

**BIODEGRADACIÓN DE TOXAFENO POR CULTIVOS ENRIQUECIDOS
A PARTIR DE SEDIMENTOS DEL RÍO BOGOTÁ, BIOSÓLIDOS Y
SUELO CONTAMINADO DEL MUNICIPIO DE COPEY, CESAR EN
CONDICIONES DE ANAEROBIOSIS: PASE II**



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Colombia

SARA JULIANA BELTRAN PEREZ

Director: ZIV ARBELI, Ph.D

Codirectora: Francy Carolina Casallas

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
UNIDAD DE SANEAMIENTO Y BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

Bogotá, D.C 2019

**BIODEGRADACIÓN DE TOXAFENO POR CULTIVOS ENRIQUECIDOS A
PARTIR DE SEDIMENTOS DEL RÍO BOGOTÁ, BIOSÓLIDOS Y SUELO
CONTAMINADO DEL MUNICIPIO DE COPEY, CESAR EN CONDICIONES
DE ANAEROBIOSIS: PASE II**

SARA JULIANA BELTRAN PEREZ

Trabajo de grado para optar por el título de
Microbióloga industrial



Ziv Arbeli
Director



Gina López
Evaluadora

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo 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.

Tabla de contenido

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	7
4. MARCO TEÓRICO	9
4.1 Contaminantes orgánicos persistentes (COP)	9
4.2 Toxafeno.....	10
4.2.1 Características	10
4.2.2 Ámbito internacional y nacional	11
4.2.3 Impactos	12
4.3 Métodos de degradación de toxafeno	13
4.4 Degradación de compuestos halogenados	14
4.4.1 Deshalogenación reductiva anaerobia	15
4.4.2 Deshalogenasas reductoras (RDs)	15
4.4.3 Uso de moléculas estimulantes para la deshalogenación reductiva.....	16
5. ANTECEDENTES	16
6. OBJETIVOS	17
6.1 Objetivo general.....	17
6.2 Objetivos específicos	17
7. METODOLOGÍA	18
7.1 Reactivos químicos	18
7.2 Obtención de solución stock de toxafeno.....	18
7.3 Inóculo.....	18
7.4 Establecimiento de los cultivos de enriquecimiento	19
7.5 Extracción de Toxafeno	20
7.6 Análisis de la concentración de Toxafeno presente en los cultivos de enriquecimiento 20	
8. RESULTADOS.....	21
8.1 Evaluación de la transformación de toxafeno	21
9. DISCUSIÓN	28
10. CONCLUSIONES	31
11. BIBLIOGRAFÍA.....	31
12. ANEXOS.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Picos representativos indicados en la huella multicomponente de toxafeno

Figura 2. Seguimiento de la concentración de toxafeno en cada tratamiento establecido durante 180 días.

Figura 3. Área relativa de los seis picos seleccionados para la evaluación de la transformación de toxafeno en los tratamientos establecidos correspondiente al tiempo 0.

Figura 4. Área relativa de los seis picos seleccionados para la evaluación de la transformación de toxafeno en los tratamientos establecidos correspondiente a los 90 días.

Figura 5. Área relativa de los seis picos seleccionados para la evaluación de la transformación de toxafeno en los tratamientos establecidos correspondiente a los 180 días.

Figura 6. Huella multicomponente correspondiente a cultivos enriquecidos a partir de sedimento, con adición de sedimento estéril con y sin dibromo.

Figura 7. Huella multicomponente correspondiente al tratamiento enriquecido a partir de biosólidos con adición de sedimento estéril en los tres tiempos de muestreo evaluados.

Figura 8. Huella multicomponente del tiempo final correspondiente al tratamiento inoculado a partir de suelo con sedimento estéril sin dibromo y con dibromo.

Figura 9. Huella multicomponente del tiempo final correspondiente a los tratamientos inoculados a partir de: Sedimento, sedimento con dibromo, Suelo, suelo con dibromo y el control abiótico.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos establecidos para la evaluación de la transformación de toxafeno

LISTA DE ANEXOS

1. Preparación del medio de cultivo
2. Composición de la solución de vitaminas (mg/L):
3. Composición de la solución de selenito y tungstato (mg/L):
4. Composición de la solución de elementos traza – SL9 (por un litro)
5. Curva patrón para la cuantificación de toxafeno

1. RESUMEN

El presente estudio pretendía evaluar las condiciones de cultivo para el enriquecimiento de bacterias transformadoras de toxafeno en condiciones de anaerobiosis por cultivos de enriquecidos a partir de sedimentos del Río Bogotá, biosólidos y suelo contaminado del municipio de Copey, Cesar mediante cromatografía de gases. Para esto, la transformación del toxafeno se evaluó mediante la evaluación de doce tratamientos que alternan la presencia de la molécula trans-1,2-dibromociclohexano y de sedimentos estériles del Río Bogotá durante 180 días empleando cromatografía de gases (GC-CDE). El análisis consistió en la evaluación de seis picos representativos que estaban presentes en los tratamientos analizados y que fueron monitoreados en cada tiempo de muestreo. En todos los tratamientos evaluados se evidenciaron cambios en las áreas de los picos, lo que indica la transformación del toxafeno. Aunque en los tratamientos que no tienen adición de sedimentos estériles hay una disminución en las áreas, esta disminución es más evidente en los que tienen adición de sedimentos estériles. Finalmente, se sugieren como posibles mejores tratamientos los que emplearon como inóculo los biosólidos con la adición de sedimento estéril y sedimento con trans 1-2 dibromociclohexano. Los cultivos enriquecidos a partir de suelos provenientes del municipio de Copey, Cesar no mostraron una diferencia considerable frente a los cultivos con sedimentos y biosólidos, por otra parte, aunque el trans 1-2 dibromociclohexano aparentemente estimuló la transformación del toxafeno tampoco demostró una diferencia considerable frente a los demás tratamientos establecidos.

2. INTRODUCCIÓN

La actividad agrícola ha cumplido un papel fundamental en el desarrollo socioeconómico de Colombia incrementando el desarrollo sostenible del país pues representa la principal fuente de ingresos del área rural; es por esto que los plaguicidas han sido utilizados a lo largo de los años para además de controlar plagas, aumentar la productividad de los cultivos, incrementar el abastecimiento de diferentes productos y como una herramienta agrícola competitiva para la recolección de cosechas de mayor calidad [1,2].

Aunque los plaguicidas han sido empleados con el objetivo principal de controlar y/o destruir poblaciones de plagas que afectan negativamente los cultivos, los riesgos asociados a su uso sobrepasan los efectos benéficos, es por esto que los plaguicidas son considerados como una de las principales fuentes de contaminación ambiental [3]. Dentro de los principales tipos de pesticidas se destacan los organofosforados, carbamatos, piretroides y organoclorados como el toxafeno [4].

El toxafeno es un insecticida de amplio espectro [5] que consiste en la mezcla compleja de cientos de compuestos policlorados [6]. A nivel mundial ha sido empleado mayormente en cultivos de algodón, soya, maní, tabaco y vegetales [4,7,8]. Este compuesto xenobiótico se caracteriza por ser estable, presentar lentas velocidades de degradación [9,10], una baja solubilidad, la tendencia moderada a evaporarse del agua [11,12] así como por estar ampliamente distribuido en ecosistemas acuáticos y terrestres alterando la biodiversidad tanto animal como vegetal [8,11,5,6, 13].

A través de residuos presentes en los productos agrícolas los insecticidas organoclorados pueden llegar al hombre de forma indirecta mediante la cadena alimenticia en los productos de origen animal como la leche y la carne, en este caso además de ingerir los residuos del insecticida se ingieren también todos los metabolitos que se hayan formado [14].

Teniendo en cuenta los efectos adversos que estos compuestos generan en el hombre, el ambiente y los animales en 2001 fue catalogado como un compuesto orgánico peligroso en el Convenio de Estocolmo, las convenciones de Rotterdam y Basel también prohibieron la fabricación e importación de productos químicos peligrosos como el toxafeno, su uso fue restringido por la Environmental Protection Agency (EPA) en 1982 y le fue asignado el puesto 32 en el listado de prioridad de sustancias peligrosas de la Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) [10,15,16,17,5,18].

Con el fin de dar una solución a los problemas que trajo la utilización del toxafeno, se han descrito y empleado diversas alternativas de tratamiento como las tecnologías tradicionales que incluyen tratamientos térmicos y químicos [19]. Sin embargo, los tratamientos como la biorremediación han tenido gran acogida pues permite llevar a cabo la remediación de suelos contaminados mediante la transformación de los productos químicos nocivos como el toxafeno en compuestos inocuos como dióxido de carbono, agua, o materia celular [20].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Durante varios años el departamento de Cesar fue reconocido por ser uno de los mayores productores de algodón en el país, pues entre 1976 y 1977 fueron sembradas más de ciento cincuenta mil hectáreas de algodón en los municipios de Copey y Agustín Codazzi, este último llegando a ser catalogado como la capital blanca de Colombia [21,22]. El manejo de este cultivo fue el más complejo del país debido a su gran extensión, razón por la cual se constituyó como el principal consumidor de plaguicidas tipo COP en la década de los noventa.

Fue en los años 1976, 1979 y 1987 donde se utilizó la mayor cantidad de los plaguicidas COP (Compuestos Orgánicos Persistentes) como ingrediente activo para la elaboración de diferentes productos comerciales como respuesta a la gran demanda existente en el país. Las tres sustancias principales fueron el toxafeno, aldrin y DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) con 29,11%,

34,48% y 24,83% de participación del total de ingrediente activo utilizado en el país, respectivamente [23].

Esta utilización de plaguicidas coincide con los años previos a la crisis algodonera que tuvo lugar en 1990 en donde la producción de algodón disminuyó cerca de un 67% principalmente debido a la aparición del gusano bellotero (*Heliothis virescens*) [24,9,21,25]. Debido a las grandes extensiones de cultivo, para erradicar la plaga fueron empleadas grandes cantidades de toxafeno ocasionando que el gusano se volviera resistente a este producto convirtiendo así la actividad algodonera económicamente inviable [25].

Además de la drástica disminución de la producción, comercialización e industrialización del algodón, la prohibición del uso de compuestos organoclorados por la legislación nacional e internacional llevaron a que la Federación Nacional de Algodoneros almacenara de forma inadecuada 30.000 litros de toxafeno en el corregimiento de caracolcito ubicado en el municipio de Copey convirtiéndose en un compuesto obsoleto [19,21]. Debido a la falta de capacidad tanto técnica como económica del país en el área ambiental y sanitaria no fue posible realizar un proceso de disposición final a estas cantidades de toxafeno almacenadas generando un problema de salud pública y ambiental en el país [9].

Según la legislación, los pesticidas que fueron utilizados en un tipo de cultivo específico se convirtieron en obsoletos debido a la evidencia científica que les atribuyó efectos adversos sobre especies animales y la salud humana [19], razón por la cual fueron almacenados de forma indebida.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este proyecto se pretende generar información relacionada con las condiciones de transformación del toxafeno mejorando la especificidad del medio de cultivo. A mediano plazo se pretende facilitar la identificación de microorganismos asociados al proceso y posteriormente, en proyectos a largo plazo favorecer el planteamiento de estrategias viables y óptimas para el tratamiento del toxafeno minimizando por un lado los costos asociados y por otro, los impactos ocasionados al medio ambiente y la salud humana [26].

Es por esto que se analizaron las condiciones para la biodegradación del toxafeno mediante cultivos de enriquecimiento inoculados a partir de sedimentos, biosólidos y suelo contaminado en condiciones de anaerobiosis con la adición de trans-1,2-dibromociclohexano y sedimento estéril promoviendo el mecanismo de deshalogenación reductiva [27,28,29,30,31,32].

Dentro del marco de la biodegradación de compuestos tóxicos, se ha descrito que al implementar como inóculo los sedimentos y biosólidos, la transformación del toxafeno proporciona resultados favorables ya que estos aportan compuestos que facilitan el desarrollo de bacterias implicadas en este proceso [33,34] Por su parte, la adición de sedimentos estériles a los cultivos favorece la degradación del toxafeno [35].

Cabe resaltar que este trabajo continúa con la propuesta novedosa de la utilización de moléculas con efecto *priming* que han sido sugeridas como una estrategia para la estimulación de microorganismos deshalogenadores que realizan la transformación de compuestos complejos como el toxafeno [36,37].

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Contaminantes orgánicos persistentes (COP)

Los contaminantes orgánicos persistentes son sustancias sintéticas a base de carbono que han sido empleados como plaguicidas y para diversos fines industriales como la fabricación de adhesivos, revestimientos para el cableado eléctrico, componentes electrónicos, retardantes de llama, fluidos hidráulicos, acabados para pisos de madera, pinturas, espumas, textiles entre otros [38,39,15,16]. Este grupo de compuestos está formado por 21 sustancias que se dividen en pesticidas organoclorados como aldrina, α , β -hexaclorociclohexano, clordano, clordecona, diclorodifeniltricloroetano (DDT), dieldrina, endrina, heptacloro, hexaclorobenceno (HCB), lindano, mirex, pentaclorobenceno y toxafeno, así como en subproductos no deliberados generados a partir de la combustión y procesos industriales como las dioxinas policloradas y los furanos [17,40].

Según el convenio de Estocolmo estas sustancias químicas comparten cuatro propiedades principales: son altamente tóxicos, son persistentes, se acumulan en el tejido adiposo y se desplazan largas distancias a través del aire y el agua [17].

Al ser lipofílicos se facilita la bioacumulación en el tejido adiposo lo que conlleva que se magnifiquen a lo largo de la cadena alimenticia ocasionando impactos negativos en las especies predatoras, peces y mamíferos que se encuentran en la cima de la cadena incluyendo a los humanos [41] siendo la alimentación la principal vía de exposición seguida por las vías dérmica y respiratoria [39]. Los niveles de adiposidad de los organismos son la base de la contaminación química pues en climas fríos las capas de tejido adiposo son más gruesas que las que presentan los organismos que habitan los climas cálidos [19].

Las características físicas el transporte de los COP en la superficie terrestre y del aire está relacionado con la temperatura pues son transportados por el viento y las partículas de polvo hasta lugares templados en donde se llevan a cabo procesos de evaporación para continuar con el desplazamiento. Cuando llegan a lugares menos templados, hay menos evaporación lo que ocasiona un desplazamiento hacia los polos y zonas montañosas [19].

Debido a los efectos adversos que representan los COP, en el año 2001 los gobiernos del mundo adoptaron el tratado internacional de Estocolmo destinado a restringir y eliminar definitivamente la producción, utilización, emisión y almacenamiento de estas sustancias [17]. Además de este, las convenciones de Rotterdam y Basel también prohibieron la fabricación e importación de productos químicos peligrosos con el fin de dar solución a los impactos negativos ocasionados [10,40,42].

4.2 Toxafeno

El toxafeno, conocido principalmente como canfeclor, clorocanfeno, melipax y canfeno clorado [6,28,30,43] es un insecticida que consiste en la mezcla de cientos de compuestos policlorados, principalmente bornanos.

El proceso de producción o síntesis consiste en la isomerización del α -pineno que resulta en la formación del canfeno el cual es clorado mediante la exposición a luz ultravioleta para finalmente producir el toxafeno con un contenido de cloro entre el 67- 69% [1,8,44].

Luego del proceso de síntesis, se forman compuestos como bornanos, canfenos, dihidrocanfenos y bornadienos denominados congéneres que pueden llegar a tener diferentes grados de cloración que varía entre 5 y 12 constituyentes de cloro por molécula. Es así como las combinaciones de estos congéneres conforman la mezcla técnica del toxafeno llegando a estar formada hasta por 1000 congéneres [44,8,21,22].

El análisis del toxafeno es difícil debido a la complejidad de su estructura, así como de la síntesis de congéneres que puedan ser usados como referencia, es por esto que para poder obtener individualmente los congéneres las posibles estrategias planteadas por diferentes autores han sido: aislar los componentes del toxafeno técnico, degradar el toxafeno técnico para después obtener los componentes restantes y aislar los componentes persistentes del toxafeno de muestras ambientales [8]. Dada la complejidad de la obtención de estándares de congéneres, en el mercado solo se encuentran disponibles 23 de estos [45].

4.2.1 Características

El toxafeno presenta una actividad de amplio espectro [5] por lo que ha sido mayormente utilizado en cultivos de algodón en el control de varias plagas como principalmente el gusano algodonero, pulgón algodonero y el gusano de jardín para aumentar la productividad de los cultivos [6,46]. También ha sido utilizado extensivamente en cultivos como maní, soya, tabaco, vegetales, flores entre otros [8,5]. Según la fabricación y el modo de uso pueden cambiar algunas propiedades del compuesto como la toxicidad y el rango de actividad [5]

Además, este compuesto se caracteriza por presentar lentas velocidades de degradación [9], una baja solubilidad y tendencia moderada a evaporarse del agua [11,47], así como por estar ampliamente distribuido ya que se dispersa mediante la atmósfera desde el lugar de aplicación hacia múltiples destinos convirtiéndose en uno de los mayores contaminantes de ecosistemas marinos [7,48,8,11,5]. Se ha descrito que es persistente en suelo y el sedimento llegando a estar presente en estos hasta 20 años después de su aplicación [8,11,5,12]. Estudios han demostrado que la volatilización y la escorrentía después de la aplicación son las principales vías de pérdida del toxafeno [5].

Debido a la compleja estructura que presenta el toxafeno, así como la falta de información se dificulta el análisis de las propiedades toxicológicas, sin embargo, se ha reportado el efecto de la sustancia sobre procesos bioquímicos y procesos enzimáticos como el sistema nervioso central, efectos sobre el movimiento del calcio y el potasio a través de la membrana, efectos sobre la actividad ATPasa entre otros [11]. También se han descrito los efectos altamente tóxicos en aves, peces y algunos mamíferos [5,12,22].

4.2.2 Ámbito internacional y nacional

En 1945 la compañía Hercules Powder introdujo por primera vez al mercado el toxafeno como insecticida para el uso en cultivos de algodón y en 1948 fue usado comercialmente para el control de diversas plagas [12,6]. En Estados Unidos fue el pesticida mayormente utilizado comparado con otros pesticidas disponibles en el mercado [21] y producido principalmente por cuatro grandes compañías: Tenneco Chemical, Riverside Chemical, Vicksburg Chemical y Hercules siendo esta la más importante [5]. Algunas preparaciones muy similares fueron manufacturadas en países como Francia, Alemania, Israel, el Sur de África, Brasil y países de América central [5,8]. El toxafeno fue comercializado en cuatro formulaciones como emulsiones, polvo, gránulos y cebos [5]. Se estima que la producción total de toxafeno fue aproximadamente de 720 toneladas, sin embargo, una de las dificultades al estimar las concentraciones es que el compuesto es biotransformado por mamíferos y aves por lo que el valor puede cambiar [46,47].

Por otro lado, en Colombia la utilización del toxafeno fue mayor en la década de los años setenta principalmente en los cultivos de algodón, arroz, maíz y representando más del 90% del total de los insecticidas producidos. Este y otros compuestos orgánicos persistentes fueron producidos en grandes cantidades debido a la demanda siendo el toxafeno uno de los más empleados desde 1975 hasta 1987 [25]. Además, se registró la importación de 8.271 toneladas de toxafeno en donde el último registro obtenido fue en 1988, mientras que los valores referentes a exportación corresponden a 137.758 Kilos-litros en el año 1975 [25].

Teniendo en cuenta los impactos adversos tanto a la salud del hombre como al medio ambiente, en Colombia se instauraron algunas medidas como:

- RESOLUCIÓN 209 de 1978 del Ministerio de Agricultura la cual prohíbe la venta y el uso de productos organoclorados con destino al cultivo del café en el territorio nacional
- RESOLUCIÓN 366 de 1987 del ICA mediante la cual se cancelan las licencias de venta de los insecticidas Organoclorados que contengan los ingredientes activos: Aldrin, Heptacloro, y Canfecloro en su composición
- DECRETO 305 de 1988 de la Presidencia de la República que prohíbe la importación, producción y formulación de los productos Organoclorados: Aldrin, Heptacloro, Dieldrin, Clordano y Canfecloro y sus compuestos.
- RESOLUCIÓN 2971 expedida en el año 2000 considera que:
 - Por la RESOLUCIÓN 531 de 1988 del Instituto Colombiano Agropecuario se cancelaron las licencias de venta y renovaciones de plaguicidas entre los que se considera el Canfecloro o Toxafeno
 - Por la RESOLUCIÓN 1255 de 1993 expedida por el Ministerio de Salud prohibió la importación, producción, formulación, comercialización, manejo, uso y aplicación de varios plaguicidas organoclorados.

4.2.3 Impactos

El toxafeno representa una gran preocupación ambiental pues debido a sus propiedades se ha determinado la presencia de residuos en diferentes ambientes. Un estudio reportó la presencia de congéneres de toxafeno (octa y nonabornanos) en el aire y agua en Resolute Bay, Canadá, los autores resaltaron que estos suelen acumularse en peces, mamíferos marinos y leche humana [49].

Al analizar ambientes acuáticos se ha determinado que el toxafeno es uno de los mayores contaminantes al estar presente en sedimento y peces [50,51,52]. El Gran Lago ha sido de interés para el desarrollo de diversas investigaciones [53,54,55]. debido a que además de albergar a una amplia variedad de especies de peces que son consumidos por un gran número de personas, es un área donde no se suelen emplear este tipo de compuestos por lo cual se hace evidente el transporte del toxafeno a lo largo de la cadena trófica o del transporte mediante la atmósfera. La detección de concentraciones de toxafeno en peces representa un riesgo para la salud humana, es por esto que se ha desarrollado el programa de monitoreo y vigilancia del gran lago (Great Lakes Fish Monitoring and Surveillance Program) [56].

Además, se han realizado diferentes estudios sobre las afectaciones ocasionadas por el toxafeno, dentro de las cuales se encuentran: el desarrollo de los huesos y la reproducción en patos [57,58] la inhibición de la fotosíntesis en cultivos de avena [59], la presencia de seis congéneres del

toxafeno en huevos de halcón, disminución en la producción de huevos de gallinas [60] entre otros. Las aves y los peces han sido empleado como bioindicadores de la contaminación ambiental [61].

Además, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) como la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) han determinado que el toxafeno posiblemente es carcinogénico en seres humanos debido a la suficiente evidencia científica [62,63,64]. Así como se han reportado estos efectos sobre la salud humana, también se han reportado que el toxafeno es un promotor de tumores hepáticos en ratones [65,66]

4.3 Métodos de degradación de toxafeno

Se ha descrito que la degradación del toxafeno puede ocurrir bajo tratamientos físicos, químicos y biológicos. Dentro de los fisicoquímicos se encuentra la incineración, degradación química, aislamiento del contaminante, excavación, entre otros, sin embargo, autores han señalado dos aproximaciones utilizadas comúnmente para la degradación del toxafeno: la adsorción física por Amberlite en aguas subterráneas contaminadas y la extracción de toxafeno del suelo contaminado por extracción con fluido supercrítico.

La primera se puede implementar para la eliminación de contaminantes como pesticidas, fenoles o compuestos aromáticos del agua subterránea o aguas residuales mediante la adherencia a un material polimérico como el Amberlite, en donde el material adsorbente atraparé el toxafeno y, por lo tanto, purificará el agua potable antes de que la población pueda consumirlo. El toxafeno extraído del adsorbente será transferido a un biorreactor para su posterior destrucción [67]. La segunda, es una técnica empleada para la descontaminación de sitios de desechos peligrosos. El dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) se usa para extraer PCB, DDT y toxafeno de suelos superiores y subsuelos contaminados. La separación del soluto extraído del SC-CO₂ da como resultado la obtención de un volumen de residuos concentrados. Este método mejora la eficiencia del tratamiento en comparación con la combustión [68,69].

Por otro lado, en cuanto a los tratamientos biológicos, la biorremediación es una de las alternativas más viables para el tratamiento de suelos contaminados, consiste en un proceso biológico de descontaminación en donde se emplean microorganismos para neutralizar sustancias tóxicas las cuales son degradadas a compuestos menos tóxicos que forman biomasa y dióxido de carbono [70,71]. Para llevar a cabo la transformación las sustancias orgánicas, estas son absorbidas por los microorganismos que las utilizan como fuente de carbono y energía para su crecimiento y para el desarrollo de sus funciones metabólicas disminuyendo así la disponibilidad de estas sustancias en el suelo [70,72,13].

Se conocen varios organismos como bacterias, hongos y plantas que pueden llevar a cabo procesos de biorremediación de compuestos como el toxafeno en condiciones tanto aerobias como anaerobias [70] sin embargo, es necesario tener en cuenta que la disponibilidad y la

tolerancia al compuesto determinan el potencial metabólico de los microorganismos para transformar el contaminante [73].

Existen varios mecanismos que resultan en deshalogenación de algunas clases de contaminantes orgánicos, que hacen que los compuestos sean menos tóxicos. Para llevar a cabo estos mecanismos se puede realizar la estimulación de secuencias metabólicas a través de la introducción de combinaciones de donador y aceptor de electrones, la adición de nutrientes para satisfacer las necesidades de microorganismos deshalogenadores y el uso de sistemas enzimáticos [74]

4.4 Degradación de compuestos halogenados

En el grupo de compuestos halogenados se encuentran los fluorados, bromados y yodados, pero predominantemente los compuestos clorados [75].

Para el tratamiento de los compuestos orgánicos halogenados se emplean métodos físicos, químicos y biológicos. Dentro de este último se destaca la deshalogenación que actualmente se ha descrito como un proceso para la transformación de contaminantes en compuestos menos peligrosos [76,77,75]. Algunas de las formas de deshalogenación pueden ser oxidativa en donde la fuente de oxígeno es molecular y por tanto ocurre en condiciones aeróbicas, hidrolítica en donde el halógeno es reemplazado por un grupo $-OH$ que proviene de una molécula de agua y reductiva en donde el átomo de cloruro es reemplazado por un átomo de hidrógeno [70,78].

La transformación puede llevarse a cabo tanto en condiciones aerobias como anaerobias y según la cantidad de átomos halogenados que tenga la molécula se favorecerá un mecanismo u otro. Cuando hay menor cantidad se lleva a cabo la degradación en condiciones aerobias mientras que cuando hay mayor cantidad se favorece la degradación bajo condiciones anaerobias [79,70].

En cuanto a la eficiencia de la degradación en condiciones aerobias o anaerobias, se ha descrito que el estrés oxidativo asociado con la biodegradación de contaminantes clorados representa una dificultad para el desarrollo de procesos eficientes de degradación aeróbica favoreciendo así la evolución de metabolismos anaeróbicos como la respiración de halógenos [75,80], es por esto que los compuestos orgánicos halogenados pueden ser transformados bajo deshalogenación reductiva en anaerobiosis ya que bajo estas condiciones se obtienen compuestos menos halogenados [75].

4.4.1 Deshalogenación reductiva anaerobia

La deshalogenación reductiva puede llevarse a cabo mediante tres formas: acoplada a cometabolismo, ligada al metabolismo de carbono y como proceso respiratorio denominado halo-respiración [77,70].

En primer lugar, en la deshalogenación reductiva acoplada al cometabolismo se lleva a cabo una degradación parcial, es un proceso lento y los microorganismos que la llevan realizan no obtienen ningún beneficio del proceso. En segundo lugar, los compuestos orgánicos halogenados actúan como fuente de carbono y energía para el crecimiento de los microorganismos, en este caso las enzimas son específicas permitiendo que el proceso de degradación se lleve a cabo en menor tiempo [75,77,70]. En tercer lugar, la halo-respiración es un proceso de respiración anaerobia en donde se reemplaza el halógeno por un hidrógeno. Allí se rompe un enlace halógeno-carbono y el átomo de halógeno se libera como un haluro, en este proceso las bacterias emplean los compuestos clorados o halogenados como aceptores finales de electrones. Al eliminar los halógenos de los compuestos se disminuye o elimina su toxicidad y son fácilmente degradables [81,82].

Las bacterias que llevan a cabo la halo-respiración se clasifican como obligadas y no obligadas [83], en el grupo de bacterias no obligadas se encuentran *Geobacter*, *Desulfuromonas*, *Anaeromyxobacter* y *sulfurospirillum* mientras que en el grupo de obligadas están las pertenecientes al phylum *Chloroflexi* y *Dehalobacter* [83], todas se encuentran en ambientes anaerobios y son específicas para ciertas sustancias. Dentro del phylum *Chloroflexi* se encuentran cepas como *Dehalococcoides mccartyi* y *Dehalogenimonas lykanthroporepellens* [83]

4.4.2 Deshalogenasas reductivas (RDs)

El punto más importante de los procesos de degradación de compuestos halogenados mediante deshalogenación reductiva son las enzimas deshalogenasas. Estas enzimas son proteínas que están asociadas a la membrana citoplasmática y catalizan la reducción del halógeno a organohaluro mediante la transferencia de electrones acoplados a la fosforilación y producción de ATP [70]. La vitamina B12 y los corronoides actúan como cofactores necesarios para llevar a cabo la reacción [75].

Se ha descrito que las deshalogenasas son inactivadas en presencia de oxígeno molecular [83] y que durante los últimos años han sido utilizadas como biomarcadores para monitorear la biorremediación de sitios contaminados [75].

Los genes que codifican para las deshalogenasas reductivas han sido identificados en una amplia variedad de bacterias anaerobias estrictas como *Sulfurospirillum*, *Desulfotobacterium*, *Dehalobacter* y *Dehalococcoides* [83,70] lo cual ha permitido la documentación de dos formas generales en las que actúan las deshalogenasas reductivas: hidrogenólisis o sustitución del halógeno y dihaloeliminación [75]. A pesar de tener información relacionada con el mecanismo de acción, investigadores sugieren el desarrollo de más estudios para caracterizarlas y así obtener una visión más detallada del proceso de deshalogenación.

4.4.3 Uso de moléculas estimulantes para la deshalogenación reductiva

Las moléculas estimulantes son empleadas con el fin de incrementar los procesos de deshalogenación reductiva y facilitar la búsqueda de grupos de bacterias haloinspiradoras mediante la estimulación selectiva de estos microorganismos.

El uso de las moléculas “priming” o estimulantes beneficia a los microorganismos que tienen enzimas o cofactores específicos sobre compuestos halogenados pues al presentar estructuras similares a la del contaminante facilitan el reconocimiento de compuestos halogenados más complejos [84,85,86,87].

Es necesario tener en cuenta que para que se lleve a cabo la estimulación esperada, las moléculas utilizadas no presenten interferencias con el halógeno a evaluar, que no presenten ningún grado de toxicidad y que su degradación sea completa [88,89,90].

Se han realizado diferentes investigaciones relacionadas con el uso de estas moléculas y el PCB. Uno de estos demostró que los procesos como la deshalogenación de congéneres pueden ser activados al emplear moléculas estimuladoras como benzoatos halogenados o bifenil clorados [90,91]. También se demostró que el 2,5,3',4'-tetraclorobifenil y el 2,6-difluoro-4-clorobifenilo pueden utilizarse como aceptores de electrones estímulo del proceso de deshalogenación [89,92].

5. ANTECEDENTES

En el año 2010 se creó el macroproyecto “Biorremediación de suelos contaminados con toxafeno: del laboratorio al campo” que surgió como una alternativa para mitigar los daños ocasionados por el uso del toxafeno en el país en donde se plantearon dos objetivos principales. El primero de estos estaba dirigido a la adquisición de información relacionada con el proceso de degradación y optimización del protocolo de remediación mediante la evaluación de microcosmos. El segundo objetivo estaba dirigido a conocimiento de las bacterias y enzimas que están involucradas en el proceso de transformación del toxafeno.

Dentro del marco de los objetivos propuestos, se planteó un trabajo pionero en la utilización de siete diferentes moléculas estimuladoras en donde el trans 1-2 dibromociclohexano mostró mejor estimulación de los procesos de deshalogenación reductiva en la transformación de toxafeno [93].

En el año 2015 se establecieron seis tratamientos en condiciones de anaerobiosis en donde se utilizaron biosólidos provenientes de la planta de tratamiento del Salitre, suelo contaminado con toxafeno del municipio de Copey, Cesar y sedimentos del Río Bogotá a los cuales se les adicionó trans 1-2 dibromociclohexano a tres de los seis tratamientos, adicionalmente se determinó la presencia de *Desulfuromonas sp.* Con un 98% de coincidencia con la cepa *Desulfuromonas michiganensis* BB1 y bacterias pertenecientes al Filum *Chloroflexi* [94]. Posteriormente, en el año 2017 se realizó el primer pase de los cultivos establecidos en el año 2015 con la adición de sedimento estéril proveniente del Río Bogotá a algunos de los tratamientos planteados [95].

Finalmente, teniendo en cuenta que en las dos últimas evaluaciones realizadas la presencia del trans-1,2-dibromociclohexano como molécula estimuladora no generó diferencias significativas en los tratamientos, en este trabajo se realizó el segundo pase de los cultivos de enriquecimiento con el fin de descartar la utilización de dicha molécula además de identificar el tratamiento que estimula en mayor medida la transformación del toxafeno mediante la evaluación de doce tratamientos que alternan la presencia de la molécula trans-1,2-dibromociclohexano y de sedimentos estériles del Río Bogotá.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar las condiciones de cultivo para el enriquecimiento de bacterias transformadoras de toxafeno en anaerobiosis.

6.2 Objetivos específicos

- Comparar la transformación del toxafeno por cultivos de enriquecidos a partir de sedimentos del Río Bogotá, biosólidos y suelo contaminado del municipio de Copey, Cesar mediante cromatografía de gases.
- Evaluar la influencia del Trans-1,2-dibromociclohexano y del sedimento estéril en el proceso de la transformación del toxafeno.

7. METODOLOGÍA

7.1 Reactivos químicos

Para los ensayos de transformación, el toxafeno utilizado fue extraído a partir de los suelos contaminados de El Copey. Se utilizó Trans-1,2-dibromociclohexano como molécula estimulante en algunos tratamientos de marca Sigma-Aldrich (al 99%). Para la extracción de Toxafeno, se utilizó el Isooctano (2, 2,4-trimetilpentano, grado cromatografía) marca J.T Baker como solvente; el Sulfato de sodio anhidro granular (Na_2SO_4) marca J.T Baker y los filtros de Nylon (25 mm; 0.22 μm) de marca Agilent.

7.2 Obtención de solución stock de toxafeno

El toxafeno empleado para dopar los sedimentos estériles provino de la extracción del suelo contaminado del municipio de Copey, Cesar. Para esto, 160 g de suelo contaminado fueron secados durante catorce horas en la cabina de extracción para ser tamizados en una malla de 2,0 mm de diámetro. El suelo fue mezclado con 160 gramos de sulfato de sodio anhídrido y 160 ml de isooctano en un frasco schott, se agitó en el vortex durante 1 minuto, posteriormente se sometió a sonicación durante 14 horas. Finalmente, el solvente fue filtrado y almacenado en nevera a 4°C. La concentración obtenida fue de 3600 ppm.

7.3 Inóculo

Los cultivos de enriquecimiento empleados como inóculo corresponderán al primer pase realizado el 7 de marzo de 2017 [89] los cuales provienen de seis cultivos de enriquecimiento a partir de tres muestras: suelo contaminado del municipio de Copey-Cesar, sedimentos del Río Bogotá y biosólidos de la planta de tratamiento del salitre [88].

Los cultivos empleados como inóculo fueron establecidos en condiciones de anaerobiosis empleando medio mineral (Anexo 1) en donde a los tratamientos correspondientes se les adicionó Trans-1,2-dibromociclohexano y sedimento estéril (Tabla 1)

Tabla 1. Tratamientos establecidos para la evaluación de la transformación de toxafeno

Cultivo	Inóculo	Trans 1-2 dibromociclohexano	Sedimento estéril
1	Suelo + Dibromo	X	
2	Suelo		
3	Sedimento + dibromo	X	
4	Sedimento		
5	Biosólidos + dibromo	X	
6	Biosólidos		
7	Suelo + Dibromo	X	X
8	Suelo		X
9	Sedimento + dibromo	X	X
10	Sedimento		X
11	Biosólidos + dibromo	X	X
12	Biosólidos		X

7.4 Establecimiento de los cultivos de enriquecimiento

Se establecieron cultivos madre con el fin de emplearlos como inóculo en futuros experimentos y cultivos de sacrificio para evaluar la transformación del toxafeno durante diferentes tiempos de muestreo (día 0, 90 y 180 días).

En primer lugar, se adicionó toxafeno y trans 1-2 dibromociclohexano (disueltos en isooctano) a los tratamientos indicados en la Tabla 1 con una concentración de 201,6 ppm y 0,34 mM correspondientemente, una vez fueron agregados a cada frasco se dejaron abiertos en la cabina de extracción durante 20 minutos para permitir la evaporación del solvente. Posteriormente se adicionó el medio mineral para anaerobios: 20 ml para los cultivos madre y 2 ml para los cultivos de sacrificio (Anexo 1), este medio fue enfriado bajo flujo de nitrógeno para proporcionar las condiciones de anaerobiosis.

Después de modificar la atmosfera de cada frasco con flujo de nitrógeno, estos fueron sellados con tapa de caucho y agrafe en donde se adicionó el inóculo mediante la inyección con jeringas, para los cultivos madre 5 ml y para los cultivos de sacrificio 0,5 ml. A los tratamientos que correspondieron se adicionó sedimento estéril (Tabla 1) proveniente del Rio Bogotá que fue sometido a tres ciclos de esterilización durante tres días seguidos, las condiciones fueron 121°C – 15psi – 15 minutos. Finalmente, los cultivos de enriquecimiento se mantuvieron en incubación a 30°C en condiciones de oscuridad.

7.5 Extracción de Toxafeno

A partir de los cultivos de sacrificio establecidos en cada tiempo de muestreo (día 0, 90 y 180 días) se realizó la extracción de toxafeno mediante la adición de 10 ml de isooctano, después las unidades experimentales se sometieron a un baño de ultrasonido por dos horas, llevados a agitación (150 rpm) en posición horizontal por veinte horas, nuevamente fueron sometidos a un baño de ultrasonido por dos horas para tomar aproximadamente 3 ml de sobrenadante y posteriormente transferirlos a frascos de extracción que contenían 1g de sulfato de sodio anhídrido con el fin de eliminar los residuos de agua que posiblemente estuvieran presentes en la muestra, el sobrenadante fue filtrado con filtros de nylon de 0,22 μ y finalmente dispuesto en viales de cromatografía para su posterior análisis.

7.6 Análisis de la concentración de Toxafeno presente en los cultivos de enriquecimiento

Para determinar la cantidad de toxafeno presente en las muestras y así mismo su transformación a lo largo de los tiempos de muestreo, se estableció una curva patrón a concentraciones de 20,50,100,150,200,300 y 400 ppm, posteriormente las muestras fueron sometidas a un análisis por cromatografía de gases en donde se compararon los picos obtenidos en los cromatogramas con diferentes picos representativos. El análisis de la transformación de toxafeno se realizó cada tres meses en donde se sacrificaron tres unidades experimentales por cada tratamiento.

La concentración del toxafeno se evaluó mediante cromatografía de gases (GC-2014, Shimadzu) acoplada a detector de captura de electrones (ECD), con una columna de DB-XLB (30m x 0.25mm diámetro interno, 0.25 μ m de espesor de película, Agilent Technologies), utilizando helio como gas de arrastre (1ml/min), y nitrógeno como gas make up. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 200°C (2min); 5°C/min – 300°C (6min), volumen de inyección: 0.5 μ l a 220°C, Modo de Split 1/50 y temperatura del detector a 320 °C.

8. RESULTADOS

8.1 Evaluación de la transformación de toxafeno

Para evaluar la transformación del toxafeno, se realizó la selección de seis picos representativos que estaban presentes en los tratamientos analizados y que fueron monitoreados en cada tiempo de muestreo (Figura 1).

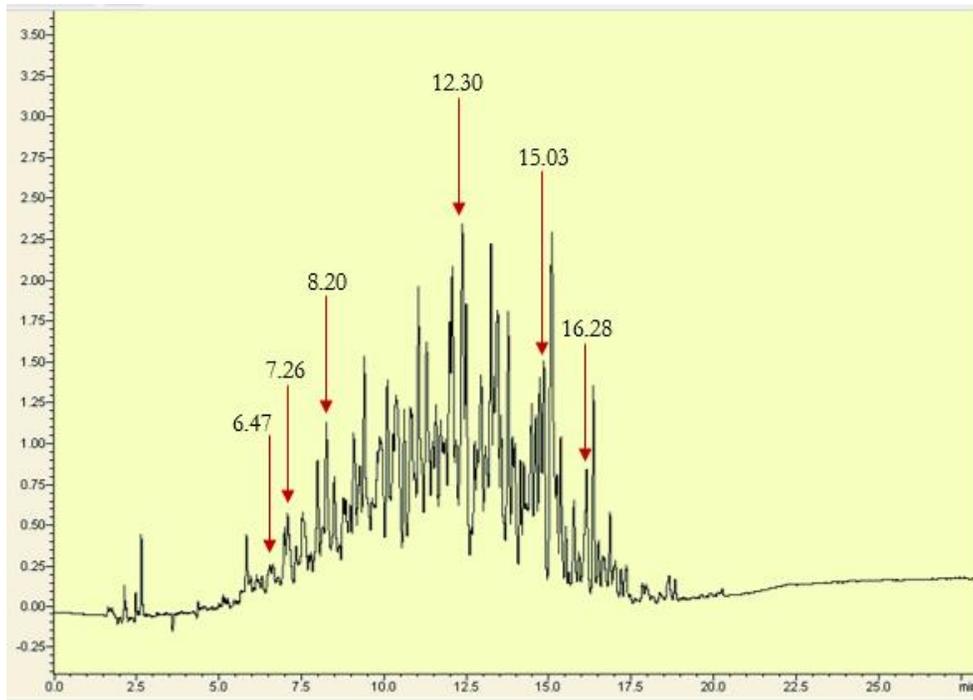


Figura 1. Picos representativos indicados en la huella multicomponente de toxafeno

Una vez obtenidos los cromatogramas correspondientes a cada tratamiento establecido se calculó la concentración de toxafeno mediante la integración de las áreas totales en los tiempos de muestreo (figura 2). Al comparar los tratamientos establecidos, se evidencia que al finalizar el experimento hay una disminución en la concentración de toxafeno en los tratamientos que contienen sedimento estéril; mientras que los tratamientos sin adición de sedimento, aunque presentan una disminución en el tiempo final respecto a los 90 días, muestran un comportamiento similar entre ellos.

A lo largo del tiempo se observa una disminución en las concentraciones de toxafeno en donde los cultivos enriquecidos a partir de biosólidos con sedimento estéril presentaron la menor concentración (56 mg/L) lo que posiblemente indicaría que es el mejor tratamiento, seguido por el tratamiento inoculado a partir de sedimento con sedimento estéril (104 mg/L). Por otro lado, el tratamiento inoculado a partir de sedimento con adición de trans 1-2 dibromociclohexano aunque permitió obtener una disminución en la concentración durante el tiempo del

experimento, fue el tratamiento con mayor concentración de toxafeno comparado con los demás tratamientos (200 mg/L).

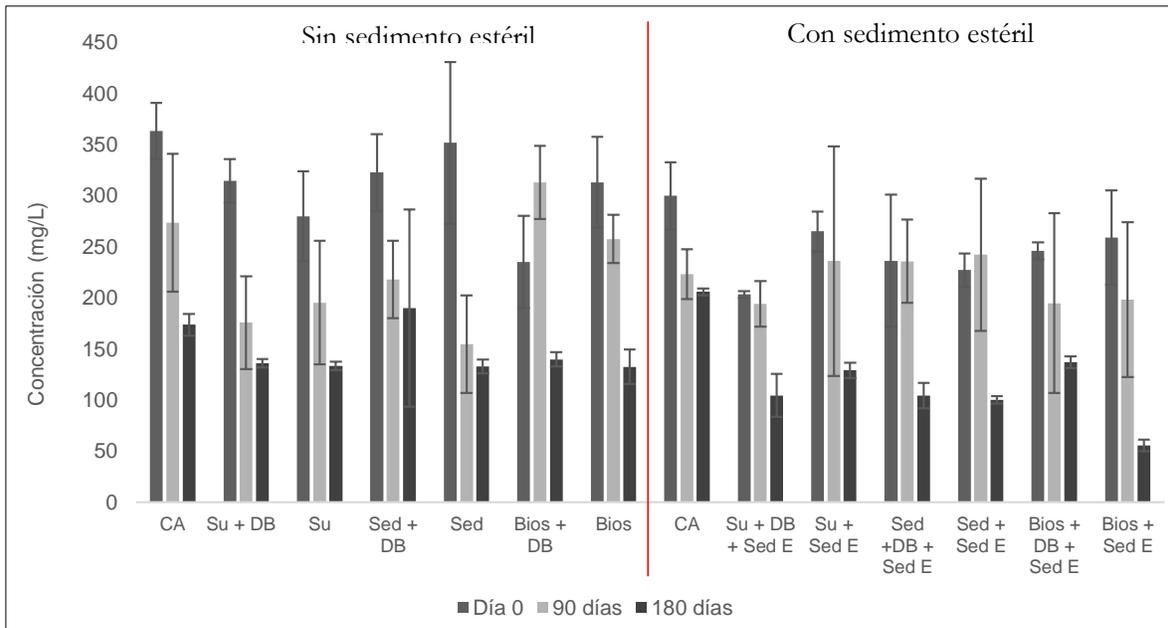


Figura 2. Seguimiento de la concentración de toxafeno en cada tratamiento establecido durante 180 días. (CA): control abiótico, (Su): cultivos enriquecidos a partir de suelo contaminado, (Sed): cultivos enriquecidos a partir de sedimentos, (DB): trans 1-2 dibromociclohexano, (Bios): cultivos enriquecidos a partir de biosólidos, (Sed E): cultivos con adición de sedimento estéril

En la Figura 2, aunque se observa una alta variabilidad en las réplicas de los tratamientos, el análisis de las áreas relativas de los picos seleccionados para llevar a cabo la evaluación de la transformación del toxafeno permitieron reafirmar que los tratamientos con adición de sedimento estéril presentaban la mayor transformación del contaminante.

Para evidenciar cambios en los perfiles obtenidos para cada tratamiento durante el tiempo de monitoreo se calculó el área relativa, para esto se dividió el área de cada pico en el área total de la huella multicomponente y se multiplicó por 100. (Figuras 3, 4 y 5)

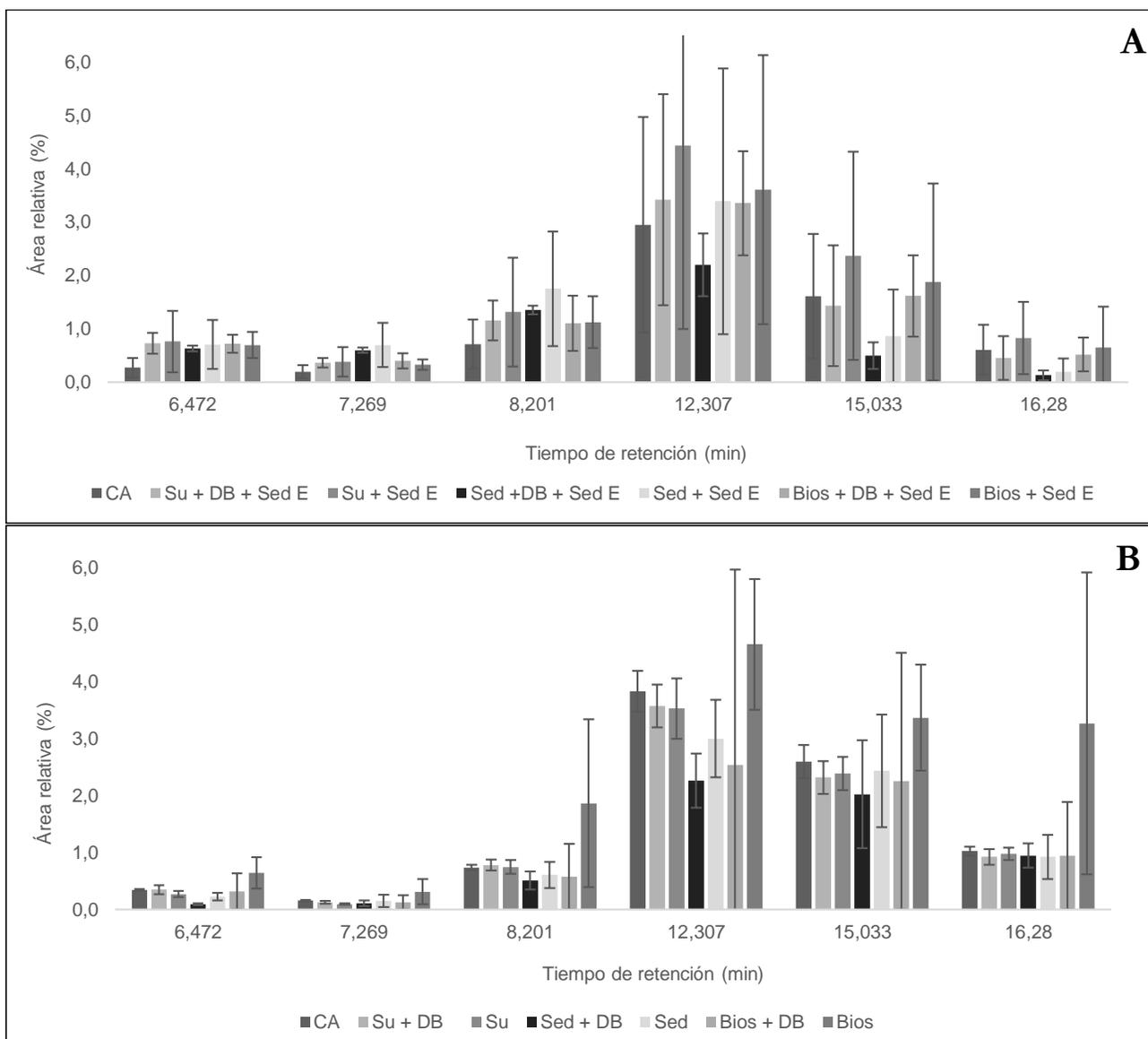


Figura 3. Área relativa de los seis picos seleccionados para la evaluación de la transformación de toxafeno en los tratamientos establecidos correspondiente al tiempo 0. **A)** Tratamientos sin adición de sedimento estéril **B)** Tratamientos con adición de sedimento estéril. (CA): control abiótico, (Su): suelo, (Sed): sedimento, (DB): trans 1-2 dibromociclohexano, (Bios): biosólidos, (Sed E): sedimento estéril

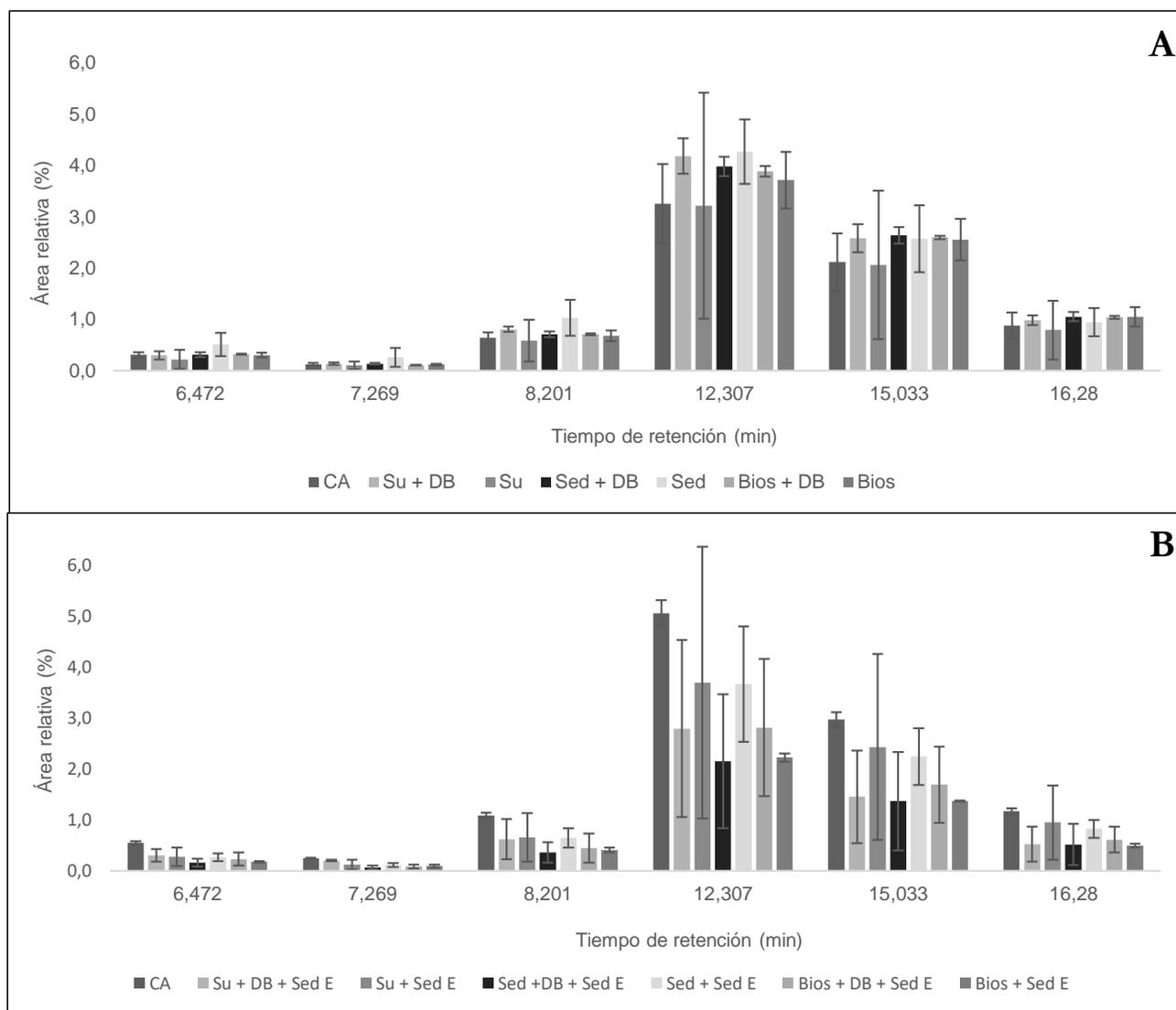


Figura 4. Área relativa de los seis picos seleccionados para la evaluación de la transformación de toxafeno en los tratamientos establecidos correspondiente a los 90 días. **A**): Tratamientos sin adición de sedimento estéril **B**): Tratamientos con adición de sedimento estéril. (CA): control abiótico, (Su): suelo, (Sed): sedimento, (DB): trans 1-2 dibromociclohexano, (Bios): biosólidos, (Sed E): sedimento estéril

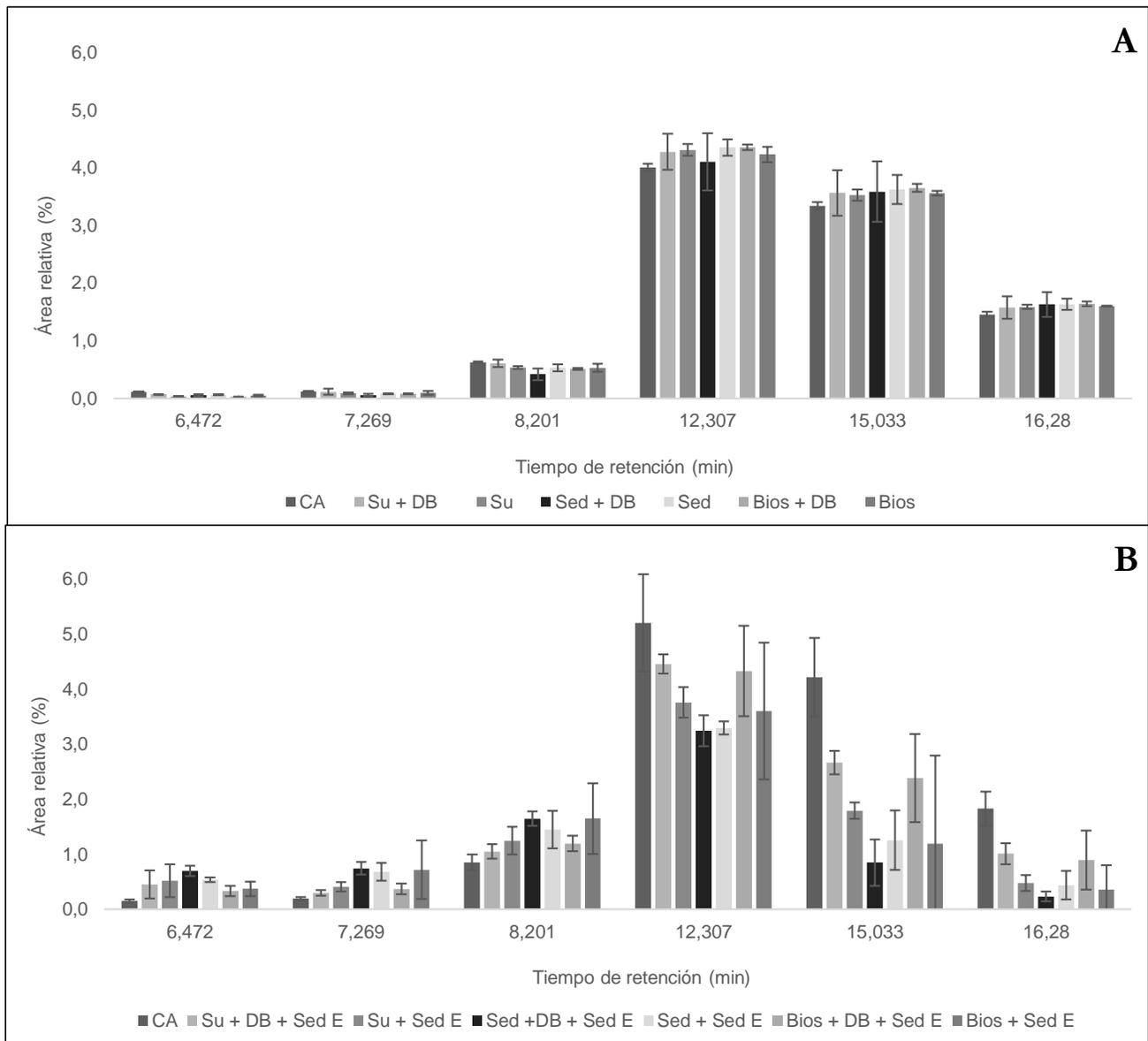


Figura 5. Área relativa de los seis picos seleccionados para la evaluación de la transformación de toxafeno en los tratamientos establecidos correspondiente a los 180 días. **A**): Tratamientos sin adición de sedimento estéril **B**): Tratamientos con adición de sedimento estéril. (CA): control abiótico, (Su): suelo, (Sed): sedimento, (DB): trans 1-2 dibromociclohexano, (Bios): biosólidos, (Sed E): sedimento estéril

Al comparar las figuras 3,4 y 5 se puede observar que a lo largo del tiempo hay un cambio en los perfiles cromatográficos en donde se presenta la tendencia que los últimos picos disminuyen mientras que los primeros aumentan. En todos los tratamientos evaluados se evidenciaron cambios en las áreas de los picos, lo que indica la transformación del toxafeno. Aunque en los tratamientos que no tienen adición de sedimentos estériles (**A**) hay una disminución en las áreas, esta disminución es más evidente en los que tienen adición de sedimentos estériles (**B**).

Además, se observa que el tratamiento inoculado a partir de sedimento con dibromo y sedimento estéril presenta un comportamiento similar al del tratamiento inoculado a partir de sedimento con sedimento estéril, razón por la cual, para tener una visión más clara de las transformaciones, la comparación se presenta en la figura 6.

Allí se puede evidenciar que el tratamiento enriquecido a partir de sedimento, dibromo y con sedimento estéril identificado con el color rojo presenta picos con menor área que el otro tratamiento en la parte final de la huella multicomponente, mientras que en los primeros picos presenta mayor área posiblemente indicando la presencia de moléculas con menos cloro. Esto permite determinar que el tratamiento de sedimento, dibromo con sedimento estéril podría presentar una mejor actividad en cuanto a la transformación del toxafeno.

Por otro lado, se observó que el tratamiento que presentó la reducción más significativa a lo largo del tiempo fue el tratamiento de biosólidos con sedimento estéril figura 7.

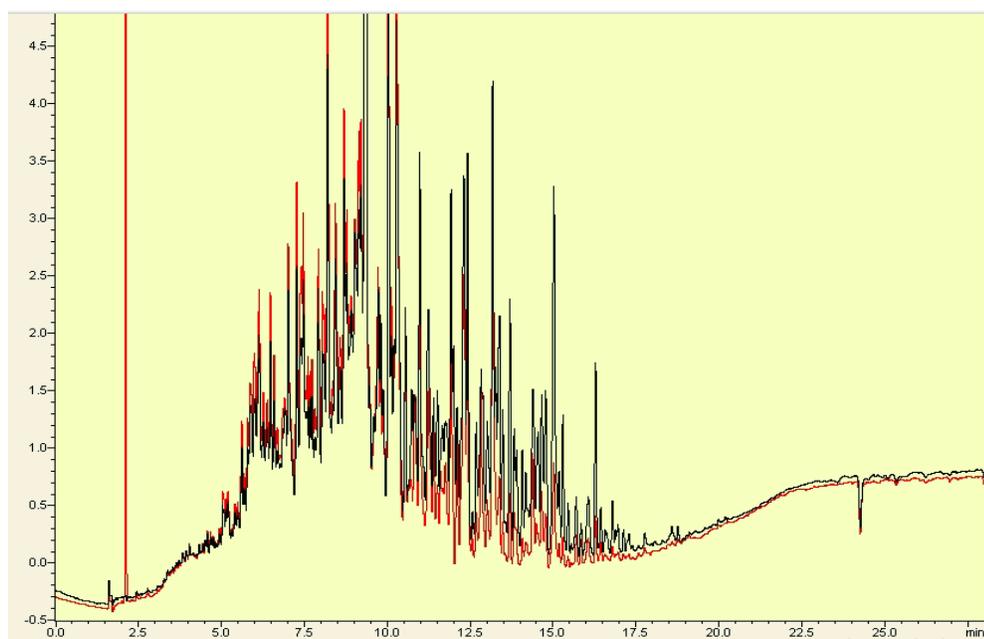


Figura 6. Huella multicomponente correspondiente a cultivos enriquecidos a partir de sedimento, con adición de sedimento estéril con dibromo (Rojo) y sin dibromo (Negro).

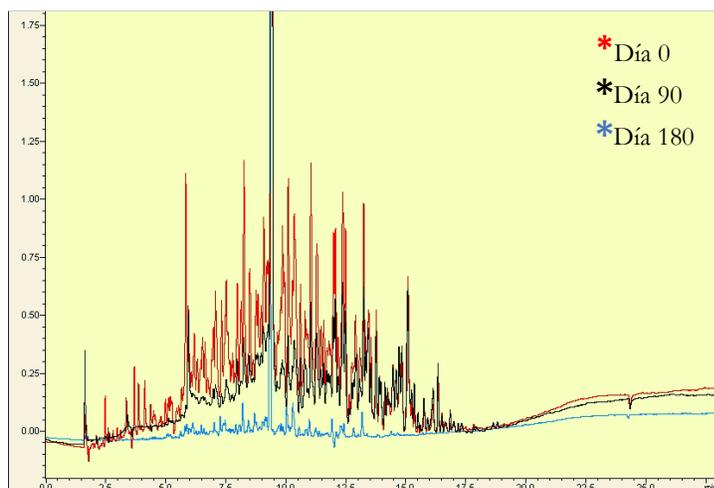


Figura 7. Huella multicomponente correspondiente al tratamiento enriquecido a partir de biosólidos con adición de sedimento estéril en los tres tiempos de muestreo evaluados.

Por su parte, en la figura 8 se presenta la comparación del cultivo inoculado a partir de suelo con y sin adición de dibromo en donde se pretende evidenciar la influencia del trans 1-2 dibromociclohexano en la transformación del toxafeno.

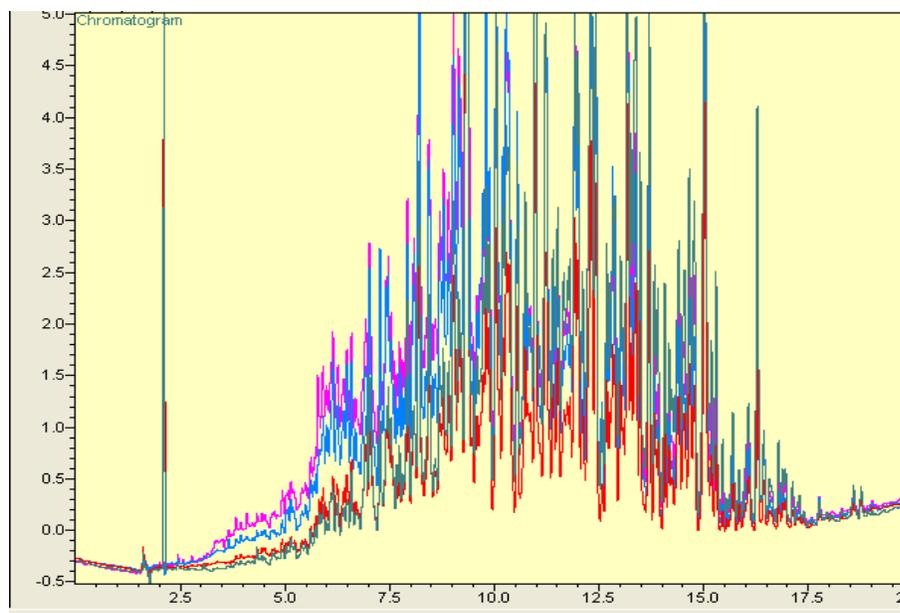


Figura 8. Huella multicomponente del tiempo final correspondiente al tratamiento inoculado a partir de suelo con sedimento estéril sin dibromo (Verde y rojo) y con dibromo (Azul y morado)

Por otro lado, en cuanto a los tratamientos que no tenían adición de sedimento estéril (A) presentaron comportamientos similares por lo que en la figura 9 se presenta la comparación de los tratamientos más significativos en cuanto a la transformación, obteniendo que los picos observados al inicio presentan una disminución considerable en comparación con el control abiótico.

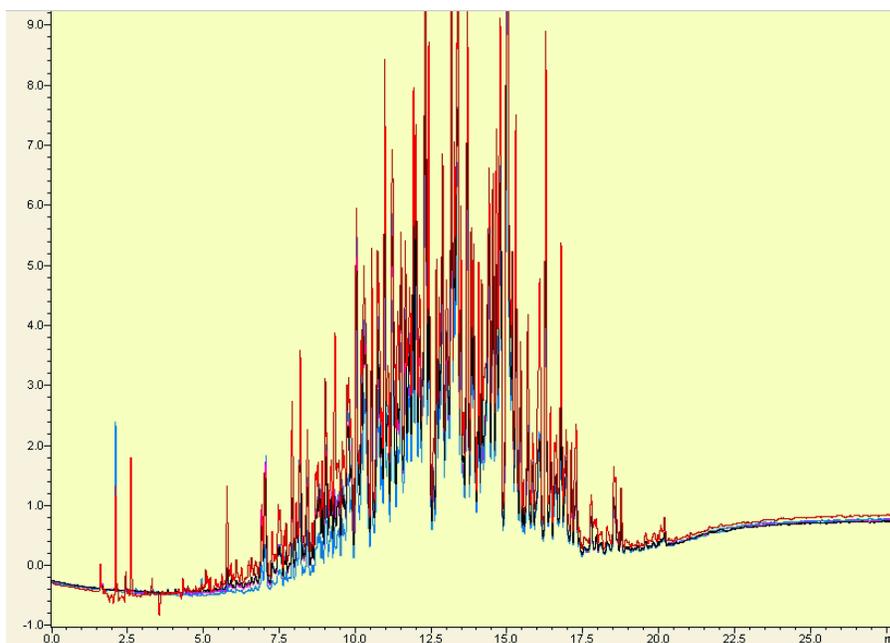


Figura 9. Huella multicomponente del tiempo final correspondiente a los tratamientos: Sedimento (Negro), sediment con dibromo (Azul), Suelo (Morado), suelo con dibromo (Amarillo) y el control abiótico (Rojo).

9. DISCUSIÓN

Los resultados sugieren que todos los tratamientos permitieron la disminución en la concentración de toxafeno (Figura 1). Sin embargo, los tratamientos que sugieren una mayor disminución son en primer lugar, el tratamiento enriquecido a partir de biosólidos, en segundo lugar, el tratamiento enriquecido a partir de sedimento con dibromo y finalmente el tratamiento enriquecido a partir de sedimento; todos estos tratamientos tenían adición de sedimento estéril. Esto coincide con los resultados evidenciados en la figura 7 en donde la adición de sedimento estéril podría influir en la degradación del toxafeno.

Se ha descrito que los microorganismos que llevan a cabo la deshalogenación reductiva provienen de ambientes anaerobios como los sedimentos [9675,83], es por esto que la adición de sedimentos que han sido sometidos a procesos de esterilización pueden llegar a favorecer el

crecimiento, enriquecimiento y mantenimiento de estos microorganismos ya que asemejan las condiciones del hábitat en el que se encuentran las bacterias [97,98].

En este trabajo la mayor transformación del toxafeno se obtuvo en los cultivos que tenían adición de sedimento estéril, esto concuerda con un estudio que pretendía evaluar la degradación de toxafeno mediante la utilización de sedimentos estériles, no estériles y hierro, se obtuvo que la huella cromatográfica del toxafeno presentó cambios representativos debido a la formación de compuestos con tiempos de retención menores que los componentes estándar del toxafeno, esto sugirió que los cambios ocasionados por los sedimentos probablemente fue causado por procesos químicos en lugar de biológicos [35].

Al comparar los tratamientos que presentan mayor disminución en la concentración de toxafeno tanto con adición de sedimento como sin sedimento estéril, se podría indicar que los mejores resultados se obtienen con los tratamientos enriquecidos a partir de biosólidos y sedimento, lo cual coincide con los resultados obtenidos en un estudio realizado anteriormente que pretendía evaluar la capacidad de biodegradación anaeróbica de toxafeno en diferentes matrices [94].

Tanto los biosólidos como los sedimentos pueden actuar como fuente nutricional de nitrógeno, carbono y fósforo promoviendo tanto el aumento de los microorganismos como de la actividad metabólica [99]. Por su parte, el suelo es una matriz que al contener altas cantidades del contaminante organoclorado dificulta que las comunidades microbianas que puedan estar presentes lleven a cabo la transformación del compuesto [98,100] lo cual podría justificar la baja disminución de la concentración del toxafeno a diferencia de los valores obtenidos con los tratamientos que están enriquecidos a partir de biosólidos y sedimentos en el tiempo final del experimento.

Aunque en las figuras 2,3,4 y 5 se observan variaciones en cuanto a la transformación del contaminante también se presenta una alta variabilidad en las réplicas de los tratamientos lo cual puede estar relacionado además de la mezcla compleja que representa el toxafeno, con errores durante el proceso de extracción o por la presencia de metabolitos que pueden alterar las áreas de los cromatogramas. Es por esto que fue necesario recurrir al análisis de las huellas multicomponente obtenidas por cada tratamiento para evaluar con más detalle las transformaciones.

Los procesos de deshalogenación reductiva inician con la degradación de compuestos con mayor cantidad de cloros hasta finalmente utilizar como último recurso compuestos menos clorados [98,101], en las figuras 3, 4 y 5 se evidencia el cambio en la distribución de los perfiles cromatográficos a lo largo del experimento en donde está representada la disminución del área relativa de los últimos picos lo cual está relacionado con compuestos con mayor cantidad de cloros y el aumento en los primeros picos lo cual representa compuestos menos clorados. Este comportamiento sugiere que los procesos de transformación del toxafeno pueden estar asociados con procesos de deshalogenación reductiva.

En el análisis cuantitativo los tratamientos enriquecidos a partir de sedimento con adición de sedimento estéril con dibromo y sin dibromo presentaron comportamientos similares en la transformación del toxafeno, es por esto que para corroborar los resultados se realizó la comparación de las huellas multicomponente de estos tratamientos (figura 6). El tratamiento enriquecido a partir de sedimento con adición de sedimento estéril y dibromo presentó una disminución en los picos ubicados en los últimos tiempos de retención y el aumento en los primeros picos, lo cual es el comportamiento esperado y que también se puede apreciar en las gráficas 3,4, y 5, sin embargo, las concentraciones de toxafeno representadas en la figura 1 sugieren que se obtiene menor disminución con el tratamiento que no tiene adición de dibromo. Teniendo en cuenta lo anterior, estos resultados no permiten determinar la influencia del trans 1-2 dibromociclohexano en la transformación por lo que un análisis estadístico permitiría aclarar estas diferencias.

Además, la huella multicomponente del tiempo final correspondiente al tratamiento inoculado a partir de suelo con sedimento estéril sin dibromo y con dibromo (figura 8) indica una mejor transformación del contaminante en el tratamiento con adición de dibromo. Cabe resaltar que, de todos los cultivos establecidos, este es el único tratamiento con adición de la molécula estimuladora trans 1-2 dibromociclohexano que evidencia una considerable disminución en la concentración. Por otro lado, al evaluar las huellas multicomponente de los tratamientos que no tenían adición de sedimento estéril (figura 9), se observó un comportamiento similar entre los cultivos establecidos, sin embargo, el tratamiento que presentó una mayor transformación del toxafeno fue el inoculado a partir de sedimento con dibromo, aunque hubo transformación esta no es considerablemente mayor que la transformación obtenida con los demás tratamientos establecidos.

La transformación que se presentó en los tratamientos inoculados a partir de suelo con sedimento estéril con dibromo y el inoculado a partir de sedimento con dibromo podría atribuirse a un efecto priming por parte del trans 1-2 dibromociclohexano el cual actúa como estimulante en el proceso de transformación del toxafeno.

Además, en una investigación la influencia del trans 1-2 dibromociclohexano no fue concluyente en cuanto a la transformación del toxafeno, pero permitió la identificación de *Desulfuromonas* en los cultivos enriquecidos, es por esto que en futuras investigaciones el uso de esta molécula podría ser útil para la estimulación de microorganismos que llevan a cabo la deshalogenación reductiva [94].

10. CONCLUSIONES

En este trabajo se evidenció la transformación de toxafeno en todos los tratamientos evaluados bajo condiciones de anaerobiosis, sin embargo, se sugieren como posibles mejores tratamientos los que emplearon como inóculo los biosólidos con la adición de sedimento estéril y sedimento con trans 1-2 dibromociclohexano. Los cultivos enriquecidos a partir de suelos provenientes del municipio de Copey, Cesar no mostraron una diferencia considerable frente a los cultivos con sedimentos y biosólidos, por otra parte, aunque el trans 1-2 dibromociclohexano aparentemente estimuló la transformación del toxafeno tampoco demostró una diferencia considerable frente a los demás tratamientos establecidos, es por esto que para futuros estudios la utilización de la molécula podría ser evaluada para la estimulación y detección de microorganismos implicados en procesos de deshalogenación reductiva.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. García CA, García JC, Vaca ML. Compuestos orgánicos persistentes en Colombia: cuantificación y diagnóstico para pesticidas organoclorados, *Revista Tecnura*, 19(43):157-163,2015. doi: 10.14483/udistrital.jour.tecnura.2015.1.a11
2. Devine G, Furlong M. Insecticide use: contexts and ecological consequences, *Agriculture and Human Values*, (24): 281-306, 2007. Doi: 10.1007/s10460-007-9067-z
3. Mostafalou S, Adbollahi M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives, *Toxicology and Applied Pharmacology*,(1):1-65, 2013. Doi: 10.1016/j.taap.2013.01.025
4. Mahmood I, Imadi SR , Shazadi K, Gul A, Hakeem KR. *Effects of Pesticides on Environment, Plant, Soil and Microbes: Vol. 1 Implications in Crop Science*, 253-269, 2016.
5. Ware G. Toxaphene: chemistry, biochemistry, toxicity and environmental fate, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 118: 2-58, 1990.
6. Gunther FA, Gunther JD. Residue Reviews: Residues of Pesticides and Other Contaminants in the Total Environment, *Springer-Verlag*, 69:87-130, 1978.
7. Vetter W, Luckas B. Theoretical aspects of polychlorinated bornanes and the composition of toxaphene in technical mixtures and environmental samples, *Science of the Total Environment*, 160/161: 505-510, 1995.
8. Vetter W, Oehme M. Toxaphene. Analysis and Environmental Fate of Congeners, *The Handbook of Environmental Chemistry*, 3:1-51, 2000.

9. Bonilla JP, Peinado JE, Urdaneta MA, Carrascal E. Reducción del escurrimiento de plaguicidas al mar Caribe: Informe Nacional, 2000.
10. Vetter W. Toxaphene. Theoretical aspects of the distribution of chlorinated bornanes including symmetrical aspects, *Chemosphere*, 26(6):1079-1084, 1993. doi: 10.1016/0045-6535(93)90196-C.
11. U.S. National Toxicology Program, Report on Carcinogens. Substance profile: Toxaphene CAS No. 8001-35-2, 20:418-421, 2010.
12. Manual de plaguicidas de Centro América. Universidad Nacional de Costa Rica, 2018. URL disponible en: <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/545-toxafeno>
13. Voldner E, Li Y. Global usage of selected persistent organochlorines, *The Science of the Total Environment*, 160/161:201-210, 1995.
14. Repercusiones del uso de los órganoclorados sobre el medio ambiente y salud publica
15. Convenio de Basilea sobre el control de los movimientos transfronterizos de los desechos peligrosos y su eliminación, 1992. URL disponible en: <http://www.basel.int/portals/4/basel%20convention/docs/text/baselconventiontext-s.pdf>
16. Convenio de Rotterdam sobre el procedimiento de consentimiento fundamentado previo aplicable a ciertos plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional, 2004. URL disponible en: https://digitallibrary.un.org/record/738816/files/UNEP_FAO_RC_CRC.8_9_Rev.1-ES.pdf
17. Eliminando los COP del mundo: Guía del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, 2010.
18. Pagina ATSDR
19. Sarria VM, Rodríguez MS, Sánchez NP. Pesticidas obsoletos en Colombia: Situación actual y alternativas de tratamiento y disposición, *Revista de ingeniería – Universidad de los Andes*, 23:13-23, 2006.
20. Lopez A. Biorremediación y fitorremediación en suelos contaminados, 69-101, 2009. URL disponible en: www.analesranf.com/index.php/mono/article/download/598/615
21. Barboa S. Travel report: Bogota and Valledupar, Colombia, from 2 until 9 May 1999, *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, 1999.
22. Nota periodística: La maldición del oro blanco. Colombia: Revista cromos. N° 4217, noviembre 30 de 1999.
23. Inventario de plaguicidas COP, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. 2007.

24. Devine GJ, Eza D, Ogusuku E, Furlong MJ. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25:74-100, 2008. doi: 10.17843/rpmesp.2008.251.1241
25. Resolución defensorial N°011: Uso, almacenamiento y disposición inadecuado de plaguicidas, Colombia, junio 8 de 2001.
26. Islam R, Kumar S, Karmoker J, Kamruzzaman M, Rahman M, Biswas N, Anh T, Mahmudur M. Bioaccumulation and adverse effects of persistent organic pollutants (POPs) on ecosystems and human exposure: A review study on Bangladesh perspectives, *Environmental Technology and Innovation*, 12:115-131, 2018. doi: 10.1016/j.eti.2018.08.002.
27. Ruppe S, Neumann A, Vetter W. Anaerobic transformation of compounds of technical toxaphene. 1. Regiospecific reaction of chlorobornanes with geminal chlorine atoms, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(11): 2614-2621, 2003. doi: 10.1897/02-605.
28. Young JC, Freeman AD, Bruce RM, Williams D, Maruya K. Comparing the mutagenicity of toxaphene after aging in anoxic soils and accumulating in fish, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 162-172, 2009. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.03.018.
29. Ruppe S, Neumann A, Braekevelt E, Tomy G, Stern GA. Anaerobic transformation of compounds of technical toxaphene. 2. Fate of compounds lacking geminal chlorine atoms, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(3): 591-598, 2004. doi: 10.1897/03-221.
30. Carboneras B, Cañizares P, Villaseñor J, Fernandez FJ. Biodegradación aerobia de pesticidas halogenados, *Aguas residuales*, 2016.
31. Arbeli Z. Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): I. El caso de los bifenilos policlorados, *Acta Biológica Colombiana*, 14(1):57-88, 2009. ISSN: 0120-548X.
32. Gracia CA, García JC, Vaca ML. Valoración económica en salud y medio ambiente del control de contaminantes orgánicos persistentes en Colombia, *Revista de Salud Pública*, 17(6):951-960, 2015. Doi: 10.15446/rsapv17n6.51717.
33. Kopytko M, Correa S, Estevez M. Biodegradación estimulada de los suelos contaminados con pesticidas organoclorados, *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(1):119-130, 2017. doi: 10.22490/21456453.1843.
34. Quensen JF, Boyd SA, Tiedje JM. Dechlorination of four commercial polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) by anaerobic microorganisms from sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8): 2360-2369, 1990. Doi: 10.3109/09638288.2015.1064482
35. Khalifa, S, Holmstead, R, Casida J. Toxaphene degradation by Iron (II) protoporphyrin systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 24(2):277-82, 1976. Doi: 10.1021/jf60204a009

36. Saleh M, Turner WV, Casida JE. Polychlorobornane Components of Toxaphene : Structure-Toxicity Relations and Metabolic Reductive Dechlorination, *Science*, 198:1256-1258. doi: 10.1126/science.929197.
37. Harder HW, Carter TV, Bidelman TF. Acute effects os Toxaphene and its sediment-degraded products of estuarine fish, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(12):2119-2125, 2011. doi: 10.1139/f83-246
38. Mamontova EA, Mmamontov AA, Tarasova EN. Ecological and hygienic assessment of the consequences of the pollution with persistent organic compounds of an industrial town (by the example of Usoľ'e-Sibirskoe): I. Atmospheric air, snow, and soil, *Russian Journal of General Chemistry*, 86(13): 2987-2996, 2016. doi: 10.1134/s1070363216130107.
39. Jones KC, Voogt P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science, *Environmental Pollution*, 100:209-221, 1999. doi: 10.1016/S0269-7491(99)00098-6.
40. Vander S, Kucklick J, Laight S, Porter B, Schantz M. Separation of 26 toxaphene congeners and measurement in air particulate matter SRMs compared to technical toxaphene SRM 3067, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397:483-492, 2010. doi: 10.1007/s00216-010-3512-3.
41. de Geus H, Besselink H, Brouwer A, Klungsoyr J, McHugh B, Nixon, E, Rimkus G, Wester P, Boer J. Environmental occurrence, analysis, and toxicology of toxaphene compounds, *Environmental Health Perspectives*, 107:115-144, 1999. doi: 10.1289/ehp.99107s1115
42. Voldner EC, Li YF. Global usage of toxaphene, *Chemosphere*, 27(10):2073-2078, 1993. doi: 10.1016/0045-6535(93)90402-Q.
43. Burniston D, Strachan W, Wilkinson R. Toxaphene deposition to Lake Ontario via precipitation 1994-1998, *Environmental Science and Technology*, 39(18):7005-7011,2005. Doi: 10.1021/es050167y.
44. Muir DC, Swackhamer DL, Bidleman TF, Jantunen LM. Toxaphene in the Great Lakes, *Handbook of Environmental Chemistry*, 5:201-265,2006. Doi:10.1007/698_5_042.
45. Korytar P, Stee L, Leonards P, Boer J, Brinkman U. Attempt to unravel the composition of toxaphene by comprehensive two-dimensional gas chromatography with selective detection. *Journal of Chromatography* (1): 179–189, 2003.
46. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR), Resúmenes de salud pública:Toxafeno. 2014.
47. Betancur B, Peñuela G, Cardona S. Biorremediación de ambientes contaminados con pesticidas: caso DDT, *Gestión y Ambiente*, 16(3):119-135, 2013. doi:10.15446/ga
48. Dudasova H, Laszlova K, Lukacova L, Balacakova M, Murinova S, Dercova K. Bioremediation of PCB-contaminated sediments and evaluation of their pre- and post-treatment ecotoxicity, *Chemical Papers*, 70(8):1049-1058, 2016

49. Muir D, Paul D, Karlsson H, Koczansky K, Stern G, Kannan K, Ludwig J, Reid H, Robertson C. Toxaphene and other persistent organochlorine pesticides in three species of albatrosses from the north and south Pacific Ocean. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(2): 413-423. 2002.
50. Stern G, Muir D, Ford C, Grift N, Dewailly E, Bidleman T, Walla M. Isolation and Identification of Two Major Recalcitrant Toxaphene Congeners in Aquatic Biota, *Environmental Science and Technology*, 26(9): 1838-1840, 1992.
51. Wang S, He J. Phylogenetically Distinct Bacteria Involve Extensive Dechlorination of Aroclor 1260 in Sediment-Free Cultures, *PLoS ONE*, 8(3), 2013.
52. Rose N, Backus S, Karlsson H, Muir D. An Historical Record of Toxaphene and Its Congeners in a Remote Lake in Western Europe, *Environmental Science and Technology*, 35(7):1312-1319, 2001. doi.org/10.1021/es0015895
53. Gandhi N, Bhavsar S, Tang Rex, Drouillard K, Arhonditsis G. Significance of toxaphene in Great Lakes fish consumption advisories, *Journal of Great Lakes Research*, 40(1): 71-79, 2014. Doi: 10.1016/j.jglr.2013.12.017
54. Xia X, Hopke P, Crimmins B, Pagano J, Milligan M, Holsen T. Toxaphene trends in the Great Lakes fish, *Journal of Great Lakes Research*, 38(1): 31-38, 2012. Doi: 10.1016/j.jglr.2011.11.001
55. Muir D, Swackhamer D, Bidleman T, Jantunen L. Toxaphene in the Great Lakes, *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution*, 5: 201-265, 2006. Doi: 10.1007/698_5_042
56. Kidd K. High toxaphene concentrations in fish from a subarctic lake, *Science*, 269: 240-242, 1995.
57. Mehrle P, Finley M, Ludke J, Mayer F, Kaiser T. Bone development in black ducks as affected by dietary toxaphene, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 10(2): 168-173, 1979. Doi: 10.1016/0048-3575(79)90018-X
58. Haseltine S, Finley M, Cromartie E. Reproduction and Residue Accumulation in Black Ducks Fed Toxaphene, *Environmental Contamination and Toxicology*, 471:461-471, 1980
59. Akbar S, Logers L. Effect of the chlorinated hydrocarbon pesticide toxaphene on the utilization of photosynthesis products in susceptible oat, *Biochemical Society Transactions*, 13(1): 236-236, 2015. Doi: 10.1042/bst0130236
60. Arscott G, Michener S, Bills D. Effect of toxaphene on the performance of White Leghorn layers and their progeny, *Poultry science*, 55(3): 1130-1131, 1976. Doi: 10.3382/ps.0551130

61. J Cavanagh, Fisher P. Persistent organic pollutants in Australian harriers from New Zealand, *Australasian Bulletin of Ecotoxicology & Environmental Chemistry*, 2:16-34, 2015.
62. Bunge M, Adrian L, Kraus A, Opel M, Lorenz, W, Andreesen J, Gorisch H, Lechner U. Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium, *Nature*, 421:357-360, 2003. Doi: 10.1038/nature01237.
63. U.S. National Toxicology Program, Report on Carcinogens. Substance profile: Toxaphene CAS No. 8001-35-2, 20:418-421, 2010.
64. Bonilla JP, Peinado JE, Urdaneta MA, Carrascal E. Reducción del escurrimiento de plaguicidas al mar Caribe: Informe Nacional, 2000.
65. Kerger B, Bogen K, Loccisano A, Lamb J. Liver tumor potency indicators for technical toxaphene and congeners simulating weathered toxaphene, *Human and Ecological Risk Assessment*, 3(24): 830-846, 2018. Doi: 10.1080/10807039.2017.1401450
66. Kerger B, Bogen K, Loccisano A, Lamb J. Proposed reference dose for toxaphene carcinogenicity based on constitutive androstane receptor-mediated mode of action, *Human and Ecological Risk Assessment*, 24(5): 1160-1180, 2018. Doi: 10.1080/10807039.2017.
67. Lacayo M. Microbial degradation of toxaphene, Lund University, Junio 2005.
68. Groves, F, Brady B, Knopf, F. State of the art on the supercritical extraction of organics from hazardous wastes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 15(3):237-274, 1985.
69. Paulaitis M. Separation processes utilizing supercritical fluids. *Corn Refiners Association*, 1:168-197, 1982,
70. Arbeli Z. Biodegradation Of Persistent Organic Pollutants (POPs): I The Case Of Polychlorinated Biphenyls (PCB), *Acta Biológica Colombiana*, 14(1):56-86, 2009. ISSN: 1900-1649
71. Arbeli Z, Fuentes C. Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension, *Crop Protection*, 26(12):1733-1746, 2007. Doi: 10.1016/j.cropro.2007.03.009
72. Prada M, Cardona S, Loaiza J. Anaerobic biodegradation of DDT in contaminated soil by biostimulation: laboratory and pilot-scale studies, *AUC Geographica*, 52(2):199-207, 2017. Doi: 10.14712/23361980.2017.16
73. Arias V, Rodriguez A, Pinilla P, Bardos P. Contaminated land in Colombia: A critical review of current status and future approach for the management of contaminated sites, *Science of the Total Environment*, 618:199-209, 2018. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.245
74. Lovley D. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nature Reviews Microbiology*. 1:35-44, 2003.

75. Leys D, Adrian L, Smidt H. Organohalide respiration: Microbes breathing chlorinated molecules, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(16): 1-10, 2013. Doi: 10.1098/rstb.2012.0316
76. Luo J, Hu J, Wei X, Fu L & Li L. Dehalogenation of persistent halogenated organic compounds: A review of computational studies and quantitative structure–property relationships. *Chemosphere*. 131: 17-33, 2015.
77. Schubert T, Adrian L, Sawers R, Diekert G. Organohalide respiratory chains: Composition, topology and key enzymes, *FEMS Microbiology Ecology*, 365(6): 1-17, 2018. Doi: 10.1093/femsec/fiy035
78. Burns R G & Dick R P. Enzymes in the environment: Activity, ecology, and applications; NewYork; Capitulo 18; P 447- 481, 2002.
79. Wiegel J y Wu Q. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 1-15, 2000.
80. Bedard D. A Case Study for Microbial Biodegradation: Anaerobic Bacterial Reductive Dechlorination of Polychlorinated Biphenyls—From Sediment to Defined Medium, *Annual Review of Microbiology*, 62(1): 253-270, 2008. Doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162733
81. Devine GJ, Eza D, Ogusuku E, Furlong MJ. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25:74-100, 2008. doi: 10.17843/rpmesp.2008.251.1241
82. Stern G, Mulr D, Ford C, Bidleman F, Walla D. Isolation and Identification of Two Major Recalcitrant Toxaphene Congeners in Aquatic Biota, *Environmental Science and Technology*, 26(9): 1838-1840, 1992. Doi: 10.1021/es00033a020
83. Hug L, Maphosa F, Leys D, Löffler E, Smidt H, Edwards E, Adrian L. Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases, *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 368:1-10. 2008 Doi: 10.1098/rstb.2012.0322
84. Waller AS, Krajmalnik-Brown R, Löffler FE, Edwards EA. Multiple reductive-dehalogenase-homologous genes are simultaneously transcribed during dechlorination by Dehalococcoides-containing cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2):8257-8264,2005.
85. Schlötelburg C, von Wintzingerode C, Hauck R, von Wintzingerode F, Hegemann W, Göbel UB. Microbial structure of an anaerobic bioreactor population that continuously dechlorinates 1, 2-dichloropropane. *FEMS microbiology ecology*. 39(3):229-237, 2002.
86. Jugder BE, Ertan H, Lee M, Manefield M, Marquis CP. Reductive dehalogenases come of age in biological destruction of organohalides. *Trends in biotechnology*, 33(10):595-610, 2015.

87. VanDort H, Smullen L, May R, y Bedard D. Priming microbial meta-dechlorination of polychlorinated biphenyls that have persisted in Housatonic river sediments for decades. *Environmental Science & Technology*. 31: 3300-3307, 1999.
88. Fu S, Barkovskii A y Adriens P. Microbial dechlorination of dioxins in estuarine enrichment cultures: effects of respiratory conditions and priming compound on community structure and dechlorination patterns. *Marine Environmental Research*, 59: 177-195, 2005.
89. Bedard D, Bailey J, Reiss B y Van Slyke G. Development and characterization of stable sediment-free anaerobic bacteria enrichment cultures that dechlorinate Aroclor 1260. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (4):2469-2470, 2006
90. Deweerdt K y Bedard D. Use of halogenated benzoates and other halogenated aromatic compounds to stimulate the microbial dechlorination of PCBs. *Environmental science and technology*, 33: 2057-2063. 1999
91. Bedard D, Van Dort H y Deweerdt K. Brominated biphenyls prime extensive microbial reductive dehalogenation of Aroclor 1260 in Housatonic river sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (5):1786-1795, 1998
92. Bedard D, Bunnell S, Smullen L. Stimulation of microbial para-dechlorination of polychlorinated biphenyls that have persisted in Housatonic River sediment for decades. *Environmental Science & Technology*. 30(2):687-694, 1996.
93. Rojas MA, Biodegradación anaeróbica de toxafeno en suelos contaminados del municipio de el copey, Pontificia Univerisdad Javeriana, enero 2016.
94. Casallas CC, Evaluación de la biodegradación anaeróbica de toxafeno por cultivos enriquecidos a partir de sedimentos del río bogotá, biosólidos y suelo contaminado, Pontificia Univerisdad Javeriana, enero 2016.
95. Rojas V, Biodegradación anaeróbica de toxafeno por cultivos de enriquecimiento a partir de sedimentos del río bogotá, biosólidos y suelo contaminado. ii: evaluación de los cultivos despues del primer pase, Pontificia Univerisdad Javeriana, 2017.
96. Vetter W, Oehme M. Toxaphene . Analysis and Environmental Fate of Congeners, *The Handbook of Environmental Chemistry*, (3):237-287, 2000.
97. Zhou J, Bruns M, Tiedje J. DNA recovery from soils of diverse composition, *applied and environmental microbiology*, 62(2):316-322, 1996.
98. Morillo V, Salazar A, Marquez M, Morales A. Magnetotactic Bacteria Samples Enrichment For Synthesis Of Biogenic Nanomagnetite, *Scientia et Technica*, (36):449-454.
99. Pawlett M., . Deeks L., Sakrabani R, Nutrient potential of biosolids and urea derived organo-mineral fertilisers in a field scale experiment using ryegrass (*Lolium perenne* L.), *Field Crops Research*, 175: 56–63, 2015.

100. Morillo E, Villaverde J; Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils, *Science of the Total Environment* (586):576–597, 2017.
101. Law R, Herzke D , Harrad S , Morris S, Bersuder P. Allchin C, Levels and trends of HBCD and BDEs in the European and Asian environments, with some information for other BFRs, *Chemosphere* (73):223–241, 2008.

12. ANEXOS

1. Preparación del medio de cultivo

El medio mineral para anaerobios tiene la siguiente composición (gramos por litro):

Compuesto	Cantidad
K ₂ HPO ₄	0,2
NaCl	1
NH ₄ Cl	0,27
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,41
KCl	0,52
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,15
Extracto de levadura	1
Cisteína - HCl	0,5
Solución de elementos traza	1 ml
Resazurina	1 ml

Luego de pesar cada compuesto se adicionará la cantidad requerida de elementos traza y se completará el volumen a 1000 ml con agua destilada, después se adicionará NaOH para ajustar el pH a un valor de 6.8. Una vez estabilizado el valor del pH se adiciona la resazurina (color rosado), se realiza una marca a la altura de el volumen, después se adicionan 20 ml de agua destilada posteriormente el medio se somete a ebullición hasta observar el cambio de color rosado a transparente y recuperar el volumen inicial del medio.

El medio se esteriliza mediante autoclave, una vez frio se adicionan 2.5 g/L de bicarbonato de sodio (NaHCO₃), 0,4 ml de la solución de vitaminas, 1 ml de la solución de selenito y tungstato y 10 ml de la solución de piruvato, lactato y formato.

Para mantener las condiciones de anaerobiosis debe mantenerse el flujo constante de Nitrógeno.

2. Composición de la solución de vitaminas (mg/L):

Vitamina	Cantidad
Ácido fólico	20
Piridoxina	100
Rivoflabina	50
Biotina	20
Tiamina	50
Ácido nicótico	50
Ácido pantotéico	50
Ácido amino p-benzoico	50
Ácido tiótico	50

3. Composición de la solución de selenito y tungstato (mg/L):

Compuesto	Cantidad
NaOH	500
Na ₂ SeO ₃ *5H ₂ O	3
Na ₂ WO ₄ *2H ₂ O	4

4. Composición de la solución de elementos traza – SL9 (por un litro)

Compuesto	Cantidad
Ácido nitroloacético	12,8 g
FeCl ₂ *4H ₂ O	2 g
COCl ₂ *6H ₂ O	190 mg
MnCl ₂ *2H ₂ O	100 mg
ZnCl ₂	70 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
NiCl ₂ *6H ₂ O	24 mg
CuCl ₂ *2H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	36 mg

5. Curva patrón para la cuantificación de toxafeno

