

DEGRADACION DE ENDOSULFAN A PARTIR DE BACTERIAS AEROBIAS
AISLADAS DEL RELLENO SANITARIO ANTANAS DE LA CIUDAD DE PASTO

Ana Lucía Narváez Apráez

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2007

DEGRADACION DE ENDOSULFAN A PARTIR DE BACTERIAS AEROBIAS
AISLADAS DEL RELLENO SANITARIO ANTANAS DE LA CIUDAD DE PASTO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Biólogo

Ana Lucía Narváez Apráez

Director:
PhD. Pablo Fernández Izquierdo

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2007

Nota de aceptación:

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Marzo 30 de 2007

He culminado otra etapa de mi vida en la que he aprendido que día tras día se construye lo que se es el futuro.

Doy infinitas gracias a Dios por ser mi compañero porque siempre ha estado a mi lado manifestándose aún en los detalles más simples, por haberme premiado con una familia maravillosa con la que he luchado incansablemente ante las adversidades.

A mi padre Hugo Eduardo a quien todos los días recuerdo como un gran maestro porque gracias a sus llamados de atención y a sus consejos, me enseñó a ser una persona íntegra; es un orgullo para mí llevar sus bendiciones y sé que en el lugar en el que se encuentre recibe este triunfo, porque mucho de esto se debe a Él. A mi madre Ana Rita, una mujer digna de admirar, por seguir siendo la luz de mi hogar, por continuar un camino firme aunque muchas dificultades pretendan hacerla desfallecer, gracias mami por tu ejemplo, por darme tu mano para seguir adelante cuando he creído que los obstáculos y las tristezas no me dejan continuar.

Agradezco a mis hermanos: Fernando y Fabio, con quienes he compartido hasta el día de hoy las dificultades y los grandes triunfos, gracias por sus consejos y su confianza, por ser un ejemplo de constancia y dedicación haciéndome ver que solo de esta manera se consigue paso a paso lo que se desea.

A quienes saben llamo amigos, de quienes he recibido su apoyo sin recibir nada a cambio, personas para las que vale la pena ser incondicional cuando vean oscuridad en su camino y quienes me han enseñado a cultivar una verdadera amistad.

A mis maestros que me aportaron sus conocimientos y me llevaron a ser la persona y profesional que soy hoy en día, a mis familiares y a todas aquellas personas que estuvieron en algún momento de esta etapa porque me enseñaron a crecer y a ver las cosas realmente importantes de la vida.

A mi esfuerzo, responsabilidad y dedicación.

Ana Lucía.

AGRADECIMIENTOS

Pablo Fernández Izquierdo, PhD. Microbiología Ambiental, Universidad la Habana Cuba. Profesor de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Biología, Universidad de Nariño.

Juan José Lozada, Químico, profesor de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Departamento de Química Universidad de Nariño.

Guido Ernesto Villota Calvachi, Biólogo con énfasis en Microbiología Industrial y Amigo, encargado del Laboratorio de Microbiología, Universidad de Nariño.

Mauricio Rodríguez Valencia Biólogo con énfasis en Ecología y Amigo, encargado del Laboratorios de Entomología, Universidad de Nariño.

David Arturo, Químico, encargado del Laboratorio de Análisis Cromatográfico, Laboratorios especializados, Universidad de Nariño.

Elkin Belalcazar, Químico, y a todos los compañeros de su área que contribuyeron en algún momento de la investigación.

A mis compañeros y amigos Biólogos y a todas aquellas personas que estuvieron conmigo y me aportaron sus conocimientos para continuar con el trabajo y permitir su exitosa culminación.

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCION	19
1. OBJETIVOS	22
1.1 OBJETIVO GENERAL	22
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
2. ANTECEDENTES	24
3. MARCO TEORICO	27
3.1 GENERALIDADES	27
3.2 LIQUIDOS LIXIVIADOS	28
3.2.1 Compuestos contaminantes presentes en los lixiviados	31
3.2.1.1 Características de los OCs	31
3.2.1.2 Plaguicidas OCs	32
3.3 TRATAMIENTOS APLICADOS A LOS LIXIVIADOS	37
3.3.1 Tratamientos Biológicos	38
3.3.1.1 Descomposición aerobia y anaerobia	39
3.3.1.2 Tratamiento biológico de compuestos OCs	43
3.4 TECNOLOGIAS DE BIORREMEDIACION	45
3.4.1 Biorremediación de compuestos tóxicos	48
3.4.1.2 Biorremediación del plaguicida Endosulfan	49
3.5 COMPUESTOS TOXICOS PRESENTES EN LOS LIXIVIADOS DEL RELLENO SANITARIO ANTANAS DE SAN JUAN DE PASTO	52

3.5.1 Presencia de residuos OCs en los lixiviados del RSA	55
4. METODOLOGIA	58
4.1 DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO	58
4.2 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE LOS LIXIVIADOS PRODUCIDOS EN EL RELLENO SANITARIO ANTANAS EN SAN JUAN DE PASTO	59
4.2.1 Muestreo	59
4.2.2 Aislamiento de bacterias y condiciones de cultivo	60
4.2.3 Descripción de los morfotipos aislados	61
4.2.4 Preservación de los aislados	61
4.2.4.1 Preservación en perlas de porcelana	62
4.2.4.2 Preservación en agar inclinado	62
4.2.4.3 Crioconservación	62
4.3 EFECTO DEL ORGANOCOLORADO EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL	62
4.3.1 Selección del aislado mas eficiente para la degradación de Endosulfan	63
4.3.1.1 Producción de bionmasa	63
4.3.1.2 Resistencia de los aislados a diferentes concentraciones de Endosulfan	63
4.3.2 Cinética de crecimiento	65
4.3.3 Cuantificación del Endosulfan residual	66
4.4 CARACTERIZACION FENOTÍPICA DEL AISLADO MÁS EFICIENTE PARA LA DEGRADACIÓN DE ENDOSULFAN	67
4.4.1 Descripción del aislado	67
4.5 ANALISIS DE DATOS	69

5. RESULTADOS Y DISCUSION	71
5.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE AGUAS RESIDUALES DEL RELLENO SANITARIO ANTANAS EN SAN JUAN DE PASTO	71
5.1.1 Descripción de los morfotipos observados	71
5.2 EFECTO DEL ORGANOCOLORADO EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL	76
5.2.1 Resultados obtenidos en las pruebas de biomasa y resistencia a diferentes concentraciones de Endosulfan	76
5.2.2 Cinética de crecimiento de RAE2	82
5.3 CARACTERIZACION FENOTÍPICA DEL AISLADO RAE2	86
5.3.1 Descripción del aislado RAE2	86
6. CONCLUSIONES	91
7. RECOMENDACIONES	92
BIBLIOGRAFIA	93
ANEXOS	99

LISTA DE CUADROS

	Pág
Cuadro 1. Principales parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos que permiten evaluar los lixiviados de un vertedero	29
Cuadro 2. Estructuras moleculares de algunos plaguicidas OCs	34
Cuadro 3. Presencia de plaguicidas en los lixiviados del RSA	57
Cuadro 4. Principales pruebas de identificación de microorganismos según el sistema MicroScan	68

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Persistencia de pesticidas e insecticidas en el suelo	37
Tabla 2. Microorganismos presentes en aguas residuales	39
Tabla 3. Microorganismos que degradan hidrocarburos	45
Tabla 4. Compuestos aptos para la biorremediación	48
Tabla 5. Composición de líquidos lixiviados presentes en el RSA	55
Tabla 6. Composición del caldo basal y concentraciones utilizadas para llevar a cabo la prueba de resistencia a diferentes concentraciones de Endosulfan	64
Tabla 7. Composición del caldo basal y tratamientos adicionales utilizados para evaluar la resistencia del aislado seleccionado a diferentes concentraciones de Endosulfan	64
Tabla 8. Condiciones de cultivo empleadas en la cinética de crecimiento del aislado bacteriano más eficiente para degradar Endosulfan	65
Tabla 9. Condiciones instrumentales óptimas para el análisis de pesticidas organoclorados mediante CG	66
Tabla 10. Descripción de las características culturales y microscópicas de los morfotipos aislados de los lixiviados del RSA capaces de utilizar Endosulfan como única fuente de carbono	71
Tabla 11. Valores de densidad óptica obtenidos después de 70 horas para los aislados RAE1, RAE2 y RAE3 cultivados en caldo basal (28 – 30°C, 120 rpm)	77
Tabla 12. Valores promedio del crecimiento de los aislados bacterianos a diferentes concentraciones de Endosulfan como única fuente de carbono en caldo basal obtenidos después de 70 horas (28 – 30°C, 120 rpm)	78
Tabla 13. Valores promedio del crecimiento de RAE2 en caldo basal, obtenidos después de 70 horas (28 – 30°C, 120 rpm)	81
Tabla 14. Perfil bioquímico obtenido para el aislado RAE2 mediante pruebas MicroScan	87
Tabla 15. Resultados de pruebas de resistencia ante antibióticos para RAE2	88

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Degradación de compuestos orgánicos en condiciones aerobias	41
Figura 2. Degradación de compuestos orgánicos en condiciones anaeróbicas	42
Figura 3. Rutas catabólicas propuestas para la transformación de la molécula de Endosulfan a partir de microorganismos	51
Figura 4. Etapas del tratamiento del lixiviado realizado en la planta del RSA	59
Figura 5. Piscina aeróbica de la planta de tratamiento del lixiviado del RSA. Ubicación de las zonas de muestreo	60
Figura 6. Crecimiento de RAE1 sobre Agar-nutritivo después de 48 horas de incubación a 28-30°C	72
Figura 7. Respuesta a la tinción de Gram aislado RAE1	72
Figura 8. Crecimiento de RAE2 sobre Agar-nutritivo después de 48 horas de incubación a 28-30°C	73
Figura 9. Respuesta a la tinción de Gram aislado RAE2	73
Figura 10. Crecimiento de RAE3 sobre Agar-nutritivo después de 48 horas de incubación a 28-30°C	74
Figura 11. Respuesta a la tinción de Gram aislado RAE3	74
Figura 12. Perfil de resistencia del aislado RAE1 a diferentes concentraciones de Endosulfan	79
Figura 13. Perfil de resistencia del aislado RAE2 a diferentes concentraciones de Endosulfan	79
Figura 14. Crecimiento de RAE2	82
Figura 15. Valores de biomasa Vs. Endosulfan residual obtenidos para el aislado RAE2	83

LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo A. Parámetros físico-químicos registrados durante la recolección de las muestras de lixiviado en el RSA (laguna aerobia) en los laboratorios del RSA (2005)	99
Anexo B. Parámetros físico-químicos del lixiviado recolectado, obtenidos en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño Sección de aguas	99
Anexo C. Caldo de enriquecimiento selectivo diseñado por Aguirre <i>et al.</i> ,	99
Anexo D. Fotografías de preservación de los aislados RAE1, RAE2, RAE3	100
Anexo E. Valores de biomasa y cuantificación de Endosulfan residual calculados para el aislado RAE2	101
Anexo F. Cromatograma obtenido para determinar la presencia de Endosulfan en la muestra de lixiviado	102
Anexo G. Esquema del método de Extracción en Fase Sólida (EFS) empleado para la obtención del analito de interés (plaguicida Endosulfan), a partir de los primeros sobrenadantes refrigerados	103
Anexo H. Cromatogramas obtenidos después del tratamiento EFS aplicado a las muestras refrigeradas, para la identificación y cuantificación de Endosulfan residual (muestras 1, 6, y 11)	104

ABREVIATURAS

DBO₅: demanda biológica de oxígeno.

DQO: demanda química de oxígeno.

EFS: extracción en fase sólida.

CG: cromatografía de gases.

RS: relleno sanitario.

RSA: relleno sanitario Antanas.

RSU: residuos sólidos urbanos.

OCs: compuestos organoclorados o hidrocarburos clorados.

RESUMEN

El uso de alternativas de biorremediación aplicadas a los lixiviados que presentan sustancias tóxicas como plaguicidas organoclorados, ha permitido que en la actualidad dichos líquidos se manejen adecuadamente antes de que se viertan al medio natural. En el RSA de la ciudad de Pasto se han identificado 13 compuestos organoclorados entre estos el plaguicida Endosulfan; en relación a ello, la siguiente investigación evaluó la eficiencia de bacterias aerobias en la degradación del plaguicida, esperando que a partir de los resultados el tratamiento del lixiviado sea mejorado mediante el uso de los microorganismos aislados.

Inicialmente se aislaron tres morfotipos bacterianos aerobios: RAE1, RAE2 y RAE3, empleando caldo de enriquecimiento selectivo con Endosulfan como única fuente de carbono; seguido a ello se realizó una prueba de producción de biomasa de los aislados, en la que RAE2 y RAE3 según un análisis de varianza simple y la aplicación de una prueba Duncan presentaron los mejores resultados. Con estos aislados se llevó a cabo un ensayo de resistencia a diferentes concentraciones de Endosulfan; para esta prueba, se emplearon modelos estadísticos que explicaron el crecimiento experimentado por las bacterias en el caldo enriquecido.

Los anteriores procedimientos permitieron determinar el efecto del plaguicida en el crecimiento de las poblaciones y finalmente seleccionar el aislado RAE2 como el más eficiente para degradar Endosulfan. El crecimiento obtenido para RAE2 en caldo basal se explicó de acuerdo a un modelo exponencial; para este aislado, se evaluó la cinética de crecimiento y mediante cromatografía de gases se cuantificó el Endosulfan residual. Estos aspectos permitieron determinar su velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.0095 \text{g/L hora}$, el rendimiento $Y = (x/s) 35\%$, y la velocidad específica de consumo de sustrato $q_s = 0.027 \text{g.L}^{-1} \text{ hora}$.

Finalmente se realizó una identificación fenotípica de RAE2 mediante el sistema MicroScan que reconoció con un 99.9% de confianza la similaridad del perfil bioquímico obtenido con *Klebsiella pneumoniae*, una especie reconocida por su alto potencial como biocatalizador en la biorremediación de Endosulfan.

ABSTRACT

The use of alternatives of biorremediation applied to the leached that display toxic substances like plaguicides organochlorides, at the present time has allowed that these liquids are being handled suitably before they are spilled in the environment. In the RSA in Pasto 13 organochlorides compounds have been identified such as Endosulfan; in addition, the following investigation has evaluated the efficiency of aerobic bacteria in the degradation of the plaguicide, it is expected that the results of the treatment of the leached is improved through the use of isolated microorganisms.

Initially, three aerobic bacterial morfotypes were isolated: RAE1, RAE2 and RAE3, using broth of selective enrichment with Endosulfan as the unique source of carbon; afterwards, a biomass production test of the isolated took place, in which RAE2 and RAE3 presented the best results according with the simple variance analysis and the use of the Duncan Test. With these isolated an essay test of resistance was made through different concentrations of Endosulfan; to this test, statistic models were used and explained the growth experienced by the bacteria in the enriched broth.

The previous procedures allowed to determine the effect of the plaguicide in the growth of the populations and finally to select the isolated RAE2 as the most efficient to degrade Endosulfan. The growth obtained for RAE2 in basal broth was explained according to an exponential model; for this isolated, the kinetics of growth was evaluated and through chromatography of gases the residual Endosulfan was quantified. These aspects allowed to determine their specific speed of growth $\mu = 0.0095\text{g/L hour}$, the performance $Y = (x/s) 35\%$, and the specific speed of consumption $q_s=0.027\text{g/L hour}$.

Finally, a partial fenotypical identification of RAE2 was elaborated through MicroScan that recognized a 99,9% of confidence, the similarity of the biochemical profile obtained with *Klebsiella pneumoniae*, a species recognized by its high potential as biocatalizador in the biorremediation of Endosulfan.

INTRODUCCION

Los lixiviados, son líquidos residuales derivados de la descomposición de basuras, caracterizados por sus altas concentraciones de contaminantes tales como amonio, hidrocarburos halogenados, metales pesados, y sales inorgánicas principalmente cloruro de sodio, carbonatos y sulfatos; compuestos que a su vez provocan la formación de gases y otros productos altamente tóxicos, que necesariamente deben ser colectados y tratados antes de su descarga¹.

Entre la gran diversidad de esta clase de contaminantes, los hidrocarburos halogenados y los metales pesados son los compuestos de mayor riesgo para los seres vivos como para el medio ambiente, los efectos ambientales que estos producen dependen de su concentración y de su movilidad entre el aire, el agua y la tierra, lo que conlleva a su que permanencia en la biosfera ocurra por muchos años y se vea asociada a fenómenos de bioacumulación y biomagnificación².

Dentro de los hidrocarburos halogenados se encuentran los Organoclorados (OCs), compuestos xenobióticos generados mediante procesos tecnológicos de los que hacen parte diversidad de plaguicidas. Estos compuestos reconocidos por su estabilidad a la luz solar, a la humedad, al aire y al calor, características atribuidas a los fuertes enlaces presentes en su estructura molecular, los hace altamente nocivos y persistentes en el ambiente, problema que se ve incrementado por su baja solubilidad en agua³.

Los (OCs), han sido en su mayoría eliminados del mercado debido a la repercusión ocasionada a la vida silvestre como al hombre, en el que aproximadamente el 90% de residuos de estos productos, se acumula a través de la alimentación en niveles relativamente pequeños que finalmente se depositan en los tejidos, en la sangre, leche materna, músculos y grasa corporal. Los perjuicios ocasionados, también se han manifestado en la imitación de las hormonas naturales, dificultando las funciones celulares e induciendo la actividad de las enzimas, lo cual conduce a un desequilibrio hormonal, que posiblemente puede

¹ GIERLICH y KOLLBACH, citado por RHEINHEIMER, Gerhard. Microbiología de las aguas. España: Acribia, S.A 1987, p.230.

² BASTIDAS *et al.*, Estandarización y validación del método cromatográfico para la determinación y seguimiento de pesticidas organoclorados en el proceso de tratamiento de lixiviados del Relleno Sanitario Antanas de la ciudad de San Juan de Pasto – Colombia. Trabajo de grado (Química) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. 2005, p. 25.

³ STOKER *et al.*, Química ambiental: Contaminación del aire y del agua. España : Blume, 1981, p. 215-220.

conllevar a reacciones bioquímicas incontroladas y toda una serie de efectos nocivos para la salud⁴.

Respecto a la presencia de estos compuestos en aguas residuales provenientes de los desechos sólidos como a otras sustancias de naturaleza tóxica, se ha visto la necesidad de emplear tratamientos integrales que garanticen un efectivo manejo de los lixiviados de manera que los resultados de los procedimientos empleados, no ocasionen problemas de tipo ambiental. De esta manera se han planteado métodos, en los que se preveen aspectos básicos de la disposición de las basuras tales como el sistema de recolección, almacenamiento y recirculación de los líquidos generados⁵.

Actualmente los métodos utilizados para el tratamiento de lixiviados, incluyen la aplicación de fuerzas físicas como desbaste, sedimentación, filtración entre otras y la eliminación de los contaminantes mediante reacciones químicas o biológicas, todos estos agrupados en tratamientos primario, secundario y terciario. Cada tipo de tratamiento incluye complejidad de operaciones con las que se va eliminando cierta cantidad de carga orgánica hasta mejorar finalmente la calidad del lixiviado antes de que este regrese al medio natural⁶.

En relación a dichos tratamientos, los procedimientos secundarios que utilizan medios biológicos y químicos, se encargan de eliminar la mayoría de materia orgánica. En los tratamientos biológicos diversidad de poblaciones mixtas de microorganismos, utilizan como nutrientes sustancias que se encuentran como contaminantes en el agua residual. Mediante la comunidad de estos organismos interactuantes, la contaminación del agua, puede ser reducida y generará productos aceptables al medio⁷.

Respecto a la eficacia que garantiza la degradación de muchos compuestos tóxicos a partir de diversidad de reacciones microbianas, los problemas de contaminación se han enfocado al desarrollo de nuevas tecnologías que permitan el control y uso de microorganismos en la destrucción de productos químicos. En los últimos años estas tecnologías acompañadas del término biorremediación

⁴ CONSTABEBER *et al.*, Influence of alimentary habits on organochlorine concentrations in adipose tissue. En: Ciencia y Tecnología de alimentos. 22(1), (Ene-Abr 2002).

⁵ METCALF & EDDY. Ingeniería Sanitaria: Tratamiento, Evacuación y Reutilización de Aguas Residuales. España: Labor, S. A 1985. 2 ed, p. 133.

⁶ METCALF & EDDY. Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, Vertido y Reutilización. España: Mc Graw Hill, 1995. 3 ed, v.1 p. 221.

⁷ RHEINHEIMER, Op.cit., p. 233-253.

aplicadas a solucionar multiplicidad de problemas ambientales, han permitido en gran medida la mejoría de los procesos de biodegradación natural⁸.

Según estudios realizados por Bastidas⁹ *et al.*, en el 2005, los líquidos lixiviados producidos en el Relleno Sanitario Antanas (RSA) en la ciudad de Pasto, incluyen en su composición compuestos OCs como el Endosulfan. En relación con la presencia de dicho plaguicida, el siguiente trabajo de investigación evaluó la eficiencia de bacterias aeróbicas aisladas de los lixiviados generados en el RSA capaces de degradar el contaminante. A partir de pruebas de producción de biomasa y ensayos de resistencia a diferentes concentraciones de Endosulfan a las que se sometieron los aislados obtenidos, se selecciono uno de estos, definido como el aislado más eficiente al que se le evaluaron diversos parámetros, y al cual finalmente se lo identifico fenotípicamente.

Con los resultados adquiridos en esta investigación se espera que los tratamientos que se llevan a cabo en el RSA se vean mejorados mediante el uso de los microorganismos aerobios aislados, siendo estos utilizados en los procesos de descontaminación de esta clase de aguas residuales con presencia del plaguicida Endosulfan.

⁸ TECNOLOGIAS EN BIORREMEDIACION En: CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL (2º : 1999: Santa Fé de Bogotá). Memorias del II Congreso de Microbiología Ambiental. Santa Fé de Bogotá, 1999, p. 193-194.

⁹ BASTIDAS *et al.*, Op cit., p. 77.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la eficiencia de bacterias aeróbicas aisladas de los lixiviados del Relleno Sanitario Antanas (RSA) para degradar Endosulfan

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- ✓ Aislar bacterias aerobias de las aguas residuales del Relleno Sanitario Antanas en San Juan de Pasto, que presenten capacidad para degradar Endosulfan.
- ✓ Determinar el efecto del Endosulfan en el crecimiento de la población bacteriana.
- ✓ Caracterizar fenotípicamente el aislamiento bacteriano más eficiente para la degradación de Endosulfan.

2. ANTECEDENTES

La naturaleza nociva de algunos OCs ha sido reconocida por más de 30 años, cuando se prestó la debida atención a los problemas de contaminación por los que atravesaba el medio ambiente. Mucho de los compuestos OCs entre los que se encuentran productos químicos como los plaguicidas: insecticidas, funguicidas y herbicidas, como otras sustancias orgánicas sintéticas, se produjeron masivamente en las últimas décadas ignorándose la cantidad de efectos perjudiciales que ocasionarían a la salud pública como a la vida silvestre, consecuencias que se vieron reflejadas en el incremento de enfermedades como en la desaparición de numerosas poblaciones animales¹⁰.

Con relación a la problemática mundial ocasionada por la alta diversidad de compuestos OCs y sus lugares de acumulación masiva tales como los Rellenos Sanitarios (RS), se promovió el estudio de diversos procesos que conlleven a reducir o eliminar estas sustancias. En estos lugares (RS), en donde la descomposición de los residuos sólidos domésticos como industriales ocasionan la formación de líquidos residuales, se empezaron a realizar tratamientos en los que se emplearon técnicas microbiológicas¹¹.

Inicialmente el tratamiento de aguas residuales comenzó en Inglaterra a finales del siglo XIX y principios del XX para controlar los brotes infecciosos en las ciudades, en las que el primer objetivo del tratamiento se basaba en la reducción del contenido de materia en suspensión en agua y la disminución de la demanda biológica de oxígeno. Sin embargo, mas adelante el conocimiento sobre la composición de altas cargas tóxicas presentes en aguas residuales tanto domesticas como industriales, llevó a plantearse mayores objetivos con los que se pretendían a partir del tratamiento biológico la disminución del contenido de materia orgánica de las aguas, la reducción de su contenido en nutrientes, y la eliminación de patógenos y parásitos¹².

Para dichos fines, las primeras investigaciones se vieron relacionadas con el conocimiento de las poblaciones de microorganismos presentes en aguas contaminadas. Durante 1988 Fielding¹³ *et al.*, realizaron un aislamiento y

¹⁰ CONSTABEBER, *et al.*, Op cit.

¹¹ TCHOBANOGLOUS *et al.*, Gestión integral de residuos sólidos. España : Mc Graw Hill. v.1, 1994, p. 108-112.

¹² METCALF & EDDY, Op cit., 1985. p. 130-132.

¹³ FIELDING, ARCHER, C, De Macario y A. J de Macario. Isolation and characterization of methanogenic bacteria from landfills, citado por TIBANTA *et al.*, Efecto de microorganismos en la degradación *in vitro* de lixiviados del antiguo Relleno Sanitario de

caracterización de microorganismos presentes en aguas residuales generadas en RS. En sus resultados se registran bacterias metanogénicas como *Metanobacterium formicicum*, *Metanobacterium bryantii* y algunos cocos no identificados. Dos años mas tarde Westlake¹⁴ et al., aislan un gran número de bacterias celulolíticas utilizando muestras se sólidos ya enterrados como *Clostridium sp.*, y *Eubacterium sp.* Palmisano y Pettigrew¹⁵ en 1992 realizaron investigaciones sobre la actividad de las enzimas hidrolíticas y la densidad de las poblaciones microbiales en los RS.

Mas adelante las investigaciones que se llevaron a cabo, se relacionaron con el tratamiento de compuestos químicos tóxicos de alta persistencia en el medio. Para dicho propósito se desarrollaron nuevas tecnologías en las que el principal objetivo, ha sido el control y uso de microorganismos en la destrucción de contaminantes químicos. Varias de estas, se basan en la actividad degradativa de los microorganismos enfocadas en mejorar los procesos de biodegradación natural o tecnologías que usan reactores en los que el compuesto químico o contaminante entra en contacto con el microorganismo permitiendo una transformación acelerada. El principal objetivo de la biorremediación, como se conocen estas tecnologías busca nuevas alternativas para degradar contaminantes orgánicos a concentraciones que sean de alguna forma indetectables, o si son detectables a concentraciones por debajo de los límites establecidos como seguros o aceptados por las agencias de regulación¹⁶.

En el año de 1994 Pogell¹⁷, aplicó la técnica de biorremediación a pesticidas y herbicidas con cepas de *Streptomyces* aisladas de suelos enriquecidos, determinando su capacidad única para biodegradar numerosos xenobióticos. Durante este año, Leenn¹⁸ et al., estudiaron la degradación microbiana de PCBs, (compuestos OCs tóxicos generados por procesos tecnológicos) a través de dos rutas metabólicas llevadas a cabo por bacterias anaeróbicas y aeróbicas con las que se logró una degradación de PCBs a compuestos menos clorinados.

la ciudad de San Juan de Pasto. Trabajo de grado (Biología con énfasis en microbiología) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, 2003, p.18.

¹⁴ WESTLAKE, ARCHER y BOONE. Diversity of cellulolytic bacteria in landfill, citado por TIBANTA et al., Op cit., p.18.

¹⁵ PALMISANO y PETTIGREW. Biodegradability of plastic, citado por TIBANTA et al., Ibid., p.18.

¹⁶ TECNOLOGIAS EN BIORREMEDIACION, Op.cit., p. 193-194.

¹⁷ POGELL, Burton M. Bioremediation of pesticides and herbicides by *streptomyces*. En: INTERNATIONAL SYMPOSIUM/WORKSHOP ON ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY. (1994 : Waterloo). Universidad de Waterloo. (Jul 4-8), 1994.

¹⁸ LEENN et al., Microbial degradation of PCBs by a two-stage process. International En: SYMPOSIUM/WORKSHOP ON ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY. (1994 : Waterloo). Universidad de Waterloo. (Jul 4-8), 1994.

Para el año de 1999 Aguirre¹⁹ *et al.*, evaluaron la capacidad de bacterias transformadoras de compuestos xenobióticos, tales como el plaguicida 2,3 dihidro 2,2 dimetilbenzofurano 7-metil Carbamato. A partir de muestras de agua de humedal, aislaron cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Burkholderia* determinando su capacidad para degradar *in vitro* dicho compuesto. En el mismo año, Espitia²⁰ *et al.*, cuantificaron y determinaron la capacidad degradativa de grupos microbianos presentes en lodos de plantas de tratamiento anaerobio de residuos industriales de las que aislaron poblaciones de bacterias anaerobias estrictas, bacterias aerobias y anaerobias facultativas estas en su mayoría fermentativas, y en menor proporción bacterias sintróficas y metanogénicas.

En relación con el plaguicida Endosulfan, un compuesto sintético de restricción en el comercio, Sutherland²¹ *et al.*, en el 2000 comprueba la capacidad enzimática de un grupo mixto de bacterias que utilizan como única fuente de azufre el Endosulfan logrando hidrólisis química y oxidación del contaminante. Para el mismo compuesto Kwon²² *et al.*, en el 2002, aislaron e identificaron la especie *Klebsiella pneumoniae* KE-1, a partir de muestras de suelos contaminados, utilizando Endosulfan como única fuente de carbono y energía. El estudio concluye, que la especie mencionada es capaz de degradar el plaguicida sin formación de su principal metabolito tóxico sulfato de Endosulfan.

Para el 2002, Sutherland²³ *et al.*, comprueba la eficacia de las enzimas microbianas para degradar Endosulfan y el metabolito sulfato de Endosulfan; en otro de sus estudios aisló y caracterizó genéticamente una especie perteneciente al género *Mycobacterium* capaz de metabolizar el insecticida.

¹⁹ AGUIRRE *et al.*, Evaluación de la capacidad degradadora de *Pseudomonas* Fluorescentes y enterobacterias sobre el plaguicida 2,3 dihidro 2,2 dimetilbenzofurano 7-metil carbamato; aislados del humedal de la conejera en SantaFé de Bogotá. En: CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL. Op. cit., p. 101-105.

²⁰ ESPITIA *et al.*, Cuantificación de los principales grupos microbianos presentes en lodos de plantas de tratamiento anaerobio. En: CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL. Ibid., p. 147-150.

²¹ SUTHERLAND *et al.*, Enrichment of an Endosulfan-Degrading Mixed Bacterial Culture. En: Applied and Environmental Microbiology. 66(7) (Jul 2000); p. 2822-2828.

²² KWON *et al.*, *Klebsiella pneumoniae* KE-1 degrades endosulfan without formation of the toxic metabolite, Endosulfan sulfate. En: FEMS Microbiol Lett. 215(2) Oct 2002); 255-259

²³ SUTHERLAND *et al.*, Isolation and characterization of a *Mycobacterium* strain that metabolizes the insecticide Endosulfan. En: Appl Microbiol. 93(3) (2002); p. 380-389.

Tres años mas tarde Kwon²⁴ *et al.*, demostraron la capacidad biodegradativa de *Klebsiella oxytoca* KE-8 sobre el Endosulfan y del metabolito tóxico sulfato de Endosulfan. Los análisis obtenidos sugieren que *K. oxytoca* KE-8 tiene un alto potencial como biocatalizador para ser utilizado en procesos de biorremediación aplicados al Endosulfan y/o al sulfato de Endosulfan.

Los estudios mencionados anteriormente sugieren que este tipo de microorganismos son potencialmente valiosos dentro de los procesos de biorremediación aplicada a la degradación de diversidad de compuestos químicos. La eficacia de estas tecnologías se ha comprobado con la medida de la velocidad en la que se da la desaparición del contaminante, demostrando la biodegradación rápida del tóxico tratado, en condiciones controladas²⁵.

Respecto al RSA de actual funcionamiento en la ciudad de Pasto, se han realizado estudios acerca de la composición físico-química de los lixiviados de los que hacen parte plaguicidas, muchos de los cuales son OCs como lo afirman Bastidas²⁶ *et al.*, sobre los que no se han llevado a cabo investigaciones acerca de los procesos de degradación que dichos compuestos sufren ni de la actividad que la población microbiana presente en los lixiviados producidos en el RSA ejerce sobre estos.

²⁴ KWON *et al.*, Biodegradation of the organochlorine insecticide, Endosulfan, and the toxic metabolite, Endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8. En: Applied Microbiology and Biotechnology. 67(6) (Jun 2005); p. 845-850.

²⁵ ATLAS *et al.*, Ecología microbiana y Microbiología ambiental. España : Prentice Hall, 2002. p. 584-585.

²⁶ BASTIDAS *et al.*, Op cit., p. 77.

3. MARCO TEORICO

3.1 GENERALIDADES

La contaminación y degradación del medio ambiente debido a la constante introducción de sustancias sintéticas fabricadas por el hombre, ha ocasionado problemas en casi todos los sustratos abióticos y bióticos, causando riesgos a la salud humana y alteraciones en los sistemas ecológicos²⁷.

Debido a la problemática que se ha venido dando en las últimas décadas por las altas cantidades de residuos generados en las actividades de producción, transformación y consumo a escala domestica como industrial, el mismo hombre se ha encargado de dar importancia a la recuperación de su entorno y ha mantener de alguna manera su equilibrio; para ello se ha propuesto el planteamiento de mecanismos que permitan darle un proceso a los desechos, de tal manera que se intente eliminar los riesgos de toxicidad que estos provocan²⁸.

El conocimiento de la composición de los residuos urbanos como industriales tiene gran importancia para la toma de decisiones en la elección de los procesos que pueden aplicarse; pues debido a su variada estructura física y química, estos pueden reutilizarse o eliminarse en gran parte del medio. Entre los procedimientos aplicables se encuentran aquellas técnicas mecánicas que agrupan la trituración, la compactación y la clasificación de las basuras; los procesos térmicos dentro de los cuales se encuentran la incineración y la pirolisis y los biológicos que incluyen tratamientos aeróbicos como anaeróbicos²⁹.

Hacia la década de los treinta se incorporó a nivel mundial, una de las alternativa más utilizadas para la disposición final de los Residuos Sólidos Urbanos (RSU) que hace referencia a la implementación de los RS, lugares en los cuales los desechos sólidos se confinan en el suelo, para evitar perjuicios al medio ambiente y no causar molestias o peligro para la salud³⁰.

Dentro de un RS se forman una gran variedad de reacciones físicas, químicas y biológicas con una serie de productos como CO₂, CH₄, H₂O, y diversidad de

²⁷ ALBERT *et al.*, Contamination by organochlorine compounds in some foodstriffs from Region of Mexico. En: Revista de Salud Pública. 22 (6) (Dic 1998).

²⁸ SALAZAR C, Roberto. Ingeniería Ambiental. Dpto de Diseño y Construcción. Universidad de Nariño. Facultad de Ingeniería. San Juan de Pasto, 2000, p. 1-3.

²⁹ TCHOBANOGLOUS *et al.*,. Op cit, p. 104-110.

³⁰ SALAZAR, Op cit., p. 100-115.

compuestos orgánicos, que con ayuda de las precipitaciones son arrastrados entre las grietas del suelo generando lo que se conoce como lixiviados³¹.

Aunque la alternativa de los RS ha sido una de las soluciones más viables para la eliminación de los RSU, este tipo de líquidos residuales generados por la descomposición de las basuras como los gases y el agua resultantes presentan un grave problema de eliminación. Como consecuencia el agua al alcanzar la saturación de la masa sólida abandona el RS, y arrastra consigo compuestos solubles y partículas que al experimentar reacciones químicas entre sustancias preexistentes o recién formadas, pueden aumentar sus niveles de toxicidad³².

3.2 LIQUIDOS LIXIVIADOS

Los lixiviados o líquidos percolados que se producen en los RS generalmente presentan una alta carga orgánica de la que hacen parte contaminantes como amonio, hidrocarburos halogenados, metales pesados, altas concentraciones de sales inorgánicas entre estas cloruro de sodio, carbonatos y sulfatos³³. La composición media de estos líquidos al igual que el volumen producido varían considerablemente según múltiples factores entre ellos el tipo de residuo depositado, las áreas geográficas, edad del vertedero y condiciones medio ambientales del entorno³⁴.

Debido a que dichos factores afectan directamente la composición del lixiviado, este debe evaluarse a menudo a partir de la medición de parámetros que determinan los componentes y las concentraciones que hacen parte del líquido producido. Entre estos parámetros se tiene en cuenta principalmente los niveles de (DQO) definida como la cantidad de oxígeno necesario para oxidar la materia orgánica y la demanda biológica de oxígeno (DBO₅), cantidad de oxígeno requerida por los organismos descomponedores aeróbicos para degradar la materia orgánica e inorgánica en una muestra de agua³⁵.

Sin embargo, existen múltiples parámetros a parte de la DBO₅ y la DQO, que permiten conocer la composición de un lixiviado. Los parámetros fisicoquímicos

³¹ AGUDELO, Ruben. Tratabilidad de lixiviados producidos en Rellenos Sanitarios, citado por Tibanta *et. al.*, p. 19

³² CORPONARIÑO. Manejo Integral de residuos sólidos. San Juan de Pasto, 2001, v.1. p. 177-179.

³³ BURBANO F, Oscar. Tratamiento biológico de lixiviados del Relleno Sanitario Antanas por filtros anaeróbicos. Trabajo de grado (Biología con énfasis en microbiología) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, 2002, p. 44-45.

³⁴ LIXIVIADOS PROCEDENTES DE LOS RS. En: Revista Ambientum. 2002 (citada en febrero de 2005) [En línea] <http://www.ambientum.com/revista/>

³⁵ ATLAS et al., Op cit., p. 316.

más importantes registrados en el cuadro 1. se toman en cuenta para evaluar las condiciones en las que se encuentra el lixiviado generado en un RS.

Cuadro 1. Principales parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos que permiten evaluar los lixiviados de un vertedero.

PARAMETROS
DBO
DQO
pH
Sólidos (totales, disueltos, suspendidos y sedimentables)
Grasas y/o aceites
Acidez y Alcalinidad
Coliformes (totales y fecales)
Cloruros

Fuente: Manejo integral de residuos sólidos. CORPONARIÑO, 2001.

Con relación a los regímenes ambientales, la generación de lixiviados se verá directamente afectada por la humedad de los residuos y la pluviosidad de la zona de depósito; técnicamente la formación de estos se estará o no favorecida por la altura del enterramiento, la naturaleza de la superficie de la cobertura y los parámetros específicos operacionales del lugar de llegada de los RSU³⁶.

Otro de los factores relacionados con la concentración del lixiviado, hace referencia a la acción ejercida por los microorganismos desde el momento de llegada de los desechos sólidos, a partir de la cual la cantidad de contaminantes en el lixiviado puede incrementarse en dos formas. En primer lugar, la degradación biológica puede ser eficiente en la obtención de productos de degradación solubles, derivados de constituyentes de desechos sólidos insolubles. Por otra parte, los ácidos producidos durante la degradación aeróbica o anaeróbica pueden solubilizar fracciones de desechos sólidos de otra manera insolubles³⁷.

Debido a la heterogeneidad en la composición de los lixiviados provocada por multiplicidad de agentes, la descarga hacia medio ambiente debe ser controlada mediante el uso de métodos muy parecidos o casi los mismos que los aplicados a la depuración de otro tipo de aguas residuales, con la salvedad que estos líquidos percolados presentan unas características adicionales que pueden alterar el tratamiento, principalmente la alta carga orgánica que contienen³⁸.

³⁶ SALAZAR, Op. cit., p. 90-91.

³⁷ Ibid., p. 47-53.

³⁸ LIXIVIADOS PROCEDENTES DE LOS RS. Op. cit., [En línea]

3.2.1 Compuestos contaminantes presentes en los lixiviados. La mayoría de compuestos que hacen parte de los residuos tóxicos presentes en los lixiviados y que por tanto elevan las cargas contaminantes de estos líquidos, son sustancias xenobióticas de difícil degradación tales como los plaguicidas sintéticos, productos químicos de amplia distribución y comercialización, utilizados en el campo agrícola como ganadero para el control de diferentes plagas³⁹.

De acuerdo a la composición, objetivo y estructura química, los plaguicidas entre ellos herbicidas, insecticidas y fungicidas, incluyen aproximadamente 1000 fórmulas distintas, que por la presencia de anillos aromáticos, compuestos clorados y moléculas con fósforo y nitrógeno los clasifican en cuatro grupos: hidrocarburos clorados, clorofenoxiácidos, organofosfatos y carbamatos; productos de alta persistencia que a pesar de encontrarse estrechamente relacionados varían en su tiempo de degradabilidad según la exposición a diversos factores ambientales⁴⁰.

A pesar de que esta clase de productos han alcanzado gran éxito en el sector agropecuario, los efectos para la salud humana son altamente negativos y los problemas en el medio ambiente se han manifestado en el desequilibrio de los ecosistemas, en los que cada vez se ha ido incrementando la cantidad como la diversidad de plaguicidas, conllevando a que algunas especies adquieran resistencia y se necesiten en mayor proporción con el fin de obtener el efecto deseado en las plagas⁴¹.

El grupo de los hidrocarburos clorados, mas conocidos como OCs, incluye además de los pesticidas, un gran número de contaminantes atmosféricos que hacen parte de los lixiviados, entre los que se incluyen productos químicos formados de manera no intencionada durante la fabricación de diversos procesos industriales por la combinación de materia orgánica con el gas cloro, una sustancia reactiva y venenosa que en muy raras ocasiones se encuentra en la naturaleza libremente. Esta clase de productos, cuya velocidad de degradación biológica en suelos y aguas es muy baja, agrava aún más sus efectos perjudiciales; la variedad y relevancia medioambiental de estos productos se ve reflejada en el informe de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), "Clean Air Act Amendments" (CAAA) de 1990, en el que se identifican 189

³⁹ MADIGAN *et al.*, Biología de los microorganismos. España : Prentice Hall. 2004. 10 ed, p. 668.

⁴⁰ LEDIRAC *et al.*, Effects of Organochlorine Insecticides on MAP Kinase Pathways in Human HaCaT Keratinocytes: Key Role of Reactive Oxygen Species. En: Toxicological Sciences. 86(2) (May-2005).

⁴¹ STOKER *et al.*, Op cit, p. 224-235.

contaminantes atmosféricos, de los que más de 40 se han identificado como OCs⁴².

3.2.1.1 Características de los OCs. Este tipo de contaminantes fabricados en procesos de bajo coste, se produjeron masivamente durante el siglo XX debido al rápido desarrollo de los procesos técnicos, presentando eficacia y beneficio para el ser humano; debido a ello se aplicaron amplia e indiscriminadamente, y sin calcular los perjuicios que podrían causar se liberaron de forma deliberada al ambiente⁴³.

Dichos compuestos, presentan características particulares a las cuales se les atribuye su elevada carga de toxicidad, bioacumulación y problemas de degradabilidad. Entre las características más importantes de estos compuestos cabe mencionar que:

- Son compuestos apolares con una masa molecular superior a 200, lo que se relaciona con el grado de solubilidad, siendo mas afines con las grasas que en el agua; por lo tanto tienden a acumularse en los tejidos grasos.
- Se adhieren fácilmente a algún sólido disponible, incrementando su poder contaminante debido a la mayor superficie hábil.
- Son compuestos semivolátiles, que se evaporan a una velocidad relativamente lenta. Cuanto mas frío es el clima, presentan menor tendencia a evaporarse acumulándose lejos de sus fuentes de producción y uso originales como en las zonas árticas y alpinas.
- Presentan alta estabilidad debido a su estructura molecular, por lo que necesitan de gran cantidad de energía para la ruptura de sus enlaces; esto incrementa su persistencia en el medio.
- Su concentración es mayor a medida que los animales obtienen su alimento de otras especies vivas ya contaminadas, dándose una situación de bioacumulación⁴⁴.

⁴² INSTITUTO DE CATÁLISIS Y PETROLEOQUÍMICA. KNAPP, Carlos. Procesos para la reducción de emisiones gaseosas de compuestos organoclorados. Madrid, 2004 (citada en enero de 2005). [En línea] <http://www.estrucplan.com.ar>.

⁴³ WANIA *et al.*, Tracking the distribution of persitent organic pollutants En: Environmental Science and Technology, 1996; 30 (9): 390- 396.

⁴⁴ YARTO, Mario, GAVILAN, Andrés y BARRERA, Juan. El convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos persistentes y sus implicaciones para México, citado por Bastidas *et al.*, Op cit, p. 80-81.

De acuerdo a las características en mención, gran cantidad de efectos nocivos se han registrado a nivel mundial. Existen numerosos informes acerca de la desaparición localizada de poblaciones de mamíferos y aves, atribuidas a los OCs, a los que también se les han sumado varios casos del descenso de poblaciones de orcas, tursiones, focas comunes, grises y anilladas, nutrias, halcones entre otras especies⁴⁵.

En los seres humanos cerca del 90% de estos compuestos se acumulan a través de la alimentación en niveles relativamente pequeños que finalmente se depositan en los tejidos. Igualmente se han detectado en la sangre, leche materna, músculos y grasa corporal, y se han manifestado imitando las hormonas naturales, dificultando las funciones celulares e induciendo la actividad de las enzimas, lo cual conduce a un desequilibrio hormonal; debido a ello se pueden provocar reacciones bioquímicas incontroladas y toda una serie de efectos nocivos para la salud⁴⁶.

En la carne, el pescado y los derivados lácteos se registran los niveles más elevados de OCs debido a que estas sustancias tienen afinidad por las grasas y se acumulan en toda la cadena alimenticia, igualmente se presentan en las frutas y verduras que hayan sido fumigadas con plaguicidas de este tipo⁴⁷.

3.2.1.2 Plaguicidas OCs. Los plaguicidas organoclorados hacen parte de los contaminantes xenobióticos más abundantes, constituyendo un tipo único de pesticidas debido a su estructura cíclica y a su número de átomos de cloro. Sus moléculas orgánicas cloradas que resultan de la unión de uno o más átomos de cloro unidos a un compuesto orgánico presentan un peso molecular entre 291 y 545⁴⁸.

Entre estos productos químicos, los más conocidos y utilizados han sido el DDT, el Dieldrín, el Aldrín, el Heptacloro, el Clordano, el Endrín, el Lindano y el Endosulfan. El DDT fue el primer insecticida orgánico tratado con cloro, de uso extensivo y de alta persistencia en el ambiente, utilizado para el control de plagas domésticas y agrícolas. Debido a sus efectos directos como a los ocasionados por los productos formados durante su degradación (DDE y el DDD), este plaguicida se prohibió en los Estados Unidos desde 1972; sin embargo todavía se utiliza en otras áreas del mundo⁴⁹.

⁴⁵ WHO. World health organization. ROSS S. Peter y BRINBAUM Linda S. Case studies. Persistent Organic Pollutants (POPs) in humans and Wildlife. Geneva: WHO. 2001, p. 1-6.

⁴⁶ CONSTABEBER, *et al.*, Op cit.,

⁴⁷ STOKER *et al.*, Op cit, p. 223.

⁴⁸ BASTIDAS *et al.*, Op cit, p. 85.

⁴⁹ STOKER *et al.*, Op cit, p. 230.

La gran mayoría de OCs se emplearon inicialmente en el control de plagas que atacaban las cosechas y que ocasionaban estragos en los suelos de invernaderos, mas tarde se vieron útiles en el tratamiento de semillas y en la preservación de maderas; en relación a la efectividad de su uso dichos compuestos se emplearon extensivamente sin calcular los prejuicios que ocasionarían a los ecosistemas conllevando a que sea necesaria su eliminación del mercado; sin embargo, se ha confirmado que muchos de ellos aun se siguen utilizando⁵⁰.

Algunos de estos plaguicidas, presentan afinidad por los tejidos corporales de las plantas y se depositan fácilmente en tejidos finos grasos de animales, otros son fácilmente acumulables en peces e invertebrados acuáticos y pueden encontrarse en humanos en los que llegan por ingesta de alimentos y leche contaminada, por contacto con la tierra o a través de la respiración aun en lugares con bajos niveles de aire contaminado⁵¹; en humanos los problemas mas comunes ocasionados por estos compuestos se han visto relacionados con trastornos en el sistema nervioso central, reproductivo e inmunológico, mortalidad infantil e inclusive algunos pueden ser causantes de cáncer⁵².

Entre los OCs de uso frecuente se encuentra el Endosulfan conocido comercialmente como Thiodan, el cual se ha empleado por más de 30 años en variedad de cosechas y como un excelente preservante de las maderas. Debido a su uso excesivo, la contaminación ambiental por este plaguicida es muy frecuente alcanzando grandes distancias desde los puntos originales de su aplicación, por lo que se ha detectado en la atmósfera, suelos, sedimentos, aguas de lluvia, como en residuos alimenticios⁵³.

El Endosulfan se ha visto directamente relacionado con la toxicidad en aves, peces e invertebrados acuáticos. Sus efectos tóxicos se han manifestado en alteraciones del sistema nervioso central como en daños a los órganos reproductores masculinos de mamíferos, sin conocer aún problemas en la reproducción; sin embargo, algunos defectos del nacimiento se han visto en la descendencia de animales que se han expuesto al plaguicida o lo han ingerido durante el embarazo, confirmando su presencia en la sangre, orina, y tejidos del

⁵⁰ EPA. Environmental Protection Agency. Persistent Bioaccumulative and Toxic (PBT) chemical program: Aldrin/Dieldrin. Washington, 2004. (citado en abril de 2005). [En línea] <http://www.epa.gov>

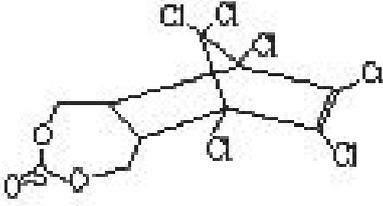
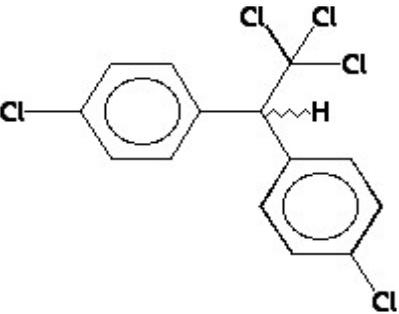
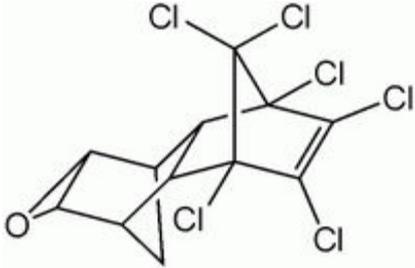
⁵¹ ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Center for disease Control (CDC): ToxFAQs™ for Hexaclorobenceno. Atlanta, 1993 (citado en marzo de 2005). [En línea] http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts90.pdf.

⁵² EPA. Environmental Protection Agency. Persistent Bioaccumulative and Toxic (PBT) chemical program: Aldrin/Dieldrin. Washington, 2004. (citado en abril de 2005). [En línea] <http://www.epa.gov>.

⁵³ SIDDIQUE *et al.*, Enrichment and Isolation of Endosulfan-Degrading Microorganisms. En: *Journal of Environmental Quality*. 32 (1) (Ene-Feb2003), p 47-54.

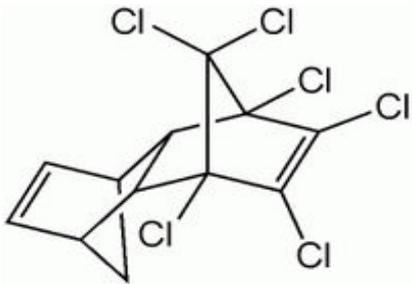
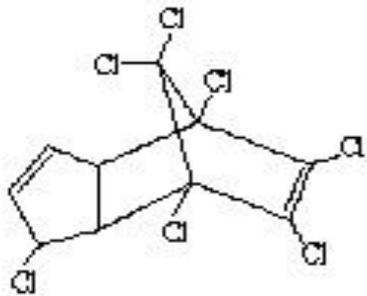
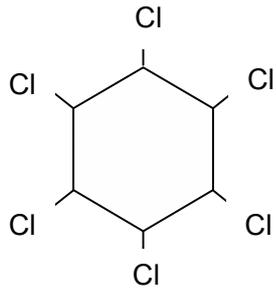
cuerpo. La exposición en los animales a largo plazo demuestra que pueda dañar el hígado y los riñones, y puede afectar las defensas del organismo⁵⁴.

Cuadro 2. Estructuras moleculares de algunos plaguicidas OCS.

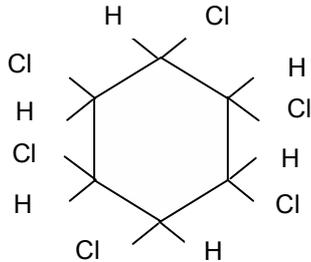
PLAGUICIDA OCS	ESTRUCTURA MOLECULAR
Endosulfan (<i>Thiodan</i>)	 <p data-bbox="997 828 1284 896">ENDOSULFAN I Y II ENDOSULFAN</p>
DDT ((1,1,1-Tricloro-2,2-bis-(p-clorofenil) etano o diclorodifenil-tricloroetano).	
Dieldrín	

⁵⁴ ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Center for disease Control (CDC): ToxFAQs™ for Endosulfan. Atlanta, 2001 (citado en marzo de 2005). [En línea] http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts12.html.

Cuadro 2. Estructuras moleculares de algunos plaguicidas OCS.

PLAGUICIDA OCS	ESTRUCTURA MOLECULAR
Aldrín	
Heptacloro/ Epóxido de Heptacloro (<i>Heptagran, Velsicol 104, Basaklor</i>)	
Hexaclorobenceno (<i>HCB</i>)	

Cuadro 2. Estructuras moleculares de algunos plaguicidas OCS.

PLAGUICIDA OCS	ESTRUCTURA MOLECULAR
Lindano (<i>HCH</i>)	

Fuente: Human toxicology of pesticides. Kaloyanova *et al.*, 1991.

Como estos, la mayoría de estos productos presentan dificultades de degradación y eliminación; por lo tanto, el paso de un sistema a otro sin cambio alguno, ha producido una acumulación excesiva de estos agentes tóxicos extendida en el tiempo y en el espacio, lo que se manifiesta en el aumento de los sistemas contaminados y en su permanencia por periodos prolongados⁵⁵. Esta persistencia definida como el tiempo necesario para que la actividad se pierda al menos en un 95%, se mide bajo condiciones ambientales (temperatura, pH, aireación y contenido de materia orgánica del suelo) y tasas de aplicación normales. La pérdida de un plaguicida será completa solo cuando este se haya degradado, o cuando se haya inactivado debido a procesos químicos o biológicos⁵⁶.

De acuerdo a su permanencia en el ambiente, la clasificación de estos productos se da en tres grupos: los compuestos químicos persistentes que hacen referencia a aquellos que permanecen en el ambiente de una a tres semanas, los de persistencia moderada que se degradan entre uno y dieciocho meses y los persistentes que pueden durar dos o más años. La mayoría de OCS han sido clasificados dentro del grupo de compuestos persistentes⁵⁷. La tabla 1. indica el tiempo aproximado de persistencia de algunos de ellos en el suelo.

⁵⁵ ALBERT, Lilia. Toxicología Ambiental. México : Limusa, 1988, p. 10.

⁵⁶ STOKER *et al.*, Op. cit., p. 228.

⁵⁷ Ibid., p. 232.

Tabla 1. Persistencia de pesticidas e insecticidas en el suelo.

SUSTANCIA	TIEMPO REQUERIDO PARA LA DESAPARICION 75-100%
INSECTICIDAS CLORADOS (OCs)	
DDT	4 años
Aldrina	3 años
Clordano	5 años
Heptacloro	2 años
Lindano	3 años
Dieldrín	11 años
Endrín	11 años

Fuente: Biología de los microorganismos. Madigan, *et al.*, 2004. Química ambiental: Contaminación del aire y del agua. Stoker, *et al.*, 1981.

3. 3 TRATAMIENTOS APLICADOS A LOS LIXIVIADOS.

En relación a la diversidad de compuestos que hacen parte de los líquidos lixiviados, la elección del procedimiento a seguir, dependerá de lo que sea más fiable y adecuado teniendo en cuenta aspectos económicos como técnicos. La solución mas acertada para llevar a cabo la descarga de este tipo de líquidos al medio, se ha logrado mediante el tratamiento integral de los lixiviados preferentemente en las instalaciones del RS, en donde se pretende que los líquidos obtenidos sean sometidos a un mayor control y tratamiento y se logre reducir la carga contaminante a los valores exigidos por la legislación y por tanto se permitan vertir a los cauces públicos más cercanos⁵⁸.

Las técnicas *in-situ*, como se conoce a los tratamientos llevados a cabo en el lugar en donde se originan este tipo de líquidos, han demostrado resultados bastante adecuados cuando se han integrado tratamientos biológicos y físico-químicos, demostrando que su aplicación permite la eliminación de compuestos orgánicos del agua residual⁵⁹. Después del ingreso de los líquidos a la planta de tratamiento, y seguido al mismo, el agua resultante es apta inclusive para ser vertida a sistemas de potabilización para su posterior consumo⁶⁰.

⁵⁸ COTORAS Davor. Los derrames incontrolados. En: Biohídrica : Induambiente. 3(17), (1995), p. 70-72.

⁵⁹ KIELY, Gerard. Ingeniería Ambiental: Fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión. Aravaca : Mc Graw Hill. 1999. 234 p.

⁶⁰ MADIGAN *et al.*, Op. cit., p. 929.

Inicialmente este tipo de métodos requiere de una separación de los lixiviados producidos de acuerdo a su concentración en líquidos de mayor y menor concentración; esto se logra mediante un sistema de tuberías de recogida, adecuado en el vertedero. Después de recolectarse en un depósito de regulación son llevados a una planta de tratamiento, en la que pueden tratarse mediante dos tipos de sistemas que suponen una amplia utilización de microorganismos, lo que hace que pueda ser considerado como un tipo de bioconversión a escala industrial, seguido a ello continúan hacia la etapa físico-química en donde finaliza el tratamiento, para posteriormente vertirse al medio⁶¹.

3.3.1 Tratamientos Biológicos. Los tratamientos biológicos, involucran una serie de reacciones complejas de digestión y fermentación llevadas a cabo por diferentes especies microbianas, quienes oxidan la materia orgánica presente en las aguas contaminadas. Específicamente este tipo de tratamiento, considerado como tratamiento secundario esta ligado a dos procesos microbiológicos, los cuales pueden ser aerobios y anaerobios⁶².

Primeramente en el vertedero se producen lixiviados con una alta DQO/DBO; para esta fase el mejor tratamiento sería un sistema anaerobio. Con el tiempo, aproximadamente con 10 años de funcionamiento el contenido en DQO/DBO bajará muy rápidamente y el mejor sistema sería un aeróbico. Para comprobar la biodegradabilidad de la carga orgánica suele emplearse la DBO; a partir de esta medición se comprueba la eficiencia de un proceso de tratamiento expresada en términos de porcentaje de disminución desde el dato de DBO inicial⁶³.

Con relación a los materiales de desecho que contienen las aguas residuales, la microflora presente no es la misma para toda clase de aguas; en muchos casos puede encontrarse una microflora característica. En la tabla 2. se presentan algunos microorganismos característicos en este tipo de aguas, que se encargan de degradar diferentes compuestos.

⁶¹ Ibid., p. 928-929.

⁶² SALAZAR, Op. cit., p. 40-42.

⁶³ METCALF & EDDY. Op. cit., p. 80-93.

Tabla 2. Microorganismos presentes en aguas residuales.

GRUPOS	MICROORGANISMO
Bacterias de la putrefacción	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Aerobacter cloacae</i> , <i>Zoogloea ramigera</i>
Bacterias desulfurantes	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
Bacterias que oxidan Azufre	<i>Thiobacillus</i> , <i>Thiothrix</i> y <i>Beggiatoa</i>
Bacterias desnitrificantes	<i>Thiobacillus denitrificans</i> , <i>Micrococcus denitrificans</i>
Bacterias metanogénicas	<i>Methanomonas (Pseudomonas) methanica</i> , <i>Metanosphaera</i> , <i>Stadtmanae</i> , <i>Metanopinillum</i> , <i>Metanogenium</i> , <i>Metanosarcina</i> , <i>Metanosaeta</i> y <i>Metanococcus</i>
Bacterias vaginadas de aguas con abundante materia orgánica	<i>Sphaerotilus natans</i>
Bacterias que degradan hidrocarburos	<i>Pseudomonas</i> y <i>Nocardia</i>
Bacterias que degradan desechos agrícolas	<i>Myxococcus</i> , <i>Cytobacter</i> y <i>Plyangium</i>
Bacterias que degradan residuos de fenoles, cresoles, cianuros, formaldehído.	<i>Nocardia rubra</i>
Hongos (presentes en condiciones bajas de pH, deficiencia de N, presencia de productos tóxicos)	<i>Penicillium</i> y <i>Cephalosporium</i>
Protozoos (contribuyen a la reducción del la DBO)	ciliados, flagelados y rizópodos
Rotíferos	

Fuente: Microbiología de las aguas. Rheinheimer, 1987.

3.3.1.1 Descomposición aerobia y anaerobia. Romero⁶⁴ y Orozco⁶⁵ afirman que en el proceso aeróbico, el oxígeno es el único aceptor de electrones, en el cual el oxígeno es reducido y el carbono oxidado. En esta fase, los microorganismos transforman los compuestos orgánicos complejos a carbonatos NO₂, NH₄, PO₄, y SO₄. En el tratamiento aeróbico de las aguas residuales se incrementa

⁶⁴ ROMERO, Jairo. Tratamiento de aguas residuales: teoría y principio de diseño, citado por Tibanta *et al.*, Op. cit., p. 33.

⁶⁵ OROZCO *et al.*, Tratamiento biológico de aguas residuales, citado por Tibanta *et al.*, Op. cit., p. 33.

fuertemente el aporte de oxígeno, debido al riego de superficies sólidas, por agitación y por aireación sumergida, lo que conlleva entonces a que el crecimiento de los microorganismos como su actividad degradativa, se incrementen proporcionalmente a la tasa de aireación⁶⁶.

Aunque estos procesos se llevan a cabo en menos tiempo, su costo energético es más elevado que el de los procesos anaeróbicos por el requerimiento de una fuente de oxígeno para su funcionamiento por medio de una aireación u oxigenación forzada. Sin embargo, la ventaja frente a la degradación de materia orgánica, se ve relacionada con la rapidez con la que se lleva a cabo este proceso, con menores tiempos de retención y menores volúmenes de instalaciones; de igual manera los productos finalmente obtenidos no son tóxicos ni mal olientes, por tanto la instalación puede encontrarse al aire libre⁶⁷.

Entre los microorganismos que intervienen en estos procesos, se han encontrado bacterias y hongos que representan los géneros con metabolismos aerobios-oxidativos como *Zooglea*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Athrobacter*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*; bacterias anaerobias facultativas como *Aeromonas*, *enterobacterias*, *Streptococcus* y distintas especies de *Bacillus*. En menor cantidad se encuentran rotíferos y hongos del género *Sepedonium*, *Subbaromyces*, *Ascoidea*, *Fusarium*, *Geotrichium*⁶⁸.

Durante las transformaciones oxidativas de la materia orgánica las bacterias al igual que otros microorganismos aeróbicos y facultativos encuentran ambientes favorables para llevar a cabo actividades particulares en cada especie, catalizadas por enzimas que actúan específicamente sobre el sustrato convirtiéndolo en formas estables como en otros materiales orgánicos que pueden ser resultado indirecto de los procesos de degradación. Entre las condiciones deseables para desarrollarse los procesos, la humedad óptima es de 40 a 60% en el ambiente y la materia digerible debe tener relación de C/N entre 30 Y 50, para maximizar la acción aeróbica⁶⁹.

⁶⁶ JAGNOW *et al.*, Biotecnología: introducción con experimentos modelo. España : Acribia, S.A. 1991, p. 118.

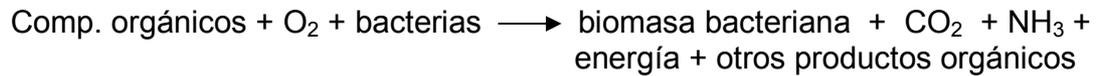
⁶⁷ SALAZAR, Op. cit., p. 42-43.

⁶⁸ GLAZER *et al.*, Microbial Biothecnology. En: Fundamentals of applied Microbiology. 1995. JAGNOW *et al.*, Op. cit., p. 190.

⁶⁹ LAGREGA *et al.*, Gestión de residuos tóxicos: Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. España : Mc Graw Hill. v.2, 1996, p. 643-645.

La acción degradativa de los microorganismos aerobios puede manifestarse entonces de la siguiente manera:

Figura 1. Degradación de compuestos orgánicos en condiciones aerobias.

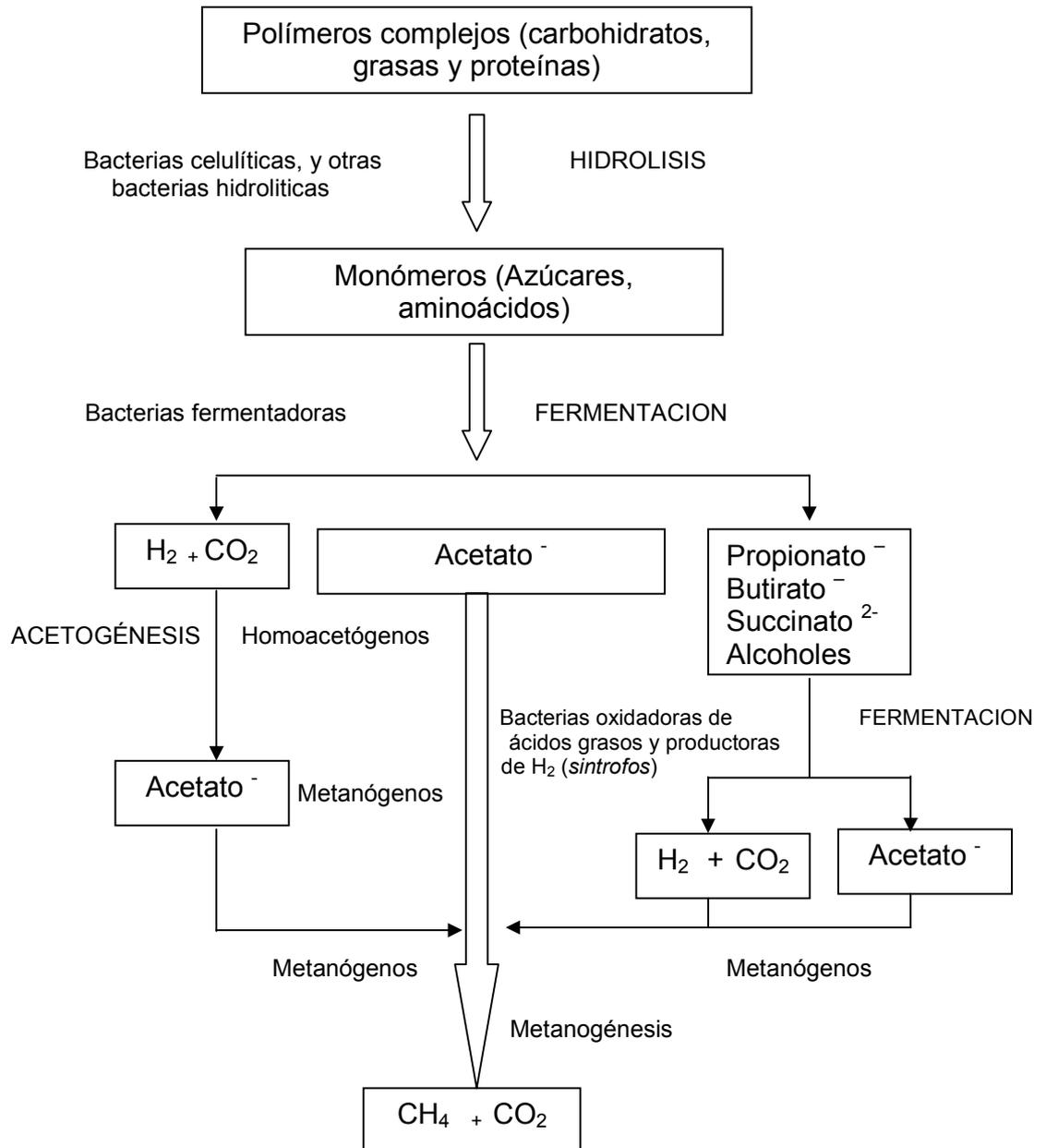


Fuente: Ingeniería Sanitaria: Tratamiento, Evacuación y Reutilización de Aguas Residuales. Metcalf & Eddy, 1985.

Por otra parte, la degradación anaeróbica generalmente empleada en el tratamiento de aguas con un gran contenido en materias orgánicas y por tal razón con una DBO muy alta, requiere la cooperación de muchos tipos diferentes de microorganismos anóxicos residentes, a partir de los cuales, se desencadenan una serie de reacciones digestivas y fermentativas⁷⁰. Los procesos desarrollados mediante ruta anaerobia, se explican en la figura 2. mostrada a continuación:

⁷⁰ MADIGAN *et al.*, Op. cit., p. 930.

Figura 2. Degradación de compuestos orgánicos en condiciones anaeróbicas.



Fuente: Biología de los microorganismos. Madigan, *et al.*, 2004.

Durante la hidrólisis intervienen enzimas extracelulares como polisacaridasas, lipasas y proteasas. Los procesos de hidrólisis como de fermentación corresponden a la primera fase de este tipo de metabolismo; entre los microorganismos que se han aislado de digestores anaeróbicos encontrados en tratamientos de aguas residuales se encuentran bacterias como: *Clostridium spp.*, *Peptococcus anaerobus*, *Bifidobacterium spp.*, *Desulphovibrio spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Staphylococcus* y *E. Coli*⁷¹.

Para la segunda parte del proceso intervienen bacterias homoacetógenas como metanogénicas, entre estas últimas aisladas de muchos ambientes anaeróbicos se encuentran *Methanobacterium*, *Methanobacillus*, *Methanosarcina*, *Metanosphaera*, *Stadtmanae*, *Metanopinillum*, *Metanogenium*, *Metanosaeta* y *Metanococcus*⁷².

A diferencia de los procesos aeróbicos, la degradación anaeróbica no requiere abastecimiento de oxígeno, por lo tanto presenta un costo energético menor; sin embargo los procesos anóxicos necesitan de instalaciones cerradas con mayores volúmenes debido a la producción de gas metano (CH₄), amoníaco (H₂SO₃) y (H₂S), además requiere de mayores tiempos de suspensión. Una de las ventajas más importantes frente al gas metano es que su producción elevada permite que sea utilizado como combustible para calentar y abastecer de energía la planta de tratamiento⁷³.

3.3.1.2 Tratamiento biológico de compuestos OCs. Al igual que muchos tipos de aguas residuales industriales originadas por compuestos orgánicos, los líquidos lixiviados que contienen hidrocarburos clorados, reciben tratamientos químicos y biológicos (microbiológicos) que permiten eliminar o neutralizar los contaminantes⁷⁴.

Cuando los tratamientos de líquidos lixiviados con presencia de este tipo de compuestos se realizan mediante procesos biológicos, la estructura de los OCs presentes juega un papel importante para dichos procedimientos. En el caso de presentarse plaguicidas OCs, muchas sustancias que hacen parte de su estructura como los compuestos clorados, anillos aromáticos y moléculas con fósforo y nitrógeno, pueden servir como fuentes de carbono y donadores de electrones para algunos microorganismos mientras que otras no. Si estas sustancias son tomadas por los microorganismos presentes, puede darse paso a la degradación evitando así la acumulación tóxica del compuesto⁷⁵.

⁷¹ LAGREGA, Op cit, p. 670-672.

⁷² Ibid., p. 670-672

⁷³ SALAZAR, Op. cit., p. 41-44.

⁷⁴ ATLAS *et al.*, Op cit, p. 530-531.

⁷⁵ MADIGAN *et al.*, Op. cit., p. 668-669.

En algunos casos se ha visto que no siempre la desaparición de un plaguicida del ecosistema significa necesariamente que haya sido degradado por microorganismos, ya que su pérdida puede deberse también a volatilización o ruptura química espontánea. La biodisponibilidad será también un factor que puede controlar el ataque microbiano de los compuestos xenobióticos. Muchos de estos son bastante hidrófobos y, por tanto, no muy solubles en agua, otros pueden adherirse a la materia orgánica y a la arcilla de suelos y sedimentos, impidiendo que los microorganismos accedan a ellos. Por esta razón la adición de tensioactivos o emulsionantes suele aumentar la biodisponibilidad, y por ende, la biodegradación de compuestos xenobióticos⁷⁶.

Sin embargo es claro que la biodegradación de estos compuestos ejercida por diversidad de microorganismos, contribuye de manera decisiva a la autodepuración natural de las aguas. Muchos microorganismos que hacen parte de la microflora nativa de las aguas residuales, presentan capacidad degradativa para metabolizar plaguicidas y herbicidas OCs, entre estos se encuentran diversidad de géneros de bacterias como de hongos, en menor cantidad actinomicetes, y ciertos tipos de levaduras y mohos, que utilizan estos compuestos como una fuente de carbono para su crecimiento. La clase de microorganismos encontrados como los procesos que se llevan a cabo varían de acuerdo a los hidrocarburos presentes; en el caso de hidrocarburos alifáticos saturados se requiere de un proceso de degradación aeróbico, mientras que la degradación de hidrocarburos alifáticos insaturados puede efectuarse en forma aeróbica y anaeróbica, al igual que los aromáticos en los que se incluyen los hidrocarburos clorados (OCs)⁷⁷.

En la degradación de hidrocarburos xenobióticos como detergentes, solventes y plaguicidas se han encontrado microorganismos capaces de actuar sobre esta clase de compuestos, al igual que sobre otros productos de naturaleza tóxica fabricados por el hombre. Algunos de los géneros más representativos encontrados en la degradación de hidrocarburos se registran en la tabla 3. mostrada a continuación.

⁷⁶ Ibid., p. 668

⁷⁷ RHEINHEIMER, Op.cit., p. 230-240.

Tabla 3. Microorganismos que degradan hidrocarburos.

MICROORGANISMOS	COMPUESTOS QUE DEGRADAN
<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Alcaligenes spp.</i> , <i>Arthrobacter spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Mycobacterium</i> <i>spp.</i> , <i>Candida spp.</i> , y <i>Cunninghamella</i> <i>elegans</i>	hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, e hidrocarburos halogenados.

Fuente: Biotecnología Básica: Bu'lock, *et al.*, 1991.

En algunos casos, los hidrocarburos pueden ser utilizados a la vez como fuente de carbono y energía y son oxidados completamente a CO₂. Sin embargo, otros compuestos son mucho más recalcitrantes y solo son atacados ligeramente, o no lo son en absoluto, aunque con frecuencia pueden ser degradados parcial o totalmente si en el ambiente hay algún otro tipo de materia orgánica que sirva como fuente de energía primaria; en ocasiones tomada, de otro tipo de hidrocarburos que estén presentes. Este fenómeno conocido como cooxidación o cometabolismo es muy conocido en los cicloalcanos e hidrocarburos clorados⁷⁸.

En el caso del OCs Endosulfan, uno de los plaguicidas mencionados anteriormente de restricción comercial se le han encontrado asociados a sus procesos de degradación microorganismos que trabajan en consorcios, entre los que cabe mencionar bacterias del género *Klebsiella spp.*, *Mycobacterium ssp.*, y hongos como *Fusarium ventricosum*⁷⁹. A partir de los procesos de biodegradación realizado en su mayoría en asociaciones, se facilita en gran medida la ruptura de los enlaces carbono-halógeno que hace parte de la estructura del Endosulfan; estructura que requiere de gran cantidad de energía para la disolución de sus enlaces, la cual generalmente es aportada gracias al cometabolismo microbiano⁸⁰.

3.4 TECNOLOGIAS DE BIORREMEDIACION.

En los últimos años el interés por la degradación de compuestos contaminantes, se ha encaminado hacia el desarrollo de nuevas tecnologías que emplean microorganismos aeróbicos y anaeróbicos, debidamente utilizados y controlados mediante los cuales se logra la destrucción de contaminantes químicos. Estas tecnologías basadas en la actividad biodegradativa de los microorganismos y

⁷⁸ ATLAS *et al.*, Op.cit., p. 530-533.

⁷⁹ KWON *et al.*, Op.cit., 2005. SIDDIQUE *et al.*, Op.cit.,

⁸⁰ ATLAS *et al.*, Op.cit., p. 512.

enfocadas en mejorar los procesos de biodegradación natural se conocen como tecnologías en biorremediación⁸¹.

Según la afirmación de Tchobanoglous⁸², la eficiencia demostrada por los microorganismos en los procesos de biodegradación, garantiza que las transformaciones microbianas provocan la ruptura aún de compuestos complejos, señalando que las bacterias son los microorganismos más importantes en la degradación de compuestos orgánicos. Sin embargo es necesario que en todo proceso de biorremediación se determine si los contaminantes, son susceptibles al ataque microbiano y que las condiciones ambientales permitan el crecimiento *in situ* de los microorganismos que llevan a cabo la biorremediación o extracción del contaminante, de manera que pueda biodegradarse primeramente *ex situ* en biorreactores, en los que podrían optimizarse las condiciones de degradación y así lograr óptimos resultados⁸³.

A partir de dichas técnicas, los contaminantes químicos que generalmente se encuentran en el suelo, aguas subterráneas, aguas residuales, lodos, sistemas de residuos industriales y gases, logran descomponerse en sustancias que no sean tóxicas o al menos no tan perjudiciales para el hombre como para el medio ambiente. En el caso de lograr una optimización de las condiciones de biodegradación, la efectividad de la degradación podría ser mucho mayor; lo cual depende del conocimiento de múltiples factores, como el tipo y concentración de contaminante, concentración de microorganismos, concentración de nutrientes, aireación, condiciones macroambientales, presencia de inhibidores, biodisponibilidad del contaminante, características agronómicas, topográficas y microbianas del suelo receptor, entre otros⁸⁴.

Los microorganismos que intervienen en este tipo de procesos entre los que se encuentran diversidad de especies bacterianas, como de hongos y de levaduras, cuentan con la capacidad catabólica para digerir sustancias contaminantes; una vez degradadas la población de microorganismos se reduce porque ha agotado su fuente de alimentos, muchas de ellas mueren otras se mantienen, pero en ningún caso presentarán riesgos de contaminación⁸⁵.

Dependiendo de la variación ocasionada en la estructura molecular de los compuestos orgánicos y el grado de alteración, se determina si los microorganismos interactuantes han originado un proceso de biotransformación conocido como la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar, o un proceso de mineralización referente a la descomposición total de las moléculas orgánicas en dióxido de carbono, agua, residuos inorgánicos inertes y en otras

⁸¹ TECNOLOGIAS EN BIORREMIACION, Op.cit., p. 193-194.

⁸² TCHOBANOGLIOUS et al., Op cit, p. 755.

⁸³ ATLAS *et al.*, Op. cit., p. 553.

⁸⁴ Ibid., p. 193-195.

⁸⁵ ATLAS *et al.*, Op.cit., p. 553-560.

que se incorporan a la estructura de los microorganismos. Cuando el resultado es un proceso de biotransformación se puede decir que ocurrió una degradación parcial; en el caso de manifestarse una descomposición completa lo que habrá ocurrido es un proceso de mineralización⁸⁶.

Durante todo proceso de biorremediación, sea de mineralización como de biotransformación, es necesario considerar ciertos parámetros identificados como principios básicos, a partir de los cuales se llevará a cabo el desarrollo del tratamiento. Uno de ellos y el más importante está relacionado con la necesidad de establecer, mantener y controlar las poblaciones microbianas, para lo cual existe una serie de caracteres microbiológicos, agrupados en las siguientes categorías:

- Fuentes de energía y sustrato.
- Procesos enzimáticos.
- Biodegradabilidad del sustrato.
- Inhibición y toxicidad.
- Población microbiana⁸⁷.

Además de los mencionados anteriormente, existen ciertos parámetros técnicos que al ser controlados en conjunto deben satisfacer el fin de todo tratamiento biológico relacionado con promover y mantener una población microbiana (biomasa) que metabolice un determinado residuo. Dichos parámetros técnicos influyen en la velocidad a la que tiene lugar el metabolismo y, por lo tanto, en la biodegradación. Mediante la aplicación de ellos, es posible identificar, establecer y controlar las condiciones favorables que aseguren el crecimiento y el desarrollo de la biomasa, de esta manera, la biodegradación se puede dar a una velocidad lo suficientemente dinámica para que el coste del tratamiento sea competitivo con las alternativas físico-químicas que puede darse en un tratamiento. Los parámetros técnicos que pueden afectar al tratamiento biológico están relacionados con:

- El aceptor electrónico
- Humedad
- Temperatura
- PH
- Sólidos disueltos totales
- Disponibilidad de nutrientes
- Fuentes alternativas de carbono⁸⁸.

⁸⁶ LAGREGA *et al.*, Op. cit., p. 643.

⁸⁷ *Ibid.*, p. 643.

⁸⁸ *Ibid.*, p. 651-652.

Teniendo en cuenta la medida en que se de la biorremediación, es posible considerarla como una tecnología aplicable para eliminar un contaminante específico, con la que sea probable demostrar que una sustancia o una mezcla química que la contenga, es biodegradable y que el proceso de biorremediación no tendrá efectos colaterales adversos sobre el ecosistema. Cuando se administra como es debido, esta biotecnología puede reducir el riesgo de impactos adversos de compuestos tóxicos y peligrosos en el medio ambiente⁸⁹.

3.4.1 Biorremediación de compuestos tóxicos. La aplicación de las tecnologías de biorremediación, han sido benéficas para corregir situaciones y proteger el ambiente de diversidad de compuestos xenobióticos. Cuando se ha trabajado con esta clase de residuos tóxicos se han encontrado limitaciones comunes, como la excesiva concentración del residuo, la falta de oxígeno, el pH desfavorable, la falta de nutrientes, minerales, la falta de humedad y las temperaturas desfavorables. Sin embargo una vez corregidas las limitaciones la distribución ubicua de los microorganismos permite en la mayoría de los casos un enriquecimiento espontáneo de los agentes microbianos apropiados⁹⁰.

Respecto a la biodegradación de hidrocarburos tóxicos, se han encontrado microorganismos que mediante una serie de catalizadores biológicos atacan las moléculas de estos compuestos transformándolas en formas más fácilmente asimilables. Se estima que los microorganismos empleados para la eliminación del tóxico son los mismos que se encuentran en el medio, para ello se ha concebido en principio el aislamiento de microorganismos cometabolizantes que estimulan la biodegradación de los residuos químicos recalcitrantes; aunque en una segunda instancia la manipulación genética de los mismos puede fortalecer considerablemente su capacidad⁹¹.

En algunos casos, cuando la población nativa no presenta la capacidad de degradar un amplio rango de sustancias orgánicas presentes en una mezcla compleja de residuos contaminantes, es necesaria la inoculación de microorganismos aislados de un ambiente natural, a partir de los cuales se puede incrementar o extender la biodegradación de contaminantes, resultando un método eficiente para la biorremediación *in situ*. El criterio para efectuar una mezcla eficiente de organismos incluye: la habilidad para degradar la mayoría de los compuestos tóxicos, estabilidad genética, rápido crecimiento, alto grado de producción de enzimas, capacidad para competir con otros microorganismos, no producir sustancias metabólicas tóxicas, entre otros⁹².

⁸⁹ ATLAS *et al.*, Op.cit., p. 559.

⁹⁰ Ibid., p. 562- 567.

⁹¹ LEVIN *et al.*, Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos: selección, estimación, modificación de microorganismos y aplicaciones. España: Mc Graw Hill. 1997, p. 3-10.

⁹² TECNOLOGIAS EN BIORREMEDIACION, Op.cit., p. 193-194.

En muchos casos, la presencia de un compuesto OCs xenobiótico no puede sustentar el crecimiento de un microorganismo, por lo que ha sido posible que se realice un cultivo de enriquecimiento a partir de un análogo estructural poco o nada clorado. Si el organismo tiene un espectro enzimático amplio, es posible que cometabolice el compuesto xenobiótico aun cuando no pueda alimentarse de él, esto conlleva a que los residuos en los que se encuentran contaminantes OCs recalcitrantes puedan depurarse aportando un análogo estructural biodegradable⁹³.

En la tabla 4. se registran algunos compuestos contaminantes que han sido potencialmente aptos para la biorremediación a partir de procesos aeróbicos como anaeróbicos.

Tabla 4. Compuestos aptos para la biorremediación.

CLASE	PROCESO AEROBIO	PROCESO ANAEROBIO
Compuestos aromáticos monoclorados	+	+
Hidrocarburos monoaromáticos	+	+
Fenólicos y cresoles no halogenados	+	+
Hidrocarburos aromáticos polinucleares	+	-
Alcanos y alquenos	+	-
Bifenilos policlorados	+	-
Clorofenoles	+	+
Heterocíclicos nitrogenados	+	+
Alcanos clorados	+	+
Alquenos clorados	+	+

Fuente: Ecología microbiana y Microbiología Ambiental. Atlas *et al.*, 2002.

3.4.1.2 Biorremediación del plaguicida Endosulfan. Diversidad de bacterias y hongos han sido reportados en los procesos de degradación del plaguicida Endosulfan, un hidrocarburo OCs que por sus propiedades particulares ha sido considerado uno de los contaminantes tóxicos de alta persistencia en el medio natural⁹⁴.

⁹³ ATLAS *et al.*, Op cit., p. 563

⁹⁴ SUTHERLAND *et al.*, Op cit., 2000.

En investigaciones publicadas en años recientes se reporta que un gran número de microorganismos presentes en la biota natural del suelo y el agua utilizan este compuesto contaminante como fuente de carbono. A pesar del alto coste energético empleado para el rompimiento de los enlaces que hacen parte de la estructura del Endosulfan, se reporta que mediante la capacidad metabólica de los organismos, el compuesto en mención es transformado hacia otros productos presentándose un proceso de degradación⁹⁵.

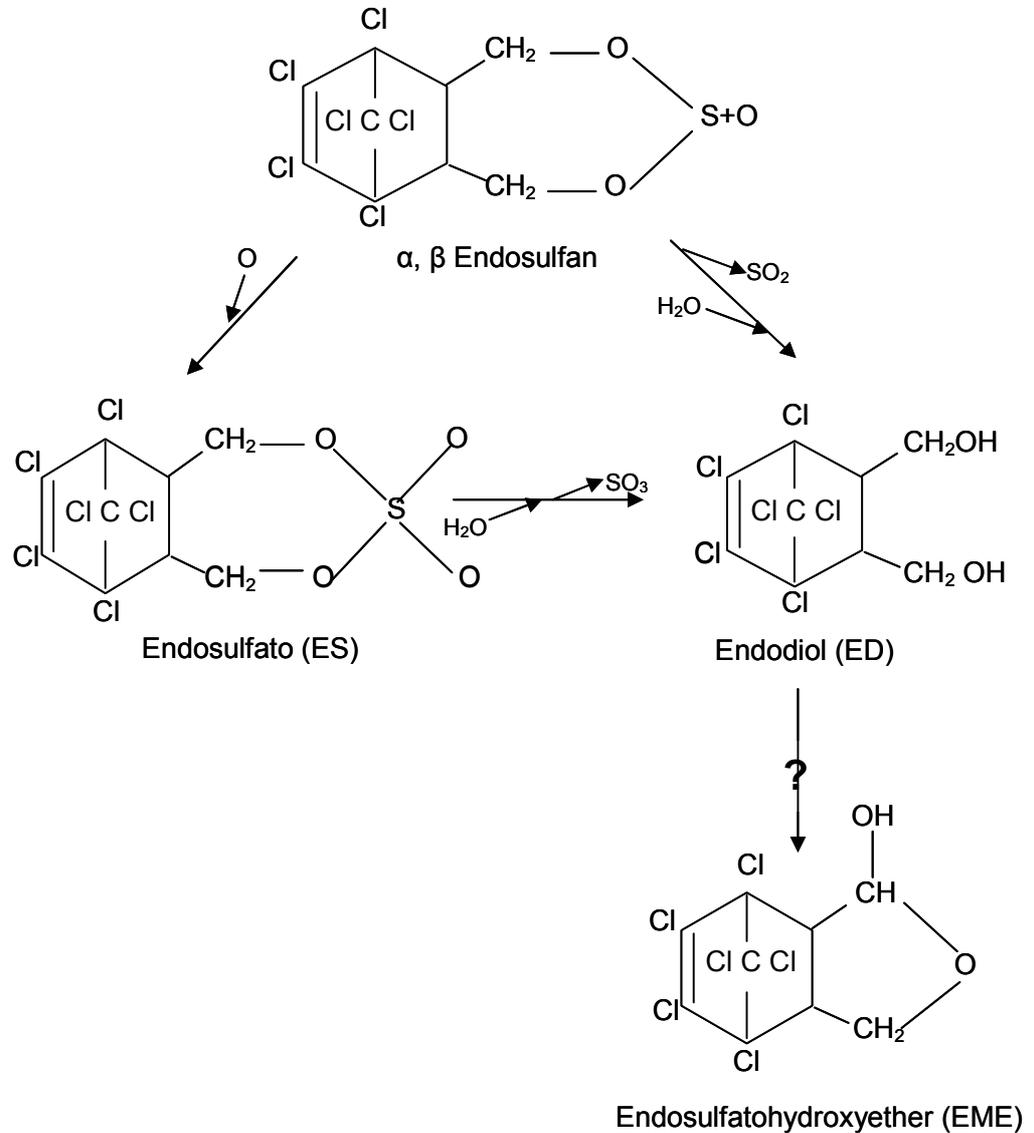
Entre los organismos que llevan a cabo el proceso de degradación del Endosulfan cabe señalar entre los hongos más predominantes, representantes de los géneros ***Aspergillus, Fusarium, Mucor y Penicillium***⁹⁶. En cuanto a bacterias se registran entre los géneros más comunes a: ***Bacillus, Klebsiella, Mycobacterium, Corynebacterium y Pseudomonas***; estas bacterias, con alto potencial para la transformación del Endosulfan, se clasifican en dos grupos de acuerdo a la ruta catabólica que toman para la degradación del tóxico. Un grupo comprende aquellas bacterias que pueden formar Endodiol, un segundo grupo está conformado por bacterias que producen Endosulfato (sulfato de Endosulfan) como producto final⁹⁷. En la figura 3. se pueden apreciar las rutas propuestas para la degradación de Endosulfan.

⁹⁵ MARTENS, Rainer. Degradation of [8,9-¹⁴C] Endosulfan by Soil Microorganisms. En: Applied and Environmental Microbiology. 31(6) (Jun 1976); p. 853-858.

⁹⁶ SIDDIQUE *et al.*, Op cit., 2003

⁹⁷ MARTENS *et al.*, Op cit, p. 853-858.

Figura 3. Rutas catabólicas propuestas para la transformación de la molécula de Endosulfan a partir de microorganismos.



Fuente: Degradation of [8,9- ^{14}C] Endosulfan by Soil Microorganisms. Martens R. 1976.

Muchos de los estudios relacionados con la degradación de Endosulfan, resaltan la importancia de los procesos llevados a cabo por bacterias del género *Klebsiella* del que sobresalen las especies *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*.

Respecto a *K. pneumoniae* investigaciones han demostrado la capacidad de dicha especie para metabolizar Endosulfan; según Kwon⁹⁸ *et al.*, la especie *K. pneumoniae* (nombrada por el autor como cepa KE-1 e identificada mediante análisis fisiológicos y genéticos como 16S rDNA), fue aislada de muestras de suelos utilizando un medio de cultivo con Endosulfan como única fuente de carbono y energía; los resultados obtenidos demostraron la actividad degradativa de la cepa. Kwon⁹⁹ *et al.*, también comprobó que *K. pneumoniae* cepa KE-1 transformaba Endosulfan por vía no oxidativa por lo tanto no formaba sulfato de Endosulfan (Endosulfato) el principal producto metabólico del Endosulfan.

En relación a *K. oxytoca*, Kwon¹⁰⁰ *et al.*, logró demostrar que *K. oxytoca* (KE-8, 16S rDNA) aislada en medio de cultivo sal mineral suplementado con Endosulfan o sulfato de Endosulfan como únicas fuentes de carbono y energía, presentaba un rápido incremento de biomasa en cuatro días y degradación constante de los productos metabólicos α - y $-\beta$ Endosulfan como sulfato de Endosulfan.

Como en las anteriores investigaciones, un sin número de trabajos en los que se han aislado *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* se concluye que ambas especies son consideradas importantes biocatalizadores para la biorremediación de Endosulfan¹⁰¹.

3.5 COMPUESTOS TOXICOS PRESENTES EN LOS LIXIVIADOS DEL RELLENO SANITARIO ANTANAS DE SAN JUAN DE PASTO.

El Relleno Sanitario Antanas (RSA) de la ciudad de Pasto, presenta un sistema convencional de tratamiento de los líquidos lixiviados que consiste en una planta de tratamiento ubicada en las instalaciones del vertedero con una gran flexibilidad de funcionamiento. El tratamiento incluye procesos físicos, químicos y microbiológicos que permiten la reducción de las altas cargas contaminantes presente en los lixiviados producidos hasta los valores exigidos por la legislación¹⁰².

⁹⁸ KWON *et al.*, Op. cit., 2002.

⁹⁹ Ibid.,

¹⁰⁰ KWON *et al.*, Op. cit., 2005.

¹⁰¹ Ibid.,

¹⁰² BASTIDAS *et al.*, Op cit., p. 29.

Las unidades de funcionamiento del Relleno sanitario Antanas se encuentran dispuestas de la siguiente manera:

- Dos vasos de recogida de los RSU. Cada vaso contiene residuos provenientes del Municipio; uno de ellos se encuentra sellado y genera lixiviado viejo, el otro vaso tiene una vida útil de 7 años y genera líquidos residuales de las basuras resientes. Independientemente, presentan filtros y chimeneas que permiten expirar diversos gases; constantemente se hacen monitoreos con los que se examina la normatividad de los gases, evitando que se encuentren fuera de las normas de sanidad.
- Dos pozos a los que llegan los lixiviados. Cada pozo se encuentra proyectado para recibir 1lt/sg. En caso de que el caudal aumente, el exceso llega a una piscina de emergencia en donde se retiene hasta que el caudal baje para luego reanudarse a los pozos y dirigirse a las lagunas en donde inicia el tratamiento biológico para luego continuar con el tratamiento físico-químico.
- Planta de tratamiento físico-químico. A continuación se describe la funcionalidad de las unidades correspondientes a la planta del líquido lixiviado:
 - Tratamiento Aeróbico (laguna aireada). Antes de ingresar a la laguna aireada, los líquidos pasan por un tanque de nutrición, el cual presenta una capacidad de 2000ml. El tanque contiene abono con alto contenido de calcio, DAP (fósforo) y urea, en donde el líquido tiene un tiempo de retención de un día y un caudal de 0.003lt/sg. El tanque se ha dispuesto con el fin de acelerar el crecimiento como el metabolismo de los microorganismos aerobios.

En seguida, el lixiviado se dirige a la laguna en donde se retienen por un tiempo aproximado de 7 días; en esta laguna se encuentran bacterias que permiten una remoción entre el 55 y 60% de los contaminantes, presentes en los componentes líquidos. En este lugar la demanda biológica de oxígeno (DBO) es del 80%.

Dentro de la laguna se encuentra un aireador de tipo hélice aspirador específico para aguas residuales que distribuye aire constantemente permitiendo el funcionamiento del sistema.

- Tratamiento Anaeróbico (Laguna anaeróbica). El líquido que sale de la laguna aireada se dirige directamente por gravedad hacia la laguna anaeróbica que hasta alcanza un volumen de 25000m³. En esta laguna se desarrolla un sistema de tratamiento biológico donde la digestión del material orgánico es realizado por la acción metabólica de bacterias anaerobias y la estabilización se realiza en dos etapas inicialmente un grupo de bacterias descomponen las moléculas orgánicas a ácidos orgánicos, dióxido de carbono, sulfuros, amoniaco y materia celular en condiciones ambientales favorables, relativas a alcalinidad, pH y

concentración de ácidos orgánicos, un segundo grupo de bacterias utilizan los ácidos orgánicos para producir metano, dióxido de carbono y materia celular. La licuefacción de la materia orgánica es simultánea a las etapas del proceso.

- Tratamiento físico-químico. Aproximadamente 1lt/sg del lixiviado ingresa a la planta de tratamiento físico-químico en donde se llevan a cabo cuatro etapas: corrección de pH, dosificación de coagulante, coagulación y/o floculación y sedimentación. Mediante este procedimiento, el lixiviado mejora sus características fisicoquímicas para finalizar su tratamiento en los filtros anaeróbicos.
- Filtro anaeróbico: El lixiviado ya tratado pasa por filtros anaeróbicos, con el fin de retener la biomasa anaerobia activa mediante dos mecanismos: adherencia de los microorganismos a un soporte sólido formando una película biológica y atrapamiento de flóculos bacterianos.
- Desinfección: Mediante motobombas el líquido lixiviado llega a un tanque en donde se hace el proceso de cloración. Para la desinfección del líquido, se agregan 3 kilos de cloro al día. El líquido ya desinfectado es conducido al suelo por medio de tubos con aspersores que permiten la infiltración¹⁰³.

Los líquidos lixiviados que se generan son analizados desde la entrada hacia la planta de tratamiento hasta que este finaliza con el proceso de cloración antes de vertirse al medio; de esta manera se realiza un control adecuado de los líquidos durante todo el proceso⁹⁷. Los parámetros evaluados como las diferentes zonas en las que se toman muestras para llevar el control se registran en la tabla 5.

¹⁰³ CORPONARIÑO, Op cit., v.2.

Tabla 5. Composición de líquidos lixiviados presentes en el RSA (2004)

PARAMETRO	M1*	M2	M3	M4	M5	M6
Turbiedad UNT	685	117	512	803	204	207
Sólidos totales mg/L	9982	12110	10219	10827	10489	9611
Sólidos suspendidos mg/L	117	124	137	344	219	103
Hierro mg/L	2,89					3,6
Cobre mg/L	1,81					1,76
Cromo mg/L	3,87					1,06
Manganeso mg/L	224					60
Zinc mg/L	76					26
DBO5	8120	6812	6020	4030	3600	2027
DQO	10971	8360	6958	5432	4601	3413
Grasas y aceites mg/L	92,8	46,8	40,2	38,4	14,2	5,4
UFC Coliformes totales/100 mL	96000	112000	188000	112000	112	7
UFC Coliformes fecales/100 mL	48800	558000	72000	18000	36	< 3

Fuente: Laboratorios Especializados Universidad de Nariño. Sección de aguas.

* Identificación de las muestras

M1: Afluente planta de tratamiento

M2: Efluente piscina aerobia

M3: Efluente piscina anaerobia

M4: Efluente floculación

M5: Efluente sedimentación

M6: Efluente cloración

3.5.1 Presencia de residuos OCs en los lixiviados del RSA. Mediante el uso de métodos que permiten la extracción de analitos de interés a partir de mezclas de sustancias presentes en muestras de lixiviados, ha sido posible la identificación de residuos de OCs tóxicos, de los que hacen parte diversidad de plaguicidas. Una de las técnicas mas empleadas en la extracción líquido-líquido de plaguicidas de las muestras de lixiviado, hace referencia a la extracción en fase sólida (EFS). Esta alternativa aplicada por Bastidas¹⁰⁴ *et al.*, en la identificación y cuantificación de plaguicidas OCs en el RSA, esta basada en la extracción de los analitos de

¹⁰⁴ BASTIDAS *et al.*, Op. cit., p. 62-64.

interés de una muestra acuosa sobre solventes que permiten la recuperación y concentración de la muestra¹⁰⁵.

Los analitos que se obtienen hacen parte de una mezcla compleja, que a partir de métodos microanalíticos avanzados permite la separación de los componentes químicos presentes muy relacionados entre sí, permitiendo la identificación cualitativa y determinación cuantitativa de cada uno. Entre las técnicas empleadas en los procesos de separación de componentes se encuentra la cromatografía de gases (CG) un procedimiento conveniente en el análisis de pesticidas de naturaleza no iónica como los pertenecientes al grupo de OCs; el cual se basa en el uso de un detector de captura de electrones y columnas específicas, que a partir de una señal eléctrica determinan la presencia de cierto compuesto identificado por la comparación de sustancias mostradas mediante un patrón externo¹⁰⁶.

La presencia de los plaguicidas presentes en el RSA identificados y analizados mediante las técnicas mencionadas, a partir de muestras de lixiviado tomadas en diferentes puntos de la planta de tratamiento, se registran en el cuadro 3.

¹⁰⁵ ARJAN Y LOUWER, H. On-Line Solid phase Extraction Thermal Desorption – Gas Chromatography with Ion Trap Detection Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Microcontaminants in Water, citado por BASTIDAS *et al.*, Op. cit., p. 49.

¹⁰⁶ PARRA *et al.*, Determinación de plaguicidas organoclorados en agua por cromatografía de gases. En: SIMPOSIO INTERNACIONAL Y NACIONAL: EFECTOS DE LOS PLAGUICIDAS SOBRE EL AMBIENTE Y LA SALUD HUMANA. (2º y 3º : 1994: Palmira) Memorias del II Simposio Internacional y III Nacional: Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud humana. Palmira, 1994, p. 74-80.

Cuadro 3. Presencia de plaguicidas en los lixiviados del RSA.

COMPUESTO
α HCH
δ HCH
γ HCH
β HCH
Heptacloro
Aldrín
Epoxido de Heptacloro
<i>Endosulfan</i>
4,4-DDE y Dieldrín
Endrín
4,4-DDD
Endrín aldehído
Sulfato de Endosulfan
4,4-DDT

Fuente: Seguimiento de pesticidas organoclorados en el proceso de tratamientos de lixiviados. En: CONGRESO COLOMBIANO DE CROMATOLOGRAFIA. Lozada *et al.*, 2005

4. METODOLOGIA

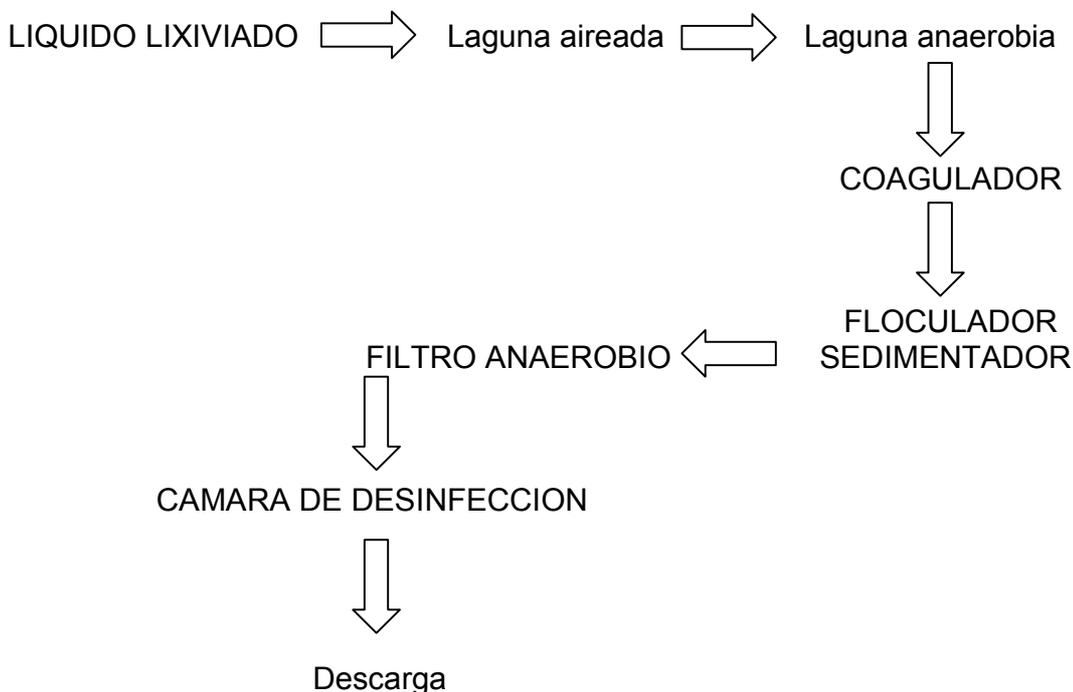
4.1 DESCRIPCION DEL AREA DE ESTUDIO Y MUESTREO.

La fase de campo de esta investigación, se realizó en el Relleno Sanitario Antanas (RSA) (Anexo A) ubicado al Norte de la ciudad de Pasto, en la vereda La Josefina corregimiento de Morasurco, sector conocido como Daza.

De acuerdo a la topografía, el lugar presenta franjas planas y de pie de monte, un terreno limo-arenoso de alta compresibilidad con un pH de 5.4 y una permeabilidad de 0.001cms/s. La zona se caracteriza por presentar una temperatura promedio de 12°C, y una altura de 2750 m.s.n.m; cubre una extensión de 100 Ha de las cuales 4 Ha se encuentran actualmente en disposición de la Empresa Metropolitana de Aseo (EMAS. SA. ESP).

El RSA, cuenta con dos vasos de almacenamiento de los RSU que independientemente presentan filtros y chimeneas permitiendo expirar diversos gases. En los vasos se generan líquidos lixiviados colectados en dos piscinas de homogenización, para luego dirigirse a una piscina aeróbica de 722m³ en donde los líquidos se retienen por siete días, seguido a ello, los lixiviados pasan a una piscina anaeróbica de 2400 m³ de capacidad, en donde se da un tiempo de retención de 18 días. Finalizado el tratamiento biológico, se da inicio al tratamiento físico-químico, que permite mejorar las condiciones del lixiviado mediante tres etapas: coagulación, floculación y sedimentación; ya tratado, el líquido se dirige hasta un filtro anaerobio (240 m³) y termina el proceso en la planta de cloración (Figura 4.)

Figura 4. Etapas del tratamiento del lixiviado realizado en la planta del RSA.



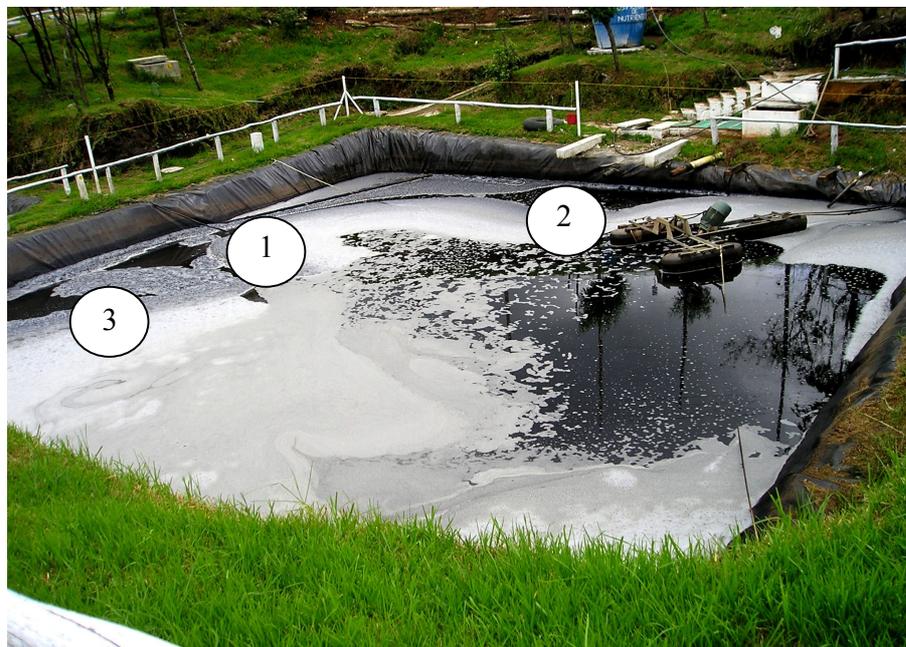
Fuente: Manejo Integral de residuos sólidos : Planta de tratamiento del liquido lixiviado RSA. CORPONARIÑO, 2001.

4.2 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE LOS LIXIVIADOS PRODUCIDOS EN EL RELLENO SANITARIO ANTANAS EN SAN JUAN DE PASTO.

4.2.1 Muestreo. El muestreo se realizó en la piscina aeróbica, la cual se dividió en nueve cuadrantes imaginarios, de los que se tomaron aleatoriamente tres puntos de muestreo (Figura 5). De cada uno de ellos a 50 cm de profundidad se colectaron 1000 mL de lixiviado; las muestras envasadas en frascos estériles de polietileno de 1L de capacidad se sellaron y transportaron en una nevera portátil hacia el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Nariño en donde se realizó la fase de laboratorio.

En el momento de la recolección, la laguna aerobia presentaba espuma en la parte superior, por esta razón para evitar interferencias, las muestras se tomaron a 50 cm de profundidad, altura que presenta niveles detectables de oxígeno.

Figura 5. Piscina aeróbica de la planta de tratamiento de lixiviado del RSA. Ubicación de las zonas de muestreo.



Puntos 1,2 y 3: zonas de muestreo tomadas en esta investigación.

En el momento de la recolección y a la misma profundidad a la que se tomaron las muestras, se midió la concentración de oxígeno disuelto con ayuda de un oxímetro digital, y se registró la temperatura ambiental como la temperatura de la piscina aeróbica (Anexo A).

Los parámetros físico-químicos del lixiviado tales como pH, sólidos suspendidos, sólidos totales, nitrógeno, fósforo, grasas y aceites, DBO₅ y DQO se obtuvieron a partir de las muestras llevadas a laboratorios especializados de la Universidad de Nariño Sección de aguas en donde se aplican los métodos normalizados para el análisis de aguas¹⁰⁷ (Anexo B).

4.2.2 Aislamiento de bacterias y condiciones de cultivo. De cada una de las muestras colectadas en la laguna aeróbica se inocularon 10 mL en 90 mL de caldo de enriquecimiento selectivo (caldo basal). Los caldos de cultivo ya inoculados se incubaron a una temperatura de 28 – 30°C (Incubadora LAB – Line) con agitación constante (120 rpm) durante cinco días (Agitador (K) VRN 360). La temperatura

¹⁰⁷ APHA – AWWA – WPCF. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Madrid : Díaz de Santos. S. A. 1992. Sec 1 – 10:221.

como la agitación de los cultivos se mantuvieron constantes para llevar a cabo todo el trabajo de investigación.

Como punto de partida para realizar el procedimiento descrito anteriormente se tuvo en cuenta el caldo de enriquecimiento selectivo, diseñado por Aguirre¹⁰⁸ *et al.*, (Anexo C), al cual se le realizaron tres modificaciones relacionadas con las fuentes de fósforo, nitrógeno y carbono. Respecto a la fuente de fósforo se reemplazo K_2HPO_4 por KH_2PO_4 , este cambio se realizó al observar precipitación en el medio por parte del K_2HPO_4 , la cantidad adicionada de KH_2PO_4 fue equivalente a la del micronutriente inicial; en relación a la fuente de nitrógeno se adicionó $(NH_4)_2 SO_4$, teniendo en cuenta que el medio base no la presentaba y se cambio la fuente de carbono sustituyendo el plaguicida Carbofuran por el Endosulfan. Por tanto la composición del caldo de cultivo basal (caldo basal) se conformó de la siguiente manera: KH_2PO_4 0.078 g/L (Carlo Erba), $MgSO_4$ 0.075g/L (Carlo Erba), $CaCO_3$ 0.036g/L (Carlo Erba), NaCl 5 g/L (Malinckrodt), $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g/L (Malinckrodt), y como única fuente de carbono Endosulfan (6,7,8,9,10,10-Hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6, 9-methano-2,4,3 benzodioxathiepin-3-oxide)(Thiodan 35 CE Aventis) en una concentración de 0.0202mg/L.

Transcurrido el tiempo de incubación de los caldos de cultivo, de cada una de las muestras se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-6} con agua destilada estéril. De cada dilución se transfirieron 0.1 mL sobre medio de aislamiento sólido (medio basal) el cual contenía la misma composición del caldo basal descrito anteriormente, suplementado con 15 g/L de agar-bacteriológico (OXOID). La siembra se realizó por superficie homogenizando la muestra con una aza de vidrio estéril; seguido a ello los cultivos se llevaron a incubación entre 28 - 30°C durante cinco días.

4.2.3 Descripción de los morfotipos aislados. De cada aislado bacteriano se obtuvieron cultivos puros, para ello cada aislado, se sembró por agotamiento en agar-nutritivo (OXOID). Posteriormente los morfotipos aislados se identificaron parcialmente teniendo presentes las características culturales como microscópicas.

Entre las características culturales se tuvo en cuenta: color, forma, elevación, borde, tamaño de la colonia y el tiempo en el que se observo crecimiento. Para realizar la caracterización microscópica, se estableció la respuesta a la tinción Gram, así como la morfología celular y tipo de agrupación.

4.2.4 Preservación de los aislados. Cada uno de los aislados se preservó de tres maneras diferentes cada una por triplicado, a partir de los cultivos puros que se encontraban en agar-nutritivo empleados para la descripción de los morfotipos

¹⁰⁸ AGUIRRE *et al.*, Op. cit., p. 102.

observados. Para cada uno se prepararon 150mL de caldo basal, repartidos en cantidades de 50 mL con los que se llevaron a cabo los siguientes tratamientos.

4.2.4.1 Preservación en perlas de porcelana. Esta preservación se realizó bajo los parámetros descritos por Somasegaran¹⁰⁹ *et al.*, de la siguiente manera: los caldos basales se inocularon con los cultivos puros de los aislados correspondientes y se adicionaron perlas de porcelana estériles, este cultivo se incubó durante cinco días (28-30°C). Transcurrido el tiempo las perlas de porcelana se transfirieron a tubos de ensayo con silica gel. Los montajes se mantienen a temperatura ambiente en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Nariño en donde se llevó a cabo el desarrollo del trabajo.

4.2.4.2 Preservación en agar inclinado. Se empleo medio sólido con igual composición del caldo basal reemplazando la fuente de carbono por glucosa (Malinckrodt) en una concentración de 5 g/L y adicionando agar-bacteriológico (OXOID) 15 g/L; el medio se dispuso en tubos de ensayo. De cada aislado creciendo en CB se tomaron inóculos, los cuales se sembraron por superficie y se llevaron a incubación (28-30°C). Al observar crecimiento, los tubos se sellaron herméticamente y se mantuvieron a temperatura ambiente, como lo indica la técnica descrita por Somasegaran¹¹⁰ *et al.*,

4.2.4.3 Crioconservación. Para esta conservación se usaron frascos estériles de aproximadamente 12 mL de capacidad. Basándose en el método de Collins¹¹¹ *et al.*, se uso como crioprotector glicerol adicionando 2.5 mL a los frascos que contenían 7.5 mL de CB con los respectivos aislados bacterianos en crecimiento, obteniendo un total de 10mL. Los tratamientos se agitaron se sellaron con parafina y se llevaron a congelación a -20°C.

4.3 EFECTO DEL ORGANOCOLORADO EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL.

El efecto del organoclorado en el crecimiento de las poblaciones bacterianas, se evaluó a partir de la producción de biomasa y resistencia de los aislados a diferentes concentraciones de Endosulfan. En base a los resultados obtenidos se escogió uno de los aislados, el cual se definió como el más eficiente para la degradación del plaguicida Endosulfan. Para este aislado se evaluó la cinética de crecimiento y se cuantificó el Endosulfan residual; posteriormente se identificó fenotípicamente.

¹⁰⁹ SOMASEGARAN *et al.*, Methods in Legume - Rhizobium Tecnology. Institute of Tropical Agriculture y human resources. Department of Agronomy and Soil science. University of Hawaii. 1985, p. 61.

¹¹⁰ Ibid., p. 61.

¹¹¹ COLLINS *et al.*, Métodos Microbiológicos. España : Acribia, S,A. 1989, p. 111.

4.3.1 Selección del aislado más eficiente para la degradación de Endosulfan.

4.3.1.1 Producción de biomasa: Esta prueba tuvo como fin evaluar la producción de biomasa de cada uno de los aislados bacterianos después de 70 horas de incubación; para ello se utilizó como medio de cultivo el caldo basal (descrito en el epígrafe 4.2.2).

Para determinar la biomasa producida después de 70 horas se empleó la técnica de turbidimetría descrita por Madigan¹¹² *et al.*, quienes plantean que la densidad óptica o unidades fotométricas son proporcionales al número de células, por tanto la turbidez puede usarse como un sustituto de los métodos de recuento directo.

Inicialmente, de cada aislado se hicieron preinóculos de 48 horas de edad, incubados a una temperatura entre 28 – 30°C con agitación constante a 120 rpm; transcurrido el tiempo se realizó un ajuste de absorbancia de los cultivos hasta llevarlos a una densidad óptica de 0.15 unidades de absorbancia leídas a 420nm, empleando para ello un Espectrómetro (Perkin-Elmer-Lambda 11 UV/VS). La longitud de onda (λ) empleada en las lecturas de absorbancia para las dos pruebas, se definió según la técnica planteada por Somasegaran¹¹³ *et al.*, a partir del barrido que se realizó al caldo de cultivo a diferentes longitudes de onda determinando la máxima densidad óptica en absorbancia.

A partir de los preinóculos se hicieron los caldos de fermentación, para lo cual se sembraron 10 ml del preinoculo en 40 ml de caldo basal (proporción 1:4). La fermentación se realizó en erlenmeyer de 125 mL, los cultivos se incubaron a iguales condiciones de temperatura y agitación que los preinóculos.

Al cabo de 70 horas se determinaron los aislados que presentaron mayor producción de biomasa. Como variable de respuesta se tuvo en cuenta el crecimiento celular medido en unidades de absorbancia, las lecturas se realizaron con ayuda del espectrofotómetro.

Los aislados con mayor producción de biomasa se seleccionaron para realizar el segundo ensayo.

4.3.1.1 Resistencia de los aislados a diferentes concentraciones de Endosulfan. La prueba se llevó a cabo con los aislados que presentaron los mejores resultados en relación al primer ensayo. En este procedimiento se utilizó inicialmente el caldo basal descrito para el aislamiento bacteriano (descrito en el epígrafe 4.2.2), el cual presentaba la concentración de Endosulfan registrada en el lixiviado producido en el RSA según el reporte de Bastidas¹¹⁴ *et al.*, a partir de este valor se emplearon cuatro concentraciones de Endosulfan mayores que presentaban intervalos

¹¹² MADIGAN *et al.*, Op.cit., p. 148.

¹¹³ SOMASEGARAN *et al.*, Op.cit., p. 21

¹¹⁴ BASTIDAS *et al.*, Op. cit., p. 77.

aproximados de 0.0034 mg.L⁻¹ del plaguicida por cada tratamiento, hasta alcanzar una concentración de 0.0302 mg.L⁻¹. Posteriormente para el aislado seleccionado se evaluaron cuatro concentraciones más (concentraciones 5-8), las que se definieron de la misma manera que para los tratamientos iniciales. Las cuatro primeras concentraciones utilizadas en el ensayo se registran en la tabla 6; seguida a ella se registran las concentraciones adicionales para evaluar el aislado seleccionado (tabla 7.)

Tabla 6. Composición del caldo basal y concentraciones utilizadas para llevar a cabo la prueba de resistencia a diferentes concentraciones de Endosulfan.

COMPOSICIÓN DEL CALDO BALSAL	TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN DE ENDOSULFAN
<ul style="list-style-type: none"> • KH₂PO₄ 0.078 g/L • MgSO₄ 0.075g/L • CaCO₃ 0.036g/L • NaCl 5 g/L • (NH₄)₂ SO₄ 0.5 g/L • Endosulfan 	1	0.0202 mg.L ⁻¹
	2	0.0235 mg.L ⁻¹
	3	0.0268 mg.L ⁻¹
	4	0.0302 mg.L ⁻¹

Tabla 7. Composición del caldo basal y tratamientos adicionales utilizados para evaluar la resistencia del aislado seleccionado a diferentes concentraciones de Endosulfan.

COMPOSICIÓN DEL CALDO BALSAL	TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN DE ENDOSULFAN
<ul style="list-style-type: none"> • KH₂PO₄ 0.078 g/L • MgSO₄ 0.075g/L • CaCO₃ 0.036g/L • NaCl 5 g/L • (NH₄)₂ SO₄ 0.5 g/L • Endosulfan 	5	0.0336 mg.L ⁻¹
	6	0.0369 mg.L ⁻¹
	7	0.0403 mg.L ⁻¹
	8	0.0436 mg.L ⁻¹

Para llevar a cabo esta prueba se realizaron preinóculos de los aislados seleccionados, de la misma manera que se hicieron para la primera prueba, con iguales condiciones de temperatura, tiempo, agitación constante, y el ajuste de absorbancia. Los caldos a fermentar se prepararon a partir de los preinóculos a una concentración del 10% en 10 mL de caldo basal. La fermentación se realizó para cada aislado en tubos de ensayo utilizando el caldo basal con las respectivas concentraciones de Endosulfan descritas en la tabla 6.; transcurridas 70 horas se calculó el crecimiento celular medido en unidades de absorbancia.

4.3.2 Cinética de crecimiento. Con el aislado bacteriano más eficiente para la degradación de Endosulfan obtenido mediante las anteriores pruebas, se llevó a cabo la cinética de crecimiento. Para ello se preparó un preinoculo del aislado, con las mismas condiciones con las que se realizaron los preinóculos descritos para las pruebas de selección.

Para la preparación del caldo a fermentar se utilizaron 220 mL de caldo basal en el que se reemplazó la concentración de Endosulfan utilizada para el aislamiento bacteriano por la concentración óptima en donde se obtuvo mayor crecimiento respecto a la segunda prueba con la que finalmente se realizó la selección del aislamiento bacteriano.

De los 220 mL a fermentar el 10% correspondía al inóculo; la fermentación se realizó por triplicado en erlenmeyer de 500mL de capacidad. Durante el experimento se tuvieron presentes las condiciones de cultivo registradas en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de cultivo empleadas en la cinética de crecimiento del aislado bacteriano mas eficiente para degradar Endosulfan.

CONDICIONES DE CULTIVO	
Concentración óptima de Endosulfan	0.0403 mg.L ⁻¹ .
Tiempo de Incubación	60 horas
Temperatura	28 – 30°C
Agitación (r.p.m)	120

Cada seis horas hasta alcanzar las 60 horas, se colectaron 10 mL de caldo basal de cada réplica, los cuales se centrifugaron a 8000 rpm, durante cinco minutos a temperatura ambiente (18°C); el sobrenadante obtenido después de la centrifugación se conservó bajo refrigeración. Para calcular la producción de biomasa de empleo el método de peso seco descrito por Madigan¹¹⁵ *et al.*, para ello el botón celular obtenido en la primera centrifugación se lavó con 1ml de agua

¹¹⁵ MADIGAN *et al.*, Op.cit., p. 149.

destilada, se centrifugó por segunda vez y se transfirió a un tubo de 1.5 mL de capacidad previamente pesado; este se dejó secar por 24 horas a 80°C y se calculó el peso de la biomasa el cual se expresó en g/L.

4.3.3 Cuantificación del Endosulfan residual. A partir de los primeros sobrenadantes guardados bajo refrigeración cada seis horas, fue posible la medición del OCs residual. Las soluciones refrigeradas se sometieron al tratamiento conocido como extracción en fase sólida (EFS), descrito por Arjan y Louter¹¹⁶ a partir del cual se hizo la extracción del metabolito de interés.

La identificación y cuantificación del Endosulfan se realizó mediante la técnica de cromatografía de gases (CG), haciendo uso del método de patrón externo que consiste en comparar el área del pico del compuesto en una solución desconocida con las áreas de una serie de soluciones estándar que se han usado para formar una curva de calibración¹¹⁷.

Durante el procedimiento se tuvieron en cuenta las condiciones cromatográficas estandarizadas por Bastidas¹¹⁸ *et al.*, para la determinación de pesticidas organoclorados en los lixiviados del RSA; las condiciones se registran en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones instrumentales óptimas para el análisis de pesticidas organoclorados mediante CG.

DESCRIPCIÓN INSTRUMENTAL	CONDICIONES DE ANÁLISIS
Cromatógrafo de gases	G-17A SHIMADZU
Gas de arrastre	Helio a 1mL/min
Detector	ECD
Temperatura del inyector	280°C
Temperatura del detector	280°C
Programa del horno	130°C @ 4°C/min hasta 260°C
Inyección	Modo split 200:1
Método de cuantificación	Estándar externo
Tiempo de análisis	32,5 minutos

Fuente: Tesis de grado : Estandarización y validación del método cromatografico para la determinación y seguimiento de pesticidas organoclorados en el proceso de tratamiento de lixiviados del Relleno Sanitario Antanas de la ciudad de San Juan de Pasto – Colombia. Bastidas *et al.*, 2005.

¹¹⁶ ARJAN Y LOUTER, H., Op cit., citado por Bastidas *et al.*, p. 49.

¹¹⁷ KENNETH, R. Análisis Instrumental. España : Pearson Educación. 2001, p. 205-208.

¹¹⁸ BASTIDAS *et al.*, Op. cit., p. 67.

A partir de los datos obtenidos durante el proceso de fermentación se calcularon las siguientes variables de respuesta:

a. Rendimiento $Y(x/s)$: relaciona el producto obtenido (biomasa en este caso) y el sustrato consumido.

Fórmula aplicada:
$$Y(x/s) = \frac{\text{biomasa producida (dX)}}{\text{sustrato consumido (dS)}}$$

Fuente: Programa de monografías científicas : Monografía de Microbiología Industrial. OEA.

b. Velocidad específica de crecimiento (μ): se calculó a partir de la biomasa hasta el tiempo en que se finalizó la fase exponencial.

Fórmula aplicada:

$$\mu = \frac{2,3 (\log X_2 - \log X_1)}{t_2 - t_1}$$

t_2 : tiempo final

t_1 : tiempo cero

X_2 : biomasa al tiempo 2

X_1 : biomasa t 1

Fuente: Programa de monografías científicas : Monografía de Microbiología Industrial. OEA.

c. Velocidad específica de consumo de sustrato (q_s): se evaluó teniendo en cuenta la relación entre los dos parámetros anteriores.

Fórmula aplicada:

$$q_s = \mu/Y(x/s)$$

Fuente: Programa de monografías científicas : Monografía de Microbiología Industrial. OEA.

4.4 CARACTERIZACION FENOTÍPICA DEL AISLADO MÁS EFICIENTE PARA LA DEGRADACIÓN DE ENDOSULFAN.

4.4.1 Descripción del aislado. Para la identificación parcial del aislado microbiano más eficiente se tuvieron en cuenta las características culturales y microscópicas y se realizaron pruebas bioquímicas utilizando el sistema MicroScan. Este sistema cuenta con una serie de paneles específicos que permiten tanto la identificación de bacilos Gram negativos aeróbicos y anaeróbicos facultativas, como la

determinación de la susceptibilidad bacteriana ante antibióticos¹¹⁹. Las pruebas en las que se basa el sistema para la identificación, se registran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Principales pruebas de identificación de microorganismos según el sistema MicroScan.

PRUEBAS DE IDENTIFICACION
Fermentación de carbohidratos: <ul style="list-style-type: none"> • Glucosa • Sucrosa • Sorbitol • Ramnosa • Rafinosa • Arabinosa • Inositol • Melobiosa • Adonitol
Presencia de la enzima ureasa
Producción de ácido sulfúrico
Metabolismo de triptofano
Descarboxilación de aminoácidos: <ul style="list-style-type: none"> • Lisina • Arginina • Ornitina
Deaminación de triptofano con producción de ácido indolpiruvato
Hidrólisis de escualina
Producción de acetona por piruvato de sodio
Hidrólisis de β - galactosidasa, orto-nitrophenyl- β -D galactopyranoside
Oxidación-Fermentación: oxidación de glucosa con formación de ácido

Fuente: MicroScan. Dried Gram Negative Procedural Manual. 2004

¹¹⁹ MICROSCAN. Dried Gram Negative Procedural Manual. Dade Behring : Estados Unidos. 2004, p. 2.

Utilización de sustratos como únicas fuentes de carbono: <ul style="list-style-type: none"> • Citrato • Malonato • Acetamida • Tartrato •
Reducción de nitrato a nitrito
Tolerancia a la ceftriaxona
Resistencia ante antibióticos principalmente: <ul style="list-style-type: none"> • Penicilina • Kanamicina • Colitina • Cefalotina • Nitrofurantina • Trobamicina •
Presencia de la enzima gelatinasa

Fuente: MicroScan. Dried Gram Negative Procedural Manual. 2004

Los análisis se obtienen a partir de la base de datos generada por el programa de MicroScan; los resultados se interpretan hasta con un 99.9% de confiabilidad.

A partir de la aplicación del sistema se determinó la especie a la que correspondía el aislado.

Los resultados obtenidos se compararon con el manual Bergey's¹²⁰ de taxonomía bacteriana asegurando a que grupo taxonómico pertenecía el morfotipo tratado.

4.5 ANALISIS DE DATOS.

Para evaluar el efecto del organoclorado en el crecimiento poblacional y escoger el aislado más eficiente para la degradación de Endosulfan se realizó para la primera prueba un diseño de bloques al azar con cinco replicas para cada aislado bacteriano, para la segunda prueba se realizaron tres réplicas para los aislados seleccionados en el primer ensayo. Los datos obtenidos para ambas pruebas fueron analizados a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov con el fin de determinar si se ajustan o no a una distribución normal.

¹²⁰ KRIEG *et al.*, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Estados Unidos : Williams & Wilkins. 1986. 6 ed. v.1, p. 461.

Para la evaluar la producción de biomasa (primera prueba) se realizó un análisis de varianza simple permitiendo establecer si existían diferencias significativas en la productividad de las cepas, seguido a ello se aplico la prueba de medias de Duncan para identificar el (los) aislados que diferían significativamente con los cuales se llevó a cabo la prueba de resistencia a diferentes concentraciones de Endosulfan, en relación a este ensayo se establecieron modelos estadísticos que permitieron justificar el crecimiento experimentado por cada aislado en los caldos de cultivo con diferentes concentraciones de Endosulfan, la aplicación de los modelos permitió definir el aislado mas eficiente para la degradación de Endosulfan.

Respecto a la cinética de crecimiento del aislado seleccionado y la cuantificación de Endosulfan residual, se realizaron tres réplicas para cada parámetro obteniendo los promedios como la desviación estándar.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE LOS LIXIVIADOS PRODUCIDOS EN EL RELLENO SANITARIO ANTANAS EN SAN JUAN DE PASTO.

5.1.1 Descripción de los morfotipos observados. Con los procedimientos aplicados para el aislamiento bacteriano se obtuvieron tres morfotipos capaces de utilizar el Endosulfan (6,7,8,9,10,10-Hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,4,3-benzodioxathiepin-3-oxide) como única fuente de carbono. Los morfotipos se denominaron RAE1, RAE2 y RAE3; en la tabla 10. se describen las características de cada aislado y en las figuras 6-11 se observan algunas características culturales como microscópicas de las colonias.

Tabla 10. Descripción de las características culturales y microscópicas de los morfotipos aislados de los lixiviados del RSA capaces de utilizar Endosulfan como única fuente de carbono.

	ASLADOS OBSERVADOS		
	MORFOTIPO 1 (RAE1)	MORFOTIPO 2 (RAE 2)	MORFOTIPO 3 (RAE 3)
CARACTERISTICAS CULTURALES			
Color	Blanco lechoso	Transparente	Café claro
Forma	Rizoide	Filamentosa	Punteada
Elevación	Convexa	Convexa	Convexa
Bordes	Ondulado	Ondulado	Ondulado
Tamaño	Mediano	Pequeño	Pequeño
Tiempo aproximado de alta turbidez en caldos de enriquecimiento selectivo(caldo basal)	70 horas	70 horas	70 horas
CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS			
Prueba Gram:			
Morfología	Bacilos	Bacilos	Bacilos
Respuesta al Gram	Gramnegativos	Gramnegativos	Gramnegativos
Agrupación	Solos	Solos	Empalizada

Figura 6. Crecimiento de RAE1 sobre Agar-nutritivo después de 48 horas de incubación a 28-30°C.

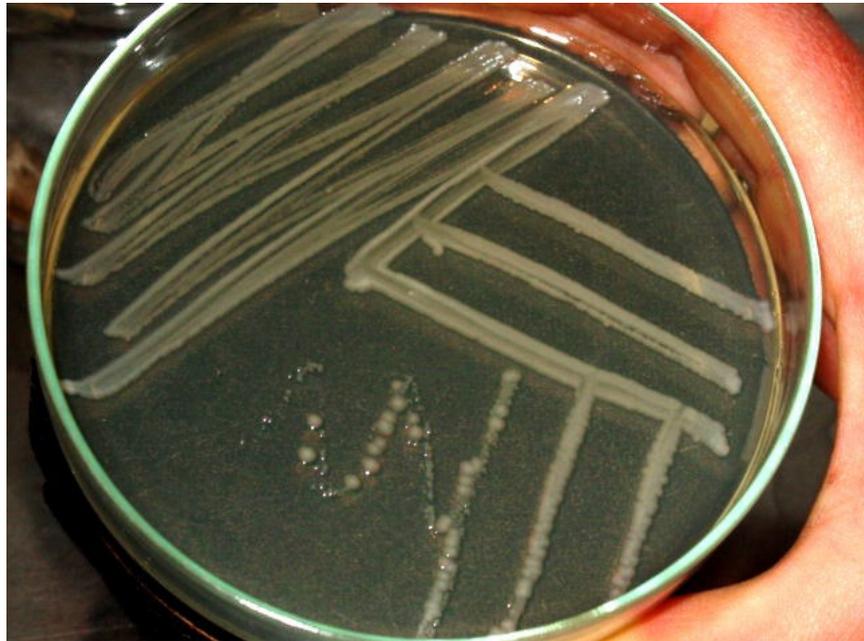


Figura 7. Respuesta a la tinción de Gram aislado RAE1.

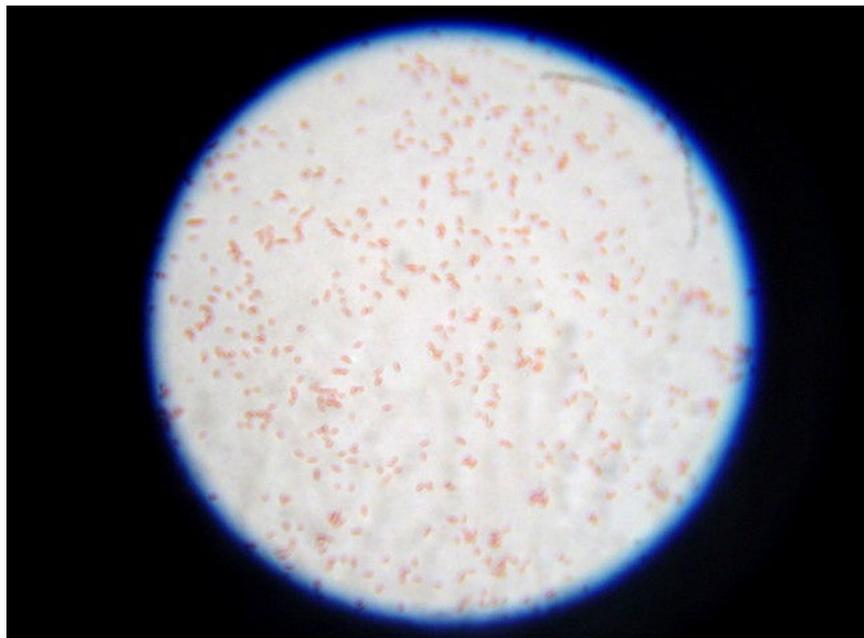


Figura 8. Crecimiento de RAE2 sobre Agar-nutritivo después de 48 horas de incubación a 28-30°C.

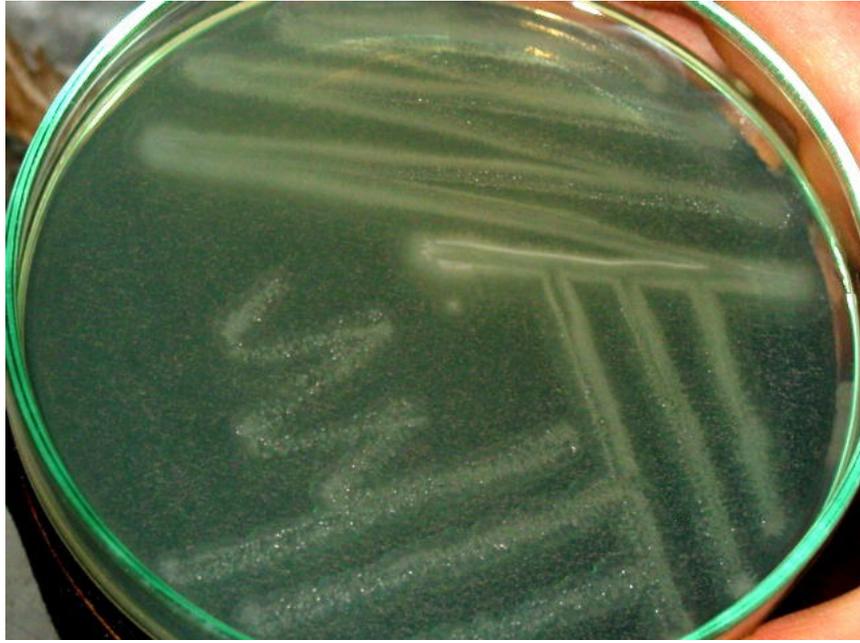


Figura 9. Respuesta a la tinción de Gram aislado RAE2.

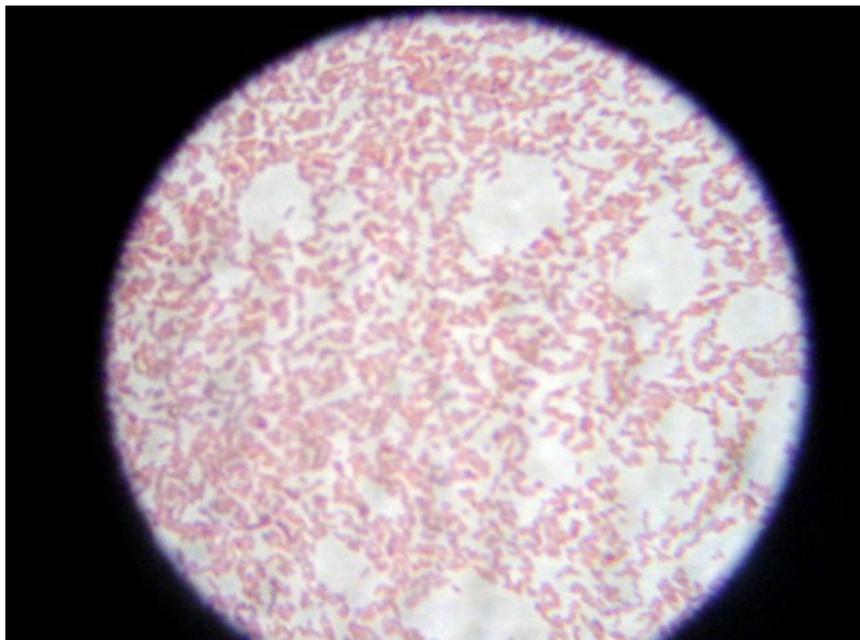
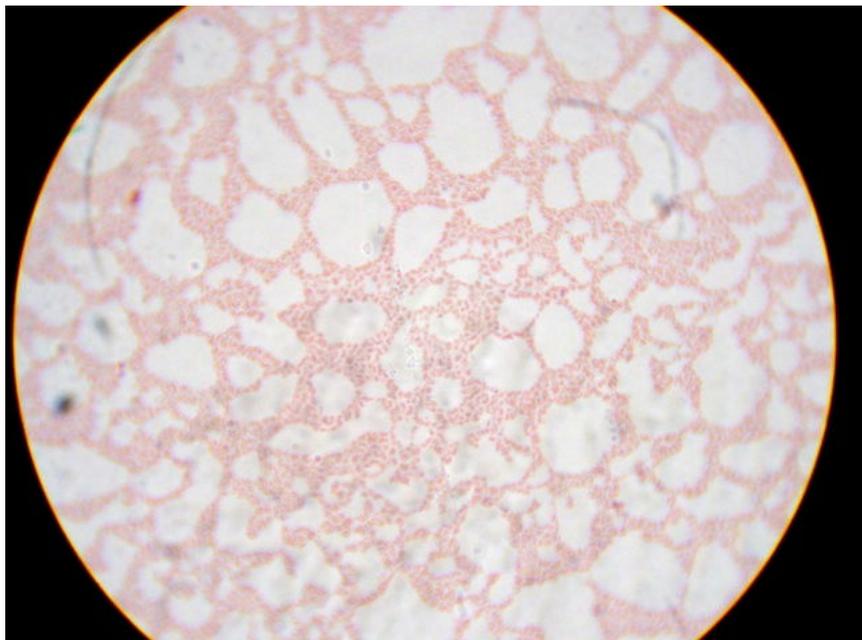


Figura 10. Crecimiento de RAE3 sobre Agar-nutritivo después de 48 horas de incubación a 28-30°C.



Figura 11. Respuesta a la tinción de Gram aislado RAE3.



Cabe resaltar que de suelos contaminados con Endosulfan, se han aislado bacterias capaces de degradar este plaguicida, como lo demuestran trabajos realizados por Sutherland¹²¹ *et al.*, Kwon¹²² *et al.*, y Siddique¹²³ *et al.*, quienes lograron el aislamiento de microorganismos biodegradadores del OCs Endosulfan a partir de cultivos de enriquecimiento utilizando Endosulfan como fuente de carbono y azufre. Sin embargo este es el primer estudio que reporta la presencia de bacterias degradadoras de Endosulfan aisladas de los lixiviados generados en el RSA de la ciudad de Pasto.

Estudios realizados por Bastidas¹²⁴ *et al.*, reportan que el plaguicida Endosulfan hace parte de la composición del lixiviado generado en el RSA, encontrándose en la piscina aeróbica en una concentración aproximada de 0.0202 ppm. Los residuos procedentes de las actividades agrícolas como de RSU y las condiciones que presenta el lixiviado, permiten que diversidad de microorganismos mediante su acción metabólica aprovechen el medio como sustrato, del que toman los nutrientes necesarios para su desarrollo.

Los aislados RAE1, RAE2, y RAE3 se reconocieron como bacilos Gram negativos; según Grant *et al.*, Valderrama y Rheinheimer¹²⁵, entre la diversidad de microorganismos que hacen parte de las aguas contaminadas los bacilos Gram negativos son los microorganismos más comunes que se encuentran en mayor grado de abundancia en este tipo de líquidos residuales.

Los morfotipos RAE1 y RAE2 se distinguieron por generar un olor putrefacto; los medios en los que se encontraba el aislado RAE3 presentaron un cambio de color de una tonalidad amarilla hasta un tono verde que se manifestaba transcurridas las 48 horas de incubación. La síntesis de pigmentos producidos por microorganismos se atribuye en gran parte a características de los mismos, determinadas genéticamente. La formación de productos pigmentados también se ve asociada a que son dependientes en gran parte de la presencia de la luz, de la composición del sustrato, la temperatura de incubación, e inclusive muchos de ellos son producidos como mecanismos de defensa. Entre la diversidad de pigmentos la piocianina es el más conocido, excretado al medio por algunas especies de *Pseudomonas*, fácilmente reconocible por su color amarillo verdoso¹²⁶; según Rheinheimer¹²⁷ *et al.*, este género con metabolismo aerobio-oxidativo, ha sido reportado como uno de los grupos más importantes en

¹²¹ SUTHERLAND *et al.*, Op cit., 2000.

¹²² KWON *et al.*, Op cit., 2002.

¹²³ SIDDIQUE *et al.*, Op cit., 2003.

¹²⁴ BASTIDAS *et al.*, Op cit., p. 77.

¹²⁵ Grant *et al.*, Valderrama y Rheinheimer citados por Tibanta *et al.*, Op. cit., p. 66.

¹²⁶ Margalith P. Pigment microbiology. Londres : Chapman & Hall. 1992.

¹²⁷ RHEINHEIMER, Op.cit., p. 260.

tratamientos de aguas residuales y uno de los microorganismos más representativos numéricamente.

Los caldos basales en los que se encontraban los tres aislados bacterianos presentaron turbidez transcurridas las 50 horas lo que manifestaba el crecimiento bacteriano; sin embargo a las siguientes 20 horas los medios se observaron más turbios, siendo esto indicio de mayor densidad celular. Al realizar la purificación de los morfotipos en Agar-nutritivo el crecimiento se manifestó a las 24 horas de realizar la inoculación permitiendo observarse colonias fácilmente descriptibles.

El lento crecimiento de los microorganismos en el caldo basal puede atribuirse a que el Endosulfan provee una baja fuente energética para la actividad microbiana cuando es empleado como única fuente de carbono como lo afirman Sutherland *et al.*, Awasthi *et al.*, y Guerin¹²⁸ en investigaciones en las que se han empleado medios enriquecidos con Endosulfan como única fuente de carbono para el aislamiento bacteriano. Otra posible razón por la cual puede sustentarse el tiempo de crecimiento de los aislados en los caldos basales se encuentra relacionada con la complejidad en la estructura molecular del Endosulfan que hace más difícil el proceso metabólico llevado a cabo por las células bacterianas quienes toman primeramente y en su totalidad la fuente de carbono seguida por las fuentes de nitrógeno, fósforo y azufre, para la construcción de los componentes celulares como para la obtención de energía¹²⁹.

Los aislados obtenidos: RAE1, RAE2, y RAE3 se preservaron según las técnicas descritas en la metodología epígrafe 4.2.4 (Anexo D). A partir de los preservados se dio continuidad al trabajo de investigación.

5.2 EFECTO DEL ORGANOCOLORADO EN EL CRECIMIENTO POBLACIONAL.

5.2.1 Resultados obtenidos en las pruebas de biomasa y resistencia a diferentes concentraciones de Endosulfan para la selección del aislado más eficiente en la degradación del plaguicida.

Como se puede apreciar en la tabla 11. para la primera prueba relacionada con la producción de biomasa, se obtuvo que los aislados RAE1 y RAE2 presentan un valor de biomasa superior al valor producido por el aislado RAE3. En dicha tabla se aprecian los valores promedio de las unidades de absorbancia que expresan la producción de biomasa obtenidas para cada aislado.

¹²⁸ Sutherland *et al.*, Awasthi *et al.*, y Guerin citados por Siddique *et al.*, Op. cit.

¹²⁹ D.B Alexander citado por Siddique *et al.*, Op. cit.

Tabla 11. Valores de densidad óptica obtenidos después de 70 horas para los aislados RAE1, RAE2 y RAE3 cultivados en caldo basal (28 – 30°C, 120 rpm).

AISLADO					
RAE1		RAE 2		RAE 3	
Promedio (unidades de Abs.)	Desviación estándar (S)	Promedio (unidades de Abs.)	Desviación estándar (S)	Promedio (unidades de Abs.)	Desviación estándar (S)
0.121	+/-0.031	0.119	+/-0.009	0.057	+/-0.009

p-valor test F: <0.05
 nivel de confianza 95%

En el análisis de varianza realizado con la prueba F, se demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas en los promedios de las unidades de absorbancia de los tres aislados ($p > 0.05$) con un nivel de confianza del 95%; mediante una prueba Duncan se demostró que los aislados RAE1 y RAE2 forman un solo grupo y el aislado RAE3 se define como un grupo heterogéneo representado con la menor producción de biomasa. De acuerdo a ello los aislados RAE1 y RAE2 se utilizaron para la siguiente prueba.

El segundo experimento llevado a cabo con los aislados RAE1 y RAE2 relacionado con el crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de Endosulfan, demostró que el aislado RAE2 incrementa su biomasa aún a concentraciones mayores del plaguicida. En la tabla 12. se encuentran los valores promedio en unidades de absorbancia que indican el crecimiento de los aislados bacterianos a diferentes concentraciones de Endosulfan.

Tabla 12. Valores promedio del crecimiento de los aislados bacterianos a diferentes concentraciones de Endosulfan como única fuente de carbono en caldo basal obtenidos después de 70 horas (28 – 30°C, 120 rpm).

Tratamiento (Concentración Endosulfan)	AISLADOS			
	RAE1		RAE2	
	Promedio (unidades de Abs)	Des.estándar (S)	Promedio (unidades de Abs)	Des.estándar (S)
1(0.0202 mg.L ⁻¹)	0.181	+/-0.101	0.112	+/-0.029
2(0.0235 mg.L ⁻¹)	0.284	+/-0.091	0.134	+/-0.012
3(0.0268 mg.L ⁻¹)	0.292	+/-0.040	0.188	+/-0.045
4(0.0302 mg.L ⁻¹)	0.233	+/-0.190	0.361	+/-0.040

Los resultados adquiridos para los aislados RAE1 y RAE2, podrían relacionarse con los procesos metabólicos de los microorganismos, los cuales no ocurren en igual medida, debido a que existe una concentración adecuada de los componentes del medio en el que cada microorganismo puede utilizar el sustrato como fuente de carbono y energía¹³⁰.

Con los datos obtenidos para los aislados RAE1 y RAE2, se realizó una modelación matemática que permitió dar una explicación sobre el crecimiento que experimenta cada aislado bacteriano; los modelos se muestran en las figuras 12 y 13 presentadas a continuación.

¹³⁰ RHEINHEIMER, Op.cit., p. 122-127

Figura 12. Perfil de resistencia del aislado RAE1 a diferentes concentraciones de Endosulfan.

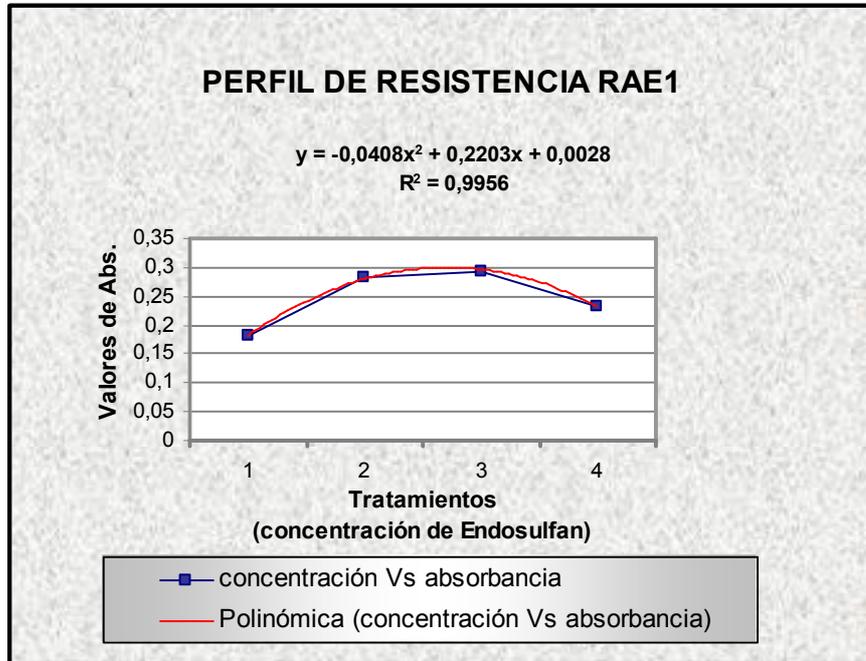
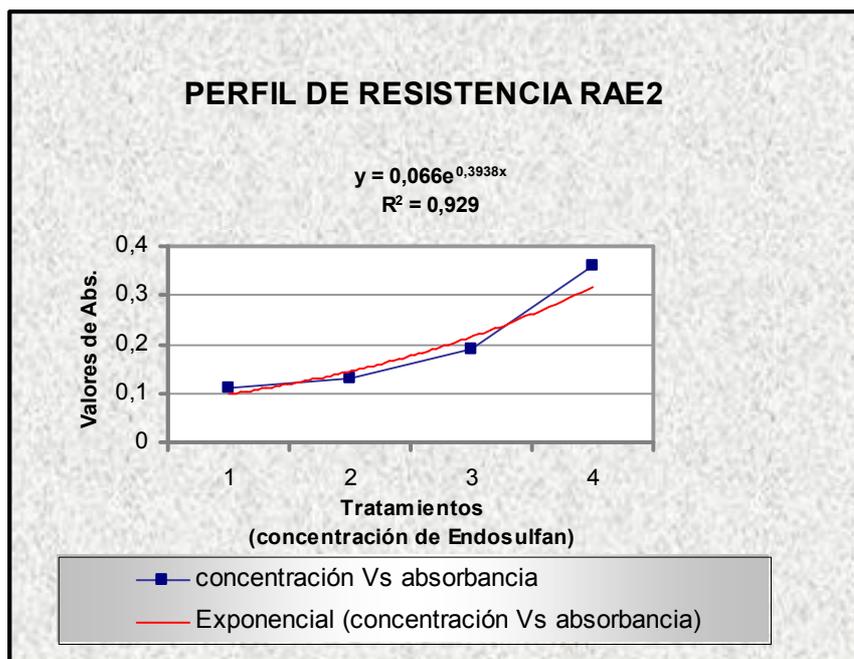


Figura 13. Perfil de resistencia del aislado RAE2 a diferentes concentraciones de Endosulfan.



Para el aislado RAE1 (figura 12.) se observa que la curva del perfil de resistencia presenta la ecuación $y = -0.0408x^2 + 0.2203x + 0.0028$, lo que representa un modelo polinómico de segundo grado, que para este caso presenta un $R = 0.99$ indicando que el modelo matemático explica con un 99% de confiabilidad la variable de respuesta. De acuerdo a ello el modelo permite deducir que a concentraciones bajas y altas de Endosulfan (0.0202 mg.L^{-1} y 0.0302 mg.L^{-1} respectivamente), el crecimiento es menor, comparado con los valores de crecimiento obtenidos a las concentraciones dos y tres con valores de 0.0235 mg.L^{-1} y 0.0268 mg.L^{-1} .

La explicación a estos resultados puede relacionarse con la afirmación de Rheinheimer¹³¹ la cual se fundamenta en que la concentración de ciertos nutrientes activos como en este caso el Endosulfan puede ser demasiado baja o excesivamente alta para algunos microorganismos o incluso para todos delimitando de esta manera el crecimiento de la población; igualmente valores superiores o inferiores a los óptimos diferentes para las distintas especies, pueden alterar la forma celular y provocar efectos derivados presumiblemente, del grado de saturación del sistema enzimático que normalmente degrada los nutrientes.

Respecto al aislado RAE2 el modelo matemático que explica la relación crecimiento Vs. concentraciones de Endosulfan, corresponde a un modelo exponencial ($y = 0.066^{0.3938x}$) con un $R = 0.929$. En la figura 13. se aprecia que a medida que se incrementan las concentraciones del Endosulfan se incrementa el crecimiento microbiano; por tal razón existe una relación directamente proporcional entre las concentraciones y el crecimiento; este modelo de incremento de la población permitió la selección del aislado RAE2 y conllevó a experimentar su crecimiento a concentraciones mayores de Endosulfan.

Para comprobar si ocurre incremento en la producción de biomasa para RAE2 a concentraciones mayores que la última (0.0302 mg.L^{-1}) empleada en el cuarto tratamiento, se realizaron para este aislado pruebas de resistencia a concentraciones adicionales (concentraciones 5-8); a partir de estos ensayos fue posible determinar el punto óptimo de crecimiento de RAE2 en el que se registró la mayor densidad celular. En la tabla 13. se registran los valores de densidad celular obtenidos en los tratamientos adicionales, con los que se verificó si el aislado RAE2 presentaba incremento en su biomasa.

¹³¹ RHEINHEIMER, Op.cit., p. 122-127

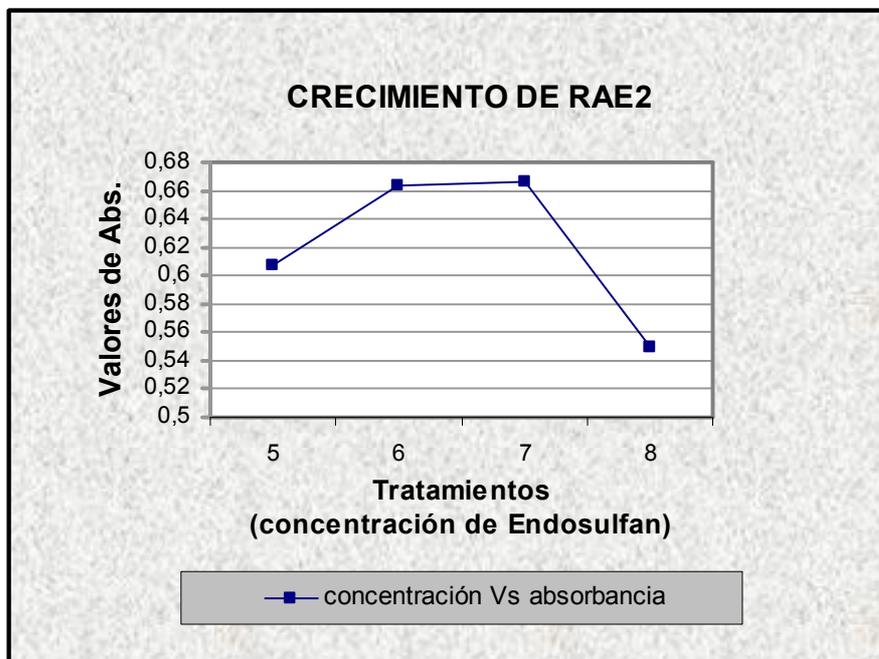
Tabla 13. Valores promedio del crecimiento de RAE2 en caldo basal, obtenidos después de 70 horas (28 – 30°C, 120 rpm).

	AISLADO SELECCIONADO	
Tratamiento (Concentración Endosulfan)	RAE2	
	Promedio (unidades de Abs)	Des.estandar (S)
5 (0.0336 mg.L ⁻¹)	0.607	+/-0.342
6 (0.0369 mg.L ⁻¹)	0.663	+/-0.561
7 (0.0403 mg.L ⁻¹)	0.666	+/-0.743
8 (0.0436 mg.L ⁻¹)	0.55	+/-0.282

Los valores promedio registrados en la tabla 13. indican un aumento de la biomasa por parte del aislado RAE2 la que se aprecia hasta el séptimo tratamiento, a partir de este, ocurre un descenso en la producción celular de acuerdo al valor de densidad obtenido en la mayor concentración (0.0436 mg.L⁻¹).

La figura 14. indica el perfil de resistencia de RAE2; en la figura se observa el crecimiento representado en las diferentes concentraciones y se aprecia el punto óptimo determinado por el valor máximo de densidad celular el cual se obtiene en el séptimo tratamiento a una concentración de 0.0403 mg.L⁻¹.

Figura 14. Crecimiento de RAE2.



La razón a la que puede atribuirse el bajo crecimiento manifestado por RAE2 en la máxima concentración (0.0436 mg.L^{-1}), se basa en la afirmación de Kiely¹³² la cual hace referencia a que la mayoría de residuos orgánicos e inorgánicos presentan un efecto progresivo cuando se incrementa su concentración, por lo tanto, una sustancia orgánica a concentraciones altas puede ser tóxica para el cultivo lo que se presume por el grado de saturación del sistema enzimático que normalmente lo degrada, afectando la viabilidad de la población microbiana y por tanto ocasionando muerte celular.

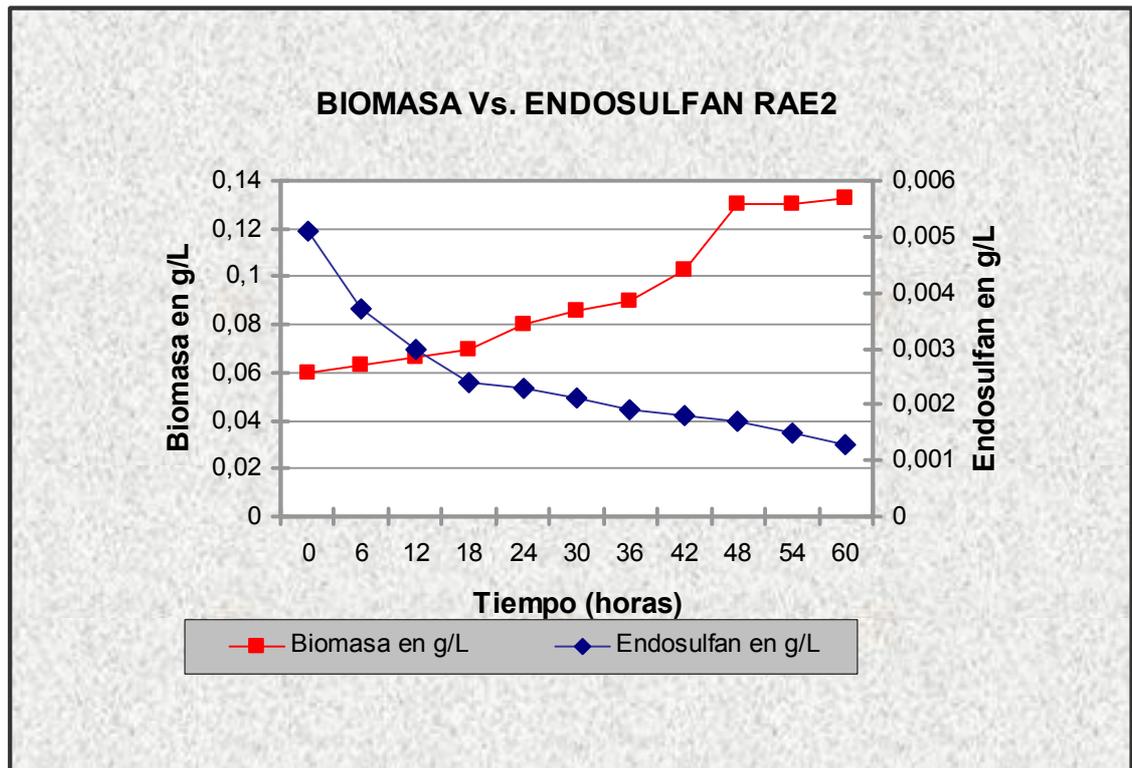
De acuerdo a los perfiles de resistencia obtenidos para los aislados RAE1 y RAE2 que mediante los modelos matemáticos representados en las figuras 12 y 13. explican el crecimiento en función de las concentraciones de Endosulfan y según las pruebas de resistencia realizadas para el aislado RAE2 a nuevas concentraciones de Endosulfan, se seleccionó el aislado RAE2 como el aislado que presento los mejores resultados para las dos pruebas.

5.2.2 Cinética de crecimiento de RAE2. Después de realizada la selección del aislado, se procedió a determinar la producción de biomasa y cuantificar el Endosulfan residual, variables que se representan en la figura 15. El gráfico

¹³² KIELY, Op.cit., 649 p.

permite observar la relación inversamente proporcional entre la biomasa producida y las concentraciones de Endosulfan.

Figura 15. Valores de biomasa Vs. Endosulfan residual obtenidos para el aislado RAE2.



En la figura 15. se aprecia que las células han superado la fase de latencia debido a que proceden de un medio de cultivo en el cual previamente se han preadaptado (preinoculo), de tal manera que el crecimiento en los caldos basales inicia inmediatamente.

La gráfica también permite observar un crecimiento exponencial que finaliza a las 48 horas con un $\mu = 0.0095 \text{ g.L hora}$; el hecho de que la producción de biomasa se incremente con el tiempo permite suponer que RAE2 se encuentra creciendo en un medio de cultivo con los nutrientes y las condiciones necesarias que le proporcionan al microorganismo un ambiente favorable para sintetizar sus propios componentes celulares, duplicar su biomasa y por tanto su material genético.

Según Madigan¹³³ *et al.*, cuando el comportamiento de una población bacteriana se manifiesta como se observa en la figura 20, es posible afirmar que ocurre un crecimiento acelerado en donde las condiciones del medio (pH, composición del medio de cultivo, temperatura entre otras) permiten el incremento en la velocidad de crecimiento de manera exponencial.

Contrario al incremento de biomasa se observa el consumo de sustrato representado con un $q_s=0.027\text{g.L}^{-1}$ / hora, el cual disminuye de manera inversamente proporcional en relación a la biomasa producida. La correlación entre estas dos variables expresada con un $r = -0.788$, nos permite concluir que existe una relación inversa entre la biomasa de las células activas y el consumo del sustrato, lo que ha sido afirmado por Rheinheimer¹³⁴, quien también manifiesta que la correlación entre la producción celular y el sustrato es mucho más apreciable en las curvas de crecimiento a medida que transcurre el tiempo hasta que las células alcanzan la fase estacionaria.

La velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) determinada para RAE2 podría verse justificada en este caso, por la composición del sustrato, de acuerdo a la afirmación realizada por Atlas¹³⁵ *et al.*, la cual deduce que los plaguicidas sintéticos como el Endosulfan utilizado en el caldo basal como fuente de carbono, presentan alta complejidad en su estructura química lo que determina el tiempo, y por tanto la velocidad con que el consumo se lleve a cabo.

Transcurrida la fase exponencial, se aprecia que la curva tiende a estabilizarse hasta las 60 horas, tiempo que comprende la fase estacionaria de la cinética de crecimiento. La manifestación de la fase estacionaria que experimenta el aislado RAE2, puede verse relacionada con dos razones que Madigan¹³⁶ *et al.*, justifica para las poblaciones de microorganismos cuando permanecen estacionarias; la primera, relacionada con el hecho de que las células han agotado el sustrato o el nutriente esencial del medio de cultivo necesario para duplicarse, y la segunda que en el medio se acumulan productos de desecho inhibitorios que hacen que el crecimiento exponencial cese.

Basado en estas afirmaciones, Madigan¹³⁷ *et al.*, concluye que durante la fase estacionaria en el medio no hay un aumento ni descenso neto de microorganismos; sin embargo, argumenta que en algunos casos puede ocurrir un lento crecimiento durante dicha fase por la aparición de nuevos individuos pero que se vera compensado por la muerte de otros. A ello puede verse relacionado

¹³³ MADIGAN *et al.*, Op.cit., p. 144-145.

¹³⁴ RHEINHEIMER, Op.cit., p. 169.

¹³⁵ ATLAS *et al.*, Op. cit., p. 512.

¹³⁶ MADIGAN *et al.*, Op.cit., p. 145.

¹³⁷ Ibid., 145.

el hecho de que la curva de crecimiento no se estabiliza en su totalidad hasta las 60 horas, momento en el que aún se aprecia la etapa estacionaria.

A diferencia de la curva de crecimiento en la que se estima el inicio de la fase estacionaria al cumplirse las 48 horas, es evidente que el consumo de sustrato se sigue presentando, lo que da a entender que los nutrientes del medio no están implicados únicamente con el crecimiento de la población. Generalmente el presentarse disminución en la concentración inicial de sustrato supone que en el medio se está presentando crecimiento, sin embargo, el hecho de que este se siga consumiendo aún al manifestarse la fase estacionaria, puede justificarse por que el sustrato puede considerarse a la vez como fuente de carbono y energía lo que podría conllevar a que el crecimiento sea nulo y por tanto el consumo de sustrato se vea asociado con el mantenimiento de funciones vitales tales como recambio de material celular, mantenimiento de gradientes de concentración y movilidad, y no con el aumento de biomasa¹³⁸.

El rendimiento obtenido para RAE2 calculado después de 60 horas de incubación está representado con un valor del 35%; si se tiene presente la investigación realizada por Martens¹³⁹ en la que se ensayó que bacterias aerobias aisladas de suelos contaminados con Endosulfan degradaban aproximadamente el 30% de Endosulfan después de diez días de incubación, se puede concluir que RAE2 presenta un buen rendimiento durante el tiempo en que se realizó el estudio que corresponde aproximadamente a tres días.

Respecto a los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento como a los valores de Endosulfan residual, es posible afirmar que RAE2 tiene la capacidad metabólica para consumir este plaguicida. El aporte de los valores de consumo de sustrato, la velocidad en que se da el crecimiento y el rendimiento en el medio de cultivo de un microorganismo de interés son aspectos indispensables como lo afirma Gocke¹⁴⁰, para desarrollar investigaciones destinadas a solucionar problemas de contaminación relacionados con sustancias tóxicas como los plaguicidas.

El conocimiento acerca de la capacidad biodegradativa de RAE2, indica que la cepa puede emplearse en investigaciones enfocadas a la biorremediación de contaminantes orgánicos como el Endosulfan; un mejor rendimiento por parte del aislado podría lograrse mediante el uso de cultivos mixtos, la optimización de las condiciones de biodegradación y/o mediante manipulación genética del microorganismo a través de la modificación del genoma de manera controlada,

¹³⁸ OEA. Organización Estados Americanos. ERTOLA *et al.*, Programa de monografías científicas : Monografía de Microbiología Industrial Estados Unidos, Sf. (consultada en junio de 2006).[[En línea] <http://www.biologia.edu.ar/microind/introduccion.htm>

¹³⁹ MARTENS *et al.*, Op.cit., p. 853-858.

¹⁴⁰ GOCKE K. citado por Rheinheimer, Op.cit., p. 245.

como se ha comprobado con otros microorganismos empleados en procesos de biorremediación de contaminantes xenobióticos con los que se ha garantizado la eficacia de los procesos microbianos¹⁴¹. Sin embargo, es necesario que todo proceso se desarrolle primeramente *in situ* y comprobar si las alternativas con las que se pretenden obtener resultados efectivos para la degradación de compuestos tóxicos como el Endosulfan en este caso, no presenten efectos colaterales negativos cuando se extrapolen al medio ocasionando el desequilibrio de los ecosistemas o la generación de enfermedades, lo que conllevaría a que las alternativas se descarten o rectifiquen dentro de los procesos de biorremediación¹⁴².

5.3 CARACTERIZACION FENOTÍPICA DEL AISLADO RAE2

5.3.1 Descripción del aislado RAE2. En las tablas 14 y 15, se presenta el perfil bioquímico y las respuestas a las pruebas de resistencia a diferentes antibióticos obtenidos para el aislado RAE2. Los resultados obtenidos con un 99.9% de confiabilidad mediante el sistema MicroScan demostraron que el aislado RAE2 presentaba un perfil semejante al de ***Klebsiella pneumoniae***.

El perfil bioquímico con el que se identificó RAE2 según el sistema MicroScan se corroboró con el manual Bergey's en relación a las características diferenciales para ***K. pneumoniae***.

¹⁴¹ ATLAS *et al.*, Op. cit., p. 553-585.

¹⁴² *bid.*, p. 553-585.

Tabla 14. Perfil bioquímico obtenido para el aislado RAE2 mediante pruebas MicroScan.

PRUEBA	RESULTADO PRUEBA MICROSCAN	CARACTERISTICAS DIFERENCIALES PARA <i>K. pneumoniae</i> , según el manual Bergey's)
Respuesta gram	-	-
Glucosa (GLU)	+	+
Sucrosa (SUC)	+	+
Sorbitol (SOR)	+	+
Ramnosa (RAF)	+	+
Rafinosa (RHA)	+	+
Arabinosa (ARA)	+	+
Inositol (INO)	+	
Adonitol (ADO)	-	d
Melobiosa (MEL)	+	
Urea (URE)	+	+
H ₂ S	-	-
Indol (IND)	-	-
Lisina (LYS)	+	+
Arginina (ARG)	-	-
Ornitina (ORN)	-	-
Triptofano de aminasa (TDA)	-	
Esculina (ESC)	+	
Voges-proskauer (VP)	+	+
Galactosidasa (ONPG)	+	
Oxidación-fermentación (OF/G)	+	
Citrato de Simons (CIT)	+	+
Malonato (MAL)	+	+
Acetamida (ACE)	+	
Tartrato (TAR)	+	d
Nitrato (NIT)	+	
Cetrimida (CET)	-	
Gelatinasa (GEL)	+	+

d: manifestación débil

Fuente: MicroScan, 2006. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg *et al.*, 1986.

Tabla 15. Resultados de pruebas de resistencia ante antibióticos para RAE2.

ANTIBIOTICO	RESPUESTA
Amikacina	susceptible
Amoxicilina/Acido clavulónico	susceptible
Ampicilina/Sulbactan	susceptible
Ampicilina	intermedio
Cefazolina	susceptible
Cefepima	susceptible
Cefotaxima	susceptible
Ceftriaxona	susceptible
Ceftazidima	susceptible
Cefuroxima	susceptible
Cefalotina	susceptible
Ciprofloxacina	susceptible
Gentamicina	susceptible
Imepenem	susceptible
Levofloxacina	susceptible
Piperacilina/Tazobactam	intermedio
Piperacilina	susceptible
Tetraciclina	susceptible
Ticarcilina/Acido clavulónico	susceptible
Tobramicina	susceptible
Trimetopin Sulfa	susceptible

Fuente: MicroScan, 2006.

Según Constans¹⁴³ *et al.*, ***Klebsiella pneumoniae***, es una especie común en hábitat terrestres y acuáticos que al igual que otras especies de su mismo género se presenta numerosamente en aguas residuales.

K. pneumoniae como fue caracterizado bioquímicamente el aislado RAE2 por el sistema MicroScan, presenta las características acordes a la cepa ***K. pneumoniae*** descrita en el manual Bergey's¹⁴⁴ de taxonomía bacteriana, en el que se encuentra agrupada dentro de la familia de enterobacterias, bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, con metabolismo respiratorio y fermentativo. La mayoría de miembros de este género se encuentran recubiertos por una notable cápsula de polisacáridos; algunas especies presentan habilidad para fijar nitrógeno solo

¹⁴³ INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD HIGIENE EN EL TRABAJO. CONSTANS *et al.*, NTP 473: Estaciones depuradoras de aguas residuales: riesgo biológico. España, 2006 (citada en febrero de 2006).[En línea] http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_473.htm

¹⁴⁴ KRIEG *et al.*, Op cit., p. 461.

cuando se encuentran en condiciones anaeróbicas, estas características se describen de manera particular para este género. En relación a los resultados obtenidos por el sistema MicroScan y la comparación respectiva con el manual Bergey's se compara con similitud una identificación parcial de manera bioquímica de la cepa ***K. pneumoniae*** RAE2 aislada en el presente trabajo de investigación.

Estudios relacionados acerca de la actividad degradativa de ***K. pneumoniae*** sobre compuestos tóxicos como el Endosulfan, han demostrado la capacidad de la especie para metabolizar dicho plaguicida; Kwon¹⁴⁵ *et al.*, afirma que ***K. pneumoniae*** cepa KE-1 como fue nombrada en una de sus investigaciones, presentaba mayor actividad degradativa que otros aislados bacterianos capaces de crecer en el mismo medio; respecto a ello, el haber logrado el aislamiento de la cepa ***K. pneumoniae*** RAE2 en el presente ensayo, es un resultado importante para trabajar con la cepa en trabajos de biorremediación, llevando a cabo de manera previa ensayos *ex situ*.

Uno de los resultados más significativos de la investigación realizada por Kwon¹⁴⁶ *et al.*, se enfatizó en que la cepa ***K. pneumoniae*** no formaba sulfato de Endosulfan (Endosulfato) el principal producto metabólico del Endosulfan, caracterizado por su alta volatilidad y por ser una sustancia mucho más peligrosa que su compuesto de partida; por tanto, esta puede ser una de las razones más importantes para realizar ensayos con la cepa ***K. pneumoniae*** RAE2 aislada en este estudio, conociendo que los productos finales obtenidos por la degradación del plaguicida Endosulfan, no serán más peligrosos que el compuesto inicial.

Respecto a la efectividad de ***K. pneumoniae*** en procesos de biodegradación como lo demuestran diversas investigaciones en las que se concluye que la cepa en mención presenta un alto potencial como biocatalizador para la biorremediación de ambientes contaminados con Endosulfan, la cepa aislada del RSA e identificada como ***K. pneumoniae*** RAE2 con capacidad de crecer en medios de cultivo suplementados con Endosulfan como única fuente de carbono, puede ser un microorganismo adoptado en los tratamientos de biorremediación de lixiviado del RSA con presencia del plaguicida Endosulfan.

La posibilidad de realizar ensayos con ***K. pneumoniae*** RAE2 en los procesos de descontaminación en el RSA de la ciudad de Pasto también se ve favorecida al reconocer que esta especie presenta requerimientos de oxígeno; según Atlas¹⁴⁷ *et al.*, en la mayoría de pruebas de biodegradabilidad realizadas bajo condiciones aerobias la gama de compuestos químicos degradables es mayor y su degradación es más rápida que en condiciones anóxicas.

¹⁴⁵ KWON *et al.*, Op. cit., 2002.

¹⁴⁶ Ibid.,

¹⁴⁷ ATLAS *et al.*, Op. cit., p. 555.

En los procesos de degradación del plaguicida Endosulfan también ha sido reportada *K. oxytoca*, que ha diferencia de *K. pneumoniae* presenta capacidad para degradar sulfato de Endosulfan, el metabolito tóxico producto de la degradación del Endosulfan; esta especie ha sido considerada de igual manera por Kwon¹⁴⁸ *et al.*, como otro de los biocatalizadores mas importantes para la biorremediación de Endosulfan; respecto a los reportes acerca de la presencia de esta especie en la biodegradación de Endosulfan es posible que uno de los aislados bacterianos RAE1 y RAE3 que no fueron identificados, puedan ser esta especie o uno de los géneros reportados por Bu'lock¹⁴⁹ *et al.*, entre los que se encuentran representantes de los géneros ***Pseudomonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Corynebacterium, Mycobacterium, Candida***, y la especie ***Cunninghamella elegans***, microorganismos reconocidos por su capacidad para biodegradar hidrocarburos aromáticos policíclicos e hidrocarburos halogenados de los que hacen parte el plaguicida Endosulfan.

El haber logrado el aislamiento de tres morfotipos a partir de los lixiviados generados en el RSA, concibe la posibilidad de emplear cultivos mixtos, llevando a cabo previamente la identificación de los aislados RAE1 y RAE3. El uso de los cultivos mixtos, puede considerarse una alternativa para la biorremediación del xenobiótico Endosulfan, teniendo presente que este mecanismo es considerado como uno de los procesos mas eficaces en los procesos de biodegradación de compuestos peligrosos, en los que mediante actividades bioquímicas sinérgicas en consorcios microbianos se conduce al reciclado total de compuestos relativamente recalcitrantes que agrupan xenobióticos como el plaguicida Endosulfan, según lo afirma Atlas¹⁵⁰ *et al.*,

¹⁴⁸ KWON *et al.*, Op. cit., 2005.

¹⁴⁹ BU'LOCK *et al.*, Biotecnología Básica. España : Acribia, S. A., 1991, p. 234.

¹⁵⁰ ATLAS *et al.*, Op. cit., p. 531-532.

6. CONCLUSIONES

1. A partir de muestras de lixiviado producido en el RSA, se aislaron los morfotipos RAE1, RAE2 y RAE3, aislados que presentaron capacidad para degradar el plaguicida Endosulfan. Según ensayos relacionados con la producción de biomasa y resistencia a diferentes concentraciones de Endosulfan en los que se evaluó al cabo de 70 horas el crecimiento celular de los aislados, se determinó a RAE2 como el aislado más eficiente para degradar Endosulfan; el crecimiento experimentado por RAE2 se explicó a partir de un modelo exponencial ($R= 0.929$), los valores de biomasa obtenidos para RAE2 a diferentes concentraciones del plaguicida permitieron conocer el punto óptimo de crecimiento del aislado en mención.
2. Con el aislado seleccionado (RAE2) se llevó a cabo la cinética de crecimiento; teniendo presente la biomasa producida como los valores de Endosulfan residual calculados mediante cromatografía de gases, se conoció para RAE2 la velocidad específica de crecimiento (μ) con un valor de 0.0095g/L hora, la velocidad específica de consumo de sustrato $q_s=0.027g.L^{-1}$ / hora y el rendimiento $Y= x/s$ 35%. Estos valores permitieron conocer el comportamiento de RAE2, información importante en la aplicación del aislado en procesos de biorremediación.
3. El aislado RAE2 se identificó parcialmente de manera fenotípica mediante pruebas MicroScan, el sistema determinó con un 99.9% de confiabilidad que el perfil bioquímico obtenido para RAE2 era semejante al de *K. pneumoniae*. La caracterización parcial bioquímica se corroboró con la el manual Bergey's de taxonomía bacteriana según lo reportado para la especie *K. pneumoniae*.

7. RECOMENDACIONES

1. La identificación de las cepas RAE1 y RAE3 pueden aportar un nuevo conocimiento acerca de otras especies bacterianas que utilizan el Endosulfan como única fuente de carbono, por lo tanto se recomienda realizar la caracterización de los aislados mencionados que se encuentran preservados en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Nariño.
2. Es de gran importancia que el aislado RAE2, caracterizado fenotípicamente como ***K. pneumoniae***, sea caracterizado de manera genotípica, de tal forma que respalde confiabilidad a los resultados obtenidos.
3. El realizar pruebas con ***K. pneumoniae*** RAE2 en las que se optimicen las condiciones del medio de cultivo de manera controlada, podrían en alguna medida favorecer el rendimiento de la cepa así como el incremento de biomasa y la velocidad de degradación del plaguicida, de tal forma que puedan ser aportes positivos para el uso de la especie en investigaciones *in situ* aplicadas a la biorremediación de líquidos lixiviados producidos en RS con presencia de compuestos xenobióticos como el Endosulfan.
4. El uso de cultivos mixtos en los que se utilicen los microorganismos aislados en esta investigación, puede beneficiar los procesos de degradación de contaminantes como los plaguicidas presentes en los lixiviados generados en el RSA, con la posibilidad de que al obtener resultados eficaces se amplíen hacia otros RS.
5. Se recomienda hacer realizar un diseño simultaneo entre los tres aislados, en relación a las pruebas de producción de biomasa y resistencia a diferentes concentraciones de Endosulfan, como llevar a cabo la cinética de crecimiento y la cuantificación de Endosulfan residual, con el fin de conocer por igual el comportamiento de los tres aislados bacterianos.

BIBLIOGRAFIA

AGUIRRE, S. ALDANA, D. MARTINEZ, M. MARTINEZ, P. Evaluación de la capacidad degradadora de *Pseudomonas* Fluorescentes y enterobacterias sobre el plaguicida 2,3 dihidro 2,2 dimetilbenzofurano 7-metil carbamato; aislados del humedal de la conejera en Santa Fe de Bogota. En: CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL. (2º : 1999: Santa Fé de Bogotá). Memorias del II Congreso de Microbiología Ambiental. Santa Fé de Bogotá, 1999, p. 101-105.

ALBERT Lilia A. Toxicología Ambiental. México : Limusa, 1988, 290. p.

----- y RENDÓN-VON OSTEN, Jaime. Contamination by organochlorine compounds in some foodstuffs from Region of Mexico. En: Revista de Salud Pública. 22 (6) (Dic 1998).

APHA – AWWA – WPCF. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Madrid - España: Díaz de Santos. S. A. 1992. Sec 1 – 10:221.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Center for disease Control (CDC): ToxFAQs™ for Endosulfan. Atlanta, 2001 (citado en marzo de 2005). [En línea] http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts12.html.

-----, ToxFAQs™ for Heptachlor/Heptachlor Epoxide. Atlanta, 1993 (citado en marzo de 2005). [En línea] http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts12.html.

-----, ToxFAQs™ for Hexaclorobenceno. Atlanta, 1993 (citado en marzo de 2005). [En línea] http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts90.pdf.

ATLAS Ronal M y BARTHA Richard. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Madrid - España : Prentice Hall. 2002. 677 p.

BASTIDAS, Elizabeth, BENAVIDES, Yolanda y BRAVO, Patricia. Estandarización y validación del método cromatográfico para la determinación y seguimiento de pesticidas organoclorados en el proceso de tratamiento de lixiviados del Relleno Sanitario Antanas de la ciudad de San Juan de Pasto – Colombia. Trabajo de grado (Química) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. 2005. 147 p.

BU'LOCK, John y KRISTIANSEN, Bjorn. Biotecnología Básica. Zaragoza – España : Acribia, S. A., 1991. 557 p.

BURBANO F. Oscar. Tratamiento biológico de lixiviados del relleno sanitario Antanas por filtros anaeróbicos. Trabajo de grado (Biología con énfasis en microbiología) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, 2002. 104 p.

COLLINS C, H y LYNE, Patricia M. Métodos Microbiológicos. Zaragoza – España : Acribia, S.A., 1989. 524 p.

CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL. (2º : 1999: Santa Fé de Bogotá). Memorias del II Congreso de Microbiología Ambiental. Pontificia Universidad Javeriana. Dpto. de Microbiología. Santa Fe de Bogotá : (May 19-21), 1999. 201 p.

CONSTABEBER Ijoni, EMANUELLI Tatiana. Influence of alimentary habits on organochlorine concentrations in adipose tissue. En: Ciencia y Tecnología de alimentos. 22(1), (Ene-Abr 2002).

CORPONARIÑO. Manejo integral de residuos sólidos. v. 1, 2, 3, 4. San Juan de Pasto, 2001.

COTORAS Davor. Los derrames incontrolados. En: Biohídrica : Induambiente. 3(17), (1995), p. 70-72.

EPA. Environmental Protection Agency. Persistent Bioaccumulative and Toxic (PBT) chemical program: Aldrin/Dieldrin. Washington, 2004. (citado en abril de 2005). [En línea] <http://www.epa.gov>

ESPITIA S, VARGAS C, DIAZ M.C, ALAZARD D. Cuantificación de los principales grupos microbianos presentes en lodos de plantas de tratamiento anaerobio. En: CONGRESO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL. (2º : 1999: Santa Fé de Bogotá). Memorias del II Congreso de Microbiología Ambiental. Santa Fé de Bogotá, 1999, p. 147-150.

GLAZER N Alexander y NIKARDO H. Microbial Biothechnology. En: Fundamentals of applied Microbiology. Estados Unidos: WH freeman and company, 1995.

HORVALT R.S. Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. En: Bacteriological Reviews. 36(2) (Jun 1972); p. 146–155.

INSTITUTO DE CATÁLISIS Y PETROLEOQUÍMICA. KNAPP, Carlos. Procesos para la reducción de emisiones gaseosas de compuestos organoclorados. Madrid, 2004 (citada en enero de 2005). [En línea] <http://www.estrucplan.com.ar>.

INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGIA. Hexaclorobenceno (HCB). México, 2004 (citada en febrero de 2004). [En línea] <http://www.ine.gob.mx/index.html>.

INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD HIGIENE EN EL TRABAJO. CONSTANS A. Angelina, ALONSO E. Rosa María y MARTI S. M^a Carmen. NTP 473: Estaciones depuradoras de aguas residuales: riesgo biológico. España, 2006. (citada en febrero de 2006). [En línea] http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_473.htm.

JAGNOW Gerhard y WOLFGANG David. Biotecnología: introducción con experimentos modelo. España : Acribia., S,A. 1991. 251 p.

KALOYANOVA Fina P y EL BATAWI Mostafa A. Human Toxicology of Pesticidas. Estados Unidos : CRC Press. 1991. 196 p.

KENNETH, R. Análisis Instrumental. España : Pearson Educación. 2001. 430 p.

KIELY Gerard. Ingeniería Ambiental. Fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión. Aravaca – España: Mc Graw Hill. 1999. 841 p.

KONNEMAN Elmer, ALLEN Stephen, JANDA William, SCHRECKENBERGER Paul y WASHINGTON Winn. Color atlas and textbook of Diagnostic Microbiology. Estados Unidos : Lippincott Williams & Wilkins. 1997. 5 ed. 1395 p.

KRIEG Noel. R y HOLT John G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Estados Unidos : Williams & Wilkins. 1986. 6 ed. v.1. 964 p.

KWON GS, KIM JE, SOHN HY, SHIN KS, KIM TK, HOH SC, y KIM DJ. *Klebsiella pneumoniae* KE-1 degrades endosulfan without formation of the toxic metabolite, endosulfan sulfate. En: FEMS Microbiol Lett. 215(2) Oct 2002); 255-259 p.

KWON GS, KIM JE, SOHN HY, SHIN KS, SEO BI. Biodegradation of the organochlorine insecticide, Endosulfan, and the toxic metabolite, Endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8. En: Applied Microbiology and Biotechnology. 67(6) (Jun 2005); 845-850 p.

LABORATORIOS ESPECIALIZADOS UNIVERSIDAD DE NARIÑO. Sección de aguas. Informe sobre la composición de líquidos lixiviados presentes en el RSA. 2004.

LAGREGA D. Michael, BUCKINGHAM L. Phillip y EVANS C. Jeffrey. Gestión de residuos tóxicos: Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Aravaca – España : Mc Graw Hill. v.2, 1996. 643-1261 p.

LEDIRAC Natalie, ANTHERIEU Sebastian, DUPUY D. Anne, CARON J. Claude y RAHMANI Roger. Effects of Organochlorine Insecticides on MAP Kinase Pathways in Human HaCaT Keratinocytes: Key Role of Reactive Oxygen Species. En: Toxicological Sciences. 86(2) (May-2005); 444-452 p.

LEENN M.J, ROBINSON G.K, STRATFORD J. y KNOWLES C.J. Microbial degradation of PCBs by a two-stage process. En: INTERNATIONAL SYMPOSIUM/WORKSHOP ON ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY. (1994 : Waterloo). Waterloo : (Jul 4-8), 1994.

LEVIN, Morris y GEALTH, Michael A. Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos: selección, estimación, modificación de microorganismos y aplicaciones. España: Mc Graw Hill. 1997. 338 p.

LIXIVIADOS PROCEDENTES DE LOS RS. En: Revista Ambientum. 2002 (citada en febrero de 2005) [En línea] <http://www.ambientum.com/revista/>

LOZADA Juan J, BASTIDAS Adriana, BENAVIDES Norma, BRAVO Lida P. Seguimiento de pesticidas organoclorados en el proceso de tratamiento de lixiviados. En: CONGRESO COLOMBIANO DE CROMATOLOGRAFIA (4º : 2005 : Bogotá, D. C). Resúmenes del IV Congreso Colombiano de Cromatografía. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2005, PC 22. 127 p.

MADIGAN Michael, MARTINKO John, y PARKER Jack. BROCK. Biología de los microorganismos. España : Prentice Hall. 2004. 10 ed. 1011 p.

MARGALITH P. Pigment microbiology. Londres : Chapman & Hall. 1992.

MARTENS, Rainer. Degradation of [8,9-¹⁴C] Endosulfan by Soil Microorganisms. En: Applied and Environmental Microbiology. 31(6) (Jun 1976); 853-858 p.

MICROSCAN. Dried Gram Negative Procedural Manual. Dade Behring : Estados Unidos. 2004. 8 p.

METCALF & EDDY. Ingeniería Sanitaria: Tratamiento, Evacuación y Reutilización de Aguas Residuales. España: Labor, S. A. 1985. 2 ed. 969 p.

----- . Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, Vertido y Reutilización. España: Mc Graw Hill, 1995. 3 ed, v.1. 754 p.

OEA. Organización Estados Americanos. ERTOLA Rodolfo, YANTORNO Oswaldo Y MIGNONE Carlos. Programa de monografías científicas : Monografía de Microbiología Industrial. Estados Unidos, sf. (consultada en junio de 2006).[[En línea] <http://www.biologia.edu.ar/microind/introduccion.htm>

PARRA C. Sandra P y PAEZ M. Marta I. Determinación de plaguicidas organoclorados en agua por cromatografía de gases. En: SIMPOSIO INTERNACIONAL Y NACIONAL: EFECTOS DE LOS PLAGUICIDAS SOBRE EL AMBIENTE Y LA SALUD HUMANA. (2º y 3º : 1994: Palmira) Memorias del II Simposio Internacional y III Nacional: Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud humana. Palmira : 1994. 129 p.

POGELL, Burton M. Bioremediation of pesticides and herbicides by *streptomycetes*. En: INTERNATIONAL SYMPOSIUM/WORKSHOP ON ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY. (1994 : Waterloo). Waterloo : (Jul 4-8), 1994.

RHEINHEIMER Gerhard. Microbiología de las aguas. España : Acribia, S. A. 1987, 299 p.

SALAZAR CANO, Roberto. Ingeniería Ambiental. Dpto de Diseño y Construcción. Universidad de Nariño. Facultad de Ingeniería. San Juan de Pasto, 2000. 540 p.

SIDDIQUE, Tariq, OLEKE, Benedict C, ARSHAD, Muhammad y FRANKENBERGER, William T. Enrichment and Isolation of Endosulfan-Degrading Microorganisms. En: Journal of Environmental Quality. 32 (1) (Ene-Feb2003), p 47-54.

SOMASEGARAN P y HOBEN H. Methods in Legume - Rhizobium Tecnology. Institute of Tropical Agriculture y human resources. Department of Agronomy and Soil science. University of Hawaii. 1985. 360 p.

STOKER H. Stephen y SEAGER L. Spencer. Química ambiental: Contaminación del aire y del agua. España : Blume, 1981. 320 p.

SUTHERLAND Tara D, HORNE Irene, HARCOUT Rebecca L, OAKESHOTT Jonh G, RUSELL Robyn J. Isolation and characterization of a Mycobacterium strain that metabolizes the insecticide endosulfan. En: Appl Microbiol. 93(3) (2002); p. 380-389.

-----, y LACEY Michael J. Enrichment of an Endosulfan-Degrading Mixed Bacterial Culture. En: Applied and Environmental Microbiology. 66(7) (Jul 2000); 2822-2828 p.

TIBANTA G. Shirley y SOLARTE Bismar. Efecto de microorganismos en la degradación in vitro de lixiviados del antiguo relleno sanitario de la ciudad de San Juan de Pasto. Trabajo de grado (Biología con énfasis en Microbiología) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, 2003. 106 p.

TCHOBANOGLIOUS George, THEISEN Hilary y VIGIL Samuel A. Gestión integral de residuos sólidos. España : Mc Graw Hill. 1994. v.1,v.2. 1107 p.

WANIA, F y MACKAY D. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. En: Environmental Science and Technology, 1996; 30 (9): 390- 396.

WHO. World health organization. ROSS S. Peter y BRINBAUM Linda S. Case studies. Persistent Organic Pollutants (POPs) in humans and Wildlife. Geneva: WHO. 2001. 26 p.

ANEXOS

Anexo A. Parámetros físico-químicos registrados durante la recolección de las muestras de lixiviado en el RSA (laguna aerobia) en los laboratorios del RSA (2005).

PARAMETRO	MEDIDA
Temperatura ambiental	18°C
Oxígeno disuelto a 50 cm (ppm)	1.16
Temperatura laguna aerobia	24.9

Anexo B. Parámetros físico-químicos del lixiviado recolectado, obtenidos en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño Sección de aguas.

PARAMETRO	MEDIDA
pH	6.98
Sólidos suspendidos (mL/L-h)	479.5
Sólidos totales (mg/L)	9047.8
Nitrógeno	2300.3
Fósforo mg/L	53.3
Grasas y aceites mg/L	30.1
DBO ₅	4354.9
DQO	6094.9

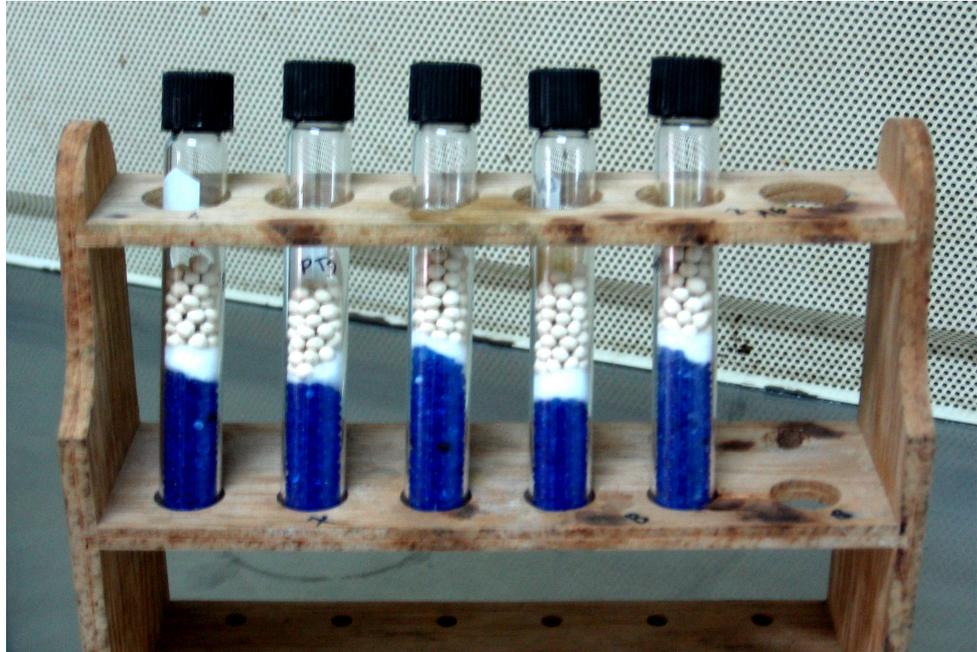
Fuente: Laboratorios Especializados Universidad de Nariño. Sección de aguas (2005)

Anexo C. Caldo de enriquecimiento selectivo diseñado por Aguirre *et al.*,

- K_2HPO_4 0.1g/L
- $MgSO_4$ 0.075g/L
- $CaCO_3$ 0.036g/L
- NaCl 5 g/L
- Carbofuran 10mL/L como única fuente de Carbono

Anexo D. Fotografías de preservación de los aislados RAE1, RAE2, RAE3.

- Preservación en perlas de porcelana



- Preservación en agar inclinado



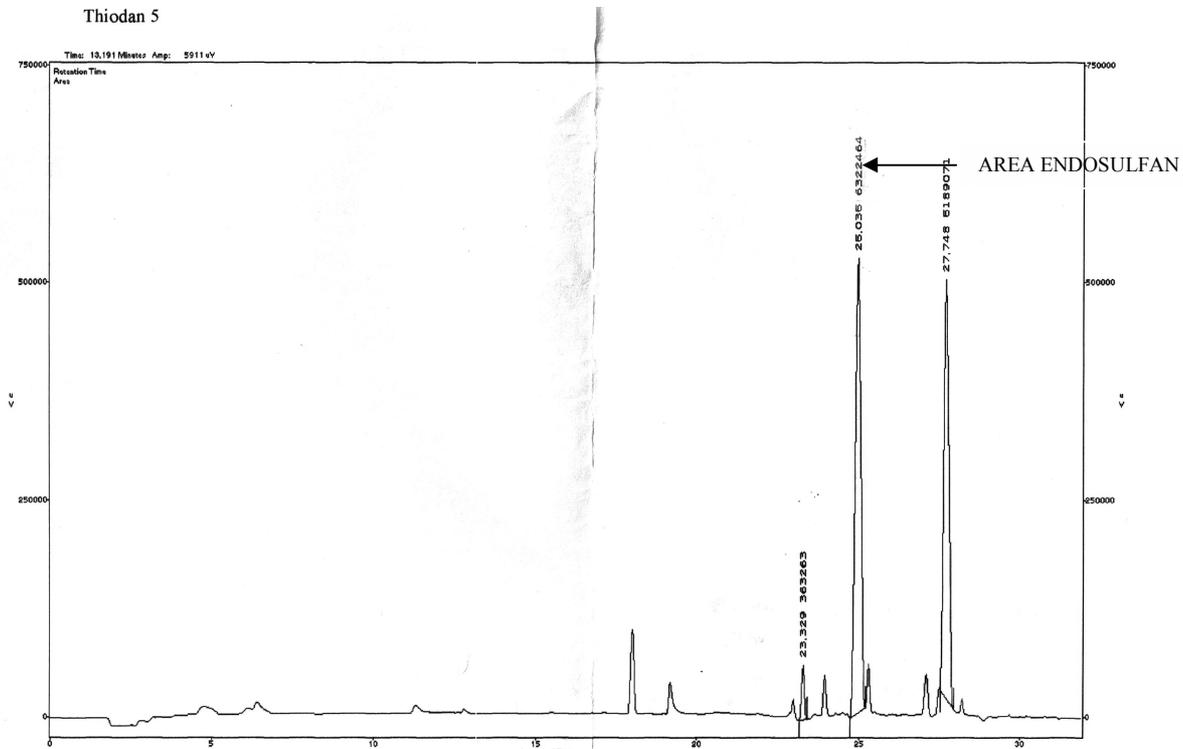
- Preservación por congelación.



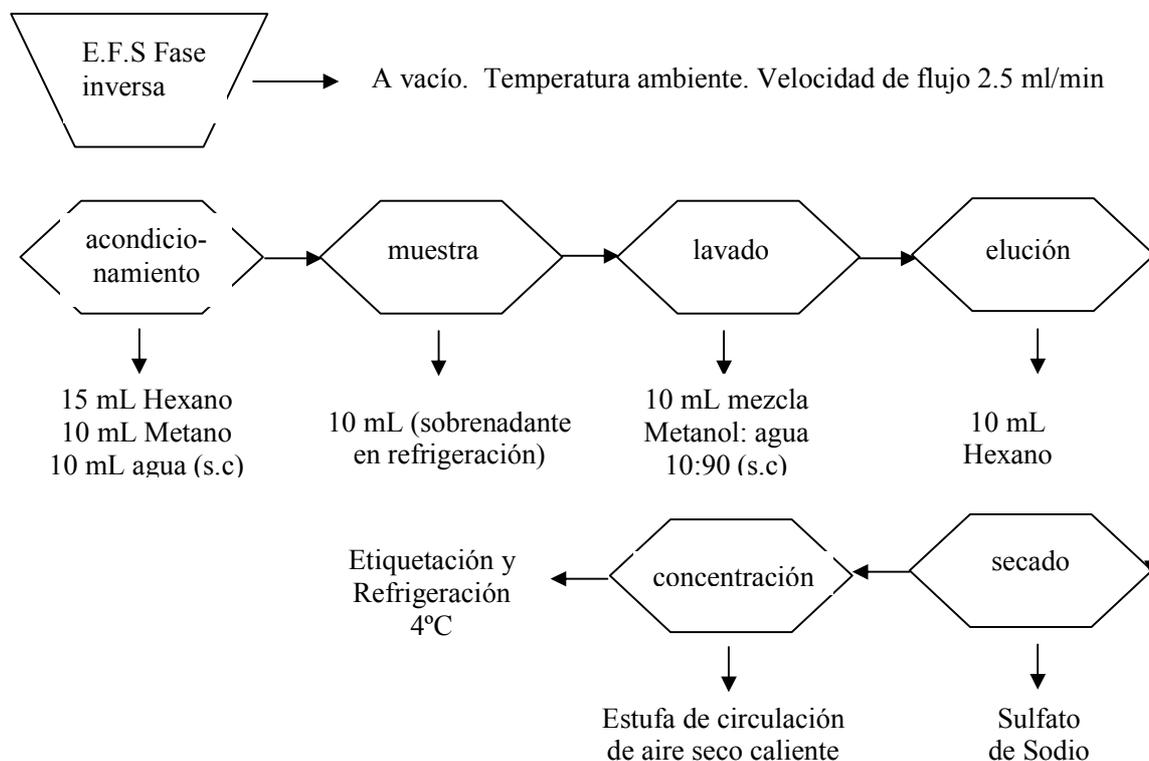
Anexo E. Valores de biomasa y cuantificación de Endosulfan residual calculados para el aislado RAE2.

TIEMPO	BIOMASA PRODUCIDA(gr/L)	CUANTIFICACION DE ENDOSULFAN RESIDUAL(gr/L)
0	0.060	0.0051
6	0.063	0.0037
12	0.066	0.0030
18	0.070	0.0024
24	0.080	0.0023
30	0.086	0.0021
36	0.090	0.0019
42	0.103	0.0018
48	0.130	0.0017
54	0.130	0.0015
60	0.133	0.0013

Anexo F. Cromatograma obtenido para determinar la presencia de Endosulfan en la muestra de lixiviado.



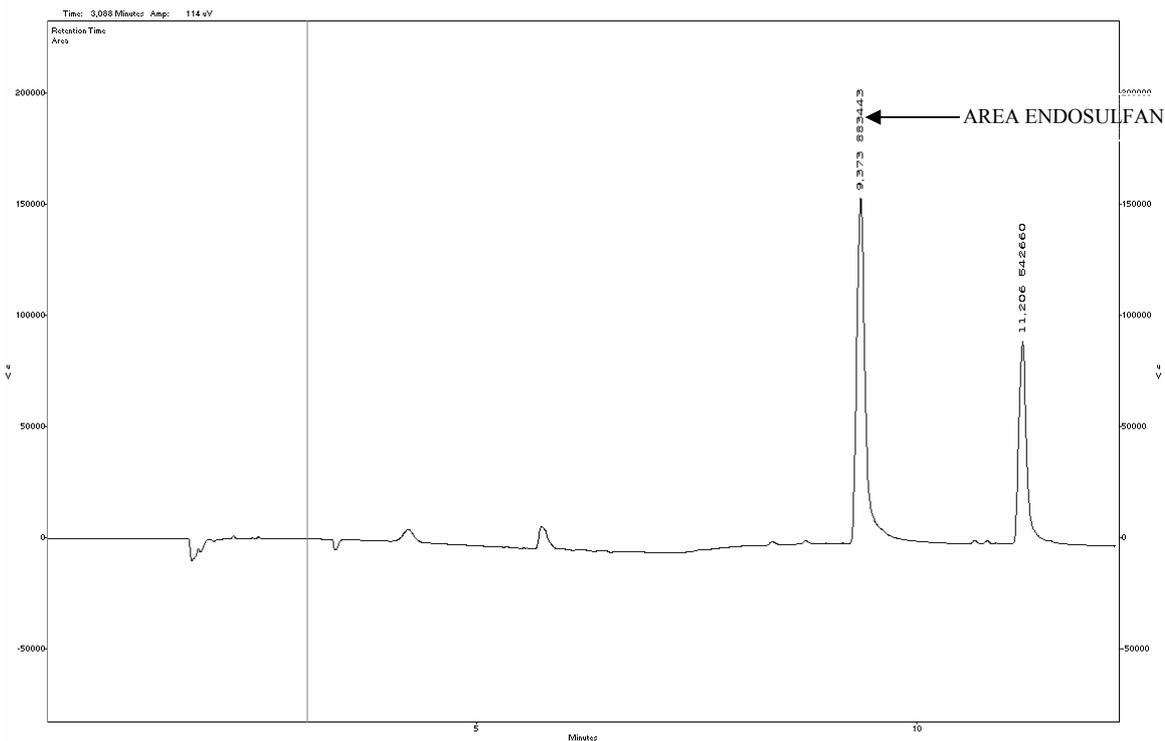
Anexo G. Esquema del método de Extracción en Fase Sólida (EFS) empleado para la obtención del analito de interés (plaguicida Endosulfan), a partir de los primeros sobrenadantes refrigerados.



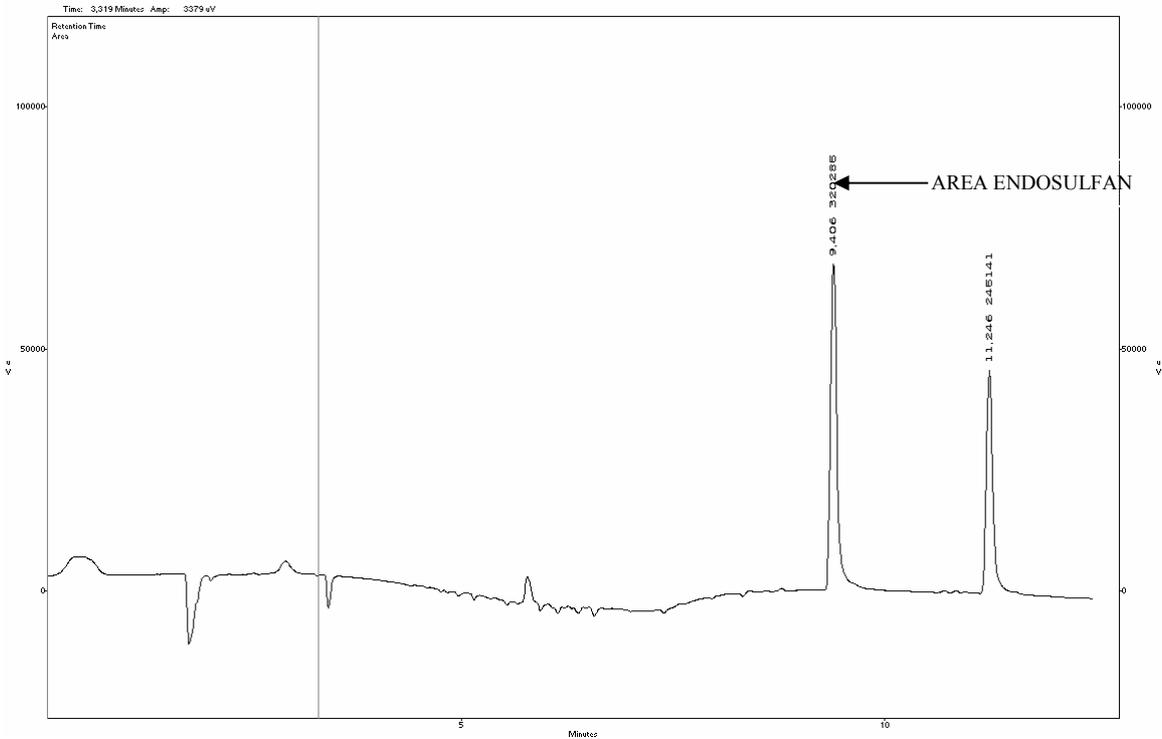
Fuente: Tesis de grado : Estandarización y validación del método cromatográfico para la determinación y seguimiento de pesticidas organoclorados en el proceso de tratamiento de lixiviados del Relleno Sanitario Antanas de la ciudad de San Juan de Pasto – Colombia. Bastidas *et al.*, 2005.

Anexo H. Cromatogramas obtenidos después del tratamiento EFS aplicado a las muestras refrigeradas, para la identificación y cuantificación de Endosulfan residual (muestras 1, 6, 11).

Muestra 1.



Muestra 6.



Muestra 11.

