

**EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE LIGNITO Y BACTERIAS
SOLUBIZADORAS DE CARBÓN EN LA BIODISPONIBILIDAD DEL DDT EN UN
SUELO POBRE EN MATERIA ORGÁNICA**

KERRY JOHANA DIAZ FUENMAYOR

**SUE CARIBE
UNIVERSIDAD DE LA GUAJIRA
FACULTAD DE INGENIERIA
MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
RIOHACHA – LA GUAJIRA**

2016

**EFECTOS DE LA APLICACIÓN DE LIGNITO Y BACTERIAS
SOLUBIZADORES DE CARBÓN EN LA BIODISPONIBILIDAD DEL DDT EN UN
SUELO POBRE EN MATERIA ORGÁNICA**

KERRY JOHANA DIAZ FUENMAYOR

CÓD. 40927310

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar el título

“Magíster en Ciencias Ambientales”

PhD. NELSON OSVALDO VALERO VALERO

DIRECTOR

SUE CARIBE

UNIVERSIDAD DE LA GUAJIRA

FACULTAD DE INGENIERIA

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

RIOHACHA – LA GUAJIRA

2016

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma del Jurado

Firma del Jurado

[Fecha de Sustentación]

DEDICATORIA

A Dios porque es el que da la sabiduría, de su boca nacen la ciencia y la prudencia y a mis padres por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia las metas se pueden lograr.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al profesor NELSON VALERO VALERO, por su acompañamiento como director, y su paciencia durante el desarrollo de esta investigación.

A MANUEL PANTOJA, por su disposición permanente y por compartir sus conocimientos.

A MARTHA LIGIA CASTELLANOS, por sus buenos consejos a lo largo de este estudio.

A JEIMMY BONIVENTO, por su permanente colaboración.

A ADRIAN RADILLO por sus conocimientos microbiológicos y su disposición el laboratorio de Ciencias Ambientales.

A MARLON BASTIDAS BARRANCO, por su interés y sus valiosos conocimientos en la Química

A VICTOR PINEDO Por su gran apoyo y colaboración.

A la UNIVERSIDAD DE LA GUAJIRA, especialmente equipo de trabajo del Laboratorio de Ciencias Ambientales por el apoyo y servicios prestado.

A la Red de investigación para el aprovechamiento de recursos naturales y obtención de productos biotecnológicos para suelos disturbados por actividad antrópica. Colciencias: 111557635893

Y a todas aquellas personas que no he mencionado, pero que con su apoyo hicieron posible la realización de este proyecto.

CONTENIDO

1	EL PROBLEMA DE ESTUDIO	4
1.1	Planteamiento del problema.....	4
1.2	Justificación	6
1.3	Objetivos.....	9
	1.3.1 Objetivo general	9
	1.3.2 Objetivos específicos.....	9
2	ESTADO DEL ARTE	10
2.1	Marco teórico.....	10
	2.1.1 Insecticidas organoclorados.....	10
	2.1.2 Formas de degradación.....	11
	2.1.3 Biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo.....	11
	2.1.4 Efectos sobre la salud y el ambiente de insecticidas organoclorados... 11	
3	METODOLOGÍA.....	13
3.1	Tipo de estudio y línea de investigación.....	13
3.2	Localización.....	13
3.3	Procedimiento	15
	3.3.1 Suelo	16
	3.3.2 Carbón de Bajo Rango (CBR) y Ácidos Húmicos (AH).....	16
	3.3.3 Microorganismos e inóculos microbianos.....	17
	3.3.4 Inoculo bacteriano	18
3.4	Ensayos en microcosmos	18
	3.4.1 Ensayo de adsorción de DDT en diluciones de suelo tratado previamente con CBR lignito y BSC.....	18
	3.4.2 Ensayo del efecto de CBR y BSC en suelo contaminado previamente con DDT. 20	
	3.4.3 Determinación de la actividad microbiana del suelo.....	21
	3.4.4 Capacidad de BSC para tomar DDT como fuente de carbono	21
	3.4.5 Análisis de los tratamientos mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) 22	
	3.4.6 Tratamiento estadístico de los datos	22
4	RESULTADOS Y DISCUSION	23
4.1	Caracterización del suelo	23

4.2	Ensayo 1: Adsorción inmediata de DDT por el suelo pre-tratado con lignito y BSC. 24	
4.3	Ensayo 2: Interacción DDT – SUELO durante 30 días. Efecto de la aplicación de CBR y BSC sobre la adsorción del contaminante.....	28
4.4	Ensayo 3: Interacción DDT – SUELO durante 6 meses. Efecto de la aplicación de CBR y BSC sobre la adsorción del contaminante.....	30
4.5	Análisis de CBR + AH por microscopía electrónica	32
5	CONCLUSIONES	34
6	BIBLIOGRAFÍA	36

TABLAS

Tabla 1 Diseño experimental de tratamientos aplicados durante 30 y 60 días.....	18
Tabla 2 Resultados de análisis físicos y químicos del suelo utilizado, siguiendo las metodologías propuestas en el manual de métodos de laboratorio de suelos del IGAC (IGAC, 2006)	24
Tabla 3 a) Ácido Húmico + BSC13 (<i>Acinetobacter</i> sp.) control; b) Ácido Húmico + BSC13 (<i>Acinetobacter</i> sp.) con DDT; c) Ácido húmico + BSC13 (<i>Acinetobacter</i> sp.) control; d) Ácido Húmico + BSC13 (<i>Acinetobacter</i> sp.) con DDT; e) CBR (virgen) control; f) CBR + BSC3 (<i>Microbacterium</i> sp.); g) CBR+ BSC25 (<i>Bacillus mycooides</i>); h) CBR + BSC13 (<i>Acinetobacter</i> sp.)	33

FIGURAS

Figura 1 Estructura molecular de algunos pesticidas organoclorados (De izquierda a derecha) DDT (Mižoch, 2006); Dieldrina (Neurotiker, 2008); Heptacloro (Yikrazuul, 2014)	10
Figura 2 Ubicación geográfica de Caracolcito corregimiento de El Copey, Cesar, Colombia.	13
Figura 3 Tajo "Comuneros" en la mina Cerrejón, lugar de extracción del CBR usado para los ensayos.....	14
Figura 4 (Izquierda): Porcentaje de DDT remanente en los extractos acuosos del suelo después del tratamiento con CBR y BSC. (Derecha): Contenido húmico en la fracción acuosa del suelo en los diferentes tratamientos.	25
Figura 5 DDT biodisponible después de su interacción directa con el suelo tratado con CBR y BSC durante 30 días.	28
Figura 6 (Izquierda): DDT biodisponible después de su interacción directa con el suelo tratado con CBR y BSC durante 6 meses. (Derecha): DDD biodisponible resultante de la transformación del DDT después de su interacción directa con el suelo tratado con CBR y BSC por 6 meses.	31

ANEXOS

Anexo 1 Curva de calibración de DDT	37
Anexo 2 Pico de la concentración más baja de la curva. Previa SPC	37
Anexo 3 Pico de la penúltima concentración de la curva (0,025 ppm). Previa SPC	37
Anexo 4 Pico de la concentración más alta de la curva. Previa SPC	37
Anexo 5 Pico de detección en muestra extraída de suelo.....	37
Anexo 6 Espectro UV teórico (arriba); Huella del espectro UV de la molécula en muestra extraída de suelo.	37

RESUMEN

El DDT es un insecticida organoclorado persistente que presenta residualidad en el medio ambiente. En este trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de lignito (carbón de bajo rango, CBR) y bacterias solubilizadoras de carbón (BSC), sobre la biodisponibilidad de DDT en un suelo agrícola con bajo contenido de materia orgánica. Para conseguirlo se hicieron tres experimentos; en el primer ensayo las muestras de suelo fueron tratadas con BSC, CB y CBR + BSC por 30 días, después fueron sumergidas en una solución de DDT al límite de solubilidad en agua, posteriormente se determinó el DDT remanente en la solución acuosa. En un segundo ensayo, las muestras de suelo, contaminadas previamente con DDT fueron tratadas con CBR y BSC. Después de 30 días de interacción las muestras de suelo fueron sumergidas en agua y fue determinado el DDT remanente en la solución. El tercer ensayo fue similar al anterior, pero el tiempo de interacción fue de 6 meses. En el primer experimento, bajo los tratamientos con CBR y CBR + BSC, se registró un porcentaje de DDT remanente en la solución acuosa de 8.16 % y 3.4 % respectivamente, indicando que el suelo tratado retuvo el compuesto. En el segundo ensayo, el tratamiento con BSC redujo significativamente el DDT biodisponible (0.007 ppm), comparado con el control (0.014 ppm); es posible que estas bacterias utilicen DDT como fuente de carbono. En el tercer experimento, en los tratamientos con CBR y CBR + BSC se encontró la mayor reducción en la biodisponibilidad de DDT, en este ensayo también se detectó el compuesto DDD generado a partir de la transformación del DDT, el cual mostró el mismo comportamiento; se puede sugerir además que el tiempo de interacción favorece la adsorción y copolimerización de los contaminantes a la materia orgánica humificada (MOH) del suelo. Teniendo en cuenta los

resultados, se puede sugerir en este caso específico, que el uso de CBR como fuente de MOH representa una estrategia promisorio para el tratamiento de suelos con bajo contenido de materia orgánica, afectados por contaminantes orgánicos persistentes, tales como el DDT.

PALABRAS CLAVE: DDT, lignito, adsorción, materia orgánica humificada, biodisponibilidad.

ABSTRACT

DDT is an persistent organochlorine insecticide that exhibits residuality in the environment. This study assessed the effect of the application of lignite [low rank coal (LRC)] and coal solubilizing bacteria (CSB), on the bioavailability of DDT in soil with low organic matter content. In doing this, three trials were designed; in the first trial, soil samples were treated with CSB and lignite for 30 days and, afterwards, they were immersed in a DDT solution at water solubility limit and, lastly, the remaining DDT in the aqueous solution was determined. In the second trial, soil samples previously contaminated with DDT were treated with LRC and CSB. After 30 days of this interaction, the soil samples were immersed in water and the remaining DDT in solution was subsequently determined. The third trial was similar to the latter, but the interaction lasted for 6 months. In the first experiment, treatments with LRC and LRC + CSB, showed 8.16 and 3.4 % of remaining DDT respectively, thus indicating the retention of the compound in the soil. In the second trial, the treatment with CSB greatly reduced the bioavailable DDT (0.007 ppm), compared to the control (0.014 ppm); this is possible since these bacteria use DDT as a carbon source. In the third trial, the highest reduction in the bioavailability of DDT took place in LRC and LRC + CSB treatments; this trial also detected DDD produced from DDT transformation, which showed the same behavior; the interaction timeframe favors adsorption and copolymerization of pollutants to humified organic matter (HOM) in soil. Use of LRC as a source of HOM represents a promising strategy for the treatment of soils with low organic matter content affected by persistent organic pollutants such as DDT.

KEY WORDS: DDT, lignite, adsorption, humified organic matter, bioavailability

INTRODUCCION

El DDT [1, 1, 1 – tricloro – 2,2 bis (4-clorofenil) etano], es un insecticida sintético que fue ampliamente usado en el control de malaria y de otras enfermedades transmitidas por mosquitos; sin embargo, su uso fue prohibido en la mayoría de los países, debido a su efecto negativo sobre la salud humana y los ecosistemas; a pesar de su prohibición, el DDT debido a su persistencia, recientemente fue reportado como contaminante en ecosistemas terrestres (Purnomo, et al., 2011). En 1993 fue prohibido en Colombia el uso y comercialización de DDT, sin embargo en la localidad de Caracolicito (municipio de El Copey), en el departamento del Cesar, se ha reportado la acumulación y persistencia de DDT y otros insecticidas, en predios de uso agrícola, abandonados desde la década de 1960 (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de Colombia, 2007). Este municipio inició su actividad agrícola algodonera desde 1953, y el uso de pesticidas, para control de plagas fue intenso hasta principio de la década de los 90, cuando por se presentó una drástica reducción en la producción, dejando excedentes de pesticidas sin utilidad, tales como metil-paratión, etil-paratión, endosulfan, arsénico de plomo y dicloro-difenil-tricloroetano (DDT). Estos compuestos fueron enterrados, lo que permitió su mezcla con el suelo e incrementó su residualidad (Sánchez, et al., 2006) (Rojas, 2010).

Teniendo en cuenta el anterior contexto, desde el punto de vista de la problemática ambiental relacionada a la presencia de DDT en el suelo, cómo los avances en investigación sobre el papel de la Materia Orgánica Humificada (MOH) para el tratamiento de suelos contaminados con plaguicidas, el propósito de este trabajo consistió en determinar el efecto de la aplicación de Carbón de bajo rango (CBR) y bacterias solubilizadoras de carbón (BSC)

sobre la biodisponibilidad de DDT en un suelo agrícola del departamento del Cesar, bajo condiciones de laboratorio.

Actualmente está en ejecución el proyecto de investigación macro financiado por Colciencias a través del cual se creó la **Red De Investigación Para El Aprovechamiento De Recursos Naturales Y Obtención De Productos Biotecnológicos Para Suelos Disturbados Por Actividad Antrópica** (Rpbsd), cuyo objetivo es integrar esfuerzos para la investigación y desarrollo de soluciones biotecnológicas a problemas de suelos disturbados por diferentes causas, con especial énfasis en suelos degradados del departamento del Cesar.

En el marco de esta red se adelanta el proyecto específico “Diseño De Productos Basados En El Uso Combinado De Microorganismos Benéficos Y Carbón De Bajo Rango Como Fuente De Materia Orgánica Humificada Para La Rehabilitación De Suelos Degradados” que busca desarrollar bioproductos a partir de microorganismos benéficos nativos de estos suelos y materiales carbonosos generados en la región que puedan utilizarse como enmiendas orgánicas para mejorar las propiedades de suelos degradados por agricultura, minería, ganadería y contaminación; con el presente trabajo se busca generar conocimiento útil para contribuir al tratamiento de zonas de enterramiento de plaguicidas que se encuentran en la zona desde hace varias décadas (Valero, et al., 2012) para lo cual es necesario estudiar en condiciones controladas de laboratorio la posibilidad de inmovilización de los plaguicidas de mayor importancia, entre ellos el DDT, lo anterior para avanzar en el desarrollo de estrategias que permitan reducir su biodisponibilidad en el suelo, en este caso, utilizando las propiedades de la MOH para inmovilizar contaminantes orgánicos y a la vez aprovechando un residuo de la minería de carbón en la zona, el CBR, que presenta un alto

contenido de Sustancias húmicas (SH) y por ello puede ser un recurso potencial como enmienda orgánica para el suelos degradados.

1 EL PROBLEMA DE ESTUDIO

1.1 Planteamiento del problema

En 1993 fue prohibido en Colombia el uso y comercialización de DDT, sin embargo en la localidad de Caracolicito (municipio de El Copey), en el departamento del Cesar, se ha reportado la acumulación y persistencia de DDT y otros insecticidas, en predios de uso agrícola, abandonados desde la década de 1960 (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de Colombia, 2007).

Este municipio inició su actividad agrícola aldononera desde 1953, y el uso de pesticidas, para control de plagas, fue intenso hasta principio de la década de los 90, cuando se presentó una drástica reducción en la producción, dejando excedentes de pesticidas sin utilidad, tales como metil paratión, etil paratión, endosulfan, arseniato de plomo y dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) (Bustamante, 2009).

Estos compuestos fueron enterrados, lo que permitió su mezcla con el suelo e incrementó su residualidad (Sánchez, et al., 2006) (Rojas, 2010). Para la remediación de suelos contaminados con DDT se han ensayado varias tecnologías fisicoquímicas y biológicas; como mecanismo de biorremediación se ha estudiado la degradación bacteriana del xenobiótico en cultivos microbianos puros, sin embargo se han presentado inconvenientes en ensayos de campo debido a factores relacionados con altas concentraciones del contaminante y desconocimiento del efecto de factores del suelo como textura, contenido de materia orgánica, disponibilidad de aceptores de electrones, pH y la aparición de metabolitos intermediarios tóxicos (Sudharshan, et al., 2012).

Por otra parte, se ha propuesto la disminución de DDT y de su toxicidad, a través de su inmovilización en la fracción de materia orgánica humificada (MOH) del suelo, mediante el uso de enmiendas orgánicas (Dercová, et al., 2007); además de reducir la biodisponibilidad, también se ha demostrado que el uso de enmiendas orgánicas aumenta la tasa de biodegradación de contaminantes orgánicos en el suelo (Stehlickova, et al., 2009).

Estudios previos a este trabajo han demostrado que un CBR tipo lignito generado en la zona carbonífera de La Guajira presenta alto contenido de MOH y a la vez éste carbón es susceptible de transformación por BSC nativas que contribuyen a la liberación de la fracción de MOH (Valero et al., 2014), también se demostró que la aplicación de CBR y CBR inoculado con BSC en suelos degradados con pobre contenido orgánico ocasiona cambios benéficos en algunas propiedades químicas y físicas que en consecuencia estimulan la actividad microbiana del suelo (Valero et al., 2016), lo cual es una evidencia que apoya el uso de este CBR, como fuente de materia orgánica humificada y representa una estrategia promisorio para el tratamiento de suelos con bajo contenidos de materia orgánica, afectados por contaminantes orgánicos persistentes.

Por lo anterior se propuso la siguiente pregunta de investigación: ¿El CBR tipo lignito generado como subproducto en la minería de carbón, en conjunto con bacterias solubilizadoras de carbón (BSC), como estrategia para incrementar el contenido húmico del suelo, podría incidir en la reducción de la biodisponibilidad de DDT en un suelo representativo de la zona afectada por residualidad de este compuesto?

1.2 Justificación

El DDT es un insecticida órgano-clorado que ha sido prohibido en la mayoría de los países debido a sus efectos adversos sobre la salud humana; no obstante, debido a su persistencia presenta residualidad en muchos lugares donde fue aplicado antes de la prohibición de su uso (Bownman, et al., 2013).

En Colombia, desde 1993 se prohíbe el uso, fabricación, formulación, importación y comercialización del DDT, siendo el primer país de Latinoamérica en prohibir su uso en un marco de consumo anual superior a 50 toneladas (El Tiempo, 1994) (Sánchez, et al., 2006).

La habilidad del suelo para retener los contaminantes orgánicos, es atribuida a los fenómenos de adsorción y a las reacciones químicas que ocurren sobre las superficies de las sustancias húmicas (SH) y las partículas minerales (Gevao, et al., 2000); (Fava, et al., 2004); los contaminantes hidrofóbicos como el DDT y otros bifenilos policlorados se hacen más solubles en los dominios hidrofóbicos de las SH, facilitando los procesos de biorremediación (Fava & Piccolo, 2002).

Por otra parte, se ha concluido que el carbón de bajo rango (CBR) generado como subproducto de la minería de carbón a cielo abierto es una materia prima conveniente para la extracción de SH (Gianoulli, et al., 2009) (Valero, 2013) y su aplicación directa al suelo podría ser una estrategia promisorio para aumentar el contenido de materia orgánica humificada (MOH) y mejorar algunas condiciones de suelos con bajo contenido de materia orgánica (Herrera, et al., 2012). (Valero, et al., 2014), reportaron la producción de SH, a partir de CBR, por la actividad de bacterias obtenidas de microhabitats influenciados por la minería

del carbón; el contenido de MOH en suelos deteriorados, incluso los afectados por contaminantes como el DDT, podría incrementarse mediante el uso de bacterias solubilizadoras de carbón, que poseen la capacidad de liberar MOH a partir de CBR. Además se ha descrito el potencial de CBRs oxihumolíticos (Carbones con alto grado de oxidación y contenido de materia orgánica humificada), como depuradores ambientales, al tener la capacidad de retener por adsorción, metales pesados y compuestos órgano-clorados, este efecto fue atribuido a la reactividad de algunos grupos funcionales de las SH, contenidas dentro de estos carbones (Janos, et al., 2011).

La biorremediación microbiana involucra el uso de microorganismos para degradar contaminantes orgánicos presentes en el ambiente, transformándolos en compuestos más simples y de menor peligrosidad, inclusive inocuos (Zhao & Poh, 2008). Esta estrategia de descontaminación tiene bajos costos, una amplia aceptación pública y puede llevarse a cabo en el sitio. Comparado con otros métodos, la biorremediación es una forma más promisoriosa y menos costosa de eliminar los contaminantes presentes en suelos y agua. En el suelo, los compuestos bifenilos clorados como el DDT, pueden ser parcialmente biodegradados por un grupo de bacterias que cometabolizan el contaminante.

Teniendo en cuenta las consideraciones expuestas, se considera necesario y conveniente el desarrollo de este trabajo cuyo propósito es determinar en condiciones de laboratorio, el efecto de la aplicación de CBR y bacterias solubilizadoras de carbón (BSC) sobre la biodisponibilidad de DDT en un suelo agrícola representativo de la zona afectada por la presencia de residuos de ese agroquímico, con el fin de generar conocimiento y

evidencia experimental que permita avanzar en el desarrollo de estrategias pertinentes para la descontaminación de estos suelos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar los efectos de la aplicación de un carbón de bajo rango (CBR) tipo lignito y bacterias solubilizadoras de carbón (BSC) sobre la biodisponibilidad del DDT en un suelo agrícola con bajo contenido de materia orgánica.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de DDT biodisponible en un suelo bajo contaminación controlada, en respuesta a la adición conjunta de lignito y bacterias solubilizadoras de carbón.

- Establecer en dos períodos de tiempo, el efecto de las bacterias solubilizadoras de carbón y lignito sobre la reducción de DDT, bajo interacción con el suelo sometido a contaminación controlada.

- Evaluar la reducción en la concentración de DDT por efecto de las bacterias solubilizadoras de carbón, al tomar el compuesto como fuente de carbono en medio de cultivo.

2 ESTADO DEL ARTE

2.1 Marco teórico

2.1.1 Insecticidas organoclorados

Los pesticidas organoclorados como el DDT [1, 1, 1 – tricloro – 2,2 bis (4-clorofenil) etano], Aldrina [1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-exo-1,4-endo-5,8-Dimetanonaftaleno], Clordano [1,2,4,5,6,7,8,8-octacloro-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindano], dieldrina [1aR,2R,2aS,3S,6R,6aR,7S,7aS)-3,4,5,6,9,9-hexacloro-1a,2,2a,3,6,6a,7,7a-octahidro-2,7:3,6-dimetanonafto[2,3-b]oxireno], heptacloro [1,4,5,6,7,8,8-heptacloro-3a,4,7,7a-tetrahidro-4,7-metanoindano], endrina [R,2S,3R,6S,7R,8S,9S,11R)-3,4,5,6,13,13-Hexacloro-10-oxapentaciclo[6.3.1.13,6.02,7.09,11] trideca-4-eno] y toxafeno, son denominados compuestos persistentes por su capacidad de permanecer por mucho tiempo en el ambiente. Los compuestos orgánicos persistentes (COP) son ambientalmente estables, liposolubles y tóxicos; bioacumulables y biomagnificables a través de la cadena trófica (Gómez, et al., 2006)

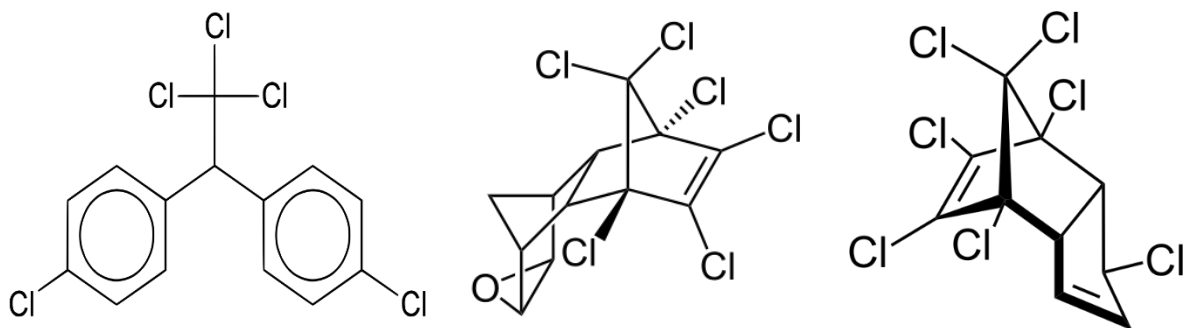


Figura 1 Estructura molecular de algunos pesticidas organoclorados (De izquierda a derecha) DDT (Mižoch, 2006); Dieldrina (Neurotiker, 2008); Heptacloro (Yikrazuul, 2014)

Todos ellos tienen una característica en común, químicamente están contruidos sobre una base de átomos de carbono, que son también los bloques de construcción de las biomoléculas, por lo que se clasifican como “orgánicos”. El carbono como elemento básico posee átomos que tienen una capacidad casi infinita de unirse entre sí y formar cadenas, anillos y otras varias configuraciones, y también de quedar unidos con átomos de otras sustancias.

2.1.2 Formas de degradación

La degradación del DDT resulta en productos de la declorización: DDE y DDD, pudiendo pasar directamente desde DDT a DDD, o siguiendo la ruta $DDT \rightarrow DDE \rightarrow DDD$ (Corona, et al., 1999).

2.1.3 Biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo

Una vez en el suelo, los contaminantes orgánicos pueden ser reducidos o eliminados por efectos biodegradativos, lixiviación o volatilización, o también pueden ser acumulados en la fracción de materia orgánica con los minerales del suelo. El término “biodisponibilidad” hace referencia a la fracción de un determinado compuesto químico que está en el medio en una forma tal que fácilmente puede ser tomado o transformado por organismos vivos (Semple, et al., 2003) .

2.1.4 Efectos de insecticidas organoclorados sobre la salud y el ambiente

La exposición al DDT causa una amplia gama de efectos agudos y crónicos en la salud humana, incluyendo un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, cáncer endometrial, degeneración espermática, cáncer de testículo, diabetes, productos químicos

disruptores endocrinos, enfermedad hepática, problemas neurodegenerativos y afección del sistema inmune, además, la exposición ancestral al DDT puede promover la obesidad y la enfermedad asociada transgeneracionalmente (Bownman, et al., 2013)

Por lo tanto, la manera de eliminar o reducir eficazmente los efectos adversos del DDT ha estado atrayendo mucha atención científica y pública. Durante las últimas dos décadas, se han estudiado varios métodos de remediación fisicoquímica y biológica. La transformación ambiental es el proceso principal en la vía de la degradación y puede subdividirse en transformación abiótica y biótica. La investigación se centra principalmente en la transformación biótica, que podría ser llevada a cabo por una sola especie microbiana o una combinación de varias especies microbianas. Puede llevarse a cabo una degradación parcial del DDT, pero el envejecimiento, el secuestro y la formación de metabolitos tóxicos dan lugar a dificultades en la biorremediación de suelos contaminados con DDT (Li, et al., 2017)

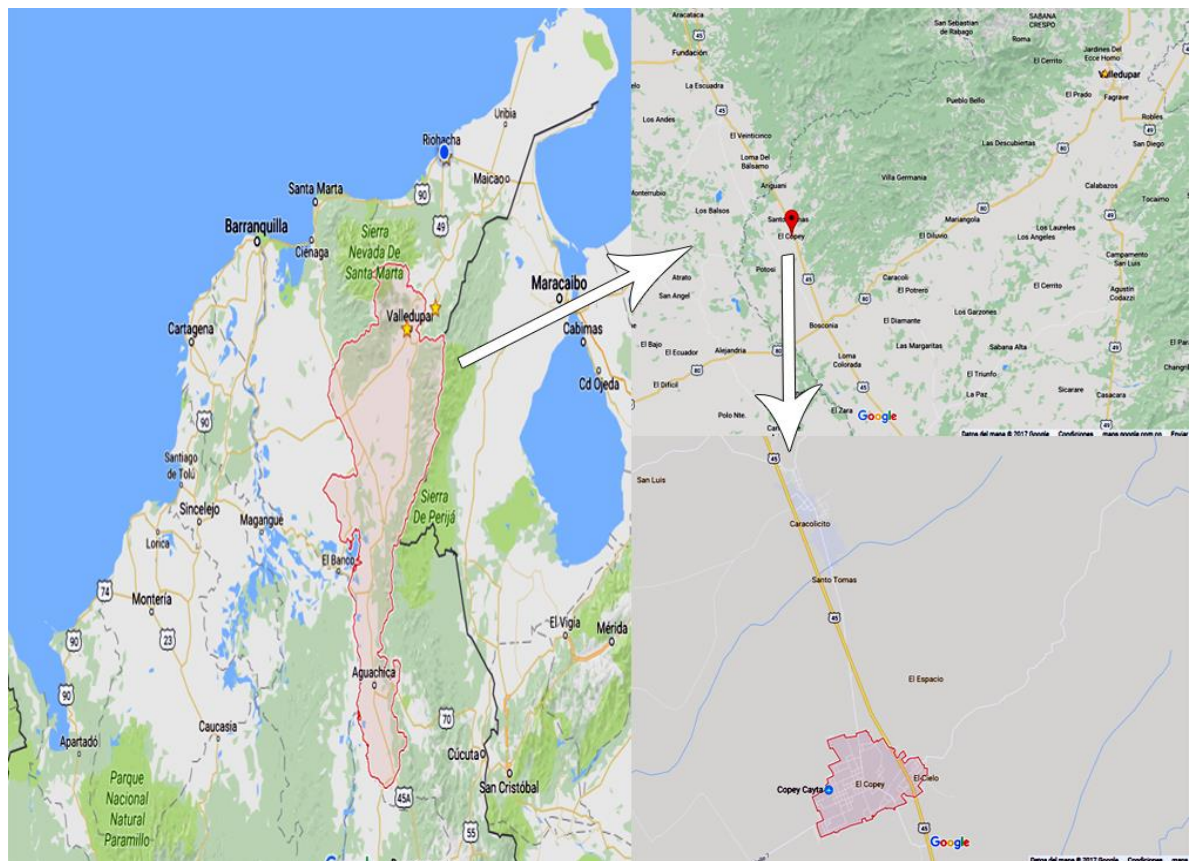
3 METODOLOGÍA

3.1 Tipo de estudio y línea de investigación

3.2 Localización

El montaje del experimento se realizó en el laboratorio de Ciencias Ambientales ubicado en la Sede de la Universidad de La Guajira, en la ciudad de Riohacha.

Para el experimento se utilizaron muestras de un suelo agrícola pobre en materia orgánica, procedentes de la localidad de Caracolicito (municipio del Copey) en el departamento del Cesar, cuyos suelos tienen un historial de cultivo intensivo de algodón con uso de pesticidas como el DDT y otros como el Metil paratión, Etil paratión, Endosulfan, por



lo menos desde hace cinco décadas (Ministerio de Medio Ambiente, 2007). Sus coordenadas
 Figura 2 Ubicación geográfica de Caracolicito corregimiento de El Copey, Cesar, Colombia.

geográficas son $10^{\circ} 12' 28.7''$ Norte - $73^{\circ} 58' 35.0''$ Oeste.

Debido a que no hay un inventario de los predios contaminados en la localidad, para el presente estudio se utilizó como modelo una muestra del horizonte superficial de un suelo representativo de uso agrícola en la actualidad, asumiendo que al desarrollar los experimentos de inmovilización del DDT mediante el uso del CBR tipo lignito, como fuente de MOH liberada por las BSC, utilizando esta muestra de suelo, el resultado puede modelar en parte lo que podría ocurrir en suelos con la presencia de contaminantes .

Se utilizó el CBR tipo lignito, extraído del manto cuarenta del tajo denominado

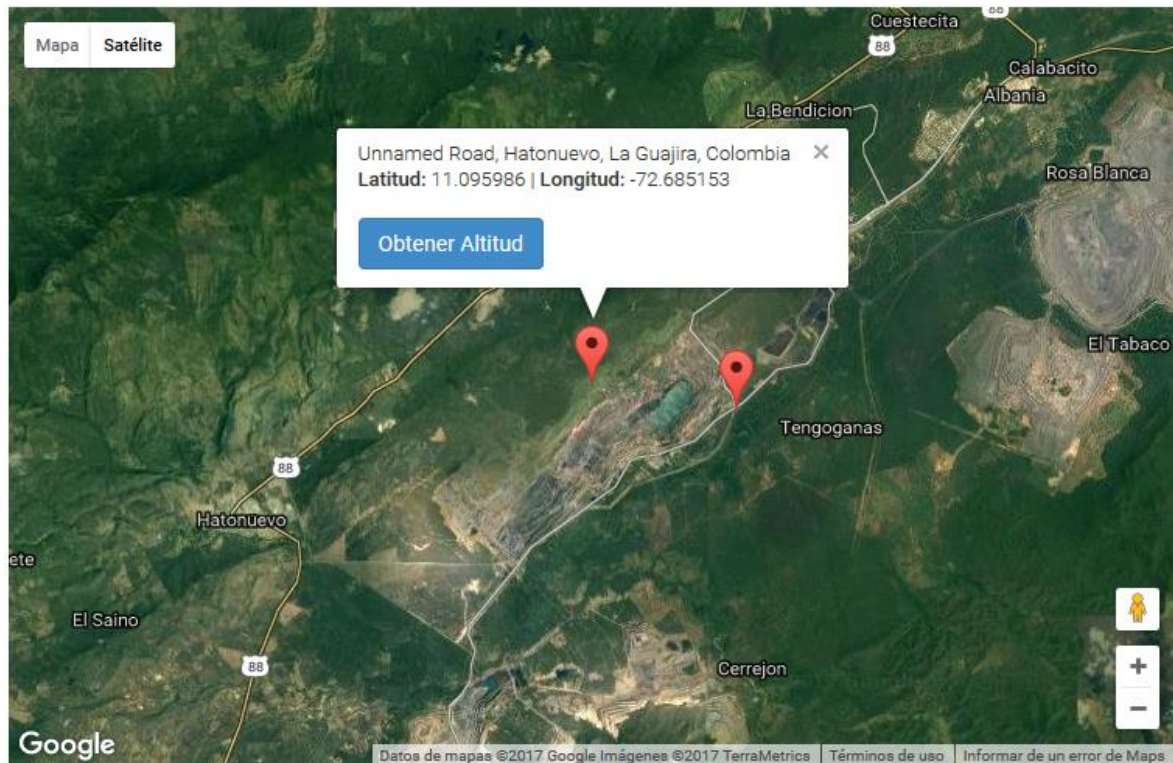


Figura 3 Tajo "Comuneros" en la mina Cerrejón, lugar de extracción del CBR usado para los ensayos Comuneros en la mina "El Cerrejón", La Guajira-Colombia ubicado en las coordenadas $11^{\circ} 05' 45,55''$ N y $72^{\circ} 40' 66,55''$ O.

3.3 Procedimiento general

Para dar cumplimiento a los objetivos propuestos, se determinó el efecto de la adición conjunta de CBR y BSC al suelo, sobre la biodisponibilidad de DDT, en condiciones de laboratorio, para ello se llevaron a cabo tres experimentos; en el primer experimento se evaluó en un modelo de microcosmos, el efecto del tratamiento previo (antes de recibir DDT como contaminante) de muestras de suelo adicionando CBR e inóculos de las BSC consideradas para este estudio, esto para determinar el efecto sobre la adsorción o inmovilización inmediata del contaminante, al mezclar el suelo tratado en una solución de DDT concentrada al límite de solubilidad en agua. En el segundo experimento se contaminaron muestras de suelo con DDT y se dejaron en interacción con el contaminante durante 30 días, con el propósito de observar el efecto de la interacción directa del contaminante con el suelo durante este tiempo; el tercer experimento fue similar al segundo, pero la interacción del DDT con el suelo y los diferentes tratamientos se hizo por 6 meses.

Para obtener mayor evidencia sobre los mecanismos de acción de la estrategia empleada para reducir la biodisponibilidad de DDT, en complemento a los tres experimentos, se determinó la capacidad de las BSC para asimilar y utilizar el DDT como fuente de carbono para su metabolismo, mediante cultivo de dichas bacterias en medios de cultivo con adición de DDT, esto con el fin de indagar acerca del posible efecto adicional de estas bacterias sobre la disponibilidad de DDT, mediante biodegradación del compuesto, dado que se han reportado aislamientos de estos géneros bacterianos, como degradadores de contaminantes orgánicos persistentes, además, teniendo en cuenta que los mecanismos enzimáticos de liberación de la MOH a partir del CBR por parte de los organismos son los

mismos que expresan para la degradación de contaminantes orgánicos, dada una relativa similitud de sus estructuras con las estructuras químicas básicas que hacen parte de las formas de materia orgánica complejas como la lignina, el carbón y las sustancias húmicas (Valero, 2013). A continuación se describe en detalle cada una de las etapas mencionadas anteriormente.

3.3.1 Suelo

Se utilizaron muestras de un suelo agrícola de los 20 primeros centímetros de profundidad, se verificó previamente al muestreo, que estuviera en un área sin historial de uso de plaguicidas, proveniente de la localidad de Caracolicito (municipio El Copey) al suroeste de la ciudad de Valledupar (Norte de Colombia). Esta muestra de suelo fue objeto de una caracterización física y química básica, mediante análisis textural a través del método de Bouyoucos, pH mediante potenciómetro, acidez intercambiable mediante extracción con KCl, carbono orgánico por medio del método de Walkley-Black, nitrógeno total por el método de Kjeldahl y capacidad de intercambio catiónico mediante extracción con acetato de amonio 1 N y neutro.

3.3.2 Carbón de Bajo Rango (CBR) y Ácidos Húmicos (AH)

Se utilizó un CBR tipo lignito obtenido del frente de extracción denominado “Tajo Patilla” en la mina El Cerrejón (La Guajira –Colombia), este fue triturado y tamizado en malla de 300 μm de diámetro de apertura para ser suministrado posteriormente al suelo. Los AH fueron obtenidos del CBR mediante el método clásico de extracción alcalina con NaOH 0,5 N (Sharif, 2002), para la extracción se trabajó con una relación 1:10 (p/v) de [CBR] / [NaOH 1N], esta mezcla se mantuvo a 60°C por 10 horas, terminado el proceso de extracción,

se dejó reposar durante 24 horas y se obtuvo el extracto húmico total (EHT) mediante filtración en papel Whatman número 40, para la separación del residuo de carbón y la fracción de huminas, no solubles en NaOH.

Una vez obtenido el EHT que contiene tanto ácidos fúlvicos (AF), cómo AH, la separación de la fracción de AH se hizo llevando el EHT hasta pH 2 mediante la adición de HCL 1N, a este valor de pH se observan dos fases, los AH que son insolubles en medio ácido se precipitan y los AF permanecen solubles en el sobrenadante (Swift, 1996), la fracción de AF se descartó y los AH fueron separados y sometidos a secado por liofilización, para posteriormente ser utilizados en los ensayos de microcosmos como sustancia de referencia de MOH.

3.3.3 Microorganismos e inóculos microbianos.

Se utilizaron las cepas bacterianas: BSC3 (*Microbacterium* sp.), BSC13 (*Acinetobacter* sp.) y BSC25 (*Bacillus mycoides*), estas cepas fueron aisladas previamente de micro-hábitats influenciados por residuos de la actividad de extracción de carbón en la mina El Cerrejón (Colombia), fueron seleccionadas mediante la evaluación de su actividad biotransformadora de carbón, lo que permitió demostrar que estas cepas poseen la capacidad para de tomar CBR como fuente de carbono y producir SH en el proceso (Valero et al, 2014). Para obtener suficiente biomasa de cada una de estas tres cepas, se preparó un inóculo bacteriano de la siguiente manera: en frascos de vidrio de 5 litros fueron vertidos 2 litros del medio de cultivo líquido estéril (caldo nutritivo al 0,8% + humus alfa® 0,005%) y se inoculó cada cepa bacteriana, el cultivo se mantuvo a 30 °C por 48 horas, con flujo continuo de aire; posteriormente se mezcló la biomasa resultante de cada uno de los tres cultivos para

obtener una mezcla de las tres cepas, la mezcla resultante se diluyó con agua destilada estéril hasta adecuar una concentración celular de $1,5 \times 10^9$ células.ml⁻¹, esta solución se utilizó como inóculo para el suelo en los experimentos posteriores.

3.3.4 Inoculo bacteriano

En frascos de vidrio de 5 litros fueron vertidos 2 litros del medio de cultivo líquido estéril (caldo nutritivo al 0,8% + humus alfa® 0,005%) y se inoculo cada cepa bacteriana, el cultivo se mantuvo a 30°C por 48 horas, con flujo continuo de aire; posteriormente se mezcló la biomasa resultante de cada uno de los tres cultivos para obtener una mezcla de las tres cepas, la mezcla resultante se diluyo con agua destilada estéril hasta adecuar una concentración celular de $1,5 \times 10^9$ células.ml⁻¹, en esta solución se utilizó como inóculo para el suelo en los experimentos posteriores.

3.4 Ensayos en microcosmos

3.4.1 Ensayo de adsorción de DDT en diluciones de suelo tratado previamente con CBR lignito y BSC.

Se desarrolló un diseño de experimento bajo un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y tres repeticiones por tratamiento. Las unidades experimentales consistieron en contenedores con 1 Kg de suelo sin DDT a los cuales se le aplicó cada uno de los tratamientos descritos en la Tabla 1. Para los tratamientos con adición de BSC, se aplicaron 300 ml del inoculo.

Tabla 1 Diseño experimental de tratamientos aplicados durante 30 y 60 días.

T= 30 Y 60 DIAS	CBR 3%	BSC	AH (50 ppm)	DDT
------------------------	---------------	------------	--------------------	------------

TRATAMIENTO 1 (CONTROL)				
T= 30 Y 60 DIAS	CBR	BSC	AH (50 ppm)	DDT
TRATAMIENTO 2	X			
TRATAMIENTO 3	X	X		
TRATAMIENTO 4		X		
TRATAMIENTO 5			X	
TRATAMIENTO 1 (CONTROL)				
TRATAMIENTO 2	X			
TRATAMIENTO 3	X	X		
TRATAMIENTO 4		X		X
TRATAMIENTO 5			X	

El suelo tratado estuvo durante 30 días manteniendo una humedad aproximada a la capacidad de campo. Después de este tiempo, se tomaron 20 gramos de muestra y se hizo una dilución en 100 ml de una solución de DDT, concentrada al límite de solubilidad en agua (0,0246 ppm), se agitó orbitalmente a 200 rpm por 2 horas, esto para garantizar la homogeneidad de la mezcla y permitir la adsorción de DDT por parte del suelo, según lo recomendado por Decorvá *et al* (2007); una vez terminada la agitación se dejó decantar por 24 horas y se filtró el sobrenadante, posteriormente se extrajo el DDT remanente en la solución con cartuchos de extracción en fase solida (SPE) y se determinó su concentración en el extracto acuoso, mediante cromatografía líquida de alta definición (HPLC). Este ensayo se realizó en el Laboratorio GDCON del grupo diagnóstico y control de la contaminación de la Universidad de Antioquia, acreditados por el Organismos Nacional de Acreditación

(ONAC) según la norma ISO/IEC 17025:2005, con certificado de acreditación 13-LAB-053, lo cual garantiza la calidad de los resultados obtenidos.

La detección de DDT en el extracto obtenido se realizó por medio de un cromatógrafo HPLC Shimadzu con detector de arreglo de diodos programado a 238 nm, columna LiChospher® 100 RP-18 (250mm x 4mm x 5µm), fase móvil: metanol/agua (90/10) a 0,5 mL/min, volumen de inyección: 100 µL y tiempo de retención de 17 minutos (Wang *et al*, 2012) (Ver Anexo).

Finalmente se determinó el contenido húmico del extracto acuoso del suelo, para ello se tomaron muestras de los extractos y se midió la absorbancia a 465 nm (Valero *et al*, 2012), esto con el propósito de comparar el contenido de sustancias húmicas solubles en la muestra, lo que permite confirmar que hubo liberación de MOH a partir del CBR y relacionarla con los cambios en la concentración de DDT biodisponible.

3.4.2 Ensayo del efecto de CBR y BSC en suelo contaminado previamente con DDT.

Este experimento se realizó probando los mismos tratamientos definidos en el experimento anterior, pero para este ensayo el suelo fue contaminado previamente a razón de 40 ppm de DDT. Después de transcurridos los 30 días de interacción del sistema (DDT-Suelo – CBR – BSC) se tomaron muestras de 20 gramos de suelo y se diluyeron en 100 ml de agua, acidulada hasta pH 4,5 con H₂SO₄ 0,5 N, con el propósito de simular condiciones de lluvia acida, y maximizar las condiciones de desorción DDT en el suelo (Decorva' *et al*, 2007), se agitó orbitalmente a 200 rpm por 2 horas y se dejó decantar por 24 horas, se filtró con papel filtro Watman, finalmente se extrajo el DDT utilizando cartuchos SPE como fue

descrito para el ensayo anterior y se determinó su concentración en el extracto acuoso por medio de HPLC, para ello se utilizó un cromatógrafo HPLC Shimadzu con detector de arreglo de diodos programado a 238 nm, columna LiChospher® 100 RP-18 (250mm x 4mm x 5µm), fase móvil: metanol/agua (90/10) a 0,5 mL/min, volumen de inyección: 100 µL y tiempo de retención de 17 minutos.

3.4.3 Determinación de la actividad microbiana del suelo

Con el propósito de ver posibles cambios en la actividad microbiana del suelo, por la adición de CBR y BSC, y su efecto sobre la biodisponibilidad de DDT, debido a que el inóculo de BSC va a actuar sobre el CBR metabólicamente, para liberar la fracción de MOH hacia el suelo y por otra parte la MOH es un factor que estimula la actividad microbiana del suelo. La actividad microbiológica se determinó mediante la hidrólisis enzimática de diacetato de fluoresceína (FDA), según el método propuesto por Greena *et al* (2006). Los resultados se interpolaron en una curva patrón con concentraciones conocidas de fluoresceína obteniendo así la cantidad de FDA hidrolizado, los datos se expresaron como mg FDA hidrolizados por Kg suelo⁻¹ h⁻¹.

3.4.4 Capacidad de BSC para tomar DDT como fuente de carbono

Para esto estudio se utilizó un medio de cultivo solido con DDT como fuente de carbono, según la siguiente composición mg/L (Carrillo *et al*, 2005): NH₄NO₃ 2.50, KH₂PO₄ 1.75, MgSO₄ 0.75, K₂HPO₄ 0.75, NaCl 0.25, ZnSO₄ 0.088, FeCl₃ 0.08, CuSO₄ 0.016, MnCl₂ 0.014, MoO₃ 0.007, Co (NO₃)₂ 0.005, agar – agar 1,8% y 92 ml de agua destilada. Esta solución se expuso al calor hasta la disolución y se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 lb de presión durante 15 minutos; posteriormente se agregaron 8 ml de una solución de DDT a

500 ppm, para adecuar a una concentración final de DDT de 40 ppm (Carrillo *et al*, 2005). Las BSC se sembraran por triplicado en este medio y fueron incubadas a 37°C durante 7 días, el crecimiento de las cepas indica la capacidad de tomar DDT como fuente de carbono, mostrando su potencial degradador de DDT.

3.4.5 Análisis de microagregados de los suelos tratados mediante microscopia electrónica de barrido (SEM)

Se aplicó esta técnica del microscopio electrónico de barrido, por ser reconocida como de orden superior, por su sensibilidad, gran magnificación y una menor distorsión del analito, con el propósito de analizar la presencia bacteriana en el suelo, mostrándonos patrones de colonización, morfología y elementos del suelo o fragmentos minerales (Nurmiaho *et al*, 1997).

Para este análisis se utilizó un microscopio de barrido de electrones JEOL, modelo JSM 6490-LV, el cual hace parte de los equipos interfacultades de la Universidad de los Andes, el cual permitió realizar análisis químicos mediante espectroscopia por dispersión de energía (EDS), acelerado con energías de excitación desde 0.1kV hasta 30kV.

3.4.6 Tratamiento estadístico de los datos

Todos los experimentos se desarrollaron con un diseño completamente aleatorio y fueron aplicados el Test de Dunnet para comparar las medias de todos los tratamientos contra su tratamiento control respectivo y la prueba de Tukey para comparar todos los tratamientos entre sí y determinar diferencias significativas.

4 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Caracterización del suelo

La Tabla 1 muestra los resultados de caracterización básica de la muestra del suelo utilizado para el experimento; la textura fue descrita como franco arenosa (FA), con alto contenido de arena y bajo contenido de arcillas (10,9%) lo que puede estar relacionado con una menor capacidad para formar complejos arcillo – húmicos que permiten la inmovilización estable de xenobióticos a la matriz del suelo (Gevao, et al., 2000) (Dercová, et al., 2007); el pH es considerado como “*muy fuertemente acido*” (Instituto Geografico Agustín Codazzi [IGAC], 2013), lo que aumenta la posibilidad de solubilización de minerales y compuestos orgánicos (Jaramillo, 2011), reduciendo su fijación e inmovilización en el suelo; el contenido de materia orgánica reflejado en los porcentajes de carbono orgánico (0.47%) y nitrógeno total (0.04%) es bajo, aún para suelos de clima cálido (IGAC, 2013), esto representa para este suelo una menor capacidad de adsorción de xenobióticos (Gevao, et al., 2000) y de organización de sus partículas formando agregados (Jaramillo, 2011); los valores del complejo de cambio muestran que el suelo tiene un bajo contenido de cationes disponibles para la nutrición vegetal y un bajo nivel de interacción de los mismos con la fracción orgánica.

Tabla 2 Resultados de análisis físicos y químicos del suelo utilizado, siguiendo las metodologías propuestas en el manual de métodos de laboratorio de suelos del IGAC (IGAC, 2006)

Característica		Resultado
Textura: Franco Arenoso (FA)	Arena (%)	73.4
	Limo (%)	15.7
	Arcilla (%)	10.9
pH		5.4
Acidez Intercambiable. cmol (+)/Kg		0.19
Saturación de bases (%)		40.3
Materia orgánica	Carbono orgánico (%)	0.47
	Nitrógeno total (%)	0.04
Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)		4
Complejo de Cambio. cmol (+)/Kg	Ca	0.99
	Mg	0.28
	K	0.25
	Na	0.09
	Bases totales	1.6

4.2 Ensayo 1: Adsorción inmediata de DDT por el suelo pre-tratado con lignito y BSC.

Al someter la solución de DDT concentrada al límite de solubilidad en agua (0.0246 ppm) a la acción del suelo sin tratamiento, esta presentó un porcentaje de DDT remanente en dilución de 41.16% (Figura 3, Izquierda). La habilidad del suelo para retener los contaminantes orgánicos es atribuida a los fenómenos de adsorción y a las reacciones químicas que ocurren sobre las superficies de las sustancias húmicas y las partículas minerales (Gevao, et al., 2000) (Gevao, et al., 2002) (Fava, et al., 2004). Teniendo en cuenta que el suelo en estudio posee un contenido mínimo de materia orgánica y de arcillas que forman el complejo arcillo – húmico, estas dos características están relacionadas directamente con la adsorción de contaminantes orgánicos persistentes, se puede considerar este suelo podría tener un potencial de adsorción mayor del contaminante tras el tratamiento

con la adición de enmiendas orgánicas; es así como los tratamientos del suelo con adición de CBR, BSC y CBR + BSC (Figura 3, Izquierda) ocasionaron mayor adsorción del contaminante que el suelo sin tratar y mostraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos, excepto entre CBR y CBR+BSC (diferencias de grupos simples con varianzas homogéneas $\geq 0,05$), los cuales mostraron mayores niveles de adsorción, con porcentajes de DDT remanente en dilución de 8,16% y 3,4% respectivamente; estos resultados indican que la presencia de CBR en el suelo es el principal factor causal del incremento en la adsorción de DDT y de la reducción de su biodisponibilidad.

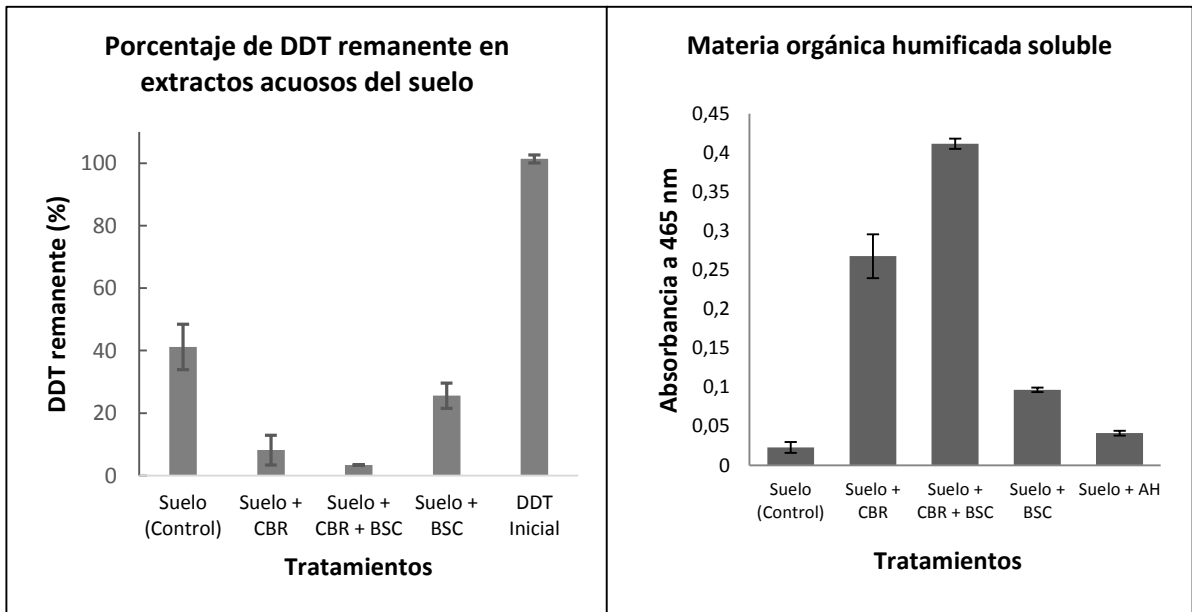


Figura 4 (Izquierda): Porcentaje de DDT remanente en los extractos acuosos del suelo después del tratamiento con CBR y BSC. (Derecha): Contenido húmico en la fracción acuosa del suelo en los diferentes tratamientos.

Los CBRs poseen algunas características físicas y químicas que le confieren propiedades adsorbentes, en primer lugar debido a su porosidad y alta superficie de contacto presentan fenómenos de fisi-sorción, lo que les permite retener moléculas, esta propiedad ha sido aprovechada para depurar aguas contaminadas con metales pesados o contaminantes orgánicos persistentes (Gan et al., 1972, Yu et al., 2013); además, debido al alto contenido

de MOH de estos carbones, su superficie posee grupos químicos funcionales, los cuales han demostrado tener capacidad de adsorber contaminantes orgánicos (Teng y Hsieh 1998, Crosdale et al., 2008). Cabe destacar que en presencia de BSC, hubo mayor reducción de la biodisponibilidad de DDT, este resultado puede atribuirse al hecho de que estas bacterias liberan SH contenidas en estos carbones, cómo se ha demostrado previamente (Valero *et al*, 2014), lo que representa para el carbón residual un incremento en su porosidad, esto puede estar relacionado con el aumento de su actividad adsorbente. Dercova *et al* (2007) en un ensayo similar al presente trabajo, reportó la reducción de la biodisponibilidad de pentaclorofenol mediante la aplicación de zeolita suplementada con ácidos húmicos, este fenómeno fue atribuido a procesos de adsorción por cuenta de ambos materiales.

De otro lado, es posible que la reducción en la biodisponibilidad se deba al incremento en el contenido de MOH en el suelo, debido a su tratamiento con CBR (Valero, 2013); los compuestos xenobióticos orgánicos se unen a la materia orgánica MOH a través de diversos mecanismos, tales como: formación de puentes covalentes, puentes iónicos, partición hidrofóbica, fuerzas de Van der Waals, complejos de transferencia de carga, intercambio de ligandos y puentes de hidrogeno (Gevao *et al*, 2000; Dercova *et al*, 2007; Mazei y Piccolo, 2012). Por lo anterior se puede sugerir que en el caso de este experimento, la MOH presente en el CBR interactuó con el DDT aumentando su inmovilización. Al respecto, Fontaine y Piccolo (2011) demostraron la copolimerización de compuestos organoclorados a las SH a través de catálisis enzimática; también se ha demostrado que la aplicación de enmiendas orgánicas ricas en SH bajo condiciones experimentales retiene de forma estable y reduce considerablemente la biodisponibilidad de contaminantes como *p,p* -

diclorodifenildicloroetnilo (*p,p* – DDE), evitando su translocación a través de las raíces y tejidos vasculares de plantas (Peters *et al*, 2007).

La Figura 3-Derecha muestra que los valores de absorbancia (465 nm) que se presentan en el extracto acuoso obtenido del suelo control es menor, indicando una menor concentración de MOH, lo cual está relacionado con el resultado presentado en la Figura 3-Izquierda, donde se evidencia que este tratamiento ocasiona una menor adsorción de DDT. En el tratamiento con adición de CBR hubo un aumento en la absorbancia del extracto acuoso a 465nm, lo cual indica que a partir del CBR se liberaron espontáneamente fracciones de MOH. Valero, (2013) demostró la liberación espontánea de SH a partir del mismo tipo de CBR; sin embargo en el tratamiento que incluía CBR + BSC hubo mayor absorbancia, esto puede ser considerado como evidencia de que las bacterias logran solubilizar el CBR y aumentar el contenido de MOH en el suelo, previamente se demostró que estas cepas bacterianas presentan capacidad para biotransformar el CBR liberando SH a en el proceso (Valero *et al*, 2014).

En conjunto los resultados de este experimento sugieren que el tratamiento del suelo con CBR ocasiona la liberación de SH y este efecto es incrementado por la presencia de BSC, entonces el efecto sobre la disponibilidad de DDT aparentemente es causado por la presencia del EHT, lo cual coincide con lo descrito por varios autores previamente (Fontaine y Piccolo, 2011; Mazei y Piccolo, 2012).

4.3 Ensayo 2: Interacción DDT – SUELO durante 30 días. Efecto de la aplicación de CBR y BSC sobre la adsorción del contaminante.

En este experimento solamente el tratamiento del suelo + BSC presentó diferencias estadísticamente significativas (Dunnet $\geq 0,05$) frente al tratamiento control (Figura 2), en este tratamiento se muestra una reducción significativa del DDT extraído y cuantificado, este resultado sugiere la posible degradación del DDT por parte de las BSC; al respecto se puede demostrar que *Acinetobacter* sp y *Microbacterium* sp, , mostraron capacidad para crecer en medio de cultivo sólido con DDT como única fuente de carbono, estas cepas bacterianas además de exhibir capacidad para producir SH a partir de CBR, también son capaces de tomar CBR como fuente de carbono (Valero et al, 2011), el CBR es una fuente

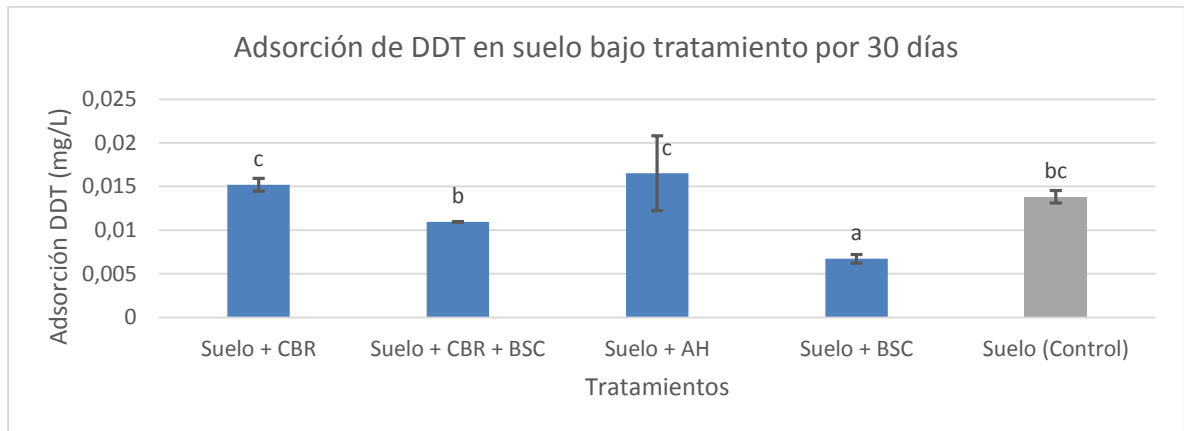


Figura 5 DDT biodisponible después de su interacción directa con el suelo tratado con CBR y BSC durante 30 días.

de carbono compleja compuesta por fracciones polifenólicas con estructuras similares a las del contaminante en estudio; en ese sentido, dada la semejanza estructural entre las dos sustancias, es probable que estas bacterias también puedan presentar la capacidad para degradar el DDT; como evidencia adicional a este análisis, en otros estudios se ha reportado la capacidad de cepas bacteriana pertenecientes a estos géneros para degradar compuestos

recalcitrantes incluyendo DDT (Asturias *et al*, 1994; Decorva *et al*, 2003; Carrillo *et al*, 2004). Ha sido ampliamente descrito el papel del genero *Acinetobacter* sp en la biodegradación aerobia de compuestos bifenilos-policlorados (PCBs), ésta actividad puede ocurrir por medio de tres diferentes vías: (a) metabolización directa del compuesto, (b) degradación por el metabolismo secundario, en esta vía las bacterias requieren de otras fuentes de carbono primarias y (c) por modificación microbiana de la estructura del compuesto haciéndolo más susceptible a la degradación; la degradación bacteriana directa ha sido descrita en *Acinetobacter* sp y es mediada por la enzima bifenil-dioxigenasa (Decorva *et al*, 2003; Purnomo *et al*, 2011).

Adicionalmente se observaron diferencias estadísticamente significativas (Dunnet \geq 0,05) entre el tratamiento con suelo + CBR + BSC con respecto a los tratamientos que incluían suelo + CBR y suelo + AH (Figura 2), mostrando una menor concentración biodisponible del contaminante en el primero (suelo + CBR + BSC), esto indica que en este experimento el principal factor causal de la reducción de la biodisponibilidad de DDT fue la aplicación de BSC. Las diferencias entre las concentraciones de DDT en el tratamiento con BSC y el que incluía CBR + BSC (figura 2), indican que las bacterias prefieren CBR y SH liberadas a partir del mismo como fuente de carbono, al resultarles más fáciles de metabolizar, es probable que la reducción de DDT en el tratamiento que incluía CBR + BSC se genere debido a procesos de degradación por co-metabolismo utilizando la MOH del CBR como fuente alterna de energía para la degradación del DDT.

La diferencia del efecto del CBR entre el primer experimento y el segundo, puede deberse a que después de 30 días de interacción directa del contaminante con la fracción

húmica del suelo se haya presentado una mayor solubilidad del DDT, lo que pudo haber incrementado su disponibilidad en medio acuoso; Fava y Piccolo, (2002) y Gavrilescu, (2005) demostraron un aumento en la biodisponibilidad de BPCs en presencia de enmiendas húmicas, así describieron incrementos en la biodegradabilidad de dichos compuestos, esto se debe a que las moléculas muy hidrofóbicas como el DDT, se hacen más solubles en los dominios hidrofóbicos de la supra estructura húmica (suspensión coloidal), aumentando así la accesibilidad de los contaminantes a los microorganismos especializados en la biodegradación de BPCs.

El pH ácido del suelo utilizado en este experimento (5,4), podría estar relacionado con la incapacidad del suelo (aún con la aplicación del CBR como fuente de MOH) para inmovilizar DDT, debido a que el pH ácido en el suelo tiende a favorecer la solubilización de minerales y compuestos orgánicos, dejándolos libres en su fracción acuosa (Jaramillo, 2011). Por lo anterior, los resultados de este experimento condujeron a la realización de otro, en el que el contaminante interactuara con el suelo tratado por más tiempo (6 meses).

4.4 Ensayo 3: Interacción DDT – SUELO durante 6 meses. Efecto de la aplicación de CBR y BSC sobre la adsorción del contaminante.

En este experimento los tratamientos CBR y CBR + BSC muestran una significativa reducción del DDT biodisponible en el extracto acuoso del suelo con respecto a los demás tratamientos, pero no presentan diferencias entre sí (Figura 3a), por lo tanto el principal factor causal de la reducción de DDT biodisponible es el CBR; los resultados muestran diferencias entre la interacción del DDT en el suelo tratado durante 30 días y 6 meses. Varias investigaciones han demostrado que la interacción de contaminantes xenobioticos orgánicos

con las SH del suelo en presencia de enzimas tipo peroxidasa, y durante tiempos largos (más de 200 días), incide en la inmovilización y adsorción del contaminante por parte las SH mediante procesos de co-polimerización y de “difusión intraorgánica”, lo que involucra varios mecanismos físico - químicos y podría constituir una estrategia promisorio de descontaminación en suelos contaminados por xenobioticos orgánicos (Hatzinger *et al*, 1995; Alexander y Guerin, 1999; Gevao *et al*, 2000; Nam y Kim, 2002; Fontaine y Piccolo, 2011; Mazei y Piccolo, 2012). Además la capacidad de adsorción de los CBRs durante un tiempo más prolongado, también pudo haber influido en el incremento en la reducción de la biodisponibilidad del contaminante.

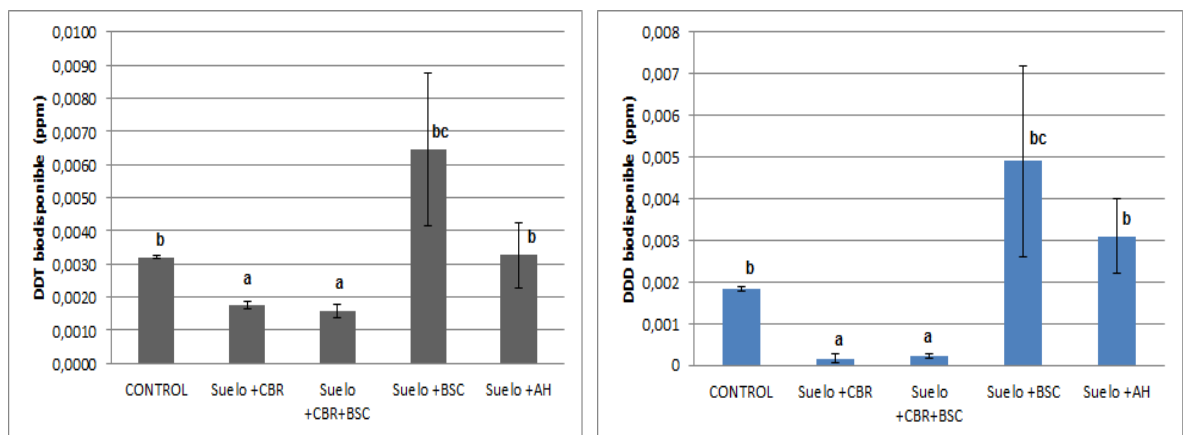


Figura 6 (Izquierda): DDT biodisponible después de su interacción directa con el suelo tratado con CBR y BSC durante 6 meses. (Derecha): DDD biodisponible resultante de la transformación del DDT después de su interacción directa con el suelo tratado con CBR y BSC por 6 meses.

No se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos control, suelo + BSC y suelo + AH; es probable que después de 6 meses el inoculo bacteriano haya perdido su viabilidad debido a la ausencia de fuentes de carbono y nitrógeno fácilmente asimilables (Rodriguez, 2003). Aunque algunos autores han reportado la adsorción de contaminantes organoclorados en el suelo, mediante la aplicación de AH (Dercova' *et al*. 2007, Smejkalová *et al*. 2009), en este experimento no se observó ese comportamiento, esto

podría estar relacionado con procesos de depolimerización de los AH, por cuenta de la microbiota nativa, la cual toma los AH como fuente de carbono tras ser adicionados en un suelo con bajo contenido de materia orgánica; este comportamiento se conoce como efecto “*primming*” (Kleber, 2003; Van, 2006).

Los resultados de la cromatografía muestran que después de 6 meses de interacción del DDT con el suelo y sus diferentes tratamientos, se generó un subproducto de la degradación de dicho compuesto conocido como DDD. La adsorción y biodisponibilidad de este subproducto en los distintos extractos acuosos, mostró un comportamiento similar al DDT (Figura 5, Derecha), lo que podría explicarse por los mismos fenómenos de adsorción que se generan por la adición de CBR y de las SH que se liberan al suelo a partir del mismo.

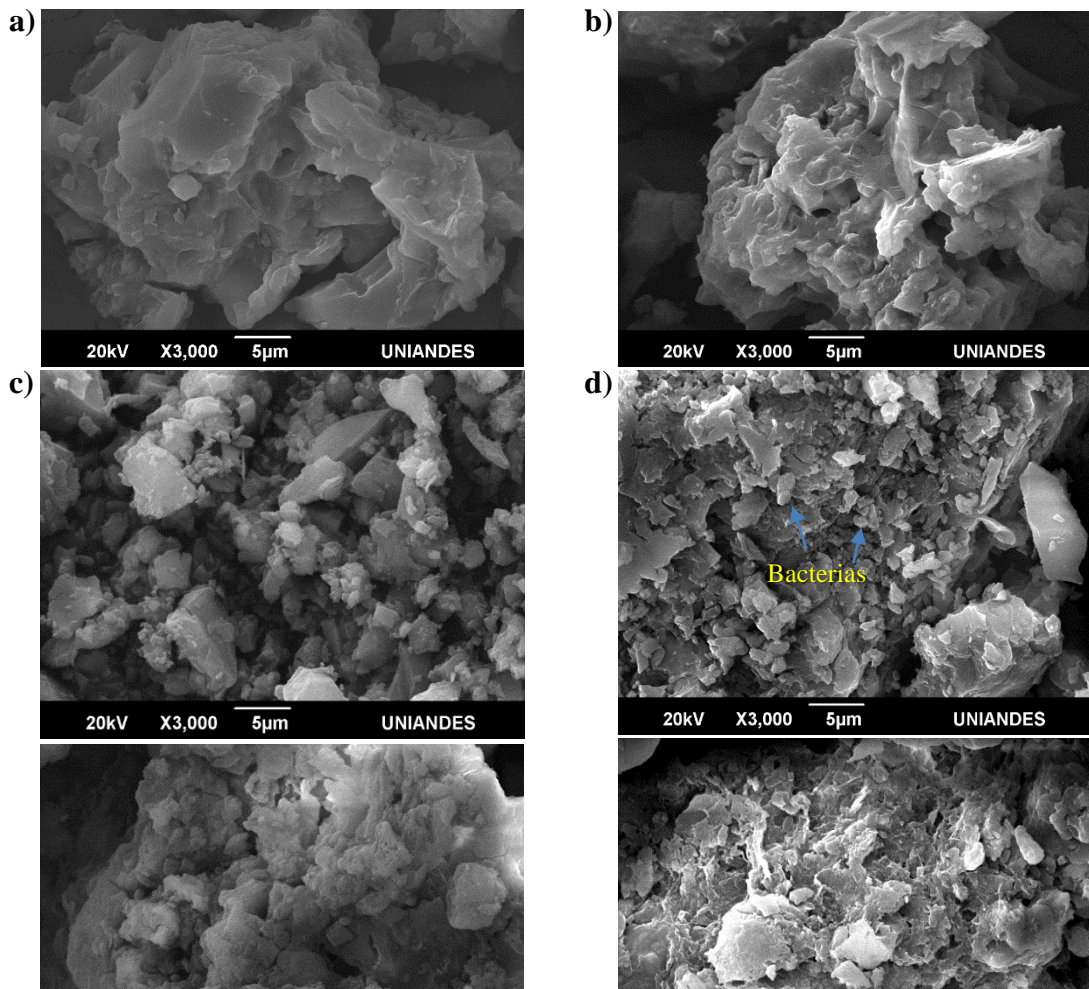
4.5 Análisis de CBR + AH por microscopía electrónica

En la Tabla 2, microfotografía de un microagregado de suelo bajo el tratamiento con CBR+ BSC25 (*Bacillus mycoides*) se observa la morfología típica de supraestructuras de MOH con presencia de las bacterias, también se aprecia que desarrollan sus función la actividad de reproducción bacteriana mediante fisión celular, se hizo una toma más cercana para observa una mayor transformación del CBR, que se evidencia por una mayor microporosidad del material.

En el tratamiento de control BSC13 se observan partículas de minerales del suelo con algunas fracciones de materia orgánica y evidencias de la presencias de bacterias sobre las superficies de las partículas. En el control AH + BSC13 se observan partículas minerales de arcillas, se nota un incremento en la agregación y porosidad del suelo.

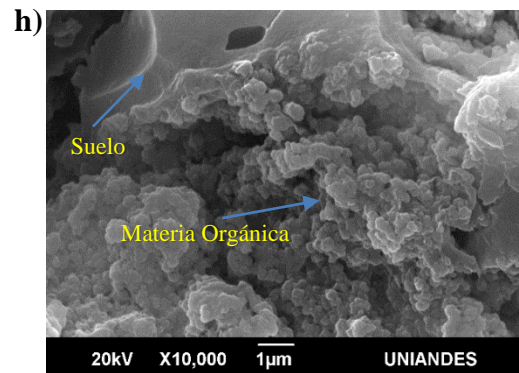
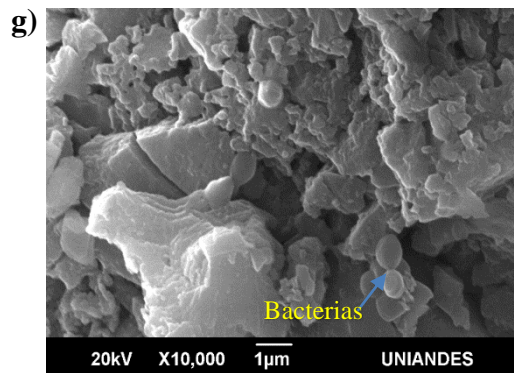
En el carbón virgen (Tabla 3-e) se evidencia la microporosidad del carbón, partícula no alterada. En el control BSC (*Microbacterium*) (Tabla 3-f) se nota un carbón fragmentado con una superficie más rugosa, partículas de materia orgánica.

Tabla 3 a) Ácido Húmico + BSC13 (*Acinetobacter* sp.) control; b) Ácido Húmico + BSC13 (*Acinetobacter* sp.) con DDT; c) Ácido húmico + BSC13 (*Acinetobacter* sp.) control; d) Ácido Húmico + BSC13 (*Acinetobacter* sp.) con DDT; e) CBR (virgen) control; f) CBR + BSC3 (*Microbacterium* sp.); g) CBR+ BSC25 (*Bacillus mycooides*); h) CBR + BSC13 (*Acinetobacter* sp.)



e)

f)



5 CONCLUSIONES

El tratamiento del suelo en estudio con CBR generó evidencia sobre la adsorción de DDT, disminuyendo su biodisponibilidad; este proceso está relacionado con el contenido de MOH, la cual es liberada a partir del CBR. La interacción CBR – BSC ocasiona una mayor adsorción de DDT, este hecho puede relacionarse con la capacidad de BSC para liberar SH a partir del CBR, incrementando el contenido de estas sustancias en el suelo.

La interacción del DDT en el suelo con CBR y BSC sugiere degradación de este contaminante, mientras que la acción adsorbente de CBR o SH liberada de sí mismo es menos perceptible; sin embargo, después de 6 meses la reducción en la biodisponibilidad del DDT se produce debido a la aplicación de CBR en el suelo; esto se explica por la copolimerización

de DDT en la fracción húmica procedente de CBR o debido a la adsorción del contaminante al carbón.

El contenido de MOH juega un papel importante en la biodisponibilidad de DDT en un suelo con bajo contenido de materia orgánica, en este caso el suelo representativo del área con historial de uso y almacenamiento de residuos de DDT en el departamento del Cesar, debido a que propicia procesos de adsorción y estimula la biodegradación del contaminante, en ese sentido y debido al potencial del CBR como fuente de sustancias húmicas, su uso asociado a microorganismos benéficos del suelo, representa una estrategia biotecnológica promisorio en la rehabilitación de suelos contaminados con DDT y probablemente con otros compuestos xenobióticos orgánicos.

6 BIBLIOGRAFÍA

Bownman, H., Bornman, R., Van den Berg, H. & Kylin, H., 2013. 11 DDT: fifty years since Silent Spring. En: *Late lessons from early warnings: science, precaution, innovation*. s.l.:s.n., pp. 272-291.

Bustamante, A., 2009. Hallaron más desechos tóxicos en el Copey (Cesar). *El Tiempo*, 24 Agosto.

Corona, A. y otros, 1999. Anaerobic-Aerobic Biodegradation of DDT (Dichlorodiphenyl Trichloroethane) in Soils. *Environmental contamination and toxicology*, Volumen 63, pp. 219-225.

Dercová, K. y otros, 2007. Bioremediation of soil contaminated with pentachlorophenol (PCP) using humic acids bound on zeolite. *Chemosphere*, 66(5), pp. 783-790.

El Tiempo, 1994. Ministerio de salud prohíbe uso del DDT. *El Tiempo*, 4 Enero.

Fava, F. y otros, 2004. Effects of humic substances and soya lecithin on the aerobic bioremediation of a soil historically contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biotechnology and bioengineering*, 88(2), pp. 214-223.

Fava, F. & Piccolo, A., 2002. Fava, F., & Piccolo, A. (2002). Effects of humic substances on the bioavailability and aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in a model soil. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(2), pp. 204-211.

Gevao, B., Jones, K. C., Haygarth, P. M. & Jarvis, S. C., 2002. Pesticides and persistent organic pollutants. En: *Agriculture, hydrology and water quality*. Wallingford: CABI Publishing.

Gevao, B., Semple, K. T. & Jones, K. C., 2000. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution*, Volumen 108, pp. 3-14.

Gianoulli, A. y otros, 2009. Evaluation of greek low-rank coals as potential raw material for the production of soil amendments and organic fertilizers. *International Journal of Coal Geology*, 77(3-4), pp. 383-393.

Gómez, M. L. y otros, 2006. Determinación de la capacidad de degradación de compuestos orgánicos persistentes por bacterias marinas aisladas de sedimentos en el caribe colombiano. *Actual Biol*, 28(85), pp. 125-137.

Herrera, P., Pantoja, M. & Valero, N., 2012. Efecto de un carbon de bajo rango y bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre el crecimiento temprano de dos gramíneas forrajeras de interés en el departamento del Cesar. En: *Biofertilización: avances en investigación*. Ibagué: Sociedad Colombiana de la ciencia del suelo, pp. 83-84.

IGAC, 2006. *Métodos analíticos del Laboratorio de Suelos*. Sexta ed. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia.

Instituto Geografico Agustín Codazzi, 2013. *Consideraciones generales para la interpretación de análisis químicos de suelos*. Bogotá: Subdirección Agrícola-Laboratorio de suelos.

Janos, P. y otros, 2011. *Young brown coals for environmental applications: composition, acid-base, ion-exchange, and sorption properties of selected Central European coals*. New York: Nova Science Publishers.

Jaramillo, D. F., 2011. *El suelo: origen, propiedades, espacialidad*. Primera ed. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.

Li, K. y otros, 2017. Effect of aerobic exercise intervention on DDT degradation and oxidative stress in rats. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(3), p. 664–671.

Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial de Colombia, 2007. *Inventario Nacional de Existencias de Plaguicidas COP*. Bogotá: s.n.

Mižoch, L., 2006. *Wikipedia*. [En línea] Available at: https://es.wikipedia.org/wiki/Dicloro_difenil_tricloroetano#/media/File:DDT.svg [Último acceso: 25 Marzo 2017].

Neurotiker, 2008. *Wikimedia commons*. [En línea] Available at: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diieldrin.svg> [Último acceso: 25 Marzo 2017].

Purnomo, A. S., Mori, T., Kamei, I. & Kondo, R., 2011. Basic studies and applications on bioremediation of DDT: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(7), pp. 921-930.

Rojas, M. P., 2010. Incidencia y tendencia de seis cánceres en poblaciones expuestas ambientalmente a plaguicidas en desuso en el departamento del Cesar (Colombia). *Revista Colombiana de Cancerología*, 14(2), pp. 88-101.

Sánchez, N., Rodríguez, M. & Sarria, V., 2006. Pesticidas obsoletos en Colombia, situación actual y alternativas de tratamiento y disposición. *Revista de Ingeniería*, Volumen 23, pp. 13-23.

Sánchez, N., Rodríguez, M. & Sarria, V. M., 2006. Pesticidas obsoletos en Colombia. Situación actual y alternativas de tratamiento y disposición. *Revista de Ingeniería*, Volumen 23, pp. 13-22.

Semple, K. T., Morriss, A. W. J. & Paton, G. I., 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, Volumen 54, pp. 809-818.

Stehlickova, L., Svab, M., Wimmerova, L. & Kozler, J., 2009. Intensification of phenol biodegradation by humic substances. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(7), pp. 923-927.

Sudharshan, S., Naidu, R., Mallavarapu, M. & Bolan, N., 2012. DDT remediation in contaminated soils: a review of recent studies. *Biodegradation*, 23(6), pp. 851-863.

Valero, N., Melgarejo, L. M., & Ramírez, R. 2016. Effect of low-rank coal inoculated with coal solubilizing bacteria on edaphic materials used in post-coal-mining land reclamation: a greenhouse trial. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1-10.

Valero, N., 2013. *Caracterización supramolecular de ácidos húmicos obtenidos mediante solubilización bacteriana de un carbón de bajo rango. En: Transformación microbiana de carbón de bajo rango para inducir cambios en las propiedades del suelo.* Bogotá: Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Colombia.

Valero, N., Gómez, L., Pantoja, M. & Ramírez, R., 2014. Production of Humic Substances through Coal-solubilizing Bacteria. *Brazilian Journal of microbiology*, 45(3), p. 911-918.

Valero, N. O., Rodríguez Salazar, L. N., Mancilla Gómez, S. & Contreras Bayona, L., 2012. Obtención de bacterias biotransformadoras de carbón de bajo rango a partir de microhábitats con presencia de residuos carbonosos. *Acta Biológica Colombiana*, 17(2), pp. 335-348.

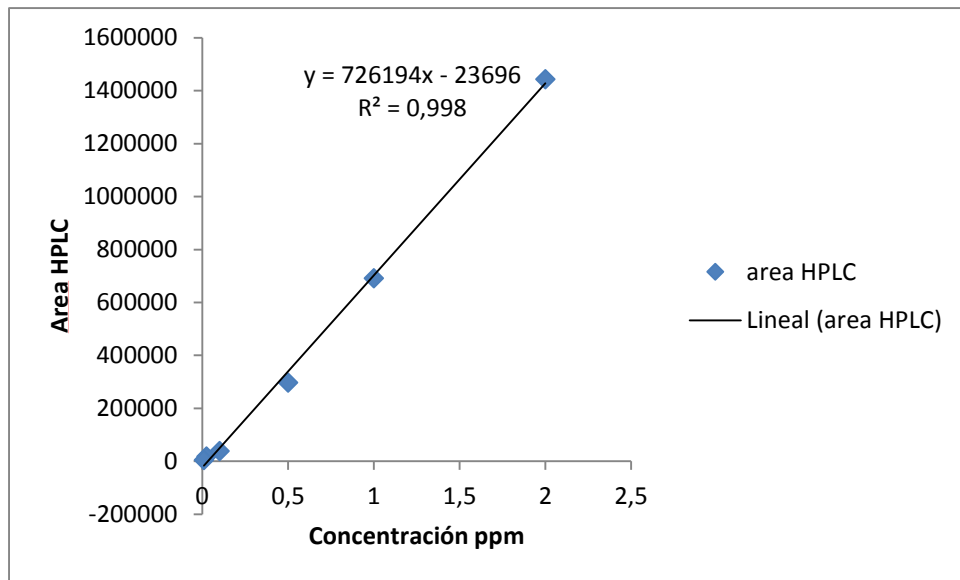
Yikrazuul, 2014. *Wikimedia commons.* [En línea] Available at: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:\(%2B\)-Heptachlor.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:(%2B)-Heptachlor.svg) [Último acceso: 25 Marzo 2017].

Zhao, B. & Poh, C. L., 2008. Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. *Proteomics*, Volumen 8, p. 874-881.

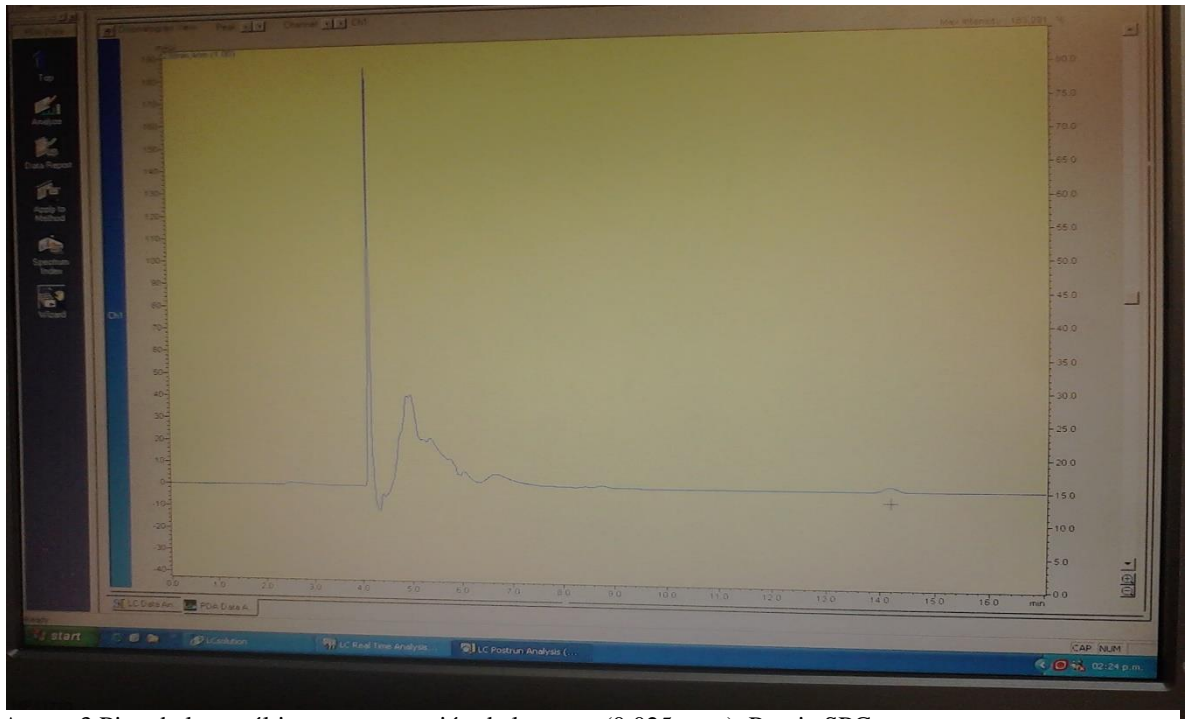
7 ANEXOS

Anexo 1 Curva de calibración de DDT

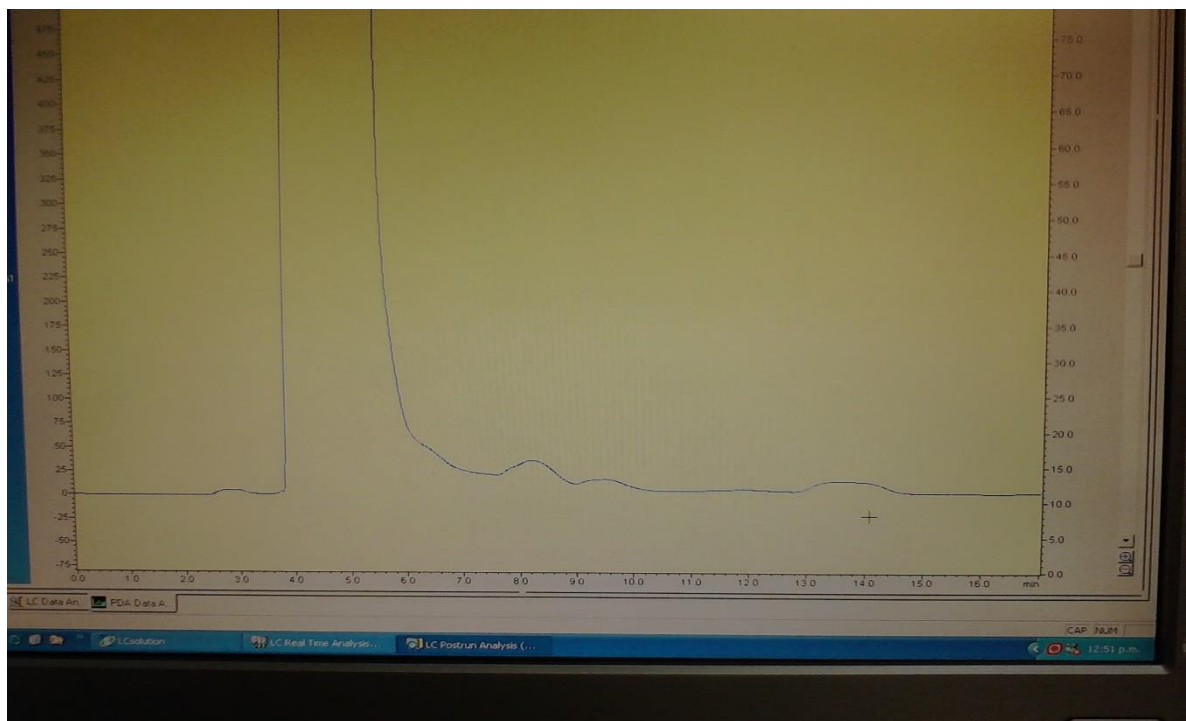
ppm	area HPLC	factor de corrección de la extracción en fase solida	ppm	area HPLC
2	1544198,9	Concentrado 50 veces	2	1444198,9
1	692359,1		1	692359,1
0,5	281691,9		0,5	297991,9
0,1	39031,7		0,1	39031,7
0,025	916160	18323,2	0,025	18323,2
0,01	286587	5731,7	0,01	5631,74



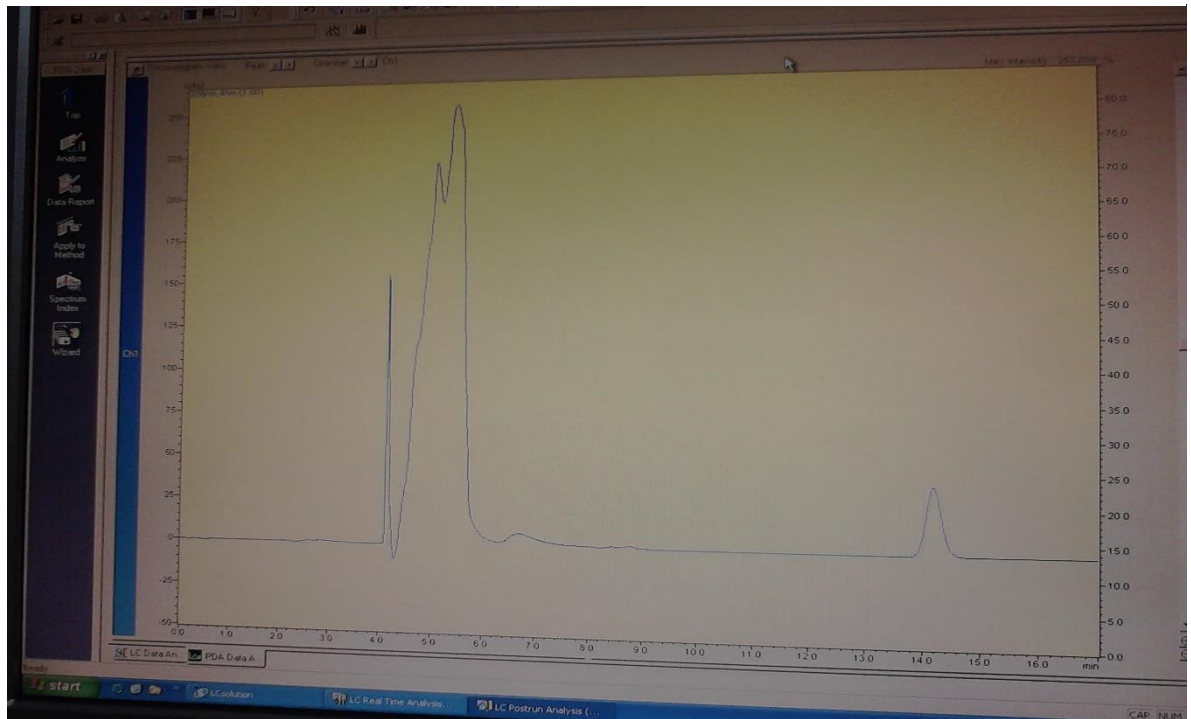
Anexo 2 Pico de la concentración más baja de la curva. Previa SPC



Anexo 3 Pico de la penúltima concentración de la curva (0,025 ppm). Previa SPC



Anexo 4 Pico de la concentración más alta de la curva. Previa SPC



Anexo 5 Pico de detección en muestra extraída de suelo
Anexo 6 Espectro UV teórico (arriba); Huella del espectro UV de la molécula en muestra extraída de suelo.

