fluorescens</i> 
19			<i>Burkholderia cepacia</i> 

20			<i>Bacillus sp.</i>
----	---	--	---------------------

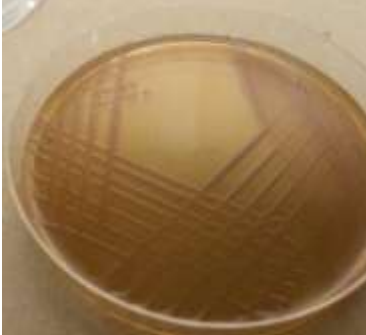






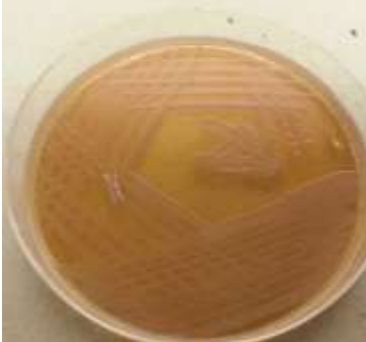


CARACTERIZACIÓN AL FINAL DE LA FASE 1 (ANAEROBIA)


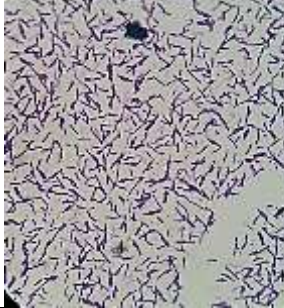
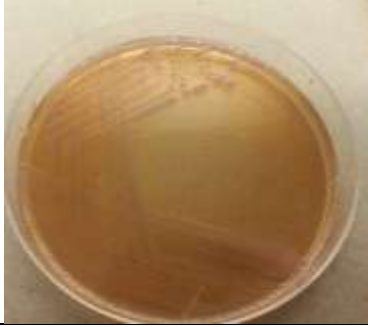
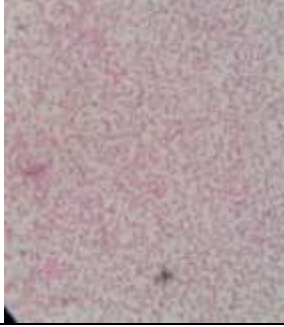


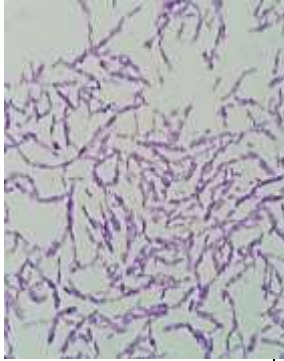
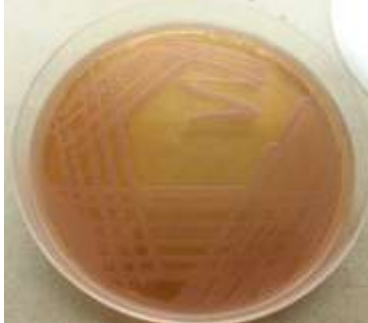


Cepa	Caracterización Macroscópica	Caracterización Microscópica	Identificación
BIOAUMENTACIÓN			
1			Requiere API 20E: Enterobacteria
2			Requiere API 20E: Enterobacteria
3			 Posible <i>Pseudomona putida</i>

4			<i>Bacillus sp</i>
5			 <i>Pseudomonas putida</i>
BIOESTIMULACIÓN			
1			 <i>Burkholderia cepacia</i>
2			 Posible <i>Pseudomonas putida</i>
3			Requiere API 20E: Enterobacteria

4			<i>Bacillus sp</i>
CONTROL DE CONDICIONES			
1			Requiere API 20E: Enterobacteria
2			Requiere API 20E: Enterobacteria
ATENUACIÓN NATURAL			
1			 Posible <i>Pseudomona putida</i>

CARACTERIZACIÓN AL FINAL DE LA FASE 2 (AEROBIA): FINAL DEL TRATAMIENTO

Cepa	Caracterización Macroscópica	Caracterización Microscópica	Identificación
BIOAUMENTACIÓN			
1			 <i>Pseudomona aeruginosa</i>
2			<i>Bacillus sp</i>
3			Requiere API 20E: Enterobacteria
4			 <i>Pseudomona putida</i>

BIOESTIMULACIÓN			
1			<i>Bacillus sp</i>
2			 <i>Pseudomona putida</i>
CONTROL DE CONDICIONES			
1			<i>Bacillus sp</i>
ATENUACIÓN NATURAL			
1			 Posible <i>Pseudomona putida</i>