



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SEGUIMIENTO DE LA REMOCIÓN DE  
PLAGUICIDAS EN UN REACTOR  
ANAEROBIO/AEROBIO A TRAVÉS DEL USO DE UN  
BIOMARCADOR**

**T E S I S**

**PRESENTA**

**JAZMÍN ALHELÍ AGUILAR TORREJÓN**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**DIRIGIDA POR**

**DR. JUAN CARLOS SÁNCHEZ MEZA  
M. EN I. VICTOR FRANCISCO PACHECO SALAZAR**



**Toluca, Estado de México 2013**

Este trabajo va dedicado  
A Carlos, Claudia, Laura y Carlos  
por el apoyo incondicional durante toda la vida, ¡mil gracias!

A Juan Rojas, por tus siempre buenas ideas y apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Maestra Lidia Sandoval Flores por todo el apoyo, cariño, aprecio y enseñanza para conmigo y el trabajo.

A la Doctora Araceli Amaya Chávez por su apoyo, paciencia y enseñanza.

A las técnicas laboratoristas Patricia, Silvia e Isabel por las facilidades en los laboratorios y sus buenos consejos.

A mis amigas Tere, Miriam, Gaby, Isa por hacer más agradable este recorrido, sus buenas ideas y consejos.

A todos los involucrados en este proceso de desarrollo académico y personal.

El presente trabajo se desarrolló en las instalaciones de la Facultad de Química en los laboratorios 7 y 9 correspondientes a los departamentos de Toxicología y Microbiología respectivamente bajo la supervisión y asesoría del Dr. Juan Carlos Sánchez Meza, M en I. Víctor Francisco Pacheco Salazar, M. en S.P. Sergio Humberto Pavón Romero y la M. en S.H.O. Lidia Sandoval Flores.

El proyecto se llevó a cabo a través del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Ambientales de la Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México bajo el No de registro MACIAS-0111. Con el apoyo de beca nacional CONACYT con número de becario 248401

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Aplicaciones de biorremediación utilizando células o enzimas inmovilizadas .....	7
Tabla 2. procedimiento para la determinación de la inhibición de la actividad colinesterásica.....	28
Tabla 3. Procedimiento para la determinación de la inhibición de la actividad colinesterásica.....	29
Tabla 4. Componentes de los reactores R1 y R2.....	31
Tabla 5. Determinaciones fisicoquímicas monitoreadas en los reactores .....	5
Tabla 6. Información general de la identificación de cepas del consorcio microbiano anaerobio/aerobio aislado de la presa Tecualoyan .....	39
Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas e inhibición de la actividad colinesterásica para las muestras de agua y sedimentos .....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Formación de biopelículas .....	5
Figura 2. Esquema de degradación de un proceso anaeróbico .....	9
Figura 3. Diagrama de transporte de plaguicidas en el ambiente. ....	12
Figura 4. Mecanismo de reacción para el método de Ellman.....	17
Figura 5. Esquema del reactor anaerobio/aerobio .....	31
Figura 6. Vista general de la presa Tecualoyan .....	36
Figura 7. Suelo con coloraciones ocres y rosadas en la entrada de la presa Tecualoyan .....	36
Figura 8. Suelo con coloración ocre en el ingreso de la presa Tecualoyan .....	36
Figura 9. Acercamiento del suelo para observar detalladamente la coloración ....	36
Figura 10. Vista general del cuerpo de agua A .....	36
Figura 11. Vista general del cuerpo de agua B. ....	36
Figura 12. Mapa que referencia geográficamente la zona de estudio.....	37
Figura 13. Curvas control del biomarcador para los plaguicidas metomilo (CA), dimetoato (OF) y la mezcla de ambos.....	41
Figura 14. Degradación del plaguicida metomilo con respecto al tiempo en presencia y ausencia de fotólisis. ....	42
Figura 15. Degradación del plaguicida dimetoato con respecto al tiempo en presencia y ausencia de fotólisis .....	43

## ÍNDICE.

Resumen .....	1
Abstract .....	2
I. GENERALIDADES .....	3
1. MARCO TEÓRICO .....	4
1.1 Reactores en el tratamiento de aguas contaminadas .....	4
1.1.2 Reactores con la biomasa unida a un soporte .....	4
1.1.2.1 Inmovilización pasiva de microorganismos. ....	4
1.1.2.2 Biodiscos (ARBC). ....	5
1.1.2.3 Reactores de contacto con soporte (CASBER). ....	6
1.1.2.4 Reactores de lecho fluido y lecho expandido (FB/EB). ....	6
1.1.2.5 Reactores de lecho fijo. ....	6
1.1.2.6 Filtros anaerobios (AF). ....	7
1.1.3. Descripción de los procesos microbianos que suceden en reactores. ....	8
1.1.3.1. Hidrólisis .....	8
1.1.3.2. Fermentación .....	8
1.1.3.3. Metanogénesis. ....	9
1.1.4. Factores ambientales que influyen en los procesos anaerobios. ....	10
1.2. Plaguicidas. ....	10
1.2.1 Factores que determinan el comportamiento de los plaguicidas en el ambiente. ....	11
1.2.2 Efectos ecológicos de los plaguicidas en el agua. ....	12
1.2.3 Comportamiento de los microorganismos frente a los plaguicidas. ....	13
1.3 Biomarcadores en la determinación de la presencia de plaguicidas organofosforados y carbamatos en suelo y agua. ....	14
1.3.1. Uso de biomarcadores. ....	15
1.3.2. Biomarcadores en la exposición a plaguicidas organofosforados y carbámicos. ....	15
1.4 Antecedentes. ....	17
1.5 Planteamiento del problema. ....	19
1.6 Justificación. ....	21
1.7 Hipótesis. ....	22
1.8 Objetivos. ....	22
1.8.1. Objetivo General. ....	22
1.8.2. Objetivos específicos. ....	22
II. METODOLOGÍA .....	23
2.1 Diagrama de bloques de la metodología aplicada. ....	24
2.2 Descripción de la metodología. ....	25
2.2.1. Etapa I: Pre-análisis. ....	25
2.2.2. Etapa II: Determinación de la presencia de plaguicidas. ....	27



2.2.3. Etapa III: Remoción de la mezcla de plaguicidas en el reactor anaerobio/aerobio.....	30
III. RESULTADOS.....	33
3.1 Resultados de la Etapa I: Pre-análisis.....	34
3.2 Resultados de la Etapa II: Determinación de la presencia de plaguicidas.....	40
3.3 Etapa III. Remoción de la mezcla de plaguicidas en el reactor anaerobio/aerobio. ....	43
IV. DISCUSIÓN.....	59
4.1 Discusión general.....	60
V. CONCLUSIONES.....	62
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	64

## RESUMEN.

El municipio de Villa Guerrero en el Estado de México forma parte del denominado “corredor florícola”, para poder cubrir los grandes volúmenes de producción de flor de corte los productores han implementado el uso de diversos agroquímicos para favorecer el crecimiento de las plantas y disminuir el de las plagas, sin embargo, el entorno está sufriendo alteraciones en su ecosistema producto de los residuos que se generan al utilizar estos productos químicos.

En el presente trabajo de investigación se seleccionó una zona del municipio de Villa Guerrero correspondiente a la cuenca hidrográfica del Calderón por las características geográficas que presentaba además de la acumulación de invernaderos cerca de cuerpos de agua representativos siendo el más importante la Presa Tecualoyan.

Por lo anterior, se propuso el estudio de la degradación de mezclas de plaguicidas a través de técnicas amigables con el ambiente como la bioremediación, para lo cual se establecieron los objetivos de construcción de un reactor anaerobio/aerobio para llevar a cabo la remoción de dos plaguicidas representativos de las familias de los organofosforados y carbamatos con un consorcio microbiano aislado de la Presa Tecualoyan capaz de utilizar estos compuestos como única fuente de energía, el monitoreo incluyó los parámetros fisicoquímicos de temperatura, pH y conductividad eléctrica además de el seguimiento de la remoción a través de un biomarcador, herramienta capaz de detectar bajas concentraciones de estos tipos de plaguicidas a través de la inhibición de la actividad colinesterásica.

Los resultados obtenidos mostraron que el consorcio microbiano constituido por dieciséis cepas bacterianas de los géneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Deinococcus* es capaz de utilizar una mezcla de dimetoato y metomilo (plaguicida organofosforado y carbámico respectivamente) en concentración de 1 mg/mL en un reactor con sistema tipo batch. El biomarcador demostró ser una herramienta útil en el seguimiento de la biotransformación de estos compuestos tanto en muestras ambientales como en el monitoreo de la remoción de los plaguicidas, además de mostrar el incremento en la inhibición de la actividad colinesterásica cuando estos compuestos se encuentran en mezcla.

El porcentaje de remoción obtenido de la mezcla de dimetoato con metomilo fue de 70 % en un periodo de 120 horas; de las dieciséis cepas bacterianas únicamente siete se recuperaron de manera constante durante el monitoreo, sin embargo, es necesario mejorar las condiciones de eficiencia del reactor así como determinar si los metabolitos generados son menos tóxicos que las moléculas originales.

## **ABSTRACT.**

The municipality of Villa Guerrero in the Estado de México as part of the "corridor floriculture", in order to cover the high volume production of cut flower producers have implemented the use of various chemicals to promote plant growth and reduce pests, however, the environment is suffering alterations in the ecosystem waste product generated when using these chemicals compounds.

In the present research we selected an area of the municipality of Villa Guerrero corresponding to the watershed of Calderon presenting geographic features in addition to the accumulation of greenhouse near water bodies representing the most important Tecualoyan Dam.

Therefore, it was proposed to study the degradation of pesticide mixtures through environmentally friendly techniques such as bioremediation, which is established for the purposes of construction of a reactor anaerobic / aerobic to carry out the removal of two pesticides; with a microbial consortium isolated Dam Tecualoyan able to use these compounds as sole source of energy, monitoring physicochemical parameters included temperature, pH and electrical conductivity in addition to monitoring the removal through a biomarker tool capable of detecting low concentrations of these types of pesticides through inhibition of cholinesterase activity.

The results showed that the sixteen microbial consortium comprising bacterial strains of the genera *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* and *Deinococcus* is able to use a mixture of dimethoate and methomyl (organophosphate pesticide and carbamic respectively) at a concentration of 1 mg / mL in one batch type reactor system. The biomarker proved to be a useful tool in monitoring the biotransformation of these compounds in environmental samples such as in monitoring the removal of pesticides, and shows the increase in inhibition of cholinesterase activity when these compounds are in mixture . The removal percentage obtained from the mixture of dimethoate with methomyl was 70 % in a period of 120 hours, of the sixteen only seven bacterial strains recovered steadily during monitoring, however, is necessary to improve efficiency conditions reactor and to determine whether the metabolites generated are less toxic than the original molecules.

# **I. GENERALIDADES**

## **1. MARCO TEÓRICO.**

### **1.1 Reactores en el tratamiento de aguas contaminadas.**

Los reactores biológicos utilizados para el tratamiento de aguas residuales pueden ser divididos en dos grandes grupos en base a tipo de crecimiento microbiano:

1. de lecho fijo, formando biopelículas,
2. de crecimiento libre o suspendido.

En los primeros la biomasa está constituida por bacterias formando una película sobre un soporte inerte, mientras que los segundos dependen de que los microorganismos formen gránulos o flóculos en el reactor. Las bacterias que crecen en suspensión deben de formar estructuras que las permitan permanecer en el reactor y no ser lavadas con el efluente, y la eficiencia del proceso depende en buena parte de la capacidad del inóculo (lodos/residuos) para formarlas.

#### **1.1.2 Reactores con la biomasa unida a un soporte**

En ellos la biomasa se encuentra inmovilizada en, o alrededor de, partículas o superficies inertes formando biopelículas. Dependiendo de la forma en que se induce la inmovilización, esta se clasifica en: inmovilización pasiva e inmovilización activa. Siendo de interés para el presente proyecto los reactores de lecho fijo que forman biopelículas por inmovilización, se detallarán a continuación.

##### **1.1.2.1 Inmovilización pasiva de microorganismos.**

Algunos microorganismos de forma natural tienden a formar aglomerados o unirse a superficies y crecer en ellas. Esta interacción con superficies puede darse por la presencia de estructuras celulares como la cápsula y las fimbrias en el caso de las bacterias, y en el caso de los hongos sus propias hifas (Garzón y Barragán 2008).

Durante la inmovilización pasiva puede darse un proceso de formación de biofilms el cual tan solo de un 15 – 25% corresponde a células vivas. El porcentaje restante esta compuesto por agua en su mayoría, exopolisacáridos (EPS), proteínas y ácidos nucleicos; estos 3 últimos compuestos son conocidos como sustancias poliméricas extracelulares (SPE). Son complejas estructuras, con sistemas de canales de agua y aireación, los cuales permiten el transporte de nutrientes, desechos, oxígeno, y agua, entre otros. Gracias a estos canales se generan diferentes gradientes de tensión de pH y oxígeno, lo cual permite que se desarrollen micronichos y diversos grupos bacterianos (Korkoutas *et al.*, 2004).

La formación de la biopelícula se da en 4 pasos principalmente (ver Figura 1). Durante el primer paso, las células perciben una superficie de adherencia y forman una unión activa reversible por medio de fimbrias, apéndices, pilis, o proteínas de superficie. Durante la segunda fase se produce un incremento de la biomasa celular, formando microcolonias alrededor del área de adherencia, así como la formación de EPS permitiendo que sea una unión irreversible. La composición del exopolisacárido puede variar según el tipo de microorganismo o las condiciones ambientales, los principales componentes son alginato, N-acetil-glucosa-mina, glucosa, y galactosa. Durante el tercer paso, la biopelícula crece y madura, permitiendo la adhesión de nuevas colonias bacterianas. Luego de la maduración, se da el último paso, en el cual células individuales o conglomerados se desprenden de la biopelícula por erosión, abrasión o separación para formar nuevos conglomerados. (Nazar, J., 2007)

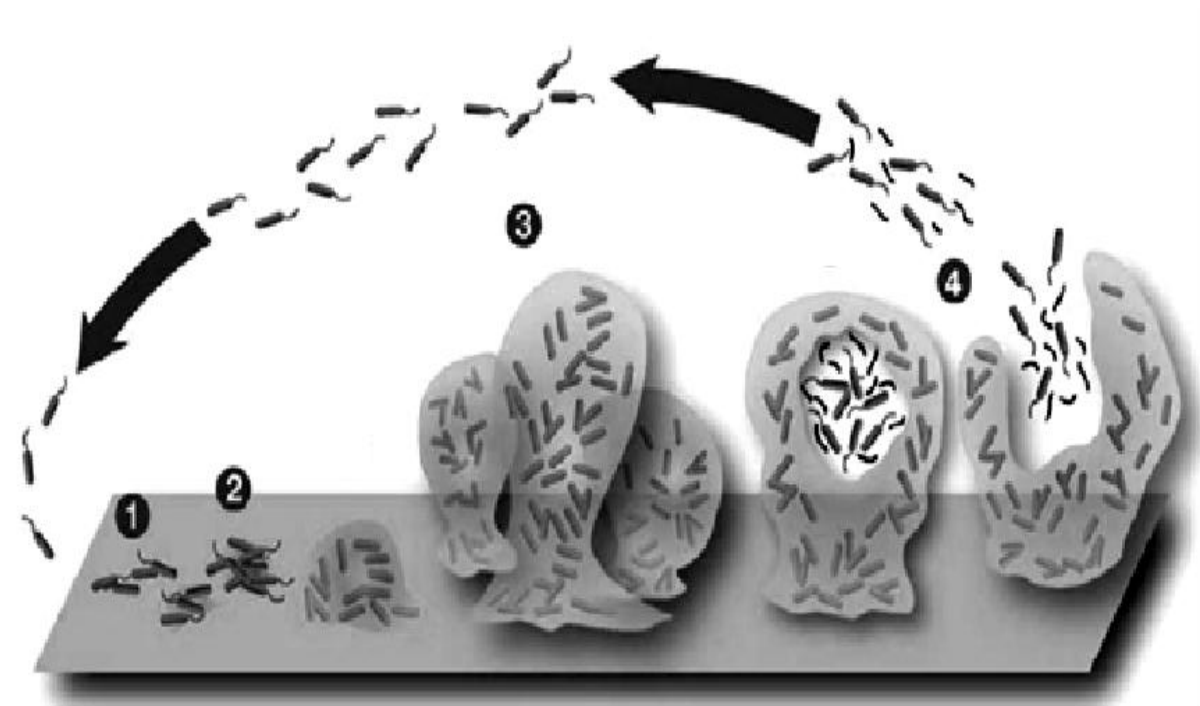


Figura 1. Formación de biopelículas. Fuente: Garzón y Barragán 2008.

#### 1.1.2.2 Biodiscos (ARBC).

En los RBC los microorganismos están unidos a un soporte ligero formando una película. El soporte, constituido por una serie de discos paralelos, se encuentra casi totalmente sumergido y gira lentamente sobre un eje horizontal dentro del tanque cerrado por el que fluye el medio a tratar.

### **1.1.2.3 Reactores de contacto con soporte (CASBER).**

Estos reactores son, en esencia, idénticos a los sistemas de contacto pero con la incorporación de un medio inerte en el reactor. La cantidad de material soporte es pequeña, sus dimensiones también lo son y tienen baja velocidad de sedimentación.

### **1.1.2.4 Reactores de lecho fluido y lecho expandido (FB/EB).**

Técnicamente, un reactor FEB es una estructura cilíndrica, empaquetada hasta un 10% del volumen del reactor con un soporte inerte de pequeño tamaño lo que permite la acumulación de elevadas concentraciones de biomasa que forman películas alrededor de dichas partículas. La expansión del lecho tiene lugar gracias al flujo vertical generado por un elevado grado de recirculación. La velocidad ascensional es tal que el lecho se expande hasta un punto en el que la fuerza gravitacional de descenso es igual a la de fricción por arrastre.

### **1.1.2.5 Reactores de lecho fijo.**

En general el uso de biocatalizadores inmovilizados permite que un proceso continuo sea posible. Los procesos de biorremediación en multietapas basados en la inmovilización de células con crecimiento estable ofrecen una alternativa atractiva. De esta manera se permite la utilización de cepas o consorcios microbianos en sistema de reactor bajo condiciones controladas. La biomasa inmovilizada es de especial interés para el tratamiento de residuos peligrosos y consiste en dos etapas: en la primera se cultivan los microorganismos hasta tener una población densa y en la segunda etapa, los microorganismos son utilizados para aumentar la velocidad de degradación (Yañez-Ocampo *et al.*, 2008).

Los procesos de tratamiento, son más eficientes con respecto a las células en suspensión, ya que permiten altas concentraciones celulares/g de soporte y se reutiliza la biomasa, entre otros. Los microorganismos inmovilizados con la formación de biopelícula en soportes porosos, toleran concentraciones altas de compuestos tóxicos (Yañez-Ocampo *et al.*, 2007).

Algunas aplicaciones de biorremediación utilizando la inmovilización celular o de enzimas se aprecian en la Tabla 1.

Tabla 1. Aplicaciones de biorremediación utilizando células o enzimas inmovilizadas

APLICACIÓN	MATRIZ/SISTEMA BIOLÓGICO	OBSERVACIONES	REFERENCIA
Biodegradación de paraoxon y diclorvos	Silica-silicon y poliuretano, inmovilización de la enzima FTE	41-71% actividad enzimática 18-41% de pérdida de actividad	Gill y Ballesteros 2000
Remoción de propachlor	Sepiolita granular (material de cerámica). Inmovilización de una cepa de <i>Pseudomonas</i>	98% remoción 39% adsorción del propachlor en la cerámica	Martín <i>et al.</i> 2000
Biodegradación de paraoxon	Fusión de proteínas a la celulosa. Inmovilización de la FTE	85% de actividad 100% de hidrólisis en 45 días	Richins <i>et al.</i> 2000
Hidrólisis de paraoxon	Unión covalente de la FTE y encapsulación con Polietilenglicol hydrogel	80% de actividad en 80 días	Andreopoulos <i>et al.</i> 1999
Detoxificación de paraoxon, diazinon, paratión metílico, por separado	Material de tejido sintético (polyester, polipropileno). Inmovilización de <i>E. coli</i> GM	100% de hidrólisis. Reutilización por 12 ciclos	Mulchandani <i>et al.</i> 1999

Fuente: Jin-Woo *et al.* 2002, tomado de: Yañez- Ocampo *et al.*, 2008.

#### 1.1.2.6 Filtros anaerobios (AF).

La biomasa se encuentra unida a un medio inerte o atrapada en él a través de la inmovilización pasiva de las células. El afluente atraviesa el reactor con flujo vertical, bien ascendente o descendente. El tamaño de dichas partículas es relativamente grande y su tasa de colonización por parte de las bacterias depende de la rugosidad, porosidad, tamaño de poro, etc.

Los materiales utilizados suelen ser plásticos, piedras y arcillas, sobre este material de relleno crece una población bacteriana que degrada la DBO soluble del afluente, dando como resultado un efluente clarificado con una menor carga orgánica. Sus principales ventajas son su fácil operación y mantenimiento, consumo energético nulo, no requiere personal especializado para su mantenimiento y presenta una eficacia de remoción de alrededor del 80% (Gallego *et al.*, 2008).



### **1.1.3 Descripción de los procesos microbianos que suceden en reactores.**

En los procesos anaerobios existen tres pasos básicos involucrados en la oxidación anaeróbica de los desechos que son:

1. hidrólisis
2. fermentación, también conocida como acidogénesis
3. metanogénesis.

Estos tres pasos se ilustran en la Figura 2. El punto de inicio del esquema para aplicaciones particulares depende de la naturaleza del residuo que se desee tratar.

#### **1.1.3.1 Hidrólisis**

El primer paso para la mayoría de los procesos fermentativos se denomina hidrólisis. Partículas del material se convierten en compuestos solubles que se hidrolizan hasta llegar a simples monómeros. Estos monómeros son utilizados por las bacterias que llevan a cabo la fermentación. Microorganismos específicos producen algunas enzimas (proteasas, lipasas etc.) capaces de hidrolizar macromoléculas o polímeros (proteínas, lípidos, polisacáridos) para convertirlas en moléculas simples (aminoácidos, ácidos grasos, glicerol, alcoholes, etc.) (Nègre y Jonnson 2010).

#### **1.1.3.2 Fermentación**

El segundo paso es la fermentación, en este proceso los aminoácidos, carbohidratos y algunos ácidos grasos son degradados (ver Fig. 2). Los sustratos orgánicos sirven al mismo tiempo como donadores y aceptores de electrones. Los principales productos de fermentación son acetato, hidrógeno, CO<sub>2</sub>, propionato y butirato. El propionato y butirato y una gran parte de los ácidos grasos volátiles y los alcoholes son asimilados por bacterias acetogénicas para producir hidrógeno, CO<sub>2</sub> y acetato. Este paso es conocido como acetogénesis, como consecuencia los productos finales de la fermentación son precursores del metano (metanogénesis).

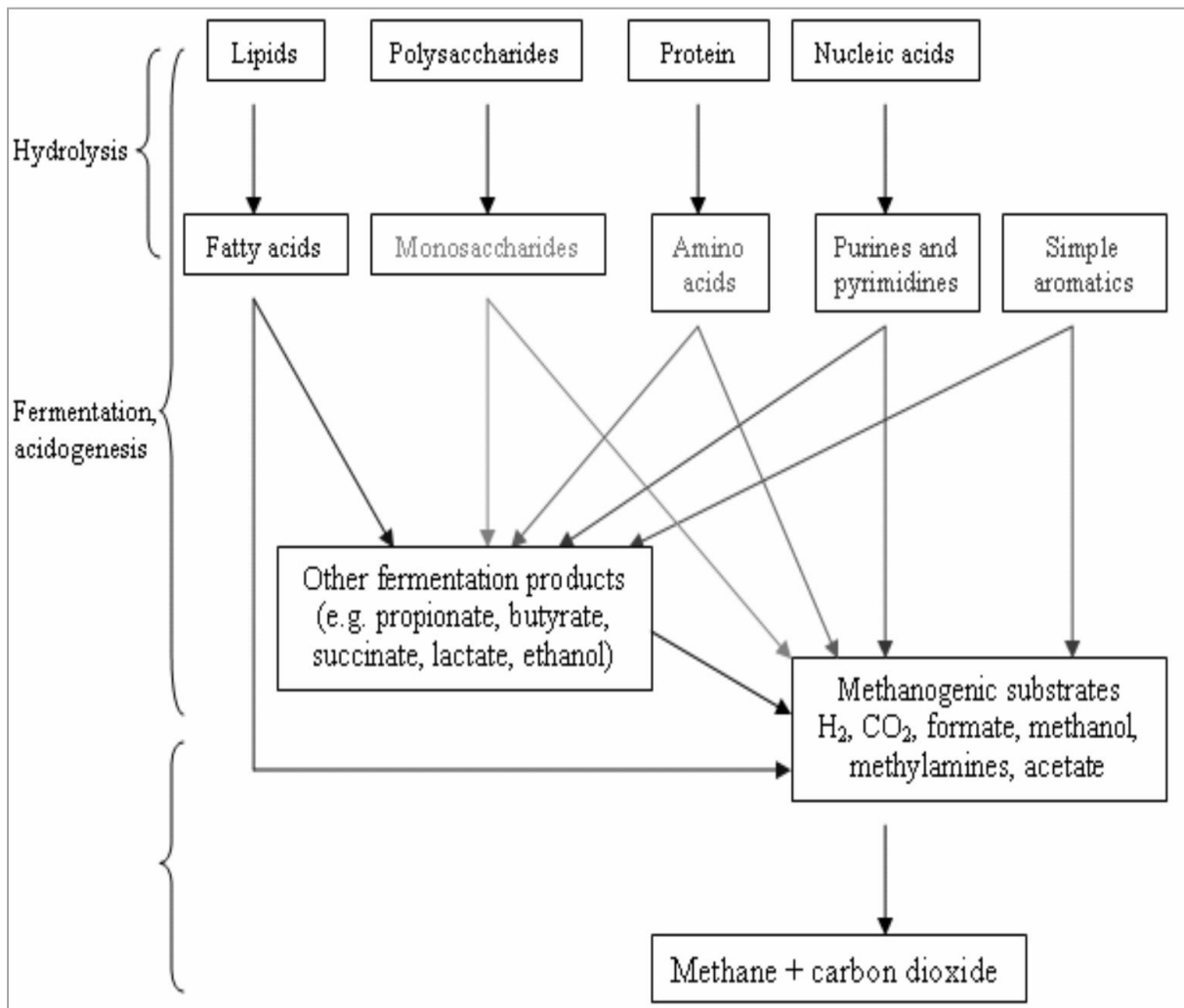


Figura 2. Esquema de degradación de un proceso anaeróbico. Fuente Nègre y Jonnson 2010.

### 1.1.3.3 Metanogénesis.

El tercer paso se lleva a cabo por un grupo de microorganismos conocido como metanógenos, clasificados como archeas y son estrictamente anaerobias. El grupo de microorganismos no metanogénicos responsables de la hidrólisis y la fermentación consisten en bacterias anaerobias facultativas y anaerobias estrictas.

#### 1.1.4 Factores ambientales que influyen en los procesos anaerobios.

- Influencia del pH. Los procesos anaerobios son extremadamente sensibles a cambios en el pH. El valor del pH cercano al neutral es el adecuado, valores por debajo del 6.8 inhiben la actividad metanogénica. Valores alcalinos extremos son menos serios que los valores ácidos, si el pH decrece se debe a una acumulación de los ácidos grasos volátiles.
- Influencia de la temperatura. La temperatura no solo influye en las actividades metabólicas de la población microbiana, también tiene un efecto sobre los valores de transferencia de gas y las características de sedimentación de los sólidos biológicos. La temperatura es una preocupación importante en dichos procesos. La temperatura no sólo influye en las actividades metabólicas de la población microbiana. La dependencia de la temperatura de las constantes biológicas de velocidad de reacción son muy importantes para evaluar la eficiencia general.

Las principales consecuencias de lo anterior son:

- Aumento de la velocidad de reacción, de acuerdo con la relación de Arrhenius.
- Disminución en el valor de conversión de frecuencia, por las condiciones de temperatura fuera del rango óptimo. Esto es alrededor de 35 ° C para el proceso mesófilo.
- Aumento de la tasa de descomposición microbiana, como la lisis celular (Nègre y Jonnson 2010).

#### 1.2 Plaguicidas.

Los plaguicidas son productos de síntesis donde además del principio activo se encuentran impurezas, emulsificantes, solventes y aditivos de toxicidad no despreciable. Debido a su toxicidad intrínseca, más no su selectividad, los plaguicidas pueden poner en riesgo el medio ambiente, organismos no blanco y causar lesiones agudas y crónicas en la salud humana (Cárdenas *et al.*, 2005)

Si bien el uso de productos químicos en la agricultura se reduce a un número limitado de compuestos, esta es una de las pocas actividades donde se descargan deliberadamente en el medio ambiente productos químicos para acabar con algunas formas de vida, ocasionando con el paso de los años una saturación de remanentes químicos en estos sitios debido a la fácil dispersión que presentan estos compuestos.

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) expone en diversos trabajos de investigación que, del total de los plaguicidas utilizados en la agricultura, un bajo porcentaje del principio activo llega a los cultivos con eficiencia, logrando así

controlar o eliminar la plaga. El resto de la sustancia se distribuye en el suelo filtrándose a través de él hacia mantos freáticos o directamente hacia recursos de agua como ríos, lagos y pozos.

### **1.2.1 Factores que determinan el comportamiento de los plaguicidas en el ambiente.**

Para entender cómo se comporta un plaguicida en el ambiente se necesita conocer cierta información sobre las propiedades físico-químicas de la molécula y su mecanismo de transporte, así como las características medio ambientales y la geografía del lugar en el que se encuentra.

De gran importancia es la interacción plaguicida-suelo-agua por el impacto de estas sustancias en el ambiente, sobre todo en aplicaciones aéreas donde un porcentaje considerable del producto llega al suelo o cuerpos de agua, así también como resultado del lavado ocasionado por las lluvias, o bien, por el arrastre provocado por el viento, sobre todo en los tratamientos al follaje, sin embargo los organofosforados tienen la importante ventaja de que son degradados biológico y químicamente en forma rápida en plantas, en animales y en el suelo a materiales no tóxicos (Badii y Varela 2008).

El transporte ambiental involucra los movimientos de gases, líquidos y partículas sólidas dentro de un medio determinado y a través de las interfaces entre el aire, el agua, sedimento, suelo, plantas y animales. La Figura 3 muestra un ejemplo del transporte de los plaguicidas en el ambiente; sin embargo, es de gran importancia considerar los siguientes:

- **Difusión.** Es el movimiento de moléculas debido a un gradiente de concentración. Este movimiento es al azar pero trae como consecuencia el flujo de materiales desde las zonas más concentradas a las menos concentradas. Para medir la difusión de un compuesto en el suelo hay que considerar la interacción conjunta de parámetros tales como la porosidad, los procesos de adsorción, la naturaleza del compuesto, etc (INE 2000).
- **Lixiviación.** Es el parámetro más importante de evaluación del movimiento de una sustancia en el suelo. Está ligado a la dinámica del agua, a la estructura del suelo y a factores propios del plaguicida. Los compuestos aplicados al suelo tienden a desplazarse con el agua y lixiviar a través del perfil, alcanzando las capas más profundas y el acuífero, que en consecuencia resulta contaminado.

- Evaporación. La tasa de pérdida de un plaguicida por volatilización depende de su presión de vapor, de la temperatura, de su volatilidad intrínseca y de la velocidad de difusión hacia la superficie de evaporación

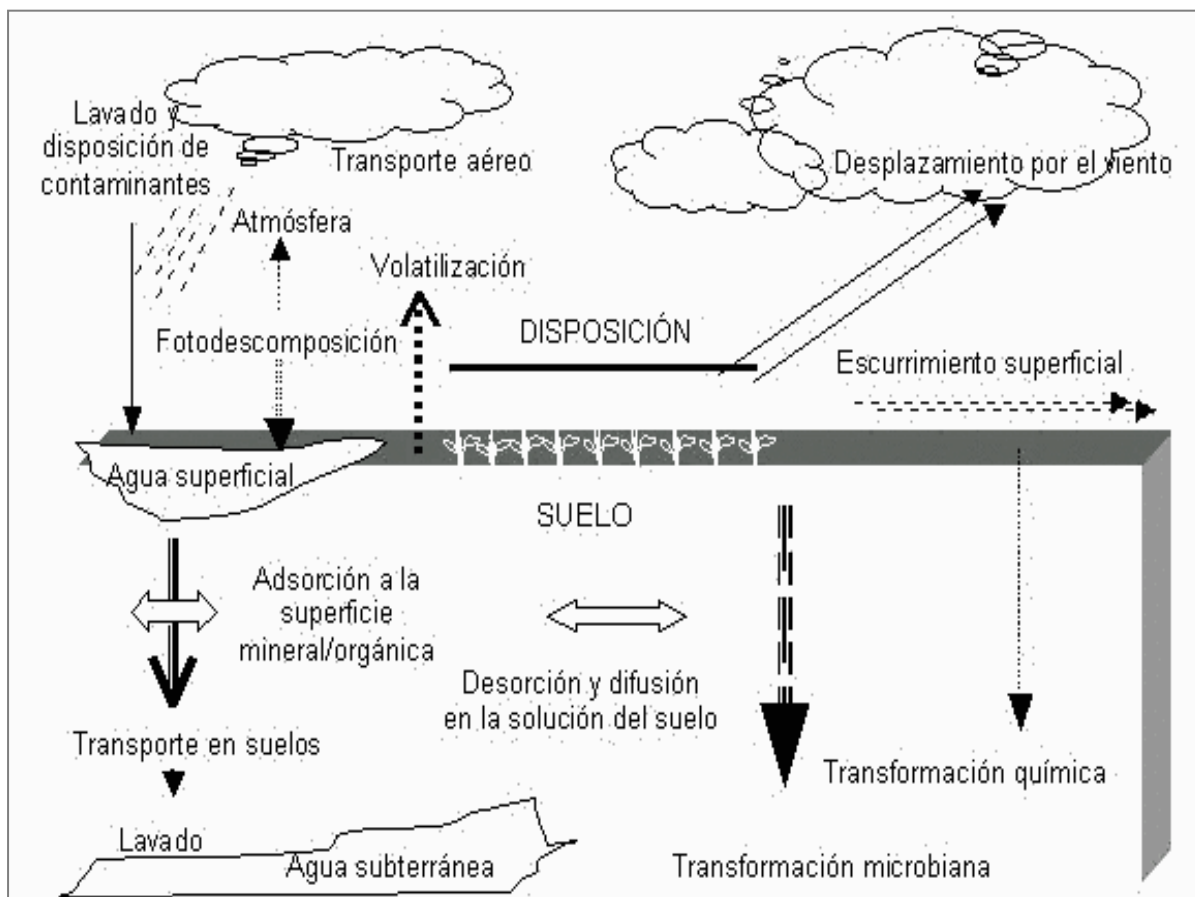


Figura 3. Diagrama de transporte de plaguicidas en el ambiente.

### 1.2.2 Efectos ecológicos de los plaguicidas en el agua.

En años recientes se han reportado un número importante de casos sobre la presencia de plaguicidas en aguas superficiales, derivados de fuentes de contaminación no puntuales, la gran mayoría de ellos hace referencia al acarreo de plaguicidas como factor principal de entrada y solo algunos han considerado la contaminación por la aspersión del plaguicida, varios de estos reportes han mostrado una clara relación entre la exposición no experimental y los efectos observados in situ en los cuerpos de agua, sobre la abundancia, estructura de la comunidad o dinámica de la población (Sánchez-Meza, 2009).

De acuerdo con Ongley (1997), los efectos ecológicos de los plaguicidas en el agua están determinados por los siguientes criterios:

- **Toxicidad:** Toxicidad para mamíferos y no mamíferos, expresada en forma de  $DL_{50}$  ("Dosis letal": concentración del plaguicida que provoca la muerte de la mitad de los organismos de prueba durante un período especificado de prueba). Cuanto más baja es la  $DL_{50}$ , mayor es la toxicidad; los valores de 0 a 10 son extremadamente tóxicos.
- **Persistencia:** Medida en términos de vida-media (tiempo necesario para que la concentración ambiental disminuya un 50 por ciento). La persistencia está determinada por procesos bióticos y abióticos de degradación. Los procesos bióticos son la biodegradación y el metabolismo; los procesos abióticos son fundamentalmente la hidrólisis, fotólisis y oxidación. Los plaguicidas modernos suelen tener vida-media breve, que reflejan el período durante el cual la plaga debe ser controlada.
- **Productos degradados:** El proceso de degradación puede llevar a la formación de "productos degradados", cuya toxicidad puede ser mayor, igual o menor que la del compuesto original. Por ejemplo, el DDT se degrada en DDD y DDE.
- **Destino (ambiental):** El destino ambiental (comportamiento) de un plaguicida depende de la afinidad natural del producto químico con respecto de uno de los cuatro compartimentos ambientales: materia sólida (materia mineral y carbono orgánico en partículas), líquido (solubilidad en aguas superficiales y aguas del suelo), forma gaseosa (volatilización) y biota. Este comportamiento recibe con frecuencia el nombre de "compartimentación" y comprende, respectivamente, la determinación de los siguientes aspectos: coeficiente de absorción del suelo ( $K_{OC}$ ); solubilidad; Constante de Henry (H); y el coeficiente de partición n-octanol/agua ( $K_W$ ). Estos parámetros son bien conocidos en el caso de los plaguicidas y se utilizan para prever su evolución ambiental.

### 1.2.3 Comportamiento de los microorganismos frente a los plaguicidas.

Cuando las bacterias son expuestas a una presión selectiva de algún compuesto como única fuente de carbono, se pueden tener poblaciones con capacidad de degradación específica (Alexander, 1994). Las transformaciones se refieren a la degradación de estos compuestos, dichos procesos abarcan reacciones de deshalogenación, alquilación, hidrólisis, oxidación, reducción, conjugación y condensación durante el metabolismo y el co-metabolismo. (Calva y Torres 1998).

El metabolismo de los plaguicidas tiene que ver con un proceso de tres fases que se describe a continuación: en la primera fase del metabolismo, las propiedades originales del compuesto son transformadas a través de procesos de reacciones de oxidación, hidrólisis y reducción, esto generalmente origina un producto más soluble en agua y menos tóxico que el inicial. La segunda fase involucra conjugación de los plaguicidas o metabolitos de los plaguicidas con azúcares, aminoácidos o glutatión, lo cual incrementa la solubilidad en agua y reduce la toxicidad con respecto al plaguicida inicial. La tercera fase involucra conversiones de los metabolitos generados en la fase II en conjugaciones secundarias ocasionando en la mayoría de los casos, que la nueva molécula sea inocua (Van-Eerd *et al.* 2003).

### **1.3 Biomarcadores en la determinación de la presencia de plaguicidas organofosforados y carbamatos en suelo y agua.**

Un biomarcador en su más amplio sentido incluye cualquier medida que refleja una interacción entre un sistema biológico y un agente liberado al medio ambiente, el cual puede ser físico químico o biológico.

Los biomarcadores pueden ser utilizados en la identificación de peligro, la evaluación de la exposición y en la asociación de una respuesta de un organismo con la producción de una enfermedad (Sánchez-Meza, 2009).

Según la definición de McCarthy & Shugart (1990), los biomarcadores son "medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, y que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante".

Los biomarcadores se han clasificado en términos generales en tres grupos: biomarcadores de exposición, biomarcadores de efecto o daño y biomarcadores de susceptibilidad (Sánchez-Meza, 2009).

- Biomarcador de exposición: una sustancia exógena o sus metabolitos o los productos de interacción entre el agente xenobiótico y una molécula o célula blanco que es medida en un compartimento dentro del organismo.
- Biomarcador de efecto: la medición de una alteración bioquímica, fisiológica o de compartimento en un organismo, la cual, dependiendo de su magnitud, se puede reconocer o asociar con una alteración de la salud o la producción de una enfermedad.

- Biomarcador de susceptibilidad: un indicador de una capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición de una sustancia xenobiótica específica.

### **1.3.1 Uso de biomarcadores.**

Los biodetectores ambientales, de acuerdo con el tipo de técnica empleada, pueden ser clasificados en bioensayos y biosensores. Los bioensayos fueron la primera herramienta biológica en ser aplicada al campo ambiental. Básicamente constituyen procedimientos que emplean diversos materiales vivos para estimar la toxicidad potencial de una sustancia o de una matriz contaminada (Castro-Ortíz *et al.*, 2007).

Los biosensores han sido desarrollados como métodos analíticos, cuantitativos o semicuantitativos para detectar determinados analitos o compuestos específicos, y más recientemente para la detección de efectos de contaminación por agentes químicos en el ambiente. En los últimos 10 años los biosensores han sido integrados a los programas de control de contaminantes, implementándolos en sistemas de seguridad ambiental en dos formas:

1. Métodos de seguimiento capaces de predecir el posible peligro de efectos biológicos, como toxicidad, genotoxicidad o estrogenicidad de un coctel de contaminantes; pudiendo medir una gran cantidad de contaminantes en cortos lapsos.
2. Métodos de cribado (*screening*) que sirven como alerta de presencia de algún compuesto contaminante. Para la confirmación de los resultados positivos se requiere del uso de métodos convencionales como son cromatografía de gases o espectrofotometría de masas, para la identificación de los compuestos causantes del daño.

### **1.3.2 Biomarcadores en la exposición a plaguicidas organofosforados y carbámicos.**

Cuando se evalúa el peligro que representan mezclas complejas de plaguicidas organofosforados y carbamatos, la determinación de la concentración y por consecuencia toxicidad de un plaguicida en particular resulta insuficiente ya que no se toman en cuenta los efectos derivados de la combinación de sustancias. Asimismo, los efectos tóxicos de sus metabolitos no son reconocidos cuando solo se analiza el compuesto original. Por ello un enfoque más adecuado resulta de medir la potencia tóxica integrada que representa una mezcla compleja de plaguicidas a través del uso de bioensayos que permitan la identificación y cuantificación de puntos finales relevantes de toxicidad.



La posibilidad de producir inhibición de la enzima acetilcolinesterasa in vitro por concentraciones conocidas de plaguicidas organofosforados y carbamatos hace posible su uso potencial como indicador de suelos contaminados. La medición de la actividad colinesterásica se realiza empleando la reacción modificada de Ellman, la cual se ha utilizado por otros investigadores para fines similares en muestras de agua de lluvia y en suelo (Sánchez-Meza, 2009).

Para la determinación de acetilcolinesterasa se emplea su capacidad de hidrolizar a la acetilcolina en ácido acético y tiocolina. Se han desarrollado varios métodos entre los que se incluyen la determinación en el cambio de pH que acompaña la hidrólisis de los ésteres de colina y aquellos basados en la detección de la liberación de los ésteres de la tiocolina.

La medición de la actividad colinesterásica en el suero se realiza empleando la reacción modificada de Ellman (Ellman et al., 1961; Milla-Cotos y Palomino-Horna, 2002) la cual se ha usado por otros investigadores para fines similares.

El método de Ellman es un método espectrofotométrico que permite determinar la actividad acetilcolinesterasa en sangre y otros tejidos, ha sido ampliamente usado para evaluar la exposición a sustancias inhibitoras de colinesterasas tanto en el ser humano como en otros organismos. Este método se basa en la medición de un compuesto, el 5-tío-2-nitrobenzoato, el cual se deriva a partir de dos reacciones acopladas: la acetilcolinesterasa o la pseudocolinesterasa producen la hidrólisis de la acetiltiocolina, la cual se emplea como sustrato formando así tiocolina y acetato. La tiocolina reacciona con el ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) generando el 5-tio-2-nitrobenzoato, el cual en medio alcalino (pH = 8) produce un compuesto de color amarillo el cual presenta un máximo de absorción a 405 nm, la absorbancia medida en un espectrofotómetro a esta longitud de onda es proporcional a la cantidad de 5-tio-2-nitrobenzoato formado y a su vez proporcional a la actividad de la enzima. La acetilcolinesterasa en presencia de un plaguicida organofosforado o carbámico se verá inhibida, disminuyendo la cantidad de 5-tio-2-nitrobenzoato formado; el mecanismo de reacción se puede apreciar en la Figura 4.

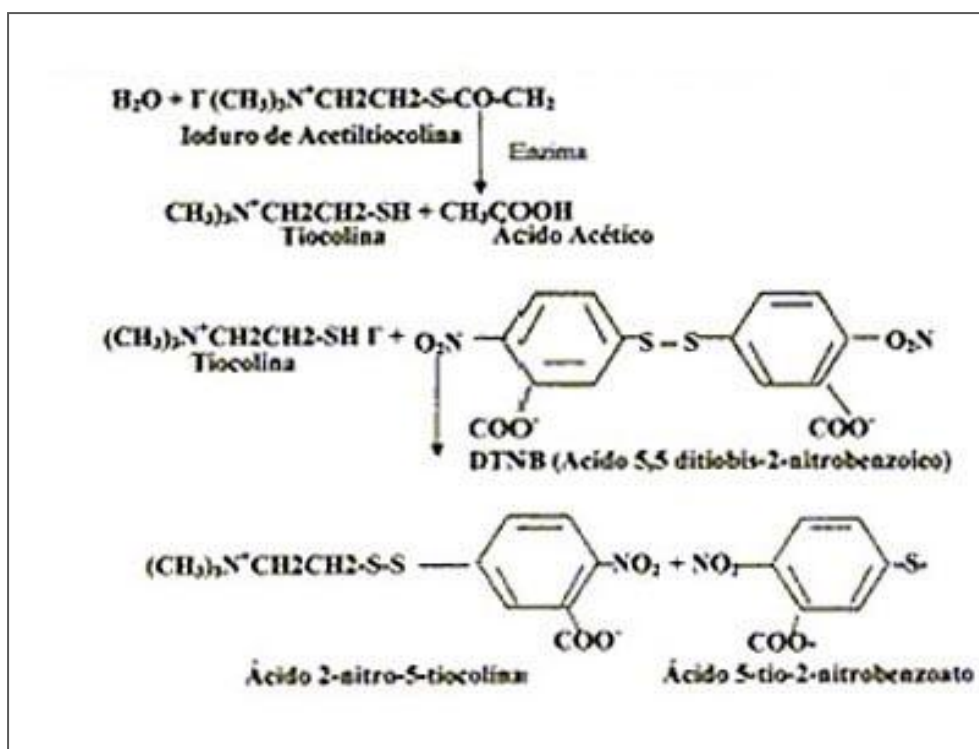


Figura 4. Mecanismo de reacción para el método de Ellman.

#### 1.4 Antecedentes.

En México, en los últimos diez años se han estado desarrollando investigaciones aplicando métodos físicos, químicos y biológicos para remover contaminantes presentes en suelo y agua, de estos últimos se espera que permitan tratar el problema de los plaguicidas a través del uso de los microorganismos y la capacidad de adaptación y degradación de compuestos xenobióticos que estos representan.

Estas nuevas técnicas para el uso en la biorremediación pueden contribuir a un mejor tratamiento de estos compuestos de manera más eficiente y ambiental, sin embargo, la mayoría de las investigaciones, consideran que los plaguicidas se encuentran en el ambiente como sustancias puras libres de otros agentes químicos propios del producto o como parte del ecosistema donde se adicionan, por lo que es importante dirigir este tipo de investigaciones a la remoción de productos en mezcla.

Los plaguicidas como contaminantes ambientales en el agua o en el suelo, se integran en un ecosistema constituido por una asociación de microorganismos interactiva causando una actividad metabólica interrelacionada, protegiendo la vida como unidad del llamado consorcio.

Microorganismos en consorcio como *Stenotrophomona smalthophilia*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio metschinkouii*, *Serratia ficaria*, *Serratia spp* y *Yersinia enterocolitica* aislados de suelos agrícolas, han demostrado crecer en presencia de plaguicidas del tipo organofosforados como tetraclorvinfos en concentración de 25 mg/L utilizándolo como única fuente de carbono, de manera individual las cepas no logran crecer en el mismo medio con plaguicida presente lo que sugiere que las asociaciones microbianas son importantes para la utilización de este tipo de compuestos; la herramienta analítica para poder determinar la degradación fue la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de gases (Ortíz y Sánchez 2010).

Géneros como *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* aislados directamente de leguminosas o de plantas de ornato han presentado degradación de compuestos como el malatión en concentración de 50, 100 y 200  $\mu$ L encontrando a través del uso de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC/MS) la presencia de al menos cinco metabolitos de este compuesto después de su tratamiento con estos microorganismos durante 15 días; para el mismo plaguicida también se ha utilizado la cepa pura de *Bacillus thuringiensis* aislado de agua contaminada con estos productos removiendo hasta un 99.32 % de malatión en una concentración inicial de 250 mg/L en un periodo de 30 días, demostrando que la remoción más efectiva se lleva a cabo por cometabolismo, la identificación de los metabolitos obtenidos se realizó por HPLC, GC/MS e infrarrojo (Hernández *et al.*, 2005; Zeinat *et al.*, 2008).

Herbicidas como la atrazina también han mostrado remoción cercana al 100 % después de un tratamiento con microorganismos (aislados de suelos saturados con este producto), como *Microbacterium*, *Xanthomonas*, *Ochrobactrum*, *Massilia*, *Klebsiella* y *Stenotrophomonas*, encontrando en este último género cuatro genes que codifican a las enzimas catabólicas responsables de la degradación de esta sustancia (Tafoya, 2008).

En el caso de estos compuestos, Van Eerd y col. (2003) sugieren que el primer paso en la biodegradación de plaguicidas se relaciona con reacciones de oxidación mediadas por enzimas como el citocromo P450 presente en plantas, animales y bacterias. En los plaguicidas organofosforados, cuando el átomo que se une al fósforo con el doble enlace es el oxígeno, el compuesto se denomina oxón, y es un potente inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa y de otras esterases, sin embargo, con el oxígeno en esta posición, también se favorece la hidrólisis del compuesto, especialmente bajo condiciones alcalinas (Fuentes-Matus *et al.*, 2010).

Los factores que se deben considerar en la remoción de este tipo de compuestos son pH, temperatura, y el tipo de medio de dispersión. En un rango de pH de 7 a 11, la degradación de dimetoato depende de la alquilación del medio más que del tiempo de almacenamiento. Los metabolitos resultantes de estas alquilaciones como el dimetil fosfato y dimetil fosforotioato ocasionalmente no pueden ser utilizados por los microorganismos como fuente de fósforo (Kanekar, 2004).

### **1.5 Planteamiento del problema.**

El municipio de Villa Guerrero se localiza en la porción sur del Estado de México y colinda con los municipios de Zinacantepec, Toluca y Tenango del Valle al norte, Ixtapan de la Sal al sur, Tenancingo y Zumpahuacán al este, y Coatepec Harinas al oeste, contando con las siguientes coordenadas extremas:

Longitud Norte 18°48´

Latitud Sur 18°25´

Longitud Este 98°33´

Longitud Oeste 100°28´

Representa el 8.48% de la superficie del Estado, es decir, 20773 Ha, y el 56% de la producción total de flor dentro del Estado de México.

Las condiciones geográficas donde se ubica el municipio le permiten aprovechar los recursos naturales de los que dispone para lograr los grandes volúmenes de producción que presenta. El agua, como recurso esencial para el cultivo lo proveen los diferentes ríos, arroyos y manantiales que se surten del agua que proporciona el volcán Xinantecatl, de igual manera ríos más pequeños que nacen en el Norte del municipio y llegan hasta la parte Sur se recolectan en cuerpos de agua artificiales como bordos y presas construidas por los pobladores como es el caso de la presa Tecualoyan ubicada en una de las partes más bajas que recolecta agua que proviene del Río el Muerto, sin embargo, a diferencia de los cuerpos de agua que se suministran del mismo río presenta diferencias significativas en su calidad del agua así como en su entorno.

La diferencia entre esta presa y los cuerpos de agua que se encuentran dentro de la misma cuenca a altitudes mayores se da a través del ingreso del agua, la contaminación de diversas sustancias que arrastró a su paso el Río El Muerto desembocan en la presa generando un reservorio de agua que no mantiene las condiciones adecuadas para el uso agrícola que se le da.

El área seleccionada para desarrollar la investigación comprendió tres cuerpos de agua que se denominarán de la siguiente manera: la Presa Tecualoyan (18°54´43.5" latitud N y 99°38´10.8" longitud W a 1910 msnm), el cuerpo de agua A (18°55´40.7"

latitud N y 99°38'26.3" longitud W) y el cuerpo de agua B (18°55'41.4" latitud N y 99°38'26.2" longitud W).

Se observó que la Presa Tecualoyan presentaba anomalías en sus alrededores como coloración anormal del suelo, poca flora y fauna macro y microscópica en el agua, se encuentra rodeada de por lo menos diez invernaderos que se dedican a la flor de corte y al cultivo de Eucalipto dólar para ornamento. Los cuerpos de agua A y B se encuentran por encima de la presa, son los dos cuerpos de agua más grandes cercanos a esta que aunque son aledaños también a otros invernaderos que cultivan los mismos productos no presentan las anomalías de la presa Tecualoyan, de manera contraria a ésta la diversidad en su flora y fauna es mayor.

El uso intensivo de fertilizantes, plaguicidas y aditivos para promover el adecuado crecimiento del cultivo en los invernaderos que se encuentran dentro de esta cuenca puede ser parte de la contaminación que presenta el agua, por lo que es de importancia iniciar un diagnóstico ambiental de la cuenca para observar la gravedad del daño que se pueda manifestar.

### 1.6 Justificación.

Los plaguicidas aplicados constantemente a suelos agrícolas, los envases contenedores y los productos caducados, generan grandes cantidades de residuos líquidos y sólidos que contaminan suelos y cuerpos de agua. Ante esta situación, es importante generar alternativas para el tratamiento de residuos de estos xenobióticos y/o para la limpieza de sitios contaminados. La biodegradación con bacterias aisladas de sitios expuestos a estos contaminantes, es una alternativa valiosa (Castrejón-Godínez *et al.*, 2001).

Diversos estudios sobre la degradación de plaguicidas de diferentes familias químicas a través del uso de microorganismos capaces de utilizarlos como fuente de energía han mostrado que son una manera fácil, económica y segura de tratar este tipo de contaminantes, sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se realizan *in vitro* bajo el supuesto de que el contaminante se encuentra en estado químicamente puro y sin una interferencia de cualquier otro compuesto (Castrejón-Godínez *et al.*, 2001; Lopera-Mesa *et al.*, 2005; Zeinat *et al.*, 2008; Ortiz-Hernández *et al.*, 2010).

Para el presente proyecto de investigación, se seleccionaron dos familias químicas de compuestos que se utilizan ampliamente en la mayoría de los invernaderos que se encuentran dentro de la cuenca a estudiar, se eligieron los compuestos dimetoato (plaguicida organofosforados) y metomilo (carbamato) por su fácil adquisición en la compra, el amplio espectro de inhibición así como los diversos efectos toxicológicos que presentan.

La selección de la zona de estudio se realizó con la finalidad de establecer las condiciones de manejo de un reactor anaerobio/aerobio para remover mezclas de compuestos organofosforados y carbámicos utilizando un consorcio microbiano aislado de la presa Tecualoyan. El monitoreo de la remoción de esta mezcla de compuestos se propuso llevar a cabo a través del uso de un biomarcador, valores de pH, temperatura y comportamiento del consorcio microbiano.

La importancia del monitoreo de la remoción de los plaguicidas dentro del reactor anaerobio/aerobio se realizó a través de una técnica analítica que tiene las ventajas de ser mucho más económica, no generar una cantidad significativa de residuos y arrojar resultados semicuantitativos reales, de los plaguicidas organofosforados y carbamatos como compuestos individuales y en mezcla, que a diferencia de las cromatografías utilizadas en otras investigaciones no requiere de un tratamiento de la muestra para su análisis y tiene una mayor sensibilidad.

### **1.7 Hipótesis.**

Si los plaguicidas organofosforados y carbámicos son de poca persistencia pero las altas concentraciones no permiten su rápida degradación de manera natural, entonces el uso de un reactor anaerobio/aerobio que agilice la remoción podría ser una alternativa para conocer y evaluar a través de un marcador enzimático el tratamiento de una mezcla de este tipo de contaminantes en un sistema tipo batch.

### **1.8 Objetivos.**

#### **1.8.1 Objetivo General.**

Monitorear y evaluar la remoción de una mezcla de dos plaguicidas, dimetoato (OF) y metomilo (CA) utilizando un consorcio microbiano en un reactor anaerobio/aerobio a través del uso de un biomarcador.

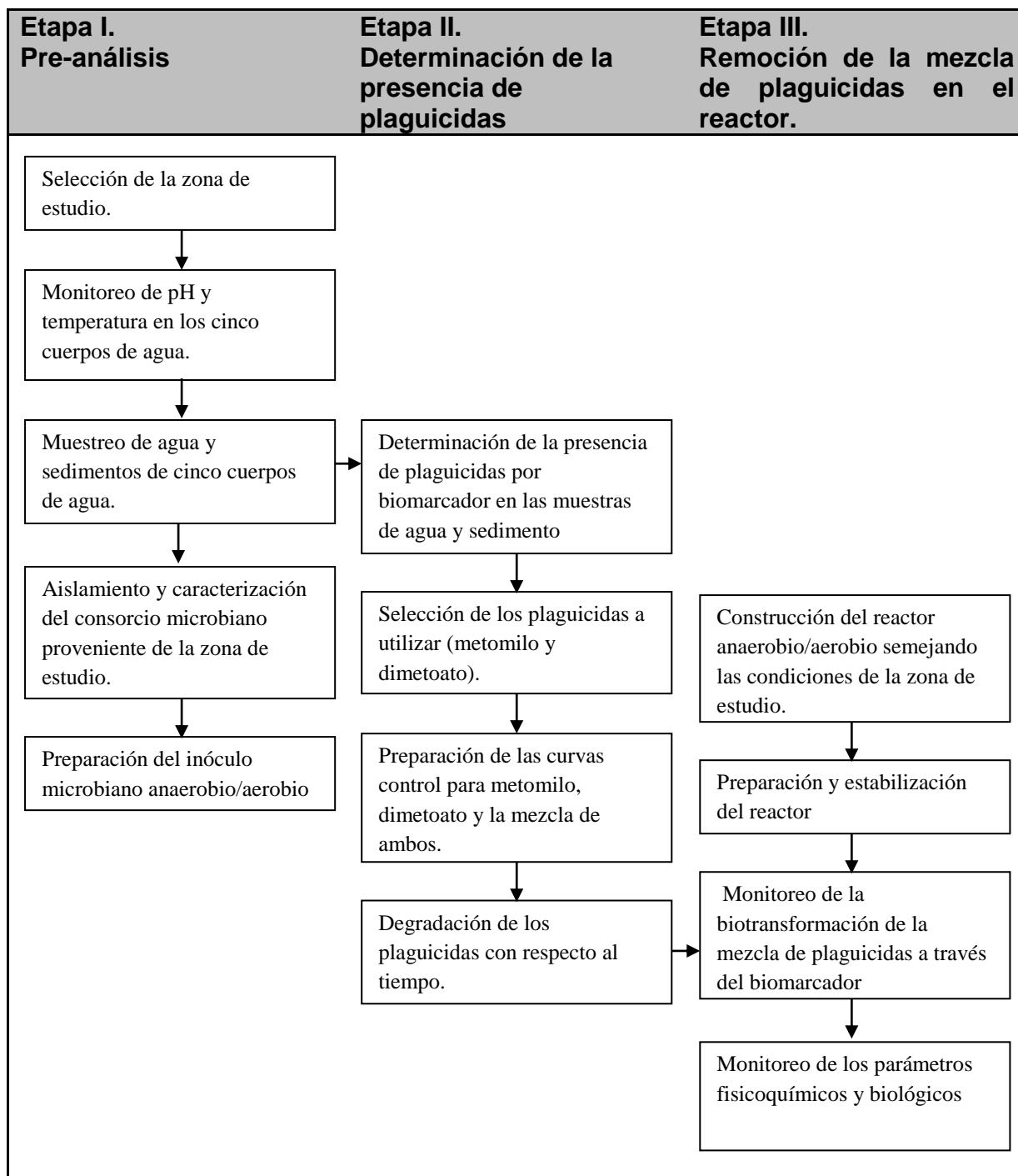
#### **1.8.2 Objetivos específicos.**

- Seleccionar una zona de estudio que presente acumulación de plaguicidas OF y CA en el Municipio de Villa Guerrero, Estado de México.
- Obtener las condiciones ideales para la construcción y manejo del reactor a través de los resultados obtenidos en la zona de estudio.
- Aislar y caracterizar un consorcio microbiano con diferente capacidad para utilizar el oxígeno (anaerobios facultativos, microaerófilos y aerobios estrictos) proveniente de la zona de estudio, susceptibles de utilizar la mezcla de plaguicidas como única fuente de carbono.
- Construir las curvas control del biomarcador para los compuestos dimetoato, metomilo y la mezcla de ambos.
- Construir un reactor anaerobio/aerobio semejando las condiciones ambientales de la zona de estudio para degradar la mezcla de plaguicidas en presencia del consorcio microbiano.
- Monitorear la biotransformación de la mezcla de plaguicidas en el reactor a través del uso del biomarcador, parámetros fisicoquímicos y biológicos, para calcular el porcentaje de remoción.

## **II. METODOLOGÍA**



2.1 Diagrama de bloques de la metodología aplicada.



## **2.2 Descripción de la metodología.**

### **2.2.1 Etapa I: Pre-análisis.**

#### **Selección de la zona de estudio.**

La Zona de estudio fue seleccionada dentro del Municipio de Villa Guerrero en el Estado de México debido a la alta actividad florícola que presenta el municipio. La Zona seleccionada se encuentra en una de las partes más bajas de una de las cuencas más importantes que pertenecen a Villa Guerrero (Cuenca del Calderón). Los primeros cuatro cuerpos de agua a muestrear corresponden a bordos que se surten del Río el Muerto, que al final del trayecto dan origen a la Presa Tecualoyan (quinto cuerpo). Cada uno de los lugares seleccionados se encuentra cerca de invernaderos que cultivan flor de corte como Rosa y Gerbera, además de cultivos a cielo abierto de Ave de Paraíso, Cedro dólar y Clavelín.

Los cultivos que se encontraron cercanos a la Presa Tecualoyan corresponden a cultivos de flor de corte ubicados en terrenos donde el horizonte "0" del suelo ha sufrido constante erosión, además de encontrarse ubicados en laderas cercanas a los ríos que alimentan la presa.

Los cuerpos de agua seleccionados se referenciaron como: Cuerpo de agua A, Cuerpo de agua B, Presa Tecualoyan, Bordo 1 y Bordo 2; en el lugar se midieron los parámetros de temperatura, pH y conductividad eléctrica en dos ocasiones correspondientes a la temporada de lluvias y temporada de estiaje.

#### **Muestreo de agua y sedimentos.**

Se tomaron muestras de agua y sedimento de la Presa Tecualoyan así como de los otros cuerpos de agua con el objetivo de determinar la presencia de plaguicidas OF y CA. El muestreo se llevó a cabo en frascos ámbar lavados previamente con ácido nítrico y se transportaron en cama de hielo, protegidos de la luz hasta llegar al laboratorio.

Para las muestras de la Presa Tecualoyan cuyo objetivo era el aislamiento de los consorcios microbianos se utilizaron frascos ámbar estériles, el caso del agua conteniendo tiosulfato de sodio, utilizando la metodología para el muestreo de agua superficial; obteniendo un total de 1 L; para los sedimentos las cucharillas utilizadas así como el resto del material se esterilizó previamente, los frascos se cerraron herméticamente y se transportaron al laboratorio

### **Aislamiento y caracterización del consorcio microbiano proveniente de la zona de estudio.**

La muestra de agua de la Presa correspondió a la fase de aislamiento del consorcio aerobio, la siembra se llevó a cabo en condiciones asépticas por el método de vaciado en placa en concentraciones de 1.0, 0.1 y 0.5 mL por triplicado en los siguientes medios de cultivo: Agar Nutritivo (AN), Papa Dextrosa Agar (PDA) y PDA con rosa de bengala, llevando a incubación de 35 y 28 °C, las lecturas se llevaron a cabo cada 24 horas durante 72 horas (Castrejón-Godínez *et al.* 2001, Ortiz y Sánchez 2010)..

La muestra de sedimento proveniente de la Presa correspondieron a la fracción del consorcio anaerobio, la muestra se trabajó por el método de dilución en tubo y vaciado en placa sembrando en AN, agar soya tripticaseína (TSA) y Czapeck incubando las placas a 35 °C directamente en la incubadora y en jarra Gaspack para anaerobiosis, la lectura se realizó cada 24 horas durante 72 horas.

Una vez que las placas mostraron crecimiento se comenzaron a caracterizar las colonias por descripción de la morfología colonial y características microscópicas como forma, agrupación y afinidad al Gram. Una vez caracterizadas las colonias se aislaron en tubos con medio enriquecido y se les asignó una clave alfanumérica.

Para la identificación de los géneros de los que se constituyó el consorcio microbiano se utilizaron una serie de pruebas bioquímicas diferentes para cada cepa conforme lo establecen los algoritmos de identificación del manual Bergey's de Bacteriología Sistemática (1994).

Las cepas aisladas y caracterizadas se inocularon en medio de cultivo de Tioglicolato para observar el comportamiento de las cepas por requerimiento de oxígeno, separando de esta forma las cepas aerobias estrictas, microaerofílicas y anaerobias facultativas para conformar de esta manera el consorcio microbiano que se adicionaría en las diferentes fases del reactor.

Las cepas puras y aisladas se guardaron para su posterior uso en un medio enriquecido y en refrigeración, manteniendo la viabilidad de las cepas a través de pases continuos.

### **Preparación del inóculo microbiano anaerobio/aerobio.**

Para cada una de las cepas aisladas, caracterizadas e identificadas que conformaron el consorcio microbiano anaerobio/aerobio se procedió de la siguiente manera:

Se sembraron en placas de Petri que contenían AN por estría cerrada para lograr un crecimiento en toda la extensión de la placa, se incubaron entre 18 y 24 horas, posteriormente se cosecharon con solución salina de NaCl al 0.85 % construyendo una solución madre con un volumen de 100 mL con suspensión de microorganismos en concentración desconocida.

Una vez establecidos los 100 mL de suspensión de cada uno de los microorganismos se sembraron por el método de dilución en tubo y vaciado en placa para determinar la concentración de cada una de las suspensiones en medio AN e incubando a 35 °C. Con los resultados obtenidos de las cuentas de cada una de las cepas se hicieron los cálculos para construir una suspensión final de concentración  $1 \times 10^6$  UFC/mL de cada uno de los microorganismos en un volumen total de 100 mL correspondiente al volumen total adicionado en el reactor.

### **2.2.2 Etapa II: Determinación de la presencia de plaguicidas.**

#### **Determinación de la presencia de plaguicidas en muestras de agua y sedimento.**

Las muestras de agua obtenidas de la zona de estudio en la etapa I, se llevaron al laboratorio para realizar la determinación de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y así determinar la presencia de plaguicidas OF y CA a través del uso del biomarcador, por tratarse de muestras líquidas no se requirió de ningún tratamiento previo antes de llevar a cabo la reacción.

A los sedimento muestreados se les realizó una extracción de la fase orgánica de la siguiente manera: se pesaron 20 g de sedimento y se suspendieron en 50 mL de acetona, se separó la fase orgánica con ayuda de un embudo de separación llevándose a evaporación a 30 °C, se lavó el vaso de precipitado con 1 mL de agua destilada y el lavado se analizó con el biomarcador.

El método empleado para determinar la presencia de plaguicidas en agua y sedimentos se resume a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Procedimiento para la determinación de la inhibición de la actividad colinesterásica.

Reactivos / actividad	Actividad basal del suero	Actividad del suero con muestra	Blanco
<b>Solución Trabajo de DTNB</b>	3mL	3mL	3mL
<b>Suero</b>	0.02mL	0.02mL	--
<b>Muestra de agua</b>	--	0.05mL	--
<b>Incubar a 25°C</b>	10 min	10 min	10 min
<b>Sol. Sustrato acetiltiocolina</b>	--	0.05mL	0.05mL
<b>Mezclar y agitar</b>	5 seg	5 seg	5 seg
<b>Lectura 405nm</b>	Leer cada minuto durante 3 minutos	Leer cada minuto durante 3 minutos	--

**Preparación de las curvas patrón para los plaguicidas dimetoato (OF), metomilo (CA) y la mezcla de ambos.**

Para cada uno de los plaguicidas y la mezcla de ambos se prepararon soluciones madre de concentración 10 mg/mL para obtener por dilución las siguientes concentraciones: 10.0, 1.0, 0.1, 0.001 mg/mL además de 1.0 y 0.1 µg/mL, colocándose en matraces cubiertos de la luz sobre una cama de hielo.

Antes de comenzar las lecturas se ajustó el blanco que consta de 3mL de solución de trabajo de ácido ditiobistrinitrobenzoico (DTNB), incubación de 10 minutos a 25 °C y 0.05 mL yoduro de acetiltiocolina (sustrato) a 405 nm.

Enseguida se tomó la lectura de la actividad basal del suero de ratón (obtenido el mismo día por punción cardiaca) sin plaguicida: 3 mL de solución de trabajo de DTNB con 0.02 mL de suero de ratón, se incubaron por 10 minutos a 25 °C y se adicionó 0.05 mL de sustrato. La lectura se llevó a cabo a 405 nm tomando lectura de resultados cada minuto durante un periodo de 3 minutos.

Para cada una de las diluciones de plaguicida y de la mezcla se trabajó de manera semejante: en un tubo se adicionaron 3 mL de solución de trabajo de DTNB con 0.02 mL de suero de ratón y 0.050 mL de la concentración de plaguicida en estudio, se llevaron a incubación por 10 minutos a 25 °C, después de la incubación se adicionaron 0.05 mL de sustrato, agitando durante 5 segundos y llevando al espectrofotómetro con una longitud de onda de 405 nm tomando lecturas cada minuto durante 3 minutos (Sánchez-Meza, 2009).. El procedimiento se muestra a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Procedimiento para la determinación de la inhibición de la actividad colinesterásica.

Reactivos / actividad	Actividad basal del suero	Actividad del suero con plaguicida	Blanco
<b>Solución Trabajo de DTNB</b>	3mL	3mL	3mL
<b>Suero</b>	0.02mL	0.02mL	--
<b>Muestra plaguicida</b>	--	0.05mL	--
<b>Incubar a 25°C</b>	10 min	10 min	10 min
<b>Sol. Sustrato acetiltiocolina</b>	--	0.05mL	0.05mL
<b>Mezclar y agitar</b>	5 seg	5 seg	5 seg
<b>Lectura 405nm</b>	Leer cada minuto durante 3 minutos	Leer cada minuto durante 3 minutos	--

Con los datos obtenidos se calculó la actividad colinesterásica y el porcentaje de inhibición a través de la siguiente expresión (Milla-Cotos y Palomino-Horna, 2002):

$$\text{Actividad Colinesterásica (U/mL)} = (\text{Apm}) (\text{VT}) (10\text{E}3)/(\text{e}) (\text{LCO}) (\text{VM})$$

Donde:

Apm = Promedio de las diferencias de absorbancia obtenidas a cada minuto.

U = Cantidad de enzima que convierte un micromol de sustrato (acetiltiocolina) por minuto en condiciones normales.

e = Coeficiente de absortividad molar del 5 tio-2 nitrobenzoato equivalente a 13,162 a 405 nm.

10E3 = Factor de corrección para pasar de milimol a micromol.

VT = Volumen total de reacción.

VM = Volumen de la muestra sin diluir.

LCO = Longitud del camino óptico (1 cm).

El porcentaje de inhibición de la actividad colinesterásica producida por una concentración conocida de plaguicida se obtiene en relación con la actividad colinesterásica registrada en el suero no expuesto a plaguicida. El porcentaje de inhibición se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ IACH} = 100 - (\text{AChEP})(100)/(\text{AChNEP})$$

Donde:

% IACH = Porcentaje de inhibición actividad colinesterásica.

AChEP = Actividad enzimática del suero expuesto a una concentración de plaguicida.

AChNEP = Actividad enzimática del suero no expuesto a una concentración de plaguicida.

### **Degradación de la mezcla de plaguicidas con respecto al tiempo.**

Se prepararon dos mezclas de 10 mL cada una con los plaguicidas metomilo y dimetoato en una concentración de 10 mg/mL. Posteriormente se vertieron en dos vasos de precipitado que se colocaron en agitación constante y a temperatura ambiente, cuidando que uno de los vasos estuviera protegido de la luz en su totalidad. Se determinó el porcentaje de inhibición de la actividad colinesterásica (ver procedimiento anterior) a las 0, 6, 24, 48, 72, 96 y 120 horas para construir la gráfica de degradación de la mezcla de plaguicidas.

### **2.2.3 Etapa III: Remoción de la mezcla de plaguicidas en el reactor anaerobio/aerobio.**

#### **Construcción del reactor anaerobio/aerobio semejando las condiciones de la zona de estudio.**

Considerando el modelo de Anzola-Rojas y colaboradores (2008), se construyeron dos reactores, el material utilizado fue tubo de PVC con una altura final de 60 cm y capacidad total de 5 L, se dividió en tres compartimentos para alojar a los tres tipos de microorganismos adicionados: el más profundo donde se estableció el lecho de grava y arcilla expandible (para bacterias anaerobias facultativas) además de su respectiva salida para toma de muestra, el segundo compartimento ubicado en el medio del tubo sin lecho fijo (bacterias microaerófilas) y por último el tercer compartimento en la parte más alta del reactor correspondiente a la zona aerobia que presenta aireación constante.

El ingreso del agua con la mezcla de plaguicidas se realiza por la parte alta, al ser un reactor sin flujo se dejó estabilizar tres días antes de adicionar la mezcla de plaguicidas así como el inóculo microbiano de concentración  $1 \times 10^6$  UFC/mL. El esquema del reactor construido se muestra a continuación en la Figura 5.

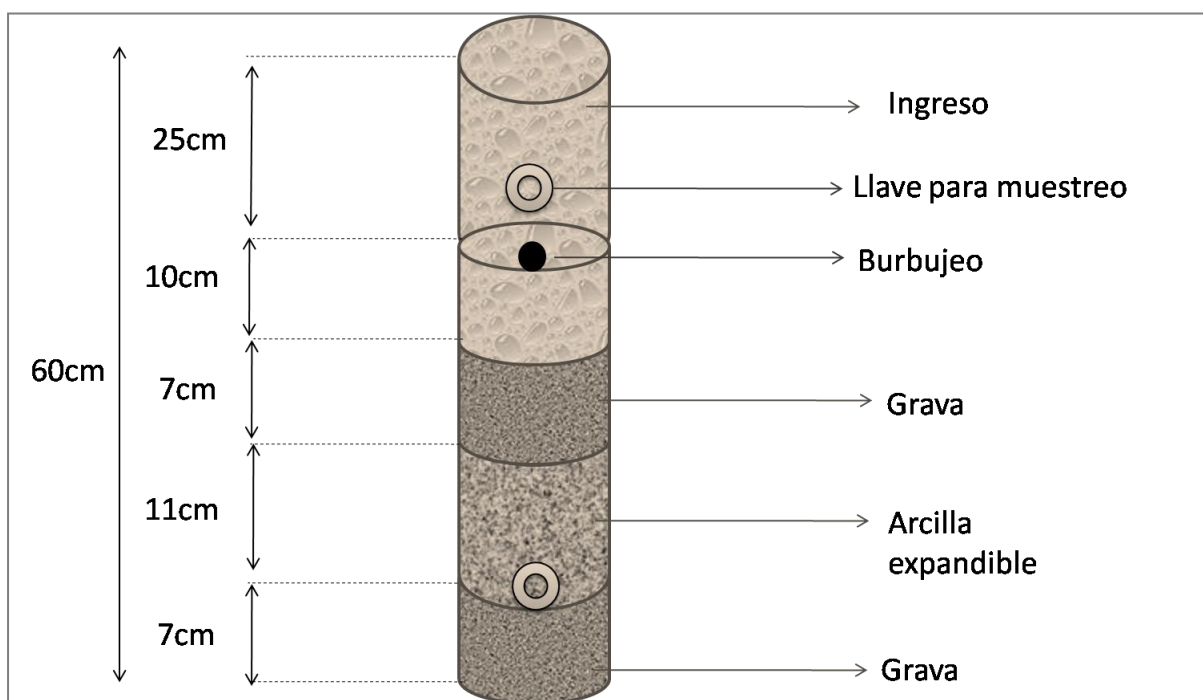


Figura 5. Esquema del reactor anaerobio/aerobio. Fuente: elaboración propia.

Los reactores se denominaron R1 y R2 para diferenciar el control de la prueba. La Tabla 4 muestra la diferencia entre ambos.

Tabla 4. Componentes de los reactores R1 y R2.

Constituyentes	R1	R2 (control)
Agua proveniente de la presa Tecualoyan estéril	✓	✓
Lecho de arcilla con grava en zona anaerobia	✓	✓
Mezcla de plaguicidas metomilo y dimetoato [1 mg/mL]	✓	✓
Inóculo microbiano anaerobio/aerobio $1 \times 10^6$ UFC/mL	✓	x
Ausencia de luz	✓	✓
Aireación en zona aerobia	✓	✓
Temperatura ambiente	✓	✓

### Monitoreo de la biotransformación de la mezcla de plaguicidas.

Se tomaron muestras de ambas salidas a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas para evaluar la inhibición de la actividad colinesterásica filtrando la muestra previamente en papel filtro Wathman y posteriormente en filtro de jeringa para eliminar las partículas de arcilla así como la biomasa presente para no interferir con la lectura. El procedimiento se realizó de la misma manera como se explico previamente en el apartado 2.5.2 Etapa II.



### **Monitoreo de los parámetros fisicoquímicos y biológicos.**

Las muestras se tomaron de las dos salidas correspondientes a las zonas anaerobia y aerobia de ambos reactores (Arcos-Ramos *et al.*, 2003; Guevara-Vera, 1996). Los parámetros fisicoquímicos que se llevaron a cabo se muestran a continuación en la Tabla 5 con su respectiva referencia:

Tabla 5. Determinaciones fisicoquímicas monitoreadas en los reactores.

<b>Determinación</b>	<b>Procedimiento</b>
<b>Temperatura</b>	NMX-AA-007-SCFI-2000
<b>pH</b>	NMX-AA-008-SCFI-2000
<b>Conductividad</b>	NMX-AA-093-SCFI-2000

También se tomaron muestras en condiciones asépticas y con material estéril de las dos salidas en ambos reactores a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas para llevar a cabo el análisis del comportamiento biológico a través del método de dilución y vaciado en placa en AN con la finalidad de conocer el comportamiento del inoculo a través del tiempo con respecto a la biotransformación de la mezcla de metomilo y dimetoato, además de cuantificar cada muestra para determinar el incremento o decremento del consorcio como conjunto y de manera individual.

## III. RESULTADOS

El apartado de resultados se divide en dos secciones, la primera referente a los resultados de campo que se obtuvieron en las Etapas I y II de la investigación y la segunda con relación al los resultados de la Etapa III que conformaron el artículo enviado a la Revista Internacional de Contaminación Ambiental y que se presentan en el formato establecido por la revista.

### **3.1 Resultados de la Etapa I: Pre-análisis.**

#### **Descripción de la zona de estudio seleccionada.**

**Clima.** El clima que predomina dentro del municipio es el templado subhúmedo, se encuentra clasificado como Cw, con temperatura máxima anual de 39°C, temperatura media anual de 18.6°C y mínima anual de 4°C.

El municipio posee tres zonas perfectamente definidas en las que el clima presenta las siguientes características:

La parte boreal, poblada de bosque mixto mesófilo considerado como clima templado húmedo (Cf), derivado de su posición altimétrica y de su gran cercanía con el cono volcánico del Chignahuitécatl, en esta zonas las heladas suelen ser severas y eventualmente llega a nevar.

La parte media del municipio posee un clima templado en el que las heladas no hacen daños mayores, sólo cuando provienen de los vientos polares que penetran por el Golfo de México, se elevan en la Sierra madre Oriental y afectan la masa central del Anáhuac . El clima de esta zona se clasifica como Cwbg.

La parte más austral del municipio presenta un clima templado semicálido del tipo Aw en donde llegan a presentarse las más altas temperaturas del territorio municipal, a diferencia de las zonas anteriores, no presenta heladas.

Generalmente la temporada de lluvias inicia a finales de abril pero suele interrumpirse durante mayo, se continúa durante los meses de junio y julio agudizándose en agosto y septiembre.

**Geología.** El suelo se ha formado por la sedimentación que proviene de la erosión pluvial y de la erosión eólica, dando como resultado la acumulación de tierra arcillo-arenosa, lo que permite el desarrollo de la vegetación.

Otro tipo del suelo característico del municipio se encuentra en la parte sur donde se observan sedimentos de arcilla negra que permite el desarrollo de actividades agrícolas. Así mismo, existe también una composición de tierra fina que dificulta su humectación, por lo que se recurre a la irrigación para la germinación de los vegetales.

**Edafología.** En el municipio existen suelos de tipo *andosol*, tierra oscura formada a partir de cenizas volcánicas de textura muy suelta y susceptible de erosionarse fácilmente, su rendimiento agrícola es bajo por la retención de fósforo.

En algunas otras porciones del territorio se presenta el suelo *feozem*, suelo rico en materia orgánica y nutrientes localizándose en zonas semiáridas y templadas, presentando susceptibilidad a la erosión, tierras muy buenas para actividades agrícolas de riego y temporal.

**Aprovechamiento actual del suelo.** El municipio de Villa Guerrero cuenta con una superficie total de 20772.58 Ha, las cuales están distribuidas en los tres diferentes usos: forestal con 11038 Ha, Urbano 989 Ha y Agropecuario 8746 Ha, de este último los principales productos que destacan son las flores de ornato que se cultivan como: clavel, crisantemo, gladiola, ave del paraíso, pospón, margarita polar, rosas, bugambilias, nardos, tulipanes, lirios y alcatraz entre los más importantes. Además se cultiva fresa, maíz, frijol, garbanzo, haba, lenteja, manzano, nogal, trigo, papa zanahoria, alfalfa, avena y cebada (GEM 2009).

### **Identificación del problema.**

Se sospechaba de suelos contaminados por las actividades agrícolas que se realizan cerca de la presa, así como del uso de sustancias peligrosas y los residuos que estas pueden generar, por lo que se realizaron visitas a la zona de estudio en la temporada de estiaje y lluvias con la finalidad de obtener información a través de las observaciones.

El suelo que se encontraba cerca de la Presa Tecualoyan presentaba coloraciones poco comunes en tonos ocres y rosas, los suelos referenciados para esta zona son andosol y feozem; la descripción física del primero corresponde a tierra oscura proveniente de cenizas volcánicas de textura muy suelta, lo cual no se apreciaba en la observación (ver Figuras 7, 8 y 9), para el caso del feozem la coloración debe ser oscura por su alto contenido de materia orgánica; en el caso de los cuerpos de agua A y B (Figuras 10 y 11) se logró observar que el perfil del suelo si correspondía con lo descrito por la referencia (GEM, 2009).

### **Generación de un mapa específico para la zona de estudio.**

Se generó un mapa de la zona que muestra los cuerpos de agua cercanos a la presa y su posición geográfica, además del relieve del lugar que explica una parte del transporte de los plaguicidas, así como la delimitación de la cuenca hidrológica. El mapa se puede apreciar en la Figura 12.



Figura 6. Vista general de la presa Tecualoyan.



Figura 7. Suelo con coloraciones ocres y rosadas en la entrada de la presa Tecualoyan.



Figura 8. Suelo con coloración ocre en el ingreso de la presa Tecualoyan.



Figura 9. Acercamiento del suelo para observar detalladamente la coloración.



Figura 10. Vista general del cuerpo de agua A.



Figura 11. Vista general del cuerpo de agua B.

SEGUIMIENTO DE LA REMOCIÓN DE PLAGUICIDAS EN UN REACTOR ANAEROBIO/AEROBIO A TRAVÉS DEL USO DE UN BIOMARCADOR

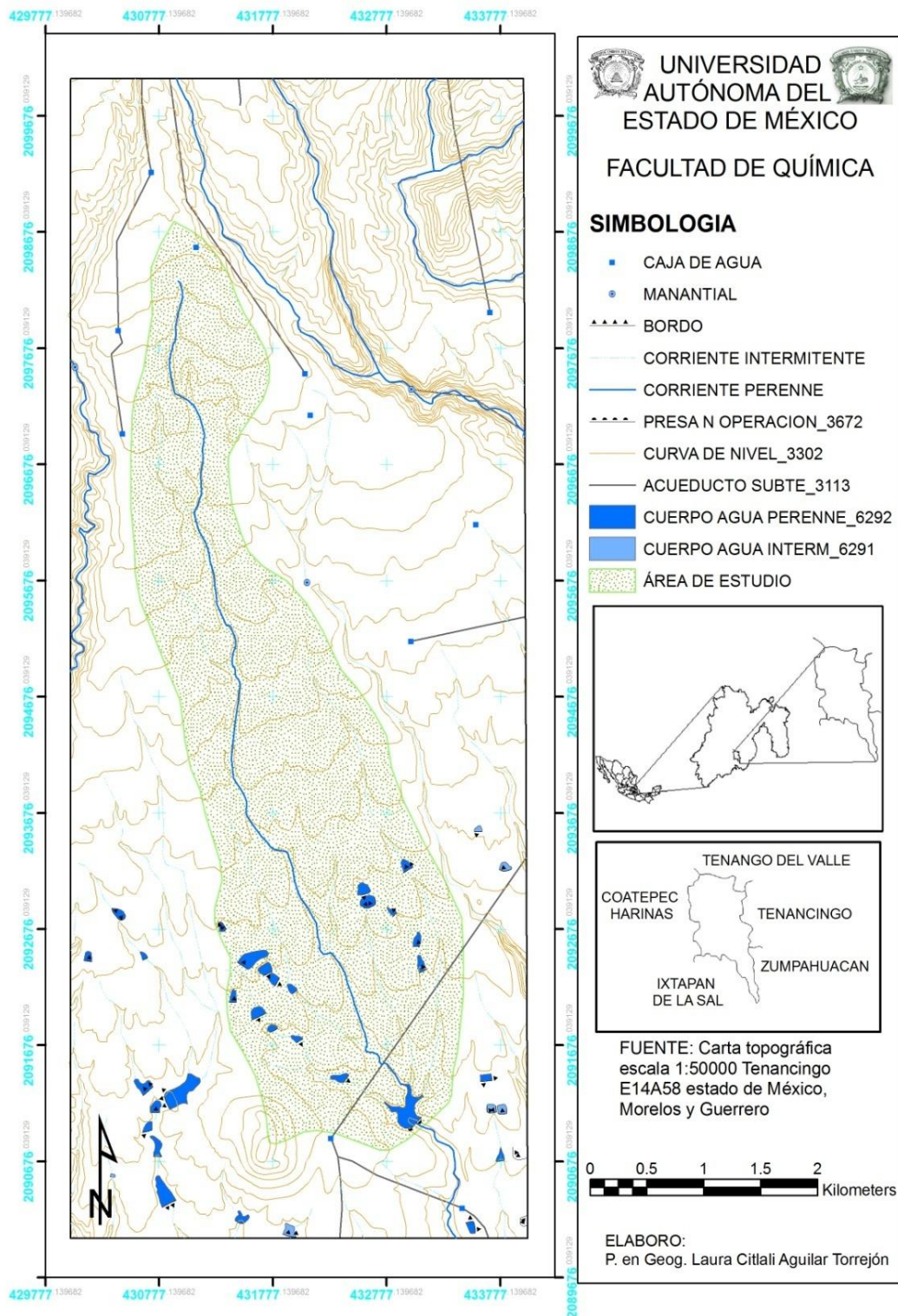


Figura 12. Mapa que referencia geográficamente la zona de estudio.

### **Aislamiento del consorcio microbiano anaerobio/aerobio proveniente del agua y sedimentos de la presa Tecualoyan.**

Las muestras de agua y sedimentos se sembraron en condiciones asépticas en placas de AN, TSA y PDA, sin embargo, las placas de PDA no presentaron crecimiento en ninguna de las repeticiones por lo que se reportó ausencia de hongos filamentosos.

Las placas de TSA mostraron el crecimiento de diferentes colonias las cuales fueron diferenciadas obteniendo un total de dieciocho cepas, de las cuales únicamente dieciséis fueron aisladas y caracterizadas macro y microscópicamente otorgándoles una clave alfanumérica. Las cepas cuya clave es un número se aislaron de la superficie del medio por lo que se sospechaba de su comportamiento aerobio estricto, las cepas identificadas con una letra fueron aquellas que presentaron un comportamiento microaerofílico o anaerobio facultativo.

Las cepas reportadas con un número y letra minúscula corresponden a cepas de difícil manejo y aislamiento debido a que se encontraban en algún tipo de asociación microbiana creciendo juntas complicando su aislamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Todas las cepas se incubaron a 35° C mostrando un buen crecimiento, sin embargo, una vez que se llevaban a cabo ciclos de incubación-refrigeración, la recuperación de las cepas era más exitosa.

Después de realizar las pruebas bioquímicas por el perfil microscópico y la respuesta que presentó cada cepa a la prueba de oxidasa y catalasa se determinaron los géneros *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Deinococcus*.

Tabla 6. Información general de la identificación de cepas del consorcio microbiano anaerobio/aerobio aislado de la presa Tecualoyan.

Cepa	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Afinidad al Gram
1a	Colonia plana, arborescente, blanca, libera pigmento al medio de cultivo	Bacilos anchos en cadena, presencia de gránulos metacromáticos	Positivo
1b	Colonia característica de actinomiceto	Bacilos alargados, en cadena, presencia de micelio microsifonado	Positivo
4	Colonia puntiforme amarilla, translúcida, con pigmentación en el medio de cultivo	Bacilos pequeños, delgados, sin agrupación	Negativo
5	Colonia blanca, opaca, cremosa, plana	Bacilos anchos y alargados, en cadena, forman un tipo de red	Positivo
6	Colonia circular con bordes definidos, rosada, translúcida	Bacilos pequeños sin agrupación	Negativo
8	Colonia seca, blanca, opaca	Bacilos en empalizada	Positivo
9	Colonia amorfa, plana, cerosa, blanca y opaca	Bacilos con espora central	Positivo
11	Colonia blanca, opaca, amorfa	Bacilos anchos en cadena, presencia de esporas central	Positivo
12	Colonia amorfa, elevada, blanca, translúcida mucosa	Bacilos alargados sin agrupación, probable presencia de cápsula	Negativo
13	Colonia blanca, cremosa, plana	Bacilos pequeños con espora central	Positivo
14	Colonia puntiforme, cremosa, opaca, anaranjada	Cocos en tétradas	Positivo
15	Colonia amorfa, seca, plana, blanca, opaca	Bacilos pequeños en empalizada	Positivo
A	Colonia arborescente, blanca opaca, plana y seca	Bacilos medianos anchos, presencia de gránulos metacromáticos	Positivo
B	Colonia arborescente, blanca no difunde pigmento al medio	Bacilos en cadena, probable presencia de gránulos	Negativo
C	Colonia amorfa, extendida, blanca, cerosa	Bacilos pequeños, anchos, presencia de gránulos	Positivo
D	Colonia blanca, cremosa, translúcida	Bacilos pequeños en letras chinas	Negativo



### 3.2 Resultados de la Etapa II: Determinación de la presencia de plaguicidas.

#### Determinación de la presencia de plaguicidas OF y CA en las muestras de agua y sedimentos provenientes de la zona de estudio.

Se obtuvieron en total siete muestras de agua correspondientes a la Presa Tecualoyan, los cuerpos de agua A y B, tres bordos y una de toma directa para riego, en el lugar se midieron los parámetros de pH, temperatura y conductividad. Una vez en laboratorio se determinó la presencia de los plaguicidas a través del biomarcador.

De cada cuerpo de agua que se muestreó, se intentó obtener a la par una muestra de sedimento, sin embargo, no se logró el objetivo para con todas, a continuación en la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de los plaguicidas en sedimentos y agua.

Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas e inhibición de la actividad colinesterásica para las muestras de agua y sedimentos.

No muestra	Muestra	% Inhibición de AChE		pH	CE (□s)	Temp (°C)
		Agua	Sedimento			
1	Basal	0	0	--	--	--
2	Presa Tecualoyan	0.26	-3.07	7.18	232	19
3	Bordo 1	-20.45	-4.39	8.34	188.2	19.6
4	Bordo 2	4.57	ND	7.87	199	19.6
5	Bordo 3	-6.19	ND	8.38	151.8	19.7
6	Cuerpo de agua A	-27.72	-16.23	7.79	184.5	23.7
7	Cuerpo de agua B	-7.80	-10.53	8.17	199	21.1
8	Toma de invernadero	-16.95	ND	7.86	350	21

ND: No Determinado

Los resultados para las muestras 3,5,6,7 y 8 mostraron que no se presentó una inhibición de la actividad colinesterásica, los valores se encuentran con un signo negativo por las partículas disueltas que se encontraban en el agua. Los valores obtenidos para la Presa Tecualoyan muestran una inhibición de la actividad enzimática poco significativa a diferencia del Bordo 2 donde si se observa claramente la presencia de plaguicidas OF y CA.

**Curvas patrón del biomarcador para los plaguicidas metomilo, dimetoato y la mezcla de ambos.**

En la Figura 13 se puede observar la comparación del porcentaje de inhibición de la actividad colinesterásica ocasionada por el plaguicida metomilo, dimetoato y la mezcla de ambos. Las curvas se iniciaron con una concentración de 10 mg/mL llevando a cabo repeticiones por triplicado para cada una. La inhibición del plaguicida metomilo en la concentración más alta (10 mg/mL) inhibe un 53 % de la actividad colinesterásica a diferencia del dimetoato que inhibe 59 %, sin embargo, la mezcla de los dos plaguicidas sufre un efecto sinérgico al incrementar la inhibición hasta un 90 % en la misma concentración presentando mayor inhibición de la enzima acetilcolinesterasa en las diferentes diluciones.

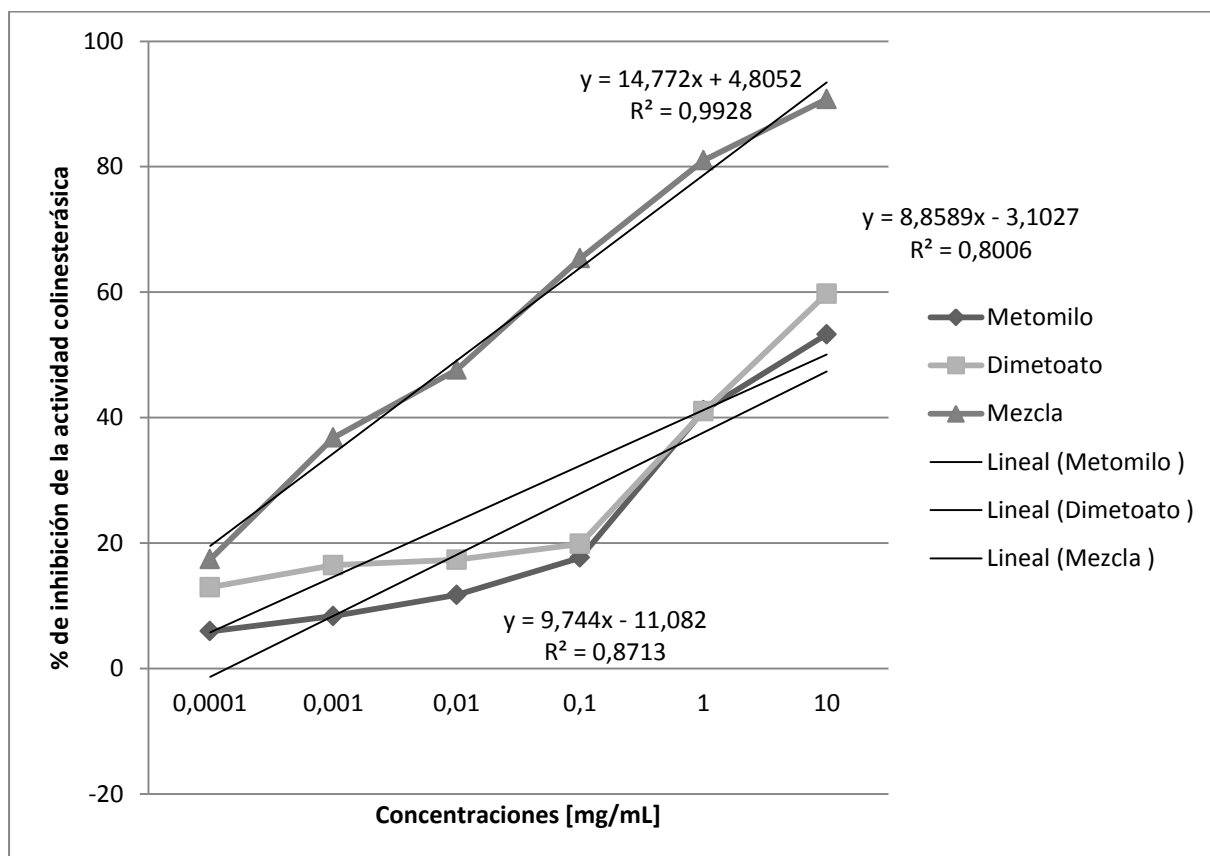


Figura 13. Curvas patrón del biomarcador para los plaguicidas metomilo (CA), dimetoato (OF) y la mezcla de ambos.

Los resultados mostraron que únicamente la curva patrón de la mezcla sigue un modelo lineal, para el caso del dimetoato, se considera su linealidad en las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mg/mL, previo a esas concentraciones, el biomarcador es capaz de determinar la presencia pero no es lo suficientemente

sensible para determinar la diferencia entre ellas; el metomilo sin embargo, logra que el biomarcador identifique una diferencia entre las concentraciones pero tampoco se observa la linealidad de la curva patrón.

### Degradación de los plaguicidas metomilo y dimetoato con respecto al tiempo.

Se trabajaron dos condiciones diferentes: en presencia y en ausencia de luz, la finalidad de este ensayo fue determinar las condiciones específicas para el uso del reactor en la biotransformación de los plaguicidas con respecto al tiempo de retención y factores abióticos que puedan afectar el proceso como la hidrólisis y fotólisis. Los resultados se muestran en la Figura 14 y Figura 15.

La concentración del plaguicida fue de 10 mg/mL tomando muestras a las 0, 6, 24, 48, 72 y 120 horas.

Los resultados mostraron que en ambos plaguicidas disminuye la inhibición de la actividad colinesterásica más rápido cuando se encuentra expuesto a la luz lo que indica una posible descomposición del compuesto por fotólisis e hidrólisis.

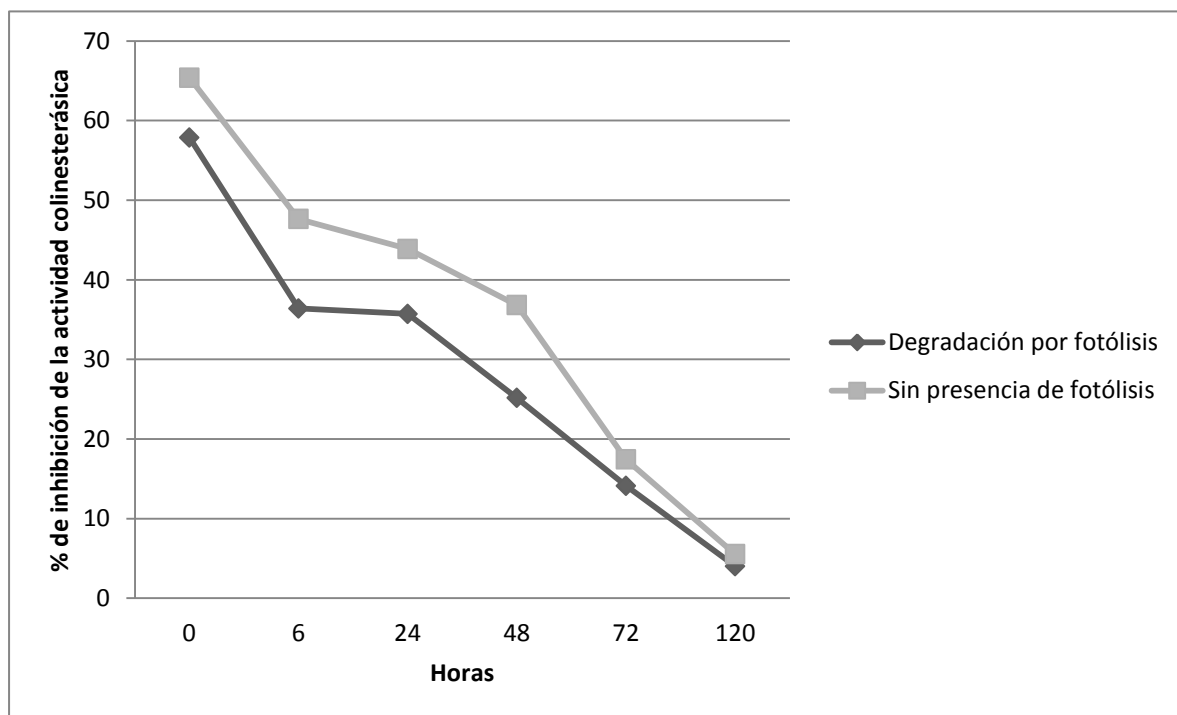


Figura 14. Degradación del plaguicida metomilo con respecto al tiempo en presencia y ausencia de fotólisis.

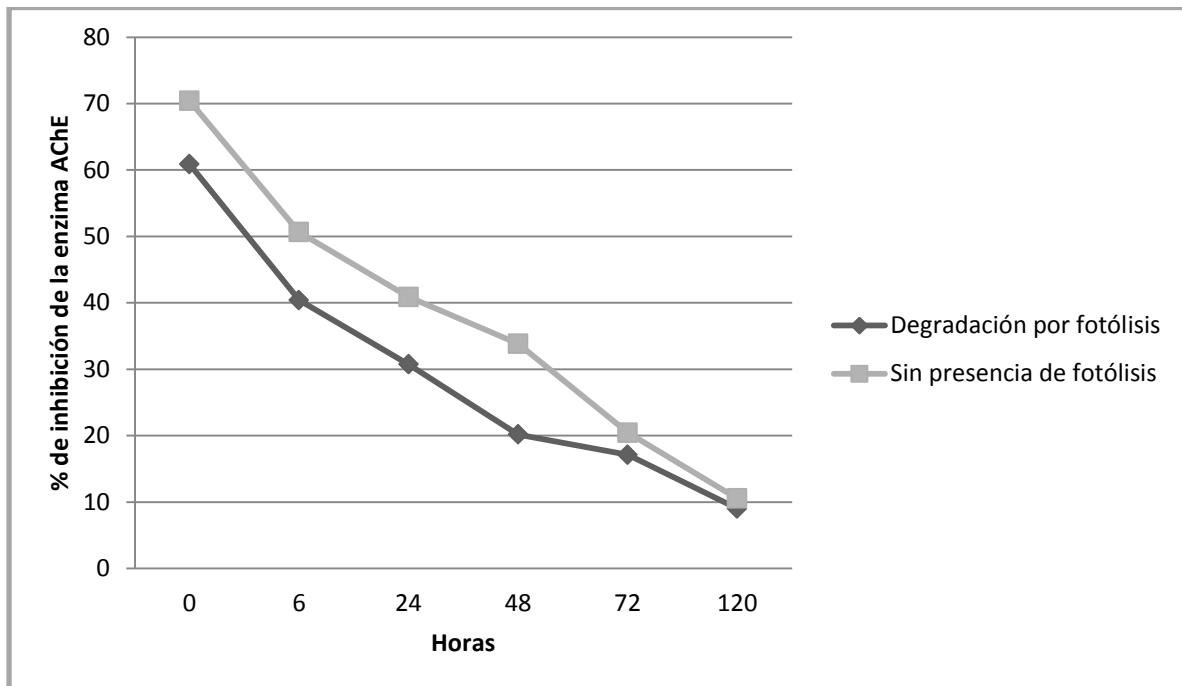
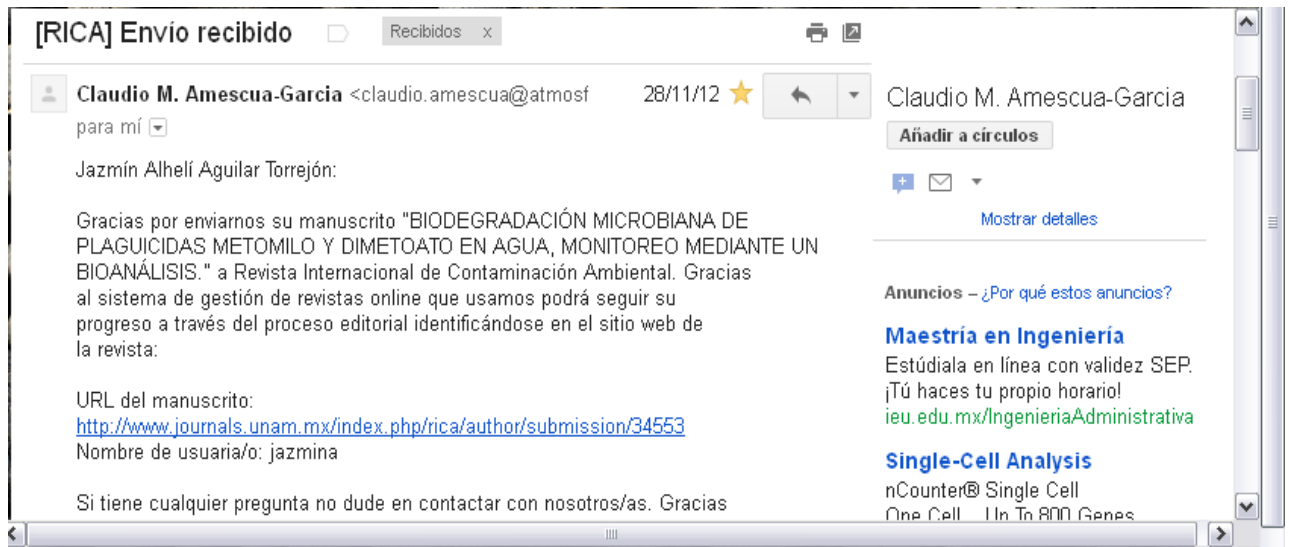


Figura 15. Degradación del plaguicida dimetoato con respecto al tiempo en presencia y ausencia de fotólisis.

### 3.3 Etapa III. Remoción de la mezcla de plaguicidas en el reactor anaerobio/aerobio.

Los resultados correspondientes a este apartado se muestran en el artículo enviado a la Revista Internacional de Contaminación Ambiental, a continuación se muestra el acuse de recibido por parte de los editores de la Revista.

SEGUIMIENTO DE LA REMOCIÓN DE PLAGUICIDAS EN UN REACTOR ANAEROBIO/AEROBIO A TRAVÉS DEL USO DE UN BIOMARCADOR



BIODEGRADACIÓN MICROBIANA DE PLAGUICIDAS METOMILO Y DIMETOATO  
EN AGUA, MONITOREO MEDIANTE UN BIOANÁLISIS.

Jazmín A. AGUILAR-TORREJÓN<sup>1</sup>, Juan Carlos SÁNCHEZ-MEZA<sup>1</sup>, Víctor PACHECO-SALAZÁR<sup>1</sup>, Carlos AGUILAR-ORTIGOZA<sup>2</sup> y Lidia SANDOVAL-FLORES<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Química Paseo Colón esquina Paseo Tolloca SN, CP 50120, Toluca Estado de México. jazaguitt@gmail.com

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias. Instituto Literario No. 100, Toluca, Estado de México.

Palabras Clave: bioanálisis, colinesterasa, columna de tratamiento, biodegradación.

**RESUMEN.**

Se evaluó la capacidad de un consorcio microbiano de dieciséis cepas proveniente de una zona contaminada con plaguicidas organofosforados y carbamatos para remover una mezcla de metomilo (*S*-metil (*EZ*)-*N*-(metilcarbamoiloxi)tioacetimidato) y dimetoato (*O,O*-dimetil *S*-metilcarbamoilmetil fosforoditioato) de concentración 1.0 mg/mL en un sistema tipo batch; el monitoreo se realizó a través del uso de un bioanálisis enzimático (inhibición de la enzima acetilcolinesterasa) capaz de detectar concentraciones de hasta 0.00001 mg/mL del contaminante. Se obtuvieron porcentajes de remoción mayores a 50 % en un tiempo de 120 horas, la degradación de la mezcla de plaguicidas generó productos menos tóxicos que los originales y se encontraron seis cepas bacterianas de importancia susceptibles de sobrevivir y utilizar estos compuestos como fuente de energía.

Key words: cholinesterase bioassay, column treatment, biodegradation.

**ABSTRACT**

The ability of a microbial consortium of sixteen strains from a contaminated area with organophosphate and carbamate pesticides was determined. This consortium was used to treat a methomyl (*S*-methyl (*EZ*)-*N*-(methylcarbamoiloxy) thioacetimidate) and dimethoate (*O, O*-dimethyl *S*-methylcarbamoilmethyl phosphorodithioate) mixture on concentration 1.0 mg / mL in a batch type system, monitoring is done through the use of an enzyme bioassay (cholinesterase) able to detect concentrations up to 0.00001 mg / mL of the mixture. Results indicated that greater

than 50 % was remove by the treatment over a time of 120 hours, the degradation of the pesticide mixture generated less toxic molecules than the original; six bacterial strains were susceptible to survive importance and use of these compounds as energy source.

## INTRODUCCIÓN.

Los plaguicidas son productos de síntesis donde además del principio activo se encuentran impurezas, emulsificantes, solventes y aditivos de toxicidad no despreciable. Debido a su toxicidad instrínseca, y nula selectividad, los plaguicidas pueden poner en riesgo el medio ambiente, a organismos no blanco y causar lesiones agudas y crónicas en la salud humana (Cárdenas *et al.*, 2005)

El metabolismo final de los plaguicidas depende de las condiciones abióticas del ambiente (temperatura, mezcla, suelo, pH, etc.), comunidades microbianas o especies de plantas (ó ambas) características del plaguicida (hidrofilía, pKa/b, Kow, etc.), y de reacciones químicas y biológicas. La degradación abiótica se debe a las transformaciones físicas y químicas del plaguicida por procesos como fotólisis, hidrólisis, oxidación, reducción, y reacomodo de las moléculas. Además, los plaguicidas pueden no estar biodisponibles por compartimentación, lo cual ocurre como resultado de la alteración de la estructura química de la molécula original (Van Eerd *et al.*, 2003).

Todos los derivados fosfóricos presentan un modo de acción primario semejante, definida de modo general, puede decirse que en los insecticidas organofosforados la acción tóxica específica tiene lugar a nivel sináptico, en donde al enlazarse en forma covalente con la acetilcolinesterasa inhiben su actividad enzimática normal de hidrólisis de acetilcolina, lo que da como resultado la acumulación excesiva de este neuro transmisor y en consecuencia una estimulación sostenida de los órganos efectores colinérgicos (Badii y Varela, 2008).

Los organofosforados inhiben la función de la colinesterasa al formar un complejo enzima-inhibidor irreversible. Este complejo se puede degradar espontáneamente permitiendo que la enzima sea reactivada o puede ir a un proceso llamado envejecimiento esta es una reacción de dealquilación dependiente de tiempo que resulta en una inactivación irreversible de la enzima El proceso de envejecimiento es variable y puede ser medido en minutos, horas o días dependiendo del compuesto organofosforado, ya que entre más lipofílico sea, mayor será la unión a la enzima.

Los carbamatos tienen un mecanismo de acción similar a los organofosforados, sin embargo, son dos las características farmacocinéticas que los diferencian: 1) No sufren el proceso de envejecimiento, por lo cual, la unión entre el tóxico y la

colinesterasa es reversible, permitiendo una reactivación espontánea de la enzima después de una variable de tiempo dependiendo del producto, por lo general no mayor a 24 horas; y 2) Los carbamatos no cruzan de forma fácil la barrera hematoencefálica (Plazas y Olarte, 2011).

Los biosensores han sido desarrollados como métodos analíticos, cuantitativos o semicuantitativos para detectar determinados analitos o compuestos específicos, y más recientemente para la detección de efectos de contaminación por agentes químicos en el ambiente. El término biosensor se aplica a un sistema analítico que acopla un elemento biológico sensible asociado a un sistema de transducción, el cual permite detectar y medir de manera rápida, proporcional, precisa y sensible la señal producida por la interacción del elemento biológico y la sustancia de interés. Un bioanálisis constituye procedimientos que emplean diversos materiales vivos para estimar la toxicidad potencial de una sustancia o de una matriz contaminada (Castro-Ortiz *et al.*, 2007) incluye cualquier medida que refleja una interacción entre un sistema biológico y un agente liberado al medio ambiente, el cual puede ser físico químico o biológico (Sánchez-Meza, 2009).

La inhibición *in vitro* de la enzima colinesterasa por plaguicidas organofosforados y carbamatos provee una herramienta como indicador de ambientes contaminados. Mediante la medición de la actividad colinesterásica empleando la reacción modificada de Ellman, la cual ya se ha utilizado en muestras de agua de lluvia y en suelo (Milla-Cotos y Palomino-Horna, 2002; Arduini *et al.*, 2006; Sánchez-Meza *et al.*, 2009).

Cuando se evalúa el peligro que representan mezclas complejas de plaguicidas organofosforados y carbamatos, la determinación de la concentración y por consecuencia toxicidad de un plaguicida en particular resulta insuficiente ya que no se toman en cuenta los efectos derivados de la combinación de sustancias. Asimismo, los efectos tóxicos de sus metabolitos no son reconocidos cuando solo se analiza el compuesto original. Por ello un enfoque más adecuado resulta de medir la potencia tóxica integrada que representa una mezcla compleja de plaguicidas a través del uso de bioensayos que permitan la identificación y cuantificación de puntos finales relevantes de toxicidad (Sánchez-Meza 2009)

Diversos estudios sobre la degradación de plaguicidas a través del uso de microorganismos capaces de utilizarlos como fuente de energía han mostrado que son una manera fácil, económica y segura de tratar este tipo de contaminantes, sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se realizan *in vitro* bajo el supuesto de que el contaminante se encuentra en estado químicamente puro y sin



interferencia de cualquier otro compuesto (Castrejón-Godínez *et al.*, 2001; Lopera-Mesa *et al.*, 2005; Zeinat *et al.*, 2008; Ortíz-Hernández *et al.*, 2010).

Se han utilizado microorganismos para degradar plaguicidas organofosforados con cepas bacterianas de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella* y *Flavobacterium*, en el caso de cepas fúngicas *Aspergillus* y *Fusarium* aisladas de zonas cercanas a cultivos donde se vierten este tipo de compuestos (Castrejón-Godínez *et al.*, 2001); los ensayos han alcanzado porcentajes de remoción mayores a 50 % a partir de concentraciones iniciales de 300 mg/Kg de suelo, utilizando al plaguicida como única fuente de carbono, nitrógeno o fósforo para incrementar la masa microbiana en periodos tiempos cortos (Kanekar *et al.*, 2004).

La presencia de contaminantes induce la selectividad y la disminución de la diversidad microbiana convirtiendo el ambiente contaminado en potencial fuente de microorganismos. En estos ambientes contaminados, los microorganismos tolerantes a este factor de estrés desarrollan y utilizan respuestas enzimáticas y fisiológicas especializadas de manera natural, degradando el contaminante presente en el suelo (Botero *et al.*, 2011).

El presente artículo tiene como objetivo demostrar la utilidad del bioanálisis enzimático de colinesterasa en el seguimiento de la remoción de una mezcla de plaguicidas en agua en una columna de tratamiento utilizando además un consorcio microbiano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Construcción del consorcio bacteriano

Se obtuvo un consorcio bacteriano procedente de la Presa Tecualoyan (18°54'43.5" latitud N y 99°38'10.8" longitud W a 1910 msnm), ubicada en el municipio de Villa Guerrero, Estado de México. El cuerpo de agua fue seleccionado por su cercanía con invernaderos que utilizan plaguicidas de las familias organofosforados y carbamatos como lo reveló la entrevista que se realizó a los productores de la zona.

El consorcio microbiano se aisló de muestras de agua y sedimento por la técnica de dilución en tubo y vaciado en placa sembrando en medios nutritivos, las colonias encontradas se caracterizaron por su morfología colonial y microscópica obteniendo un total de dieciséis cepas que se mantuvieron en cultivo puro. Los géneros identificados correspondieron a *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Deinococcus* y *Corynebacterium*.

### **Preparación del inóculo microbiano de concentración conocida.**

Cada cepa se sembró por separado y en duplicado en placas de Agar Nutritivo por estría cerrada, se incubaron por 24 horas, posteriormente se cosechó a través de la adición de 3 mL de solución de NaCl al 0.85 % en placa hasta obtener turbiedad en los cultivos líquidos de 100mL por cepa. Se sembró cada una por dilución y vaciado en placa hasta obtener cuentas del orden de  $10^6$  UFC/mL. Con el conteo de todas las cepas se preparó un inóculo de 100mL con concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL con el que se llevó a cabo la prueba de degradación de la mezcla de plaguicidas.

### **Construcción y preparación de las columnas.**

Se construyeron dos contenedores cilíndricos de PVC (60 cm de altura y 10.16 cm de diámetro) con capacidad de 5 L, con un lecho de grava y arcilla expandible (perlita) de 25 cm de alto en cada uno. Posteriormente se adicionó agua proveniente de la Presa Tecualoyan esterilizada por método de microfiltración para no alterar sus características fisicoquímicas, se debe estabilizar la columna por al menos 48 horas. Al primer contenedor se le adicionó una mezcla de 0.1 mg/L de la mezcla de metomilo y dimetoato además de los 100 mL de inóculo microbiano  $1 \times 10^6$  UFC/mL, al segundo contendor fue el control donde se manejaron las mismas condiciones pero no se adicionó el inóculo microbiano.

### **Evaluación de la actividad colinesterásica.**

#### **Control del Bioanálisis**

Se prepararon una serie de diluciones de 10 hasta 0.00001 mg/mL para el plaguicida metomilo (carbamato) y dimetoato (organofosforado) en matraces volumétricos de 10 mL protegidos de la luz dejándolos sobre una cama de hielo. Se adicionaron 3 mL de la solución de trabajo de ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB, Sigma-Aldrich) a un tubo de ensayo, 0.02 mL de suero de ratón (obtenido por punción cardíaca con anestesia con éter momentos antes de comenzar con el ensayo) y 0.05 mL de la dilución de plaguicida a determinar, se incubó a 25 °C durante 10 minutos, enseguida se adicionaron 0.05 mL de yoduro de acetiltiocolina (Sigma-Aldrich), se agitó rápidamente y se leyó en un espectrofotómetro Genesys 10UV a 405 nm considerando una lectura por minuto durante 3 minutos. El blanco se construyó únicamente con la solución de trabajo de DTNB y el yoduro de acetiltiocolina, la actividad basal del suero se determinó con la solución de DTNB, el suero de ratón y el yoduro de acetiltiocolina.

Para la segunda prueba control del bioanálisis, se preparó una mezcla de metomilo con dimetoato en concentración 10 mg/mL, se vertió la solución en un vaso de precipitado protegido de la luz y tapado colocándolo en agitación constante por 196 horas. Se tomaron muestras en intervalos de 24 horas para determinar con la metodología anteriormente descrita la inhibición de la actividad colinesterásica con respecto al tiempo.

### **Degradación de los plaguicidas en la columna.**

En ambas columnas (control y prueba) se tomaron muestras a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Las muestras se filtraron con un filtro de jeringa de acetato de celulosa para eliminar las interferencias como presencia de microorganismos y restos de arcilla. En un tubo de ensaye se colocaron 3 mL de solución de trabajo de DTNB, se adicionaron 0.02 mL de suero de ratón y 0.05 mL de la muestra filtrada, se incubaron en baño María 10 minutos a 25 °C y posteriormente se les adicionó 0.05 mL de yoduro de acetiltiocolina y se leyeron en espectrofotómetro a 405 nm durante tres minutos tomando lecturas cada minuto. El blanco se construyó únicamente con la solución de trabajo de DTNB y el yoduro de acetiltiocolina, la actividad basal del suero se determinó con la solución de DTNB, el suero de ratón y el yoduro de acetiltiocolina.

Además se tomaron muestras para el análisis microbiológico. Cada muestra se diluyó en serie hasta obtener la dilución  $10^{-5}$  y se sembraron por vaciado en placa, se incubaron a 35 °C y posteriormente se contaron y caracterizaron nuevamente para obtener las cepas sobrevivientes.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Consortio microbiano.**

Los resultados de la sobrevivencia de microorganismos del consorcio bacteriano, en la mezcla de plaguicidas dimetoato y metomilo se muestran en la **Tabla I**; de las dieciséis cepas que conformaron el consorcio, nueve desaparecieron a lo largo del tratamiento. Las bacterias identificadas con actividad metabólica sobre la mezcla de metomilo y dimetoato fueron *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas* sp, *Deinococcus* sp, *Corynebacterium nebraskense* y una variedad de *Bacillus alvei*, estos organismos también han mostrado capacidad de degradar compuestos contaminantes como los plaguicidas organofosforados utilizándolos como fuente de energía, en suelos agrícolas y de manera experimental (Castrejón-Godínez *et al.*, 2001; Kanekar 2004; Ortíz-Hernández *et al.*, 2010; Yáñez *et al.*, 2007; Zeinat *et al.*, 2008). La especie que mayor actividad y sobrevivencia mostró fue *Pseudomonas fluorescens*.

### **Características de la columna de tratamiento.**

El esquema de la columna de tratamiento, se puede apreciar en la **Figura 1**. El pH de ambas columnas, se mantuvo neutro en un rango no mayor de 7.5, lo que sugiere condiciones adecuadas para el crecimiento microbiano, no así para llevar a cabo la hidrólisis alcalina de los plaguicidas como lo han reportado otros autores (Fuentes-Matus *et al.*, 2010, Kanekar 2004, Sánchez-Meza *et al.*, 2010). Sin

embargo, el sistema de tratamiento resulto eficaz para disminuir diez veces la concentración inicial de la mezcla en un periodo de cinco días considerando que los tiempos de vida para metomilo y dimetoato son de seis y ocho días respectivamente.

### **Actividad colinesterásica**

#### **Curvas control.**

El Dimetoato es el plaguicida que inhibe la actividad colinestrásica en mayor porcentaje que el metomilo cuando se utilizan de manera individual como se muestra en la figura 2, lo anterior coincide con lo reportado en la literatura (Milla-Cotos y Palomino-Horna, 2002; Plazas y Olarte, 2011), debido a que son los primeros compuestos que forman un complejo irreversible con la enzima, que puede llevar al proceso de envejecimiento. En el primer paso, la parte ácida del plaguicida se incorpora covalentemente en el sitio activo de la enzima, mientras que se libera su fracción alcohólica. En el segundo paso, una molécula de agua libera la parte ácida del plaguicida, dejando la enzima libre y, por lo tanto, reactivada. Este proceso de reactivación dura menos tiempo con los carbamatos al permitir la reactivación espontánea de la enzima, mientras que con los organofosforados puede ser mucho más prolongado e incluso llegar a ser irreversible. Una vez que los plaguicidas se mezclaron, la inhibición de la actividad colinesterásica se incrementó lo que sugiere un mecanismo de sinergia entre los dos compuestos trabajados potenciando la efectividad de la mezcla (Fig.3).

#### **Monitoreo de la degradación de la mezcla de plaguicidas en la columna de tratamiento.**

Se monitorearon las columnas prueba y control en intervalos de 24 horas a través del uso del bioanálisis como se puede observar en la **Figura 4**. Los resultados muestran una rápida disminución en la inhibición de la actividad colinesterásica en la columna de prueba que contiene el consorcio bacteriano.

Como lo explican Van Eerd y col. (2003), el primer paso en la biodegradación de plaguicidas se relaciona con reacciones de oxidación mediadas por enzimas como el citocromo P450 presente en plantas, animales y bacterias. En los plaguicidas organofosforados, cuando el átomo que se une al fósforo con el doble enlace es el oxígeno, el compuesto se denomina oxón, y es un potente inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa y de otras esterases, sin embargo, con el oxígeno en esta posición, también se favorece la hidrólisis del compuesto, especialmente bajo condiciones alcalinas (Fuentes-Matus *et al.*, 2010).

Los factores que se deben considerar en la remoción de este tipo de compuestos son pH, temperatura, y el tipo de medio de dispersión. En un rango de pH de 7 a 11,

la degradación de dimetoato depende de la alquilación del medio más que del tiempo de almacenamiento. Los metabolitos resultantes de estas alquilaciones como el dimetil fosfato y dimetil fosforotioato ocasionalmente no pueden ser utilizados por los microorganismos como fuente de fósforo (Kanekar, 2004).

En el control se observó la participación activa de los factores abióticos como hidrólisis, oxidación y adsorción en el monitoreo de la degradación de los plaguicidas, los porcentajes de inhibición de la actividad colinesterásica comenzaron a disminuir en menor grado que en la columna con presencia del consorcio bacteriano, sin embargo, cabe señalar que en el caso de la columna control el pH se mantuvo más estable (**Fig. 5**) debido a que no existieron transformaciones tan severas de las moléculas como las ocurridas con la presencia de microorganismos, como coincide con lo reportado por Calva y Torres (1998).

### CONCLUSIONES.

Del consorcio microbiano de dieciséis cepas, siete de ellas mostraron capacidad de crecimiento y actividad sobre la mezcla de metomilo y dimetoato; las cepas con mayor crecimiento corresponden a *P. fluorescens*, *C. nebraskense*, *Aeromonas sp* y *Deinococcus sp*.

El tipo de columna de tratamiento de tipo batch con capacidad de 5 litros con lecho de grava y perlita es adecuado al otorgar las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento del consorcio microbiano, sin embargo, es posible mejorar las características del equipo para aumentar la eficiencia del tratamiento.

El análisis de inhibición colinesterásica informa en tiempo real y por concentración de plaguicidas de manera individual o mezclada, por lo que es una herramienta adecuada y económica en el monitoreo del tratamiento de agua contaminada con Dimetoato y Metomilo; además de que permite evaluar si los metabolitos resultantes son menos tóxicos que las moléculas originales.

La biodegradación de los plaguicidas depende también de los factores abióticos como la hidrólisis y el pH para lograr que los compuestos se encuentren más biodisponibles para los microorganismos, sin embargo, el uso de estos permite incrementar la presencia de metabolitos menos tóxicos para el ambiente, además de que permite tratar el agua contaminada con compuestos organofosforados y carbamatos para una biodegradación eficiente.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo de la beca de CONACYT para estudios de posgrado; al departamento de Microbiología de la Facultad de Química UAEMéx y su jefe el MSSP Sergio Humberto Pavón Romero y al laboratorio de Investigación en Toxicología de la misma Universidad.

## REFERENCIAS

Anzola, R. M., Oliveira N. A. y Zaiat M. (2008). Actividad metanogénica específica en un reactor anaerobio - aerobio aplicado al tratamiento de agua residual doméstica. *INCI*. Abril 2008, vol.33, no.4, 284-289.

Arduini F., Ricci F., Tuta C. S., Mascone D. M., Amine A., Palleschi G. (2006). Detection of carbamic and organophosphorous pesticides in water samples using cholinesterase biosensors based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode. *Analytical Chimica Acta* 580, 155-162.

Atlas Ronald M. (2000). *Microbiología Fundamentos y Aplicaciones*. Compañía Editorial Continental. México. 77-79.

Badii, Mohammad H y Varela S. (2008). Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la Salud y el Ambiente. *CULCyT. Toxicología de Insecticidas*. Año 5, No.28.

Botero, L. R., Nagles N., Quintero J.C., Peñuela G. A. (2011). Efecto de la concentración de metil paratión y el extracto de levadura como factores de selección de microorganismos degradadores del pesticida a partir de suelos contaminados. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, vol. 10, No. 19, 13-20.

Calva, L.G y Torres M. R. (1998). Plaguicidas Organoclorados. *ContactoS* 30: 35 – 46.

Cárdenas, O., Silva E., Morales L., Ortiz J. (2005). Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001. *Biomédica* 2005; 25: 170-80.

Castrejón Godinez M.L, Sánchez Salinas E., Ortiz Hernández M. L. (2001). Crecimiento de bacterias aisladas de suelos agrícolas sobre plaguicidas organofosforados como sustrato. En: Congreso Nacional de Bioingeniería, Veracruz México 2001.

Castro-Ortíz L. P., Luna-Pabello V. M., Villalobos-Pietrini R. (2007). Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23 (1) 35-45.

Fuentes-Matus C., Vega y León S., Díaz-González G., Noa-Pérez M., Gutiérrez-Tolentino R. (2010). Determinación de residuos de malatión y malaoxón en mango de las variedades Ataulfo y Tommy Atkins producidos en Chahuities, Oaxaca. *Agrociencia* 44: 215-223.

Garzón J. C. y Barragán H. B. E. (2008). Inmovilización microbiana: técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista Sistemas Ambientales*, 2, 23-34

Kanekar, P. P., Bhadbhade B. J., Deshpande N. M., Sarnaik S. S. (2004). Biodegradation of organophosphorus pesticides. *Proc. Indian natn Sci Acad.* B70 No.1 57-70.

Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I., Marchant, R., Koutinas, A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. 21 : 377-397.

Lopera- Mesa M., Peñuela- Mesa G. A., Domínguez -Gual C. y Mejía- Zapata G. (2005). Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo utilizando *Phanerochaete chrysosporium*. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad Antioquia*. Junio número 033 58-69.

McCarthy J. F. y Shugart L.R. (1990). *Biomarkers of environmental contamination*, Lewis Publ., Boca Raton, Florida. 457 p.

Milla-Cotos O. M, Palomino-Horna W. R. (2002). Niveles de colinesterasa sérica en agricultores de la localidad de Carapongo (Perú) y determinación de residuos de plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa en frutas y hortalizas cultivadas. Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú. 100 p.

Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología*. 67:61-72.

Ortiz- Hernández M.L. and Sánchez- Salinas E. (2010). Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26 (1) 27-38.

Plazas H.C.D. y Olarte M.F. (2011). Intoxicación por inhibidores de la colinesterasa (organofosforados y carbamatos) en niños y adolescentes: revisión de la literatura y guía de manejo. *Acta Colombiana de Cuidados Intensivos*; 11(1): 26-33.

Romero C. A. (2006). Comparación de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa en dos soportes de inmovilización y valoración de la inhibición producida por plaguicidas carbámicos y organofosforados. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Toluca México.

Sánchez-Meza J. C. (2009) Identificación de la presencia de plaguicidas organofosforados y carbámicos en suelos a través de la medición del grado de inhibición de la actividad colinesterásica en suero de ratón y suelo. En: Curso Taller

teórico-práctico “Técnica de Evaluación de Biomarcadores”. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla México, Abril 2009.

Sánchez-Meza J. C., Ávila-Pérez P., Borja-Salín M., Pacheco-Salazar V. F., Lapoint T. (2010). Inhibition of cholinesterase activity by soil extracts and predicted environmental concentrations (PEC) to select relevant pesticides in polluted soils. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 45, 214-221.

Van- Eerd L., Hoagland E. R., Zablotowicz M. R., Hall C. J. (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science*, 51:472–495.

Yáñez- Ocampo, Sánchez- Salinas E. y Ortíz- Hernández M.L. (2007). Degradación de plaguicidas organofosforados utilizando bacterias inmovilizadas sobre tezontle. En: XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Morelia Michoacán 25 al 29 de junio de 2007.

Zeinat- Kamal M., Nashwa A.H. Fetyan A., Mohamed A. Ibrahim, Sherif El-Nagdy. (2008) Biodegradation and Detoxification of Malathion by of *Bacillus Thuringiensis* MOS-5. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3): 724-732.

### CUADROS Y FIGURAS

Cepa / Horas	Sobrevivencia (10 <sup>6</sup> UFC/mL)					
	0	24	48	72	96	120
<i>Bacillus alvei</i>	1	2.3	2.3	0.32	0.34	0.34
<i>Bacillus brevis</i>	1	2.2	2.2	0.31	0.32	0.32
<i>Bacillus globisporus</i>	1	0.7	0.7	0.7	0.7	0.5
<i>Bacillus coagulans</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus megaterium</i>	1	1	0.7	0.6	ND	ND
<i>Bacillus circulans</i>	1	0.05	0.02	0.007	0.005	ND
<i>Bacillus brevis</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Bacillus laterosporius</i>	1	0.9	0.05	ND	ND	ND
<i>Bacillus pumilus</i>	1	1	1	0.5	0.03	ND
<i>Bacillus firmus</i>	1	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	0.0003	ND	ND	ND	ND
<i>Corynebacterium mycetoides</i>	1	0.004	0.0008	ND	ND	ND
<i>Corynebacterium nebraskense</i>	1	2.2	2.2	2.3	2.3	2.5
<i>Deinococcus sp.</i>	1	2	2	2.2	2.2	2.4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	2.5	2.5	2.7	2.7	3
<i>Aeromonas sp.</i>	1	1.5	2.2	2	2.3	2.3

Tabla I.



SEGUIMIENTO DE LA REMOCIÓN DE PLAGUICIDAS EN UN REACTOR ANAEROBIO/AEROBIO A TRAVÉS DEL USO DE UN BIOMARCADOR

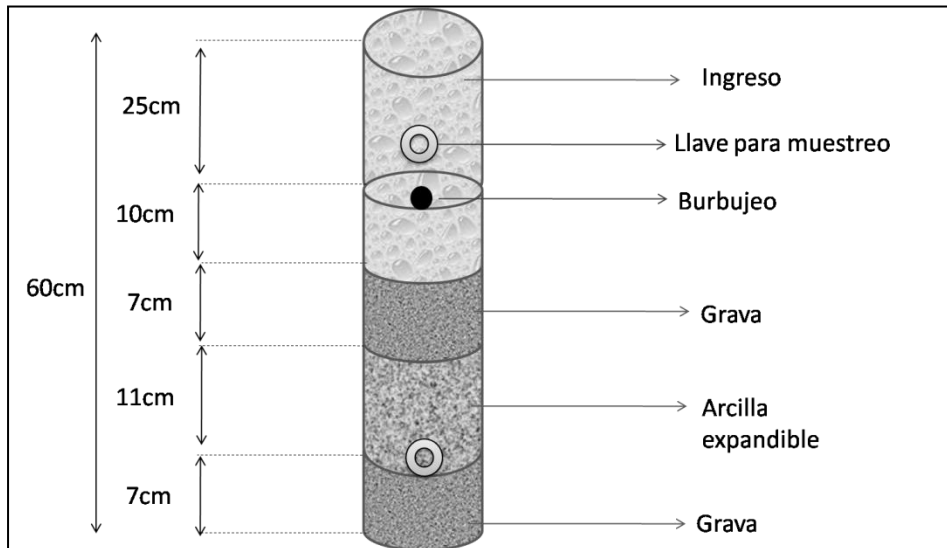


Figura 1.

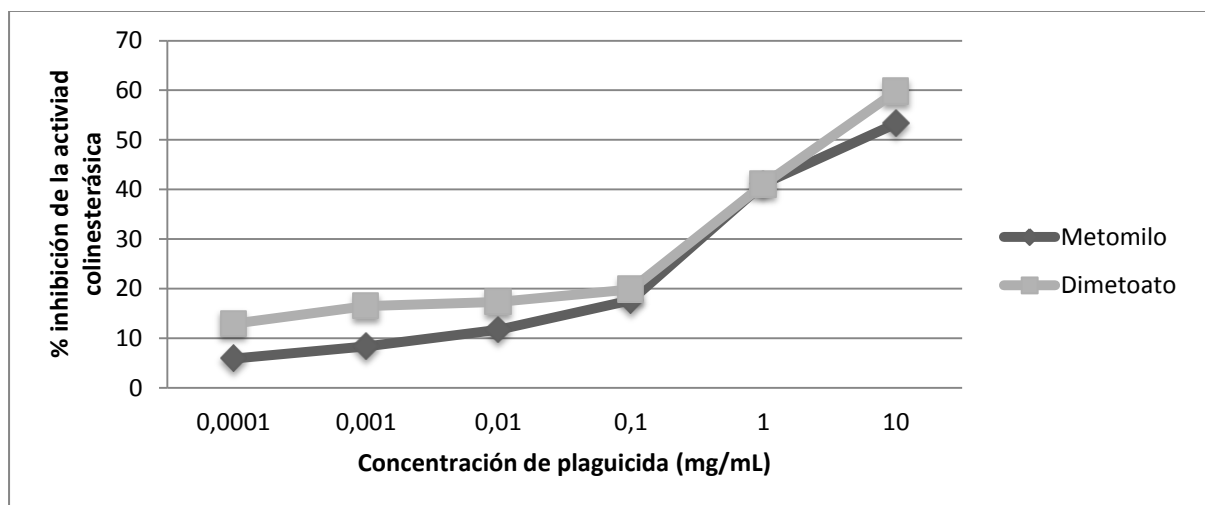


Figura 2.

SEGUIMIENTO DE LA REMOCIÓN DE PLAGUICIDAS EN UN REACTOR ANAEROBIO/AEROBIO A TRAVÉS DEL USO DE UN BIOMARCADOR

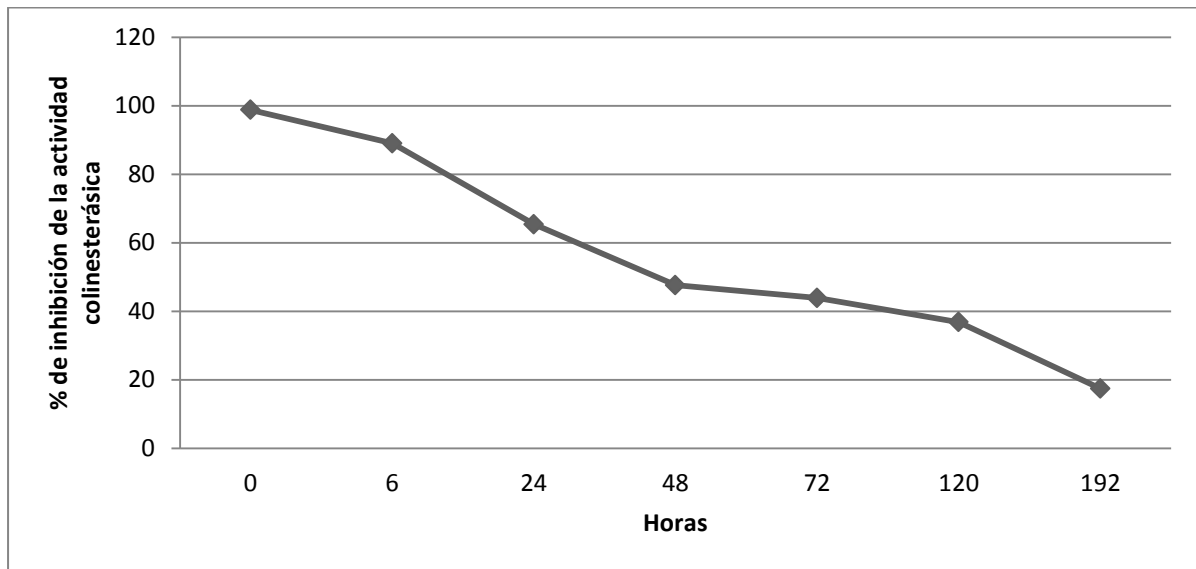


Figura 3.

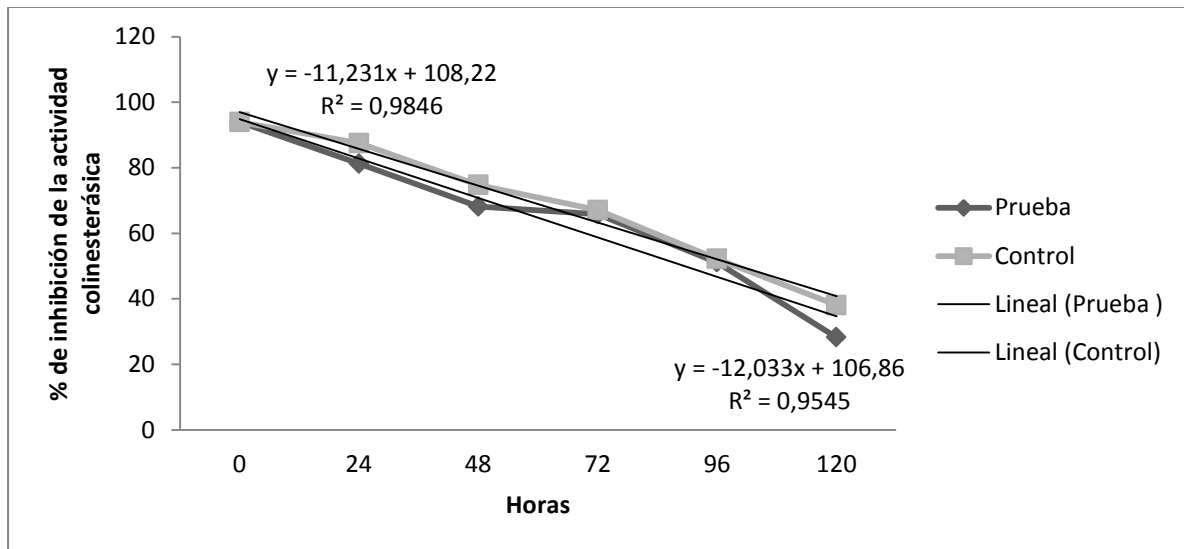


Figura 4.

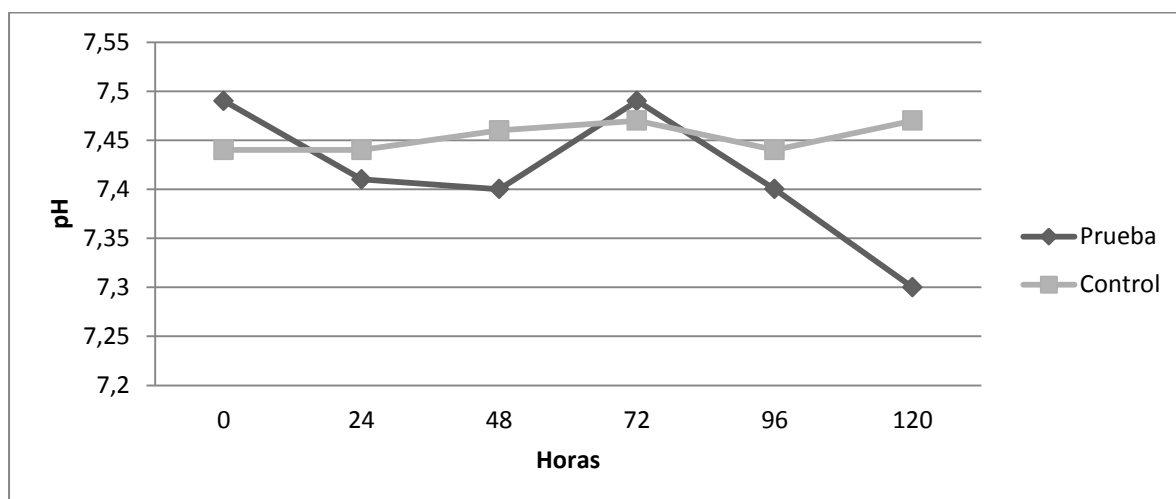


Figura 5

### LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Tabla I. Sobrevivencia de las cepas que conformaron el consorcio bacteriano durante la degradación de mezcla de plaguicidas en la columna de prueba. (ND: no determinado).

Figura 1. Esquema de la columna de tratamiento para la mezcla de plaguicidas metomilo y dimetoato.

Figura 2. Comparación de la inhibición de la actividad colinesterásica con los plaguicidas metomilo (carbamato) y dimetoato (organofosforado).

Figura 3. Inhibición de la actividad colinesterásica con respecto al tiempo en presencia de la mezcla de plaguicidas metomilo y dimetoato [10mg/mL].

Figura 4. Monitoreo de la degradación de la mezcla de plaguicidas metomilo con dimetoato [1mg/mL] a través del uso del bioanálisis en la columna de prueba y columna control.

Figura 5. Comparación del monitoreo del pH en la columna prueba y columna control.

## **IV. DISCUSIÓN**

#### 4.1 Discusión general.

El comportamiento exitoso de las cepas en los ciclos de incubación-refrigeración se puede explicar al clima del lugar de donde proviene la muestra, es decir, la presa al encontrarse a la intemperie sufría cambios en su temperatura durante el día y la noche por lo que las cepas están adaptadas a sobrevivir en diferentes rangos de temperatura y probablemente también en diferentes rangos de pH, el que la mayoría de las cepas fueran bacilos esporulados también refleja las condiciones de su procedencia si recordamos que es un agua con pocos nutrientes y un alto contenido de sustancias inhibidoras del crecimiento de plagas; lo anterior podría ser la explicación también de la usencia de hongos ya que de los muchos productos utilizados en el proceso del cultivo de la flor los fungicidas son de principal importancia, ya que los problemas reflejados en la cosecha de la flor están dados por hongos macro y microscópicos.

Importancia de los géneros encontrados:

*Bacillus*: comprende más de 40 especies de bacilos aerobios y anaerobios facultativos grampositivos que producen endosporas y son generalmente cilíndricos o elipsoidales. La mayor parte de las especies producen catalasa. Las especies de *Bacillus* son de naturaleza ubicua y habitan en el suelo, agua y polvo del aire. Algunas pueden ser parte de la flora intestinal normal del hombre y los animales. Un ejemplo clásico en suelos contaminados por plaguicidas es *B. brevis*, que se ha aislado principalmente de suelos, de agua y de alimentos. Este microorganismo produce antibióticos como la gramicidina y la tirotricina. Esta especie fue aislada a partir de suelos agrícolas con un amplio historial de aplicaciones de plaguicidas organofosforados. Esta especie presenta una importante eficiencia en remoción de hidrocarburos. *B. brevis*, resultó ser la cepa con mayor capacidad de crecimiento en un medio mínimo con paratión metílico como única fuente de carbono (Castrejón-Godínez *et. al* 2001).

*Pseudomonas*. Es un bacilo gram-negativo versátil, aerobio, pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, mide 0,5 a 0,8  $\mu\text{m}$  por 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$ , son móviles por medio de un flagelo polar, habita en suelo y agua. Su temperatura óptima para el crecimiento es 37°C y crece a temperaturas de hasta 42°C. Es un patógeno oportunista causa infecciones de la zona urinaria, infecciones del sistema respiratorio, dermatitis, bacteremia, y las infecciones gastrointestinales. Es resistente a las altas concentraciones de sales y de tintes, de antisépticos débiles, y de muchos antibióticos comúnmente usados. Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrimentos que otros organismos pueden asimilar. Se han reportado cepas de *P. aeruginosa* que tienen la capacidad de degradar alcanos y alquenos de cadena ramificada y que, por tanto,

son útiles en la limpieza de sitios contaminados con estos compuestos o con metales pesados (Castrejón-Godínez *et. al* 2001).

Los resultados encontrados mostraron que para el plaguicida metomilo (carbamato) en concentración de 10 mg/mL el máximo porcentaje de inhibición fue de 53 % en condiciones normales, en condiciones de ausencia/presencia de luz, hidrólisis y agitación, los productos de transformación del metomilo inhiben la actividad de la enzima en un 36 % cuando se encuentra en ausencia de luz después de dos días. En el caso del plaguicida dimetoato (organofosforado) en concentración de 10 mg/mL el máximo porcentaje de inhibición de la enzima fue del 60 % mayor que el del plaguicida metomilo, en la corrida de degradación, sigue inhibiendo la actividad enzimática aun después tres días de manera semejante tanto en presencia como en ausencia de luz. Para la mezcla de ambos compuestos en concentración de 10 mg/mL únicamente se monitoreó la degradación durante ocho días con las mismas condiciones físicas antes mencionadas encontrando que incluso después de cinco días la actividad de la enzima acetilcolinesterasa es inhibida en un 30 %. Con todo lo anterior se pudo establecer un análisis directo en muestras ambientales de agua y sedimento provenientes de la Presa Tecualoyan ubicada en el municipio de Villa Guerrero en el Estado de México, se seleccionó esta zona por el declive al ser uno de los puntos más bajos donde confluyen dos ríos que atraviesan el municipio dedicado al cultivo de flores de ornato y hortalizas. Los resultados para las muestras ambientales mostraron que la presencia de los plaguicidas organofosforados y carbamatos inhibe porcentajes muy bajos de la actividad enzimática, esto debido a la temporada del muestreo que coincidió con la temporada de lluvias por lo que es probable que la concentración se diluyera, el muestreo para la temporada de estiaje se encuentra aún pendiente.

La remoción de la mezcla de plaguicidas en el reactor anaerobio/aerobio mostró una disminución en la concentración diez veces menor que la concentración con la que se inició el proceso. El consorcio microbiano es susceptible de degradar la mezcla de plaguicidas utilizándolos como fuente de energía, sin embargo, es de suma importancia adicionar el inóculo microbiano en condiciones de viabilidad para evitar la pérdida masiva de cepas antes de iniciar el proceso. El biomarcador de inhibición colinesterásica informa en tiempo real y por concentración de plaguicidas de manera individual o mezclada, por lo que es una herramienta adecuada y económica en el monitoreo del tratamiento de agua contaminada con Dimetoato y Metomilo; además de que permite evaluar si los metabolitos resultantes son menos tóxicos para la inhibición de la actividad colinesterásica que las moléculas originales.

## **V. CONCLUSIONES**

- La generación de un mapa específico para la zona de estudio fue de mayor importancia para lograr vislumbrar algunas de las causas de contaminación de la presa así como de las posibles rutas de transporte que puede tomar los plaguicidas.
- La construcción de las curvas patrón de inhibición de la actividad colinesterásica con los dos plaguicidas seleccionados, mostró que el dimetoato tienen un poder de inhibición mayor con respecto al metomilo, aun en condiciones de tiempo de degradación donde el segundo se degradó más rápidamente.
- La mezcla de plaguicidas que se utilizó para determinar la degradación, sugiere que los compuestos sufrieron un sinergismo al mostrar porcentajes de inhibición mucho mayores, además la degradación fue más lenta (más allá de las 120 horas) que cuando se monitorearon de forma individual.
- Las muestras ambientales de agua no presentaron porcentajes de inhibición considerables, lo anterior se puede explicar porque las muestras se consiguieron en la temporada de lluvias donde la presa se encontraba a su máxima capacidad lo que pudo haber diluido los compuestos.
- Las muestras de sedimentos tampoco mostraron la presencia de plaguicidas OF y CA probablemente esto se deba al tipo de suelo que al regenerarse cada temporada permite que la fracción de suelo donde pueda encontrarse el plaguicida se transporte.
- El inóculo microbiano aislado del agua y sedimentos de la presa se caracterizó con un total de dieciséis cepas que ocupan las diferentes condiciones de oxígeno que se encuentran en el reactor, las cepas se identificaron con los siguientes géneros: *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Deinococcus*.
- La construcción del inóculo microbiano de concentración conocida permitió monitorear el comportamiento biológico no solo con la caracterización, sino a través de un conteo de las cepas utilizadas.
- Los reactores mostraron ser eficientes en la remoción de los plaguicidas al disminuir la concentración de los plaguicidas en un 70 %, sin embargo, el tiempo transcurrido de 120 horas se puede optimizar a través del mejoramiento de las condiciones de operación.
- El biomarcador enzimático es una herramienta útil, sensible y eficaz en el monitoreo de la remoción de la mezcla de plaguicidas organofosforados y carbamatos, sin embargo, son necesarios otros análisis que permitan determinar la toxicidad de los metabolitos generados en el proceso.



## VI. BIBLIOGRAFÍA.

Agdi, K. A. Bouaid, A. Martin Esteban, P. Fernandez Hernando, A. Azmania and C. Camara. (2000) "Removal of atrazine and four organophosphorus pesticides from environmental waters by diatomaceous earth-remediation method" en *The Royal Society of Chemistry. J. Environ. Monit.*, 2, 420-423.

Albert, Lilia A. (2004) "Panorama de los plaguicidas en México" 7° Congreso de Actualización en Toxicología Clínica" *Revista de Toxicología en Línea* Pag 3-7

Anzola, R. M., Oliveira N. A. y Zaiat M. (2008) "Actividad metanogénica específica en un reactor anaerobio - aerobio aplicado al tratamiento de agua residual doméstica." *INCI*. Abril 2008, vol.33, no.4, p.284-289.

Atlas, Ronald M. (2000). Microbiología Fundamentos y Aplicaciones. Compañía Editorial Continental. México. 77-79.

Badii, Mohammad H y S. Varela (2008). "Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la Salud y el Ambiente". *CULCyT. Toxicología de Insecticidas*. Año 5, No.28.

Benítez- Campo. N, Vivas Z. D. H, Rosero H. E. (2009) "Toxicidad de los principales plaguicidas utilizados en el municipio de popayán, usando *Bacillus subtilis*". *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 16 Vol 7 No. 1 Enero - Junio 2009.

Botero, L. R., Nagles N., Quintero J.C., Peñuela G. A. (2011) "Efecto de la concentración de metil paratión y el extracto de levadura como factores de selección de microorganismos degradadores del pesticida a partir de suelos contaminados". *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, vol. 10, No. 19, pp13-20

Cárdenas, O., Silva E., Morales L., Ortíz J. (2005) "Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001". *Biomédica* 2005; 25: 170-80

Castro- Ortíz, L. P., Luna Pabello V. M. y Villalobos Pietrini R. (2007) "Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. Febrero 2007. Pág. 35-45.

Calonge, M, Pérez-Pertejo Y, Ordoñez C, Reguera R M, Balaña-Fouce R y Ordoñez D. (2002) "Determinación de residuos de siete insecticidas organofosforados en frutas mediante cromatografía de gases con detector de nitrógeno-fósforo y confirmación por espectrometría de masas". *Revista de Toxicología*. Asociación Española de Toxicología. 19: 55-60

Castrejón Godinez M.L, Sánchez Salinas E., Ortiz Hernández M. L. (2001). "Crecimiento de bacterias aisladas de suelos agrícolas sobre plaguicidas organofosforados como sustrato" Congreso Nacional de Bioingeniería, Veracruz México 2001

Daniels, C. H (2005) Flora bacteriana aerobia y anaerobia mesófila presente en los sedimentos de un humedal natural de la Universidad Earth. *Tesis de la Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.*

Díaz Delgado, Carlos. (2007). “Agua potable para comunidades rurales, reúso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas”. Capítulo 17. Zonas húmedas artificiales como tratamiento de aguas residuales en pequeños núcleos urbanos: el caso de Els Hostalets de Pierola (Barcelona). Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua. Toluca, México.

Gobierno del Estado de México, Secretaría de Desarrollo Agropecuario (2004) “Cierre agrícola por municipios 2004, principales cultivos. Municipio de Villa Guerrero” Dirección de Agricultura del Estado de México

Gobierno del Estado de México, Secretaría de Desarrollo Urbano (2009) “Modificación del Plan de Desarrollo Municipal de Villa Guerrero”. Gaceta del Gobierno Libre y Soberano de México, Toluca México 2009.

González A., Varela S., Rodríguez E. y Macías B.(2006) “Diseño de un bioreactor anaerobio piloto de flujo ascendente para tratar el efluente del rastro municipal de Cd. Victoria, Tamaulipas”. XI Congreso Internacional y Nacional de Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 7-9 junio 2006.

Guevara Vera, A. (1996). “Control de la Calidad del agua. Métodos de análisis para el control de la calidad del agua.” Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Lima, Perú. 50 pág.

Juárez, J. y Villagra de Gamundi A. (2007) “Bioensayos preliminares para evaluar la toxicidad del lindano sobre *Simocephalus vetulus* (O.F.Muller, 1776) (Crustacea: Cladocera)” *Revista Peruana de Biología*. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. Agosto 2007.

Lopera Mesa, M. Peñuela Mesa G. A., Domínguez Gual C. y Mejía Zapata G. (2005) “Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo utilizando *Phanerochaete chrysosporium*.” *Revista Facultad de Ingeniería Universidad Antioquia*.. Junio número 033 pp 58-69.

McCarthy JF & LR Shugart. 1990. *Biomarkers of environmental contamination*, Lewis Publ., Boca Raton. USA

Mancera-López M.E., F. Esparza-García, B. Chávez-Gómez, R. Rodríguez-Vázquez, G. Saucedo-Castañeda, J. Barrera-Cortés. (2007). “Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi” *International Biodeterioration & Biodegradation*. Elsevier. 61. 151–160

Martínez, Vidal J., González-Rodríguez M. J., Belmonte Vega A., Garrido Frenich A. (2004) “Estudio de la contaminación por pesticidas en aguas ambientales de la

provincia de Almería”. *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente. Ecosistemas* 13 (3): 30-38.

Milla-Cotos O. M, Palomino-Horna W. R. (2002). Niveles de colinesterasa sérica en agricultores de la localidad de Carapongo (Perú) y determinación de residuos de plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa en frutas y hortalizas cultivadas. Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú. 100 p.

Ongley E. D. (1997). Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos. Serie Estudios FAO Riego y Drenaje 55. Food and Agriculture Organization (FAO). Rome (Italy). Dirección de Fomento de Tierras y Aguas, 115 p.

Ortíz Hernández M.L. and Sánchez Salinas E. (2010). “Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in México”. *Revista de Contaminación Ambiental* 26 (1) 27-38

Pérez, M. A., Segura A., García R., Colinas T, Pérez M., Vázquez A. y Navarro H. (2009) “Residuos de plaguicidas organofosforados en cabezuela de brócoli (*Brassica oleracea*) determinados por cromatografía de gases”. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 25 (2) 103-110,

Pitarch, Arquimbau Elena. (2001). Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias Experimentales – Química Analítica. Valencia España 463 pp.

Plazas, H.C.D., Olarte M.F. (2011). “Intoxicación por inhibidores de la colinesterasa (organofosforados y carbamatos) en niños y adolescentes: revisión de la literatura y guía de manejo”. *Acta Colombiana de Cuidados Intensivos* 2011; 11(1):26-33

Programa Ambiental Regional para Centroamérica (PROARCA) 2002. Contaminación por plaguicidas en las Cuencas Hidrográficas que desembocan en el Golfo de Fonseca y oportunidades para su prevención y mitigación.

Rincón A., Angulo García F., Olivar Tost G. (2009) “Análisis y control de un reactor anaerobio de lecho fijo de flujo ascendente”. *Dyna*, Año 76, Nro. 157, pp. 123-132. Medellín, Marzo de 2009.

Ríos J. C., Solari G. S.(2010) Biomonitorización de plaguicidas: ¿Una necesidad del país?. *Revista Médica de Chile*. 138(4): 515-518.

Romero, C. A. (2006) Comparación de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa en dos soportes de inmovilización y valoración de la inhibición producida por plaguicidas carbámicos y organofosforados. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Toluca México.

Sabroso G. M. G. y Pastor E. A. (2004). Guía sobre suelos contaminados. Gobierno de Aragón. Zaragoza, España. 108 pp.

Sánchez-Meza J. C. (2009) Identificación de la presencia de plaguicidas organofosforados y carbámicos en suelos a través de la medición del grado de inhibición de la actividad colinesterásica en suero de ratón y suelo. Curso Taller teórico-práctico “Técnica de Evaluación de Biomarcadores”. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla México Abril 2009

Tafoya G.A (2008). Biodegradación del herbicida triazínico, atrazina, por una comunidad bacteriana, seleccionada en quimiostato, inmovilizada en reactores de lecho empacado. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional. México Distrito Federal. 162 p.

Valencia-Quintana, R. (2005), “Vydate I-24, un plaguicida carbámico que induce aberraciones cromosómicas en células meristemáticas de *Vicia faba*”. Revista Internacional de Contaminación Ambiental 2005. 21 (Supl. 1) 63-70.

Van- Eerd L., Hoagland E. R., Zablotowicz M. R., Hall C. J. (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science*, 51:472–495.

Yáñez Ocampo, Sánchez Salinas E. y Ortiz Hernández M.L (2007) “Degradación de plaguicidas organofosforados utilizando bacterias inmovilizadas sobre tezontle” XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Morelia Michoacán 25 al 29 de junio de 2007.

Yáñez Ocampo, G. Yáñez Barrientos E., Sánchez Salinas E. y Ortiz Hernández M.L (2008). “Cinéticas de crecimiento con bacterias inmovilizadas y en suspensión, para la degradación de mezclas de plaguicidas organofosforados”.

Zeinat, Kamal M., Nashwa A.H. Fetyan A., Mohamed A. Ibrahim, Sherif El-Nagdy. (2008) “Biodegradation and Detoxification of Malathion by of *Bacillus Thuringiensis* MOS-5” *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3): 724-732, 2008, INSInet Publication.