

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN AERÓBICA DE TOXAFENO EN SUELOS
CONTAMINADOS DE EL COPEY, CÉSAR**

IVÁN RICARDO PRIETO ORTEGÓN

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título de

MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Bogotá, D.C., Diciembre de 2014

NOTA DE ADVERTENCIA

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1946.

**ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN AERÓBICA DE TOXAFENO EN SUELOS
CONTAMINADOS DE EL COPEY, CÉSAR**

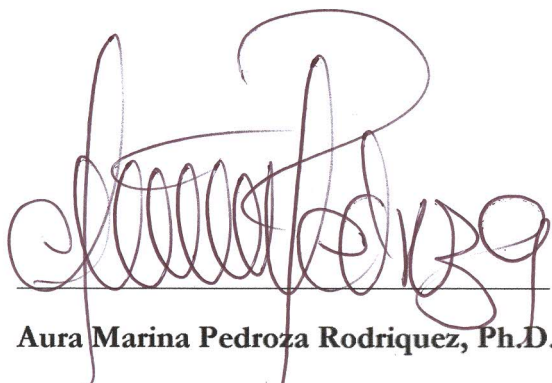
IVÁN RICARDO PRIETO ORTEGÓN

Aprobado



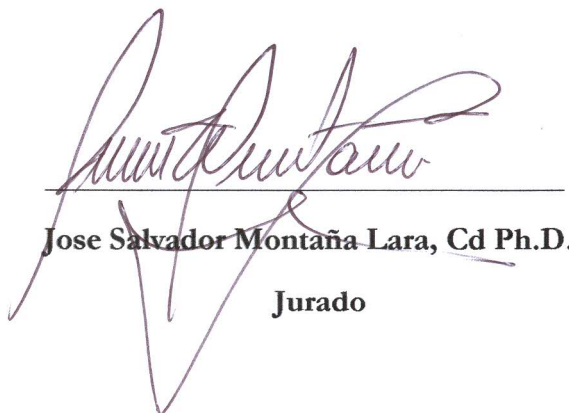
Ziv Arbeli, Ph.D

Director



Aura Marina Pedroza Rodriguez, Ph.D.

Jurado



Jose Salvador Montaña Lara, Cd Ph.D.

Jurado



Pedro Filipe de Brito Brandão, Ph.D.

Jurado

**ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN AERÓBICA DE TOXAFENO EN SUELOS
CONTAMINADOS DE EL COPEY, CÉSAR**

IVÁN RICARDO PRIETO ORTEGÓN

Aprobado

Concepción Judith Puerta Bula, Ph.D

Decana

Manuel Antonio Franco Cortes, Ph.D

Director del Posgrado

*Dedicado a mis papás Clemencia Ortega y Ricardo Prieto,
A Margarita Gómez que desde el cielo siempre me ha acompañado*

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor y profesor el Dr. ZivArbelipor la paciencia, dedicación y buenos consejos para el desarrollo de este trabajo.

A Colciencias por la financiación de este trabajo.

A Corpocesarporbrindarnos la oportunidad de desarrollar este trabajo con los suelos contaminados con toxafeno.

Al Dr. Fabio Roldán por sus aportes en los seminarios y la enseñanza en las clases.

A Alejandro Reyes por su amabilidad y gran colaboración durante el desarrollo de este proyecto.

A Paola Palacios por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas.

A Hernán Avellaneda por su amistad.

A los integrantes del laboratorioGeBixpor los buenosmomentos.

A Yaris porsuamabilidad y por siempre estar pendiente del laboratorio.

A Doña Myriam por su gentileza y por estar siempre pendiente de nosotros.

Y a todas y todos aquellos en el laboratorio USBA y otros laboratorios que me conocieron y compartieron conmigo.

Cada día sabemos más y entendemos menos

-Albert Einstein-

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ANEXOS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 Compuestos halogenados.....	6
2.1.1 Características generales.....	6
2.1.2 Contaminantes orgánicos persistentes (COP).....	6
2.1.3 Toxafeno.....	7
2.1.4 Destino e impacto ambiental de toxafeno.....	9
2.2 Biodegradación de compuestos halogenados.....	10
2.2.1 Mecanismos de deshalogenación.....	10
2.2.2 Biodegradación de COPs.....	11
2.3 Biodegradación de toxafeno.....	15
2.3.1 Degradación anaeróbica.....	16
2.3.2 Degradación aeróbica.....	17
2.4 Métodos de biorremediación de toxafeno.....	18
2.4.1 DARAMEND®.....	19
2.4.2 Harina de sangre.....	19
2.4.3 Gene Expression Factor.....	20
2.4.4 Xenorem.....	20
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo general.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1 Reactivos químicos.....	22
4.2 Origen de las muestras.....	22
4.3 Aislamientos directos.....	23
4.4 Cultivos de enriquecimiento con camfor.....	24
4.5 Degradación de toxafeno por cultivos de enriquecimiento con camfor.....	24
4.6 Aislamiento de bacterias a partir de cultivo enriquecido con camfor.....	25
4.7 Identificación de bacterias aisladas de cultivos de enriquecimiento.....	25
4.7.1 Descripción micro y macroscópica de las cepas.....	25
4.7.2 Extracción ADN de las cepas.....	25
4.7.3 Amplificación del gen 16S ARNr.....	26
4.7.4 Secuenciación y análisis de los productos de PCR.....	27
4.8 Evaluación de la degradación de camfor por las cepas.....	27
4.9 Degradación de toxafeno por cepas degradadoras de camfor.....	28
4.10 Evaluación de posibles estrategias para la biorremediación aerobia de toxafeno.....	28

4.10.1	Determinación del % de humedad y % de capacidad de campo se los suelos de El Copey.....	28
4.10.2	Montaje microcosmos.....	29
4.11	Cuantificación de camfor y toxafeno.....	30
4.11.1	Extracción líquido-líquido de camfor y toxafeno.....	30
4.11.2	Extracción sólido-líquido de toxafeno.....	31
4.11.3	Cuantificación de camfo rpor GC-FID.....	31
4.11.4	Cuantificación de toxafeno por GC-ECD.....	31
4.11.5	Porcentajes de recuperación de toxafeno, 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno, PCB No. 209 y camphor.....	32
5.	Resultados.....	33
5.1	Aislamientos directos.....	33
5.2	Cultivos de enriquecimiento con camphor.....	33
5.3	Evaluación de la degradación de toxafeno por cultivos de enriquecimiento.....	35
5.4	Aislamiento e identificación de cepas aisladas a partir de cultivos de enriquecimiento.....	39
5.5	Evaluación de la degradación de camfor por cepas puras.....	44
5.6	Evaluación de la degradación de toxafeno por cepas puras.....	47
5.7	Degradación de toxafeno en microcosmos aerobios.....	49
6.	DISCUSIÓN.....	51
7.	CONCLUSIONES.....	55
8.	RECOMENDACIONES.....	56
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	57
10.	ANEXOS.....	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de COPs por la Convención de Estocolmo.....	7
Tabla 2. Estándares disponibles de diferentes congéneres de la mezcla técnica de toxafeno....	9
Tabla 3. Tratamientos evaluados en microcosmos.....	29
Tabla 4. Tiempos de retención y coeficientes de determinación de las curvas de calibración realizadas para cada compuesto.....	32
Tabla 5. Características macro y microscópicas de las cepas.....	39
Tabla 6. Cepas de referencia más cercanas a los microorganismos degradadores de camfor...	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras que componen la mezcla técnica de toxafeno.....	8
Figura 2. Esquema antiguas bodegas de CENALGODÓN.....	23
Figura 3. Crecimiento bacteriano por densidad óptica.....	33
Figura 4. Degradación de camfor en cultivos de enriquecimiento.....	34
Figura 5. Degradación de toxafeno por cultivos enriquecidos con camfor.....	35
Figura 6. Cambios en el perfil cromatográfico de toxafeno con biosólidos y camfor.....	36
Figura 7. Análisis por ventanas de la degradación de toxafeno.....	38
Figura 8. Árboles filogenéticos con cepas de referencia.....	40
Figura 9. Degradación de camfor y densidad óptica a 600nm de las cepas aisladas a partir de cultivo de enriquecimiento.....	46
Figura 10. Degradación de toxafeno por cepas puras.....	48
Figura 11. Degradación de toxafeno por microcosmos aerobios.....	49

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Parámetro físico-químicos del suelo del Copey.....	70
Anexo 2. Composición y preparación de medio mineral.....	71
Anexo 3. Determinación de los porcentajes de humedad y capacidad de campo del suelo de El Copey.....	72
Anexo 4. Análisis material de aporte microcosmos.....	73
Anexo 5. Cálculos y preparación de soluciones de nutrientes.....	75
Anexo 6. Curva de calibración para camfor rpor GC-FID.....	77
Anexo 7. Curva de calibración para el 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno y PCB No. 209.....	78
Anexo 8. Curva de calibración para toxafeno.....	80
Anexo 9. Prueba de Tukey para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con cultivos de enriquecimiento con camfor.....	81
Anexo 10. Integración del cromatograma de toxafeno en ventanas.....	82
Anexo 11. Curvas de calibración de cada ventana para el análisis de toxafeno.....	83
Anexo 12. Cromatogramas de camfor.....	85
Anexo 13. Porcentajes de recuperación de surrogates.....	93
Anexo 14. Diseño de primers para amplificación de regions relacionadas con el citocromo P450.....	94
Anexo 15. pH medido en algunos tratamientos de microcosmos en 4 eventos de muestreo....	95

LISTA DE ABREVIATURAS

COPsContaminantes Orgánicos Persistentes

CTTsComponents of Technical Toxaphene

BSBiosólidos

SCSuelos Copey

GC-FIDGas chromatography with flame ionization detector

GC-ECDGas chromatography with electron capture detector

RESUMEN

El toxafeno es una mezcla de cientos de compuestos policlorados y pertenece al grupo de contaminantes orgánicos persistentes (COPs). En Colombia este insecticida se aplicó en cultivos de algodón ubicados en El Copey, Cesar, al prohibirse su uso en los 90 fue almacenado inadecuadamente generando contaminación de suelos y agua subterránea. Por su alto grado de cloración, los estudios sobre la biodegradación se han centrado en condiciones anaerobias, y no se conoce el alcance de la degradación e aerobia. El objetivo de esta investigación fue estudiar la degradación aerobia de toxafeno y poder establecer estrategias para aplicar en campo. Inicialmente, se enriquecieron suelos del Copey y biosólidos en medio mineral con camfor como única fuente de carbono, al observar degradación de camfor (GC-FID) con estos cultivos se evaluó la degradación de toxafeno por GC-ECD. Se obtuvo degradación de toxafeno con los biosólidos junto con camfor, probablemente esto se debió a procesos cometabólicos. Asimismo, se aislaron 7 cepas degradadoras de camfor, de los géneros *Pandoraea*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Xanthobacter*, siendo éste último una posible nueva especie. La degradación de toxafeno por cepas puras se evaluó con los aislamientos de biosólidos pero no hubo degradación ni como única fuente de carbono, con camfor o con glucosa. Por otro lado, para determinar posibles estrategias en campo se realizaron ensayos en microcosmos con suelos del Copey y diferentes tratamientos: adición de camfor, material vegetal, biosólidos o melaza. Sin embargo, no se degradó el toxafeno en ninguno de los tratamientos mostrando la importancia de aplicar una fase anaerobia previa para facilitar la degradación aerobia. Al haber obtenido degradación de toxafeno con los cultivos de enriquecimiento, podría sugerirse la bioaumentación como posible tratamiento. Por último, este es el primer estudio que muestra degradación aerobia de toxafeno usando camfor.

Palabras claves: Toxafeno, camfor, cometabolismo, cultivos enriquecimiento, microcosmos.

ABSTRACT

Toxaphene is a mixture of hundreds of polychlorinated compounds and belongs to the group of persistent organic pollutants (POPs). In Colombia this insecticide was applied principally in cotton crops located in El Copey, Cesar, between 1974 and early 90s, after its prohibition it was stored improperly causing soil and groundwater contamination. Due to its higher chlorination, studies are principally in anaerobic conditions but aerobic degradation is not well understood. The objective of this study was to investigate degradation of toxaphene under aerobic conditions using camphor and to establish possible strategies to apply in-situ for biorremediation treatments. Initially, two enrichment cultures were done with soil from el Copey and biosolids in mineral media with camfor as a sole carbon source, until camfor degradation was achieved (GC-FID), toxaphene degradation was evaluated by GC-ECD. Degradation was observed only with biosolids with camphor, probably by cometabolic processes. Also, 7 camphor degraders strains were isolated, which were identified and affiliated to the genres *Pandoraea*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Gordonia*, *Rhodococcus* and *Xanthobacter*, the last could be a new species. Toxaphene degradation by pure strains were evaluated only with strains from biosolids but no degradation was observed with toxaphene as a sole carbon source, with camphor or with glucose. On the other hand, the evaluation of possible strategies for field application was done with soil from el Copey in microcosm with the following treatments: camphor addition, pine and cypress leaves, biosolids and molasses. However, microcosms experiments did not show toxaphene degradation suggesting that a previous anaerobic phase is required to enhance aerobic degradation. Although, degradation was obtained from enrichment cultures with camphor, suggesting bioaugmentation for field application. Finally, this is the first report that showed stimulation of toxaphene degradation under aerobic conditions using camphor.

Key words: Toxaphene, camphor, cometabolism, enrichment cultures, microcosms.

1. INTRODUCCIÓN

El toxafeno era producido por la cloración del α -pineno o canfeno, mediante el uso de cloro gaseoso y luz UV. Dicho proceso generaba la adición no selectiva de cloro dando como resultado una mezcla técnica muy compleja, la cual se ha evidenciado que puede llegar a tener alrededor de 1000 compuestos policlorados, compuesta principalmente por compuestos entre hexa y nonaclorados (1). Fue introducido en 1945 por la empresa Hercules Powder Inc. y se usó principalmente en cultivos de algodón, pero también en cultivos de soja, maní, tabaco y otros. Se estima que el uso global de toxafeno antes de su prohibición mundial fue 1.33×10^6 toneladas (2, 3).

Debido a sus propiedades físicas, se favorece su persistencia, bioacumulación y transporte en la atmósfera a grandes distancias, representando un peligro para la vida acuática y terrestre. Además está catalogado como potencial carcinógeno en humanos, razón por la cual en 1984 la Organización Mundial de la Salud rechazó el uso de toxafeno a nivel mundial. Sin embargo, se siguió usando en varios lugares por casi una década como el caso de Colombia (3,4).

Desde 1953 en el departamento del Cesar en el municipio de El Copey, en el corregimiento de Caracolicito y en la ciudad de Codazzi en el departamento del Cesar, inició la producción algodонера. Se estima que entre 1974 y principios de la década de los 90 se dió el uso intensivo de toxafeno y otros plaguicidas (5) por la aparición del gusano bellotero *Heliothis virescens*, que empezó a presentar resistencia conllevando a una crisis en la producción de algodón y acumulación de plaguicidas haciéndose obsoletos (6). Las canecas con residuos de estos plaguicidas fueron enterradas en Codazzi por la salida al corregimiento de Casacará y almacenadas en Caracolicito en bodegas de lo que fue la planta desmotadora de la Federación Nacional de Algodoneros, sitio en el cual fueron reenvasados y enviados al exterior para su incineración (7). De igual manera, en el Cesar se realizó un estudio sobre la incidencia de 6 tipos de cáncer, a partir del cual surge la hipótesis que la incidencia de ciertos tipos de cáncer como: cáncer de vejiga en mujeres, en Agustín Codazzi y El Copey; cáncer de vejiga en hombres, sólo en El Copey, y cánceres de piel no melanomas en hombres, únicamente en Agustín Codazzi. Pueden estar relacionados con la exposición ambiental a plaguicidas en desuso (8). Por tales motivos es de gran importancia establecer estrategias que puedan ser

aplicadas en el campo para lograr la disminución en las concentraciones de toxafeno en suelos contaminados.

A nivel científico lo que se conoce acerca de toxafeno es que esta mezcla contiene compuestos que se degradan diferencialmente en el ambiente, siendo unos más persistentes que otros (9) dependiendo del número y posición de cloros en la molécula (10). En suelo se ha determinado que los productos más abundantes se encuentran entre heptaclorados a hexaclorados, principalmente el Hx-Sed y Hp-Sed, y otros parlar en menor abundancia cómo los 26, 40, 41, 44 y 50 (11), productos generados principalmente en condiciones anaerobias (10) y en condiciones aerobias se conoce muy poco acerca de los productos que se pueden generar en estas condiciones. En la literatura se encuentran escasos estudios sobre la biodegradación de toxafeno por cepa pura bacteriana, donde hay dos reportes de cepas anaerobias que son *Dehalospirillum multivorans* (12) y *Enterobacter cloacae* (13). Mientras que en condiciones aerobias solo uno por *Pseudomonas putida* (14). Así mismo, no se conocen todos los productos de la biodegradación cuya información es importante para poder determinar toxicidad, movilidad y destino ambiental de estos (11). Por tanto el aislamiento e identificación de microorganismos degradadores aportaría nueva información para lograr una mejor comprensión en el metabolismo del toxafeno.

Dado el limitado conocimiento de la degradación aerobia de toxafeno, este estudio busca conocer más a profundidad la degradación en estas condiciones en suelos contaminados de El Copey y de esta forma determinar si es importante incluir una etapa aerobia en estrategias de biorremediación de suelos contaminados. También evaluar el uso de un compuesto llamado camfor (molécula no clorada similar estructuralmente al toxafeno) para el aislamiento de bacterias posiblemente degradadoras de toxafeno como una estrategia que ya ha sido aplicada como en el caso de PCB donde utilizaron bifenil (15), y de endrina y dieldrina donde se usó el 1,2-epoxiciclohexano (16), encontrando cepas degradadores de estos compuestos.

Esta investigación hace parte del macroproyecto titulado: “Biorremediación de suelos contaminados con toxafeno: Del laboratorio al campo”. Es importante mencionar que este es un estudio pionero en el mundo que busca aumentar el conocimiento sobre la degradación aerobia de toxafeno, llevado a cabo en la línea de investigación biorremediación de ambientes

contaminados de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) en la Pontificia Universidad Javeriana.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Compuestos halogenados

2.1.1 Características generales

En la naturaleza se pueden encontrar más de 3800 compuestos halogenados, principalmente clorados o bromados, producidos por organismos vivos o por procesos geotérmicos (17). Sin embargo, también hay compuestos halogenados sintetizados por el hombre a nivel industrial, que fueron usados como herbicidas, plaguicidas y solventes entre otros, siendo muchos de estos compuestos halogenados liberados al ambiente (18,19). Estos últimos han llegado a determinarse en suelos, agua, niebla, nieve, animales y humanos (20-23).

2.1.2 Contaminantes orgánicos persistentes (COP)

Los contaminantes orgánicos persistentes, se caracterizan por ser altamente persistentes, viajar largas distancias a través del aire, del agua y las especies migratorias, bioacumularse en los tejidos grasos y ser tóxicos. Al ser compuestos que contienen enlaces carbono-halógeno, son muy estables en el ambiente siendo resistentes a la degradación biológica y fotolítica, propiedad que aumenta proporcionalmente con el aumento de halógenos en la molécula (24). Además, son compuestos semi-volátiles que pueden existir en fase de vapor y al ser resistentes a la degradación fotolítica pueden ser absorbidas por partículas atmosféricas y transportarse largas distancias, antes de su deposición y dada su baja solubilidad en agua y alta afinidad por lípidos (24) se han llegado a determinar en carne, huevos y humanos, incluso en leche materna (23,25). Se les atribuyen algunos cánceres, defectos de nacimiento, disfunción en los sistemas inmune y reproductivo (23,25). A principios de la década de los 70 se restringe su uso y posteriormente es prohibida su aplicación en Estados Unidos (26) y en el 2001 la Convención de Estocolmo la cual es encargada de proteger el ambiente y la salud humana de COPs, sugiere la eliminación o transformación de estos compuestos, de tal modo que no exhiban las propiedades ya mencionadas. El convenio inició con 12 compuestos, incluido el toxafeno, llamada la “docena

sucia”, aunque en el 2009 se añadieron 9 compuestos nuevos y para el 2011 se añadió el endosulfan teniendo hasta la actualidad un total de 22 compuestos (27,28) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Lista de COPs por la Convención de Estocolmo. Tomada de 28.

Item	Chemicals	CAS no.	Type	Isomers and homologues
2001 amendment				
1	Aldrin	309-00-2	Pesticide	Aldrin and isodrin
2	Dieldrin	60-57-1	Pesticide	-
3	Endrin	72-20-8	Pesticide	-
4	Chlordane	57-74-9	Pesticide	α - and β -isomers
5	Heptachlor	76-44-8	Pesticide	-
6	HCB	118-74-1	Pesticide and industrial	-
7	Mirex	2385-85-5	Pesticide	-
8	Toxaphene	8001-35-2	Pesticide	Hundreds of isomers
9	DDT	50-29-3	Pesticide	p,p'-DDT; o,p'-DDT; p,p'-DDE; p,p'-DDD
10	PCBs	-	Industrial and by-product	209 congeners
11 and 12	PCDDs and PCDFs	-	By-product	75 PCDD congeners and 135 PCDF congeners
2009 amendment				
13	Chlordecone (Kepone)	143-50-0	Pesticide	-
14	Lindane (γ -HCH)	58-89-9	Pesticide	-
15	α -HCH	319-84-6	Pesticide and by-product	-
16	β -HCH	319-85-7	Pesticide and by-product	-
17	Hexabromobiphenyl	36355-01-8	Industrial	42 congeners
18	Tetra-BDE and penta-BDE	-	Industrial	Co-exist in commercial Penta-BDE
19	Hexa-BDE and hepta-BDE	-	Industrial	Co-exist in commercial Octa-BDE
20	PPOS and its salts	1763-23-1	Industrial	Side-chain isomers
21	PPOSF Pentachlorobenzene	307-35-7 608-93-5	Pesticide, industrial and by-product	-
2011 amendment				
22	Endosulfan	115-29-7	Pesticide	α - and β -isomers

2.1.3 Toxafeno

El toxafeno es una mezcla de cientos de compuestos policlorados, su síntesis se basa en la cloración del α -pineno o canfeno en presencia de luz UV. Este proceso genera cuatro diferentes estructuras: bornano, borneno, canfeno y dihidrocanfeno, las cuales pueden tener diferentes grados de cloración (**Figura 1**), generando una mezcla muy compleja denominada como componentes de toxafeno técnico (CTTs del inglés “Components of Technical Toxaphene”) y cada compuesto de esta mezcla se denomina como un congénere (2,3). Estudios han mostrado diferentes cantidades de estos compuestos dentro de la mezcla técnica desde 174 (29) 246 (30), hasta alrededor de 1000 congéneres (1) y la exacta composición de esta mezcla es aún desconocida, así como su destino ambiental y el riesgo que puede tener en la salud humana de cada uno de estos componentes (11).

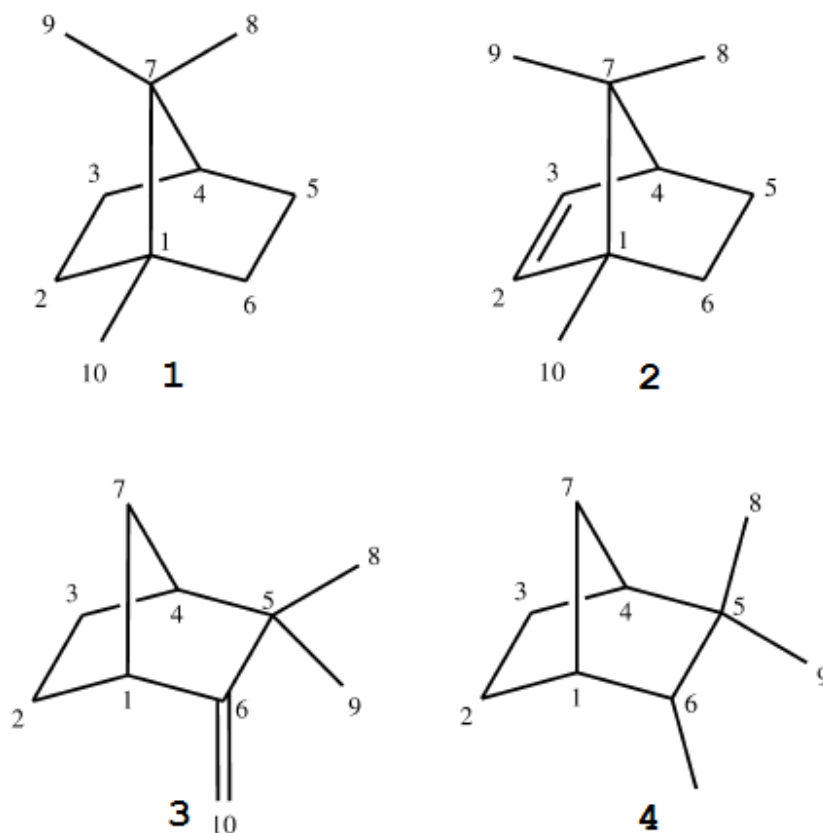


Figura 1. Estructuras que componen la mezcla técnica de toxafeno. 1= Bornano; 2=Borneno; 3= Canfeno y 4= Dihidrocanfeno. Tomado de Kucklick & Helm (3).

Para describir estos cientos de compuestos, varias nomenclaturas fueron ideadas siendo la más aceptada la basada en el orden de elución de los compuestos por cromatografía de gases y sus tiempos de retención denominada “numeración hablar” (2, 3). Al no conocerse su composición, el análisis de toxafeno se dificulta porque se requiere el aislamiento de congéneres individuales a partir de la mezcla técnica, o el aislamiento de productos de degradación en el ambiente o a partir de muestras biológicas. Así mismo, la producción de estándares requiere la cloración específica de sus estructuras basales y no se sabe con exactitud cómo llevar a cabo estos procesos. Por lo que en la actualidad se encuentran unos pocos compuestos individuales de toxafeno, exactamente 23 estándares de congéneres se encuentran disponibles comercialmente (Tabla 2).

Tabla 2. Estándares disponibles de diferentes congéneres de la mezcla técnica de toxafeno. Tomado de (1).

No. Parlar	No. de sustituciones Cloro	Nombre IUPAC
11	6	2,2,3- <i>exo</i> ,8,9,10-Hexachlorocamphene
12	6	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,8,8,9,10-Hexachlorocamphene
15	6	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,7,8,9,10-Hexachlorocamphene
21	7	2,2,5,5,9,10,10-Heptachlorobornane
25	7	2,2,3- <i>exo</i> ,8,8,9,10-Heptachlorocamphene
26	8	2- <i>endo</i> ,3- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,10,10-Octachlorobornane
31	8	2,2,3- <i>exo</i> ,8,8,9,9,10-Octachlorocamphene
32	7	2,2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Heptachlorobornane
38	8	2,2,5,5,9,9,10,10-Octachlorobornane
39	8	2,2,3- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10-Octachlorobornane
40	8	2- <i>endo</i> ,3- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,10,10-Octachlorobornane
41	8	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,5- <i>exo</i> ,8,9,9,10,10-Octachlorobornane
42a	8	2,2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10-Octachlorobornane
42b	8	2,2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,9,10-Octachlorobornane
44	8	2- <i>exo</i> ,5,5,8,9,9,10,10-Octachlorobornane
50	9	2- <i>endo</i> ,3- <i>exo</i> ,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10-Nonachlorobornane
51	8	2,2,5,5,8,9,10,10-Octachlorobornane
56	9	2,2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10-Nonachlorobornane
58	9	2,2,3- <i>exo</i> ,5,5,8,9,10,10-Nonachlorobornane
59	9	2,2,5- <i>endo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,9,9,10,10-Nonachlorobornane
62	9	2,2,5,5,8,9,9,10,10-Nonachlorobornane
63	9	2- <i>exo</i> ,3- <i>endo</i> ,5- <i>exo</i> ,6- <i>exo</i> ,8,8,9,10,10-Nonachlorobornane
69	10	2,2,5,5,6- <i>exo</i> ,8,9,9,10,10-Decachlorobornane

2.1.4 Destino e impacto ambiental de toxafeno.

Cuando el toxafeno entra al ambiente esta mezcla sufre cambios en su composición, donde desaparecen los compuestos octa a nonaclorados, encontrándose dos metabolitos predominantes denominados HxSed [2-*exo*,3-*endo*,5(o 6)-*exo*,8,9,10-hexaclorobornano o 2 (o 3)-*endo*,5-*endo*,6-*exo*,8c,9b,10a-hexaclorobornano)] y HpSed (2-*endo*,3-*exo*,5-*endo*,6-*exo*,8,9,10-heptaclorobornano), los cuales han sido determinados sedimentos de lagos (31), en lodos(32) y suelos (9,33). Así mismo, el toxafeno se ha llegado a determinar en sitios donde nunca ha sido aplicado como en la región del Ártico (42) y dentro de la red trófica se ha encontrado en varias especies de peces (43,44,47), cetáceos (45), focas (48; 49), ballenas (50) y caimanes (51) entre otros. También han sido encontrados en tejidos y leche materna de poblaciones humanas del Ártico dado que su dieta se basa principalmente en animales

marinos(52) y otros lugares alrededor del mundo (30). Estos estudios, han demostrado que en la biota se acumulan principalmente 3 congéneres en específico siendo los parlar 26, 50 y 62, que dada su hidrofobicidad tienden a acumularse en los tejidos grasos. Eso es preocupante ya que, estudios con estos 3 congéneres en ratones han mostrado que pueden llegar a afectar el tamaño de la cabeza, desarrollo del sistema nervioso central, malformaciones y retardo en el crecimiento de los embriones (53,54). De igual manera, en experimentos in vitro se evidenció que el parlar 26 y 50 aumentaban la proliferación de células relacionadas con el cáncer de seno (55), y peor aún, estos dos congéneres también fueron encontrados en plasma sanguíneo de cordón umbilical y en recién nacidos (56), lo que indica la potencial amenaza que el toxafeno representa en la salud humana y vida animal.

2.2 Biodegradación de compuestos halogenados

2.2.1 Mecanismos de deshalogenación

En el ambiente se pueden dar diversos procesos que llevan a la degradación de compuestos halogenados y otros compuestos orgánicos, procesos como: fotólisis, reacciones con superficies minerales, hidrólisis con agua, oxidación por oxígeno molecular y degradación microbiológica. En este último se encuentran procesos de deshalogenación, donde el microorganismo elimina o reemplaza el halógeno. Estos procesos pueden dar como resultado sustancias menos o más tóxicas. Dentro de este mecanismo existen varias vías de deshalogenación, que se pueden dar tanto en condiciones aerobias como anaerobias(57,58):

- a. Deshalogenación oxidativa: Se da por la acción de mono- o dioxigenasas, introduciendo en el sustrato 1 o 2 oxígenos, respectivamente.
- b. Deshalogenación hidrolítica: Mediante deshalogenasas hidrolíticas, el halógeno es reemplazado por un grupo –OH el cual se deriva del agua.
- c. Deshalogenación tiolítica: Por la acción de glutatión S-transferasas se da el reemplazo del halógeno por glutatión.
- d. Sustitución intramolecular: Se da la formación de un epóxido al salir el halógeno, por la acción de enzimas haloalcohol dehalogenasas.

- e. Dehidrohalogenación: A partir del sustrato se elimina HCl y se da la formación de un doble enlace.
- f. Deshalogenación reductiva: El halógeno es reemplazado por un hidrógeno.

Con esta variedad de procesos, la caracterización de microorganismos deshalogenadores es muy importante para el entendimiento de su bioquímica y genética, al igual que su aplicación industrial y evaluación del potencial de degradación de compuestos xenobióticos (57-59). Los halógenos son fuertemente electronegativos y sustraen densidad electrónica del átomo de carbono al que están unidos, lo que hace que este átomo tenga una deficiencia de electrones, la cual aumenta proporcionalmente al incrementar el número de halógenos, favoreciéndose los procesos reductivos, como en el caso de los compuestos polihalogenados. Cuando hay menos cantidad de halógenos unidos en la molécula se favorecen los procesos oxidativos y la molécula queda más susceptible al ataque por parte de oxigenasas ya que ahí la molécula es menos electrofílica (60-62).

2.2.2 Biodegradación de COPs

Dada la limitada información acerca de la degradación de toxafeno, es importante revisar lo que se sabe de otras moléculas estructuralmente similares. En esta parte no se pretende hablar de todos los COPs, sino tomar como ejemplos algunos para mencionar ciertas características de la biodegradación de esta clase de compuestos como compuestos con 2 anillos aromáticos (PCB y DDT), cicloalcanos (Lindano) y ciclodienos (Endrina y dieldrina).

PCB (Bifeniles policlorados): Este compuesto era producido por la cloración directa del bifenil, generando una mezcla de 209 congéneres. El primer reporte de cepas degradadoras de PCB fue en condiciones aerobias, realizado por Ahmed & Focht (15) los cuales aislaron dos cepas de *Achromobacter* sp., una por enriquecimiento con bifenil y la otra por enriquecimiento con 4-clorobifenil, donde observaron que los productos producidos eran distintos entre estas especies, sugiriendo rutas metabólicas diferentes. Tiempo después Furukawa & Matsumura (63) aislaron cepas de *Alcaligenes* sp. también por enriquecimiento con bifenil, capaces de degradar 31 congéneres de PCB. A parte de estos hay diversidad de estudios que reportan cepas gram

negativas (65-68) y gram positivas (68, 69,70,71) como degradadoras de PCB. Asimismo, estudios de los cuales se han derivado conceptos generales en la degradación de este compuesto en condiciones aerobias (64,72-75) tales como:

- i. La biodegradabilidad disminuye a medida que aumenta el número de cloros en la molécula.
- ii. Las moléculas de PCB con cloros en sólo un anillo del bifenil se degradan más fácilmente que las que tienen cloros en ambos anillos.
- iii. Los congéneres con cloros en las posiciones 2,6- o 2-2' (posiciones orto) son muy poco degradadas.
- iv. Tanto las tasas de degradación como la forma de ataque al anillo aromático depende totalmente de la cepa bacteriana usada.

Al conocerse que el bifenil era atacado por dioxigenasas y metabolizado a ácido benzoico, para una mejor comprensión de la ruta metabólica implicada en el metabolismo de los PCB, Furukawa & Miyazaki (76), fueron los primeros en clonar los genes (denominados genes bph) que codificaban para las primeras tres enzimas involucradas en la ruta de degradación del bifenil a partir de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. Igualmente, Mondello (77) realizó lo mismo a partir de *Burkholderia xenovorans* LB400, y en la actualidad está determinada la estructura por cristalografía de rayos X de los componentes bifenil dioxigenasa y de la 2,3-dihidroxibifenil dioxigenasa que es la primera enzima en actuar sobre el bifenil y PCB (78-82).

Respecto a degradación de condiciones anaerobias de PCBs, el primer estudio reportado fue en sedimentos del Río Hudson (83) y en este mismo año Quensen *et al.* (84) con microorganismos de sedimentos estudió la dechloración de PCB observando una disminución en los congéneres con cloros en las posiciones *meta* y *para*, así como el aumento de mono- y diclorobifeniles. Por otro lado, Tracey *et al.* (85) demostraron la dechloración en posiciones *ortho* identificaron secuencias relacionadas a los grupos de *Dehalococcoides*, posteriormente Bedard *et al.* (86) con una población de *Dehalococcoides* observó la dechloración de 64 congéneres de PCBs que contenían entre 4 y 9 cloros, igualmente Watt *et al.* (87) evidenció por medio de comparaciones filogenéticas con secuencias del gen 16s en cultivos dechloradores de PCB que había microorganismos dentro del grupo de deshalogenadores *Chloroflexi* diferentes a

Dehalococcoides sp. indicando que puede tratarse de un grupo todavía no descrito implicado en la deshalogenación de este compuesto.

DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano]: El DDT consiste principalmente en un 85 % de p,p'-DDT y un 15 % o,p'-DDT. Bajo condiciones anaerobias con cepas de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*, se evidenció que metabolito principal de degradación del DDT era el DDD [1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano] (88), resultado también obtenido por Ahuja *et al.* (89) con *Alcaligenes denitrificans* y con la bacteria intestinal *Eubacterium limosum* (90). Por otro lado, hay otro metabolito que es el DDE [1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno] el cual es producido bajo condiciones aerobias (91), Quensen *et al.* (92) demostró que puede ser transformado a DDMU [1-cloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno] bajo condiciones metanogénicas y sulfidogénicas.

En condiciones aerobias el primer estudio que mostró degradación de DDT fue el que realizó Focht & Alexander (46), quienes aislaron una cepa de *Hydrogenomonas* sp. la cual fue capaz de degradar DDT en presencia de difenilmetano, también Nadeau *et al.* (93) con *Alcaligenes eutrophus* A5 en un medio mínimo de sales con extracto de levadura mostró la degradación del DDT a ácido 4-clorobenzoico, mismo metabolito observado por Kamanavalli & Ninnekar (94) con *Pseudomonas* sp. pero crecida con bifenil. Por otro lado, Hay & Focht (95) con *Pseudomonas acidovorans* M3GY y Aislabe *et al.* (91) con *Terrabacter* sp. DDE-1 mostraron degradación de DDE, el primero encontró nueve metabolitos (1. C₁₄H₈O₂C₁₄; 2 y 3: C₁₄H₈OCl₄; 4. C₁₆H₁₂O₄C₁₄; 5. C₁₀H₇O₂Cl₃; 6. C₈H₇ClO₂; 7. C₈H₇ClO; 8. C₇H₅ClO y 9. C₇H₅ClO₂) y el segundo la transformación de este compuesto a 4-clorobenzoato, donde ambas cepas estaban en presencia de bifenil. Así mismo, Hay and Focht (96) también reportaron la degradación de DDD por parte de *Ralstonia eutropha* A5 encontrando 7 metabolitos (1 y 2: C₁₄H₁₀OC₁₄; 3. C₁₀H₉O₂C₁₃; 4. C₈H₇ClO; 5. C₇H₅ClO; 6. C₇H₄ClO₂; 7. C₈H₇ClO₂) cepa crecida también en presencia de bifenil como única fuente de carbono. Estudios que sugieren que la ruta de degradación del DDT puede ser similar a la del bifenil.

Lindano: El hexaclorociclohexano (HCH), se produce por la cloración del benceno en presencia de luz UV y da como resultado una mezcla de 4 isómeros muy estables que son α (60-70%), β (5- 12%), γ (10-12%) y δ (6- 10%), donde el γ-isómero conocido como lindano es

el que tiene propiedades insecticidas. En condiciones anaerobias se encuentran varios microorganismos capaces de degradar uno o los cuatro isómeros, donde hay reportes de varias especies de *Clostridium* como *Clostridium rectum*, *Clostridium sphenoides*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium pasteurianum* (97-100), *Desulfovibriogigas*, *Desulfovibrio africanus*, *Desulfococcus multivorans* (103) y *Dehalobacter* sp. (101). Así mismo, varios estudios han demostrado que el lindano en estas condiciones al ser degradado produce clorobenceno (102-106), lo mismo se ha evidenciado con los otros tres isómeros (101, 107). Ohisa *et al.* (105) propuso que la degradación iniciaba por medio de dos dicloroeliminaciones, la primera daba como resultado el γ -3,4,5,6-tetracloro-1-ciclohexano (γ -TCCH) y la segunda producía el 5,6-diclorociclohexa-1,2-dieno. Seguido a esto se daba una dehidroclorinación para producir clorobenceno. De la misma manera, otros estudios han demostrado que el γ -TCCH es un intermediario en la degradación anaeróbica del lindano (98,100,102,105) y que también a partir de este se pueden encontrar productos de bencenos triclorados y benceno en sí mismo (100).

En condiciones aerobias ha sido reportada la degradación en diferentes grados de los isómeros del HCH (108;109, 110,111,112) y con respecto a microorganismos degradadores la mayoría pertenecen a la familia *Sphingomonadaceae* (113), dentro de la cual los estudios se han centrado principalmente en las tres primeras cepas degradadoras que se aislaron *Sphingobium japonicum* UT26 (114), *Sphingobium indicum* B90A (112) y *Sphingobium francense* Sp+ (115), dentro de las cuales se han evidenciado diferencias en la degradación de los isómeros del HCH (116,117). Donde, los genes necesarios para la degradación del lindano (genes *lin*) se identificaron y caracterizaron en primer lugar para la cepa *Sphingobium japonicum* UT26 (118) y posteriormente en la cepa *Sphingobium indicum* B90A (119), encontrando genes muy similares en otras especies lo que indica la posibilidad de transferencia horizontal de genes (120,121).

Endrina y dieldrina: Diversos estudios se han llevado a cabo en la degradación de estos compuestos bajo condiciones anaerobias, Maule *et al.* (122) reportó la degradación anaerobia de dieldrina con poblaciones microbianas provenientes de diferentes matrices, evidenciando que estas poblaciones podían degradar la dieldrina a productos monoclorados. Estos mismos autores con *Clostridium* sp. mostraron la dechloración de ambos compuestos usando formato como substrato para crecimiento. Igualmente, Baczynski *et al.* (123) usando lodo metanogénico granular encontró aldrina como producto de degradación de la dieldrina y dos productos

monoclorados derivados de la aldrina, al igual que, productos mono- y diclorados derivados de la endrina. Con respecto a la aldrina Chiu *et al.* (124) la identificó como producto de degradación en sedimentos de un río contaminado con dieldrina y otros organoclorados.

En condiciones aerobias varios microorganismos han sido reportados como degradadores de ambos compuestos tales como *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Trichoderma viride*(125), *Micrococcus* sp.y *Arthrobacter* sp.(126). Asimismo, se ha identificado el 6,7-trans-dihidroxi-dihidroaldrina como producto de degradación de ambos compuestos y Matsumura *et al.* (127) identificó la cetoendrina como producto de degradación de la endrina.

Por último, Matsumoto *et al.* (16) descubrieron dos nuevas cepas (*Burkholderia* sp. Y *Cupriavidus* sp.) degradadoras de ambos plaguicidas aisladas de suelos no contaminados, usando un análogo estructural de ambos compuestos llamado 1,2-epoxiciclohexano.

2.3 Biodegradación de toxafeno

2.3.1 Degradación anaeróbica

El gran potencial que poseen los procesos anaeróbicos para la deshalogenación de moléculas altamente cloradas es muy importante para la biorremediación de sitios contaminados con toxafeno. La mayoría de estudios se han centrado en condiciones anaerobias a partir de diferentes matrices. Fingerling *et.al* (9) analizaron la degradación de una mezcla técnica de toxafeno y monitorearon la degradación de los parlar 32, 42a, 42b, 56 y 59 por un periodo de 6 meses, observando al final del experimento la acumulación de dos productos principales los cuales caracterizaron e identificaron como 2-exo,5-endo,6-exo,8c,9b,10a- y 2-endo,5-endo,6-exo,8c,9b,10a-hexaclorobornanos (HxSed), productos que después volvieron a ser determinados por Fingerling & Parlar (33) como productos de degradación de los parlar 32 y 42 en suelos que ellos contaminaron con estos dos compuestos al cabo de 18 semanas. Así mismo, Lacayo *et.al* (13) con muestras de suelos contaminados con toxafeno y suelos a los que se les añadió toxafeno, evaluó la degradación de 17 congéneres por un período de 79 días, encontrando que la mayoría de congéneres se degradaron más del 80%. En otras matrices, Buser *et.al* (32) a partir de muestras de biosólidos provenientes de una planta de tratamientos

de aguas residuales mostraron degradación de toxafeno entre 2-4 días, observando disminución más rápida de los compuestos nona y octaclorados y un aumento de los compuestos hexaclorados, experimento en el cual encontraron los dos principales metabolitos de degradación de toxafeno (HxSed y HpSed). Por otro lado, Lacayo et. al (10) implementando dos reactores, uno anaerobio conectado con un reactor aerobio con agua contaminada con toxafeno, evaluó la degradación de 16 congéneres encontrando degradación de más del 90% de todos los compuestos evaluados principalmente por parte del reactor anaerobio.

Respecto a estudios por cepas puras, se encuentra *Enterobacter cloacae* cepa D1 aislada a partir de suelos contaminados con toxafeno en Nicaragua, la cual en 40 días mostró degradación de 96 mg/l de toxafeno, observando disminución de los compuestos decaclorobornanos y nonaclorobornanos, y el aumento de los compuestos hexaclorocanfenos y heptaclorobornanos (13). También, Ruppe et. al (34, 35) con la bacteria *Dehalospirillum multivorans* en una primera parte comprobaron la degradación de una mezcla técnica de toxafeno (10 µg/µl) en 16 días de ensayo, evidenciando acumulación principalmente del compuesto HxSed. En su segundo estudio investigaron la degradación del parlar 40, encontrando que este era transformado en el otro metabolito principal de degradación HpSed y seguido a esto estudiaron la degradación de este producto encontrando como resultado compuestos hexaclorados y pentaclorados, al igual que evaluaron la degradación del HxSed encontrando 3 pentaclorados como principales productos de degradación, siendo uno de estos un metabolito común (5-endo,6-exo,8,9,10-pentachlorobornano) de degradación generado a partir de HxSed y también de HpSed.

Todos estos estudios demuestran que el principal mecanismo de degradación anaerobia de toxafeno es la deshalogenación reductiva y también es importante mencionar que el análisis de la degradación de congéneres específicos ayuda a un mejor entendimiento de cómo se generan ciertos metabolitos específicos y de cómo la transformación de varios congéneres puede llevar a la generación de un mismo compuesto, así como estos estudios son evidencia de que todavía falta generar mayor conocimiento respecto a los productos de degradación generados en estas condiciones y los microorganismos que catalizan estas reacciones.

2.3.2 Degradación aeróbica

Los estudios bajo estas condiciones son más limitados que la parte anaerobia, sólo se encuentran dos estudios por cepas puras. El primero fue realizado por Clark & Matsamura (14) con *Pseudomonas putida*, la cual había sido aislada con camfor como única fuente de carbono, esta cepa mostró degradación de toxafeno en un periodo de 14 días, midiendo radioactividad de toxafeno radiomarcado (^{36}Cl y ^{14}C) observando un aumento de esta en la fase acuosa de casi 3,6 veces con ^{14}C y 2,3 veces ^{36}Cl mayor que las radioactividades medidas con esta cepa pero en condiciones anaerobias, indicando la generación de metabolitos de toxafeno más polares y liberación de ^{36}Cl . Cabe resaltar que ya se sabe que la primera enzima en actuar en la degradación de camfor es una monooxigenasa denominada P-450_{CAM} perteneciente a la familia del citocromo P-450, enzimas que están presentes en todas las formas de vida y tienen un papel muy importante en la transformación oxidativa de moléculas endógenas y exógenas (36, 37,38). En el mismo estudio realizaron experimentos de degradación de toxafeno con sedimentos de lagos en condiciones anaerobias y aerobias, usando tres compuestos A. 2,2,5-endo,6-exo,8,9,9,10-octaclorobornano, B.2,2,5-endo, 6-exo, 8,9,10-heptaclorobornanoy C. 2,3,3-endo,5,6-exo,8,9,10,10-nonachlorobornano, encontrando degradación de estos en ambas condiciones pero con un patrón diferente, en condiciones anaerobias el orden fue C, B y A, y en condiciones aerobias fue C, A y B, indicando de nuevo que el metabolismo de toxafeno también puede ocurrir bajo condiciones aerobias, sin embargo se observó que el compuesto B es más recalcitrante en condiciones anaerobias.

El otro estudio fue realizado por Lacayo et. al. (39) con el hongo de pudrición blanca *Bjerkandera* sp.cepa BOL13, usando melaza de caña, aserrín y cáscara de trigo como cosustratos y así evaluar la degradación de toxafeno cuando el hongo era inoculado en cada uno de estos compuestos. El hongo en los tres cosustratos fue capaz de degradar toxafeno, sin embargo la cáscara de trigo alcanzó una degradación del plaguicida del 85% después de 30 días al igual que se observó alta actividad de la enzima lignina peroxidasa. Así mismo, esta autora en el estudio que realizó en el 2004 con dos reactores uno anaerobio conectado a uno aerobio, no quedó muy claro el papel que tuvo el reactor aerobio.

Otros estudios no relacionados con degradación microbiológica aerobia pero es importante mencionarlos ya que muestran evidencia de que se pueden dar compuestos de toxafeno oxidados, fue el realizado por Boon et, al. (40) en microsomas de diferentes animales, donde observó que los microsomas de *Phoca Vitulina*, fueron capaces de transformar los congéneres 32 y 62, con la aparición de 4 nuevos compuestos a partir del primero y 2 a partir del segundo. Al analizar el espectro de masas de estos metabolitos se pudo evidenciar que había inserciones posiblemente hasta de 3 oxígenos en una misma molécula, al igual que hubo actividad del citocromo P-450, hallazgo que refuerza la teoría que la enzima P450_{CAM} mencionada anteriormente podría estar involucrada en el metabolismo de toxafeno. Por otro lado, en el estudio de Fingerling & Parlar (33) en suelos en condiciones anaerobias, determinaron un compuesto que llamaron 7*b*,8*c*,9*c*-triclorocanfeno-2-uno cuya fórmula empírica es C₁₀H₁₁C₁₃O, pero dadas las condiciones de sus experimentos la formación de este producto se debió más a una deshalogenación hidrolítica ya que eran suelos completamente saturados con agua.

Finalmente, Kapp & Veter (41) sintetizaron en laboratorio compuestos de toxafeno hidroxilados ya que esta clase de compuestos no está bien descrita y no se conocen a fondo estos metabolitos que pueden producirse a partir de procesos de degradación del toxafeno, lo que sugiere que la síntesis de estos compuestos es muy importante para análisis toxicológicos, al igual que su aislamiento a partir de diferentes matrices y de esta forma ampliar los estándares de referencia que como se mencionó anteriormente son muy escasos.

2.4 Métodos de biorremediación de toxafeno

2.4.1 DARAMEND®

El DARAMEND® es una tecnología patentada que se usa para la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas organoclorados (OCP del inglés “Organochlorine pesticides”), usa carbono orgánico que proviene de plantas ricas en celulosa y hemicelulosa, y hierro zero valente (ZVI del inglés Zero-valent iron). DARAMEND que es una mezcla nutricional que aporta fuentes de carbono, y agua para saturar el suelo a un 90% de su capacidad de retención, este último es muy importante para evitar la difusión de oxígeno y generar condiciones

anaeróbicas. El material vegetal al degradarse hace que se generen ácidos grasos volátiles que sirven como fuente de carbono para los microorganismos deshalogenadores, estimulando su crecimiento y el ZVI puede dechlorinar las moléculas por procesos de eliminación e hidrogenólisis y genera hierro ferroso (Fe^{+2}) el cual es oxidado a hierro férrico (Fe^{+3}) para luego precipitarse. Para evitar la acumulación de productos menos clorados usa también una fase aerobia, la cual consiste en labrar el suelo para generar aireación y de esta forma permitir la difusión de oxígeno, generalmente los ciclos van de 1-2 semanas en una fase reductiva seguida de 2 semanas de fase aeróbica.

Esta técnica ha sido aplicada en Estados Unidos en sitios como Carolina del Sur y Alabama, donde se biorremediaron 250 y 4.500 toneladas de suelo respectivamente en 448 días y 173 días después de la aplicación de DARAMEND, logrando la degradación de toxafeno en más del 95%, con concentraciones iniciales de 239 mg/kg en Carolina del sur y 264 mg/kg en Alabama, y concentraciones finales de 5 mg/kg y 11 mg/kg respectivamente (128,129).

2.4.2 Harina de sangre

Esta tecnología se implementa en condiciones anaerobias y busca la estimulación de la degradación de toxafeno en suelo y sedimentos, por medio de la adición de nutrientes. El producto usado para llevar a cabo esta estimulación es sangre animal seca y pulverizada, la cual es rica en carbono y nitrógeno, también aplica fosfatos que sirven como buffer, y en algunos casos se aplica almidón. Cuando el suelo se mezcla con el producto, es saturado con agua teniendo la precaución que esta quede mínimo 30cm por arriba del suelo y cubierto con una capa de plástico, el lodo que se forma es muestreado periódicamente hasta que se alcancen los niveles deseados del compuesto. Ha sido aplicada en Arizona y Nuevo México, llegando a tratar hasta 3.5 toneladas y 8000 yardas cúbicas de suelo contaminados con 291 mg/kg y 110 mg/kg de toxafeno en 108 y 180 días respectivamente, alcanzando concentraciones finales de 71 mg/kg y 20 mg/kg (129).

2.4.3 Gene Expression Factor

Esta tecnología se basa en la aplicación de una proteína la cual restaura las proteínas que poseen las bacterias en el sitio contaminado. Puede ser aplicada con otros aditamentos al suelo como cal, materia orgánica (estiércol, carbón) y fertilizantes. La proteína debe ser aplicada por dos meses mínimo dos veces por día en días cálidos y una vez en días fríos, el método requiere un estudio detallado del suelo respecto a su química, demanda biológica de oxígeno, bacterias nativas, contaminantes y carbono disponible. Con toxafeno esta tecnología fue probada en Morgan Hill, California, donde se trataron 14,200 yardas cúbicas de suelo que tenían una concentración de toxafeno de 6.2mg/kg y en dos meses la concentración final fue de 0.130mg/kg (129, 130).

Es importante mencionar que en la literatura no se encontró evidencia detallada que explicara de forma rigurosa en qué consiste exactamente esta proteína y de cómo interactúa con los microorganismos para restaurar las enzimas que han sido dañadas por un contaminante.

2.4.4 Xenorem

Esta es una tecnología ex situ que consiste en ciclos anaerobios y aerobios, usa aditamentos orgánicos como estiércol y aserrín, los cuales mediante el uso una auto propulsadora son añadidos al suelo y mezclados. Al ser incorporados estos nutrientes al suelo se incrementa la actividad metabólica y el oxígeno es agotado, creando condiciones anaerobias y la duración de estas condiciones es determinada por estudios previos en laboratorio. Al acabar esta fase, la auto propulsadora empieza a mezclar el suelo para generar oxigenación y crear condiciones aerobias. Si los objetivos no son alcanzados, vuelven a añadirse los aditamentos mencionados para continuar con el tratamiento. Esta tecnología fue aplicada en suelos contaminados con toxafeno en Tampa, Florida con dos batch el primero tenía una concentración inicial de toxafeno de 129 mg/kg y al cabo de 24 semanas la concentración descendió a 7,8 mg/kg, el segundo en un periodo de 12 semanas pasó de 139 mg/kg a 23 mg/kg de toxafeno (129).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar la degradación aerobia de toxafeno en suelos contaminados de El Copey.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar si el camfor puede estimular la degradación aerobia de toxafeno.
- Aislar e identificar bacterias aerobias degradadoras de toxafeno.
- Evaluar posibles estrategias para la biorremediación aerobia de toxafeno.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos químicos

Para los ensayos de biodegradación se usó (\pm)-Camfor (96%) adquirido de Sigma Aldrich, el cual también fue utilizado como estándar cromatográfico. El toxafeno utilizado para los ensayos de biodegradación se extrajo de los suelos contaminados de El Copey y para su análisis cromatográfico se usó un estándar de toxafeno técnico (Dr. Ehrenstorfer), junto con los surrogates 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno(Dr. Ehrenstorfer) y PCB No. 209 (Dr. Ehrenstorfer). El 2,2,4-trimetilpentano (isooctano) grado cromatográfico fue el solvente utilizado para realizar las extracciones (J.T. Baker).

4.2 Origen de las muestras

Los suelos contaminados con toxafeno fueron tomadas del predio de las antiguas bodegas de CENALGODÓN ubicadas en el corregimiento de Caracolcito, Municipio de El Copey, al Noroccidente del Departamento del Cesar, en la margen derecha de la vía El Copey Caracolcito por la antigua carretera nacional. La muestras se tomaron de un sitio en cercanía al pozo de monitoreo 2 (**Fig 2**). En este lugar un mes antes del muestreo se realizó una excavación donde se removió el suelo de relleno y se expuso el suelo original del lugar (el suelo del relleno fue colocado allí después de la remoción de suelo superficial contaminado) El área expuesta tenía aproximadamente 6 * 3 metros. Se tomaron 20 muestras en 20 diferentes puntos a 15 cm de profundidad, cerca al punto de muestreo 2 (PM2) y se formó una muestra compuesta. Esta muestra fue pasada por un tamiz de 2 mm y fue la utilizada en todos los ensayos de este estudio. El análisis de las propiedades físico-químicas del suelo se realizó en el IGAG (Instituto Geográfico Agustín Codazzi) y los resultados se encuentran en el **Anexo 1**.

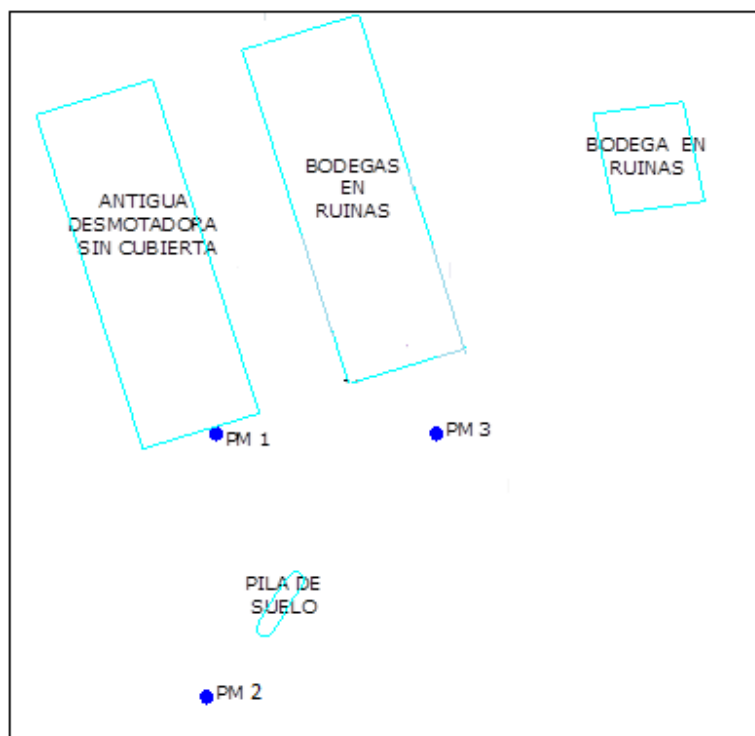


Figura 2. Esquema antiguas bodegas de CENALGODÓN. Las muestras fueron tomadas cerca a PM2.

Los biosólidos se originaban en un digestor anaerobio, el cual trataba sólidos sedimentados en el tratamiento primario de la planta de tratamiento de aguas residuales el Salitre. La idea de usar estos biosólidos fue con la intención de aprovechar la población microbiana que estos tienen y el potencial que representan para la biodegradación de xenobióticos.

4.3 Aislamientos directos

Los aislamientos directos se hicieron añadiendo 10 g de suelo en 90 ml de solución salina 0.85% (p/p), se llevaron a agitación orbital a 160 rpm por 15 minutos. Seguido a esto se hicieron diluciones seriadas de 10^{-2} a 10^{-6} por duplicado y finalmente de cada dilución se tomaron 100 μ l que fueron colocados en cajas de petri con medio mineral solidificado con agar bacteriológico (Oxoid) y el camfor se añadía en la tapa de la caja de petri (10 mg aproximadamente), las cajas fueron incubadas a 30°C por una semana. Al cabo de la semana se seleccionaron diferentes morfotipos para evaluar la capacidad de crecimiento con camfor (500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) como única fuente de carbono. Las cepas se evaluaron en Bioscreen (Bioscreen

C®Microbiology Reader- Labsystems Oy, Helsinki, Finland) midiendo la densidad óptica (600nm) durante 1 semana en intervalos de tiempo de 2 horas.

4.4 Cultivos de enriquecimiento con camfor

Se establecieron dos cultivos de enriquecimiento por aparte, uno a partir de suelos contaminados de El Copey y otro a partir de los biosólidos. Cada muestra (10g) fue añadida en 100ml de medio mineral (**Anexo 2**) con camfor ($500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) como única fuente de carbono y los cultivos fueron incubados en oscuridad a 30°C y 200rpm. El experimento se llevó a cabo por triplicado y semanalmente, se realizaron cuatro pases sucesivos por un mes, transfiriendo 10 ml de cultivo a 90ml de medio mineral nuevo con camfor. Para evaluar la degradación de camfor se tomaron muestras de 3 ml en los días 0, 1, 4 y 7 (El tiempo 0 corresponde al momento de inóculo o pase) y se determinó la concentración de camfor por GC-FID (**ver numeral 4.11**).

4.5 Degradación de toxafeno por cultivos de enriquecimiento con camfor

Para evaluar degradación de toxafeno se usaron los cultivos enriquecidos mencionados en el numeral anterior. El experimento se realizó por un periodo de 21 días, en viales de 15ml por sacrificio, con los siguientes tratamientos ($n=3$): toxafeno ($25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) como única fuente de carbono, toxafeno con camfor ($500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), toxafeno con glucosa ($986,75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y un control abiótico con toxafeno y camfor sin inóculo, todo fue incubado a 30°C y 200rpm en oscuridad. La concentración de glucosa fue equivalente a $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de camfor teniendo en cuenta la cantidad de carbonos en cada compuesto.

El toxafeno usado para realizar estos ensayos fue extraído de los suelos de El Copey y se cuantificaba por GC-ECD (**ver numeral 4.11**) para conocer su concentración y a partir de esta realizar el experimento. El toxafeno y el camfor estaban disueltos en isooctano, por lo que se colocaban previamente a los viales, y se esperaba aproximadamente media hora hasta que el solvente se evaporara y luego se añadían 2.7 ml de medio mineral y 0.3 ml de cultivo, mientras que el caso de los controles abióticos se utilizaron 3 ml de medio mineral sin inóculo. La extracción de toxafeno se realizó los días 0, 1, 7, 14 y 21, y su concentración fue monitoreada

por GC-ECD. Por último, en cada tiempo de muestreo los viales eran abiertos en cabina por 15 minutos para permitir su oxigenación.

4.6 Aislamiento de bacterias a partir de cultivo enriquecido con camfor

Después del enriquecimiento mediante 4 pases sucesivos, se hicieron diluciones seriadas en solución salina 0.85% (p/v) por duplicado (10^{-2} – 10^{-7}), transfiriendo 0,1ml de cada dilución a una caja de petri con medio mineral solidificado con agar bacteriológico (Oxoid) y el camfor se añadía en la tapa de la caja de petri, las cajas fueron incubadas a 30°C por una semana. Al cabo de la semana se seleccionaron diferentes morfotipos para evaluar la capacidad degradadora de camfor como única fuente de carbono.

4.7 Identificación de bacterias aisladas de cultivos de enriquecimiento

Las bacterias degradadoras de camfor fueron caracterizadas micro y macroscópicamente, e identificadas genotípicamente mediante la secuenciación del gen 16S ARNr.

4.7.1 Descripción micro y macroscópica de las cepas

Esta descripción se realizó por medio de la coloración Gram y las características macroscópicas se realizó teniendo en cuenta la pigmentación, tamaño, textura, forma de borde y elevación.

4.7.2 Extracción ADN de las cepas

Se realizó una siembra masiva por cada cepa, la cual fue transferida a 50 ml de caldo nutritivo (Oxoid), al cabo de 3 días se transfirieron 15ml del medio a un tubo falcon de 15ml y se centrifugaron a 10000rpm por 15 minutos. Se descartaba el sobrenadante y se adicionaban 15ml de solución salina 0,85%(p/v) para lavar y resuspender las células, se centrifugaba de nuevo 10000rpm por 15 minutos, proceso que era repetido 3 veces, pero el último lavado se realizaba en un tubo eppendorf con 1,5ml de la solución salina con las células. Al descartar el sobrenadante el pellet se resuspendía en 600 µl de tampón TE (Tris-Cl 10 mM - pH 8.0, EDTA 1mM - pH 8.0) y 15 µl de lisozima (50 mg/ml), para luego ser colocados en baño maría

a 37°C. Después de una hora, se adicionaban 30 µl de SDS al 10% y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml), llevando al baño maría a 50°C por una hora. Posteriormente, se agregaban 100 µl de NaCl (5M) y 80 µl de CTAB/NaCl (CTAB 10% - NaCl 0,7 M), y se incubaba 10 minutos a 65°C en baño maría. Se añadían 750 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezclaba en vortex y se centrifugaba 5 minutos a 13000rpm. Se transfería el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo y a este se le añadían 750 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), esta mezcla era centrifugada 15 minutos a 13000rpm. Después, se tomaba el sobrenadante y se transfería a otro tubo eppendorf para añadirle 450 µl de isopropanol y los tubos se dejaban durante la noche a -20°C. Al cabo de este tiempo, se centrifugaban por 15 minutos a 13000rpm, se descartaba el sobrenadante, se añadían 200 µl de etanol al 70% y se centrifugaba nuevamente 15 minutos a 13000 rpm. Finalmente, el etanol era secado, se resuspendía el ADN en 60 µl de tampón TE, se añadía ARNasa para tener una concentración final de esta de 15 µg/ml y se incubaba a 37°C durante 1 hora. Las muestras fueron mantenidas a -20 °C hasta su uso.

La integridad del DNA fue evaluada mediante electroforesis por 1 hora a 120 voltios, en un gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE (EDTA, Tris-HCl, Acetato) 0,5X, teñido con 2µl de SYBR[®] Safe (Invitrogen), el marcador de peso usado fue Hipper Ladder I (Bioline) y el gel fue analizado en un transiluminador (GelDoc[™] XR+System; Biorad) y luz ultravioleta.

4.7.3 Amplificación del gen 16S ARNr

Para la amplificación del gen 16S ARNr se usaron los primers universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGT'TACGACTT-3') (131).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 70 µl con los siguientes reactivos: Buffer (1X) (BIOLINE), MgCl₂ (3 mM), dNTPs (0,2 mM c/u), primers (0,5 mM), Taq polimerasa (2.5 U) (BIOLASE[™] DNA Polymerase; BIOLINE) y 2µl de ADN molde. La PCR se realizó en un termociclador (MyCycler[™] Thermal Cycler, BioRad) con el siguiente programa: denaturación inicial por 3 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos que consistieron de denaturación a 95°C por 30 segundos, 55°C por 40 segundos y 72°C por 1 minuto, y la

extensión final a 72°C por 7 minutos. Por último, a los productos obtenidos se les realizó una electroforesis por 1 hora a 120 voltios, en un gel de agarosa al 1% (p/v) en TAE (EDTA, Tris-HCl, Acetato) 0,5X, teñido con 2µl de SYBR® Safe (Invitrogen), el marcador de peso usado fue Hipper Ladder I (Bioline) y el gel fue analizado en un transiluminador (GelDoc™ XR+System; Biorad) y luz ultravioleta.

4.7.4 Secuenciación y análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por MacroGen (Maryland, Estados Unidos). Una vez se tenían las secuencias, estas fueron editadas y ensambladas en el software CLC Main Workbench Version 7.5.1® y luego comparadas con la base de datos RDP (del inglés *Ribosomal Database Project*), la cual contiene secuencias de referencia de los genes del 16S ARNr de bacterias junto con el programa BLAST del NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*). Con las secuencias más similares de cepas de referencia que se obtuvieron de la base de datos RDP se realizaron alineamientos múltiples con Clustal W y se construyeron árboles filogenéticos para cada cepa en el programa MEGA Version 6.06®.

4.8 Evaluación de la degradación de camfor por las cepas

Las diferentes cepas fueron evaluadas para comprobar su capacidad de crecer con camfor como única fuente de carbono. Para la preparación del preinóculo, se realizaron 5 siembras masivas las cuales después de una semana fueron colocadas en 50ml de medio mineral con camfor (500mg*L⁻¹), extracto de levadura (100 mg*L⁻¹) y se pusieron en agitación a 30 °C y 200 rpm. Al cabo de 3 días, los 50ml de medio se transfirieron a un falcon de 50ml, se centrifugaron a 10000rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con 50ml de solución salina 0,85% (p/v), cuando se añadía la solución salina se centrifugaba, se descartaba el sobrenadante y volvían a añadirse 50ml de la solución. Al final de los lavados, las células se resuspendían en medio mineral, por último 10ml de las células se transferían a 90ml de medio mineral con camfor (500mg*L⁻¹). La evaluación de la degradación de camfor se realizó por triplicado con un control abiótico que sólo tenía camfor y medio mineral. Las extracciones de este se realizaron los días 0, 1, 7 y 14 y las muestras fueron analizadas por GC-FID.

4.9 Degradación de toxafeno por cepas degradadoras de camfor

Las cepas evaluadas fueron las provenientes de los enriquecimientos microbianos de las muestras de biosólidos, ya que solo a partir de estos se observó degradación de toxafeno en los cultivos de enriquecimiento. Los tratamientos evaluados ($n=3$) para este ensayo fueron: toxafeno como única fuente de carbono, toxafeno con camfor ($500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), toxafeno con glucosa ($986,75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) y un control abiótico con toxafeno y camfor, sin el inoculo. El ensayo fue realizado por sacrificio, con un volumen de trabajo de 3ml.

Antes de iniciar el experimento, 5 siembras masivas de cada cepa fueron colocadas en 200ml de medio mineral con camfor ($500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) durante 1 semana, al cabo de este tiempo las células se lavaron 3 veces con solución salina 0,85% (p/v) y al final eran resuspendidas en 50ml de medio mineral para el caso de los tratamientos con toxafeno y toxafeno con camfor, o resuspendidas en medio mineral con glucosa a una concentración de $986,75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Seguido a esto, en viales de 15 ml se colocaba toxafeno y camfor cuando el tratamiento lo requería disueltos en isoocetano permitiendo la evaporación del solvente. Finalmente, 3ml de cada medio con cada microorganismo eran transferidos a estos viales los cuales fueron incubados a 30°C y 200rpm en oscuridad. La extracción de toxafeno se realizó los días 0, 10, 21, 40, 60y la concentración de toxafeno fue monitoreada por GC-ECD. Cada 10 días los viales eran abiertos en cabina por 15 minutos para permitir su oxigenación

4.10 Evaluación de posibles estrategias para la biorremediación aerobia de toxafeno

4.10.1 Determinación del % de humedad y % de capacidad de campo se los suelos de El Copey

Para la determinación del % de humedad se tomó el peso de 3 cajas de petri vacías y luego se les añadieron 10 g de suelo y de nuevo se volvió a tomar el peso. Para la determinación del % de capacidad de campo a tres tubos falcon de 50 ml con orificios en la parte inferior se les añadieron 10 g de suelo, se saturaron con agua y cuando se evidenció que el agua ya no salía

del tubo se transfirió el suelo a cajas de petri previamente pesadas. Las cajas de ambos ensayos se colocaron a 105°C durante 24 horas y al cabo de este tiempo el peso de las muestras fue nuevamente tomado. Con los resultados obtenidos se calculó cuánta agua debía añadirse a los microcosmos para tener un 60% de humedad en el suelo (**Anexo 3**).

4.10.2 Montaje microcosmos

El experimento en microcosmos tuvo una duración de 240 días, se realizó por sacrificio con suelos contaminados de El Copey y por triplicado cada tratamiento. Se usaron frascos de 20ml con 5 g de suelo y los tratamientos evaluados fueron como se muestra en la **Tabla 3**:

Tabla 3. Tratamientos evaluados en microcosmos. Todos contenían 5 g de suelo contaminado con toxafeno.

Tratamientos
1. Suelo estéril
2. Atenuación Natural
3. Adición de fósforo y nitrógeno
4. Adición de material vegetal
5. Adición de material vegetal y biosólidos
6. Adición de material vegetal, biosólidos y cal
7. Adición de camfor, fósforo y nitrógeno
8. Adición de melaza, fósforo y nitrógeno

El material vegetal utilizado y los biosólidos se añadieron en una cantidad correspondiente al 5% respecto a la cantidad de suelo usada. Los biosólidos fueron obtenidos de la planta de tratamiento de aguas residuales El Salitre. Las hojas que se añadieron fueron de eucalipto (*Eucalyptus cinerea*) y ciprés (*Cupressus lusitanica*) en una cantidad de 0,125 g de cada planta, las hojas fueron cortadas en pequeños trozos de aproximadamente 3mm. La composición de cada tipo de hojas y de la melaza fue determinada en Dr. Calderón LABS (**Anexo 4**). La concentración de melaza de caña usada fue de 10 mg por cada microcosmos. La concentración de nitrógeno y fosforo fue calculado basándose en la cantidad de carbono, nitrógeno y fósforo que contenía la melaza para llegar a la relación 100:10:1 de C:N:P. La descripción de la preparación de las diferentes soluciones de nutrientes se encuentra en el **Anexo 5**.

Cada 10 días los frascos eran abiertos y agitados manualmente para generar oxigenación, y cada 40 días se añadían nutrientes o agua destilada estéril en una cantidad de 368 μl para mantener un 60% de humedad relativa en el suelo. A los tratamientos 1., 2., 4., 5. y 6. (**Tabla 3**) se les añadía agua destilada estéril y a los tratamientos 3. solución con solo fósforo y nitrógeno, 7. solución con camfor, fósforo y nitrógeno y 8. solución con melaza fósforo y nitrógeno (**Anexo 5**).

4.11 Cuantificación de camfor y toxafeno

El monitoreo de las concentraciones de camfor y toxafeno se realizó por cromatografía de gases GC-2014 (Shimadzu), con detector de ionización de llama (GC-FID, del inglés *gas chromatography with flame ionization detector*) para camfor y con detector de captura de electrones (GC-ECD, del inglés *gas chromatography with electron capture detector*) para toxafeno.

4.11.1 Extracción líquido-líquido de camfor y toxafeno

Para los ensayos de degradación de camfor se preparaba un stock a $20,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en 2,2,4-trimetilpentano y se añadían 2.5ml a un erlenmeyer de 250ml, dejando evaporar el solvente por aproximadamente 3 horas para después añadir 100ml de medio mineral (**Anexo 1**), teniendo una concentración final de camfor de $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Se tomaban 3ml del medio y eran transferidos a un vial de 15ml y se añadían 3ml del solvente, esto se colocaba horizontalmente en shaker a 200rpm durante 24 horas, al cabo de este tiempo se tomaba el solvente y se transfería a un vial de cromatografía para su análisis por GC-FID.

Con el toxafeno los ensayos se hicieron a una concentración de $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ por sacrificio, con 3ml de medio mineral al cual se le añadían 3ml del solvente, la extracción se realizaba como el camfor pero el solvente era pasado por un filtro de nylon (Agilent, 25mm; $0.22 \mu\text{m}$) y transferido a otro vial de 15ml con 1 g de sulfato de sodio anhidro granular (J.T Baker), al cual se le hacía vortex por 10 segundos y seguido a esto se tomaba de nuevo el solvente y se pasaba a un vial de cromatografía para ser analizado por GC-ECD.

4.11.2 Extracción sólido-líquido de toxafeno

En esta parte experimental se utilizaron dos compuestos como surrogates el 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno y PCB No. 209. La extracción se realizó en frascos de 20 ml con 5gr de suelos contaminados de El Copey, a los cuales se les añadía 0.625 ml del stock de 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno ($400\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), dejando 20 minutos para permitir la evaporación del solvente, luego se añadían 5 g de sulfato de sodio anhidro granular, se agitaban para mezclar y se añadían 10ml del solvente. Por último, los frascos eran colocados en sonicación por 18 horas, al cabo de este tiempo se tomaba el solvente con jeringa y aguja, se pasaba por un filtro de nylon (Agilent, 25 mm; $0.22\ \mu\text{m}$) a un vial de cromatografía. Finalmente, en otro vial se colocaban 0.925 ml de solvente al que se le añadía 0.050 ml de la muestra previamente filtrada (dilución 1:20) y 0.025 ml de PCB No. 209, las muestras eran analizadas por GC-ECD.

4.11.3 Cuantificación de camfor por GC-FID

Los análisis de camfor se realizaron en un cromatografo de gases GC-2014 (Shimadzu) con una columna SHRX-5 (Shimadzu; 30m x 0.32mm diámetro interno, $0.50\ \mu\text{m}$ de grosor). El protocolo de corrida era con helio como gas de arrastre (velocidad lineal 28,2 cm/sec) y nitrógeno como gas make up, fue con una temperatura del puerto de inyección de 250°C , la temperatura de la columna fue programada así: 80°C por cinco minutos, luego un incremento de $40^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 280°C por 5 minutos. Se inyectaba $1\ \mu\text{l}$ de muestra en modo splitless y la temperatura del detector era de 300°C .

La curva de calibración se realizó con ocho concentraciones (10, 20, 60, 100, 250, 500, 700, $1000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) por duplicado, con dos inyecciones por concentración y se determinó el coeficiente de determinación (r^2) y el tiempo de retención del camfor (**Tabla 4, Anexo 6**).

4.11.4 Cuantificación de toxafeno por GC-ECD

Los análisis de toxafeno y los surrogates se realizaron en un cromatografo de gases GC-2014 (Shimadzu) con una columna DB-XLB (Agilent; 30 m x 0.25 mm diámetro interno, $0.25\ \mu\text{m}$ de grosor). Se usó helio como gas de arrastre (velocidad lineal 32,4 cm/sec) y nitrógeno como

gas make up, la corrida se realizaba con una temperatura en el puerto de inyección de 220°C, la temperatura de la columna fue programada así: 200°C por dos minutos, luego un incremento de 5°C/min hasta 300°C por 6 minutos. Se inyectaban 0,2 µl de muestra con un split 100:1 y la temperatura del detector era de 320 °C.

Las curvas de calibración se realizaron para los tres compuestos, siendo la del 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno y el PCB No. 209 a concentraciones de 0.1, 0.5, 1.3, 2.3, 5.2, 7.8 mg*L⁻¹(**Anexo 7**). La curva de toxafeno se realizó con concentraciones de 20, 50, 100, 200, 300 y 400 mg*L⁻¹(**Anexo 8**). Todas las concentraciones fueron realizadas por duplicado, inyectadas dos veces y se determinó el coeficiente de determinación (r²) y el tiempo de retención de los tres compuestos (**Tabla 4**).

Tabla 4. Tiempos de retención y coeficientes de determinación de las curvas de calibración realizadas para cada compuesto.

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	r ²
Camfor	8,34±0,0076	0,9945
Toxafeno	Ventana de 5-16,7	0,9974
2,4,5,6-tetracloro-m-xileno	4,22±0,0018	0,9721
PCB No. 209	22,041±0,0024	0,9521

4.11.5 Porcentajes de recuperación de toxafeno, 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno, PCB No. 209 y camfor

Los porcentajes de recuperación eran calculados según la ecuación:

$$\%R = \left(\frac{C_{experimental}}{C_{teórica}} \right) * 100$$

Donde: %R es el porcentaje de recuperación

C_{experimental} es la concentración experimental de camfor o toxafeno, en mg*L⁻¹

C_{teórica} es la concentración teórica de camfor o toxafeno, en mg*L⁻¹

5. RESULTADOS

5.1 Aislamientos directos

A partir de los aislamientos con suelos del Copey, se obtuvieron 14 cepas posiblemente degradadoras de camfor. Durante 1 semana se monitoreo el crecimiento a 600nm cuando estaba presente el camfor ($500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) como única fuente de carbono (**Figura 3**):

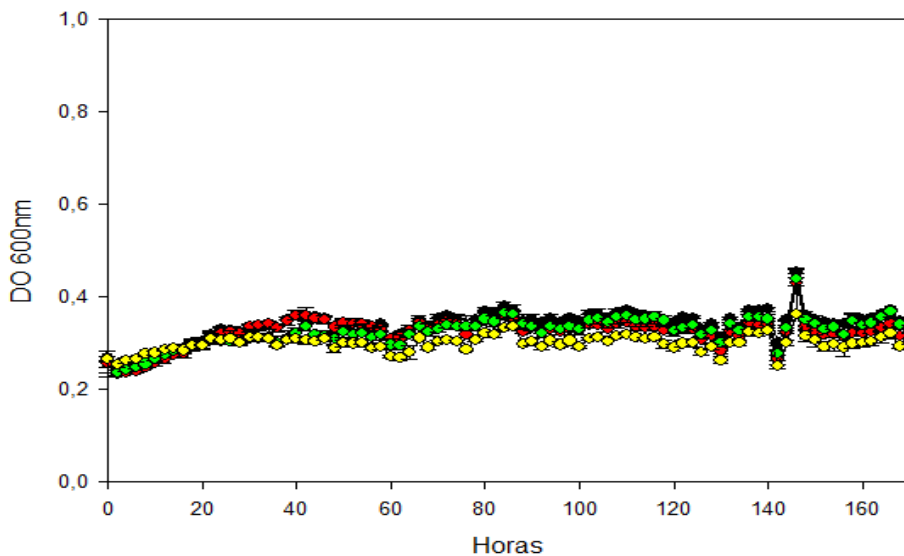


Figura 3. Crecimiento bacteriano por densidad óptica. ● Control Abiótico; ● Cepa 1Cp; ● Cepa 2Cp; ● Cepa 3Cp.

En la gráfica sólo se muestran tres cepas las cuales a comparación del control abiótico no muestran crecimiento a través del tiempo con camfor como única fuente de carbono. Este mismo patrón fue observado con las otras cepas aisladas directamente de los suelos del Copey.

5.2 Cultivos de enriquecimiento con camfor

Durante los 28 días de duración del cultivo enriquecido se evidenció en cada pase realizado la degradación de camfor durante el enriquecimiento por parte de los suelos y de los biosólidos (**Figura 4**). Al cabo de una semana la concentración de camfor disminuyó de $500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta 0 y $29\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, en suelos y biosólidos. Asimismo, en todos los pases realizados se observó una tendencia en la disminución de este compuesto entre el día 1 y 4, indicando que la presión

selectiva del cultivo de enriquecimiento fue satisfactoria tanto en los suelos como en los biosólidos.

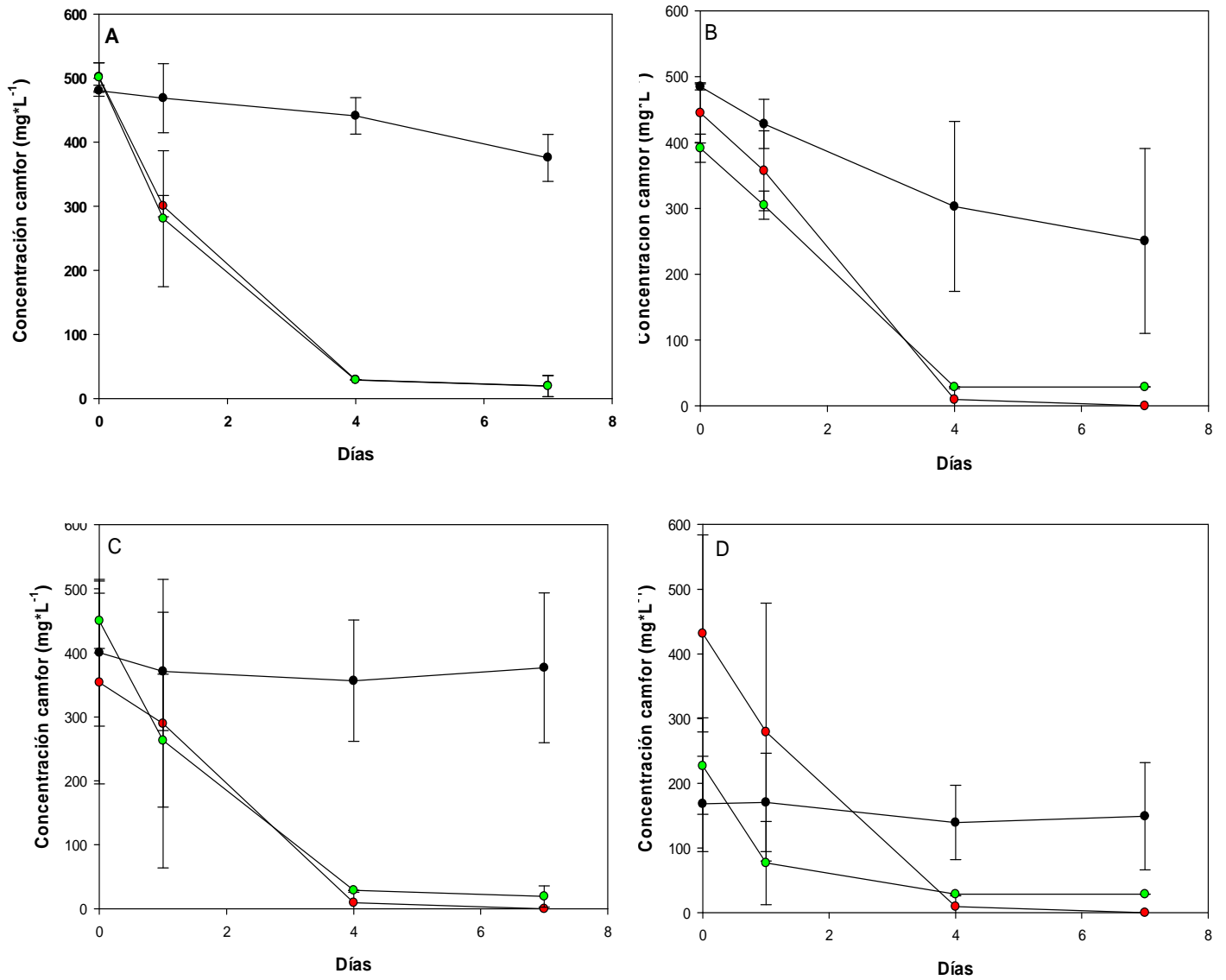


Figura 4. Degradación de camfor en cultivos de enriquecimiento A) Pase 1, B) Pase 2, C) Pase 3 y D) Pase 4. ● control abiótico; ● Copey; ● Biosólidos.

5.3 Evaluación de la degradación de toxafeno por cultivos de enriquecimiento

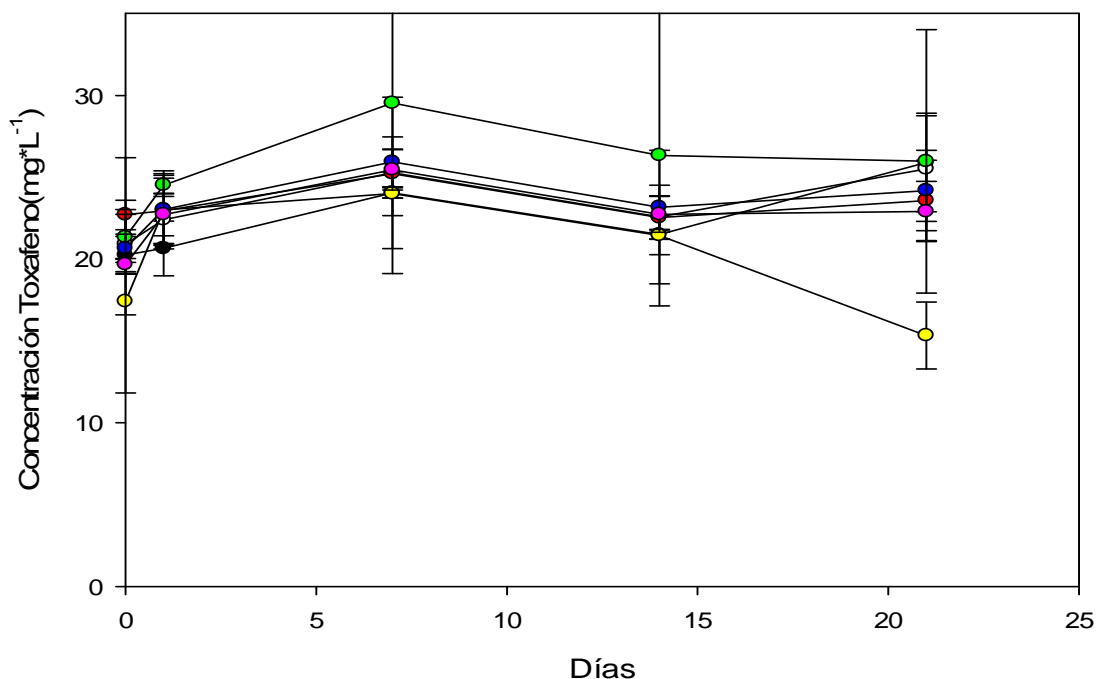
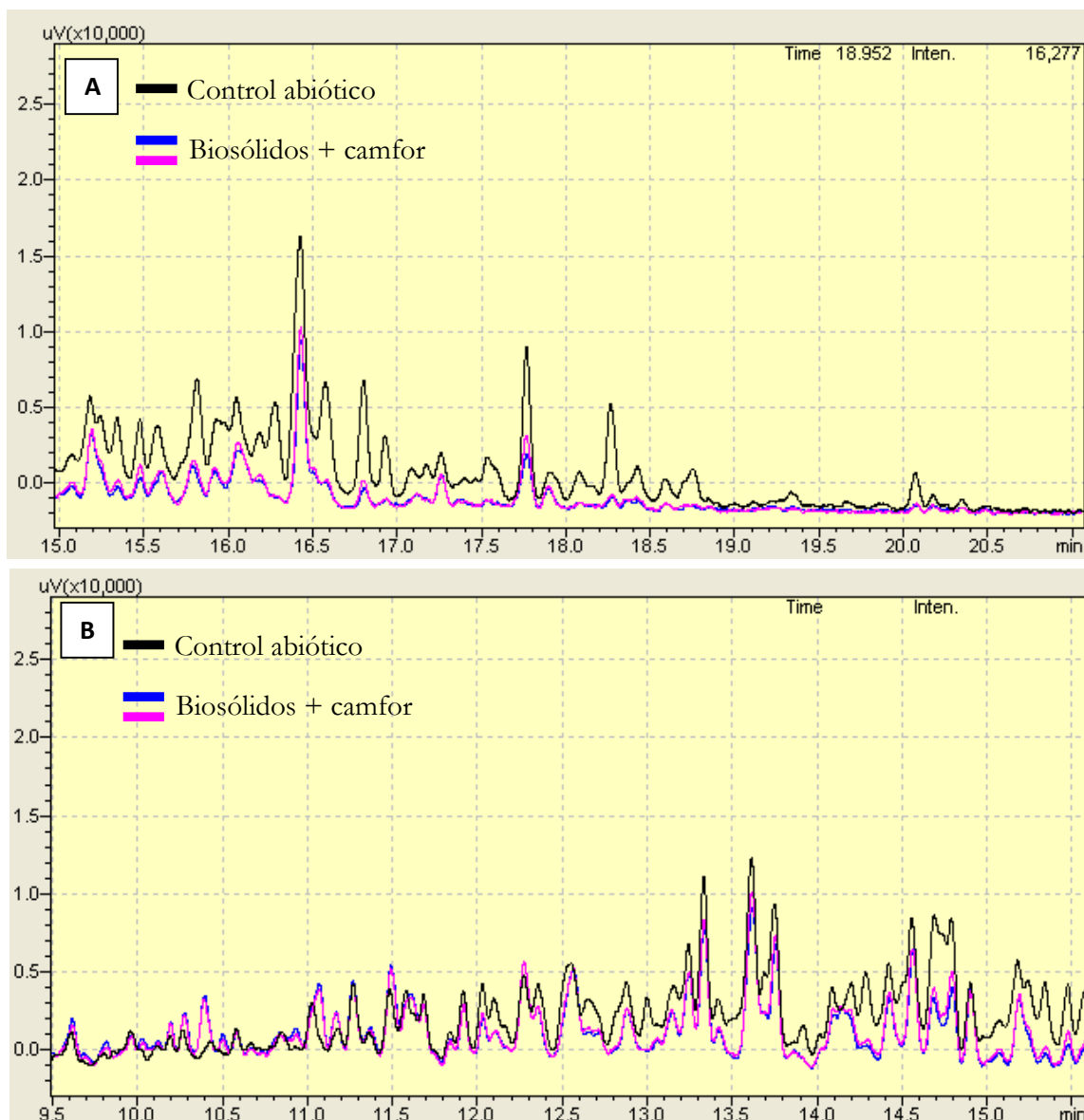


Figura 5. Degradación de toxafeno por cultivos enriquecidos con camfor. ● Control abiótico; ○ Copey + Toxafeno; ● Biosólidos + Toxafeno; ● Copey + Toxafeno + Camfor; ● Biosólidos + Toxafeno + Camfor; ● Copey + Toxafeno + Glucosa; ● Biosólidos + Toxafeno + Glucosa.

De todos los tratamientos evaluados, se encontró que solo los biosólidos en presencia de camfor fueron capaces de degradar toxafeno ($25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) (Figura 5). En este tratamiento la concentración final de toxafeno fue de $17,07 \pm 2,30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que los otros tratamientos presentaron una concentración promedio total de $27,65 \pm 1,47 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Sin embargo, al hacer una prueba de Tukey no hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (IBM SPSS Statistics 19) (Anexo 9). De igual manera, analizando el perfil de estos cromatogramas mediante la comparación con el control abiótico (Figura 6) se observó una disminución en los compuestos de mayor tiempo de retención entre 15-20 minutos (probablemente los congéneros más clorados) y un aumento en los compuestos con menor tiempo de retención entre 5-10 minutos (probablemente los menos clorados y/o a los cuales se incorporó grupos de oxígeno) (2), sugiriendo que hay una generación de productos

más oxidados ya que al ser más polares interactúan menos con la columna hidrofóbica y de este modo sus tiempos de retención disminuyen.



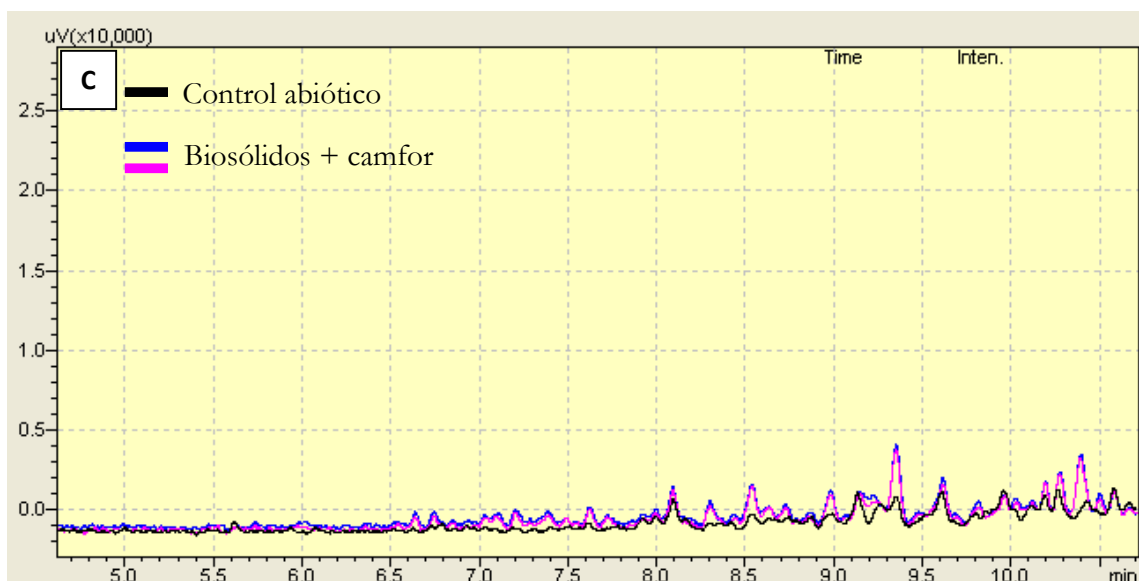


Figura 6. Cambios en el perfil cromatográfico de toxafeno con biosólidos y camfor. A=15-20minutos; B=10-15minutos; C=5-10minutos. Línea negra= Control abiótico; Líneas rosadas y azul= Biosólidos con camfor y toxafeno.

Por esta razón se analizan los tratamientos dividiendo los cromatogramas en 3 ventanas de 5-10minutos, 10-15 minutos y 15-20minutos (**Anexo 10**), construyendo una curva de calibración para cada ventana (**Anexo 11**) y de esta forma ver más detalladamente los cambios mencionados anteriormente (**Figura 7**). Este análisis permitió comprobar los cambios que se observaron en los cromatogramas de toxafeno con el tratamiento de biosólidos y camfor. Evidenciando la disminución en los compuestos con mayores tiempos de retención y acumulación de los compuestos con menores tiempos de retención mayores tiempos de retención. Tendencia que no fue observada en el resto de tratamientos evaluados.

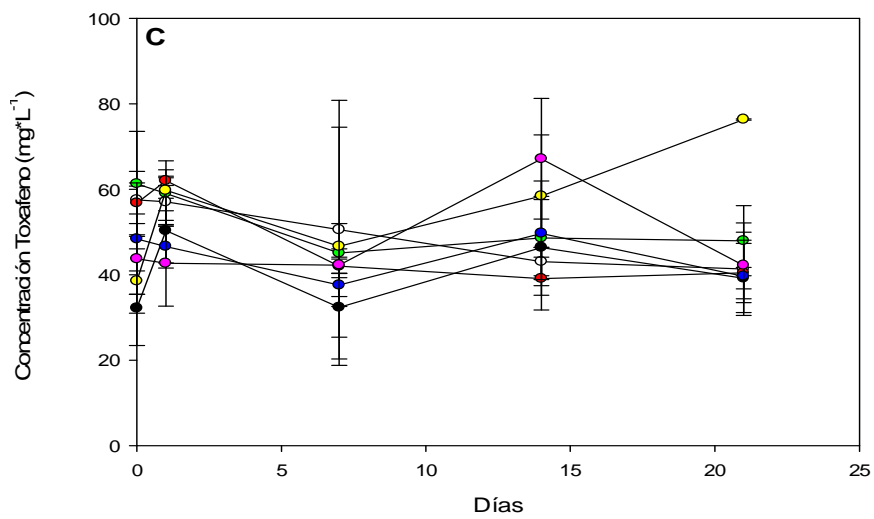
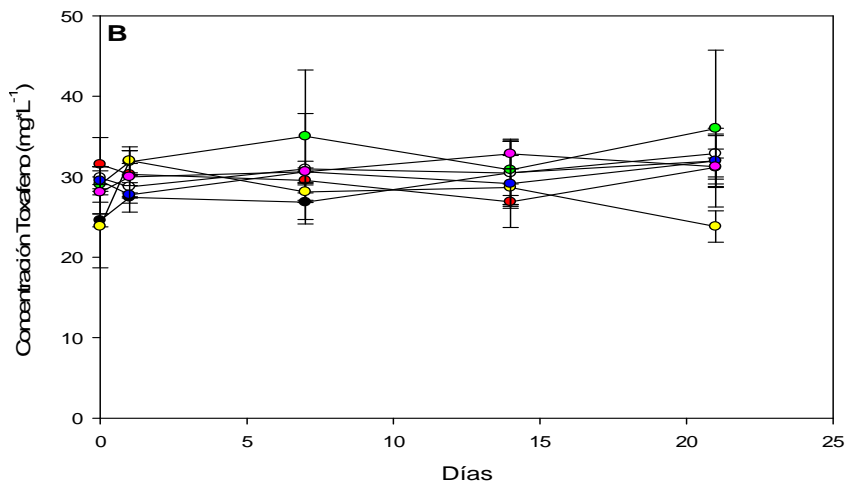
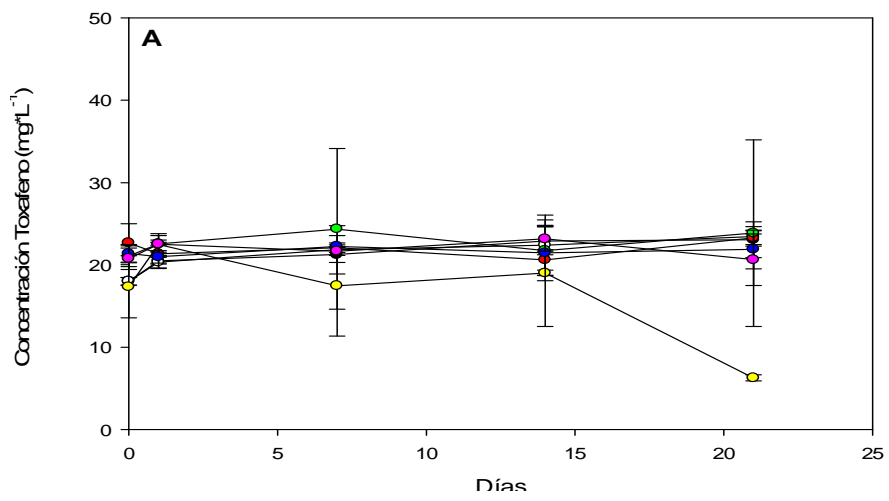


Figura 7. Análisis por ventanas de la degradación de toxafeno: A=15-20 minutos; B=10-15 minutos; C=5-10 minutos. ● Control abiótico; ○ Copey + Toxafeno; ● Biosólidos + Toxafeno; ○ Copey + Toxafeno + Camfor; ● Biosólidos + Toxafeno + Camfor; ● Copey + Toxafeno + Glucosa; ● Biosólidos + Toxafeno + Glucosa.

5.4 Aislamiento e identificación de cepas aisladas a partir de cultivos de enriquecimiento.

Al observar que el camfor era degradado por los cultivos de enriquecimiento, se realizaron aislamientos de bacterias obteniendo 7 cepas en total (4 de biosólidos y 3 de suelos). Se les hizo la caracterización macroscópica y microscópica mediante tinción Gram, encontrándose microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos (**Tabla 5**):

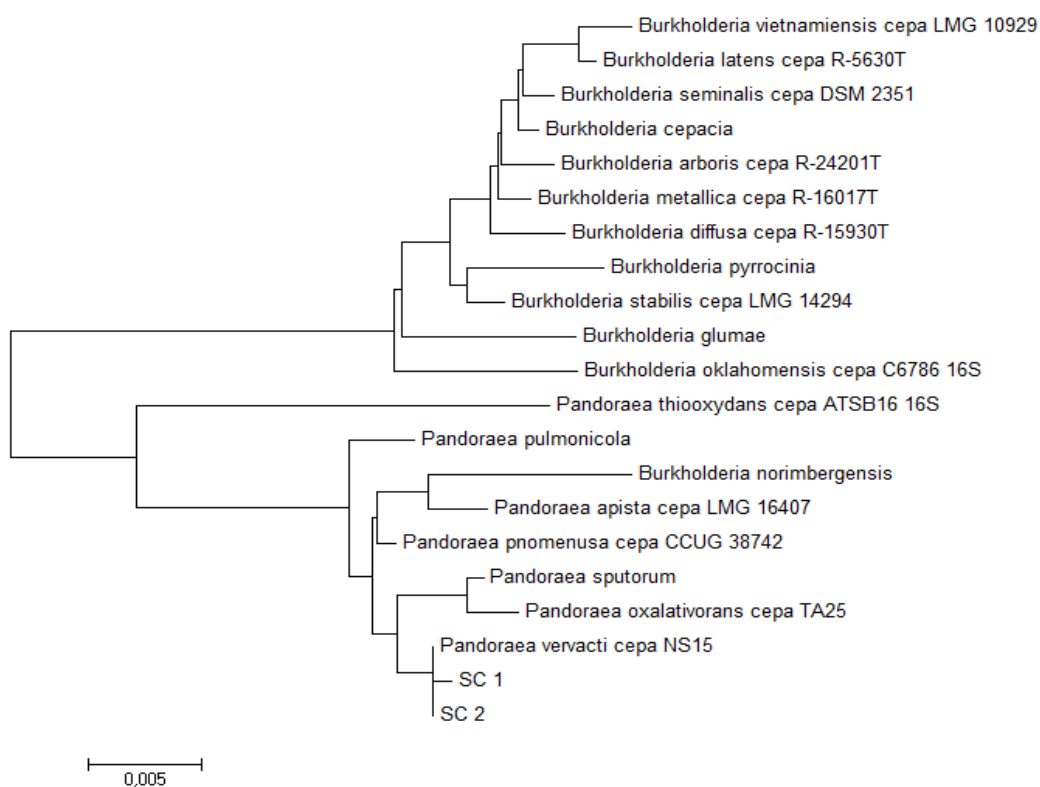
Tabla 5. Características macro y microscópicas de las cepas.

Cepa	Características	
	Macroscópicas	Microscópicas
BS 1	Colonia con centro café, borde lobulado, convexa, forma de colonia irregular, con superficie lisa y cremosa, translúcida	Bacilo Gram positivo
BS 2	Colonia pequeña, puntiforme, borde redondo, plana, superficie lisa, opaca	Bacilo Gram negativo (Bacilo pequeño)
BS 3	Color rojo opaco, colonia pequeña, bordes irregulares, elevada y cremosa	Cocos Gram positivos
BS 4	Color caqui, colonia redonda cremosa, opaca y elevación convexa	Bacilos Gram negativos
SC 1	Colonia con punto café, cremosa, plana, translúcida, borde entero, forma redonda	Bacilos Gram negativos
SC 2	Colonia con punto café, forma redonda, elevación plana, textura cremosa, borde entero, y colonia pequeña	Bacilos Gram negativos
SC 3	Colonias puntiformes, translúcidas, color amarillo pálido, borde entero, elevación plana	Bacilos Gram negativos

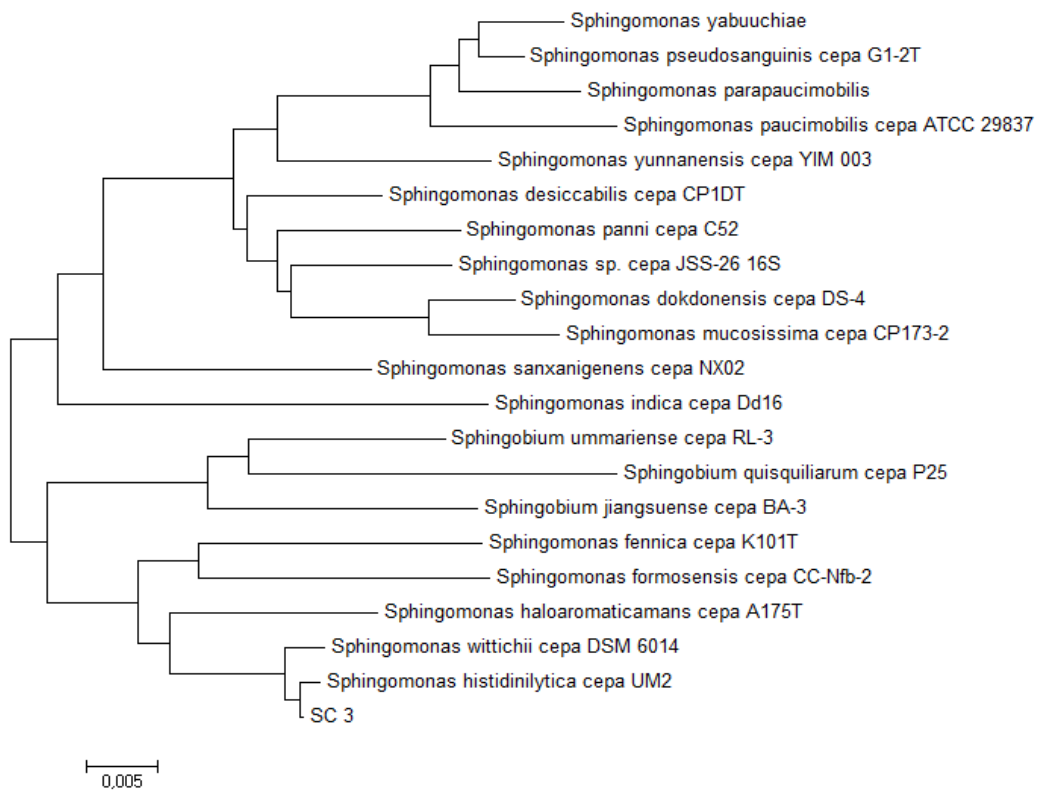
BS=Biosólidos; SC= Suelos Copey.

Para la asignación taxonómica de los microorganismos, se construyeron árboles filogenéticos en el programa MEGA Version 6.06[®] (**Figura 8**), con las secuencias del gen 16S ARNr de cada cepa y con las secuencias más cercanas de cepas de referencia que arrojó la base de datos RDP. Los árboles se realizaron por “neighbor joining” y las secuencias fueron alineadas con el microorganismo más cercano con la herramienta EMBOSS Matcher (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/nucleotide.html).

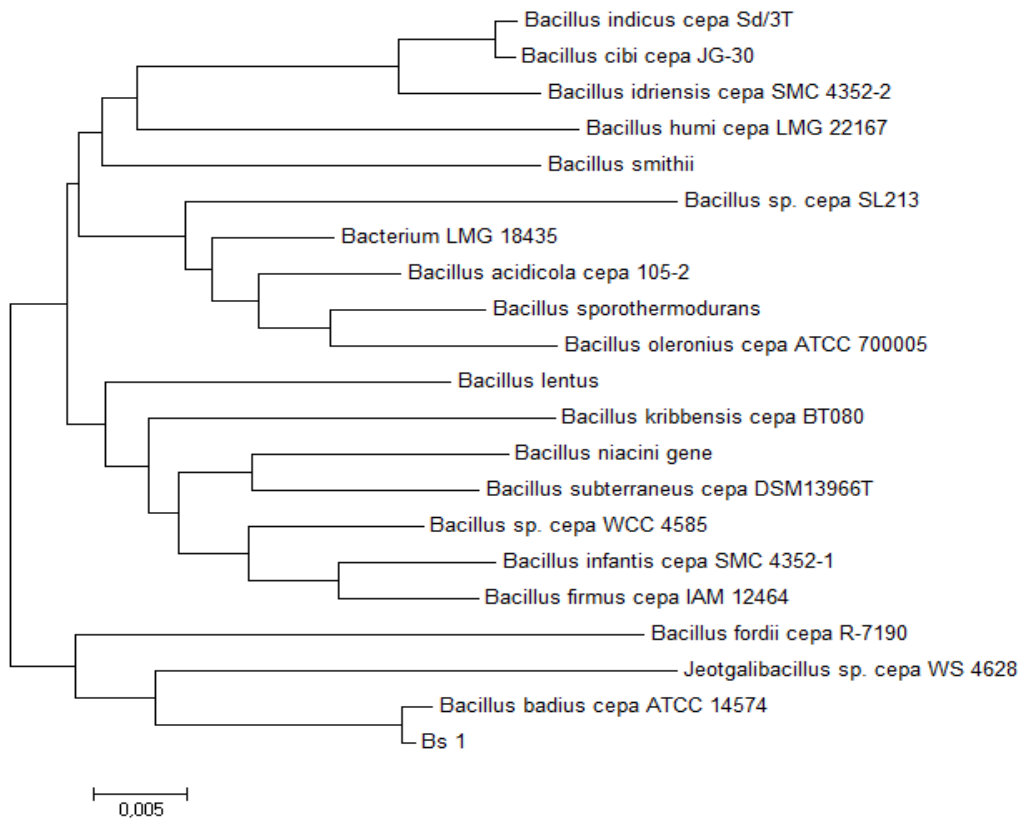
1. Cepas SC 1 y SC2



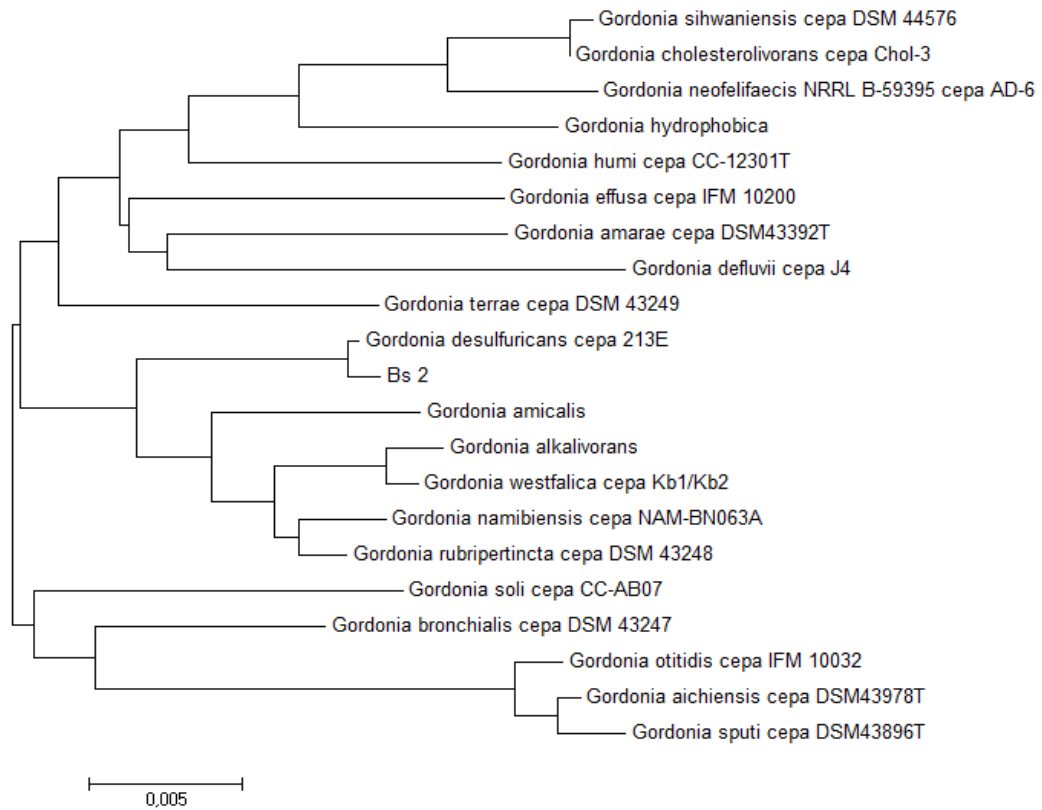
2. Ceba SC 3



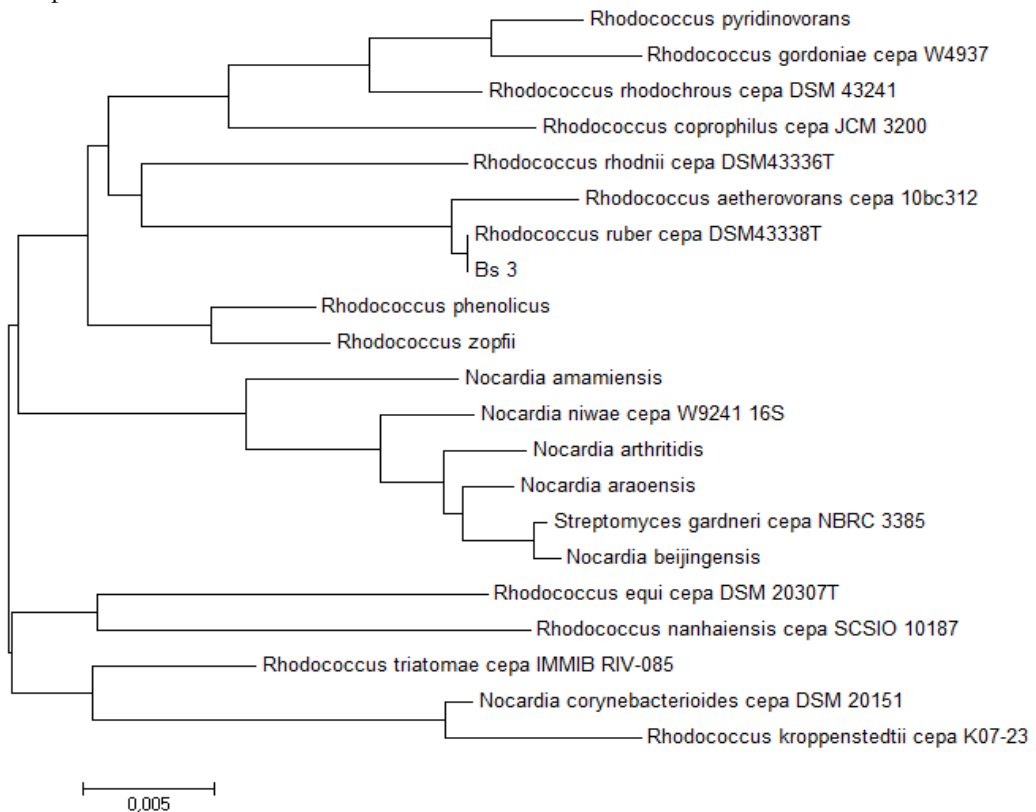
3. Ceba BS 1



4. Ceba BS 2



5. Ceba BS 3



6. Cepa BS 4

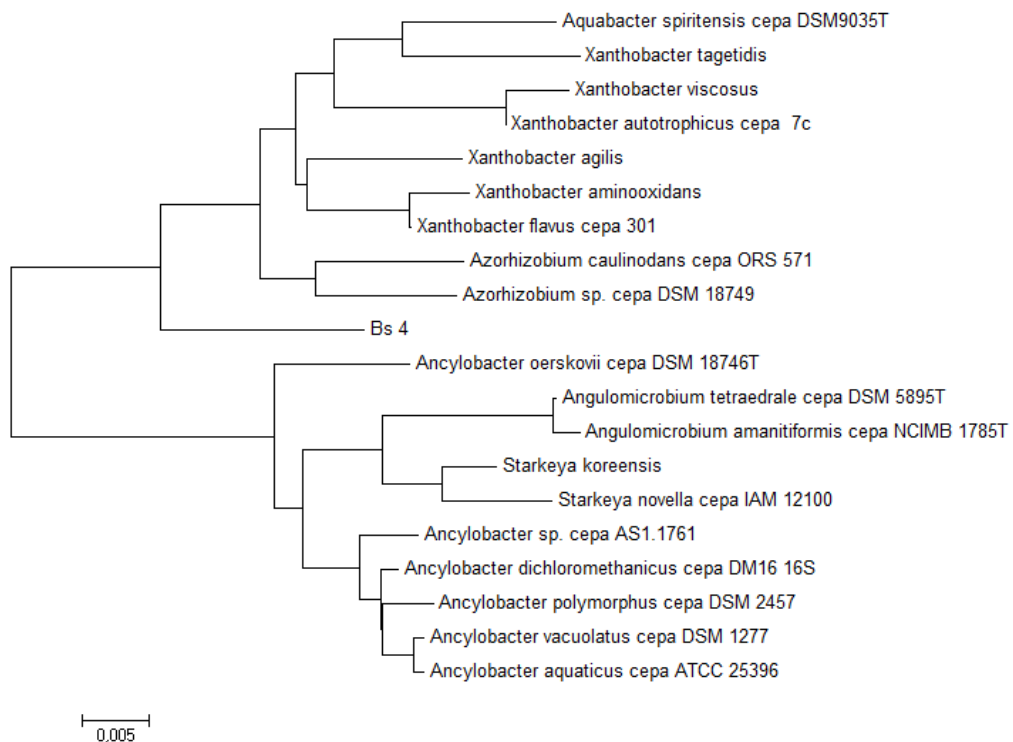


Figura 8. Árboles filogenéticos de con cepas de referencia. 1) SC 1 y SC 2; 2) SC 3; 3) BS 1; 4) BS 2; 5) BS 3 y 6) BS 4.

De los microorganismos aislados se encontraron 4 clases distintas: 2 Alphaproteobacteria, 2 Betaproteobacteria, 2 Actinobacteria y 1 Bacilli. Al alinear cada cepa con el pariente más cercano según los árboles, 6 de estas obtuvieron porcentajes de identidad mayores al 99% indicando una alta probabilidad de que sean una misma especie (**Tabla 6**).

Tabla 6. Cepas de referencia más cercanas a los microorganismos degradadores de camfor.

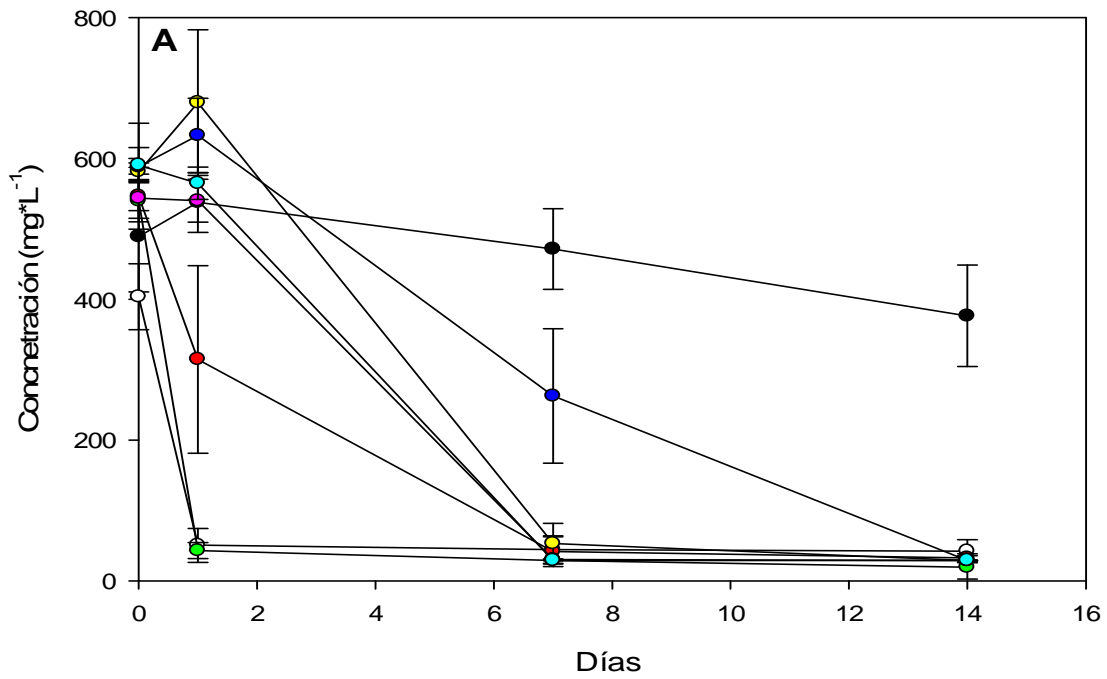
Cepa	Nombre del microorganismo más cercano	No. Acceso	% Identidad	Filum	Clase
Bs 1	<i>Bacillusadius</i> cepa ATCC 14574	X77790	99.4	Firmicutes	Bacilli
Bs 2	<i>Gordonia desulfuricans</i> cepa 213E	AF101416	99.9	Actinobacteria	Actinobacteria
Bs 3	<i>Rhodococcus ruber</i> cepa DSM43338T	X80625	99.9	Actinobacteria	Actinobacteria
Bs 4	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> cepa 7c	X94201	97.0	Proteobacteria	Alphaproteobacteria
SC 1	<i>Pandoraea verracti</i> cepa NS15	AB510956	99.9	Proteobacteria	Betaproteobacteria
SC 2	<i>Pandoraea verracti</i> cepa NS15	AB510956	100.0	Proteobacteria	Betaproteobacteria
SC3	<i>Sphingomonas histidinilytica</i> cepa UM2	EF530202	99.9	Proteobacteria	Alphaproteobacteria

La cepa BS 4 no fue agrupada con ningún microorganismo específico, por lo que su secuencia fue alineada con cada microorganismos del grupo a la cual fue asociada (parte superior del árbol), donde el mayor porcentaje de identidad (97%) fue obtenido con *Xanthobacter autotrophicus* cepa 7c lo que puede indicar que se trata de una nueva especie, probablemente del genero *Xanthobacter*. Así mismo, este árbol contiene otros géneros, tendencia que ya ha sido observada al construir árboles filogenéticos con secuencias del 16S ARNr de este género, en especial las cepas *Aquabacter spiritensis* y *Azorhizobium caulinodans* que aparecen entremezcladas dentro del cluster de *Xanthobacter* (132). Con respecto a la cepa BS 2 la cual es una actinobacteria, pero la tinción Gram dió Gram negativa, se conoce que este género puede ser Gram variable (133).

5.5 Evaluación de la degradación de camfor por cepas puras

Las cepas aisladas fueron evaluadas para comprobar su capacidad de degradar el camfor como única fuente de carbono, observando que todas fueron capaces de degradar y de crecer con este compuesto (**Figura 9**). La disminución de la concentración de camfor en el control abiótico se debe a que este compuesto es volátil, sin embargo cuando la cepa es capaz de degradarlo se observa en un menor tiempo y de mayor magnitud una disminución de esta concentración, ya que la concentración final de camfor cuando hay microorganismo presente es alrededor de 30 mg*L⁻¹ mientras que el control abiótico al final del experimento estaba en una concentración de 400 mg*L⁻¹ aproximadamente. Las cepas *Bacillusadius* cepa BS 1 y *Rhodococcus ruber* cepa BS 3 fueron las que presentaron mayor crecimiento en comparación con las demás, alcanzando la máxima densidad óptica en el día 7, día en el cual se observa también el mayor descenso en la concentración de camfor. Con respecto a las cepas *Xanthobacter* s cepa

BS 4, *Pandoraea vervacti* cepa SC 2 y *Sphingomonas bistidinilytica* cepa SC 3, crecieron un poco menos pero también se observó la tendencia de llegar al crecimiento máximo en el día 7. La cepa *Pandoraea vervacti* cepa SC 1 al día 7 había degradado menos el camfor a comparación de las demás lo que también se vió reflejado en su crecimiento, pero entre el día 7 y 14 degrado en igual magnitud el camfor como las otras cepas y alcanzó su crecimiento máximo. Por último, la cepa *Gordonia desulfuricans* cepa BS 2 fue la que presentó menor crecimiento al final del experimento, sin embargo mostró degradación casi total de camfor en el día 7 al igual que las dos cepas de mayor crecimiento.



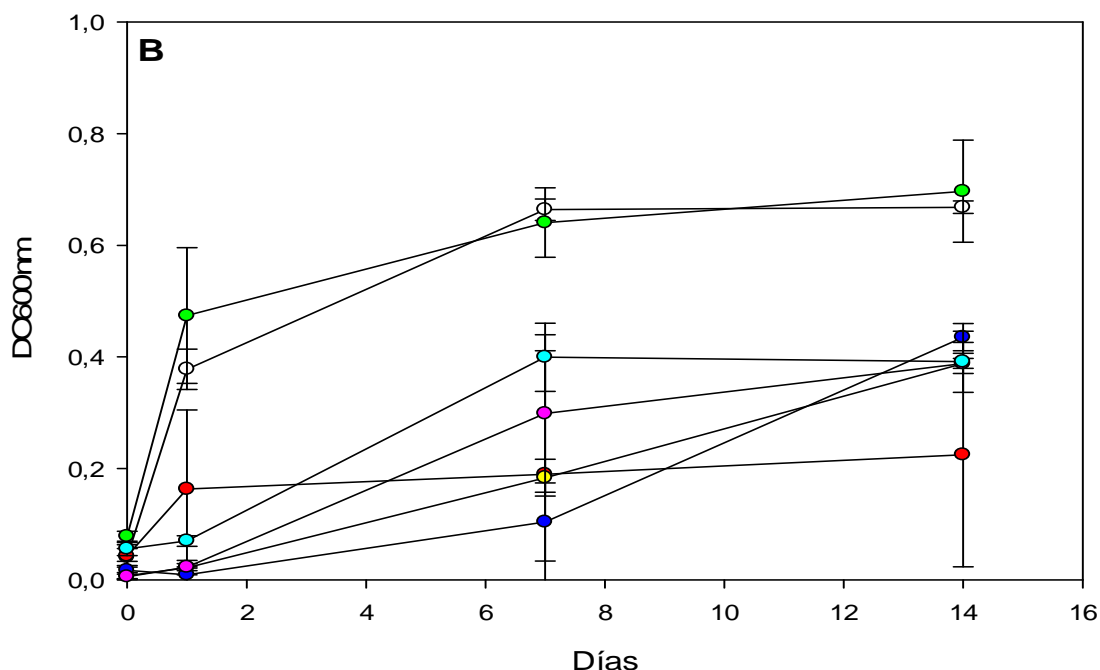


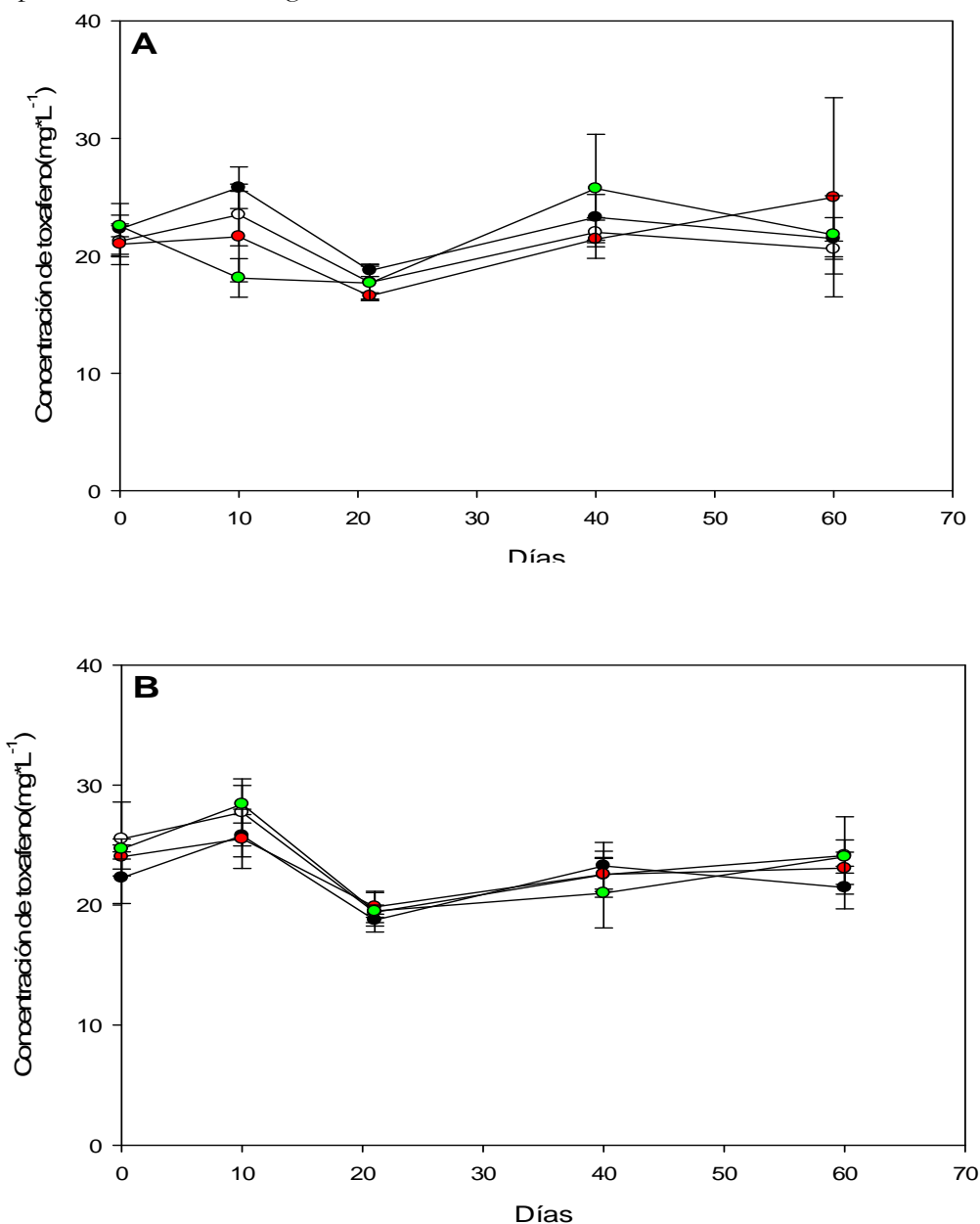
Figura 9. Degradación de camfor (A) y densidad óptica a 600nm (B) de las cepas aisladas a partir de cultivo de enriquecimiento. ● Control abiótico; ○ *Bacillus badius* cepa BS 1; ● *Gordonia desulfuricans* cepa BS 2; ● *Rhodococcus ruber* cepa BS 3; ● *Xanthobacter* sp cepa BS 4; ● *Pandoraea vervacii* cepa SC 1; ● *Pandoraea vervacii* cepa SC 2; ● *Sphingomonas histidinilytica* cepa SC 3.

Al observar los cromatogramas del camfor de las diferentes cepas entre los días 7 y 14 (**Anexo 12**), se observaron picos comunes entre 8,4 y 10 minutos. Pero hubo metabolitos predominantes como por ejemplo en las cepas *Bacillus badius* cepa BS 1 y *Sphingomonas histidinilytica* cepa SC 3, en las que se observa un pico con un tiempo de retención de 9 minutos el cual prevalece entre el día 7 y 14. Así mismo, *Rhodococcus ruber* cepa BS 3 mostró este mismo metabolito como el más dominante pero en el día 1, el cual al día 7 (no se muestra) y al día 14 ya no se encontraba presente. Las cepas *Pandoraea vervacii* cepa SC 1 y *Pandoraea vervacii* cepa SC 2 al día 14 no se observó la producción de ningún metabolito, sin embargo con *Pandoraea vervacii* cepa SC 1 al día 7 todavía se podía observar mayor cantidad de camfor a comparación de *Pandoraea vervacii* cepa SC 2 la cual ya había consumido casi todo el camfor. Con respecto a *Xanthobacter* sp cepa BS 4 no se evidenció ningún pico predominante, pero entre el día 7 y 14 hubo disminución de unos pequeños picos los cuales también estaban presentes en todas las cepas entre un rango de 8,4 a 10 minutos. El único microorganismo que presentó un metabolito predominante diferente a las demás fue *Gordonia desulfuricans* cepa BS 2, con un

tiempo de retención de 9,8 minutos. De la misma manera, al observar estos picos comunes en todas las cepas puede sugerirse un mismo mecanismo en la degradación del camfor.

5.6 Evaluación de la degradación de toxafeno por cepas puras

Como se dijo anteriormente las cepas que se evaluaron con toxafeno fueron las aisladas a partir de los biosólidos (**Figura 10**). De las cuatro cepas evaluadas en un periodo de dos meses, ninguna mostró capacidad de degradar el toxafeno ($25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) como única fuente de carbono, ni en presencia de camfor o glucosa.



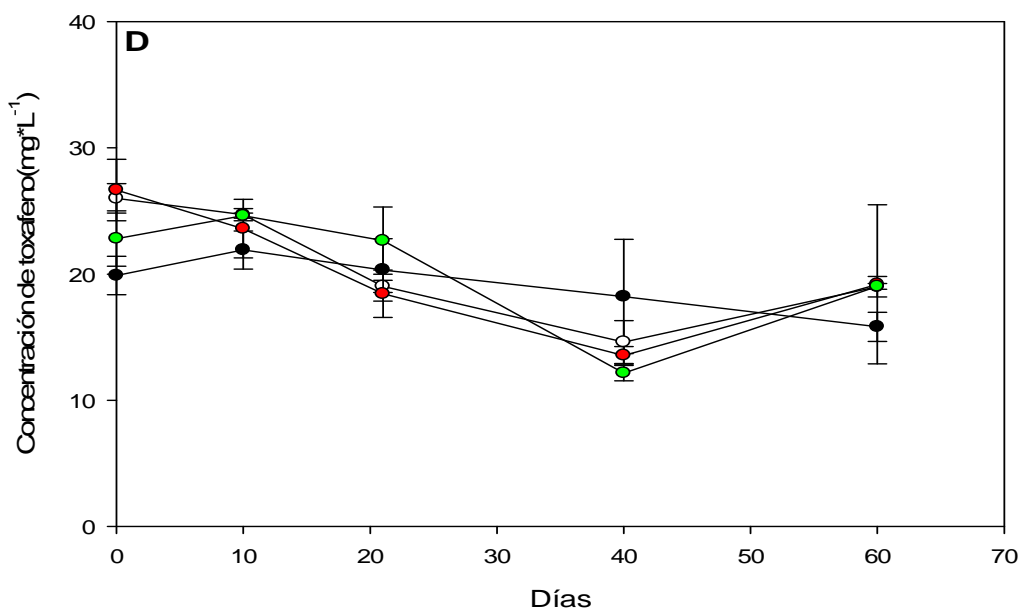
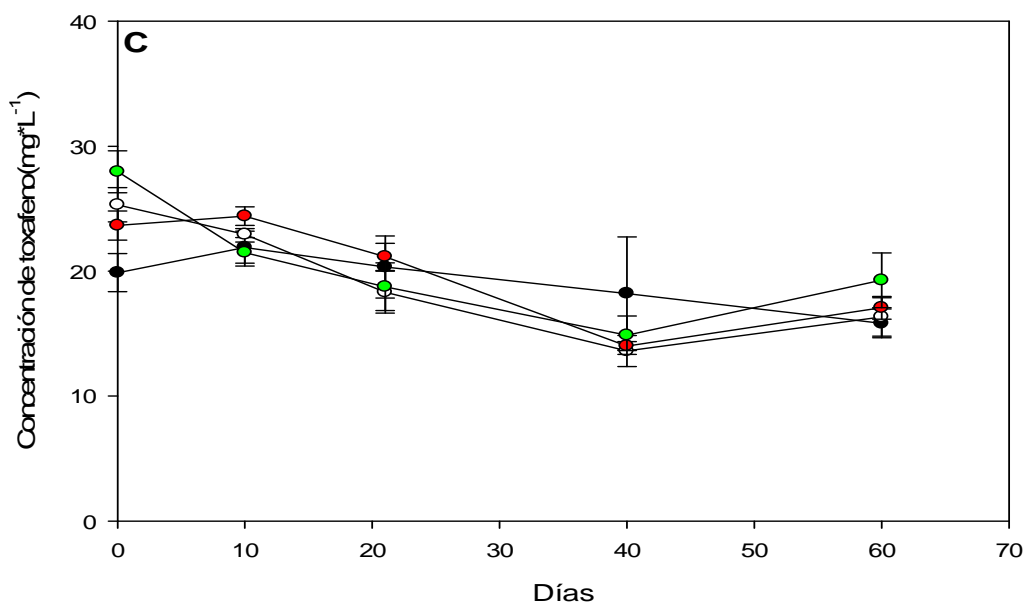


Figura 10. Degradación de toxafeno por A) *Bacillus badius* cepa BS1, B) *Gordonia desulfuricans* cepa BS 2, C) *Rhodococcus ruber* cepa BS 3 y D) *Xanthobactersp.* BS 4. ● Control Abiótico; ○ Toxafeno como única fuente de carbono; ● Toxafeno + Camfor; ● Toxafeno + Glucosa.

5.7 Degradación de toxafeno en microcosmos aerobios

Al determinar los porcentajes de humedad y de capacidad de campo del suelo, se obtuvo que se requerían añadir 368 μ l de agua o de las diferentes soluciones de nutrientes a los microcosmos para mantener un 60% de humedad (**Anexo 2**). Durante el periodo evaluado, ninguno de los tratamientos mostró degradación de toxafeno (**Figura11**).

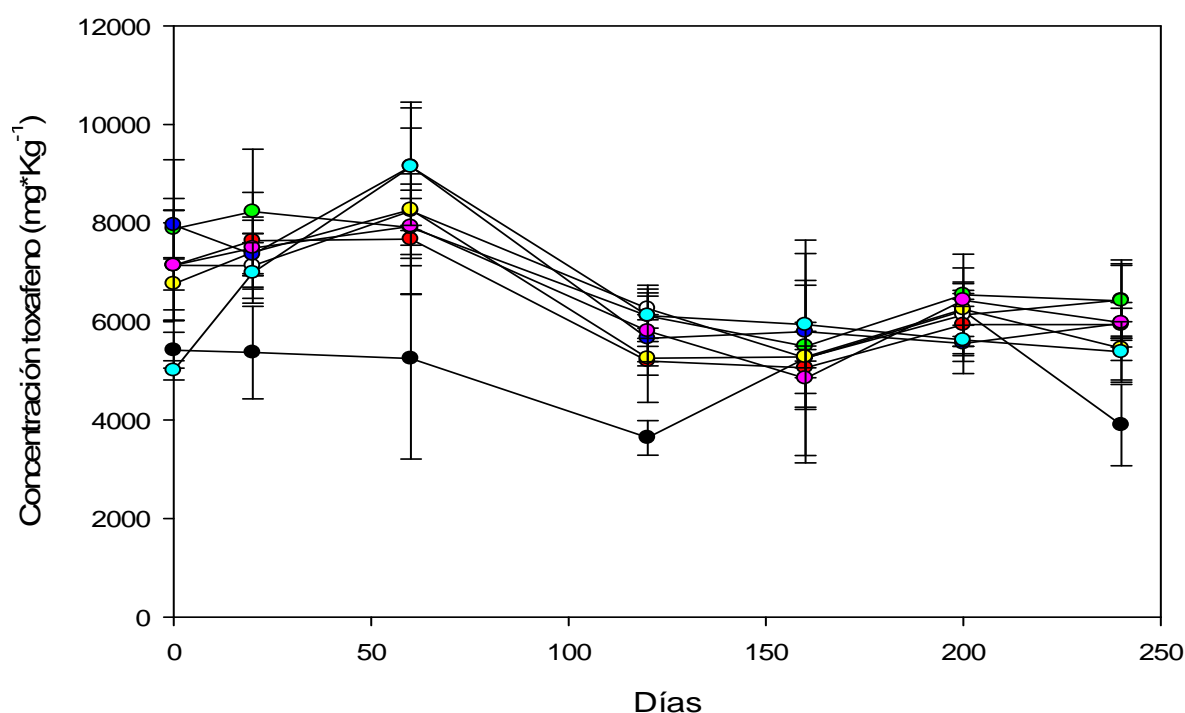


Figura 11. Degradación de toxafeno pormicrocosmos aerobios evaluados por un periodo de 240 días. N=Nitrógeno y P=Fósforo. ● Suelo estéril; ○ Atenuación natural; ● Atenuación natural + N + P; ● Material vegetal; ● Material vegetal + Biosólidos; ● Material vegetal + Biosólidos + CAL; ● Camfor + N + P; ● Melaza + N + P.

Se observaron variaciones en el tiempo con respecto a las concentraciones de toxafeno que se extrajeron, teniendo una mayor variabilidad en los tres primeros tiempos evaluados, sin embargo esta tendencia se ve disminuida en los tiempos posteriores ya que se evidencia una mayor uniformidad en la concentración extraída del plaguicida. Estas variaciones pueden deberse a errores de tipo instrumental y de operario, como también al trabajar con una muestra compuesta la distribución de toxafeno en el suelo no es homogénea y esto puede generar mayor variabilidad en los datos, al igual que existe una heterogeneidad natural del toxafeno en

el suelo. Igualmente, se hicieron comparaciones de los cromatogramas como lo realizado en el **numeral 5.3**, sin evidenciar algún cambio en estos.

Los porcentajes de recuperación de los surrogates se presentan en el **Anexo 13**, estos valores presentaron más variación en el tiempo a comparación del toxafeno, en especial el 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno el cual fue usado como control de la extracción y presentó porcentajes de recuperación entre 30 – 100%. A pesar de esto, este compuesto mostró uniformidad en todos los tratamientos en los diferentes tiempos en los que se realizaron extracciones. Sin embargo, al ser más variable a comparación de lo que se observó en las concentraciones de toxafeno a través del tiempo, los datos no se normalizaron respecto a los porcentajes de recuperación de este. Así mismo, el PCB No. 209, el cual se añadía directamente a los viales antes de ser corridos en el equipo como control de precisión de este mostró porcentajes de recuperación hasta de casi 200%, igualmente en los diferentes tiempos evaluados las mismas tendencias eran observadas en todos los tratamientos por lo que estas variaciones se deban más a cuestiones de operario.

6. DISCUSIÓN

Los cultivos que fueron enriquecidos a partir de biosólidos con camfor como única fuente de carbono, lograron mostrar degradación de toxafeno en presencia de camfor, pero no en presencia de glucosa ni tampoco con toxafeno como única fuente de carbono. Esto indica que la degradación se deba probablemente por procesos cometabólicos, tal vez por las enzimas involucradas en el metabolismo del camfor incluyendo el citocromo P450. Por otro lado, no se observó degradación de toxafeno con los cultivos de enriquecimientos a partir de los suelos del Copey, en ninguno de los tratamientos. Eso sugiere que la capacidad de degradación de toxafeno de estos es reducida y podría ser estimulada mediante la adición de los biosólidos a estos suelos. El cometabolismo es un proceso fortuito en el que se da la transformación de un sustrato secundario que no puede ser usado como fuente de energía o carbono, en presencia de un sustrato primario que sí puede ser usado como fuente de carbono, en este proceso los microorganismos no van a obtener ninguna ganancia energética por la degradación del contaminante (139).

El aislamiento de bacterias usando análogos estructurales ha dado resultado para el aislamiento de bacterias degradadoras de PCB, usando el bifenil (15,140), endrina y dieldrina (16), donde usaron el 1,2-epoxiciclohexano como análogo estructural para ambos compuestos y DDT (94,95) usando bifenil. En nuestro caso la molécula que se seleccionó fue el camfor debido a su similaridad estructural con el toxafeno y que *Pseudomonas putida* es la única cepa bacteriana reportada como degradadora de toxafeno en condiciones aerobias y fue previamente aislada con este compuesto (14). El camfor pertenece a la gran familia de los terpenos dentro de la cual hay más de 15000 compuestos, cuyas características estructurales también se asemejan a una gran variedad de xenobióticos y se ha visto que pueden estimular la degradación de variedad de compuestos hechos por el hombre (141). Por otro lado, estudios metagenómicos han demostrado la riqueza que pueden llegar a tener los lodos activados en genes relacionados con degradación de contaminantes orgánicos siendo de gran abundancia los genes relacionados con el citocromo P-450 (142), familia dentro de la cual está la enzima monooxigenasa P450cam descrita a partir de *Pseudomonas putida* encargada de darle la capacidad a esta bacteria de crecer con camfor como única fuente de carbono, ya que es la primera enzima en actuar sobre este

substrato (143,144), al igual con otros terpenos como el cineol y la P450cin de *Citrobacter braakii* (145), y el linalol y la P450lin de *Pseudomonas incognita* (146).

Teniendo esto en cuenta, la degradación de toxafeno por los cultivos enriquecidos a partir de biósólidos solo cuando el camfor estaba presente puede indicar la inducción de una enzima perteneciente al citocromo P450. El hecho que la glucosa, fuente de carbono más fácilmente asimilable por los microorganismos, no estimuló la degradación de toxafeno indica que la estimulación en la degradación de toxafeno debe llevarse a cabo con moléculas específicas que enriquezcan las poblaciones microbianas y puedan inducir sus enzimas capaces de degradar este plaguicida.

La enzima citocromo P450 es una monooxigenasa que introduce una molécula de oxígeno al sustrato. Si efectivamente esta enzima es la que actúa sobre el toxafeno, se esperaría obtener productos más polares y probablemente con menos sustituciones cloro. En el cromatograma de los cultivos enriquecidos a partir de biósólidos cuando el camfor estaba presente se observa un aumento en los compuestos con menores tiempos de retención, posiblemente compuestos a los cuales se incorporaron grupos de oxígeno que podrían ser nuevos metabolitos de degradación de toxafeno en condiciones aerobias. Resultado también observado por Clark & Matsamura (14) donde con *Pseudomonas putidax* sedimentos, en ambos casos evidenciaron la degradación de los compuestos más clorados seguida de la degradación de los menos clorados.

En este estudio se aislaron nuevas cepas degradadoras de camfor pertenecientes a diversos géneros *Bacillus*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Xanthobacter* y *Pandoraea* pertenecientes a *Firmicutes*, *Actinobacteria*, α -*Proteobacteria* y β *Proteobacteria*. Solo con *Rhodococcus* hay reportes de cepas degradadoras de camfor como *Rhodococcus ruber* T1 y *Rhodococcus wratislaviensis* DLC-cam (147). Desafortunadamente ninguna fue capaz de degradar toxafeno, aunque en degradación de COPs los géneros *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Pandoraea* y *Rhodococcus* están reportados en degradación de PCB, lindano, DDT, endrina y dieldrina (16, 91,140, 148), mientras que los géneros *Gordonia* y *Xanthobacter* aunque no se encuentran reportados con estos compuestos hay estudios en los que se demuestra su habilidad para degradar otros compuestos halogenados (133, 134).

Para profundizar en estudios de la degradación de camfor dada la diversidad de bacterias encontradas en este trabajo, se diseñaron unos primers para poder buscar estas enzimas relacionadas con el citocromo P450 en un microorganismo de interés (**Anexo 14**), y ensayos preliminares con las cepas aisladas en este trabajo mostraron amplificación de fragmentos de DNA con el tamaño esperado. Sin embargo, se necesitaría más trabajo para confirmar la presencia de estas enzimas en las cepas aisladas. Igualmente, en la parte de cromatografía se observaron metabolitos en común en las diferentes cepas y aunque ya se conoce la ruta de degradación del camfor (135) podrían ser caracterizados para hacer un nuevo aporte sobre posibles nuevos metabolitos en la ruta de degradación de este compuesto.

Por otro lado, las cepas que fueron aisladas a partir de los cultivos con biosólidos, no degradaron toxafeno en 60 días de experimento, lo que indica lo difícil que puede llegar a ser la degradación de muchos compuesto policlorados por una cepa pura aerobia, así como también demuestra que el uso de un consorcio no definido, como fueron los cultivos enriquecidos es más efectivo en la degradación de este plaguicida. Sin embargo, hay que resaltar que tal vez en el aislamiento de las cepas no se aislaron las involucradas en la degradación de toxafeno.

Es importante mencionar el hecho de que en este estudio al analizar las secuencias del 16S ARNr, posiblemente se encontró una nueva cepa relacionada con *Xanthobacter sp.* con la cual podrían realizarse estudios posteriores para una mejor caracterización de esta cepa.

En los 8 meses de duración de los experimentos en microcosmos no se evidenció degradación de toxafeno en ninguno de los tratamientos evaluados. Principalmente, lo que se intentó probar en este ensayo fue si la degradación aerobia podría ser una buena estrategia en procesos de biorremediación dada la escasa información que se encuentra sobre este proceso. Para investigar lo mencionado, se usó de camfor como análogo estructural y fuente de carbono más específica para microorganismos capaces de degradarlo, melaza como una fuente de carbono fácilmente asimilable y la adición de hojas de eucalipto y ciprés, las cuales tienen en su composición una gran cantidad de terpenos (136,137) que podrían ayudar a estimular la degradación de toxafeno y en un estudio realizado por Hernández *et, al.* (138) demostró que la adición de material vegetal al suelo, como hojas de eucalipto, naranja, hiedra y pino estimularon la degradación de PCB. Adicionalmente, se probó la adición de biosólidos como

un aporte de microorganismos al suelo contaminado, este último también se evaluó con la adición de hojas de eucalipto y ciprés, y con la adición de cal con el fin de determinar si el pH podría afectar el proceso de degradación, sin embargo la adición de cal mostró un pequeño incremento en el pH (**Anexo 15**) más no se evidenció degradación de toxafeno. A pesar de que la degradación de toxafeno bajo condiciones aerobias es más limitada pero se puede dar como lo demostrado en este estudio con los cultivos de enriquecimiento, se puede sugerir que una fase anaerobia previa es importante para que se generen productos menos clorados y más susceptibles a la oxigenación como se ha mencionado anteriormente. Esto por ejemplo es mostrado por la tecnología DARAMEND la cual usa ciclos anaerobios-aerobios, logrando degradación de toxafeno de más del 95%, aunque el papel que juega la fase aerobia no ha sido demostrado (128,129). Por otro lado, al obtener degradación de toxafeno con los cultivos enriquecidos ya mencionados se podría pensar en la bioaumentación como tratamiento para la descontaminación de los suelos del Copey aplicando microorganismos previamente crecidos con camfor como fuente de carbono.

7. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que demuestra que el camfor puede estimular la degradación aerobia de toxafeno probablemente por procesos cometabólicos, también los biosólidos mostraron tener gran potencial para degradar toxafeno a comparación de los suelos del Copey donde no hubo degradación en cultivos de enriquecimiento y en microcosmos. En conjunto, los biosólidos y el camfor factores pueden presentar una alternativa de biorremediación mediante la bioaumentación y bioestimulación de los microorganismos para luego ser aplicados en El Copey.

Las cepas evaluadas mostraron capacidad para degradar camfor pero no para degradar la mezcla técnica de toxafeno, sin embargo no quiere decir que no sean capaces de lograr transformaciones de ciertos congéneres puros. Además, se reportaron nuevas cepas degradadoras de camfor, incluyendo una posible nueva especie *Xanthobacter sp.* BS4, con la cual es importante llevar a cabo próximos estudios para una mejor caracterización de este microorganismo.

Los ensayos de microcosmos sugieren que una fase anaerobia previa puede ser de gran relevancia para facilitar la degradación aerobia de toxafeno como lo que se ha visto con DARAMEND que a comparación de tratamientos solo anaerobios como lo es la harina de sangre, logra mayores porcentajes de degradación de toxafeno.

8. RECOMENDACIONES

El ensayo con biosólidos y camfor podría realizarse por un periodo más largo para ver más detalladamente si se seguían aumentando los compuestos con menores tiempos de retención. Al cabo de 21 días el camfor ya estaba en concentraciones de $30\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, por lo que si se hace un ensayo con un mayor tiempo, podría considerarse la idea de añadir camfor al medio periódicamente para seguir estimulando el crecimiento de los microorganismos.

Las cepas que no mostraron degradación de la mezcla técnica de toxafeno igual podrían evaluarse con congéneres puros o una pequeña mezcla de estos, como por ejemplo los compuestos HxSed y Hp Sed, que están reportados como los principales metabolitos de degradación anaerobia de toxafeno que se acumulan en el ambiente. También podría evaluarse la degradación de toxafeno pero con las cepas en conjunto y ver si esta unión puede generar un efecto de sinergismo que estimule la degradación. Además, se podrían someter en un principio a concentraciones bajas de toxafeno e ir aumentando la concentración de este para generar una fase de adaptación al contaminante.

Los microcosmos podrían volverse a realizar pero usando un mayor volumen de material vegetal y biosólidos, en este estudio la cantidad usada fue equivalente al 5% de los 5 g gramos de suelo usado, podría manejarse una proporción de 50:50 o usar menos cantidad de suelo contaminado y más material de aporte.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Korytár P, Stee L, Leonards P, Boer J, Brinkman U (2003) Attempt to unravel the composition of toxaphene by comprehensive two-dimensional gas chromatography with selective detection. *Journal of Chromatography A*; 994, 179–189.
2. Vetter W, Oehme M (2000) Toxaphene. Analysis and Environmental Fate of Congeners. *The Handbook of Environmental Chemistry*; 3, 237-287.
3. Kucklick J, Helm P (2006) Advances in the environmental analysis of polychlorinated naphthalenes and toxaphene. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 386, 819–836.
4. WHO. Camphechlor. Environmental Health Criteria 45, *World Health Organization*, Geneva, 1984: p. 66.
5. Rodríguez H (1999) La maldición del oro blanco. *Revista CROMOS*. N° 4.217.
6. Sánchez N, Rodríguez M, Sarria V (2006) Plaguicidas Obsoletos en Colombia. *Revista de ingeniería Universidad de los Andes*; 23, 13-22.
7. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (2007) Inventario Nacional de Existencias de Plaguicidas COP, Colombia 2006. Proyecto de actividades habilitadoras en el marco del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (COP).
8. Hurtado M (2010) Incidencia y tendencia de seis cánceres en poblaciones expuestas ambientalmente a plaguicidas en desuso en el departamento del Cesar (Colombia). *Revista Colombiana de Cancerología*; 14(2):88-101.
9. Fingerling G, Herkorn N, Parlar H (1996) Formation and spectroscopic investigation of two hexachlorobornanes from six environmentally relevant toxaphene components by reductive dechlorination in soil under anaerobic conditions. *Environmental Science & Technology*; 30, 2984-2992.
10. Lacayo M, Bavel B, Mattiasson B (2004) Degradation of toxaphene in water during anaerobic and aerobic conditions. *Environmental Pollution*; 130, 437-443.
11. Baughman C, Bhattacharyya T, Schanemann S, Tafer F, Wilson M (2010) More Information is Needed on Toxaphene Degradation Products. Report No. 2006-P-00007, December 16, 2005. <http://www.epa.gov/oig/reports/2006/20051216-2006-P-00007.pdf>
12. Steffen R, Anke N, Walter V (2003) Anaerobic transformation of compounds of technical toxaphene. I. Regiospecific reaction of chlorobornanes with geminal chlorine atoms. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(11): 2614–2621.

13. Lacayo M, Quillaguamán J, Baveld B, Mattiasson B (2005) A toxaphene-degrading bacterium related to *Enterobacter cloacae*, strain D1 isolated from aged contaminated soil in Nicaragua. *Systematic and Applied Microbiology* 28; 632–639.
14. Clark JM, Matsuma F (1979) Metabolism of toxaphene by aquatic sediment and a camphor-degrading *Pseudomonad*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*; 8, 285-298.
15. Ahmed M, Focht DD (1973) Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. *Canadian Journal of Microbiology*; 19, 47-52.
16. Matsumoto E, Kawanaka Y, Yun S, Oyaizu H (2009) Bioremediation of the organochlorine pesticides, dieldrin and endrin, and their occurrence in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 84: 205–216.
17. Gribble G (2003) The diversity of naturally produced organohalogenes. *Chemosphere* 2003; 52: 289–297.
18. Chaudhry R, Chapalamadugu S (1991) Biodegradation of Halogenated Organic Compounds. *Microbiological reviews*; 55(1), 59-79.
19. Gianfreda L, Rao M (2008) Interactions between xenobiotics and microbial and enzymatic soil activity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*; 38, 269–310.
20. Megharaj M, Ramakrishnan B, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R (2011) Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*; 37, 1362–1375.
21. Hüskes R, Levsen K (1997) Pesticides in rain. *Chemosphere*; 35(12):3013-3024.
22. Glotfelty D, Seiber J, Liljedahl L. Pesticides in fog. *Nature* 1987; 325(12): 602-605.
23. El-Shahawi M.S, Hamzaa A, Bashammakh A.S, Al-Saggaf W.T (2010) An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta*; 80, 1587–1597.
24. Ritter L, Solomon K, Forget J, Stemmeroff M, O’Leary C (1995) A review of selected persistent organic pollutants. *World Health Organization*; 1-149.
25. Vallack H, Bakker D, Brandt I, Broström-Lundén E, Brouwer A, Bull K, Gough C, Guardans R, Holoubek I, Jansson B, Koch R, Kuylenstierna J, Lecloux A, Mackay D, McCutcheon P, Mocarelli P, Taalman R (1998) Controlling persistent organic pollutants—what next?. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 6, 143-175.

26. O'Sullivan G, Megson D (2013) Brief Overview: Discovery, Regulation, Properties, and Fate of POPs. In: Environmental Forensics for Persistent Organic Pollutants. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp 1-20.
27. Weber R, Watson A, Forter M, Oliaci F (2011) Persistent organic pollutants and landfills – a review of past experiences and future challenges. *Waste Management & Research*; 29(1) 107–121.
28. Xua W, Wang X, Caia Z (2013) Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review. *Analytica Chimica Acta*; 790, 1-13.
29. Holmstead R, Khalifa S, Casida J (1974) Toxaphene composition analysed by combined gas chromatography — chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 22, 939.
30. de Boer J, de Geus H (1997) Multidimensional Gas Chromatographic Analysis of Toxaphene. *Environmental Science & Technology*; 31(3): 873–879.
31. Stern A, Loewen M, Miskimmin B, Muir D, Westmore J (1996) Characterization of two toxaphene components in treated lake sediment. *Environmental Science and Technology*; 30, 2251-2258.
32. Buser H, Haglund P, Muller M, Poiger T, Rappe C (2000) Rapid anaerobic degradation of toxaphene in sewage sludge. *Chemosphere* 40; 1213-1220.
33. Fingerling M, Parlar H (1997) Spectroscopic Characterization of 7b,8c,9c-Trichlorocamphene-2-one Formed from Toxaphene Components in an Anaerobic Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 45; 4116-4121.
34. Ruppe S, Neumann A, Vetter W (2003) Anaerobic transformation of compounds of technical toxaphene. I. Regiospecific reaction of chlorobornanes with geminal chlorine atoms. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(11), 2614–2621.
35. Ruppe S, Neumann A, Braekvelt E, Tomy G, Stern G, Maruya K, Vetter W (2004) Anaerobic transformation of compounds of technical toxaphene. 2. Fate of compounds lacking geminal chlorine atoms. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3), 591–598.
36. Prasad B, Rojebally A, Plettner E (2011) Identification of Camphor Oxidation and Reduction Products in *Pseudomonas putida*: New Activity of the Cytochrome P450cam. *System. Journal of Chemical Ecology* 37: 657–667.
37. Kadow M, Loschinski K, Saß S, Schmidt M, Bornscheuer U (2011) Completing the series of BVMOs involved in camphor metabolism of *Pseudomonas putida* NCIMB 10007 by identification of the two missing genes, their functional expression in *E. coli*, and biochemical characterization.; DOI: 10.1007/s00253-011-3859-1.

38. Meunier B, Visser S, Sason Shaik S (2004) Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews*; 104, 3947-3980.
39. Lacayo M, Terrazas E, Bavel B, Mattiasson B (2006) Degradation of toxaphene by *Bjerkandera* sp. strain BOL13 using waste biomass as a cosubstrate *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 549-554.
40. Boon J, Sleiderink H, Helle M, Dekker M, Schanke A, Roex E, Hillebrand T, Klamer H, Govers B, Pastor D, Morse D, Wester P, Boer J (1998) The use of a microsomal in vitro assay to study phase I biotransformation of chlorobornanes (toxaphene®) in marine mammals and birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*; 121 385–403.
41. Kapp T, Vetter W (2011) Hydroxylated polychlorobornanes – Synthesis and characterization of new potential toxaphene metabolites. *Chemosphere*; 82: 32–36.
42. Bidleman T, Patton G, Walla M, Hargrave B, Vass W, Erickson P, Fowler B, Scott V, Gregor D (1989) Toxaphene and Other Organochlorines in Arctic Ocean Fauna: Evidence for Atmospheric Delivery. *Arctic*; 42(4), 307-313.
43. Oetjen K, Horst K (1998) Levels of toxaphene indicator compounds in fish meal, fish oil and fish feed. *Chemosphere*; 37 (1), 1-11.
44. Foreid S, Rundberget T, Severinsen T, Wiig O, Skaare J (2000) Determination of toxaphenes in fish and marine mammals. *Chemosphere*; 41, 521-528.
45. Bachman M, Keller J, West K, Jensen B (2014) Persistent organic pollutant concentrations in blubber of 16 species of cetaceans stranded in the Pacific Islands from 1997 through 2011. *Science of the Total Environment*; 488–489, 115–123.
46. Focht D, Alexander M (1970) Bacterial degradation of diphenylmethane, a DDT model substrate. *Applied microbiology*; 20:608-611.
47. Guzmán B, Fernández M, González M (2005) Congener specific determination of toxaphene residues in fish liver oil using gas chromatography coupled to ion trap MS/MS. *Chemosphere*; 61, 398–404.
48. Vetter W, Krock B, Luckas B (1997) Congener Specific Determination of Compounds of Technical Toxaphene (CTTs) in Different Antarctic Seal Species. *Chromatographia*; 44, 65-73.
49. Wolkersa, Burkowb I, Lydersenc C, Dahlea, Monshouwerd M, Witkamp R (1998) Congener specific PCB and polychlorinated camphene (toxaphene) levels in Svalbard ringed seals (*Phoca hispida*) in relation to sex, age, condition and cytochrome P450 enzyme activity. *The Science of the Total Environment*; 216, 1-11.

50. Andersen G, Føreidb S, Skaareb U, Jenssen B, Lydersend C, Kovacs K (2006) Levels of toxaphene congeners in white whales (*Delphinapterus leucas*) from Svalbard, Norway. *Science of the Total Environment*; 357, 128–137.
51. Gunderson M, Kohno S, Blumberg B, Iguchi T, Guillette Jr L (2006) Up-regulation of the alligator CYP3A77 gene by toxaphene and dexamethasone and its short term effect on plasma testosterone concentrations. *Aquatic Toxicology*; 78, 272–283.
52. Bjerregaard P, Dewailly E, Ayotte P, Pars T, Ferron L, Mulvad G (2001) Exposure of Inuit in Greenland to organochlorines through the marine diet. *Journal of Toxicology and Environmental Health*; 62, 69–81.
53. Calciu C, Chan H, Kubow S (1997) Toxaphene congeners differ from toxaphene mixtures in their dysmorphic effects on cultured rat embryos. *Toxicology*; 124, 153–162.
54. Calciu C, Kubow S, Chan H (2002) Interactive dysmorphic effects of toxaphene or toxaphene congeners and hyperglycemia on cultured whole rat embryos during organogenesis. *Toxicology*; 175, 153–165.
55. Stelzer A, Chan M (1999) The relative estrogenic activity of technical toxaphene mixture and two individual congeners. *Toxicology*; 138, 69–80.
56. Walker J, Seddon L, McMullen E (2003) Organochlorine levels in maternal and umbilical cord blood plasma in Arctic Canada. *Science of the Total Environment*; 302, 27–52.
57. Fetzner S, Lingens F (1994) Bacterial Dehalogenases: Biochemistry, Genetics, and Biotechnological Applications. *Microbiological Reviews* 58(4); 641–685.
58. Fetzner S (1998) Bacterial dehalogenation. *Applied Microbiology Biotechnology* 50: 633–657.
59. Janssen D, Oppentocht J, Poelarends G (2001) Microbial dehalogenation. *Environmental biotechnology* 12: 254–258.
60. Bailey A, Clark M, Ferris P, Krause S, Strong R (2002) Chemistry of the Environment (2ed) Haloorganics and pesticides. Academic Press, San Diego, USA, pp 223–293.
61. Knackmuss H (1996) Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotic compounds. *Journal of Biotechnology* 51: 287–295.
62. Sinha S, Chattopadhyay P, Pan I, Chatterjee S, Chanda P, Bandyopadhyay D, Das K, Sen K (2009) Microbial transformation of xenobiotics for environmental bioremediation. *African Journal of Biotechnology* 8 (22): 6016–6027.

63. Furukawa K & Matsumura F (1976) Microbial metabolism of polychlorinated biphenyls. Studies on the relative degradability of polychlorinated biphenyl components by *Alcaligenes* sp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 24, 251–256 .
64. Furukawa K, Tomizuka N, Kamibayashi (1979) A Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls. *Applied and Environmental Microbiology*; 38, 301–310.
65. Bedard L, Unterman R, Bopp H, Brennan J, Haberl L, Johnson C (1986) Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Applied and Environmental Microbiology*; 51, 761–768.
66. Bopp H (1986) Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*; 53, 23–29.
67. Bedard L, Wagner E, Brennan J, Haberl L, Brown F (1987) Extensive degradation of Aroclors and environmentally transformed polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes eutrophus* H850. *Applied and Environmental Microbiology*; 53, 1094–1102.
68. Unterman R (1996) A history of PCB biodegradation. In Crawford, R. L. and Crawford, D. L. (ed.), *Bioremediation: principles and applications*. University Press, New York, Cambridge, pp 209– 253.
69. Seto M, Masai E, Ida M, Hatta T, Fukuda M, Yano K (1995) Multiple polychlorinated biphenyl transformation systems in the gram-positive bacterium *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Applied and Environmental Microbiology*; 61, 4510–4513.
70. Maeda M, Chung Y, Song E, Kudo T (1995) Multiple genes encoding 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase in the gram-positive polychlorinated biphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*; 61, 549–555.
71. Lau C, Garnon J, Labbe D, Wang Y (1996) Location and sequence analysis of a 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa- 2,4-dienoate hydrolase-encoding gene (bpdF) of the biphenyl/ polychlorinated biphenyl degradation pathway in *Rhodococcus* sp. M5. *Gene*; 171, 53–57.
72. Bedard L, Haberl L, May J, Brennan J (1987) Evidence for novel mechanisms of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H850. *Applied and Environmental Microbiology*; 53, 1103–1112.
73. Furukawa K, Tomizuka N, Kamibayashi A (1983) Metabolic breakdown of Kaneclors (polychlorobiphenyls) and their products by *Acinetobacter* sp. *Applied and Environmental Microbiology*; 46, 140–145.

74. Billingsley K, Backus S, Juneson C, Ward O (1997) Comparison of the degradation patterns of polychlorinated biphenyl congeners in Aroclors by *Pseudomonas* strain LB400 after growth on various carbon sources. *Canadian Journal of Microbiology*; 43, 1172–1179.
75. Arnett C, Parales J, Haddock J (2000) Influence of chlorine substituents on rates of oxidation of chlorinated biphenyls by the biphenyl dioxygenase of *Burkholderia* sp. strain LB400. *Applied and Environmental Microbiology*; 66, 2928–2933.
76. Furukawa K, Miyazaki T (1986) Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Journal of Bacteriology*; 166, 392–398.
77. Mondello F (1989) Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *Journal of Bacteriology*; 171, 1725–1732.
78. Han S, Eltis L, Timmis K, Muchmore S, Bolin J (1995) Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading pseudomonad. *Science*; 270, 976–980.
79. Imbeault N, Powlowski J, Colbert C, Bolin J, Eltis L (2000) Steady-state kinetic characterization and crystallization of a polychlorinated biphenyl-transforming dioxygenase. *The Journal of Biological Chemistry*; 275, 12430–12437.
80. Colbert C, Couture M, Eltis L, Bolin J (2000) A cluster exposed: structure of the Rieske ferredoxin from biphenyl dioxygenase and the redox properties of Rieske Fe-S proteins. *Structure*; 8, 1267–1278.
81. Senda T, Yamada T, Sakurai N, Kubota M, Nishizaki T, Masai E, Fukuda M, Mitsui Y (2000) Crystal structure of NADH-dependent ferredoxin reductase component in biphenyl dioxygenase. *Journal of Molecular Biology*; 304, 397–410.
82. Nagarajan V, Sakurai N, Kubota M, Nonaka T, Nagumo H, Takeda H, Nishizaki T, Masai E, Fukuda M, Mitsui Y, Senda T (2003) Crystallization of the terminal oxygenase component of biphenyl dioxygenase derived from *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Protein and Peptide Letters*; 10, 412–417.
83. Brown M, Bush B, Rhee G, Shane L (1988) PCB dechlorination in Hudson River sediment. *Science*; 240;1674–1676.
84. Quensen J, Boyd S, Tiedje J (1988) Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments. *Applied and Environmental Microbiology*; 56, 2360–2369.

85. Tracey R, Holoman P, Elberson M, Cutter L, May H, Sowers K (1998) Characterization of a defined 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl-ortho-dechlorinating microbial community by comparative sequence analysis of genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*; 64, 3359–3367.
86. Bedard L, Ritalahti K, Löffler F (2007) Dehalococcoides population in sediment-free mixed cultures metabolically dechlorinates the commercial polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1260. *Applied and Environmental Microbiology*; 73, 2513–2521.
87. Watts J, Fagervold S, May H, Sowers K (2005) A PCR-based specific assay reveals a population of bacteria within Chloroflexi associated with the reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *Microbiology*, 151, 2039–2046.
88. Langlois B, Collins J, Sides K (1970) Some factors affecting degradation of organochlorine pesticide by bacteria. *Journal of dairy science* 53;1671-1675.
89. Ahuja R, Awasthi N, Manickam N, Kumar A (2001) Metabolism of 1,1-dichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethylene by *Alcaligenes denitrificans*. *Biotechnology Letters*; 23:423–426.
90. Yim YJ, Seo J, Kang SI, Ahn JH, Hur HG (2008) Reductive dechlorination of methoxychlor and DDT by human intestinal bacterium *Eubacterium limosum* under anaerobic conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*; 54:406–411.
91. Aislabie J, Richards N, Boul H (1997) Microbial degradation of DDT and its residues—A review. *New Zealand Journal of Agricultural Research*; 40(2): 269-282.
92. Quensen J, Tiedje J, Jain M, Mueller S (2001) Factors controlling the rate of DDE dechlorination to DDMU in Palos Verdes margin sediments under anaerobic conditions. *Environmental Science & Technology*; 35:286–291.
93. Nadeau L, Menn F, Breen A, Sayler G (1994) Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Applied and environmental Microbiology*; 60:51-55.
94. Kamanavalli C, Ninnekar H (2004) Biodegradation of DDT by a *Pseudomonas* sp. *Current Microbiology*; 48:10–13.
95. Hay A, Focht D (1998) Cometabolism of 1,1-dichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethylene by *Pseudomonas acidovorans* M3GY grown on biphenyl. *Applied and Environmental Microbiology*; 64:2141–2146.
96. Hay A, Focht D (2000) Transformation of 1,1-dichloro-2,2-(4-chlorophenyl) ethane (DDD) by *Ralstonia eutropha* strain A5. *FEMS Microbiology Ecology*; 31:249–253.

97. Ohisa N, Yamaguchi M (1978) Gamma-BHC degradation accompanied by the growth of *Clostridium rectum* isolated from paddy field soil. *Agricultural and Biological Chemistry*;42:1819–1823.
98. Heritage A, MacRae I (1977) Degradation of lindane by cell-free preparations of *Clostridium sphenoides*. *Applied and Environmental Microbiology*; 34:222–224.
99. MacRae I, Raghu K, Bautista E (1969) Anaerobic degradation of the insecticide lindane by *Clostridium* sp. *Nature*221:859–860.
100. Jagnow G, Haider K, Ellwardt P (1977) Anaerobic dechlorination and degradation of hexachlorocyclohexane isomers by anaerobic and facultative anaerobic bacteria. *Archives of Microbiology*; 115:285–292.
101. van Doesburg W, Eekert M, Middeldorp P, Balk M, Schraa G, Stams A (2005) Reductive dechlorination of β -hexachlorocyclohexane(β -HCH) by a *Dehalobacter* species in coculture with a *Sedimentibacter* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54:87–95.
102. Beland F, Farwell S, Robocker A, Geer D (1976) Electrochemical reduction and anaerobic degradation of lindane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 24:753–756.
103. Boyle A, Haggblom M, Young L (1999) Dehalogenation of lindane (Υ -hexachlorocyclohexane) by anaerobic bacteria from marine sediments and by sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*;29:379–387.
104. Middeldorp P, Jaspers M, Zehnder A, Schraa G (1996) Biotransformation of α -, β -, Υ -, and δ -hexachlorocyclohexane under methanogenic conditions. *Environmental Science & Technology*; 30:2345–2349.
105. Ohisa N, Yamaguchi M, Kurihara N (1980) Lindane degradation by cell-free extracts of *Clostridium rectum*. *Archives of Microbiology*; 125:221–225.
106. Phillips T, Seech A, Lee H, Trevors J (2005) Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. *Biodegradation*; 16:363–392.
107. Manickam N, Reddy M, Saini H, Shanker R (2007) Isolation of hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas* sp. by dehalogenase assay and characterization of genes involved in Υ -HCH degradation. *Journal of Applied Microbiology*; 104:952–960.
108. Bachmann A, de Bruin W, Jumelet J, Rijnaarts H, Zehnder A (1988) Aerobic biomineralization of alpha-hexachlorocyclohexane in contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*;54:548–554.

109. Nagasawa S, Kikuchi R, Nagata Y, Takagi M, Matsuo M (1993) Aerobic mineralization of γ -HCH by *Pseudomonas paucimobilis* UT26. *Chemosphere*26:1719–1728.
110. Sahu S, Patnaik K, Bhuyan S, Sreedharan B, Kurihara N, Adhya K, Sethunathan N (1995) Mineralization of α -, γ - and β -isomers of hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*;43: 833–837.
111. Sahu S, Patnaik K, Sethunathan N (1992) Dehydrochlorination of δ -isomer of hexachlorocyclohexane by a soil bacterium, *Pseudomonas* sp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*; 48:265–268.
112. Sahu S, Patnaik K, Sharmila M, Sethunathan. N(1990) Degradation of alpha-, beta-, and gamma-hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*;56:3620–3622.
113. Lal R, Dogra C, Malhotra S, Sharma P, Pal R (2006) Diversity, distribution and divergence of *lin* genes in hexachlorocyclohexane-degrading sphingomonads. *Trends in Biotechnology*; 24:121–130.
114. Senoo K, Wada H (1989) Isolation and identification of an aerobic γ -HCH decomposing bacterium from soil. *Soil Science & Plant Nutrition*; 35:79–87.
115. C er monie H., Boubakri H, Mavingui P, Simonet P, Vogel T(2006) Plasmid-encoded γ -hexachlorocyclohexane degradation genes and insertion sequences in *Sphingobium francense* (ex-*Sphingomonas paucimobilis*Sp+). *FEMS Microbiology Letters*;257:243–252.
116. B oltner D, Moreno-Morillas S., Ramos J (2005) 16S rDNA phylogeny and distribution of *lingenes* in novel hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas* strains. *Environmental Microbiology*; 7:1329–1338.
117. Nagata Y, Endo R, Ito M, Ohtsubo Y, Tsuda M (2007) Aerobic degradation of lindane (γ -hexachlorocyclohexane) in bacteria and its biochemical and molecular basis. *Applied and Environmental Microbiology*;76: 741–752.
118. Nagata Y, Miyauchi K, M. Takagi (1999) Complete analysis of genes and enzymes for γ -hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*; 23:380–390.
119. Kumari R., Subudhi S, Suar M, Dhingra G, Raina V, Dogra C, Lal S, van der Meer J, Holliger C, Lal R (2002) Cloning and characterization of *lin* genes responsible for the degradation of hexachlorocyclohexane isomers by *Sphingomonas paucimobilis* strain B90. *Applied and Environmental Microbiology*; 68:6021–6028.
120. Dogra C, Raina V, Pal R, Suar M, Lal S, Gartemann K, Holliger C, van der Meer J, and R. Lal. (2004) Organization of *lingenes* and IS6100 among different strains

- of hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas paucimobilis*: evidence for horizontal gene transfer. *Journal of Bacteriology*; 186:2225–2235.
121. Miyazaki R., Sato Y, Ito M, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda T (2006) Complete nucleotide sequence of an exogenously isolated plasmid, pLB1, involved in γ -hexachlorocyclohexane degradation. *Applied and Environmental Microbiology*;72:6923–6933.
 122. Maule A, Plyte S, Quirk AV (1987) Dehalogenation of organochlorine insecticides by mixed anaerobic microbial populations. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 27:229–236.
 123. Baczynski TP, Grotenhuis T, Knipscheer P (2004) The dechlorination of cyclodiene pesticides by methanogenic granular sludge. *Chemosphere* 55:653–659.
 124. Chiu TC, Yen JH, Hsieh YN, Wang YS (2005) Reductive transformation of dieldrin under anaerobic sediment culture. *Chemosphere*; 60:1182–1189.
 125. Matsumura F, Boush GM (1967) Dieldrin: degradation by soil microorganisms. *Science*; 156: 959–961.
 126. Patil KC, Matsumura F, Boush GM (1970) Degradation of endrin, aldrin, and DDT by soil microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*; 19:879–881.
 127. Matsumura F, Khanvilkar VG, Patil KC, Boush GM (1971) Metabolism of endrin by certain soil microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 19: 27–31.
 128. Phillips T, Bel G, Raymond D, Shaw K, Seech A (2001) DARAMEND technology for in situ bioremediation of soil containing organochlorine pesticides. 6th International HCH and Pesticides Forum: http://www.hchforum.com/6th/forum_book/C.3.4.pdf
 129. EPA (2010) Reference Guide to Non-combustion Technologies for Remediation of Persistent Organic Pollutants in Soil, Second Edition. [http://www.cluin.org/contaminantfocus/default.focus/sec/Persistent_Organic_Pollutants_\(POPs\)/cat/Overview/](http://www.cluin.org/contaminantfocus/default.focus/sec/Persistent_Organic_Pollutants_(POPs)/cat/Overview/)
 130. Young C (2001) Bioremediation of PCB & pesticide contaminated soils utilising Gene Expression Factors - A new cost effective site remediation treatment to eliminate Persistent Organic Pollutants. 6th International HCH and Pesticides Forum: http://www.hchforum.com/6th/forum_book/C.3.6.pdf
 131. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA & Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*;173: 697–703.
 132. Wiegel J (2006) The Genus *Xanthobacter*. *Prokaryotes*; 5:290–314.

133. Arenskötter M, Bröker D, Steinbüchel A (2004) Biology of the Metabolically Diverse Genus *Gordonia*. *Applied and environmental microbiology*; 70(6): 3195–3204.
134. Janssen D, Scheper A, Dijkhuizen L, Witholt B (1985) Degradation of Halogenated Aliphatic Compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Applied and environmental microbiology*; 49(3): 673-677.
135. Iwaki H, Grosse S, Bergeron H, Leisch H, Morley K, Hasegawa Y, Laub P (2013) CamphorPathway Redux: Functional Recombinant Expression of 2,5- and 3,6-Diketocamphane Monooxygenases of *Pseudomonas putida* ATCC 17453 with Their Cognate Flavin Reductase Catalyzing Baeyer-Villiger Reactions. *Applied and Environmental Microbiology*; 79(10): 3282–3293.
136. Elaissi A, Rouis Z, Salem N, Mabrouk S, Salem Y, Salah K, Aouni M, Farhat F, Chemli R, Harzallah-Skhiri F, Khouja M (2012) Chemical composition of 8 eucalyptus species essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities *Complementary and Alternative Medicine*; 12(81), 1-15.
137. Filho F, Amaral L, Rodrigues-Filho E (2011) Composition of essential oils from *Cupressus lusitana* and a Xylariaceae fungus found on its leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*; 39, 485–490.
138. Hernandez B, Koh S, Chial M, Focht D (1997) Terpene-utilizing isolates and their relevance to enhanced biotransformation of polychlorinated biphenyls in soil. *Biodegradation* 8:153–158.
139. Dalton H, Stirling I (1982) Co-metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*; 297, 481-496.
140. Furukawa K, Fujihara H (2008) Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls: Biochemical and Molecular Features. *Journal of bioscience and bioengineering*; 105(5): 433–449.
141. Singer A, Crowley D, Thompson I (2003) Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *TRENDS in Biotechnology* ; 21(3), 123- 130.
142. Fang H, Cai L, Yu Y, Zhang T (2013) Metagenomic analysis reveals the prevalence of biodegradation genes for organic pollutants in activated sludge. *Bioresource Technology*; 129 209–218.
143. Poulos T, Finzel C, Howard A (1987). High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *Journal of Molecular Biology*; 195:687–700.

144. Chapman P, Meerman J, Gunsalus I, Srinivasan R, Rinehart K (1966) New acyclic acid metabolite in camphor oxidation. *Journal of the American Chemical Society* 88:618–619.
145. Hawkes D, Adams G, Burlingame A, Montellano P, De Voss J (2002) Cytochrome P450cin (CYP176A), Isolation, Expression, and Characterization. *The journal of biological chemistry*; 277 (31): 27725–27732.
146. Ullah A, Murray R, Bhattacharyya P, Wagner G, Gunsalus I (1989) Protein Components of a Cytochrome P-450 Linalool & Methyl Hydroxylase. *The journal of biological chemistry*; 265 (3): 1345-1351.
147. Eaton R, Sandusky P (2009) Biotransformations of 2-Methylisoborneol by Camphor-Degrading Bacteria. *Applied and environmental microbiology*; 75(3): 583–588.
148. Lal R, Pandey G, Sharma P, Kumari K, Malhotra S, Pandey R, Raina V, Kohler H, Holliger C, Jackson C, Oakeshott J (2010) Biochemistry of Microbial Degradation of Hexachlorocyclohexane and Prospects for Bioremediation. *Microbiology and molecular biology reviews*; 74(1): 58–80.

10. ANEXOS

Anexo 1. Parámetro físico-químicos del suelo del Copey.

No. LAB	IDENTIFICACIÓN DE CAMPO	GRANULOMETRÍA			CLASE TEXTURAL	GRAVILLA % RELACIÓN (1:1)	pH	Al mg/Kg	S.A.I. %	SALINIDAD		CaCO ₃		RETENCIÓN FOSFÓRICA		MATERIA ORGÁNICA			
		ARENA %	LIMO %	ARCILLA %						CE (dSm)	PSI	Quartzio*	Carbonato %	%	%	CE (dSm)	PSI	Quartzio*	Carbonato %
COMPLEJO DE CAMPO (mc+/Vg)		Ca	Mg	K	Na	B.T.	SE %	ALUMINO ACTIVO %	HEBRERO ACTIVO %	ÍNDICE MELÁNICO			ELEMENTOS MENORES (mg/kg)					Fósforo mg/Kg	
	OC	Ca	Mg	K	Na	B.T.	SE %	ALUMINO ACTIVO %	HEBRERO ACTIVO %	Mn	Fe	Zn	Cu	B	S	NH ₄	NH ₄ O ₃	Disponible	Total
4-17706	MUESTRA1	5.1	0.79	0.39	0.06	6.3	88.9			40.2	906	4.4	4.4	0.16		32.4	12.6	44.4	
4-17707	MUESTRA2	4.8	0.98	0.38	0.06	6.2	70.7			41.1	70.1	4.7	4.7	0.06		33.4	12.2	42.8	

Anexo 2. Composición y preparación de medio mineral.

Solución	Reactivos	Cantidad
Buffer	K ₂ HPO ₄	17.5gr
	KH ₂ PO ₄	7.5gr
	H ₂ O	250ml
Sales	HCl (1M)	3ml
	NaCl	12.5gr
	MgSO ₄ .7H ₂ O	5g
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1gr
	H ₂ O	250ml
Fuente de nitrógeno	NH ₄ Cl	10gr
	H ₂ O	100ml
Hierro	HCl (1M)	3ml
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.3gr
	H ₂ O	100ml
Elementos traza	HCl (18-19%)	20ml
	MnSO ₄ .H ₂ O	0.2gr
	H ₃ BO ₃	0.1gr
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1gr
	CaSO ₄ .5H ₂ O	0.05gr
	CoCl ₂ .H ₂ O	0.05gr
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01gr
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.01gr
	NiSO ₄ .6H ₂ O	0.01gr
	H ₂ O	1000ml

Todas las soluciones eran preparadas con agua tipo 2 y esterilizadas en autoclave, a excepción de la solución de hierro y elementos traza, las cuales se esterilizaban por filtración.

	Solución	Cantidad
Medio mineral	Buffer	10ml
	Sales	10ml
	Fuente de nitrógeno	3ml
	Hierro	1ml
	Elementos traza	1ml
	H ₂ O	975ml

Composición medio mineral.

Anexo 3. Determinación de los porcentajes de humedad y capacidad de campo del suelo de El copey.

Réplica	Antes 24 horas		Después de 24 horas	Resta Antes 24 horas	Resta Después 24 horas	% Humedad
	Caja petri vacia (gr)	Caja petri llena (gr)	Caja de petri llena (gr)	Peso mojado	Peso seco	
1	40,25	50,27	49,63	10,02	9,38	6,82
2	41,23	51,24	50,6	10,01	9,37	6,83
3	33,75	43,76	43,12	10,01	9,37	6,83
					Promedio	6,83

Réplica	Antes 24 horas		Después de 24 horas	Resta Antes 24 horas	Resta Después 24 horas	% Capacidad de campo
	Caja petri vacia (gr)	Caja petri llena (gr)	Caja de petri llena (gr)	Peso mojado	Peso seco	
1	39,57	49,6	47,57	10,03	8	25,38
2	40,09	50,19	48,19	10,1	8,1	24,69
3	37,54	47,6	45,52	10,06	7,98	26,07
					Promedio	25,38

Para ambos casos el porcentaje fue calculado de la siguiente forma:

$$\% \text{ Humedad} \text{ o } \% \text{ Capacidad de campo} = \frac{(\text{Pesomojado} - \text{Pesoseco})}{\text{Pesoseco}} \times 100$$

Seguido a esto con el promedio del porcentaje de humedad y teniendo en cuenta que se usaban 5gr de suelo por microcosmos, se determinó la cantidad de agua en dicho suelo de la siguiente forma:

$$\text{Cantidad de agua} = 5x \frac{(\text{Promedio } \% \text{ Humedad})}{100}$$

El resultado obtenido fue 0,3413 de cantidad de agua, que al ser restado a los 5gr da como resultado el peso seco del suelo (4,66gr) valor usado para determinar la cantidad de agua o nutrientes que debían añadirse para mantener el suelo con un 60% de humedad, de la siguiente forma:

$$4,66 * \frac{[1 + 0,6(\text{Promedio } \% \text{ Capacidad de campo})]}{100}$$

Este resultado fue 5,368gr que al restarlos con los 5gr de suelo que se van a usar, da como resultado 0,368ml de agua que deben ser añadidos a cada microcosmos.

Anexo 4. Análisis material de aporte microcosmos.

1. Melaza

REPORTE EN BASE HUMEDA						METODOS ANALITICOS	
N_TOTAL	0,68	% P/P				SUMA DE NITROGENOS	
POTASIO TOTAL	4,03	% P/P	K2O Total	4,84	% P/P	NTC 202 Emisión	
CALCIO TOTAL	1,30	% P/P	CaO Total	1,82	% P/P	NTC 1369 Absorción Atómica	
MAGNESIO TOTAL	0,55	% P/P	MgO Total	0,91	% P/P	NTC 1369 Absorción Atómica	
FOSFORO TOTAL	0,06	% P/P	P2O5 Total	0,13	% P/P	NTC 234 Colorimetría	
AZUFRE	0,81	% P/P				NTC 1154 Turbidimetría	
BORO	0,0005	% P/P				NTC 1860 Colorimetría	
COBRE	0,0005	% P/P				NTC 1369 Absorción Atómica	
MANGANESO	0,001	% P/P				NTC 1369 Absorción Atómica	
HIERRO	0,01	% P/P				NTC 1369 Absorción Atómica	
ZINC	0,001	% P/P				NTC 1369 Absorción Atómica	
Carbón Orgánico Total	32,40	%P/P				NTC 5167 Walkey Black	
Carbón Orgánico Disuelto	32,40	%P/P				Cálculo	
Cloruros Solubles H2O	1,30	%P/P				LBC 42 Volumetría	

2. Hojas de eucalipto

REPORTE EN BASE SECA						METODOS ANALITICOS	
N_TOTAL	1,60	% P/P				SUMA DE NITROGENOS	
POTASIO TOTAL	1,33	% P/P	K2O Total	1,60	% P/P	NTC 202 Emisión	
CALCIO TOTAL	1,770	% P/P	CaO Total	2,48	% P/P	NTC 1369 Absorción Atómica	
MAGNESIO TOTAL	0,28	% P/P	MgO Total	0,46	% P/P	NTC 1369 Absorción Atómica	
FOSFORO TOTAL	0,11	% P/P	P2O5 Total	0,25	% P/P	NTC 234 Colorimetría	
AZUFRE	0,05	% P/P				NTC 1154 Turbidimetría	
BORO	0,004	% P/P				NTC 1860 Colorimetría	
COBRE	0,001	% P/P				NTC 1369 Absorción Atómica	
MANGANESO	0,14	% P/P				NTC 1369 Absorción Atómica	
HIERRO	0,01	% P/P				NTC 1369 Absorción Atómica	
ZINC	0,002	% P/P				NTC 1369 Absorción Atómica	
Carbón Orgánico Total	40,19	%P/P				NTC 5167 Walkey Black	
Carbón Orgánico Disuelto	21,00	%P/P				Cálculo	
Cloruros Solubles H2O	0,62	%P/P				LBC 42 Volumetría	
Celulosa	11,21	%P/P				Calculo	
Lignina	0,01	%P/P				Calculo	

3. Hojas de pino

REPORTE EN BASE SECA

METODOS ANALITICOS

N_TOTAL	1,28	% P/P				SUMA DE NITROGENOS
POTASIO TOTAL	0,79	% P/P	K2O Total	0,95	% P/P	NTC 202 Emisión
CALCIO TOTAL	2,210	% P/P	CaO Total	3,09	% P/P	NTC 1369 Absorción Atómica
MAGNESIO TOTAL	0,17	% P/P	MgO Total	0,28	% P/P	NTC 1369 Absorción Atómica
FOSFORO TOTAL	0,09	% P/P	P2O5 Total	0,21	% P/P	NTC 234 Colorimetría
AZUFRE	0,04	% P/P				NTC 1154 Turbidimetría
BORO	0,003	% P/P				NTC 1860 Colorimetría
COBRE	0,0004	% P/P				NTC 1369 Absorción Atómica
MANGANESO	0,003	% P/P				NTC 1369 Absorción Atómica
HIERRO	0,02	% P/P				NTC 1369 Absorción Atómica
ZINC	0,002	% P/P				NTC 1369 Absorción Atómica
Carbón Orgánico Total	38,23	%P/P				NTC 5167 Walkey Black
Carbón Orgánico Disuelto	9,84	%P/P				Cálculo
Cloruros Solubles H2O	0,04	%P/P				LBC 42 Volumetría
Celulosa	13,06	%P/P				Calculo
Lignina	21,53	%P/P				Calculo

Anexo 5. Cálculos y preparación de soluciones de nutrientes.

Análisis de melaza:

Carbono	Nitrógeno	Fósforo
32,4%	0,68%	0,06%

Se van a añadir 10mg de melaza por microcosmos:

$$\frac{0,01gr\text{Melaza}}{5gr\text{Microcosmos}} \times 100 = 0,2\%$$

mgC en la melaza:

$$\frac{32,40}{100} \times 9,32mg = 3,0196$$

mgP en la melaza:

$$\frac{0,06}{100} \times 9,32mg = 0,005592$$

La relación 100:10:1, sería:

Carbono	Nitrógeno	Fósforo
3,0196	0,3019	0,03019

Lo que falta de nitrógeno:

$$0,3019 - 0,0633 = 0,2385$$

La fuente de nitrógeno usada fue NH_4Cl (PM:53,49):

$$mg\ de\ N\ en\ \text{NH}_4\text{Cl} = \frac{53,49}{14} = 3,820mgN$$

Lo que falta de N * mgN en NH_4Cl = 0,91159mgN

El stock para tener 0,91159mgN en 0,368ml debe ser preparado a:

$$\frac{0,91159mg}{0,368ml} = 2,477g/l$$

$$\frac{0,2}{100} \times 4,66g = 9,32mg\text{Melaza}$$

↓
Peso seco del suelo

mgN en la melaza:

$$\frac{0,68}{100} \times 9,32mg = 0,06337$$

Lo que falta de fósforo:

$$0,03019 - 0,0055 = 0,0246$$

Las fuentes de fósforo fueron K_2HPO_4 (0,7g/l; PM: 174,1) KH_2PO_4 (0,3g/l; PM: 136,08)

$$mg\ de\ P\ en\ \text{K}_2\text{HPO}_4 = \left(\frac{174,18}{30,97}\right) (0,7) = 3,9369$$

Lo que falta de P * mgP en K_2HPO_4 = 0,0968mgP

El stock para tener 0,0968mgP en 0,368ml debe ser preparado a:

$$\frac{0,0968mg}{0,368ml} = 0,263g/l$$

$$mg\ de\ P\ en\ \text{KH}_2\text{PO}_4 = \left(\frac{136,08}{30,97}\right) (0,3) = 1,3181$$

Lo que falta de P * mgP en KH_2PO_4 = 0,03242mgP

El stock para tener 0,03242mgP en 0,368ml debe ser preparado a:

$$\frac{0,03242mg}{0,368ml} = 0,088g/l$$

Anexo 5 (Continuación). Composición soluciones de nutrientes de microcosmos.

	Reactivos	Cantidad
Solución de nutrientes	NH ₄ Cl	2,477 gr
	K ₂ HPO ₄	0,263 gr
	KH ₂ PO ₄	0,088 gr
	H ₂ O	1000ml
Solución camfor y nutrientes	Camfor	1,076gr
	NH ₄ Cl	2,477 gr
	K ₂ HPO ₄	0,263 gr
	KH ₂ PO ₄	0,088 gr
	H ₂ O	1000ml
Solución melaza y nutrientes	Melaza	25,33 gr
	NH ₄ Cl	2,477 gr
	K ₂ HPO ₄	0,263 gr
	KH ₂ PO ₄	0,088 gr
	H ₂ O	1000ml

Todas las soluciones eran preparadas con agua tipo 2 y esterilizadas en autoclave, a excepción de la solución de nutrientes y camfor la cual se esterilizó por filtración.

Anexo 6. Curva de calibración para camfor por GC-FID.

Calibration Curve - Analytical Line 2 - Channel 1

ID#:1 Name:Camphor

$$f(x)=1,01699834178e-004*x+28,6339476114$$

R=0,997272698601 R²=0,994552835375

MeanRF:1,44536393071e-004 RFSD:3,82529165712e-005 RFRSD:26,4659410398

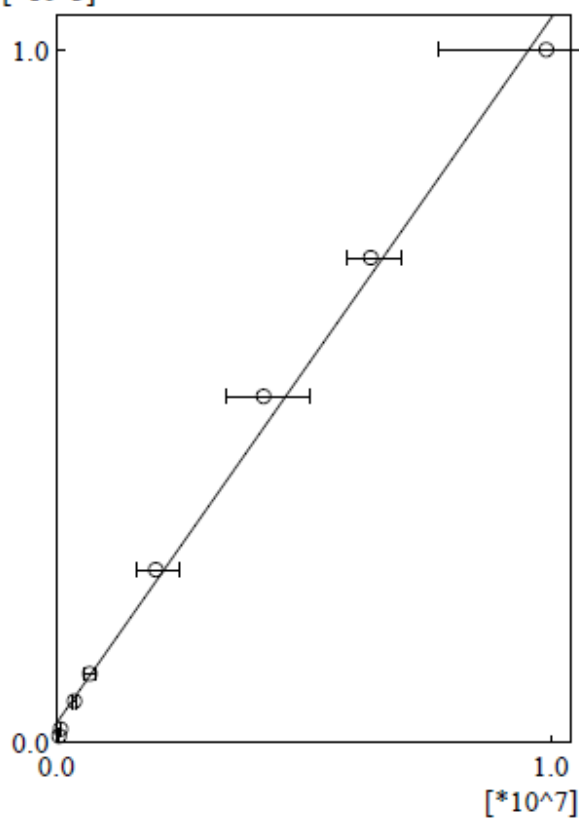
CurveType:Linear

ZeroThrough:Not through

WeightedRegression:None

External Standard

[*10³]



No.	Conc.	Area
1	10,000	61960
2	20,000	93480
3	60,000	371427
4	100,000	679963
5	250,000	2018606
6	500,000	4200230
7	700,000	6365856
8	1000,000	9914795

Anexo 7. Curva de calibración para el 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno y PCB No. 209 .

Calibration Curve - Analytical Line 2 - Channel 1

ID#:1 Name:m-Xyleno

$$f(x)=53300,0513922*x+50256,9802493$$

$$R=0,986000397437 \quad R^2=0,972196783747$$

MeanRF:110473,695764 RFSD:52332,0819984 RFRSD:47,3706266787

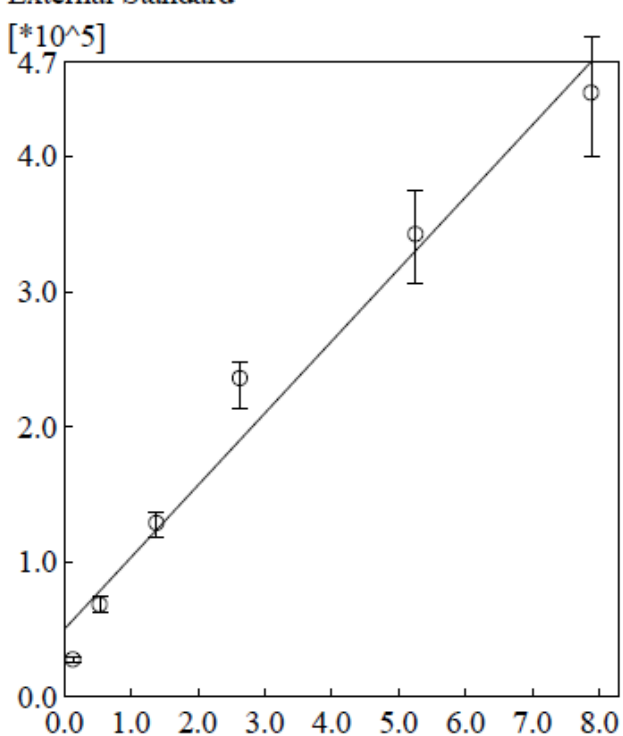
CurveType:Linear

ZeroThrough:Not through

WeightedRegression:None

External Standard

[*10⁵]



No.	Conc.	Area
1	0,130	27780
2	0,530	68342
3	1,380	128727
4	2,630	235774
5	5,250	342488
6	7,880	447172

Anexo 7 (continuación). Curva de calibración para el 2,4,5,6-tetracloro-m-xileno y PCB No. 209 .

ID#:2 Name:PCB

$$f(x)=41326,1600187*x+57123,1072365$$

R=0,975789754012 R^2=0,952165644034

MeanRF:102027,156966 RFSD:62206,3186133 RFRSD:60,9703538385

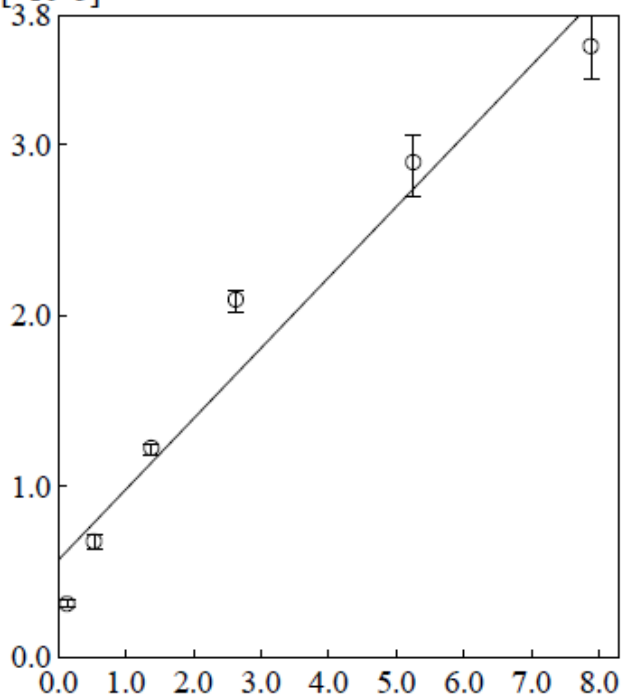
CurveType:Linear

ZeroThrough:Not through

WeightedRegression:None

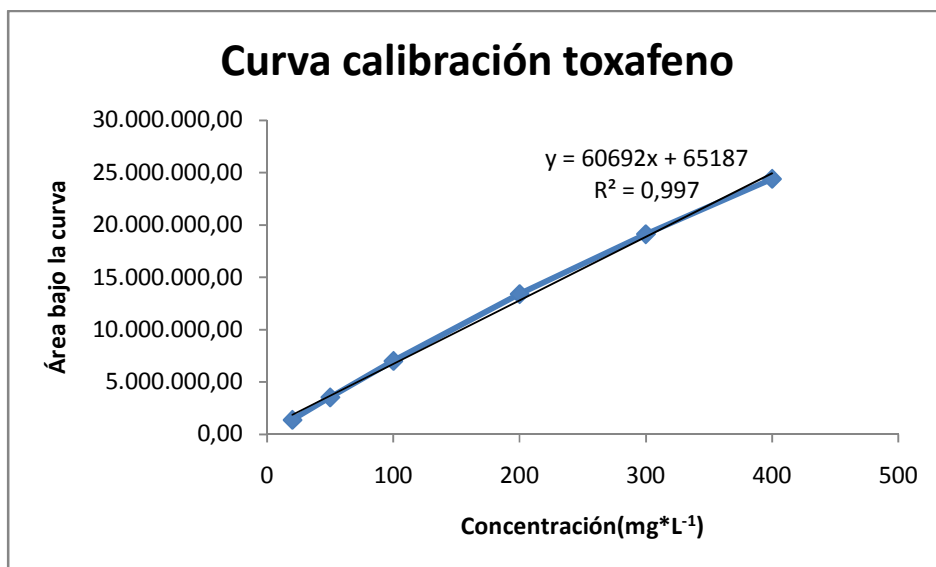
External Standard

[*10^5]



No.	Conc.	Area
1	0,130	31314
2	0,530	67769
3	1,380	122545
4	2,630	209407
5	5,250	289663
6	7,880	357646

Anexo 8. Curva de calibración para toxafeno.



La curva de calibración para el toxafeno fue realizada manualmente en Excel.

Anexo 9. Prueba de Tukey para la comparación de medias entre los tratamientos evaluados con cultivos de enriquecimiento con camfor.

Tratamiento	Media	Grupos homogéneos
SC +Tox+Cm	29.126	A
CA	29.033	A
SC + Tox	28.611	A
SC+Tox+Glu	27.102	A
BS + Tox	26.413	A
BS+Tox+Glu	25.646	A
BS+Tox+Cm	17.070	A

SC= Suelos Copey

BS= Biosólidos

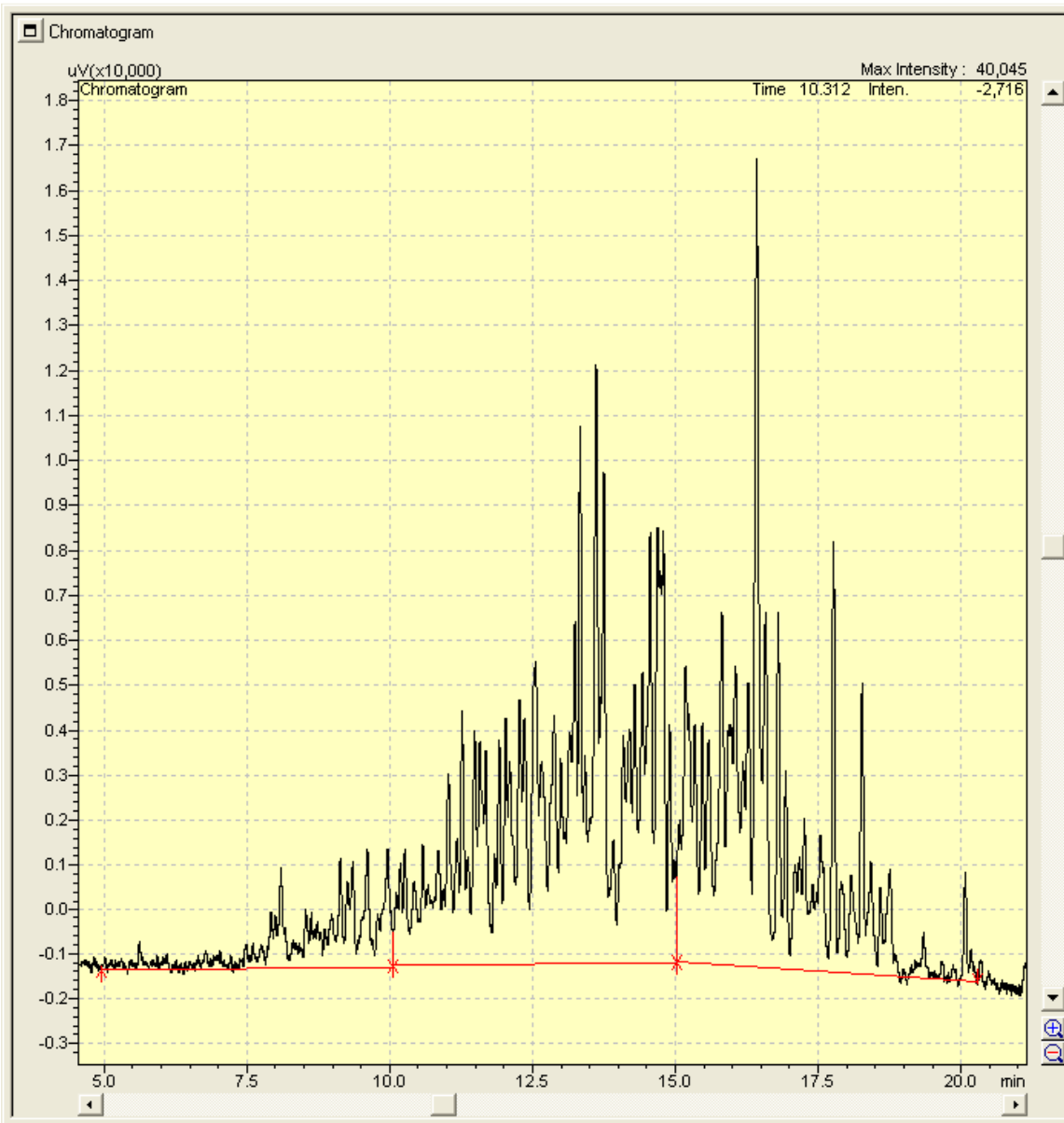
CA= Control abiótico

Tox= Toxafeno

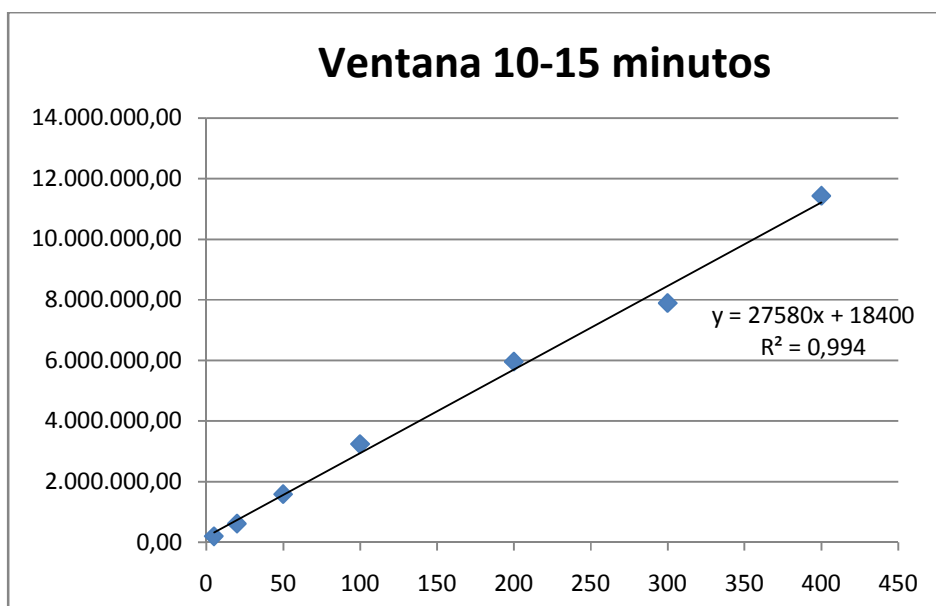
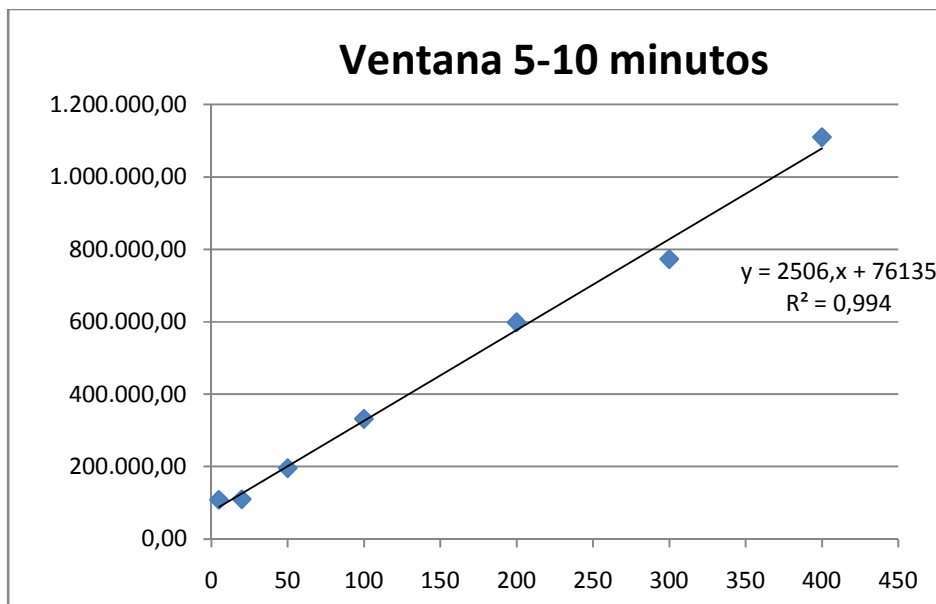
Cm= Camfor

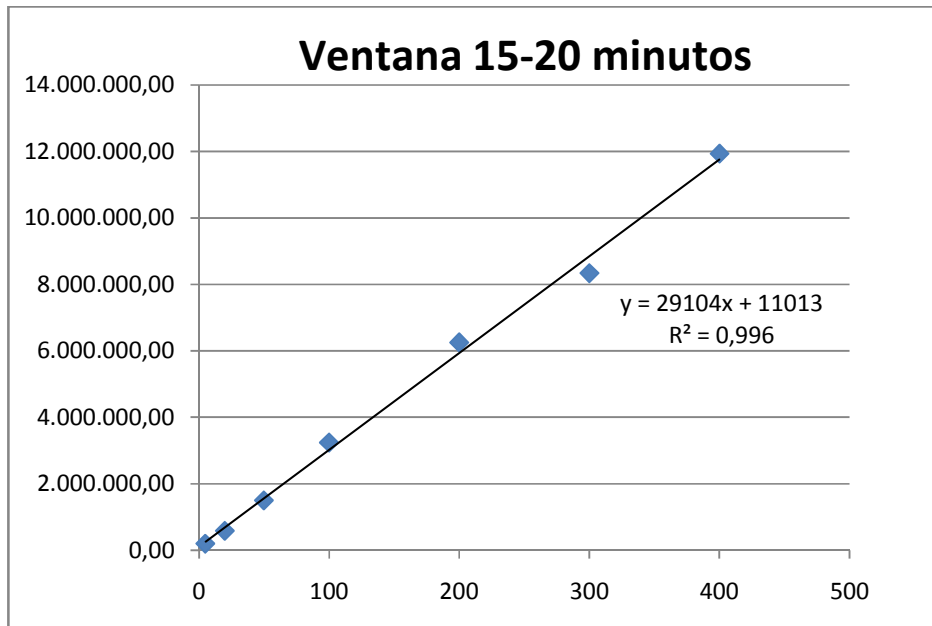
Glu = Glucosa

Anexo 10. Integración del cromatograma de toxafeno en ventanas.



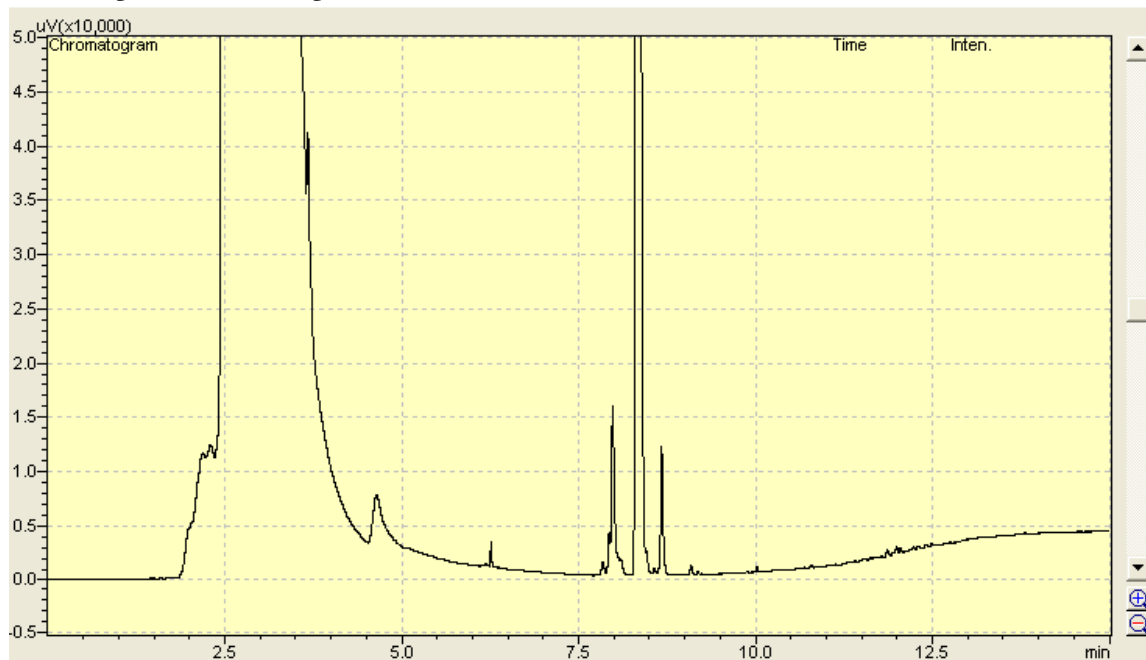
Anexo 11. Curvas de calibración de cada ventana para el análisis de toxafeno en diferentes rangos de tiempos de retención.





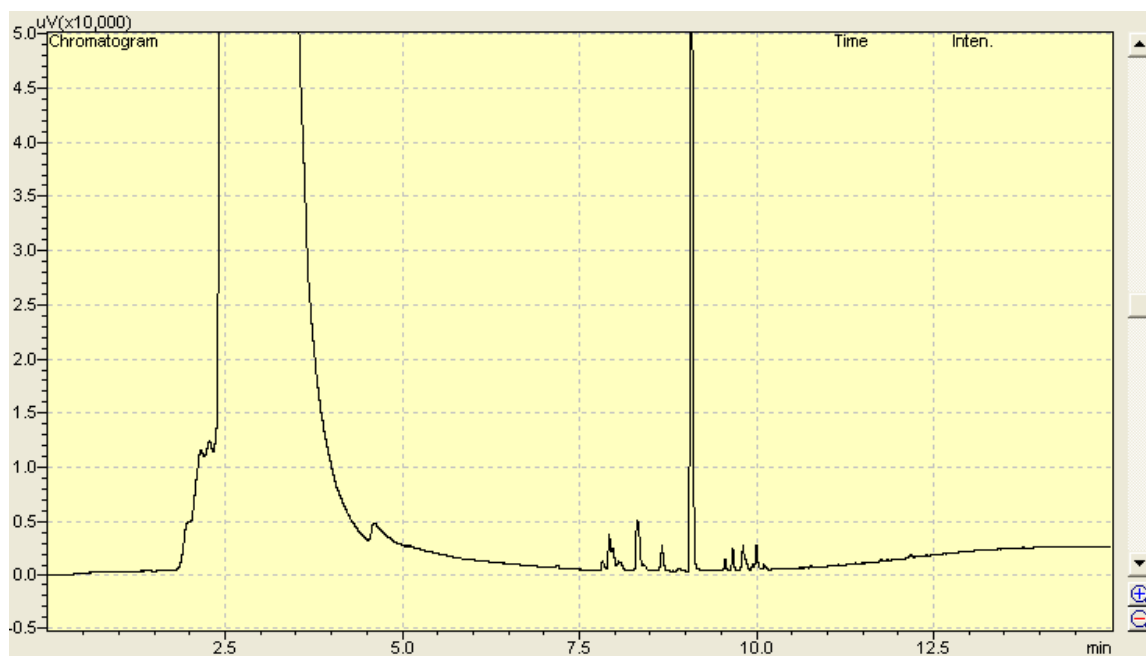
Anexo 12. Cromatogramas de camfor.

Día cero para todas las cepas

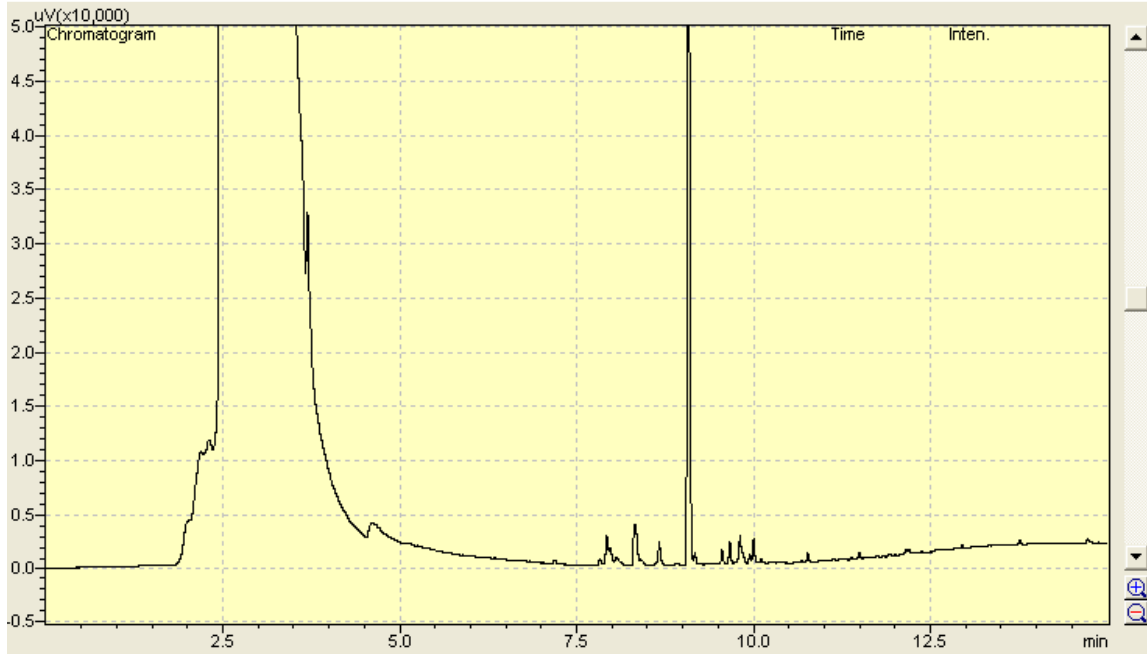


1. *Bacillus badius* cepa BS 1

Día 7

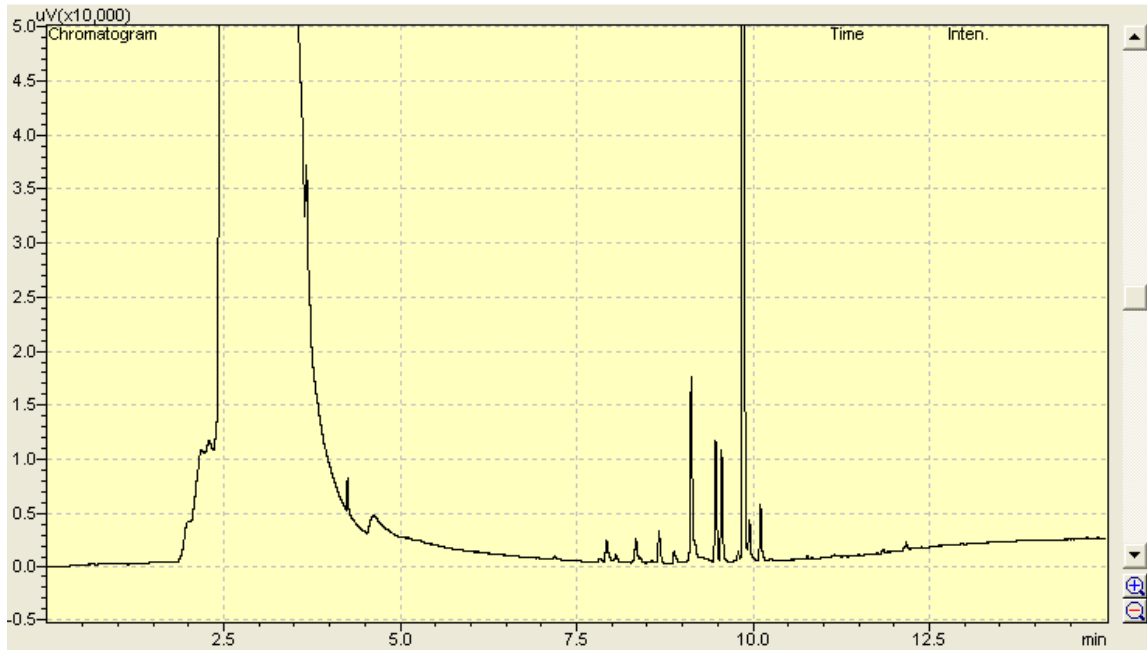


Día 14

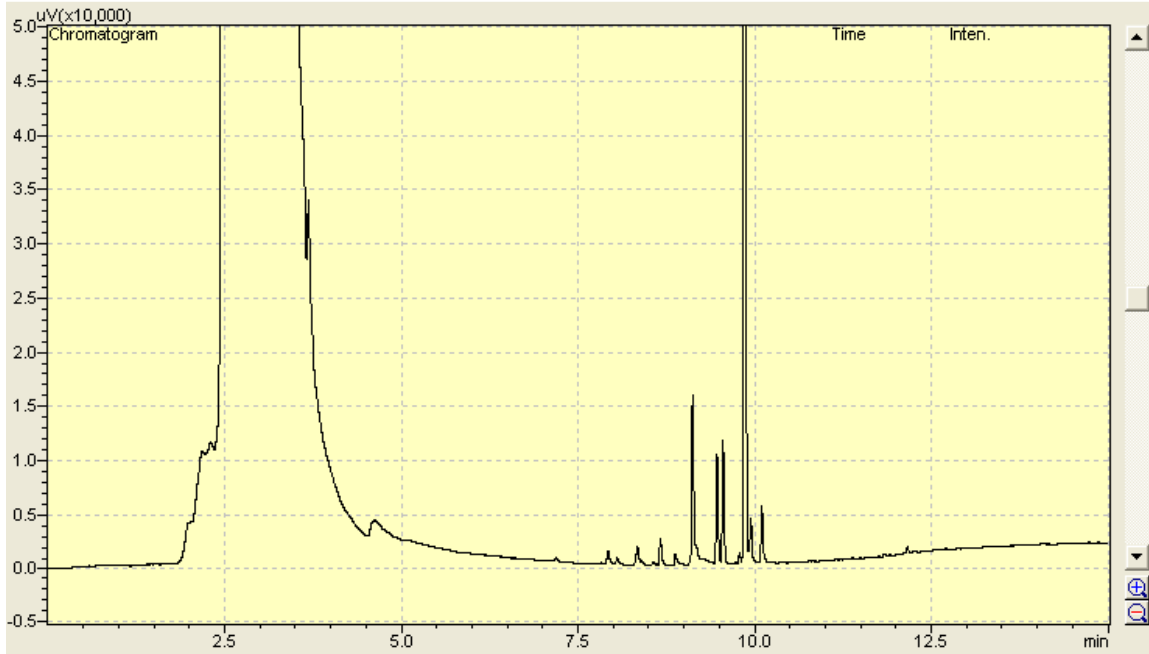


2. *Gordonia desulfuricans* cepa BS 2

Día 7

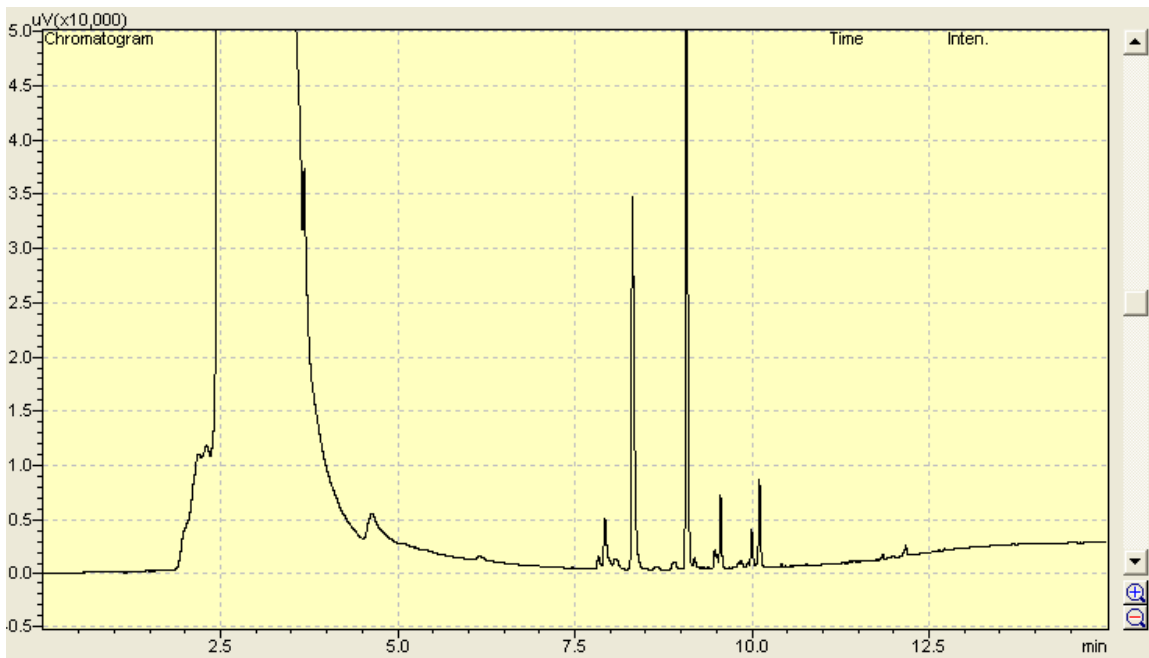


Día 14

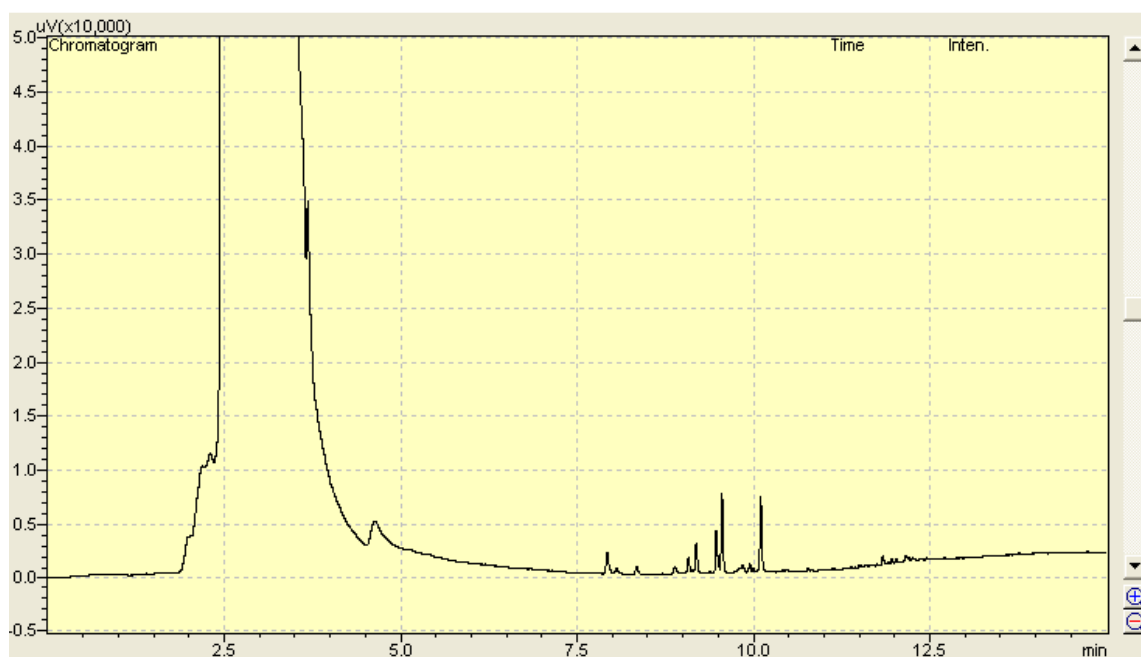


3. *Rhodococcus ruber* cepa BS 3

Día 1

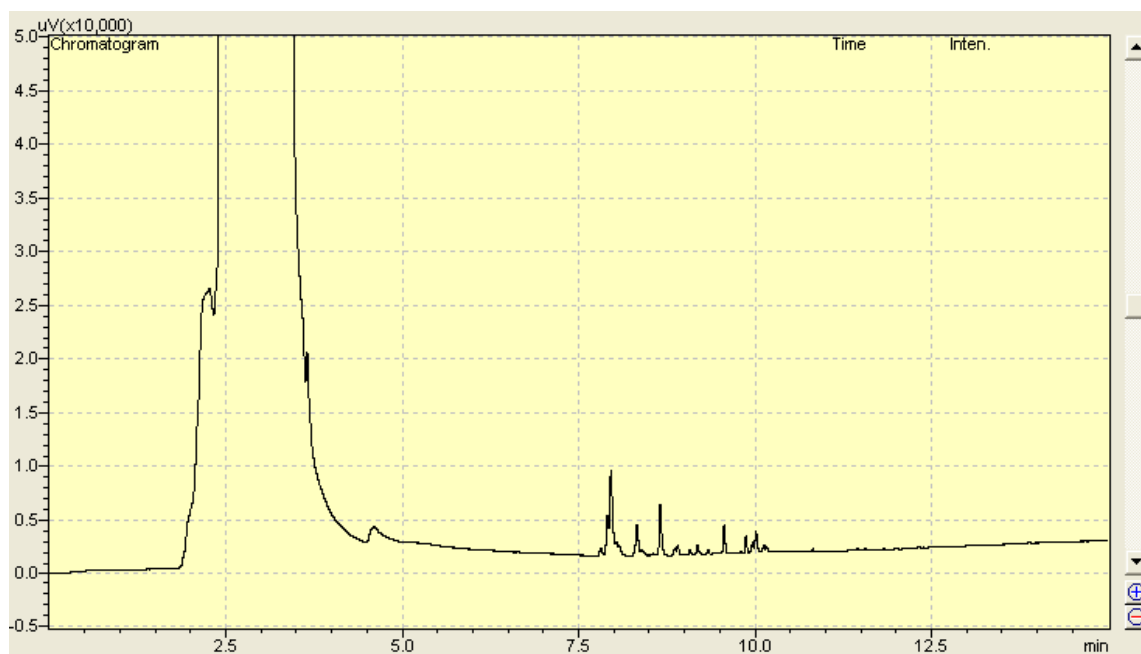


Día 14

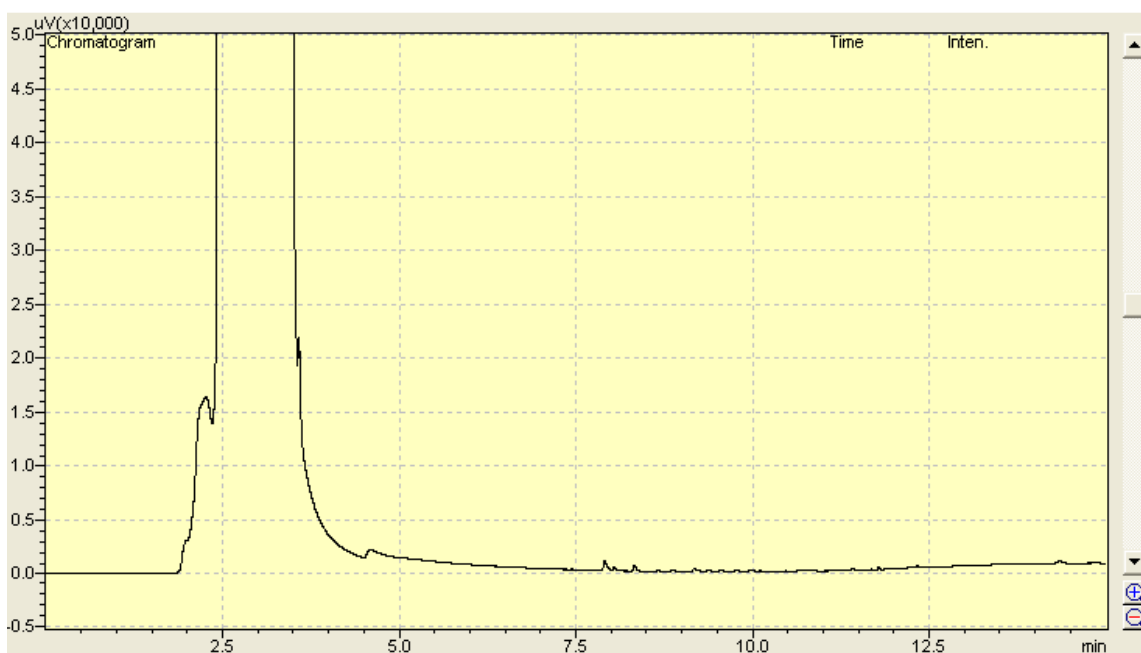


4. *Xanthobacter* sp cepa BS 4

Día 7

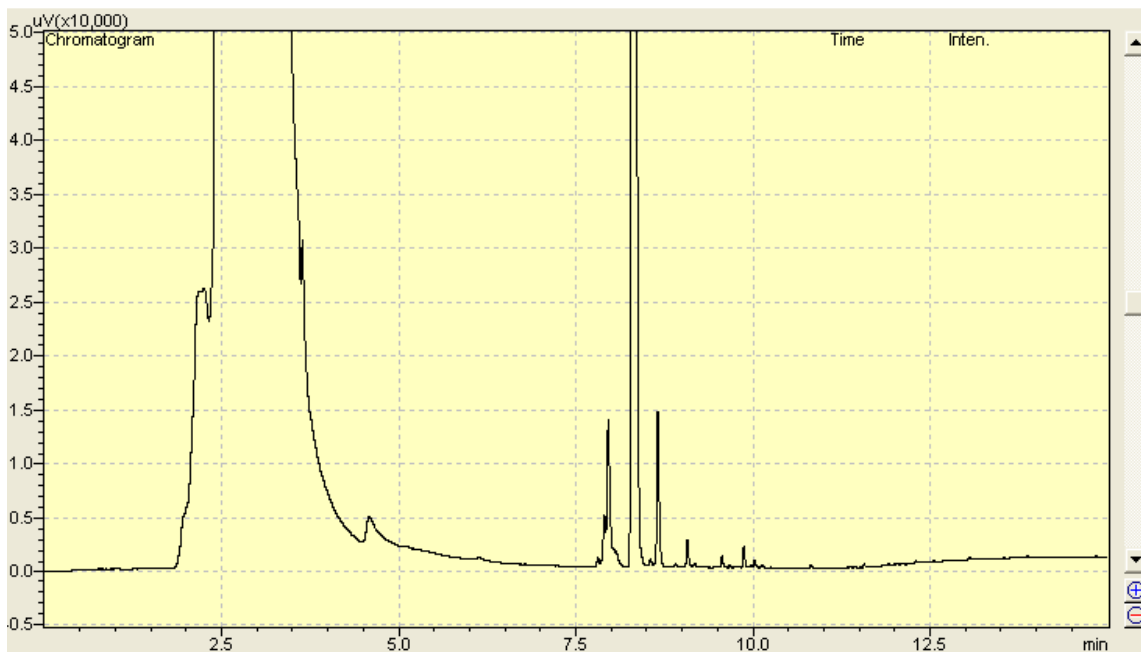


Día 14

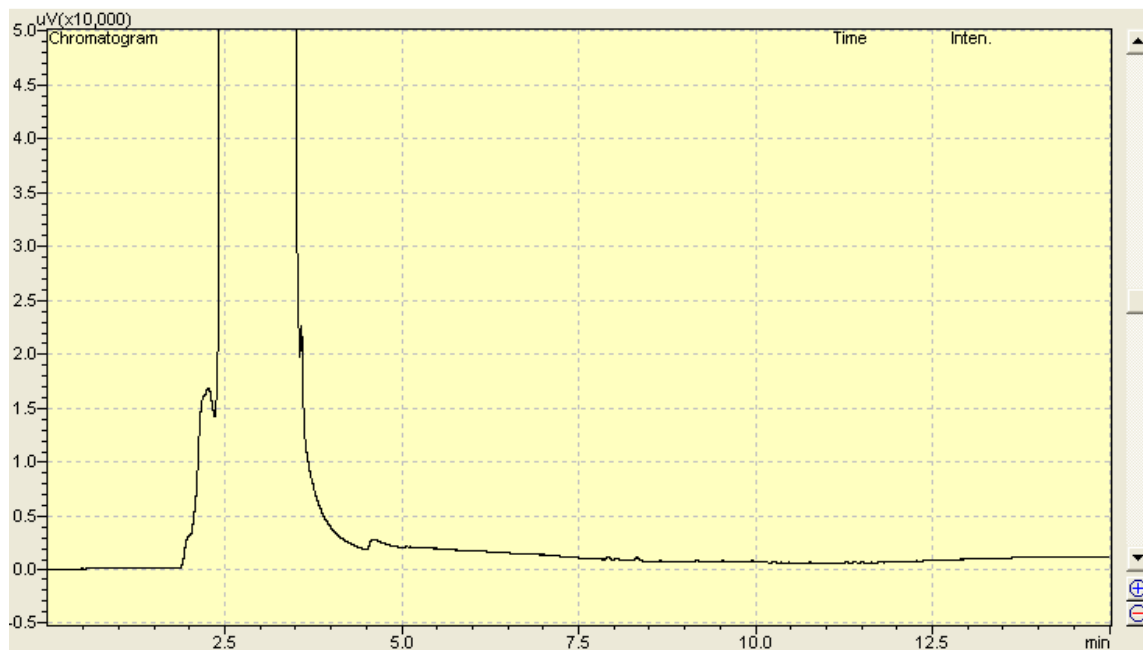


5. *Pandoraea vervaciti* cepa SC 1

Día 7

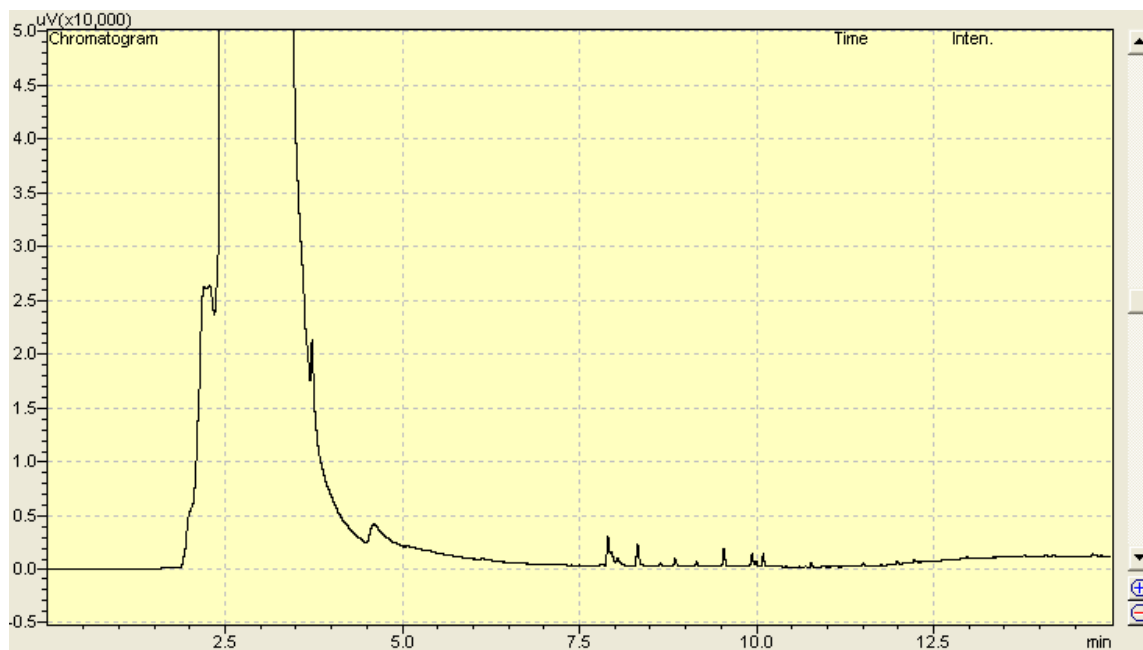


Día 14

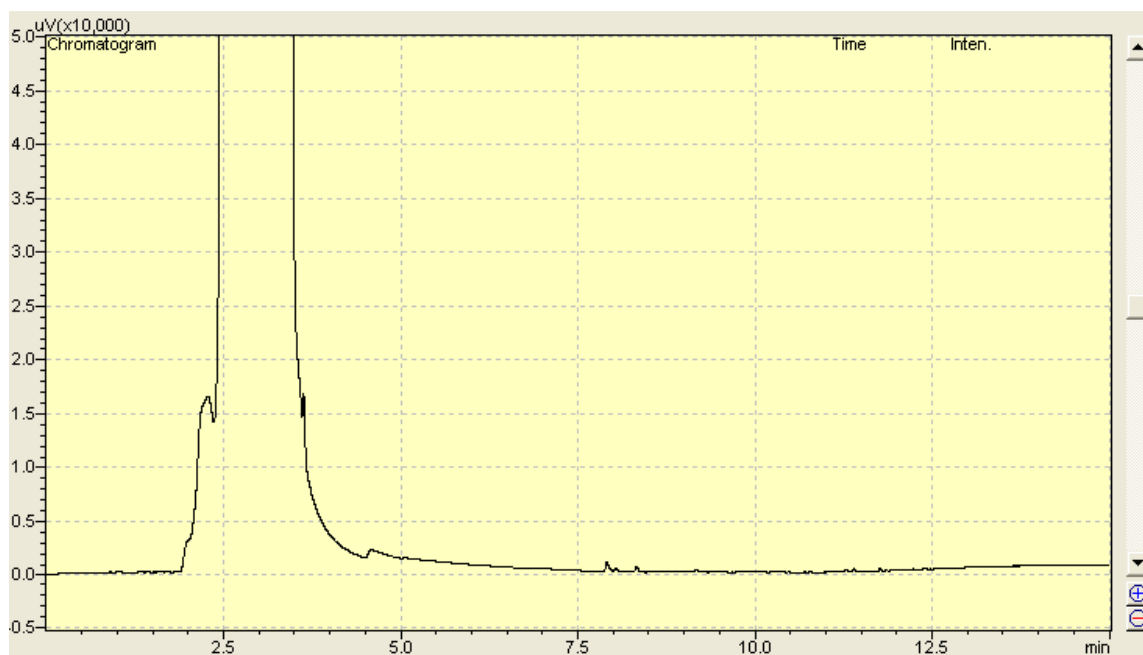


6. *Pandoraea vervaciti* cepa SC 2

Día 7

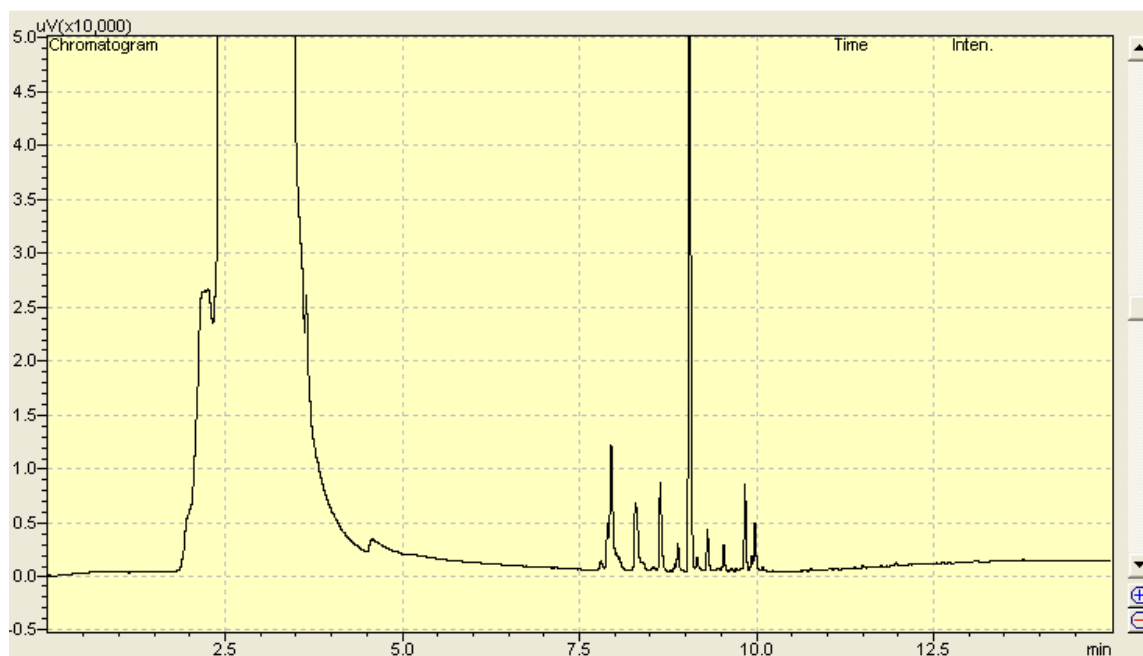


Día 14

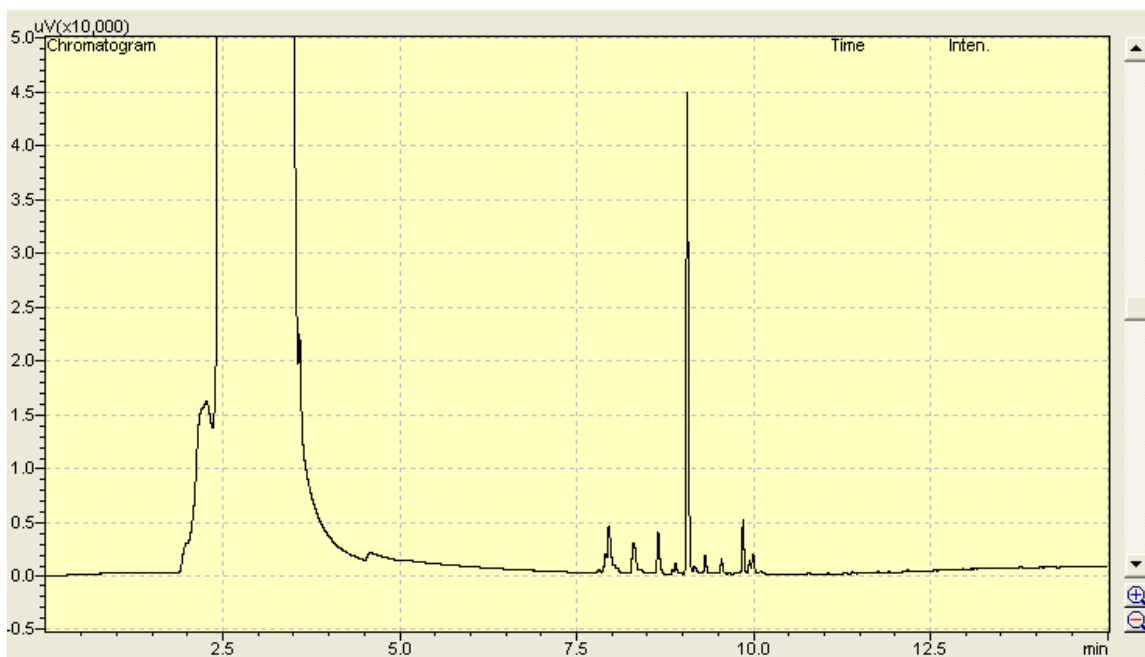


7. *Sphingomonas histidinilytica* cepa SC 3.

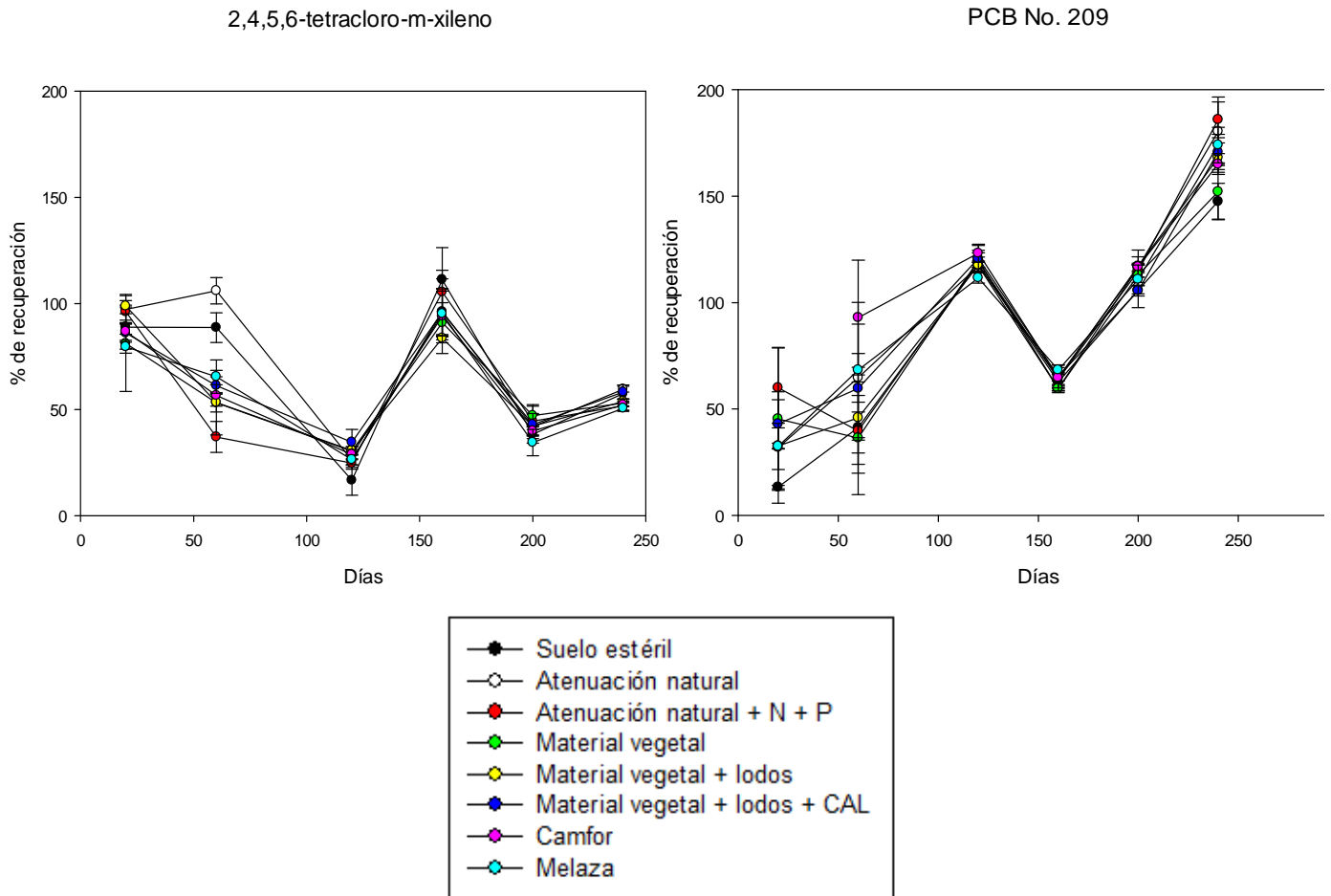
Día 7



Día 14



Anexo 13. Porcentajes de recuperación de surrogates.



Anexo 14. Diseño de primers para amplificación de regiones relacionadas con el citocromo P450.

El diseño de primers se basó en las secuencias nucleotídicas de la P450cam de *Pseudomonas putida*, dos enzimas de *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 (CYP101D1 y CYP101D2) capaces de hidroxilar el camfor, la P450lin de *Pseudomonas incognita* y la P50terp de *Pseudomonas sp.* Con estas secuencias se hizo un alineamiento múltiple usando T-Coffee (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>) y de acuerdo al árbol guía se diseñaron los primers:

Árbol guía:



Los primers se diseñaron para 1) P450cam, CYP101D1 y CYP101D2; 2) P450cam, P450lin y P50terp; 3) P450lin y P50terp; 4) P450cam y P50terp; 5) P450cam y P450lin.

Primers	Primers	Tamaño
1	Primer F-CN: 5'-GGCGGVC ACTGGATCGC	17
	Primer R-CN: 5'- AGCCATTCCTBSAGSRTGAC	20
2	Primer F-LCT: 5'-AYYTCSMTSGAYCCGCC	17
	Primer R- LCT:5'-GCKRRCCVASRCASABATG	19
3	Primer F-LT: 5'- GGTGCGYSRTGAGSARCCG	20
	Primer R-LT: 5'- CTGRCCRCSMAYTTCGGTGTC	21
4	Primer F-CT: 5'- ACCTCGATGGAYCCGCC	17
	Primer R- CT: 5'-AGRTGCTGGCCRAGGCACA	19
5	Primer F-CL: 5'-GATCCGCCYGWKCASMSSCAGTWTCG	26
	Primer R- CL: 5'- AGCASSAYYTKGTCMCCTTT	20

Anexo 15. pH medido en algunos tratamientos de microcosmos en 4 eventos de muestreo.

