

Biodegradación estimulada de los suelos contaminados con pesticidas organoclorados

Stimulated degradation of soils contaminated with organochlorine pesticides

Biodegradação do solo estimulou contaminado com pesticidas organoclorados

María Kopytko¹, Sandra Natalia Correa-Torres² & Martha Jhoana Estévez- Gómez³

¹Ingeniera Química, Especialista en Tratamiento de Aguas, Magister en Química, Doctora en Biotecnología. ²Química, Magister en Química, Doctora en Química Aplicada. ³

^{1,2,3}Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad Pontificia Bolivariana. Piedecuesta, Km 7.0. Off. K-107. Bucaramanga, Colombia.

¹maria.kopytko@upb.edu.co; ²sandra.correa@upb.edu.co; ³martha.estevez@upb.edu.co

Resumen

DDT al igual que otros pesticidas organoclorados han sido utilizados extensivamente en Colombia entre los años 1970 y 1980 en cultivos de algodón. DDT es resistente a la degradación y fuertemente relacionado con numerosos problemas de salud y actualmente está prohibido su uso. El propósito de esta investigación fue evaluar la biodegradación de DDT y de los productos DDD y DDE, presentes en el suelo contaminado durante 16 años en el municipio Agustín Codazzi, Cesar, Colombia. Se llevaron a cabo bioestimulación, bioaumentación y un tratamiento de control bajo condiciones anaerobias y aerobias secuenciales. El proceso de biodegradación anaerobia duró 8 semanas y consecutivamente se realizó el proceso aerobio por 20 semanas. En el proceso de bioestimulación se adicionó fósforo para optimizar la proporción C:N:P en el suelo tratado. De las bacterias nativas se aislaron las cepas bacterianas con la capacidad biodegradadora del DDT y fueron identificadas mediante las características morfológicas y ampliación por PCR de la región de

1465 pb del gen ribosomal 16S y secuenciación. De estas se seleccionaron cuatro cepas bacterianas para el proceso de bioaumentación: *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas caviae*, y *Bacillus sp*, las cuales fueron bioaumentadas en el laboratorio e inoculadas en el suelo tratado en concentración de 10⁸ UFC/ml. La concentración de DDT, DDD y DDE se determinó por medio de cromatografía de gases. Los mejores resultados se obtuvieron durante la fase anaerobia logrando una remoción de DDT, DDD y DDE en un 56,2%, 17,1% y 44,5% respectivamente.

Palabras clave: bioaumentación, bioestimulación, DDT

Abstract

DDT and other organochlorine pesticides has been used extensively in Colombia between the years 1970 and 1980 in cotton fields. DDT is resistant to degradation and strongly linked with numerous

health problems and its use is currently forbidden. The purpose of this research was to evaluate the biodegradation of DDT, DDD and DDE, products present in the soil contaminated during 16 years in contaminated soil at Agustín Codazzi, Cesar, Colombia. Biostimulation, bioaugmentation, and a control under anaerobic and aerobic conditions sequential treatment were carried out. The process of anaerobic biodegradation lasted 8 weeks and was consecutively held the aerobic process for 20 weeks. In the process of biostimulation added phosphorus to optimize the ratio C:N:P in the treated soil. From native bacteria were isolated bacterial strains with the ability biodegradadora of DDT and were identified using morphological characteristics and expansion by PCR of the region of 1465 pb of the gene 16S ribosomal and sequencing. Of these we selected four bacterial strains for the process of bioaugmentation: *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromona caviae*, and *Bacillus SP.*, which were bioaugmented in laboratory and inoculated into the soil treated in concentration of 108 cfu/ml. The concentration of DDT, DDD and DDE was determined by gas chromatography. The best results were obtained during anaerobic achieving a removal of DDT, DDD and DDE 56.2% 17.1% and 44.5% respectively.

Key-words: bioaugmentation, biostimulation, DDT

Resumo

DDT igual que outros pesticidas organoclorados têm sido utilizados extensamente na Colômbia

entre 1970 e 1980 nas culturas de algodão. O DDT é resistente à degradação e fortemente relacionado com numerosos problemas de saúde e atualmente está proibido sua utilização. O propósito desta pesquisa foi avaliar a biodegradação do DDT e dos produtos DDD e DDE presentes no solo contaminado durante 16 anos na localidade Agustín Codazzi, Cesar, Colômbia. Foi feita bioestimulação, bioaugmentação e um tratamento de controle baixo condições anaeróbias e aeróbias sequenciais. O processo de biodegradação anaeróbia durou 8 semanas e consecutivamente foi realizado o processo aeróbio por 20 semanas. No processo de bioestimulação foi adicionado fósforo para otimizar a proporção C:N:P no solo tratado. Das bactérias nativas, isolaram-se as cepas bacterianas com a capacidade biodegradadora do DDT e foram identificadas por morfologia e ampliação por PCR do gene ribossomal 16S e sequenciamento. Selecionaram-se quatro cepas bacterianas para o processo de bioaugmentação: *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromona caviae*, e *Bacillus sp*, bioaugmentadas no laboratório e inoculadas no solo tratado, na concentração de 108 UFC/ml. A concentração de DDT, DDD e DDE determinou-se por cromatografia de gases. Os melhores resultados foram obtidos durante a fase anaeróbia conseguindo a remoção de DDT, DDD e DDE em 56,2%, 17,1% e 44,5% respectivamente.

Palavras-chave: bioaugmentação, bioestimulação, DDT.

Introducción

El municipio de Agustín Codazzi, Cesar, Colombia, se convirtió en el primer productor nacional de algodón al cultivar 60.000 ha en año 1975 (Soler & Prieto, 1982). El proceso empleado en este cultivo correspondía a una agricultura extensiva, determinada por la utilización indiscriminada de insumos químicos para el desarrollo de los monocultivos. Entre estos insumos se aplicaba gran cantidad de compuestos organoclorados como pesticidas. En los años noventa se terminó la bonanza algodonera

y quedaron atrás miles de hectáreas de suelo infértil y grandes remanentes de agroquímicos, entre estos compuestos organoclorados. La forma más fácil de deshacerse de estas sustancias fue a través de un simple enterramiento, sin control alguno, en las zonas aledañas de antiguo cultivo (Barrios, 2013). Corporación Autónoma Regional del Cesar (CORPOCESAR) ha realizado en año 1997 estudios que revelaron la presencia de gran cantidad de pesticidas en el suelo y a los que se les atribuye hoy,

la responsabilidad de los casos de cáncer y otras enfermedades presentadas en la región (CORPO-CESAR & Geosísmica y Ambiente, 1997).

Los pesticidas organoclorados son compuestos químicos orgánicos de origen sintético, donde algunos o la totalidad de sus átomos de hidrógeno se substituyen por cloro. Diversas investigaciones destacan la gran persistencia de los pesticidas organoclorados en el suelo, debido a su estabilidad estructural y lenta degradación (Xuejun *et al.*, 2006). 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 en sistemas aerobios (Arbeli, 2009). Lo anterior indica, mejores resultados en la biodegradación de compuestos organoclorados, bajo sistemas de tratamiento de deshalogenación reductiva en condiciones anaerobias, seguida de aireación para generar condiciones aerobias (Eweis *et al.*, 1999; Baczynski *et al.*, 2010; Betancur, 2013). Generalmente los pesticidas organoclorados inhiben el crecimiento de los microorganismos, haciendo difícil su biodegradación. Sin embargo largos tiempos de permanencia de estos componentes en el suelo 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 (Castro, 2008; Fang *et al.*, 2010; Tomasini, 2011; Xiaomin *et al.*, 2015). En la presente investigación se comparó la biodegradación de pesticidas organoclorados mediante la bioaumentación y bioestimulación, en un suelo contaminado procedente del municipio de Agustín Codazzi, Cesar, utilizando el consorcio bacteriano nativo desarrollado en este suelo. Los dos métodos utilizados a escala de laboratorio recombinan las condiciones anaerobias –reductoras- y aerobias –oxidativas-, secuenciales para lograr mayor efectividad de la eliminación de estos contaminantes, acumulados en el suelo por más de 16 años.

Materiales y métodos

Muestreo de suelo

El muestreo de suelo se realizó en las antiguas instalaciones del Instituto Técnico Agropecuario Antonio Galo Lafaurie (Figura 1), zona donde, según informes de la Corporación Autónoma Regional del Cesar (Corpocesar), registró la existencia de una gran concentración de pesticidas. Las muestras se tomaron según la metodología expedida por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA, 2014). Inicialmente se delimitó la zona, separando dos cuadrantes de 50x50 m para aplicar el patrón de zig-zag cada 12 m, marcando un total de 80 puntos. En cada punto se tomaron aproximadamente 3 kg de la muestra a una profundidad de 40 cm. Finalmente se generó la muestra compuesta, cual fue homogenizada a través de operaciones como el secado, la trituración y tamizado.



Figura 1. Zona de muestreo de suelo contaminado

Fuente: Alcaldía de Agustín Codazzi.
www.agustincodazzi-cesar.gov.co

Determinación de las condiciones iniciales del suelo procedente de la zona de interés.

Se determinaron propiedades físico-químicas de la muestra de suelo proveniente de la zona de interés aplicando métodos estandarizados y/o propuestos por la normativa de la Sociedad de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Sociedad Americana

para Pruebas y Materiales (ASTM) y las de Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC) entre otras.

Identificación de las bacterias presentes en el suelo y las bacterias utilizadas en bioaumentación.

Las bacterias nativas presentes en el suelo contaminado de interés se aislaron e identificaron mediante la descripción macro y microscópicas de las cepas aisladas y la aplicación del índice Analítico de Perfil para Bacterias No Entéricas (API 20 NE). Las cepas utilizadas para el proceso de bioaumentación se aislaron y se purificó su DNA luego se realizó la amplificación por PCR de la región 1465 del gen ribosomal 16S. Tras la purificación de los fragmentos de PCR y secuenciación con los iniciadores 27F, 518F, 800R y 1492R del gen ribosomal 16S se realizó el ensamblaje y obtención de la secuencia problema. Análisis taxonómico de la secuencia problema se realizó aplicando la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI), Greengenes Lawrence Berkeley National Laboratory y Ribosomal Database Project (RDP). Finalmente se realizó el alineamiento y generación de un árbol de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema.

Análisis de los compuestos organoclorados

Los compuestos organoclorados se identificaron aplicando 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.*). 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 iones seleccionados]. La columna empleada en el análisis fue DB-5MS [5%-fenil-poli (metilsiloxano), 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm]. La inyección se realizó en modo *splitless* con volumen de dos µL).

Dimensionamiento del sistema experimental

Para el desarrollo de proyecto se establecieron tres condiciones experimentales: bioestimulación,

bioaumentación y control de las condiciones, cada uno por triplicado, en bioreactores de plástico con 8.5 kg de suelo, tomado previamente en municipio Agustín Codazzi. Al inicio del proceso de bioremediación se llevaron los reactores al 60% de su capacidad de campo, mediante la adición de un volumen de agua que se determinó a partir de los análisis iniciales para mantener el suelo en rango de 50 a 70% de la capacidad de campo y de esta manera garantizar el buen desarrollo de las bacterias (Mirsal, 2008). El agua fue adicionada a los bioreactores mediante un sistema de microaspersión por gravedad.

En el proceso de *bioestimulación* se ajustó nivel de fósforo en el suelo de interés y se aplicó condiciones anaerobias durante 8 semanas y aerobias consecutivas por 20 semanas adicionales. Para conocer el requerimiento de fósforo, se determinó la relación C: N: P, a partir de la caracterización inicial del suelo y se consideró las recomendaciones de la literatura 100:10:1 (Fuentes, 1999; Blaine, 1993). En la técnica de *bioaumentación*, adicional a la nivelación de fósforo se agregó caldo bacteriano de 4 bacterias aisladas del suelo de interés, teniendo en cuenta su potencial de biodegradación de los compuestos organoclorados, reportado por la literatura (Betancur, 2013; Nezha, 2013; Pensri & Alissara, 2011; Madigan *et al.*, 2009; Castro, 2008). Con el fin de comprobar la compatibilidad entre las cepas seleccionadas, se realizó prueba de crecimiento o inhibición en medio de Agar Tripticasa de Soya- marca Merck, aplicando diferentes combinaciones de estas bacterias. Iniciando el proceso de bioaumentación se agregó las cepas bacterianas seleccionadas al caldo nutritivo, en cantidad de su crecimiento en una caja Petri. Finalmente se obtuvo una concentración bacteriana de 10⁸ UFC/ml (determinada por recuento en placa) recomendada por la literatura (Vásquez *et al.*, 2010; Ríos, 2005). Este caldo se adicionaba al suelo, sometido al proceso de bioaumentación en un volumen de 300 ml con frecuencia de cada mes. El resto de las condiciones se conservaron de igual manera que en los ensayos de bioestimulación. Adicionalmente se tuvo en cuenta *control de las condiciones* que fue un bioreactor con suelo de interés, sometido únicamente al riego y las condiciones anaerobias y aerobias consecutivas, analizado durante el mismo tiempo que los otros experimentos.

Condiciones anaerobias. Para mantener las condiciones anaerobias, se cubrió la superficie de suelo con parafina y se colocaron las tapas en cada uno de los reactores. Esta fase tuvo una duración de 8 semanas, donde el tiempo estipulado se tomó con base a resultados reportados en la literatura (Corona-Cruz, 1999).

Condiciones aerobias. Una vez terminada la fase anaerobia, se cambiaron las condiciones en los mismos sistemas de biodegradación para proporcionar un ambiente aerobio, durante un periodo de 20 semanas. Las condiciones aerobias se garantizaron por medio de la introducción de aire al suelo. El aire fue inyectado al suelo mediante mangueras 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, produciendo en total, un caudal de aire de 330 L/min.

Resultados y discusión

Determinación de las condiciones iniciales del suelo: El suelo utilizado para este estudio fue de textura franca, (promedio \pm desviación estándar; 45,76% \pm 3,05% arena, 41,28% \pm 3,28%, limo y 12,96% \pm 1,65% arcilla.) En la Tabla 1 se resumen propiedades fisicoquímicas.

Tabla 1. Resumen de las propiedades fisicoquímicas de suelo en estudio.

Parámetro	Valor
Granulometría	
pH en H ₂ O	6.68 \pm 0,03
Δ pH	-0,42
Conductividad eléctrica	204,57 \pm 6,6 μ s/cm
Cloruros	4008,2 mg/kg
Densidad Aparente	1,60 \pm 0,02 g/cm ³
Humedad volumétrica	2,4% \pm 0,21
Capacidad de campo	17,6 \pm 0,52 meq-g/100 g suelo
Materia orgánica	1,08%
Capacidad de intercambio catiónico	1,604 g/cm ³ \pm 0,02
Nitrógeno	1025,55 mg/Kg de suelo
Fósforo	1,33 mg/Kg de suelo

Fuente: Kopytko *et al.*, 2016.

El suelo de interés fue clasificado como bien graduado, con el pH cercano a la neutralidad y alta conductividad relacionada con el alto contenido de los cloruros. El suelo presentó una escasez de humedad y compactación ligera así como muy bajo contenido de materia orgánica y un desbalance entre el contenido de nitrógeno y fósforo. La cromatografía realizada en la muestra de suelo de interés reveló la

presencia de cinco pesticidas organoclorados: 4,4'-DDT (9,1 mg/kg), 4,4'-DDD (2,4 mg/kg), 4,4'-DDE (1,1 mg/kg), Endrin (1,9 mg/Kg) y *trans*-Clordano (0,1 mg/kg). Relacionando las altas concentraciones de cloruros presentes en el suelo estudiado y registro de elevadas concentraciones de los productos de degradación del 4,4'- DDT (como lo son: 4,4'-DDD y 4,4'-DDE), se consideró que hay un progreso de

biodegradación del 4.4'-DDT, realizado por las bacterias nativas adaptadas a las condiciones en el lugar. De igual manera la gran cantidad de DDT y Endrín hallada en la muestra de suelo, donde se enterraron estos pesticidas hace más de 16 años, señala la necesidad de buscar un método eficiente, cual puede acelerar el proceso natural de su degradación. En análisis microbiológico inicial de bacterias nativas, presentes en el suelo contaminado, se identificaron 37 cepas de los géneros: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Enterobacter*. Estos géneros bacterianos reporta la literatura como microorganismos con alto potencial para degradar compuestos organoclorados (Xiaomin *et al.*, 2015; Betancur, 2013; Nezha, 2013; Tomasini, 2011).

Identificación molecular de las cepas bacterianas aisladas del suelo contaminado, para el proceso de bioaumentación

Para el proceso de bioaumentación se seleccionaron cuatro cepas bacterianas identificadas inicialmente por observación microscópica, macroscópica seguida por la aplicación del índice Analítico de Perfil para Bacterias No Entéricas (API 20 NE). El interés en uso de estas cepas fue la abundancia de estos microorganismos en el suelo contaminado así como su relación con la biodegradación de compuestos organoclorados, reportada en literatura (Betancur, 2013; Nezha, 2013; Pensri & Alissara, 2011; Madigan *et al.*, 2009; Castro, 2008). La identificación molecular de estas cepas bacterianas permitió determinar géneros y especies. En la Figura 2 se reportan resultados de la comparación de la secuencia problema de la cepa 1F contra la base de datos RDP indicando la similitud en la mayoría de su longitud con cepas identificadas como *Pseudomonas*.

Classifier :: Hierarchy View

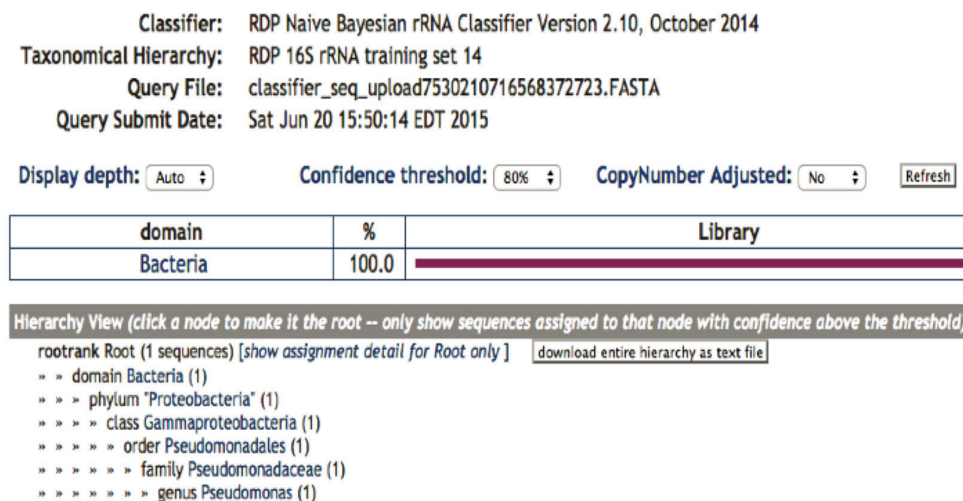


Figura 2. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra la base de datos RDP.

Utilizando la base de datos de secuencias tipo, del algoritmo Seqmatch-RDP contra aislamientos cultivados indicó que la secuencia problema ensamblada es muy similar en la mayoría de su longitud con cepas identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*. (Figura 3) La búsqueda en la base de datos Greengenes indicó que la secuencia problema es muy similar a secuencias de *Pseudomonas sp.* y *Pseudomonas*

aeruginosa. Finalmente los resultados del análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada de 1467 pb contra la base de datos curada del NCBI, Genomic Reference Sequences, RefSeq, indicó un 99,9% de identidad en el 100% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16s pertenecientes a *Pseudomonas aeruginosa*.

SeqMatch :: Detail Hierarchy

[Save selection and return to summary](#)

Query Sequence: seqmatch_seq, 1397 unique oligos

Match hit format:

short ID, orientation, similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

```

+ rootrank Root (0/5/10132) (selected/match/total RDP sequences)
+ domain Bacteria (0/5/9729)
+ phylum "Proteobacteria" (0/5/3614)
+ class Gammaproteobacteria (0/5/1647)
+ order Pseudomonadales (0/5/231)
+ family Pseudomonadaceae (0/5/153)
+ genus Pseudomonas (0/5/132)
   S000010427 - not_calculated 0.914 1460 Pseudomonas aeruginosa (T); DSM50071; X06684
   S000428789 - not_calculated 0.898 1368 Pseudomonas stutzeri (T); ATCC 17588; AF094748
   S000514601 - not_calculated 0.933 1444 Pseudomonas otitidis (T); MCC10330; AY953147
   S000824948 - not_calculated 0.888 1344 Pseudomonas panipatensis (T); Esp-1; EF424401
   S003288366 - not_calculated 0.996 1456 Pseudomonas aeruginosa (T); type strain: DSM 50071; HE978271
  
```

Figura 3. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra SeqMatch-RDP

El árbol de distancias (Figura 4) construido a partir de las 20 secuencias de microorganismos cultivables más cercanas, disponibles en la base de datos RDP, muestra que la secuencia problema se agrupa en el mismo clado con secuencias de

Pseudomonas aeruginosa, con un soporte de ramas del 95%. Con base en el anterior análisis se afirmó que la secuencia analizada pertenece a la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

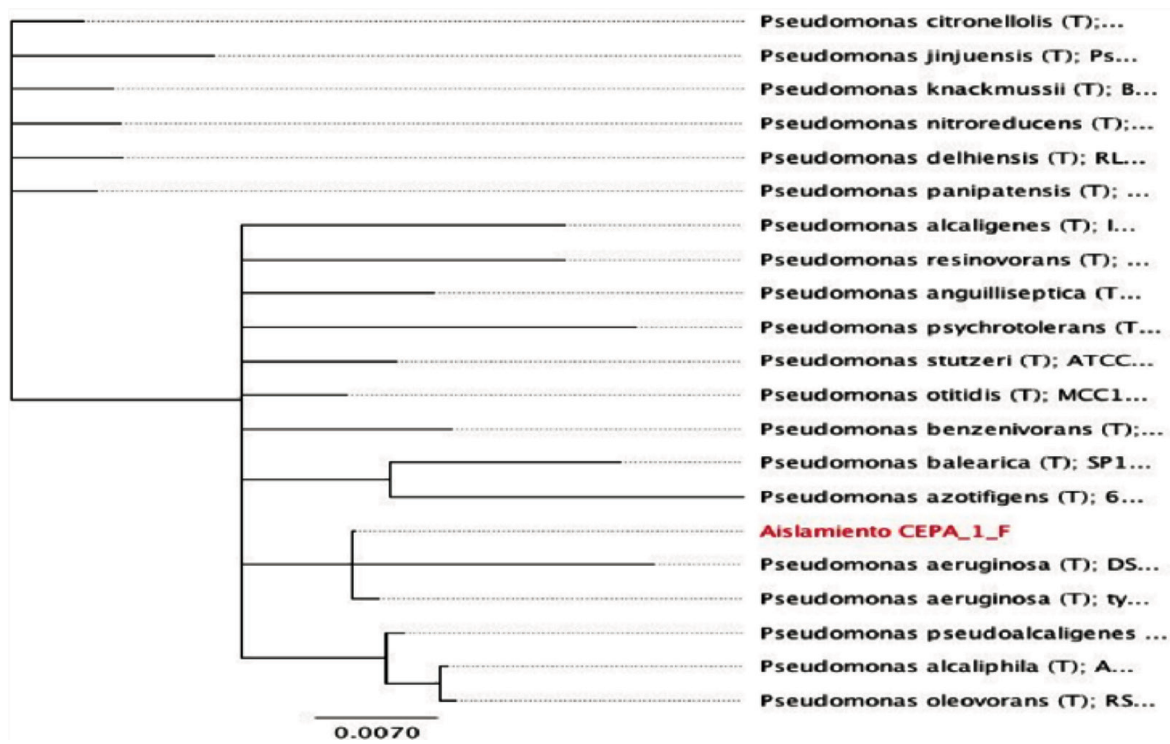


Figura 4. Árbol filogenético de *Pseudomonas aeruginosa*, correspondiente a la cepa 1F

Las otras cepas aisladas del suelo contaminado, se analizaron con la misma metodología. En la Tabla 2 se resumen resultados de la identificación de las cepas de interés aisladas para el proceso de bioaumentación.

Tabla 2. Resumen de la identificación molecular de las cepas aisladas para el proceso de bioaumentación.

Muestra	Longitud de la secuencia ensamblada	Resultados RefSeq Genomic- NCBI			Resultados RDP	Resultados Greengenes	Resultado final	
		Microorganismo	% de identidad	% de cobertura			Género	Especie
CEPA 1	1415 pb	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99,9	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	Pseudomonas	aeruginosa
CEPA 2	1443 pb	<i>Pseudomonas sp.</i>	99,8	100	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Pseudomonas taiwanensis</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas monteilii</i> <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Pseudomonas tawianensis</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas monteilii</i> <i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Pseudomonas	-
CEPA 3	1390 pb	<i>Pseudomonas putida</i>	99,8	100	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Pseudomonas putida</i>	Pseudomonas	putida
CEPA 4	1441 pb	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99,7	100	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>	Bacillus	-

Tratamiento de la muestra de suelo en condiciones anaerobias y aerobias consecutivas.

En la Tabla 3 se relacionan los porcentajes de remoción del 4,4'-DDTy de sus productos de degradación

(4,4'-DDE y 4,4'-DDD) en los procesos de bioaumentación, bioestimulación y en el control al final de la fase anaerobia (8 semanas).

Tabla 3. Concentración removida del 4,4'- DDT y sus metabolitos después del tratamiento anaerobio

Tratamiento	Porcentaje de remoción [%]		
	4,4'-DDT	4,4'-DDE	4,4'-DDD
Bioaumentación	56,48	44,54	17,08
Bioestimulación	9,45	ND	ND
Control*	27,25	ND	ND

*Aplicación de riego y un sistema anaerobio y aerobio consecutivo

ND no detectable

Durante la etapa anaerobia ocurre la sustitución de cloro por el átomo de hidrógeno en la molécula de organoclorado y se considera que las condiciones anaerobias generan mejores resultados que los ambientes aerobias, en el proceso de biodegradación. (Aislabe *et al.*, 1997). Después de 8 semanas de tratamiento anaerobio, se destacó el proceso de bioaumentación, en el cual se presentó 56,48% del 4,4'- DDT removido. De la misma manera los productos formados 4,4'- DDE y 4,4'-DDD fueron utilizados por las bacterias, durante el proceso de biodegradación, como la fuente primaria de carbono, logrando al final un porcentaje de remoción de 44,54 y 17,08% respectivamente. Teniendo en cuenta que en el proceso de bioaumentación se adicionaba al suelo un caldo bacteriano con los cuatro microorganismos aislados de las bacterias nativas, se aumentó el potencial de biodegradación de los pesticidas organoclorados en este proceso, lo cual explica alto porcentaje de su degradación en esta fase. Considerando que la bioestimulación es la adición de diferentes tipos de nutrientes cuya falta podría limitar el crecimiento de microorganismos nativos en este estudio se adicionó el fósforo al suelo. (Ortiz, 2013; Piehler *et al.*, 1999; Rhykerd *et al.*, 1999). Esto fue debido a que el suelo proveniente de Agustín Codazzi, contenía alta concentración de carbono y nitrógeno pero bajo nivel de fósforo, necesario para que las células microbianas sinteticen ácidos nucleicos y fosfolípidos. Por lo anterior en el proceso de bioestimulación se adicionó al suelo el elemento faltante,

para generar relación C:N:P recomendada por la literatura. (Fuentes, 1999; Blaine, 1993).

El rendimiento de remoción del DDT y de los productos de su degradación en el tratamiento de la bioestimulación bajo las condiciones anaerobias no fue satisfactorio. Identificando las bacterianas degradadoras de compuestos organoclorados desarrolladas en los reactores donde se aplicó la bioestimulación se encontró *Burcolderia cepasia*, *Pseudomona putida*, *Enterobacteria* y *Bascillus sp.* Estas cepas podrían generar la competencia entre ellos y otras bacterias desarrolladas después de nivelar las condiciones nutricionales en el suelo. En el bioreactor que representó el control de proceso, solo se agregaba el agua al suelo y fue sometido a las condiciones anaerobias por 8 semanas. En este caso se observó un porcentaje de remoción del 4,4'-DDT correspondiente a 27,25%, lo cual es superior que en un proceso de bioestimulación. En este suelo, solo se encontró *Enterobacteria* adaptada a las condiciones de alta toxicidad de los pesticidas organoclorados, cual utilizó 4,4'-DDT como la fuente primaria de carbono sin competir con otras bacterias. El tratamiento aerobio realizado durante de 20 semanas permitió la degradación adicional del 4,4'-DDT. En la Tabla 4 se resumen porcentajes de remoción de los pesticidas organoclorados del suelo, después de 20 semanas de tratamiento aerobio consecutivo.

Tratamiento	Porcentaje de remoción [%]		
	4,4'-DDT	4,4'-DDE	4,4'-DDD
Bioaumentación	46.5%	17.8%	8.5%
Bioestimulación	39.11%	4.3%	ND
Control*	25.28%	ND	ND

Tabla 4. Concentración removida del 4,4'- DDT y sus metabolitos después del tratamiento aerobio consecutivo.

*Aplicación de riego y un sistema anaerobio y aerobio consecutivo

ND no detectable

El porcentaje de remoción reportado en la Tabla 4 presenta el resultado únicamente de la fase aerobia. Hay que tener en cuenta que al aplicar en los bioreactores aire con el caudal de 330L/min, se generó la expansión de los poros de suelo, liberando los compuestos organoclorados, fenómeno reportado por otros autores (Betancourt, 2013). Las concentraciones de estos compuestos al iniciar el proceso aerobio, superaron la cantidad inicial en la fase anaerobia, lo cual dejó ver la fuerte vinculación y estabilización de estos pesticidas en el suelo, creando su permanencia durante muchos años. (Agbeve *et al.*, 2014).

Finalizando el proceso aerobio se detectó la remoción de 46,5% del 4,4'-DDT en el proceso de bioaumentación seguido por la bioestimulación con 39.11%. Adicionalmente en esta etapa, la bioestimulación presentó un aumento mayor al 10 % con respecto al proceso de control. Relacionando este

resultado con análisis microbiológico en el suelo se encontró que después del proceso aerobio los suelos tratados por bioestimulación registraron presencia de *Bacillus sp* y *Pseudomona putida*, pero en los reactores de control solo se detectaron *Bacillus sp* relacionados con la degradación de los compuestos organoclorados. Altos porcentajes de remoción de 4,4'- DDT y de sus productos de degradación en condiciones aerobias indican que este tratamiento aporta una remoción adicional de organoclorados del suelo.

Análisis por cromatografía de gases acopada a espectrometría de masas de la muestra tratada en condiciones aerobias reveló la presencia de otros compuestos clorados como: β -Lindano, Dieldrín, Endrin cetona. En la Figura 5 se puede observar los cromatogramas correspondientes a los tratamientos Bioaumentación, Bioestimulación y control en la muestra de suelo.

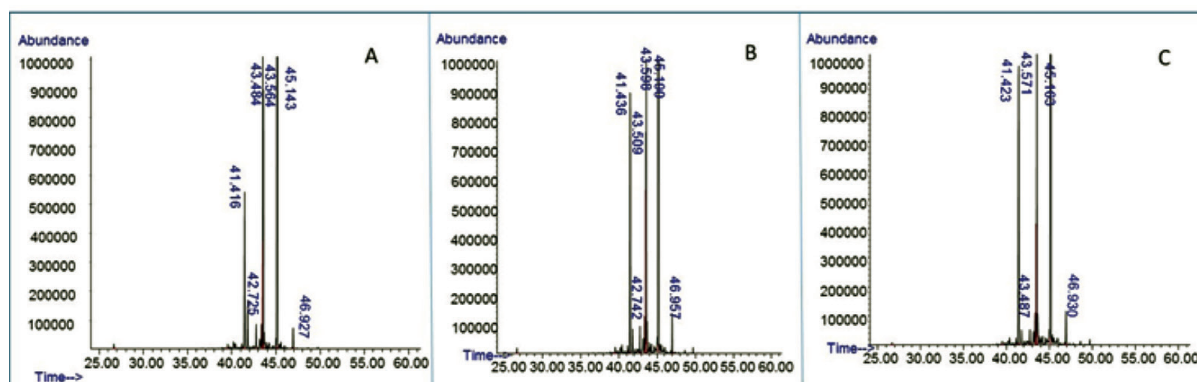


Figura 5. Cromatogramas de los tratamientos aplicados a muestras de suelo después de 12 semanas en condiciones aerobias A) Bioaumentación, B) Bioestimulación C) Control

En los cromatogramas A, B y C se encuentran presentes los compuestos 4,4-DDE, 4,4-DDD y 4,4-DDT correspondientes a tiempos de retención, 42.725, 43.564 y 45.143 respectivamente.

Conclusiones

El análisis fisicoquímico inicial del suelo contaminado con pesticidas organoclorados permitió clasificar el suelo como franco, con predominancia de limos y arenas. Este suelo presenta bajo contenido de materia orgánica (1,83%) y de partículas coloidales que desfavorece la capacidad de intercambio catiónico produciendo deficiencias nutricionales para el crecimiento de las plantas. El análisis microbiológico del suelo en estudio permitió identificar las cepas nativas, destacando los géneros de *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas (fluorescens, putida, mendocina)*, y *Aeromonas caviae*, los cuales se reportan en la literatura como bacterias con alto potencial degradativo de compuestos organoclorados. El suelo analizado tiene presencia de altas concentraciones iniciales de los metabolitos de DDT (1.1 mg/kg DDE; 2.4 mg/kg DDD; 9.1 mg/kg DDT) indicando un proceso de deshalogenación en curso, realizado por las bacterias nativas, adaptadas a los pesticidas organoclorados presentes en el suelo.

Mejores resultados de bioremediación estimulada se obtuvieron mediante una bioaumentación con un 56,2% de remoción de DDT, 17,1% de DDD y 44,5% de DDE durante 8 semanas de tratamiento anaerobio y un 46.5% de remoción de DDT, 17.8% de DDD y 8.5% de DDE adicionales después de 20 semanas de tratamiento aerobio consecutivo.

Agradecimientos

Los autores agradecen el soporte financiero para realizar esta investigación, a través del proyecto DGI 053-0614-2400 (Universidad Pontificia Bolivariana)

Literatura citada

1. Agbeve, S., Osei-Fosu, P. & Carboo, D. (2014). Levels of organochlorine pesticide residues in *Mondia whitei*, a medicinal plant used in traditional medicine for erectile dysfunction in Ghana. *Int J Adv Agric Res.*; 1:9–16.
2. Aislable, J. M., Richards, N.K. & Boul, H.L. (1997), Microbial degradation of DDT and its residues—a review. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Vol. 40: 269-282
3. Arbeli, Z. (2009). Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): el caso de los bifenilos policlorados (PCB). *Acta Bilógica Colombiana. Volumen 4*, Número 1.
4. Baczynski, T., Pleissner, D. & Grotenhuis, T. (2010). Anaerobic biodegradation of organochlorine pesticides in contaminate soil- Significance of temperature and availability. *Chemosphere*, volumen 78 pp.22-28.
5. Barrios, M. (2013). En Codazzi solo quedan ruinas de la bonanza algodonera. Recuperado de: <https://www.elheraldo.co/region/cesar/en-codazzi-solo-quedan-las-ruinas-de-bonanza-algodonera-103899>
6. Blaine, M. (1993). Soil microbial ecology. Applications in agricultural and environmental management. Marcel Dekker, Inc. New York. 646pp.
7. Betancur B. (2013). Biorremediación de Suelo Contaminado con el Pesticida 1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-Clorofenil) Etano (Ddt) mediante Protocolos de Bioestimulación y Adición de Surfactante. Medellín. (Tesis Magister) ciencias – Biotecnología. Facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia, 143 pp.
8. Castro, D. (2008). 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. (Tesis de pregrado). Licenciado en Biología. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
9. Corona-Cruz, A. (1999). Anaerobic-Aerobic Biodegradation of DDT (Dichlorodiphenyl Trichloroethane). *Soils Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63:219-225
10. CORPOCESAR & Geosísmica y Ambiente. (1997). Estudio de diagnóstico y evaluación del enterramiento de pesticidas en el municipio de Agustín Codazzi y procedimiento de descontaminación y disposición final de los mismos. Valledupar, Cesar, Colombia.
11. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA. (2014). Guía para la toma de muestras de suelo.
12. Eweis, J., Ergas, S., Chang, D. & Schroeder, E. (1999). Principios de Biorrecuperación (Biorremediación). Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. Ed. McGraw-Hill ISBN 84-481-2511-8, p 284.

13. Fang, H., Dong, B., Yan, H., Tang, F. & Yu. Y. (2010). Characterization of a Bacterial Strain Capable of Degrading DDT Congeneres and its Use in Bioremediation of Contaminated Soil. *Journal of Hazardous Material*, volumen 184, pp. 1-3.
14. Fuentes, Y. (1999). El suelo y los fertilizantes. 5 ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa. 327 p.
15. Kopytko, M., Correa, S. & Plata A. (2016). Sequential reductive and oxidative conditions used to biodegradation of organochlorine pesticides by native bacteria. IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering*, volumen 138, Number 1. DOI:10.1088.
16. Madigan, M., Clark, D., Martinko, J., & Dunlap, P. (2009). Brock: Biología de los microorganismos. 12 ed. Madrid: Pearson Educación. 1296p. ISBN 978-84-7829-097-0.
17. Mirsal, A. (2008). Soil Pollution. Origin, Monitoring, & Remediation. Berlin: Springer. ISBN 978-3-540-70775-2.
18. Nezha, T *et al.* (2013). Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. En Biodegradation life of science. ISBN 978-953-51-1154-2.
19. Ortiz, I., Velasco, A., Le Borgne, S. & Revah, S. (2013) Biodegradation of DDT by stimulation of indigenous microbial populations in soil with cosubstrates. *Biodegradation Vol.24*, 2 pp 215-225.
20. Pensri, P. & Alissara, R. (2011). Bioaugmentation of carbofuran residues in soil by Burkholderia cepacia PCL3: A small-scale field study. *International Biodeterioration & Biodegradation, Volume 65*, Issue 6, Pages 902-905, ISSN 0964-8305. DOI:10.1016/j.ibiod.2011.02.011.
21. Piehler, M.F., Swistak, J.G., Pinckney, J.L. and Paerl, H.W. (1999) Stimulation of Diesel Fuel Biodegradation by Indigenous Nitrogen Fixing Bacterial Consortia. *Microb Ecol* 38: 69-78.
22. Rhykerd R.L., Crews B., McInnes K.J. & Weaver R.W. (1999) Impact of bulking agents, forced aeration and tillage on remediation of oil-contaminated soil. *Biore-sour Technol* 67: 279-285.
23. 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
24. Soler, D. & Prieto, F. (1982). Bonanza y crisis del oro blanco 1960 – 1980. Bogotá, Colombia. Editorial Edigráficas Ltda Bogotá.
25. Tomasini, A. (2011). 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. ISBN: 978-607-477-560-0.
26. Vásquez, M., Guerrero, J. & Quintero, A. (2010). Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. *Revista Colombiana de Biotecnología*, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 141-157. ISSN 1909-8758.
27. Xiaomin, L., Zhong, L., Chunling, L., Jing, B., Yingtao, S. & Yongtao, L. (2015). Enhanced microbial degradation of pentachlorophenol from soil in the presence of earthworms: Evidence of functional bacteria using DNA-stable isotope probing. *Soil biology & Biochemistry volume 81*, pp.168-177.
28. Xuejun, W., Xiuying, P., Jing, C., Jundong, H., Fuliu, X. & Shu, T. (2006). Organochlorine pesticides in soil profiles from Tianjin, China. *Chemosphere, volumen 64*, Issue9, pp1514-1520.

Conflicto de Intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Recibido: octubre 07 de 2016
Aceptado: octubre 28 de 2016