



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

**BIODEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS EN SUELOS AGRÍCOLAS  
DE TEPETITLA POR BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO

EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

PRESENTA

María Lilia Calva Rodríguez

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa

Dr. Ángel Eduardo Absalón Constantino



Tepetitla de Lardizábal, Tlax., Enero 2014





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Tlaxcala el día 18 del mes Diciembre del año 2013, el (la) que suscribe María Lilia Calva Rodríguez alumno (a) del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro B110120, adscrito a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa y Dr. Ángel Eduardo Absalón Constantino cede los derechos del trabajo intitulado Biodegradación de plaguicidas en suelos agrícolas de Tepetitla por bioestimulación y bioaumentación, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ailil-c@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
María Lilia Calva Rodríguez

Nombre y firma

*Agradezco al Instituto Politécnico Nacional así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada bajo el número 264308*

---

---

## Contenido

<i>Introducción</i> .....	3
<i>1. Marco teórico</i> .....	6
1.1 Plaguicidas.....	6
1.2 Clasificación de plaguicidas .....	7
1.3 Contaminación del suelo .....	8
1.4 Comportamiento de los plaguicidas en el suelo .....	9
1.5 Regulación de plaguicidas en México.....	11
1.6 Tecnologías de remediación .....	12
1.6.1 Biorremediación.....	13
1.6.2 Bioestimulación.....	15
1.6.3 Bioaumentación.....	16
1.7 Biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas .....	16
1.8 DDT (Diclorodifenil tricloroetano) .....	19
1.9 Suelos de Tepetitla de Lardizábal.....	24
<i>2. Justificación</i> .....	26
<i>3. Hipótesis</i> .....	27
<i>4. Objetivo general</i> .....	28
<i>5. Objetivos específicos</i> .....	29
<i>6. Metodología</i> .....	30
6.1 Recolección y caracterización de suelo agrícola .....	30
6.1.1 Análisis fisicoquímicos .....	31
6.1.1.1 Materia orgánica.....	31
6.1.1.2 Nitrógeno.....	32
6.1.1.3 Fósforo .....	32
6.1.1.4 Contenido de humedad.....	33
6.1.1.5 pH.....	33
6.1.1.6 Textura .....	34
6.1.1.7 Cuenta microbiana.....	34

---

---

6.2 Caracterización de residuos agroindustriales .....	34
6.3 Remoción de DDT en microcosmos por bioestimulación.....	35
6.3.1 Preparación del suelo .....	35
6.3.2 Preparación de microcosmos.....	35
6.3.5 Cuantificación de CO <sub>2</sub> en los microcosmos .....	36
6.3.6 Cuenta viable de bacterias y hongos .....	36
6.3.7 Análisis de DDT residual .....	37
6.4 Aislamiento de bacterias.....	37
6.5 Evaluación de tolerancia de bacterias aisladas .....	38
6.5.1 Identificación molecular de los aislados .....	38
6.6 Remoción de DDT en microcosmos por bioaumentación .....	39
6.7 Análisis estadísticos .....	40
7. <i>Resultados y Discusión</i> .....	41
7.1 Caracterización de suelos de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala.....	41
7.2 Caracterización de residuos agrícolas.....	44
7.3 Pruebas de bioestimulación por cultivo sólido en microcosmos.....	45
7.3.1 Actividad respirométrica .....	46
7.3.2 Crecimiento bacteriano.....	52
7.3.3 Crecimiento fúngico .....	58
7.3.4 Remoción de DDT.....	63
7.4. Pruebas de inhibición e identificación de bacterias tolerantes al DDT .....	66
7.5 Pruebas de Bioaumentación.....	73
7.5.1 Actividad respirométrica .....	73
7. <i>Conclusiones</i> .....	77
8. <i>Referencias</i> .....	78

---

---

## Contenido de Figuras

<i>Figura 1. Procesos que determinan la dinámica de plaguicidas en el suelo.....</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2. Vías alternas en la degradación del DDT.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 3. Ruta de Degradación aerobia de DDT como sustrato.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 5. Actividad microbiana por la microbiota nativa estimulada del suelo A contaminado con DDT en cultivo sólido.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 6. Actividad microbiana por la microbiota nativa estimulada en suelo B contaminado con DDT en cultivo sólido.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 7. Actividad microbiana en cultivo sólido por la microbiota nativa estimulada en suelo c contaminado con DDT.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 8. Actividad microbiana por la microbiota y residuos agroindustriales en el suelo A contaminado con DDT en cultivo sólido.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 9. Actividad microbiana por la microbiota de residuos agroindustriales y suelo B contaminado con DDT en cultivo sólido.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 10. Actividad microbiana en cultivo sólido por la microbiota nativa estimulada en suelo C contaminado con DDT.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 11. Crecimiento bacteriano de la microbiota nativa del suelo A contaminado con DDT en cultivo sólido.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 12. Crecimiento bacteriano de la microbiota nativa en suelo B contaminado con DDT en cultivo sólido.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 13. Crecimiento bacteriano de la microbiota nativa en cultivo sólido en suelo C contaminado con DDT.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 15. Crecimiento bacteriano asociados a residuos agroindustriales y suelo B contaminado con of DDT en cultivo sólido.....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 16. Crecimiento bacteriano de la microbiota nativa en cultivo sólido en suelo B contaminado con DDT.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura.....</i>	<i>59</i>
<i>17. Crecimiento fúngico de la microbiota nativa del suelo A contaminado con DDT en cultivo sólido.....</i>	<i>59</i>

---

---

<i>Figura 18. Crecimiento fúngico de la microbiota nativa en suelo B contaminado con DDT en cultivo sólido. ....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 19. Crecimiento fúngico de la microbiota nativa en cultivo sólido en suelo C contaminado con DDT. ....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 20. Crecimiento fúngico de la microbiota de residuos agroindustriales y del suelo A contaminado con DDT en cultivo sólido. ....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 21. Crecimiento fúngico de asociados a residuos agroindustriales y microbiota en suelo B contaminado con DDT en cultivo sólido. ....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 22. Crecimiento fúngico de la microbiota nativa en cultivo sólido en suelo contaminado con DDT. ....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 23. Porcentaje de remoción de DDT en cultivo sólido por bioestimulación en suelo A</i>	<i>64</i>
<i>Figura 24. Porcentaje de remoción de DDT en cultivo sólido por bioestimulación en suelo B.</i>	<i>65</i>
<i>Figura 26. Árbol filogenético consenso basado en secuencias parciales de 16s rRNA de bacterias. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima verosimilitud basado el modelo 2-parametro de Kimura. El porcentaje de árboles replicados en que los taxones asociados se agruparon junto con la prueba de arranque (500 repeticiones) se muestran junto a las ramas. Los triángulos negros indican los organismos aislados en este estudio Se indica los números de secuencias de referencia del GenBank. ....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 27. Actividad microbiana en cultivo sólido por consorcio microbiano en suelo A contaminado con DDT. ....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 28. Actividad microbiana en cultivo sólido por consorcio microbiano en suelo B contaminado con DDT. ....</i>	<i>76</i>

---

---

## Contenido de tablas

<i>Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del DDT, DDE y DDD .....</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 2. Ubicación de muestreo de suelo .....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 3. Condiciones de los tratamientos para pruebas de bioestimulación .....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 4. Condiciones de los tratamientos para pruebas de bioaumentación .....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 5. Características fisicoquímicas de suelos muestreados en Tepetitla de Lardizábal Tlaxcala .....</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 6. Contenido de Carbono, Nitrógeno y Fósforo de residuos agroindustriales.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 7. Características fisicoquímicas de los suelos usados en la prueba de bioestimulación y bioaumentación .....</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 8. Radios de halos de Inhibición en mm de bacterias aisladas del suelo A en presencia de concentraciones de DDT .....</i>	<i>67</i>
<i>Tabla 9. Identificación BLAST de las bacterias aisladas del suelo A contaminado con DDT ..</i>	<i>68</i>
<i>Tabla 10. Radios de halos de Inhibición en mm de bacterias aisladas del suelo B en presencia de concentraciones de DDT .....</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 11. Identificación BLAST de las bacterias aisladas del suelo B contaminado con DDT</i>	<i>69</i>
<i>Tabla 12. Radios de halos de Inhibición en mm de bacterias aisladas del suelo C en presencia de concentraciones de DDT .....</i>	<i>70</i>
<i>Tabla 13. Identificación BLAST de las bacterias aisladas del suelo C contaminado con DDT</i>	<i>71</i>

---

---

# Resumen

El uso indiscriminado de plaguicidas en el campo y la ciudad para el control de plagas, ha generado la contaminación de suelos, así como de cuerpos de agua y aire, afectando a las cadenas tróficas y al mismo hombre. Ante esta problemática se han implementado alternativas para la limpieza de sitios contaminados. La biodegradación con bacterias aisladas de sitios expuestos a estos xenobióticos es una de ellas. Por esta razón en el presente estudio se evaluó la concentración de plaguicidas en suelos agrícolas de Tepetitla. Se realizaron pruebas de bioestimulación en microcosmos para evaluar la remoción de DDT en tres suelos con textura franco arenoso, franco arcillo arenoso y franco, se hizo un ajuste de C:N:P a una relación 100:10:1 adicionando nutrimentos y residuos agroindustriales (rastrojo de maíz, paja de trigo y bagacillo de caña), los ensayos se realizaron durante veinte días bajo condiciones controladas evaluando la actividad microbiana, remoción del DDT y crecimiento de bacterias y hongos. En todos los tratamientos independientemente de la textura del suelo, se observó que el rastrojo de maíz fue el que presentó los mejores efectos, reflejándose en un aumento de la actividad metabólica, mayor crecimiento de bacterias y alta remoción.

En tanto que de las pruebas de bioestimulación se aislaron 76 bacterias de los cuales *Cellulosimicrobium cellulans*, *Arthrobacter luteolus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus altitudinis*, *Lysinibacillus sp.*, *Sphingomonas*, *Bacillus atrophaeus* y *Bacillus sp.*, presentaron alta tolerancia al no inhibir su crecimiento cuando se expusieron a una concentración máxima de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de DDT.

Con la finalidad de incrementar la remoción del DDT se llevó a cabo procesos de bioaumentación para lo cual se emplearon a las bacterias tolerantes en consorcio, para el suelo con textura franco arenoso el consorcio constó de 9 bacterias, mientras que para el suelo franco arcilloso arenoso consto de 2.

---

---

# Abstract

The indiscriminate use of pesticides in the rural and urban pest control, has led to the contamination of soils, water bodies and air, affecting the food chain and the same man. Faced with this problem have been implemented alternatives for cleaning up contaminated sites. Biodegradation of sites with isolated bacteria exposed to these xenobiotics is one of them. Therefore in this study the concentration of pesticides in Tepetitla agricultural soils was evaluated. Biostimulation tests were conducted in microcosms to evaluate the removal of DDT in three soils with sandy loam, sandy clay loam and frankly, an adjustment was made C:N:P ratio to 100:10:1 by adding nutrients and agro-industrial wastes (corn stover, wheat straw and sugarcane bagasse), assays were performed for twenty days under controlled conditions to assess microbial activity, removal of DDT and growth of bacteria and fungi. In all treatments regardless of soil texture was observed that corn stover was the one that presented the best effects, reflected in an increase in metabolic activity, increased bacterial growth and high degradation.

While testing biostimulation 76 bacteria were isolated, which *Cellulosimicrobium cellulans*, *Arthrobacter luteolus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus altitudinis*, *Lysinibacillus*, *Sphingomonas sp.*, *Bacillus atrophaeus* and *bacillus sp.*, had high tolerance, which not inhibit their growth when were exposed to a concentration maximum of 50 mg kg<sup>-1</sup> of DDT.

In order to increase the removal of DDT were conducted bioaugmentation processes for which the tolerant bacteria were used in the consortium, for sandy loam soil with the consortium group contained 9 bacteria, while for the sandy clay loam consist of 2.

# Introducción

En los últimos 150 años el hombre ha sintetizado y producido diversos compuestos químicos con el objeto de satisfacer las necesidades crecientes del desarrollo tecnológico y mejorar la calidad de vida, sin embargo, la liberación no controlada o indiscriminada de algunas sustancias químicas pueden afectar al ambiente y a los seres vivos, ya sea durante su fabricación al producir diversos residuos, a través de su distribución o durante su degradación en el medio ambiente (Olea, 2001).

Los contaminantes más frecuentes son los compuestos orgánicos, metales pesados, metaloides y plaguicidas (Stegmann *et al.*, 2001). En particular, los plaguicidas son productos químicos empleados por el hombre para el control de diversas plagas agrícolas (Bolognesi 2003), también son usados en programas de salud para evitar enfermedades transmitidas por vectores (Maroni *et al.*, 1993), su uso disminuye pérdidas agrícolas (Hotchkiss, 1992) y contribuye a aumentar cosechas acordes con los rendimientos potenciales de los cultivos (FAO, 1998), sin embargo, su aplicación afecta a los ecosistemas y diferentes formas de vida (Chiron *et al.*, 2000; Karam *et al.*; 2004, Sun *et al.*, 2008).

De igual forma se sabe que aproximadamente el 99.7% de un plaguicida no alcanza a sus organismos objetivo (Pimentel, 1995), con lo cual se llegan a detectar en niveles inaceptables en el suelo, aire, aguas superficiales y subterráneas, vegetales y en cierta medida en los alimentos (Gamón *et al.*, 2003; Shalaby y Abdou, 2010), algunos son tan estables que sus residuos y metabolitos quedan ampliamente distribuidos en el suelo.

Se reporta también que la exposición continua a estos compuestos químicos, ocasionan enfermedades que incluyen cáncer, desordenes neuroconductuales, alteraciones de las funciones inmunes, reacciones alérgicas (particularmente en la piel) (Colborn *et al.*, 1996; Longnecker *et al.*, 1997), y que incluso la exposición

---

---

crónica a bajas dosis ocasionan inhibiciones acumulativas de la actividad colinesterasa (Al-Qurainy y Abdel-Megeed 2009).

Durante décadas en casi todos los países desarrollados o con economía en transición se han acumulado plaguicidas obsoletos (Dasgupta *et al.*, 2010). En México existen plaguicidas obsoletos tanto líquidos como sólidos, 551 de estos compuestos distribuidos en 29 de los 32 estados, así como 28 sitios contaminados con plaguicidas (Giner, 2007). Además, se ha reportado la presencia de plaguicidas en suelos, pozos de abastecimiento de agua potable y concentraciones en muestras de fluidos humanos (García *et al.*, 1991, Herrera-Portugal *et al.*, 2008).

Debido a estos plaguicidas obsoletos, a los pasivos ambientales y a los daños causados por éstos compuestos se han desarrollado tecnologías que garantizan su eliminación de forma segura, eficiente y económica. El proceso conocido como biodegradación permite que algunos microorganismos degraden dichos compuestos ya sea involucrando rutas bioquímicas secundarias o bien empleándolos como única fuente de carbono y energía (Commandeur, 1991; Nadeau *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1999; Turco *et al.*, 2003). La aplicación de microorganismos para la remoción de diversos compuestos tóxicos ha despertado un interés en el ramo de la biotecnología ambiental.

Particularmente en el área agrícola del municipio de Tepetitla se usa una amplia gama de plaguicidas, desconociéndose el impacto de éstos sobre los suelos, por lo que en este trabajo se evaluó la concentración de plaguicidas organoclorados y metil paratión en cinco suelos agrícolas de la zona.

Considerando que algunos microorganismos que están en sitios contaminados pueden tener la capacidad de metabolizar diferentes plaguicidas y ser usados como una alternativa en procesos de biorremediación para la limpieza de suelos contaminados, para este proyecto se planteó realizar ensayos de bioestimulación en tres suelos agrícolas con textura franco arcilloso, franco arcillo arenoso y franco con la adición de residuos agroindustriales (paja de trigo, rastrojo de maíz y bagacillo de caña), con el propósito de evaluar la remoción de DDT y de éstos ensayos aislar

---

bacterias para identificar a aquellas con alta tolerancia al plaguicida. Una vez identificadas seleccionar a las altamente tolerantes al plaguicida para ser probadas como consorcio en los procesos de bioaumentación.

---

---

# 1. Marco teórico

## 1.1 Plaguicidas

El concepto moderno de plaguicidas surge en el siglo XIX en el que se sintetizaron múltiples sustancias a las cuales se les descubrieron propiedades tóxicas e insecticidas que se descubrieron y utilizaron más adelante (Ferrer, 2003).

Un plaguicida es una sustancia o mezcla de ellas, de carácter orgánico o inorgánico destinada a prevenir, destruir o controlar plagas y otras especies indeseables para el hombre, como vectores que ocasionan enfermedades a los humanos o animales, y especies no deseadas que afectan actividades económicas como la producción, elaboración, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos de tipo agrícola o animal (FAO, 2002).

En México se usaron plaguicidas en la agricultura desde fines del siglo XIX, entre los que se destaca al arseniato de plomo, aceto-arseniato de cobre (verde de París) y una mezcla de sulfato de cobre con cal conocida como caldo Bordelés, sin embargo después de la Segunda Guerra Mundial gracias al desarrollo de la industria química y al tipo de agricultura dependiente de insumos de los laboratorios de la industria química se han proporcionado a los agricultores una serie de poderosos venenos contra diferentes tipos de plagas, siendo la mayoría de ellos organoclorados y organofosforados.

En 1998, la Agencia de Protección ambiental (EPA) de los E.E U.U. mantenía registrados 620 ingredientes, en su mayoría sustancias orgánicas con las que se formulan aproximadamente 20.000 diferentes productos. Se estima que entre los años 1995 y 2000, se produjeron 20,000 toneladas de herbicidas para consumo en México (SEMARNAT), cerca del 60% son clasificados como perjudiciales para la salud y el medio ambiente, de ellos el 42% se fabricaron en México.

---

---

Debido a que los plaguicidas tienen estructuras químicas que no están presentes en la naturaleza (xenobióticos), se consideran recalitrantes (Bhat, 1994), así mismo teniendo en cuenta que gran porcentaje se aplica directamente sobre la superficie del suelo, se incrementa la posibilidad de contaminación generando grandes amenazas de pérdida de fertilidad de los suelos, con la posibilidad de que lleguen a contaminar fuentes de agua (Williams *et al.*, 1995).

## 1.2 Clasificación de plaguicidas

Los plaguicidas se pueden clasificar de acuerdo a los organismos que controlan, según su concentración, modo de acción, composición química, a las presentaciones de sus fórmulas comerciales y al uso al que se destinan.

Por su aplicación se clasifican en: herbicidas (contra las malas hierbas), fungicidas (contra hongos), insecticidas (contra insectos), acaricidas (contra ácaros), rodenticidas (contra roedores), nematocidas (contra nematodos), molusquicidas (contra moluscos), fitohormonas y fitoreguladores (promueven o modifican algún proceso fisiológico en organismos vegetales). Siendo los insecticidas los de mayor interés por ser los más aplicados.

De acuerdo a su estructura química (Elliott *et al.*, 1978) existe una gran variedad, pudiéndose clasificar como:

Insecticidas y acaricidas:

- Organoclorados: Derivados ciclodiénicos (aldrin, endosulfán, mirex) derivados del 2,2-difeniletano (DDT, dicofol), derivados del ciclohexano (lindano) y policloroterpenos.
- Organofosforados: Esteres fosfóricos: ortofosfatos, pirofosfatos (diclorvos), ésteres tiofosfotionatos, fosfotiolatos (paratión fenitrothion), ésteres diotiofosfóricos (dimetoato, metidation, malation), amidas del ácido ortofosforico, amidas del ácido pirofosfórico, fosfonatos (triclorfon), tiofosfinatos.

- 
- 
- Organosulfurados (tetradifon, clorfenson)
  - Carbamatos: N-metil carbamatos (carbaril, aldicarb), N,N-dimetil carbamatos (dimetan, pirolan).

#### Herbicidas

- Compuestos piridínicos y bipyridínicos (paraquat, dicuat), dinitroanilinas (trifluralin),
- Compuestos organoclorados (2,4-D pentaclorofenol).
- Ureas sustituidas (isoproturón), sulfonilureas, (metsulfurón metilo),
- Triazinas (atrazina), fenoxiácidos y derivados (gifosato),
- Carbamatos y tiocarbamatos.

#### Fungicidas

- Azoles y análogos (penconazol, propiconazol), fenilamidas o acetalaninatos (benalaxil), anilimirimidias (ciprodinil),
- carbamatos y ditiocarbamatos (manconzeb, maneb).

### 1.3 Contaminación del suelo

La cantidad aplicada de un plaguicida que está en contacto directo con el organismo blanco es un porcentaje extremadamente pequeño, según Pimentel (1995) solo el 0.3% del plaguicida llega al organismo blanco, por lo que el 99.7 queda distribuido en el suelo. Cuando los plaguicidas se incorporan al suelo, su comportamiento se ve influenciado por diversos procesos que se esquematizan en la figura 1. El plaguicida entra en un ecosistema dinámico en el cual empezará a moverse desde uno a otro sistema o permanecerá en el lugar con su estructura original intacta o degradada en mayor o menor medida, en función del tiempo.

Los procesos ambientales que gobiernan el comportamiento y destino de un plaguicida en el suelo se pueden clasificar en tres grupos:

1. Procesos responsables de la acumulación de los plaguicidas, que implica el paso entre dos medios sin experimentar transformación química alguna permitiéndole al plaguicida conservar la función para la cual ha sido diseñado. En este grupo se encuentran implicados procesos de adsorción-desorción.
2. Procesos responsables de la eliminación de plaguicidas, como procesos fotoquímicos, químicos o biológicos que implican una transformación de éstos compuestos.
3. Procesos responsables del movimiento de los plaguicidas en el suelo como fenómenos de lixiviación, escorrentía y volatilización. Al igual que los procesos de acumulación no suponen ninguna transformación química del plaguicida.

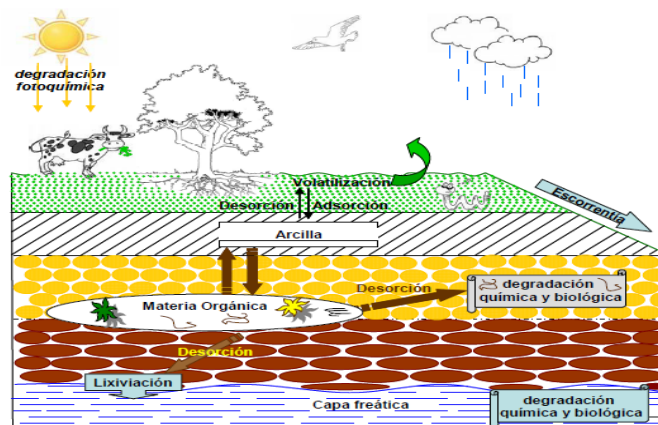


Figura 1. Procesos que determinan la dinámica de plaguicidas en el suelo

#### 1.4 Comportamiento de los plaguicidas en el suelo

La aplicación de plaguicidas en la agricultura conlleva a una distribución de éstos en las distintas fases del ambiente; agua, aire, suelo, animales y plantas. La interacción de los plaguicidas con cada una de estas fases es compleja y está controlada por numerosas reacciones físicas, químicas y/o biológicas que habitualmente no suelen darse de modo aislado, sino simultáneo (Navarro *et al.*, 2007).

Los factores que afectan la concentración local del plaguicida incluyen la cantidad y velocidad en la cual el compuesto es liberado, su estabilidad en el ambiente bajo varias condiciones (el grado de dilución, su movilidad en un ambiente en particular y la velocidad de degradación biológica o no biológica) (Ellis 2000; Janssen *et al.*, 2001).

La adsorción juega un papel fundamental en la dinámica del transporte, persistencia, transformación y bioacumulación de los plaguicidas (De Jonge *et al.*, 1996). La materia orgánica presente en el suelo, generalmente unida a arcillas es la responsable de los fenómenos de adsorción de compuestos no iónicos y no polares. Los plaguicidas también pueden estar disueltos, tanto en agua como en el aire intersticial o unido directamente a partículas sólidas por medio de fuerzas capilares (Larson, 1993).

Los factores que condicionan de forma directa el destino de los plaguicidas son (Oliveira, 2005):

- Tipo de suelo: influye sobre el equilibrio de adsorción de los plaguicidas, debido a que los complejos de arcilla y materia orgánica presentan propiedades coloidales y de intercambio iónico. La adsorción de los plaguicidas puede ocurrir por atracción dipolar, puentes de hidrógeno o enlaces iónicos.
- Naturaleza del plaguicida: Su estructura química influye en su solubilidad en agua y afinidad por el suelo. La formulación del plaguicida también es un factor importante a tener en cuenta al evaluar su persistencia en el suelo, ya que los de tipo granular y emulsificables son más persistentes que los polvos humectantes.
- Contenido de humedad: en suelos de tipo arenoso es más probable que un plaguicida se adsorba cuando los suelos estén secos, que cuando estén húmedos.

- pH: la adsorción es más alta en suelos ácidos, ya que el plaguicida puede convertirse en un catión cargado positivamente y así incrementar su adsorción.
- Temperatura del suelo: la adsorción de plaguicidas es un proceso exotérmico por lo que al incrementar la temperatura, el calor interno puede romper los enlaces y causar la desorción de moléculas de plaguicidas.

### **1.5 Regulación de plaguicidas en México**

La primera regulación en México sobre plaguicidas fue la Ley de plagas, la cual se publicó en el Diario Oficial de la Federación el 10 de diciembre de 1924. En ella se establecieron los lineamientos para el uso de aquellas sustancias empleadas en el combate de las plagas agrícolas y de los bosques, particularmente en los casos en que dichas plagas pudieran constituir un grave perjuicio económico.

La comisión Intersecretarial para el Control del proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) se limita a controlar y normalizar la comercialización de estos productos, con la finalidad de evitar que la aplicación indiscriminada cause daños al ambiente y a la salud del hombre.

En el Diario Oficial de la Federación del 3 de Enero de 1991 se prohibió la importación, fabricación, formulación, comercialización y uso del acetato o propionato de fenil, mercurio, ácido 2,4,5-T, aldrina, cianofos, cloranil, DBCP, dieldrina, dinoseb, endrina, erbon, fumisel, clordecone, triamifos. En la edición de 1995 se estableció la prohibición y el uso restringido bajo supervisión de personal autorizado y capacitado del diclorodifenil tricloroetano, BHC, aldicarb, dicofol, forato, lindano, metoxicloro, paraquat, pentaclorofenol y quintozeno (INE, 2011). Sin embargo, no existen normas para el control de agroquímicos por fuentes dispersas.

Al comparar la normatividad referente a plaguicidas, encontramos que en México están autorizados y se comercializan 7 insecticidas/acaricidas, 4 herbicidas y 3 fungicidas prohibidos, retirados o de uso muy restringido en otros países. Cabe señalar que el endosulfán, insecticida prohibido al menos en 10 países fue autorizado en el catálogo a partir de 1994 (Jiménez, 2001). Asimismo de 90 plaguicidas que han sido cancelados o se encuentran en uso restringido en los Estados Unidos, 30 se usan en México ([www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx). 2005).

### **1.6 Tecnologías de remediación**

El término “tecnología de remediación” implica cualquier proceso que altera la descomposición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas de manera que reduzca y/o modifique la movilidad o volumen del material contaminado (EPA, 2001).

La efectividad de un método de remediación para un sitio contaminado depende del conocimiento de factores hidrológicos y geológicos, solubilidad de las sustancias que se encuentran contaminando, de procesos de atenuación e inmovilización y de la medida en que éstos puedan migrar en el suelo.

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse en base a los siguientes principios: I) estrategia de remediación; II) lugar en que se realiza el proceso de remediación y III) tipo de tratamiento (EPA, 2011).

Según el tipo de tratamiento de remediación se pueden clasificar en: 1.- Tratamientos biológicos, que utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos y bacterias) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos. 2.-Tratamientos fisicoquímicos, que utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio para destruir, separar o contener la contaminación y 3.- Tratamientos térmicos, que utilizan calor

---

---

para incrementar la volatilización (separación), quemar, descomponer o fundir (inmovilización) los contaminantes en un suelo.

### 1.6.1 Biorremediación

La biorremediación surgió como una alternativa tecnológica para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados, que aprovecha la capacidad metabólica de los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas) y algunas plantas, para mineralizar o transformar contaminantes orgánicos en compuestos más sencillos. (Nápoles *et al.*, 2008). Es una tecnología de fácil aplicación y bajo costo, aunque quizá su más grande desventaja es que comparada con otras tecnologías fisicoquímicas se requiere de más tiempo para la restauración del sitio contaminado.

En general existen dos estrategias para llevar a cabo la limpieza de sitios contaminados, la primera es estimular el crecimiento de poblaciones microbianas nativas de la matriz contaminada para aumentar su actividad metabólica (bioestimulación), y la segunda es introducir microorganismos exógenos a la matriz (bioaumentación). La idoneidad de cualquiera de éstas, puede ser determinada por factores como; las condiciones del sitio (cantidad de las comunidades nativas, capacidad metabólica de los microorganismos, temperatura, pH) y el compuesto contaminante (estructura química, biodisponibilidad, cantidad y toxicidad).

Las tecnologías de biorremediación pueden ser intrínsecas o dirigidas, las primeras se basan en la capacidad de las poblaciones microbianas autóctonas para llevar a cabo de forma natural y simultánea los procesos de transformación de los contaminantes, mientras que, la dirigida consiste en provocar la bioestimulación y/o bioaumentación de las poblaciones microbianas para acelerar los procesos de biodegradación natural. (Haimi, 2000).

Las técnicas de biorremediación pueden llevarse a cabo *in situ* (en el sitio) o *ex situ* (fuera del sitio) en pilas o biorreactores. Las tecnologías *in situ* buscan mejorar la velocidad de biodegradación de los contaminantes orgánicos sin afectar el ambiente

---

---

del suelo, sedimento, agua superficial o agua subterránea. Las tecnologías *ex situ* requieren movimiento físico del material contaminado (suelo o sedimento) seguido del tratamiento, bajo condiciones contenidas en biorreactores, montones de pilas y estanques o lagunas (EPA, 2001).

La biorremediación de compuestos orgánicos *in situ* requieren la estimulación de las actividades metabólicas de poblaciones microbianas endógenas por la provisión de nutrientes y/o aceptores de electrones externos. Alternativamente, puede involucrar la adición de inóculos de microorganismos exógenos competentes con o sin la suplementación de nutrimentos y aceptores de electrones (bioaumentación).

Las técnicas de biorremediación *ex situ* usualmente son aerobias e involucra el tratamiento de suelos o sedimentos contaminados usando sistemas en fase solida o liquida (lodos). Los sistemas en fase solida incluyen parcelas agrícolas "land farming" (unidades de tratamiento del suelo), compostas y pilas. El land farming puede ser considerado como un sistema de tratamiento *in situ* ya que involucra el arar, labrar y rastrillar el suelo en el sitio contaminado *on site*, junto con la aplicación de agua, nutrientes e inóculos microbianos si es requerido (Boopathy, 2000).

Las bacterias son el grupo de microorganismos más utilizado en las tecnologías de biorremediación debido a la gran variedad de géneros y a la versatilidad metabólica que poseen. Sin embargo, no siempre una bacteria posee toda la capacidad enzimática necesaria para degradar uno o varios compuestos orgánicos contaminantes del ecosistema. Las poblaciones mixtas o consorcios microbianos tienen mayor poder biodegradativo porque la información genética que codifica al sistema enzimático es más completa y por tanto es más probable la degradación de las mezclas complejas de xenobióticos presentes en una área dañada (Nápoles, 2005; Viñas, 2005; Nuñez *et al.*, 2004).

Los géneros bacterianos identificados como degradadores tanto en suelo como en agua son *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, para los hongos son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*,

---

---

---

*Saccharomyces*, *Candida*; y las algas *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas* (Leahy y Colwell, 1990).

Muchos estudios han demostrado que distintos microorganismos son capaces de degradar total o parcialmente a plaguicidas como Aroclor (Golovleva *et al.*, 1990); metribuzin, linuron, metroburon, atrazina, endosulfán (Fournier *et al.*, 2002).

### **1.6.2 Bioestimulación**

La bioestimulación consiste en la adición de nutrientes e introducción de oxígeno u otros aceptores de electrones al sitio contaminado, para favorecer e intensificar la actividad biológica de los microorganismos que se encuentran en el suelo (Van Deuren *et al.*, 1997; Viñas *et al.*, 2001).

Ésta estrategia se aplica cuando existe población endógena con capacidad degradativa en la zona contaminada. Básicamente, los nutrientes que se introducen en el medio son aquellos que pueden ser limitantes para la actividad microbiana, principalmente los denominados macronutrientes (nitrógeno y fósforo) que se requieren en grandes cantidades, debido a que son necesarios para el crecimiento bacteriano. El nitrógeno es necesario para la síntesis de proteínas, componentes de la pared celular y ácidos nucleicos, componentes de las membranas celulares y ATP (Baker y Herson, 1994).

Comúnmente se adicionan nutrientes en concentraciones aprovechables estequiométricamente a una relación carbono:nitrógeno:fósforo (C:N:P) óptima, para generar un aumento en el crecimiento de diferentes poblaciones microbianas. La relación C:N:P más utilizada en la biorremediación es 100:10:1, la cual mantiene el equilibrio de nutrientes durante el metabolismo microbiano, acelerando el proceso de biodegradación (Atagana *et al.*, 2003).

Actualmente se ha reportado que la adición de residuos agroindustriales tales como trigo picado y residuos de pino (Semple *et al.*, 2001), optimizan los procesos de bioestimulación, debido a que éstos mejoran las condiciones del suelo (densidad de

---

---

---

volumen aparente, porosidad y difusión de oxígeno), incrementando el desarrollo de microorganismos.

### **1.6.3 Bioaugmentación**

La bioaugmentación consiste en la inoculación de microorganismos exógenos con capacidad de degradar el xenobiótico para complementar la población endógena existente en la zona afectada. Estos microorganismos pueden tener una adaptación previa al contaminante (Bossert *et al.*, 1984) o ser manipulados genéticamente (Hada *et al.*, 1981; Leahy *et al.*, 1990).

El uso de la bioaugmentación se considera conveniente cuando el número de microorganismos nativos degradadores en el sitio contaminado es muy bajo (menor a  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup> en peso seco) o cuando éstos no tienen la capacidad de degradación suficiente (Vogel, 1996).

Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos y por consiguiente de su capacidad para utilizar los contaminantes como fuente de alimento y energía (Van Deuren *et al.*, 1997).

La adición de consorcios o microorganismos nativos del sitio con capacidad para degradar el contaminante proporciona la ventaja de una adaptación más rápida en comparación con la adición de microorganismos ajenos a éste, debido a que presentan una resistencia mayor a las variaciones del ambiente (Mishra *et al.*, 2001).

## **1.7 Biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas**

Según Golovleva (1990), las *Pseudomonas* son los microorganismos más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos. La capacidad de estos microorganismos para degradar compuestos depende del tiempo de contacto con el compuesto, las condiciones medioambientales en las que se desarrollen y su versatilidad fisiológica.

---

---

Aunque las bacterias son las más empleadas en los procesos de biorremediación, se han empleado otros microorganismos como hongos para la degradación de compuestos tóxicos en el medio ambiente. Vásquez y Reyes (2001), aislaron varias especies de hongos en suelos de Argelia contaminados con plaguicidas, las más frecuentes fueron: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Absidia corymberifera* y *Rhizopus* por su capacidad para degradar el herbicida metribuzin en medio líquido. A su vez se demostró que este herbicida promovía el crecimiento de los géneros *Absidia* y *Fusarium*, los cuales lograron eliminar hasta el 50 % del compuesto después de 5 días. Por otra parte, el hongo *Botrytis cinérea* eliminó el herbicida linurón casi completamente y 30 especies más pudieron eliminar el metroburón, destacando *Botrytis cinérea* por eliminar el compuesto casi en su totalidad. En 2002, estos investigadores evaluaron tres especies de *Pseudomonas* para la degradación del herbicida Aroclor 1242, obteniendo porcentajes de remoción del 89.4 al 99.8.

Por su parte Fornier (2002), demostró la eficiencia de la bacteria *Rhodococcus sp.* para degradar las triazinas a nitrato. En este caso se realizó un ensayo para estudiar las transformaciones del herbicida atrazina como consecuencia de la descomposición microbiana, este compuesto logró ser transformado en nitrito (30%), óxido nitroso (3.2%), amonio (10%) y formaldehído (27%).

Hongos como *Phanerochaete chrysosporium*, son capaces de transformar a los plaguicidas enzimáticamente al inducir la deshalogenación por procesos aerobios (Bumpus y Aust 1987, Paszczyńska y Crawford 1995). Varias especies de *Trichoderma* son capaces de degradar plaguicidas, debido a su actividad enzimática (Matsumura y Bousch 1968, Smith 1995).

Carrillo *et al.* (2004), aislaron un cultivo bacteriano mixto conformado principalmente por cepas autóctonas de los géneros *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella* y *Acinetobacter* a partir de muestra de agua, suelo y sedimentos contaminados con DDT de la región del Valle del Yaqui en Sonora México. Evaluaron la capacidad de degradación del contaminante, en cultivo líquido bajo condiciones aeróbicas a 28 °C en medio de sales minerales y 133 ppm de DDT, como única fuente de carbono,

---

---

encontrando que la degradación ocurre en un tiempo relativamente corto de 80 horas, periodo en el cual los metabolitos DDE y DDD presentes en el medio o generados durante el proceso también fueron degradados, sin embargo, el 57% del sustrato no fue metabolizado y quedó asociado al paquete celular. Concluyendo que el empleo de sistemas biológicos autóctonos se presenta como alternativa para la biorremediación de sitios contaminados con este tipo de compuestos.

Mosquera *et al.* (2009), estudiaron la degradación del plaguicida malatión, tanto en laboratorio como en campo, utilizando microorganismos nativos de un suelo agrícola, la degradación del malatión en el laboratorio fue de un 81.6% para la mayor concentración utilizada ( $2.50 \text{ mg g}^{-1}$  de suelo), mientras que en condiciones de campo se obtuvo una remoción promedio de 74% con una concentración inicial de  $1.50 \text{ mg g}^{-1}$  de suelo, asimismo se obtuvo una cuenta microbiana promedio de  $6.8 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$  de suelo.

Por otra parte, Ortiz-Hernández *et al.* (2010), aislaron un consorcio bacteriano de suelos agrícolas identificados como *Stenotrophomonas malthophilia*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio metschnikovii*, *Serratia ficaria*, *Serratia sp.* y *Yersinia enterocolitica* e identificaron su capacidad para degradar tetraclorvinfos (ácido fosfórico, 2 cloro-1-2,4,5-triclorofenil vinil dimetil éster) (TVC) en medio mineral y en medio rico, obteniendo como resultado que el consorcio es capaz de crecer en TVC como única fuente de carbono, sin embargo, sólo una cepa pura removió el TVC del medio de cultivo, concluyendo que las cepas aisladas pueden ser utilizadas para la biodegradación de residuos o para la biorremediación de suelos contaminados con este plaguicida.

Upegui *et al.* (2010), evaluaron el efecto del enriquecimiento con nutrientes (una sal de fósforo y un fertilizante comercial con nitrógeno, fósforo y potasio) como una alternativa para mejorar la capacidad de degradación de microorganismos en una matriz sólida, contaminada con plaguicidas organofosforados, para lo cual realizaron experimentos de cultivos bajo condiciones controladas de oscuridad, temperatura y humedad durante un periodo de 30 días. Encontrando mayores porcentajes de degradación de clorpirifos y metil paratión que en el tratamiento con fósforo.

---

En un estudio reciente (Ortiz *et al.*, 2012), se evaluó la estimulación de poblaciones nativas de un suelo y su efecto sobre la remoción de DDT, adicionando pequeñas cantidades de fuentes de carbono secundarias (cosustratos). Como resultado de la investigación encontraron que la remoción del compuesto principal se incrementa de un 67, 59 y 56% con la presencia de fenol, hexano y tolueno respectivamente, disminuyendo la remoción con la adición de ácido acético.

### **1.8 DDT (Diclorodifenil tricloroetano)**

El DDT es probablemente el insecticida más conocido del grupo de los plaguicidas clorados. Fue usado en grandes cantidades para el control de numerosas plagas, sin embargo, debido a su naturaleza lipofílica y alta resistencia a la degradación se consideró como un compuesto contaminante persistente (Kannan *et al.*, 1992). Su aplicación fue prohibida en la mayoría de países industrializados desde 1972, sin embargo, en algunos países en desarrollo se siguió aplicando.

El producto crudo consiste de un 80 % del compuesto p,p DDT, un 20% del isómero o,p DDT y trazas del isómero o,o DDT. De estos el isómero p,p DDT tiene actividad insecticida significativa.

El destino y comportamiento del DDT en suelos está influenciado tanto por el tipo de suelo, como a las propiedades del DDT (Nicholls, 1991). La alta lipofilidad del DDT hace que sea adsorbido fuertemente a partículas sólidas (U.S. Dep. of Health and Human Services, 1994). La adsorción a la materia orgánica del suelo es muy alta en arena, seguido por la arcilla.

Los principales metabolitos de degradación del DDT por sistemas biológicos son los hidrocarburos aromáticos clorados 1,1-dicloro-2,2-bis (p-clorofenil) etano (DDD) y 1,1-dicloro-2,2-bis (p-clorofenil) etileno (DDE), conocidos como contaminantes orgánicos persistentes (POPs) (UNEP, 2002) y son más tóxicos que el compuesto parental.

Los microorganismos que habitan en los ambientes contaminados con compuestos xenobióticos evolucionan hasta alcanzar la capacidad de degradarlos, aunque las rutas de degradación sean limitadas por la baja velocidad relativa. En algunos casos, los metabolitos producidos a partir de reacciones de degradación de un contaminante son aún tóxicos o resistentes a la degradación. El proceso de degradación se podría entender a partir de aprovechamiento de los metabolitos por consorcios de microorganismos que siguen rutas de degradación requeridas (Sing *et al.*, 2008).

De manera general la degradación inicial del DDT ocurre por tres rutas metabólicas, y en todas ellas se involucra el ataque sobre la porción alifática del compuesto (Figura 2) (Wayland *et al.*, 1992; Wedemeyer, 1996).

Hua-Fang *et al.* (2010), caracterizaron una bacteria denominada D6 capaz de degradar DDT, proponiendo que según los metabolitos detectados ocurren reacciones de dechlorinación, hidrogenación, dioxigenación, decarboxilación, hidroxilación y por último el rompimiento de anillo para su completa mineralización.

En la tabla 1 se presentan algunas características del DDT y de sus productos de degradación.

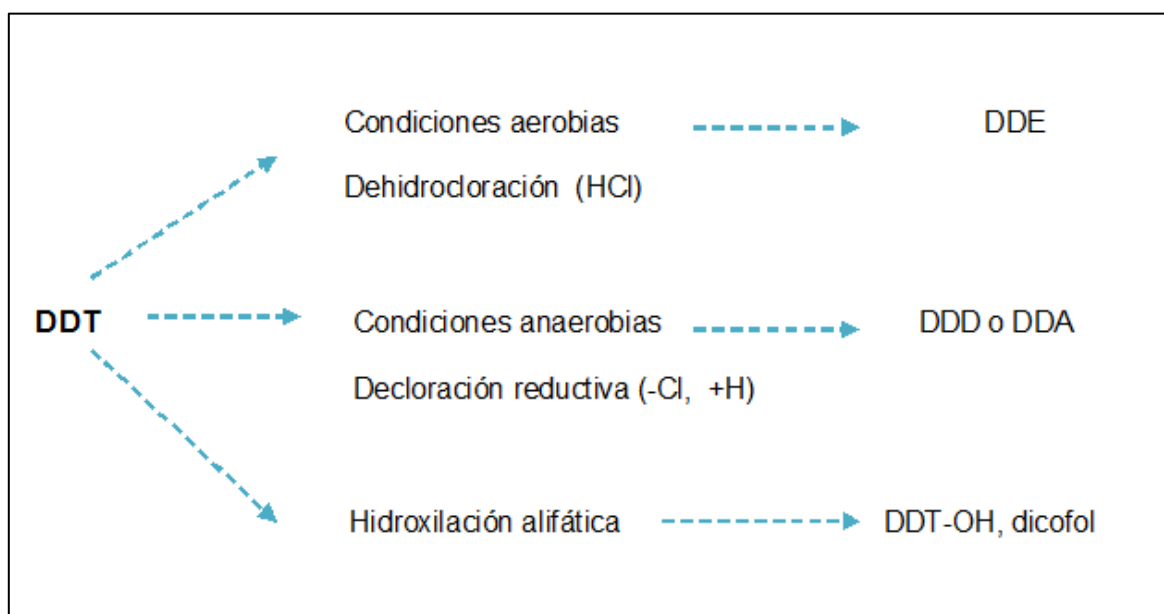
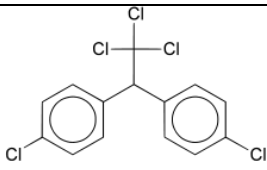
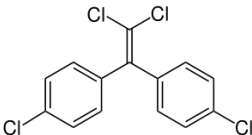
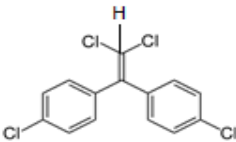


Figura 2. Vías alternativas en la degradación del DDT

En la figura 3 se muestra la ruta aerobia de degradación de DDT. En el paso A, el DDE es atacado por una dioxigenasa en las posiciones orto y meta, como resultado de ello se forma el intermediario 2,3-dihidrodiol-DDE. En los pasos B y D, el 2-(4'-clorofenil)-3,3-dicloropropenoato produce, vía decarboxilación, el 1,1-dicloro-(4'-clorofenil) etano, el cual mediante oxidación en el lado alifático de la cadena para producir 1,1-dicloro-(4'-clorofenil) etano, que es nuevamente oxidado a 4-cloroacetofenona. El grupo metilo terminal del 1,1-dicloro-(4'-clorofenil) etano sufrirá también se oxida para producir ácido fenilacético. En el paso C, la transformación de 4-cloroacetofenona a 4-cloropnenzaldehido puede darse mediante oxidación y la subsecuente decarboxilación del grupo metilo terminal. En el paso E, el producto resultante del rompimiento del anillo será degradado a un ácido clorado de 5 o 6 carbonos, dependiendo del sitio donde ocurra el rompimiento hidrolítico (UMBBD, 2008).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del DDT, DDE y DDD

Características	DDT	DDE	DDD
Sinónimos	p,p' DDT; 1,1,1, triclora-2,2-bis(p-clorofenil)etano; diclorofenil tricloraerano 4,4' DDT	Dihidrocloro; p-p' DDE; 1,1 -dicloro-	1,1-bis(4-clorofenil)-2,2-dicloroetano
Fórmula química	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> C <sub>15</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> C <sub>14</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> C <sub>14</sub>
Estructura química			
Peso molecular	354.49	318.03	320.05
Punto de fusión	108-109 °C (p,p'), 74-75 °C (o,p')	88.4-90 °C	109-110 °C
Punto de ebullición	260 °C		193 °C
Solubilidad	Insoluble (max. 0.0034 mgL <sup>-1</sup> a 25 °C)	12 mgL <sup>-1</sup> a 25 °C	Insoluble (max .06 mgL <sup>-1</sup> 24 °C)
Solventes orgánicos	Muy soluble en éter etílico, acetona, benceno	Lípidos y la mayoría de solventes orgánicos	
Coef. de partición Koc del carbono orgánico	2.4 x 10 <sup>5</sup>	4.4 X 10 <sup>6</sup>	7.8 X 10 <sup>6</sup>

(U.S. Department of Health and Human Services, 1994).

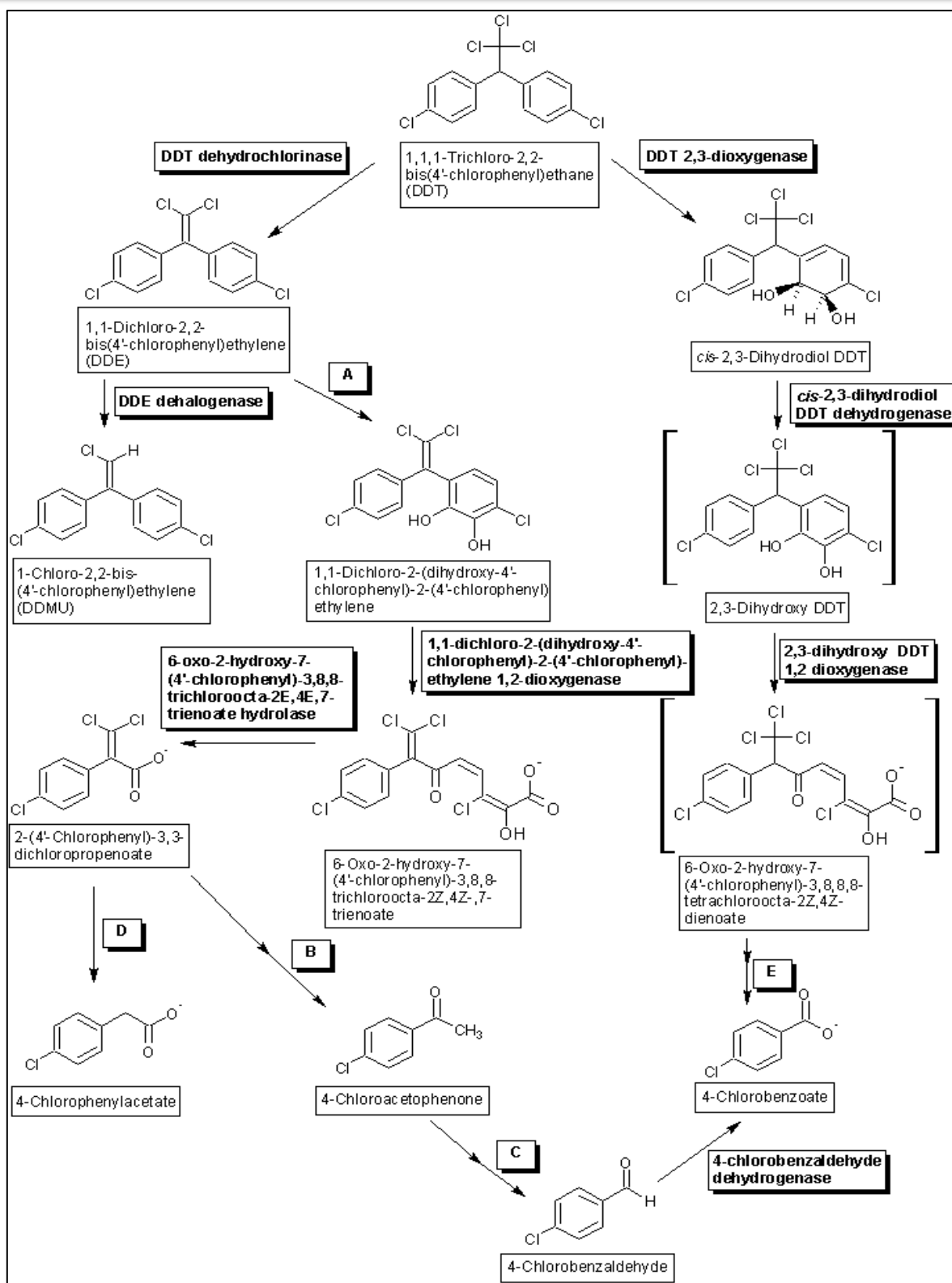


Figura 3. Ruta de Degradación aerobia de DDT como sustrato

De igual forma se han reportado otros trabajos en lo que se intenta describir la ruta de degradación del DDT hasta que llega a la mineralización (degradación de un compuesto hasta dióxido de carbono y agua) de la molécula del DDT. Subba y Alexander (1977) emplearon cultivos de *Pseudomonas putida* y sustratos análogos no clorados de metabolitos del DDT como el difenilmetano (DPM), benzidrol (BH) y la benzofenona (BP) con el fin de obtener información sobre las rutas metabólicas. Sin embargo, sólo propusieron la formación de intermediarios posibles a través de tres vías diferentes.

Bumpus *et al.* (1988), demostraron la desaparición y mineralización del DDT por una cepa del hongo *Phanerochaete chrysosporium* por vía anaerobia, la cual fue dependiente del mecanismo de degradación de la lignina que es inducida durante el metabolismo idiofásico en un medio deficiente de nitrógeno y dependiente de la concentración de glucosa en el medio.

### **1.9 Suelos de Tepetitla de Lardizábal**

Tepetitla, está ubicada en el Altiplano central mexicano a 2260 metros sobre el nivel del mar, situado en un eje de coordenadas geográficas entre los 19°15' y 19°19' latitud Norte; los meridianos 98° 20' y 98° 25' de longitud oeste. Cuenta con una superficie de 28,709 kilómetros cuadrados, colinda al norte con el municipio de Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, al sur con el estado de Puebla, al oriente con el municipio de Nativitas y al Poniente con el Estado de Puebla. El relieve del municipio presenta tres formas características: zonas planas, semi planas y accidentadas.

Los recursos hidrográficos son el río Atoyac que atraviesa el municipio desde la parte noroeste hasta el sureste, recorriendo aproximadamente 8.7 Km, además cuenta con corrientes de agua intermitentes: Atoyac- Ajejela.

En la mayor parte del municipio prevalece el clima templado subhúmedo con lluvias en verano. Igualmente la temperatura media anual máxima registrada es de 23.7 °C.

---

---

Durante el año se observan variaciones en la temperatura que van de 0.5 °C como mínima, hasta los 26.2 °C como máxima.

En el municipio existen tres tipos de suelos, los cambisoles, fluvisoles y gleysoles. Los cambisoles son aquellos suelos de sedimentos piroclásticos translocados, a menudo con horizontes duripán o tepetate. Los suelos fluvisoles, comprenden sedimentos aluviales poco desarrollados y profundos. Los gleysoles, se caracterizan por ser suelos de sedimentos aluviales influenciados por aguas subterráneas, poco desarrollados y profundos.

El ciclo agrícola del 2008 contaba con una superficie sembrada de 2,053 hectáreas (ha) de cultivos cíclicos, de las cuales 1301 ha fueron para maíz, 124 ha para avena, 36 ha para acelga, 85 ha para cilantro, 58 ha para haba verde, 53 ha para ebo, 99 ha para frijol, 36 para cebolla, 49 para espinaca y 75 para calabaza, para el 2009 la superficie cosechada se mantuvo igual con 2,053 ha (INEGI 2010).

Algunos de los compuestos usados en el sitio para el control de plagas son: paratión métilico y tamaron, herbicidas como faena, endosulfán, 2,4-D y malatión (Navarro González *et al.*, 2003), sin embargo, se desconoce el impacto real de éstos sobre los suelos, aunado a esto los suelos son regados con agua de canales provenientes del río Zahuapan, impactado por descargas de agua de origen urbano e industrial provenientes de diversas empresas ubicadas en el trayecto del mismo (CNA).

---

---

## 2. Justificación

En la actualidad la agricultura moderna forma parte de un modelo tecnológico que se caracteriza principalmente por la explotación intensiva de la tierra y el empleo de una elevada cantidad de insumos químicos como los plaguicidas. Al respecto más del 60% del área del municipio de Tepetitla está dedicada a la agricultura. Siendo ésta la principal fuente de ingresos se hace uso de una gran gama de plaguicidas para obtener altos rendimientos en los cultivos, sin embargo se desconoce el impacto real de estos compuestos en los suelos.

Por otra parte una consecuencia del uso prolongado de DDT fue la contaminación de los suelos y el ambiente. A pesar de que este plaguicida está restringido en nuestro país sus residuos, aún persisten en suelos convirtiéndose en una amenaza para la salud, por lo que es necesario el desarrollo de tecnologías eficientes para la limpieza de suelos contaminados.

Los microorganismos juegan un rol importante en la degradación de plaguicidas, debido a que poseen varias enzimas para degradar estos compuestos, por lo que el aislamiento de bacterias nativas de suelos agrícolas contaminados con la habilidad para degradar plaguicidas provee una herramienta para la recuperación los mismos.

En México se producen alrededor de 70 millones de toneladas de residuos agrícolas de los cuales el rastrojo de maíz y paja de trigo representan 58.0 y 15.0% respectivamente, los cuales pueden adicionarse a procesos de remediación incrementando la densidad de volumen aparente, porosidad y difusión de oxígeno en el suelo, estimulando el desarrollo de microorganismos.

Por todo lo expresado anteriormente el propósito de este proyecto es identificar los niveles de contaminación por plaguicidas en suelos agrícolas de Tepetitla, así como aislar bacterias altamente tolerantes al DDT para ser usadas posteriormente en procesos de biorremediación.

## 3. Hipótesis

Bacterias aisladas de suelos agrícolas con altas tolerancias al DDT serán capaces de aumentar la remoción del plaguicida mediante procesos de bioaumentación.

## 4. Objetivo general

Evaluar la remoción de DDT por bacterias nativas de suelos agrícolas mediante la bioestimulación y bioaumentación en suelos agrícolas de Tepetitla contaminados con DDT.

## 5. Objetivos específicos

1. Evaluar la remoción de DDT por bioestimulación en tres suelos agrícolas de Tepetitla con texturas diferentes en microcosmos por cultivo sólido.
2. Aislar, seleccionar e identificar cepas bacterianas con alta tolerancia al DDT de suelos agrícolas durante la etapa de bioestimulación para la conformación de un consorcio carbonoclasta
3. Evaluar la capacidad de remoción de un consorcio bacteriano carbonoclasta mediante bioaumentación en un suelo agrícola contaminado con DDT en microcosmos por cultivo sólido.

## 6. Metodología

### 6.1 Recolección y caracterización de suelo agrícola

Se colectaron seis muestras de suelos (Figura 4) de la zona agrícola del municipio de Tepetitla-Tlaxcala ubicada entre las coordenadas geográficas  $19^{\circ} 18' 98''$  latitud norte y  $98^{\circ} 16' 54''$  longitud oeste. La ubicación geográfica de los puntos muestreados (Tabla 2).

En cada uno de los sitios se realizó un muestreo del suelo en forma de zig-zag a lo largo de la parcela, con un distancia de cinco metros entre cada punto. Con un barreno se colectaron aproximadamente cinco muestras a una profundidad de 15-20 cm, de éstas se hizo una muestra compuesta que fue depositada en una bolsa de plástico, posteriormente las muestras fueron trasladadas al laboratorio para su caracterización fisicoquímica (contenido de materia orgánica, nitrógeno, fósforo, pH, humedad, textura y contenido de plaguicidas).



Figura 4. Ubicación de los sitios de estudio

Tabla 2. Ubicación de muestreo de suelo

<b>Parcela</b>	<b>Latitud Norte</b>	<b>Latitud Oeste</b>
<b>P1</b>	19 <sup>0</sup> 16'25.41"	98 <sup>0</sup> 21'47.67"
<b>P2</b>	19 <sup>0</sup> 16'20.15"	98 <sup>0</sup> 21'55.40"
<b>P3</b>	19 <sup>0</sup> 16'31.48"	98 <sup>0</sup> 21'38.49"
<b>P4</b>	19 <sup>0</sup> 16'42.45"	98 <sup>0</sup> 22'08.17"
<b>P5</b>	19 <sup>0</sup> 16'37.38"	98 <sup>0</sup> 22'53.83"
<b>P6</b>	19 <sup>0</sup> 14'01.26"	98 <sup>0</sup> 20'05.08"

### 6.1.1 Análisis fisicoquímicos

Para el análisis fisicoquímico de las muestras, los suelos se secaron a temperatura ambiente, trituraron y tamizaron. La determinación se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-AA-21-2001, bajo el siguiente procedimiento:

#### 6.1.1.1 Materia orgánica

La determinación de materia orgánica del suelo se evaluó a través del contenido de carbón orgánico con el método de Walkley y Black, que se basa en la oxidación de carbono orgánico del suelo por medio de una disolución de dicromato de potasio y el calor de reacción que se genera al mezclarla con ácido sulfúrico concentrado.

En un matraz Erlenmeyer se agregó 0.1g de suelo con 10 ml de dicromato de potasio 1 N y 20 ml de ácido sulfúrico concentrado, se agito enérgicamente por un minuto y dejó reposar 30 minutos, posteriormente se agregó 100 ml de agua, 10 ml de ácido fosfórico al 95% y 0.5 ml de difenilamina. Se tituló la mezcla con sulfato ferroso 0.5 N virando de violeta oscuro a verde. También se realizó un blanco sin materia orgánica.

Los cálculos se hicieron en base a la siguiente fórmula:

---

---

$$\text{Materia orgánica en \%} = \frac{(V1.N1 - VNF) K}{P}$$

Donde:

N1= Normalidad del dicromato de potasio

V= ml de sulfato ferroso

N= Normalidad del sulfato ferroso

P= Peso de la muestra

F=  $V_0N_1/VBN$

$V_0$ = ml del dicromato de potasio en el blanco

VB= ml de sulfato ferroso gastado en la titulación del blanco

K= 0.69 factor de corrección

### 6.1.1.2 Nitrógeno

La cantidad de nitrógeno y carbono se midió a través de un analizador elemental marca perkin elmer de CHN PE-2400 series II. Las muestras de suelos fueron secadas, se tomó 2 mg de suelo y se depositaron en capsulas de estaño que fueron depositadas en el equipo.

### 6.1.1.3 Fósforo

El fósforo como tal no se encuentra, la forma orgánica se encuentra principalmente en el humus y materia orgánica que varía de 0.0 a 0.2%, la inorgánica se encuentra como compuestos de hierro, aluminio, calcio, flúor siendo más abundantes que los orgánicos.

Para determinar el fósforo asimilable en suelos se usó el método de Bray y Kurtz (1994), con algunas modificaciones. En un tubo falcón se depositó un gramo de suelo, se adicionó 7 ml de solución extractora (460 ml de agua, 15 ml de solución de  $NH_4 F$  1N y 25 ml de HCl 0.05 N), se agitó vigorosamente durante 5 min, se decantó en un centrifuga a 5 000 rpm durante 5 minutos.

Se mezcló 1 ml de la solución anterior, 6 ml de agua y 2 ml de solución de molibdato de amonio (15 gr de molibdato de amonio tetrahidratado en 350 ml de HCl 10 N) y se

---

---

agregó 1 ml de SnCl<sub>2</sub> diluida (se tomó 0.5 ml de 5 g de SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O diluido en 12.5 de HCl concentrado y se agregó 33 ml de H<sub>2</sub>O), se agitó durante un minuto y se leyó en un espectrofotómetro a 640 nm. Para el blanco se tomó 2 ml de la solución extractora, 5 ml de agua y 2 ml de molibdato de amonio, se mezcló durante 1 min y se agregó 1 ml de la solución de SnCl<sub>2</sub> diluida.

Para la curva patrón se siguió el mismo procedimiento pero en este caso se tomaron diferentes concentraciones de 1 a 100 ppm de una solución tipo de fosfatos.

#### 6.1.1.4 Contenido de humedad

La humedad del suelo se calculó por el método gravimétrico. Se pesó 2 g de suelo en un recipiente de papel aluminio a peso constante, posteriormente se dejó en horno a 100 °C hasta alcanzar un peso constante.

El cálculo se hizo con la siguiente formula:

$$\text{Humedad} = \frac{\text{peso del recipiente con muestra húmeda} - \text{peso del recipiente con muestra seca}}{\text{Peso del recipiente con muestra} - \text{peso del recipiente sin muestra}}$$

#### 6.1.1.5 pH

Se realizó una suspensión del suelo en una proporción peso volumen 1:1 entre el suelo y el agua destilada. Esta se agitó aproximadamente 30 minutos y posteriormente se midió el pH directamente sobre la suspensión. Previó a cada medición se realizó la calibración y verificación del medidor de pH.

---

---

#### **6.1.1.6 Textura**

La textura se determinó por el procedimiento de Bouyoucos, para lo cual se pesaron 60 g de suelo en un vaso de precipitado de 500 ml, este se pasó a un vaso de agitación, se agregó 10 ml de metasilicato de sodio al 5%, posteriormente se agregó agua hasta la primera ranura del vaso y se procedió a agitar, pasados 5 minutos se vertió el contenido a una probeta de 1000 ml, se agregó agua hasta completar el litro con el hidrómetro dentro, se sacó el hidrómetro y se agitó la probeta durante un minuto, posteriormente se tomaron las lecturas con el hidrómetro y se midió la temperatura a los 40 segundos, se dejó reposar por dos horas y tomó nuevamente la lectura. Para realizar los cálculos se corrigieron las lecturas del hidrómetro agregando 0.36 por cada grado centígrado arriba de 19.5<sup>0</sup>C.

#### **6.1.1.7 Cuenta microbiana**

Se realizó una cuenta de bacterias y hongos en placa (Clark 1995), para esto se diluyó un gramo en 9mL de solución de NaCl al 0.85%, se agitó vigorosamente por 10 min, posteriormente se realizaron diluciones decimales hasta 10<sup>8</sup>. Se sembraron 80 microlitros de las dos diluciones más altas en cajas Petri con medio nutritivo y agar papa dextrosa. Las placas se incubaron a 30 <sup>0</sup>C para el crecimiento de hongos y bacterias. La cuantificación en unidades formadoras de colonias (UFC) se realizó a las 24 hrs para bacterias y 72 para hongos.

### **6.2 Caracterización de residuos agroindustriales**

Para la caracterización de residuos agroindustriales se evaluó el contenido de carbono orgánico, nitrógeno y fósforo de acuerdo a las técnicas antes mencionadas.

---

---

### 6.3 Remoción de DDT en microcosmos por bioestimulación

Las pruebas de remoción en microcosmos por bioestimulación se llevaron a cabo bajo el siguiente procedimiento.

#### 6.3.1 Preparación del suelo

El suelo fue secado a temperatura ambiente antes de llevarse a cabo las pruebas, esto con la finalidad de controlar la humedad a la que se trabajaría durante las cinéticas de remoción.

Para los controles abióticos el suelo fue esterilizado en autoclave a 121 °C con 15 lb de presión. Este procedimiento se realizó durante cuatro días consecutivos para destruir microorganismos y formas de resistencia bacteriana.

#### 6.3.2 Preparación de microcosmos

Para el montaje de los microcosmos se utilizaron botellas serológicas de vidrio de 250 ml, las cuales fueron lavadas con ácido sulfúrico al 5% para eliminar residuos de jabón y materia orgánica.

En las botellas de vidrio se colocaron 20 g de suelo suplementado con 50 mg kg<sup>-1</sup> de DDT grado técnico, residuo agroindustrial (bagacillo de caña o paja de trigo o rastrojo de maíz) en una relación 95:5, se agregó agua estéril para llevar al 30 % de humedad y por último se hizo un ajuste de C:N:P a una relación 100: 10:1 las fuentes de nitrógeno y fósforo fueron (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> respectivamente.

Se montaron controles para verificar la pérdida del plaguicida por factores abióticos y bióticos, los controles abióticos consistieron de suelo estéril con y sin DDT, en los controles bióticos se usó suelo con y sin DDT. Las condiciones de cada uno de los tratamientos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de los tratamientos para pruebas de bioestimulación

	Tratamiento	DDT	Suelo	Bagacillo	Trigo	Maíz
<b>Controles abióticos</b>	SE + DDT	+	Estéril	-	-	-
	SE - DDT	-	Estéril	-	-	-
<b>Controles bióticos</b>	S + DDT	+	No estéril	-	-	-
	S - DDT	-	No estéril	-	-	-
<b>Tratamientos</b>	S + B + DDT	+	No estéril	No estéril	-	-
	S + BE + DDT	+	No estéril	Estéril	-	-
	SE + B + DDT	+	Estéril	No estéril	-	-
	S + T + DDT	+	No estéril	-	No estéril	-
	S + TE + DDT	+	No estéril	-	Estéril	-
	SE + T + DDT	+	Estéril	-	No estéril	-
	S + M + DDT	+	No estéril	-	-	No estéril
	S + ME + DDT	+	No estéril	-	-	Estéril
	SE + M + DDT	+	Estéril	-	-	No estéril

### 6.3.5 Cuantificación de CO<sub>2</sub> en los microcosmos

Como medida indirecta de la actividad metabólica cada tercer día se monitoreo la producción de CO<sub>2</sub>, a través de la técnica por titulación ácido base, en donde el hidróxido de sodio (agente alcalino) retiene el CO<sub>2</sub> formado por la actividad microbiana, posteriormente fue cuantificado por titulación con ácido clorhídrico y fenolftaleína como indicador (Kijchavengkul *et al.*, 2006). La producción de CO<sub>2</sub> fue determinada por la diferencia del exceso de hidróxido que no reacciono (Crittter *et al.*, 2004).

### 6.3.6 Cuenta viable de bacterias y hongos

El recuento de bacterias y hongos se realizó cada tercer día sacrificando microcosmos por duplicado, mediante siembra en superficie, utilizando como medio de cultivo agar nutritivo para bacterias y agar papa dextrosa para el recuento de hongos en caja Petri. En las siembras, 80 µl de suspensión de suelo fueron inoculadas en la superficie del medio de cultivo y esparcidos con asa de vidrio. El inóculo de suelo fue preparado mediante diluciones seriadas (10<sup>-2</sup>-10<sup>-5</sup>) a partir de una solución inicial de 1g de suelo en 9 ml de solución de cloruro de sodio al 0.85%.

---

---

Posterior a la inoculación en el medio de cultivo, posteriormente las cajas se incubaron a 30 °C durante 24 y 72 horas, después de las cuales se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC).

### **6.3.7 Análisis de DDT residual**

El análisis para la determinación de DDT residual, se realizó a los días 0, 4, 8, 12 y 20 para lo cual el suelo se secó a temperatura ambiente.

El DDT residual del suelo se extrajo en un microondas SOLV Anton Par Multiwave 3000 durante 15 min a 120 °C. Se pesaron dos gramos del suelo y se colocaron en tubos para microondas adicionando 25 ml de mezcla hexano-acetona (1:1), el extracto resultante se evaporo y se re-suspendió en 2ml de hexano. La muestra se analizó en un cromatógrafo de Gases Varian con detector de captura de electrones (Ni 63), equipado con una columna capilar CP Sil %CB de 15m de longitud, 0.25mm (d.e) y 0.25um (d.i), se usó nitrógeno como gas acarreador.

### **6.4 Aislamiento de bacterias**

Para aislar las cepas se seleccionaron colonias por morfología de las placas incubadas para el recuento de bacterias de los tratamientos bioestimulados con residuos agroindustriales. Para obtener un cultivo axénico de cada tipo de colonia, se purificaron mediante siembras consecutivas en medio nutritivo por medio de la técnica de estría cruzada.

---

## 6.5 Evaluación de tolerancia de bacterias aisladas

La tolerancia de los aislados bacterianos a diferentes dosis de DDT, se evaluaron por ensayos de inhibición por difusión en agar por sensidisco, se usaron discos de fluororuro de polivinilideno (PVDF) (Millipore, E.E.U.U.), impregnados con DDT a concentraciones finales de 10, 20, 30, 40 y 50 mgL<sup>-1</sup>.

Los aislados bacterianos se cultivaron en 5 ml de caldo nutritivo a 30 °C con agitación constante a 200 rpm, se llevaron a una densidad óptica de 0.14 a 600 nm, se depositaron 100 ml del cultivo (aproximadamente  $1.5 \times 10^7$  UFC), en una caja Petri con agar nutritivo, realizando un estriado en toda la caja, seguido de esto se colocó en la superficie de la caja discos correspondientes a diferentes concentraciones de DDT (10,20, 30, 40 y 50 mg kg<sup>-1</sup>), se usó acetona diluida con agua 1:1 como portador del DDT. Las placas se incubaron a 30 °C y los halos de inhibición se midieron con un vernier cada 24 horas durante dos días. Se incluyeron discos controles sin DDT.

### 6.5.1 Identificación molecular de los aislados

Se utilizó el kit de ADN fúngico/bacteriano ZR (Zymo Research, E.E.U.U) para la extracción de ADN genómico de los aislados. Por PCR se amplificó un fragmento del gen bacteriano de ARNr 16s de 1450 pb usando primers universales P27F (5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3') y 1525R (5' - AAGGAGGTGWTCCARCC - 3') (Lane 1999). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, posteriormente fueron purificados utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen).

La secuenciación del ADN se realizó mediante el uso del terminador v3.1 Ciclo de Secuenciación Kit BigDye ® (Invitrogen, EE.UU) en un secuenciador Perkin Elmer /Applied Biosystems Modelo 3730, utilizando los nucleótidos P27F/P1525R como en la secuenciación. Para identificar a los microorganismos, las secuencias resultantes se compararon con la base de datos GenBank utilizando la plataforma de BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

---

---

El análisis filogenético se realizó utilizando el software MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias fueron analizadas con la función ClustalW y los árboles se construyeron con el modelo de Kimura parámetro 2 (Kimura 1980). La robustez de la filogenia se probó por análisis de arranque con 500 interacciones.

### **6.6 Remoción de DDT en microcosmos por bioaumentación**

Para llevar a cabo los ensayos de por bioaumentación el suelo se preparó bajo el procedimiento del apartado 6.3.1. Las bacterias fueron crecidas por separado en agar nutritivo durante 36 hrs, posteriormente se lavaron con solución salina y se ajustaron a una concentración de  $10^6$ , a través de patrones de turbidez de McFarland. Los patrones de McFarland se prepararon añadiendo ácido sulfúrico a una solución acuosa de cloruro de bario que produce la formación de un precipitado de sulfato de bario suspendido.

En las botellas serológicas de vidrio se colocaron 20 g de suelo suplementado con  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  de DDT, el suelo acondicionó a una humedad del 30% con agua estéril, posteriormente se realizó un ajuste de C:N:P a una relación 100:10:1 con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Y por último los consorcios fueron adicionados a una concentración final de  $10^6 \text{ UFC g}^{-1}$  de suelo.

Se realizaron tratamientos con biestímulo + bioaumentación, para lo cual en botellas de vidrio serológicas se depositaron 20 g de suelo suplementado o no con  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  de DDT según fuera el caso, en adición rastrojo de maíz a una relación 95-5 y por último los consorcios fueron adicionados a una concentración final de  $10^6 \text{ UFC g}^{-1}$  de suelo.

Las condiciones de cada uno de los tratamientos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Condiciones de los tratamientos para pruebas de bioaumentación

	DDT	Suelo	Rastrojo de maíz	Consortio $10^6$ UFC $g^{-1}$ suelo
<b>Tratamientos</b>				

### 6.7 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente por análisis de varianza ( $p < 0.05$ ), Tukey ( $p < 0.05$ ) y LSD (Diferencia Mínima Significativa), utilizando el software de sistema de análisis estadístico SAS, 9.00, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

---

---

## 7. Resultados y Discusión

### 7.1 Caracterización de suelos de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala

El pH de los suelos P4, P5 y P6 fueron clasificados como ácidos (6.58, 6.22 y 5.22), mientras que los suelos P1, P2 y P3 presentaron un pH básico (7.23, 8.41 y 7.7). El porcentaje de materia orgánica para todos los suelos fue de baja a media con un rango de 1.0-2.4. El contenido de nitrógeno resultó ser bajo según la clasificación de la NOM-021 SEMARNAT-2001. Por otro lado la textura de los suelos P1, P4 y P5 fueron franco arcilloso arenoso, el P2, P3 y P6 presentaron una textura franco arenoso, arena arcilloso y franco respectivamente (Tabla 5).

Se encontraron concentraciones a nivel traza de metil paratión en las muestras P1 y P3, mientras que en el suelo P5 se encontraron picos de plaguicidas relacionados con Gamma BHC y endosulfán, así mismo en el suelo P6 se identificó p'p DDT, Gamma BHC y endosulfán en concentraciones traza. Estos compuestos son de baja solubilidad en agua y presentan un alto potencial para ser adsorbidos en el suelo.

El bajo porcentaje de materia orgánica (1.0-2.4%) en los suelos puede estar influenciando la movilización de plaguicidas a capas más profundas, ya que se ha determinado que la materia orgánica y los minerales arcillosos son los constituyentes del suelo que controlan la adsorción de diferentes compuestos como clorofenoles (Van Gesteli, 1996). La cantidad de materia orgánica es esencialmente la responsable de la sorción de compuestos no iónicos y neutros (Spark y Swift 2002; Coquet, 2003; Díaz-Trujillo, 2007), mientras que su naturaleza molecular es la llave en la determinación de la absorción iónica (Ahmad *et al.*, 2006).

Otro factor relacionado al hecho de que no encontrar plaguicidas en el área agrícola puede deberse al contenido de arcillas, ya que según Hernández-Soriano *et al.* (2007), los suelos de textura fina tienen una mayor capacidad de sorción y muestran menos sensibilidad a la lixiviación de plaguicidas, mientras que los de textura media y gruesa presentan menor capacidad de retención, como es el caso de los suelos P2 y

---

---

P3. Si bien el suelo P6 tuvo un contenido de arcilla del 26%, el contenido de materia orgánica es baja y se ha demostrado que suelos arcillosos con bajo contenido de materia orgánica son malos adsorbentes (Andrades *et al.*, 2003), así mismo, los altos porcentajes de arena (mayor al 50%) en los suelos P1, P2, P3, P4 y P5 hacen que aumente la porosidad del suelo lo cual los hace muy susceptibles a la lixiviación de plaguicidas.

Además, la distribución de los plaguicidas entre la fase acuosa y el suelo está influenciada por una serie de factores relacionados con el medio ambiente (suelo), entre los que destacan la temperatura. En el caso de los suelos de Tepetila el contenido de agua en todos los suelos muestreados fue alta, por lo que los procesos de adsorción se ven afectados, modificándose la accesibilidad de los puntos de adsorción y las propiedades superficiales del adsorbente, generando una lixiviación de los compuestos. Adicionalmente, Juárez-Santacruz *et al.* (2011), encontraron compuestos persistentes en sedimentos superficiales del río Atoyac; contaminación ocasionada por el uso de plaguicidas en suelos agrícolas de Tlaxcala.

Tabla 5. Características fisicoquímicas de suelos de Tepetitla de Lardizábal Tlaxcala

Parámetro	Suelo agrícola					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
<b>pH</b>	7.23	8.41	7.7	6.58	6.22	5.22
<b>Materia orgánica (%)</b>	1.0	2.4	1.7	1.9	1.1	1.7
<b>Carbono orgánico (%)</b>	0.6	1.4	1.0	1.1	0.7	1.0
<b>Nitrógeno inorgánico (%)</b>	0.021	0.063	0.035	0.028	0.087	0.049
<b>Fósforo (%)</b>	0.0018	0.0023	0.0016	0.0022	0.0020	0.0022
<b>Contenido de agua</b>	15.77	16.41	20.93	14.98	7.1	14.16
<b>Relación C:N:P</b>	100:3.5:0.3	100:4.5:0.16	100:3.5:0.16	100:2.5:0.2	100:12.4:0.28	100:4.9:0.22
<b>Arena (%)</b>	52	71.6	84.4	56.8	63.7	38
<b>Limo (%)</b>	23	13.4	8.8	17.6	11.2	36
<b>Arcilla (%)</b>	25	15	6.8	25.6	25.1	26
<b>Textura</b>	Franco arcillosa arenosa	Franco arenosa	Areno arcillosa	Franco arcillo arenosa	Franco arcillo arenosa	Franco

## 7.2 Caracterización de residuos agrícolas

En la tabla 5 se muestra el contenido de carbono, nitrógeno y fósforo de los tres residuos agroindustriales (bagacillo de caña, rastrojo de maíz y paja de trigo) que fueron usados durante los ensayos de estimulación de la microbiota nativa de los suelos agrícolas, para evaluar la remoción del DDT.

Los residuos de origen vegetal por lo general presentan una relación carbono-nitrógeno (C/N) elevada como se muestra en la tabla 6. Se ha reportado que el bagacillo de caña posee una relación de 200, la relación encontrada aquí fue de 198. Álvarez-Solís *et al.* (2010) reportaron una relación C/N en el rastrojo de maíz de 54.9, la obtenida en este trabajo es más alta (67.7). Por su parte Lindh (2004) reporta una relación C/N de 80 en la paja de trigo, en este estudio se encontró una relación menor (68.7). Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas de los residuos mencionados dependen de la especie y de las condiciones climáticas donde se hayan generado.

Tabla 6. Contenido de Carbono, Nitrógeno y Fósforo de residuos agroindustriales

<b>Residuos agroindustriales</b>			
<b>Parámetro</b>	<b>Bagacillo de caña</b>	<b>Rastrojo de Maíz</b>	<b>Paja de trigo</b>
<b>Carbono %</b>	34.35	35.7	37.85
<b>Nitrógeno %</b>	0.175	0.465	0.555
<b>Fósforo %</b>	0.00343	0.000031	0.000187
<b>Relación C/N</b>	196	76.7	68.1

### 7.3 Pruebas de bioestimulación por cultivo sólido en microcosmos

El suelo es un medio complejo que contiene poblaciones de microorganismos mixtos con actividades sinérgicas, dependiendo de sus propiedades y condiciones ambientales influyen en el comportamiento de la microbiota y plaguicidas, por lo que se evaluó la remoción de DDT por bioestimulación con residuos agroindustriales (bagacillo de caña, rastrojo de maíz y paja de trigo), en tres suelos agrícolas con textura franco arenoso, franco arcilloso arenoso y franco a nivel microcosmos, seleccionados por presentar texturas diferentes.

Las poblaciones bacterianas en las muestras de suelo para los ensayos se encontraron en un rango de  $10^6$  -  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  de suelo (Tabla 7). La cantidad bacteriana en suelo depende de factores tales como los nutrientes y tipo de suelo.

A todos los ensayos se les realizó un ajuste de C:N:P a una relación 100:10:1 y se les adicionó 50  $mg\ kg^{-1}$  de DDT. Las características de los suelos usados durante las pruebas de bioestimulación se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7. Características fisicoquímicas de los suelos usados en la prueba de bioestimulación y bioaumentación

Suelo	Textura	Materia Orgánica %	Nitrógeno %	Fósforo %	Conductividad eléctrica $dS\ m^{-1}$	pH	Humedad	UFC (bacterias)
A	Franco arenoso	2.4	0.123	0.022	0.33	8.41	1.38	$1.4 \times 10^7$
B	Franco arcilloso arenoso	1.1	0.087	0.016	1.2	6.22	1.17	$2.5 \times 10^7$
C	Franco	1.7	0.049	0.022	0.33	5.22	1.38	$3.5 \times 10^6$

---

### 7.3.1 Actividad respirométrica

Durante las cinéticas de remoción de DDT, el crecimiento de los microorganismos fue medido indirectamente por la producción de CO<sub>2</sub> cada 48 hrs. El control abiótico del suelo franco arenoso (A) con DDT (S+DDT), presentó la actividad metabólica más baja con respecto al control sin DDT con una producción de 1.63 mgCO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> suelo (LSD P < 0.05) (Figura 5), que se correlaciona con un descenso de la comunidad bacteriana, lo que indica que existió un efecto negativo sobre la microbiota nativa. Este mismo efecto se observó en el suelo franco arcillo arenoso (B) y franco (C) donde la producción fue de 2.23 y 1.25 mgCO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> respectivamente.

Se ha reportado que altas concentraciones de plaguicidas funcionan como tóxicos para los microorganismos del suelo y según Kantachote *et al.* (2010) existe un efecto de inhibición sobre el crecimiento de microorganismos por el DDT. Gan *et al.* (1995), sostienen que altos niveles de plaguicidas inhiben uno o posiblemente más miembros de consorcios microbianos necesarios para la degradación del compuesto, este efecto se ha observado por la adición de otros plaguicidas, por ejemplo Rivera *et al.* (2010), observaron un efecto inhibitor en *Azotobacter chroococcum*, al adicionar cipermetrina.

Por otra parte, Pfaender *et al.* (1973) reportaron que la adición de nutrimentos incrementa la remoción de DDT, debido a que las enzimas de bacterias involucradas en estos procesos pueden actuar de manera cometabólica. En general se adiciona macronutrientes como nitrógeno y fósforo para favorecer el crecimiento de los microorganismos. La relación C:N:P; 100:10:1 utilizada en todos los ensayos de este estudio es la más usada en procesos de biorremediación que mantiene un equilibrio de nutrimentos permitiendo acelerar el metabolismo microbiano (Sing *et al.*, 1990; Margesin 1997, Atagana *et al.*, 2003). Se ha comprobado que la adición de residuos agroindustriales aportar nutrimentos como el nitrógeno que como ya se mencionó ayuda a acelerar los procesos microbiológicos, también produce beneficios sobre las propiedades del suelo como la capacidad de retención hídrica e intercambio catiónico y mejoran la textura del suelo. La aplicación de enmiendas orgánicas ayudan a

---

aumentar la degradación de fungicidas como el bromuro de metilo y el isotiocianato de metilo (Gan *et al.*, 1998).

La actividad metabólica en los tratamientos estimulados con residuos agroindustriales (bagacillo de caña, rastrojo de maíz y paja de trigo) aumentó, debido a que los nutrimentos aportados favorecieron el crecimiento microbiano. En el suelo A, el tratamiento al que se adicionó rastrojo de maíz (S+M+DDT) presentó la actividad metabólica más alta con una producción de  $11.27 \text{ mg g}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  ( $P < 0.05$ ). Los tratamientos con bagacillo de caña y paja de trigo (S+B+DDT y S+T+DDT) no mostraron diferencias significativas con una producción acumulada al día 20 de 7.4 y  $8 \text{ mg g}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  respectivamente (Figura 5).

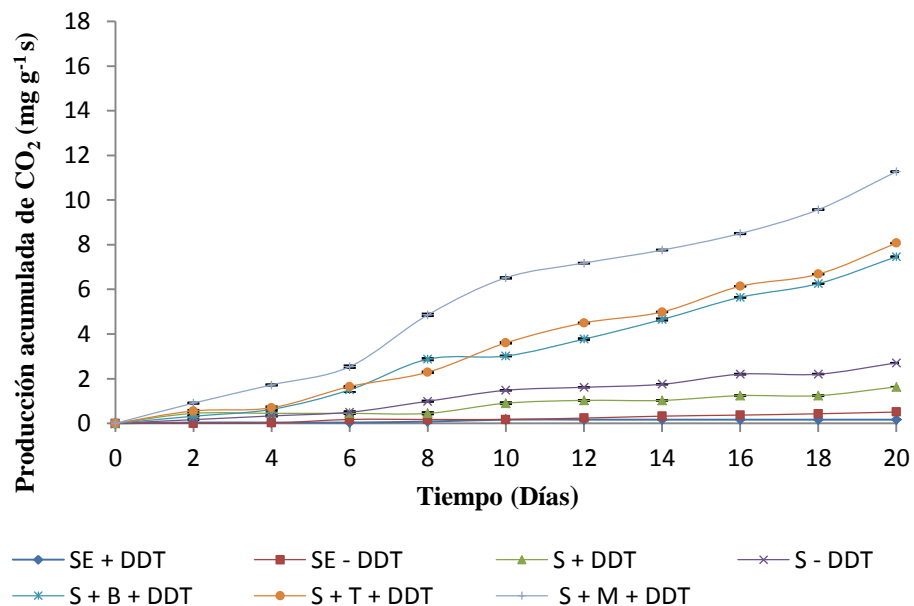


Figura 5. Actividad microbiana por la microbiota nativa estimulada del suelo A contaminado con DDT en cultivo sólido. (SE=suelo estéril, B=bagacillo de caña, T=paja de trigo y M=rastrojo de maíz).

En el suelo B, el tratamiento con rastrojo de maíz presentó una producción de  $14.84 \text{ mgCO}_2 \text{ g}_{\text{suelo}}^{-1}$  siendo estadísticamente diferente a los tratamientos a los que se adicionaron paja de trigo y bagacillo de caña ( $p < 0.05$ ), los cuales mostraron un

comportamiento similar hasta el décimo día, ya que en el tratamiento S+T+DDT la producción de CO<sub>2</sub> aumentó al final de la cinética (10.84 mgCO<sub>2</sub>g<sub>suelo</sub><sup>-1</sup>) (Figura 6).

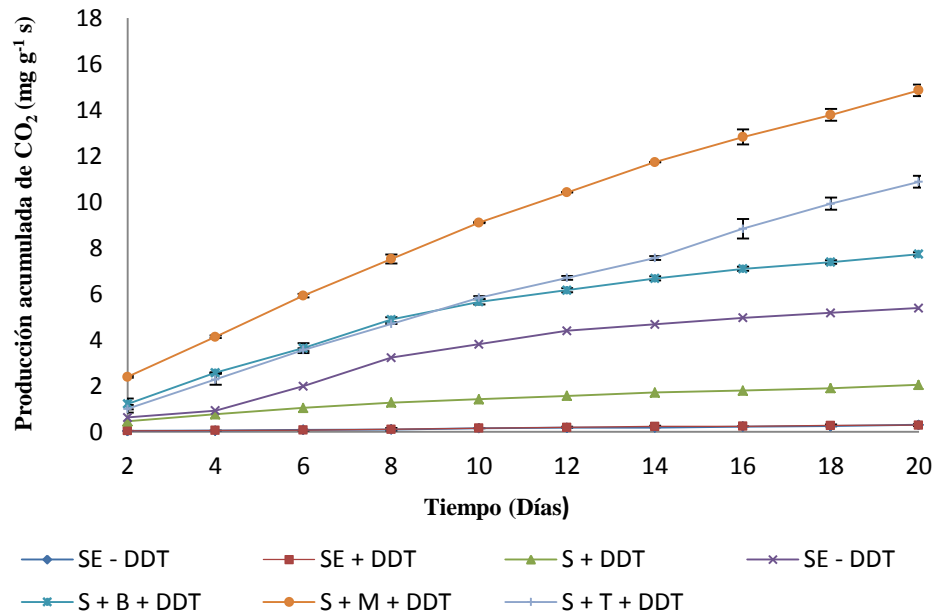


Figura 6. Actividad microbiana por la microbiota nativa estimulada en suelo B contaminado con DDT en cultivo sólido. (SE=suelo estéril, B=bagacillo de caña, T=paja de trigo y M=rastrojo de maíz).

En el caso del suelo C, se obtuvo un comportamiento similar a los suelos A y B, el tratamiento al que se adicionó rastrojo de maíz también mostró la producción más alta ( $P < 0.05$ ). De igual forma que en los suelos A y B los tratamientos con bagacillo de caña y paja de trigo no mostraron diferencias significativas con una producción de 14.24 y 13.9 mgCO<sub>2</sub>g<sub>suelo</sub><sup>-1</sup> (Figura 7).

Particularmente los tratamientos a los que se agregó rastrojo de maíz presentaron un incremento en la actividad metabólica. En el suelo C (textura franco) se observó la mayor actividad metabólica con 16.73 mgCO<sub>2</sub>g<sub>suelo</sub><sup>-1</sup>, esto probablemente a que el suelo franco presenta una composición cuantitativa en proporciones óptimas o muy próximas a ellas de arena, limo y arcilla, por lo que retiene la humedad, por otra parte se ha determinado que este residuo se mineraliza dos veces más rápido que otros

residuos, esto puede deberse a que posee mayor contenido en compuestos degradables.

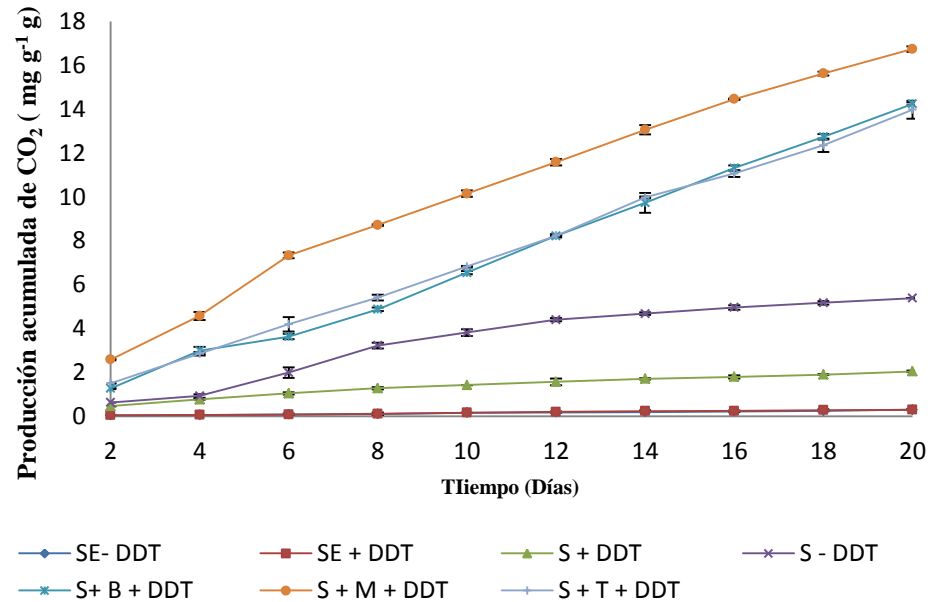


Figura 7. Actividad microbiana en cultivo sólido por la microbiota nativa estimulada en el suelo C contaminado con DDT. (SE=suelo estéril, B=bagacillo de caña, T=paja de trigo y M=rastrojo de maíz).

Cabe mencionar que, como era de esperarse los controles abióticos (SE+DDT y SE-DDT) en los tres suelos no mostraron una actividad metabólica considerable (Figura 5, 6 y 7).

Para evaluar si la actividad metabólica era debida a los microorganismos autóctonos del suelo se llevaron a cabo ensayos con suelo estéril + residuos no estériles y suelos no estériles + residuos estériles. Comparado la producción de CO<sub>2</sub> del suelo A entre los tratamientos adicionados con residuos estériles y sin esterilizar los primeros mostraron una menor actividad metabólica ( $P < 0.05$ ) (Figura 8), por lo que el efecto en el aumento de la producción de CO<sub>2</sub> en tratamientos con residuos no estériles se debió también al aporte de microorganismos asociados a éstos.

De igual forma en el suelo B, la actividad metabólica asociada a los microorganismos de residuo incremento en los tratamientos con suelo estéril a los que se adicionó paja de trigo y bagacillo de caña (SE+T+DDT Y SE+B+DDT), sin embargo, está no fue comparable con la producida en los tratamientos con suelo no estéril más residuos estériles (microorganismos nativos del suelo). El tratamiento con rastrojo de maíz se comportó de forma diferente al observarse una producción de CO<sub>2</sub> más alta en el tratamiento SE+M+DDT (microorganismos asociados al residuo) que la que se produjo en el S+ME+DDT (microorganismos nativos del suelo) (Figura 9) (P<0.05).

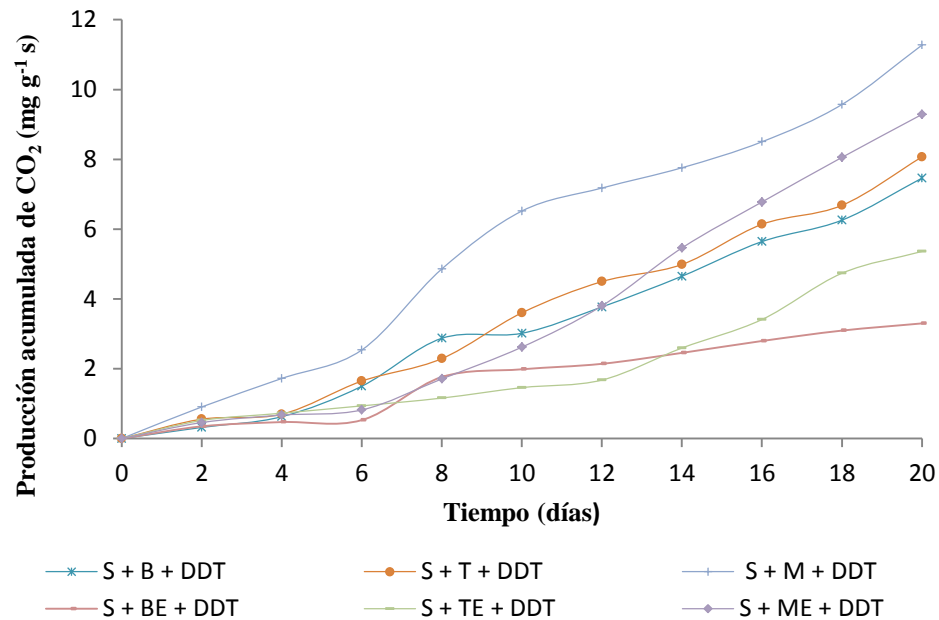


Figura 8. Actividad microbiana por la microbiota y residuos agroindustriales en el suelo A contaminado con DDT en cultivo sólido. (SE=suelo estéril, B=bagacillo de caña, T=paja de trigo y M=rastrojo de maíz, BE=bagacillo de caña estéril, TE=paja de trigo estéril, ME=rastrojo de maíz estéril).

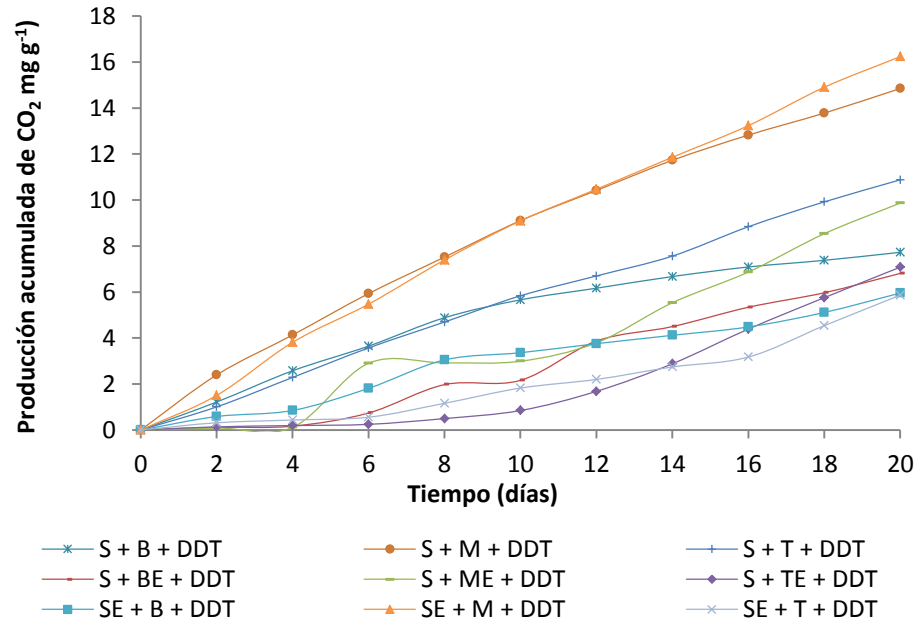


Figura 9. Actividad microbiana por la microbiota de residuos agroindustriales y suelo B contaminado con DDT en cultivo sólido. (SE=suelo estéril, B=bagacillo de caña, T=paja de trigo y M=rastrojo de maíz, BE=bagacillo de caña estéril, TE=paja de trigo estéril, ME=rastrojo de maíz estéril).

A diferencia de los suelos A y B, en el suelo C no hubo diferencias significativas entre los tratamientos S+ME+DDT y SE+M+DDT, los microorganismos nativos del suelo y los asociados al residuo mostraron una producción de  $\text{CO}_2$  similar, esto mismo se observó en el caso de los tratamientos con bagacillo de caña. Por su parte, los tratamiento SE+T+DDT y S+TE+DDT mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), por lo que los microorganismos nativos del suelo mostraron una actividad más alta que los asociados al residuo (Figura 10).

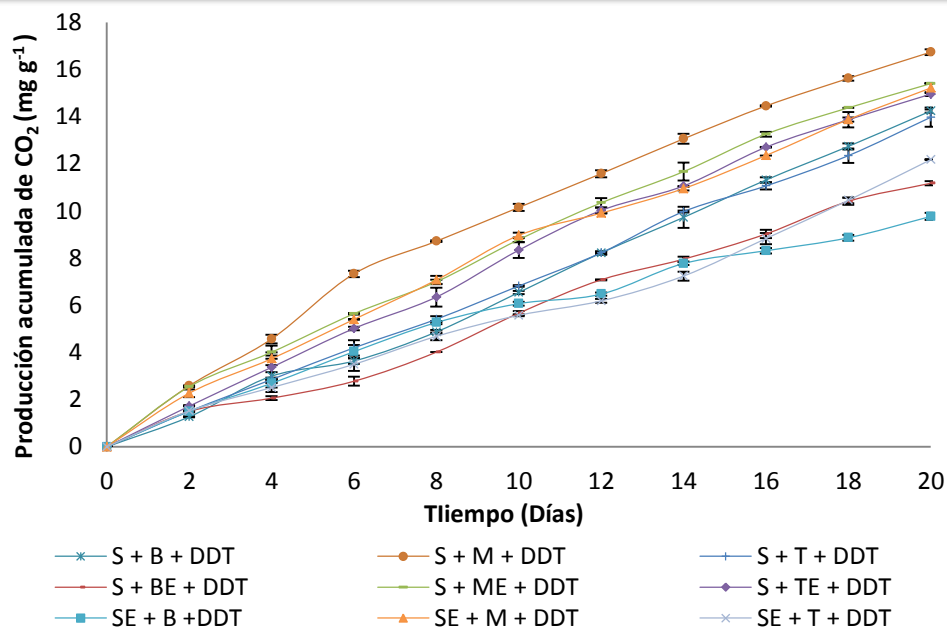


Figura 10. Actividad microbiana en cultivo sólido por la microbiota nativa estimulada en suelo C contaminado con DDT. (SE=suelo estéril, B=bagacillo de caña, T=paja de trigo y M=rastrojo de maíz, BE=bagacillo de caña estéril, TE=paja de trigo estéril, ME=rastrojo de maíz estéril)

### 7.3.2 Crecimiento bacteriano

Varias cepas de microorganismos del suelo, particularmente bacterias están involucradas en la degradación de compuestos orgánicos tóxicos. Durante las cinéticas de remoción por bioestimulación con residuos agroindustriales se realizó el recuento total de bacterias. Los resultados del presente estudio muestran que a pesar de que hay un efecto negativo sobre la microbiota de los tres suelos (A, B y C) al adicionar  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de DDT, no hubo una total inhibición en el crecimiento de los microorganismos, lo que indica que existen microorganismos que son tolerantes al DDT. Según Dragun (1998), los plaguicidas tienen tres posibles efectos sobre los microorganismos: inhibición, no efecto y estimulación, no obstante la acción de un plaguicida sobre los microorganismos del suelo, depende de su concentración, así como el tipo de microorganismos y el ambiente en el cual estén creciendo. Albont *et al.* (1971), encontraron que la adición de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de DDT a agar redujo la cuenta de bacterias aerobias y anaerobias presentes en sedimentos de un estuario. Sin

embargo Salenius (1972), encontró que dosis masivas de DDT ( $112 \text{ Kg ha}^{-1}$ ) no alteraron el número de los microorganismos del suelo.

Con respecto al suelo A (textura franco arenoso), se observó una disminución de la comunidad bacteriana, esto debido a que se encontraron diferencias significativas entre el control sin DDT y el control con DDT en donde se cuantificó el menor crecimiento bacteriano que fluctuó entre  $5.3 \times 10^5$  y  $4.7 \times 10^6$  UFC.

Por su parte los tratamientos estimulados con residuos agroindustriales mostraron un aumento en la cuenta bacteriana (microorganismos nativos y asociados al residuo). El tratamiento al que se adicionó rastrojo de maíz (S+M+DDT) fue el que mostró el mayor crecimiento bacteriano durante la cinética, el día 4 mostró su máximo crecimiento con  $2.1 \times 10^8$  UFC, mientras que en los días intermedios las UFC disminuyeron, pero su crecimiento se recuperó en los días finales de la cinética. Los tratamientos estimulados con bagacillo de caña y paja de trigo (S+B+DDT, S+T+DDT) mostraron un comportamiento similar hasta el día 16, lo cual coincide con la producción de  $\text{CO}_2$  acumulada. (Figura 11).

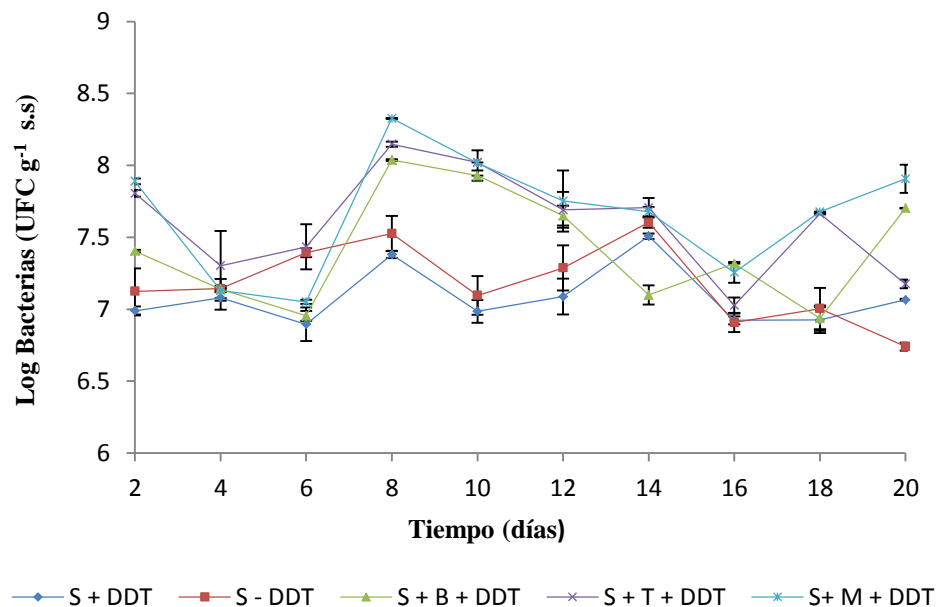


Figura 11. Crecimiento bacteriano de la microbiota nativa del suelo A contaminado con DDT en cultivo sólido. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz).

En cuanto al suelo B (textura franco arcillo arenoso), el tratamiento al que se adicione rastrojo de maíz mostró un mayor crecimiento microbiano al día 8 ( $2.6 \times 10^7$  UFC), comparado con los tratamientos a los que se agregaron bagacillo de caña y paja de trigo que mostraron un menor crecimiento hasta el día 12, para el día 16 se mostró un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) (Figura 12).

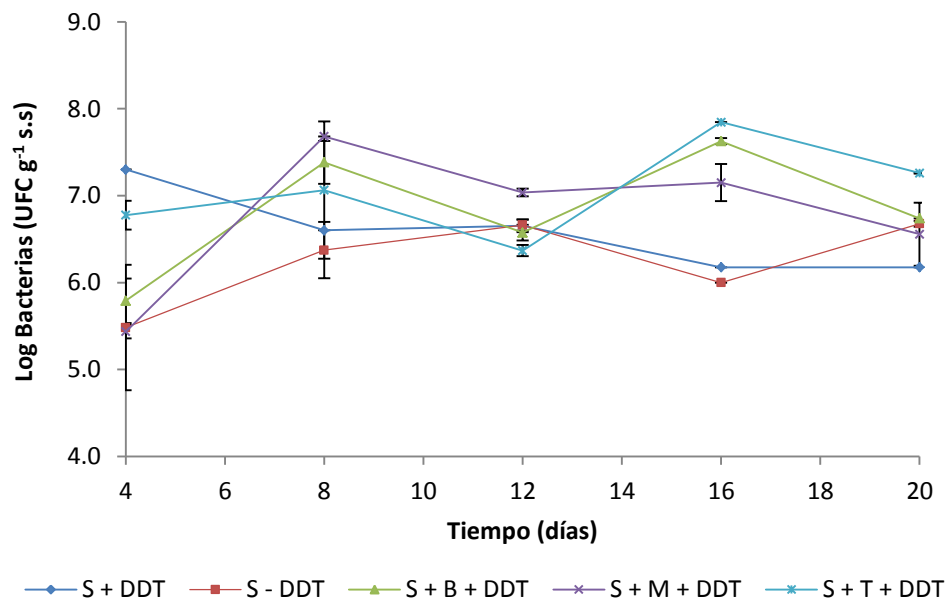


Figura 12. Crecimiento bacteriano de la microbiota nativa en suelo B contaminado con DDT en cultivo sólido. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz).

A diferencia de la tendencia observada en el suelo A y B, en el suelo C, el crecimiento de bacterias en todos los tratamientos presentaron una tendencia similar, por ejemplo al octavo día de la cinética el crecimiento se mantuvo en el mismo orden de magnitud con un rango de  $1.6 \times 10^6$  –  $6.78 \times 10^6$  (Figura 13).

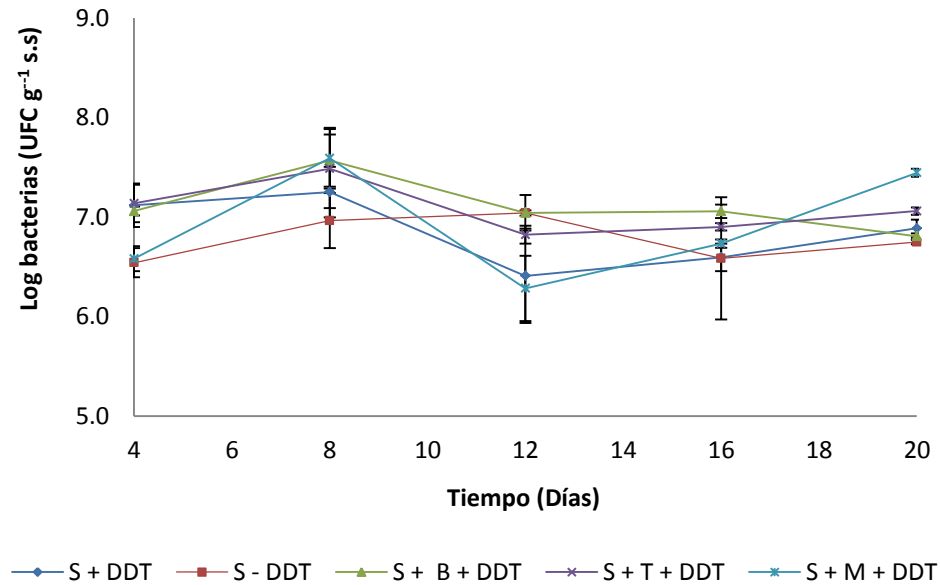


Figura 13. Crecimiento bacteriano de la microbiota nativa en cultivo sólido en suelo C contaminado con DDT. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz).

Así como se observó que la actividad metabólica disminuyó en todos los tratamientos del suelo A en los que se adicionó residuos estériles, la comunidad bacteriana también disminuyó, sobre todo en los primeros días de la cinética, por lo que microorganismos asociados al residuo tienen un aporte importante en la actividad metabólica. Los tratamientos con bagacillo de caña y paja de trigo estéril (S+BE+DDT y S+TE+DDT) aumentaron su población al día 12 en una orden de magnitud, sin embargo, las UFC volvieron a disminuir al día 16. En el caso del tratamiento con rastrojo de maíz estéril (S+ME+DDT) las UFC fueron bajas hasta el día 12, después de los cuales aumentaron (Figura 14). En el suelo B también se mostró una disminución en las UFC en los tratamientos a los que se adicionaron residuos agroindustriales estériles (Figura 15).

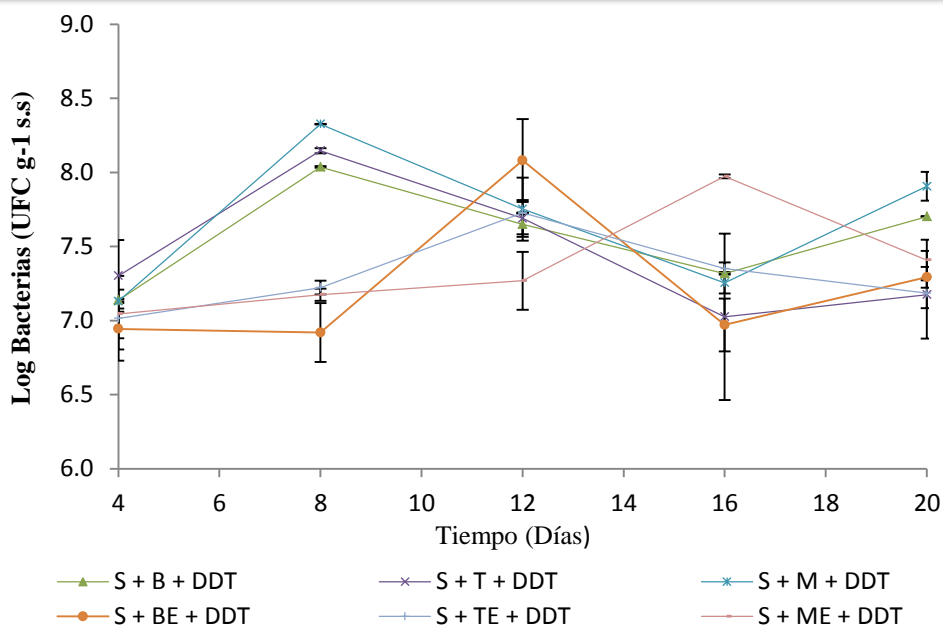


Figura 14. Crecimiento bacteriano de la microbiota de residuos agroindustriales y suelo A contaminado con DDT en cultivo sólido. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz, BE=bagacillo de caña, TE=paja de trigo estéril, ME=rastrojo de maíz estéril).

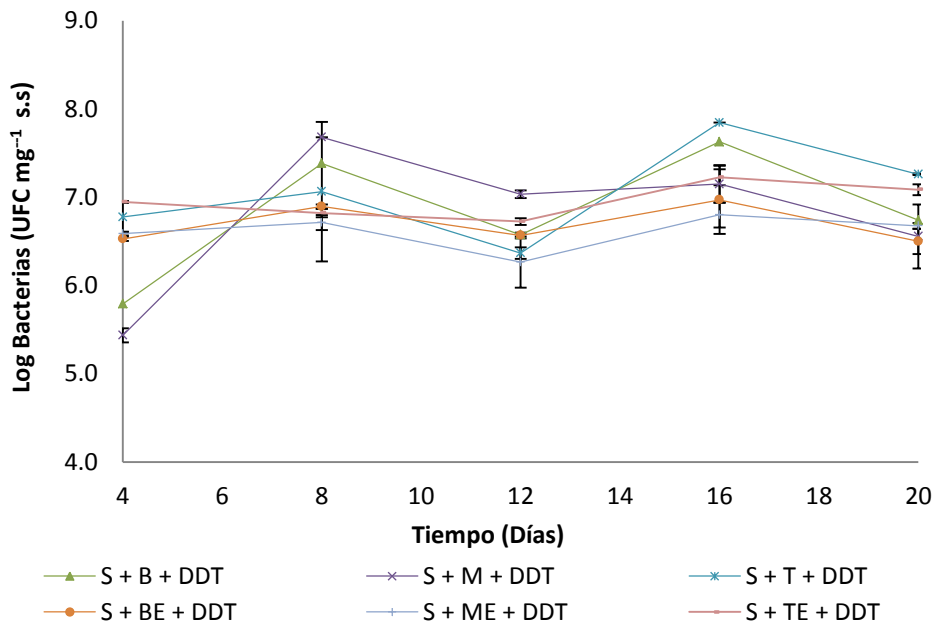


Figura 15. Crecimiento bacteriano asociados a residuos agroindustriales y suelo B contaminado con of DDT en cultivo sólido. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz, BE=bagacillo de caña, TE=paja de trigo estéril, ME=rastrojo de maíz estéril).

Por otra parte, en el suelo C, a los tratamientos a los que se adicionó rastrojo de maíz y paja de trigo estériles mostraron un incremento de las UFC en dos órdenes de magnitud al día 12, esto posiblemente a que las bacterias autóctonas del suelo se vieron favorecidas con los nutrientes que aportan estos residuos y no presentaron competencia con las asociadas a los residuos. Lo mismo se observó en el tratamiento con bagacillo de caña estéril, sin embargo, el mayor incremento se dio al día 16 (Figura 16).

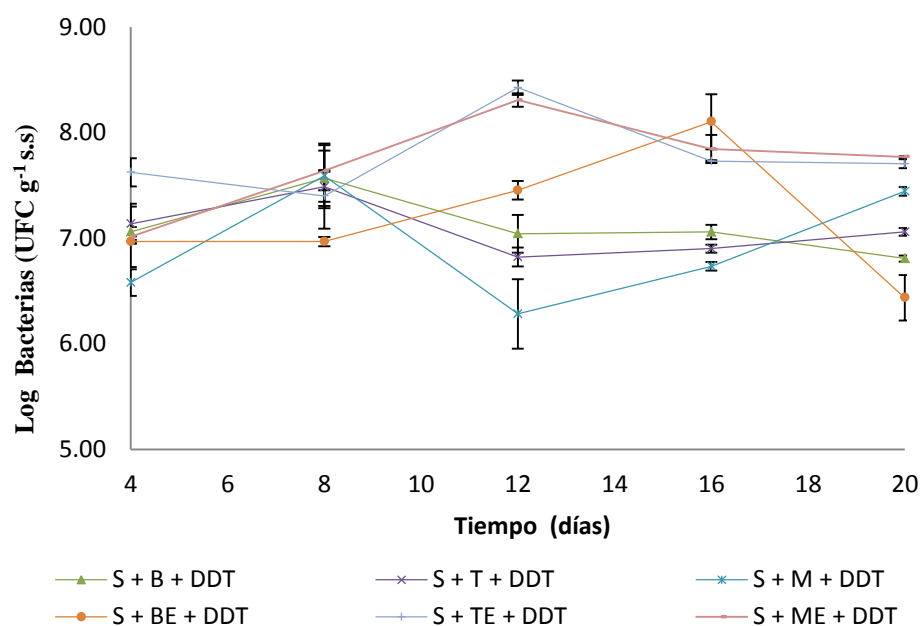


Figura 16. Crecimiento bacteriano de la microbiota nativa en cultivo sólido en suelo B contaminado con DDT. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz, BE=bagacillo de caña, TE=paja de trigo estéril, ME=rastrojo de maíz estéril).

Los microorganismos pueden tener adaptaciones morfológicas y fisiológicas según la biodisponibilidad de un compuesto, las morfológicas comprenden el tamaño y la forma de las células que le permite a un microorganismo desplazarse en la matriz del suelo y acceder a los microporos, mientras que las fisiológicas incluyen la adquisición de sistemas de asimilación de alta afinidad al contaminante, los cuales permiten al

---

microorganismo llevar a cabo procesos de transferencia y desorción de un contaminante más rápido que otros. Independientemente de la textura del suelo, el rastrojo de maíz fue el residuo que estimulo el mayor crecimiento de bacterias, esto podría deberse a que los componentes de este residuo son más asimilables por los microorganismos nativos del suelo, ya que se ha reportado que presenta un menor porcentaje de lignina (componente que es más recalcitrante a la degradación enzimática), comparado con la paja de trigo y bagacillo de caña (Chuck-Hernández 2011), además se observó que microorganismos asociados a este residuo son capaces de crecer en microcosmos con DDT.

### 7.3.3 Crecimiento fúngico

De acuerdo a Kantachote *et al.* (2001), así como Mitra *et al.* (2011), las comunidades de hongos presentan mayor tolerancia que las bacterias al DDT, sin embargo en este caso se observó que la comunidad fúngica del suelo A se vio más afectada, sobre todo en los primeros cuatro días de la cinética (Figura 9). Un factor que juega un papel importante en el crecimiento de las comunidades de microorganismos es el pH. En general el pH óptimo para el crecimiento de bacterias heterótrofas es neutro (6-8) y un pH ácido lo es para hongos (4-5). Además afecta directamente en la solubilidad del fósforo, siendo éste es más soluble a pH ácido (Torres *et al.*, 2009) y por lo tanto puede estar más accesible para los microorganismos del suelo.

Durante los 20 días de la cinética la comunidad fúngica en el control biótico del suelo A sin DDT (S-DDT), se mantuvo en un rango de  $2.1 \times 10^4$  -  $9 \times 10^4$  UFC. En el control con DDT y en los tratamientos con residuos agroindustriales hubo un efecto de inhibición ya que durante los primeros seis días no se cuantificaron UFC de hongos, sin embargo, la comunidad fúngica se recuperó después de seis días. Al día 16 el tratamiento con bagacillo de caña (S+B+DDT) presentó un crecimiento de dos órdenes de magnitud con respecto a los tratamientos S+T+DDT y S+M+DDT (Figura 17). El suelo A presentó un pH alcalino (8.4) y durante los 20 días de la cinética todos los tratamientos se mantuvieron en un rango de 8.0-8.9, en consecuencia esto pudo originar un mayor crecimiento de bacterias que de hongos.

A pesar de que el suelo B presentó un pH ácido (6.2), también se cuantificó una densidad mayor de bacterias que de hongos. En éste caso se observó que en el tratamiento con rastrojo de maíz se presentó un crecimiento de hongos parecido a los controles bióticos con y sin DDT ésta densidad disminuyó en el tratamiento con el residuo estéril, por lo que se concluye que los microorganismos asociados al residuo crecen bajo estas condiciones (Figura 18).

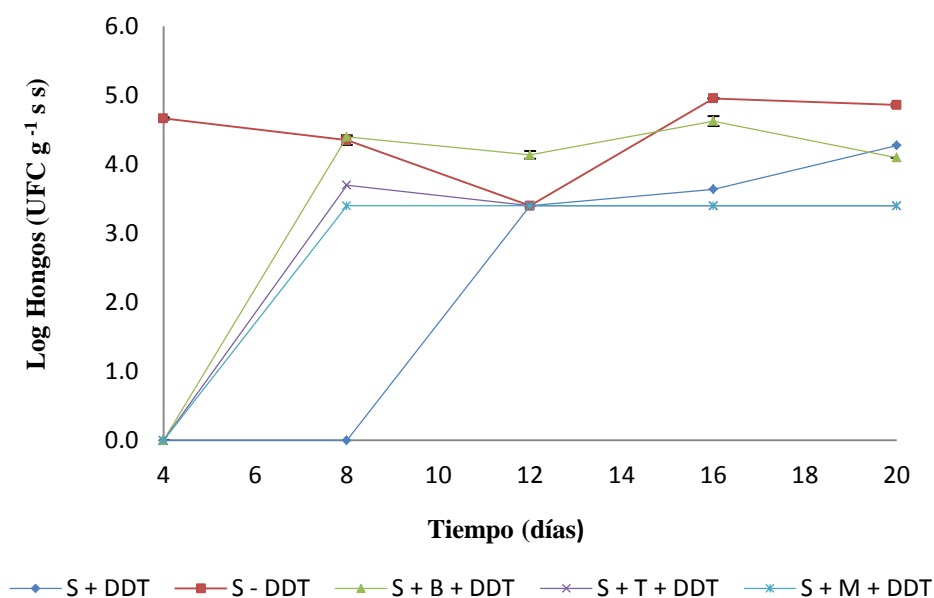


Figura 17. Crecimiento fúngico de la microbiota nativa del suelo A contaminado con DDT en cultivo sólido. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz).

El suelo C también presentó un pH ácido, no obstante la comunidad fúngica disminuyó en los tratamientos con residuos agroindustriales. El control biótico sin DDT (S-DDT) mantuvo su densidad en un rango de  $1.35 - 3.6 \times 10^4$  UFC durante la cinética. En el control sin DDT (S-DDT) se observó una disminución de las UFC. Solo en los días 4 y 8, el tratamiento con rastrojo de maíz presentó una densidad fúngica muy similar al del control sin DDT, sin embargo el crecimiento disminuyó los días 12 y 16 con dos órdenes de magnitud ( $7.5 \times 10^2$  UFC) (Figura 19).

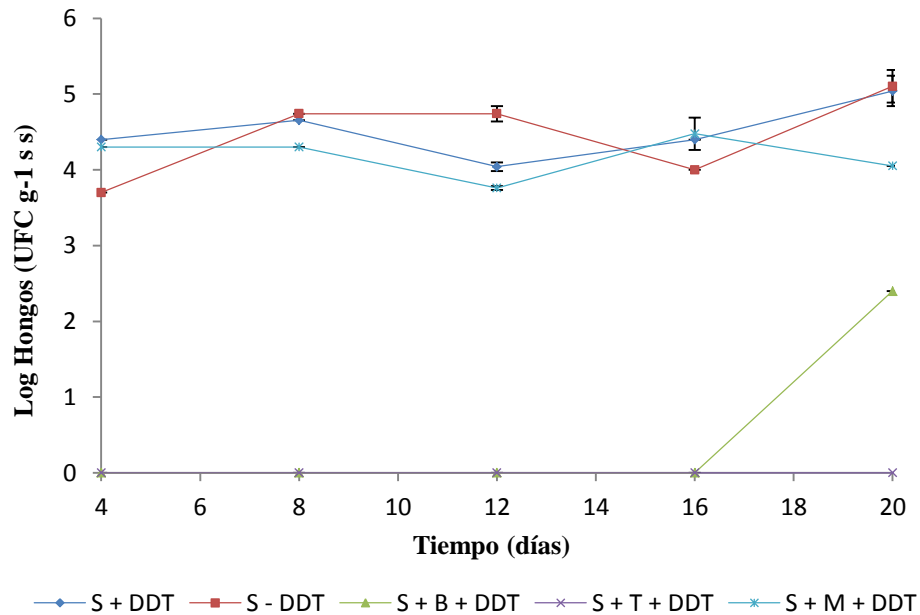


Figura 18. Crecimiento fúngico de la microbiota nativa en suelo B contaminado con DDT en cultivo sólido. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz).

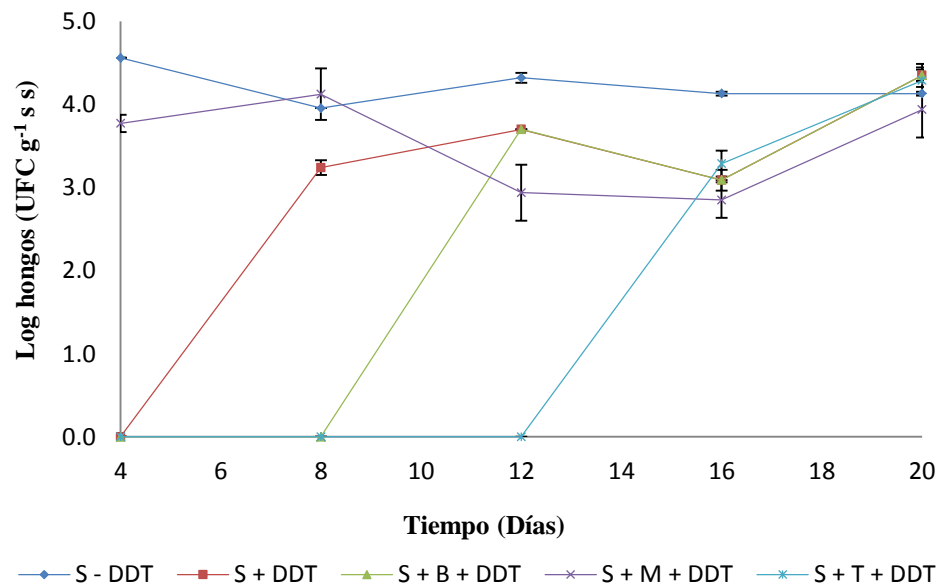


Figura 19. Crecimiento fúngico de la microbiota nativa en cultivo sólido en suelo C contaminado con DDT. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz).

Como se observa en la figura 20, en los tratamientos a los que se adicionaron paja de trigo y rastrojo de maíz estériles (S+TE+DDT y S+ME+DDT) no se cuantificaron UFC de hongos. En el tratamiento con bagacillo de caña estéril si hubo crecimiento (Figura 20), en este caso las UFC fueron menores en dos órdenes de magnitud con respecto al tratamiento con bagacillo no estéril (S+B+DDT).

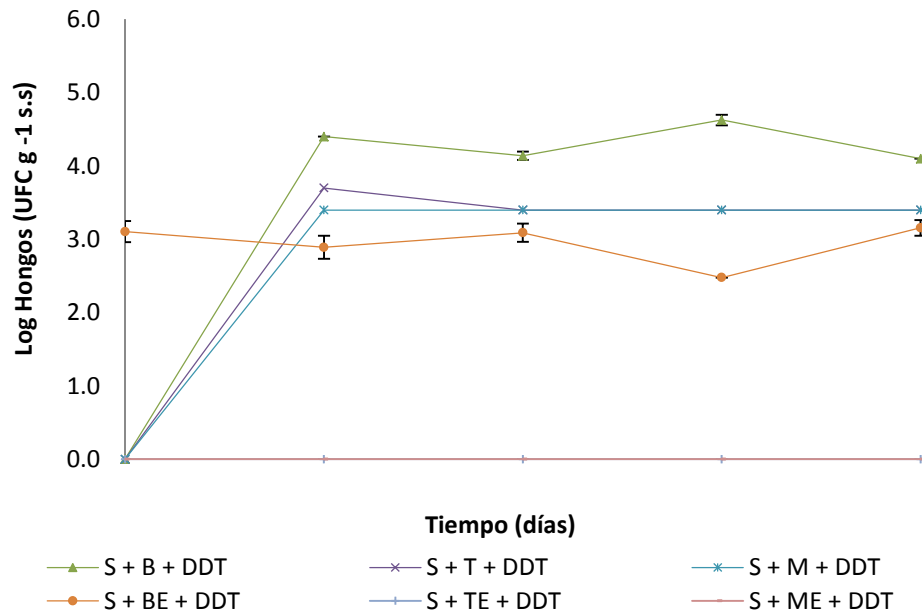


Figura 20. Crecimiento fúngico de la microbiota de residuos agroindustriales y del suelo A contaminado con DDT en cultivo sólido. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz, BE=bagacillo de caña, TE=paja de trigo estéril, ME=rastrojo de maíz estéril).

A diferencia del suelo A, en el B se observó que hubo un crecimiento de la comunidad fúngica en los tratamientos con trigo y bagacillo estéril, debido probablemente a que hubo hongos nativos del suelo que tuvieron la capacidad de crecer con los nutrimentos que aportaron estos residuos. Por otro lado, el crecimiento de los hongos en todos los tratamientos se mantuvo en la misma orden de magnitud ( $P < 0.05$ ) (Figura 21).

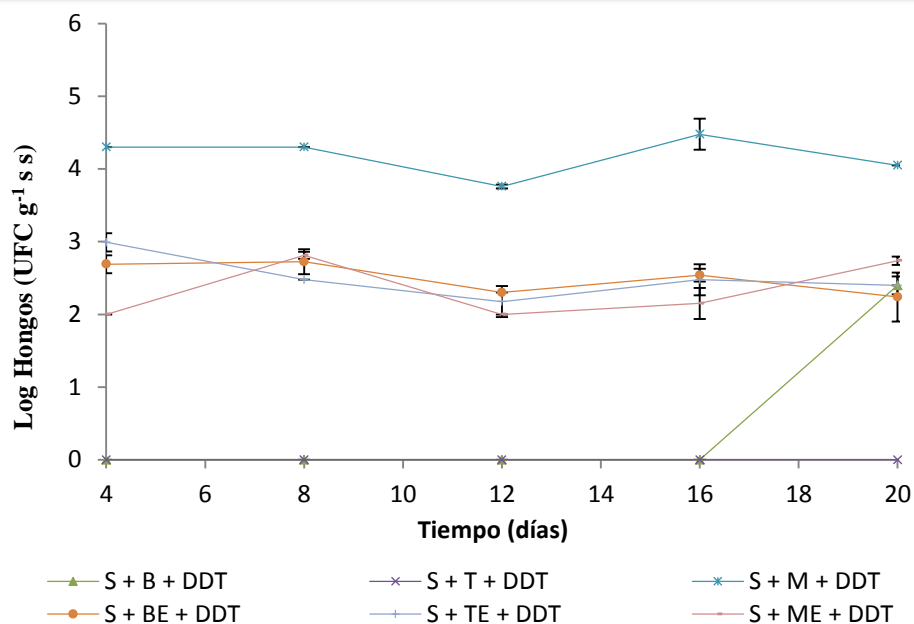


Figura 21. Crecimiento fúngico de asociados a residuos agroindustriales y microbiota en suelo B contaminado con DDT en cultivo sólido. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz, BE=bagacillo de caña, TE=paja de trigo estéril, ME=rastrojo de maíz estéril).

Se observó un aumento de las UFC tanto de bacterias nativas como de los hongos en el suelo C al adicionar residuos agroindustriales estériles, como se observa en la figura 22, aun cuando el crecimiento varió durante la cinética, el tratamiento que más favoreció el crecimiento de hongos fue el de bagacillo (S+BE+DDT), sin embargo al día 14 todos los tratamientos con residuo estéril presentaron un crecimiento muy parecido con  $5.38 \times 10^4$ ,  $5.55 \times 10^4$  y  $3.6 \times 10^4$  UFC (Figura 22).

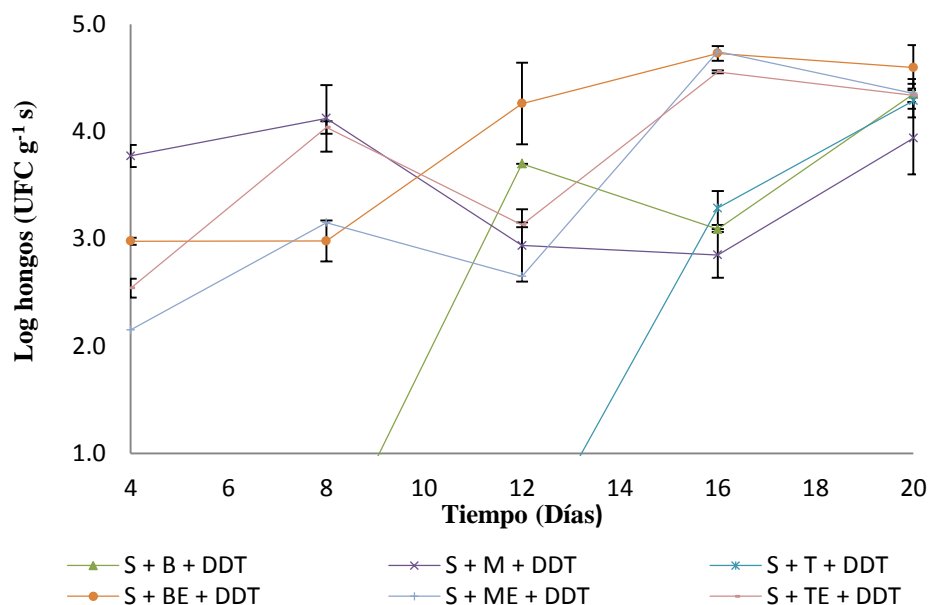


Figura 22. Crecimiento fúngico de la microbiota nativa en cultivo sólido en suelo contaminado con DDT. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz, BE=bagacillo de caña, TE=paja de trigo estéril, ME=rastrojo de maíz estéril).

### 7.3.4 Remoción de DDT

En el suelo A las pérdidas de DDT por procesos abióticos fueron de 18.17%, mientras que en el suelo B alcanzaron 22.17%, probablemente por una mayor interacción de éste con el suelo, lo que reduciría la eficiencia de la extracción durante los últimos días.

El control biótico en el suelo A (S+DDT) mostró un porcentaje de remoción de 40.17 al cuarto día y 61.40 al final del tratamiento, mientras que en el suelo B se presentó una remoción final del 28%.

Setyo *et al.*, (2010) reportaron una degradación del 34% de DDT por la a la adición de un abono de estiércol de ganado. En este caso el máximo porcentaje de remoción en el suelo B se observó en el tratamiento estimulado con rastrojo de maíz el cual presentó 72.90% al día 20 ( $P < 0.05$ ), seguido del tratamiento al que se adicionó paja de trigo con un porcentaje de remoción de 68.0 (Figura 23). La adición de los residuos agroindustriales ayudo al incremento en la remoción del DDT, debido posiblemente a

que las enzimas de las bacterias involucradas en este proceso pueden actuar de forma cometabólica, como se ha demostrado previamente (Pfaender *et al.*, 1973).

Si bien en el suelo B, el tratamiento al que se adicionó rastrojo de maíz presentó la actividad metabólica más alta, el máximo porcentaje de remoción no se correlacionó de la misma forma ya que el tratamiento al que se adicionó paja de trigo presentó el mayor porcentaje de remoción (58%) (Figura 24).

Los tratamientos con bagacillo de caña y rastrojo de maíz del suelo B no mostraron diferencias significativas con una remoción de 44 y 43.9%, lo cual podría estar correlacionado con el tipo de microorganismos que crecieron en cada uno de los tratamientos.

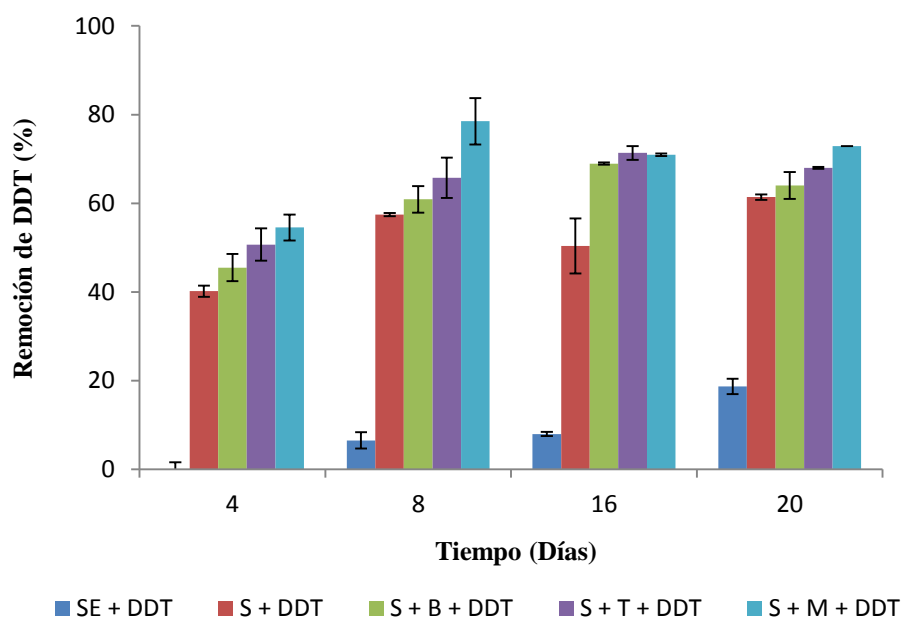


Figura 23. Porcentaje de remoción de DDT en cultivo sólido por bioestimulación en suelo A. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz).

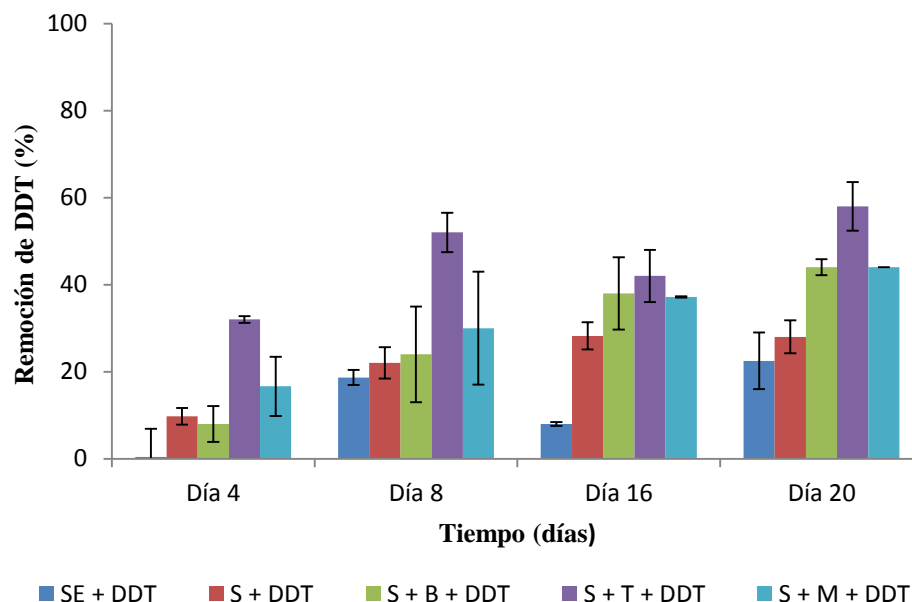


Figura 24. Porcentaje de remoción de DDT en cultivo sólido por bioestimulación en suelo B. (B=bagacillo de caña, T=paja de trigo, M=rastrojo de maíz).

La velocidad de degradación de DDT puede ser mejorado por la adición de un enmendante, debido a que se incrementa la población bacteriana, se mejora la estructura del suelo y optimiza la biodisponibilidad del DDT y sus residuos en el suelo (Kantachote *et al.*, 2004). Los residuos agroindustriales proporcionan carbono y nitrógeno entre otros nutrimentos y sirven como soporte para el desarrollo de microorganismos del suelo. En este trabajo el residuo que mostró la mejor opción para procesos de bioestimulación en todos los suelos (independientemente de su textura), fue el rastrojo de maíz, debido posiblemente a que sus componentes son fácilmente asimilables por los microorganismos nativos del suelo ya que se ha reportado que presenta un porcentaje menor de lignina (componente que es más recalcitrante a la degradación enzimática), comparado con la paja de trigo y bagacillo de caña (Chuck-Hernández, 2011).

---

#### 7.4. Pruebas de inhibición e identificación de bacterias tolerantes al DDT

Las bacterias juegan un rol importante en el proceso de remoción debido a que poseen enzimas capaces de degradar plaguicidas a través de dechloración reductiva, dehidrocloración, oxidación e isomerización de moléculas parentales (Nawab *et al.*, 2003). Del seguimiento de las pruebas de bioestimulación en el suelo A (franco arenoso), en cultivo sólido durante 20 días, se obtuvieron 34 aislados bacterianos Gram positivos y Gram negativos. La tolerancia de éstas a diferentes concentraciones, medidos a través de radios de halos de inhibición en su crecimiento, se presentan en la tabla 8. Los radios de inhibición más grandes se presentaron en los discos con concentración más alta de DDT ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Cinco de los aislados identificados como P5, P25, P26, P27 y P34 mostraron tolerancia hasta una concentración de  $40 \text{ mg kg}^{-1}$ , mientras que los aislados P8, P12, P19, P21, P22 y P33 no mostraron tolerancia a ninguna de las concentraciones de DDT a las que fueron expuestas. Por otra parte, ocho aislados (P14, P17, P18, P20, P23, P24, P28 y P30) tuvieron la mayor tolerancia no encontrándose inhibición en su crecimiento cuando se expusieron a concentraciones de hasta  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ . Basados en el análisis del gen 16S rRNA, los aislados más tolerantes fueron identificados como del género actinobacteria (*Cellulosimicrobium cellulans* P14, *Cellulosimicrobium cellulans* P24, *Arthrobacter luteolus* P23), firmicutes (*Bacillus pumilus* P17, *Bacillus pumilus* P18, *Bacillus* sp. P20 y *Lysinibacillus* sp P30) y solo una proteobacteria (*Sphingomonas* sp P28), con valores de similitud genéticos cerca de 100 % con los reportados en el GenBank (Tabla 9).

Se ha reportado que la degradación de DDT vía aeróbica es llevada a cabo por bacterias como *Alcaligenes eutrophus* A5 (Nadeau *et al.*, 1994), *Micrococcus varians* (Abou-Arab *et al.*, 2002). Si bien no hay reportes en los que se asocie a *Cellulosimicrobium* con la remoción de DDT, recientemente se ha demostrado que es una actinobacteria poco estudiada que presenta actividad ligninolítica (Revollo *et al.*, 2012), actividad asociada a la destoxificación de contaminantes y biorremediación (Alcalde *et al.*, 2002). Por su parte las bacterias del género *arthrobacter* son representativas de la microflora del suelo, conocidas por su capacidad para degradar

---

contaminantes xenobióticos como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, componentes del petróleo, hidrocarburos heterocíclicos (Hayatsu *et al.*, 1999; Eaton 2001; Khasaeva *et al.*, 2007) y plaguicidas; como s-triazinas (atrazina, cianacine, fenilurea), glyfosate y malation (Kertesz *et al.*, 1994; Strong *et al.*, 2002; Tixier *et al.*, 2002).

Tabla 8. Radios de halos de Inhibición en mm de bacterias aisladas del suelo A en presencia de concentraciones de DDT. (se muestra la desviación estándar en paréntesis).

Aislado	Control	Concentración de DDT en disco (mg L <sup>-1</sup> )				
		0	10	20	30	40
P1	0	0	3.6 (± 0.32)	3.97 (± 1.19)	4.88 (± 0.06)	12.17 (± 1.50)
P2	0	0	0	4.39 (± 0.54)	4.79	12.94 (± 0.47)
P3	0	0	5.04 (± 1.2)	5.35 (± 0.63)	5.63 (± 0.86)	13.76 (± 2.4)
P4	0	0	2.50 (± 0.03)	2.85 (± 0.29)	3.16 (± 0.0)	10.11 (± 0.0)
P5	0	0	0	0	2.91 (± 0.146)	10.88 (± 0.53)
P6	0	0	0	0	0	11.98 (± 0.33)
P7	0	0	0	0	5.93 (± 0.15)	11.14 (± 1.15)
P8	0	10.60 (± 2.9)	11.7 (± 1.12)	16.5 (± 3.1)	16.32 (± 0.28)	16.74 (± 1.08)
P9	0	0	1.98 (±)	4.26 (±)	4.88 (± 0.12)	7.17 (± 2.03)
P10	0	0	0	0	5.50 (± 2.3)	7.15 (± 0.71)
P11	0	0	0	3.49 (± 0.16)	5.64 (± 1.8)	7.66 (± 2.12)
P12	0	5.24 (± 2.92)	7.26 (± 0.26)	7.28 (± 4.7)	11.09 (± 1.1)	12.52 (± 0.16)
P13	0	0	0	4.61 (± 0.07)	4.62 (± 2.1)	6.28 (± 0.55)
P14	0	0	0	0	0	0
P15	0	0	2.18 (± 0.0)	4.33 (± 0.0)	4.60 (± 0.15)	6.75 (± 1.50)
P16	0	0	0	0	3.56 (± 0.15)	4.72 (± 0.73)
P17	0	0	0	0	0	0
P18	0	0	0	0	0	0
P19	0	6.22 (± 0.32)	10.08 (± 1.36)	10.86 (± 0.19)	11.52 (± 0.98)	13.52 (± 0.0)
P20	0	0	0	0	0	0
P21	0	1.76 (± 0.03)	2.56 (± 0.13)	3.04 (± 0.75)	6.55 (± 3.7)	10.36 (± 1.04)
P22	0	2.30 (± 0.67)	2.69 (± 0.34)	3.28 (± 0.62)	3.50 (± 0.83)	5.41 (± 0.06)
P23	0	0	0	0	0	0
P24	0	0	0	0	0	0
P25	0	0	0	0	0	7.33 (± 0.33)
P26	0	0	0	0	0	4.48 (± 0.33)
P27	0	0	0	0	0	3.34 (± 0.79)
P28	0	0	0	0	0	0
P29	0	0	0	0	2.71 (± 0.27)	4.87 (± 1.04)
P30	0	0	0	0	0	0
P31	0	0	0	0	3.61 (± 0.27)	5.39 (± 0.52)
P32	0	0	0	0	1.32 (± 1.8)	5.33 (± 0.39)
P33	0	2.22 (± 0.08)	2.48 (± 0.0)	2.43 (± 0.49)	2.58 (± 0)	3.58 (± 0.50)
P34	0	0	0	0	0	6.21 (± 0.0)

Tabla 9. Identificación BLAST de las bacterias aisladas del suelo A contaminado con DDT

Cepa	Organismo más cercano (Número de acceso del Genbank)	Identidad	Phylum	Clase
P14	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> strain NFR1 (GQ496666.1)	100%	Actinobacteria	Actinobacteria
P17	<i>Bacillus pumilus</i> strain FMII_12 (KC920914.1)	100%	Firmicutes	Bacilli
P18	<i>Bacillus pumilus</i> strain J2RP2 (KC888201.1)	100%	Firmicutes	Bacilli
P20	<i>Bacillus</i> sp. Gr-11 (KF010630.1)	100%	Firmicutes	Bacilli
P23	<i>Arthrobacter luteolus</i> isolate LNR3 (DQ486130.1)	100%	Actinobacteria	Actinobacteria
P24	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> strain KSK-3 (KF192273.1)	100%	Actinobacteria	Actinobacteria
P28	<i>Sphingomonas</i> sp. strain 52NP12 (AB242798.1)	98%	Proteobacteria	$\alpha$ -Proteobacteria
P30	<i>Lysinibacillus</i> sp. strain CD2301 (KC478953.1)	100%	Firmicutes	Bacilli

Del seguimiento realizado en las diferentes pruebas de bioestimulación en el suelo B (franco arcillo arenoso), se obtuvieron 24 aislados bacterianos Gram positivos y negativos. Solo dos de los aislados (T5 y T7) mostraron tolerancia hasta una concentración de 50 mg kg<sup>-1</sup> de DDT, mientras que el resto mostró una inhibición en su crecimiento desde la concentración mínima expuesta (10 mg kg<sup>-1</sup>) (Tabla 10). El análisis del gen 16S rRNA mostró que los dos aislados más tolerantes pertenecen al género *Firmicutes* (*Bacillus-artrophaceus*-PT1, *Bacillus* sp PT2) (Tabla 11).

Especies del género *Bacillus* han sido reportadas para degradar DDT (Ramesh *et al.*, 2004), en especial *Bacillus pumilus* tiene la capacidad de degradar el plaguicida carbofuran (Mohapatra *et al.*, 1997), bi-fenol (Yamanaka, 2007) y un plaguicida organofosforado (clorpirifos) siendo además capaz de tolerar a éste último en concentraciones muy altas (1000 mg L<sup>-1</sup>) (Anwar *et al.*, 2009).

Tabla 10. Radios de halos de Inhibición en mm de bacterias aisladas del suelo B en presencia de concentraciones de DDT. (se muestra la desviación estándar en paréntesis).

Aislado	Concentración de DDT en discos mg L <sup>-1</sup>					
	Control 0	10	20	30	40	50
T1	0	0	0	0	0	0
T2	0	3.03 (± 0.25)	4.16 (± 0.42)	4.91 (± 0.37)	5.33 (± 0.91)	5.15 (± 0.70)
T3	0	1.48 (± 0.12)	2.31 (± 0.28)	3.74 (± 0.37)	3.88 (± 0.72)	4.33 (± 0.40)
T4	0	3.1 (±)	3.60 (± 0.77)	4.10 (± 0.91)	4.49 (± 1.07)	4.92 (± 1.29)
T5	0	0	0	0	0	0
T6	0	3.55 (± 0.46)	3.86 (± 0.080)	4.88 (± 0.42)	5.92 (± 0.91)	6.19 (± 1.06)
T7	0	3.31 (± 0.26)	3.82 (± 0.68)	4.76 (± 0.51)	5.72 (± 1.20)	5.8 (± 1.16)
T8	0	2.69 (± 0.90)	3.92 (± 0.60)	5.21 (± 0.55)	6.14 (± 0.61)	6.74 (± 0.84)
T9	0	0.65 (± 0.13)	1.8 (± 0.61)	3.84 (± 0.75)	4.91 (± 1.22)	5.48 (± 0.15)
T10	0	3.99 (± 0.15)	5.57 (± 0.03)	6.24 (± 0.19)	6.58 (± .33)	6.71 (± 0.79)
T11	0	2.52 (± 0.20)	2.60 (± 0.28)	2.55 (± 0.56)	3.21 (± 0.55)	3.81 (± 0.0)
T12	0	1.68 (± 0.17)	1.97 (± 0.33)	2.49 (± 0.16)	3.01 (± 0.75)	3.09 (± 0.67)
T13	0	1.21 (± 0.44)	1.85 (± 0.32)	1.82 (± 0.30)	1.96 (± 0.19)	2.69 (± 0.22)
T14	0	1.76 (± 0.38)	2.29 (± 0.09)	2.81 (± 0.18)	2.83 (± 0.56)	2.94 (± 0.29)
T15	0	2.04 (± 0.45)	2.65 (± 0.53)	2.83 (± 0.39)	2.93 (± 0.16)	2.94 (± 0.58)
T16	0	2.29 (± 0.78)	2.58 (± 0.17)	2.54 (± 0.22)	3.24 (± 0.45)	3.53 (± 0.59)
T17	0	0	0	3.06 (± 0.01)	3.44 ± 0.24	4.44 (± 0.19)
T18	0	1.95 (± 0.61)	1.96 (± 0.31)	2.98 (± 0.22)	3.07 ± 0.38	3.6 (± 1.30)
T19	0	1.48 (± 0.28)	2.31 (± 0.76)	3.75 (± 1.0)	3.88 ± 1.23	4.34 (± 0.99)
T20	0	0	0	2.75 (± 0.33)	3.34 ± 0.23	3.96 (± 0.15)
T21	0	1.97 (± 0.08)	2.75 (± 0.13)	2.70 (± 0.06)	2.13 ± 0.0	3.35 (± 0.76)
T22	0	2.87 (± 0.09)	3.34 (± 0.03)	3.36 (± 0.16)	4.66 ± 0.98	5.42 (± 0.75)
T23	0	2.34 (± 0.59)	2.12 (± 0.12)	2.1 (± 0.27)	2.94 ± 0.26	4.39 (± 0.01)

Tabla 11. Identificación BLAST de las bacterias aisladas del suelo B contaminado con DDT

Aislado	Organismo más cercano (Número de acceso del Genbank)	Identidad	Phylum	Clase
PT1	<i>Bacillus atrophaeus</i> strain U8 (AB363731.1)	99%	Firmicutes	Bacilli
PT2	<i>Bacillus</i> sp. strain I3X (HQ727952.1)	100%	Firmicutes	Bacilli

De los ensayos de bioestimulación en el suelo de textura franco (C), se obtuvieron 18 aislados bacterianos Gram positivos y negativos. De igual forma que en los ensayos con los suelos A y B los radios de inhibición más grandes se presentaron en los

discos con concentración más alta de DDT ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Ninguno de los aislados mostró tolerancia a la concentración más alta. Solo cuatro de los aislados C2, C6, C9 y C16. Presentaron tolerancia a una concentración de  $40 \text{ mg kg}^{-1}$ . (Tabla 12).

Según el análisis del gen 16S rRNA, tres de los aislados fueron identificados como del género Firmicutes (*Bacillus thuringiensis* C2, *Bacillus sp.* C9, *Bacillus sp.* C16), mientras que el aislado C6 se identificó como *Brevundimonas sp* C-1-2, del género alpha proteobacteria, con valores de similitud genéticos del 100% con los reportados en el GenBank (Tabla 13).

Tabla 12. Radios de halos de Inhibición en mm de bacterias aisladas del suelo C en presencia de concentraciones de DDT. (se muestra la desviación estándar en paréntesis).

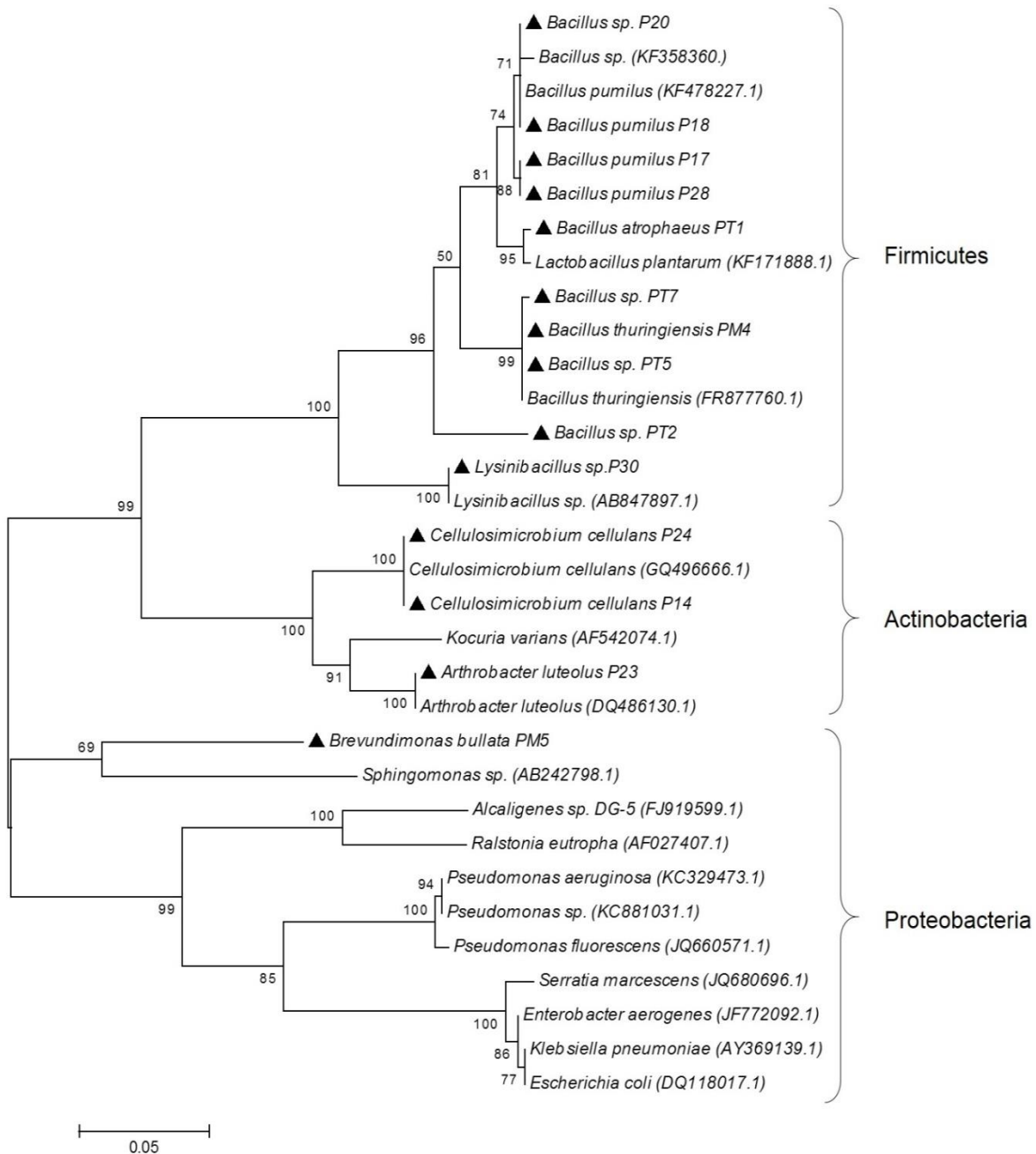
Aislado	Concentración de DDT en discos $\text{mg L}^{-1}$					
	Control 0	10	20	30	40	50
C1	0	0	4.1 ( $\pm 1.02$ )	6.3 ( $\pm 2.10$ )	7.38 ( $\pm 3.4$ )	12.67 ( $\pm 2.21$ )
C2	0	0	0	0	0	0.86 ( $\pm 0.47$ )
C3	0	0	1.15 ( $\pm 0.63$ )	3.42 ( $\pm 0.02$ )	7.07 ( $\pm 0.27$ )	16.72 ( $\pm 0.35$ )
C4	0	0	4.33 ( $\pm 0.186$ )	7.01 ( $\pm 0.21$ )	7.00 ( $\pm 0.25$ )	10.34 ( $\pm 0.17$ )
C5	0	0	0	0	2.12 ( $\pm 0.97$ )	3.10 ( $\pm 0.33$ )
C6	0	0	0	0	0	1.28 ( $\pm 0.025$ )
C7	0	0	0	0	1.98 ( $\pm 0.68$ )	1.9 ( $\pm 0.14$ )
C8	0	7.75 ( $\pm 0.63$ )	11.15 ( $\pm 1.89$ )	16.57 ( $\pm 3.1$ )	16.61 ( $\pm 0.12$ )	17.81 ( $\pm 0.42$ )
C9	0	0	0	0	0	1.9 ( $\pm 0.4$ )
C10	0	0	0	0	3.78 ( $\pm 0.49$ )	7.4 ( $\pm 0.32$ )
C11	0	0	0	0	8.10 ( $\pm 1.2$ )	8.48 ( $\pm 1.9$ )
C12	0	7.18 ( $\pm 0.24$ )	6.99 ( $\pm 0.49$ )	9.49 ( $\pm 0.24$ )	11.0 ( $\pm 1.1$ )	16.64 ( $\pm 0.75$ )
C13	0	0	0	5.33 ( $\pm 0.01$ )	5.16 ( $\pm 2.89$ )	7.8 ( $\pm 1.59$ )
C14	0	0	0	2.4 ( $\pm 1.4$ )	1.5 ( $\pm 0.01$ )	2.25 ( $\pm 0.91$ )
C15	0	0	2.36 ( $\pm 0.04$ )	3.28 ( $\pm 1.2$ )	3.75 ( $\pm 1.84$ )	7.88 ( $\pm 0.91$ )
C16	0	0	0	0	0	4.3 ( $\pm 0.15$ )
C17	0	0	0	3.89 ( $\pm 1.36$ )	3.89 ( $\pm 1.36$ )	6.2 ( $\pm 0.13$ )
C18	0	6.24 ( $\pm 0.72$ )	11.13 ( $\pm 2.8$ )	12.18 ( $\pm 3.7$ )	14.8 ( $\pm 3.7$ )	17.75 ( $\pm 0.1$ )

Tabla 13. Identificación BLAST de las bacterias aisladas del suelo C contaminado con DDT

Aislado	Organismo más cercano (Número de acceso del Genbank)	Identidad	Phylum	Clase
PM4 (C2)	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BD12OL1-B43 (FR877760.1)	100%	Firmicutes	Bacilli
PM5 (C6)	<i>Brevundimonas bullata</i> strain 1A6 (KC128885.1)	100%	Proteobacteria	$\alpha$ -Proteobacteria
PT7 (C9)	<i>Bacillus sp.</i> FJAT-17832 (KF279528.1)	100%	Firmicutes	Bacilli
PT5 (P16)	<i>Bacillus sp.</i> 16S-228 (JX103463.1)	100%	Firmicutes	Bacilli

En la figura 26 se muestra el árbol filogenético consenso, basado en secuencias parciales de 16 rRNA de las bacterias aisladas durante las pruebas de bioestimulación de los tres suelos (A, B y C). Se observó que el 60 % de las cepas tolerantes pertenecieron al *phylum* Firmicutes, el 21% a actinobacterias y sólo una de ellas fue una proteobacteria.

Figura 26. Árbol filogenético consenso basado en secuencias parciales de 16s rRNA de bacterias. La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima verosimilitud basado el modelo 2-parametro de Kimura. El porcentaje de árboles replicados en que los taxones asociados se agruparon junto con la prueba de arranque (500 repeticiones) se muestran junto a las ramas. Los triángulos negros indican los organismos aislados en este estudio. Se indica los números de secuencias de referencia del GenBank.



---

## 7.5 Pruebas de Bioaumentación

Según Aislabe *et al.* (1995) el número de microorganismos que son capaces de utilizar plaguicidas como sustrato para su crecimiento pueden ser aumentados para mejorar el proceso de biorremediación del suelo. Debido a que durante procesos de bioestimulación se aislaron e identificaron a bacterias tolerantes a concentraciones altas de DDT ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ), se llevaron a cabo pruebas de bioaumentación en los suelos A y B.

### 7.5.1 Actividad respirométrica

Para los ensayos en el suelo A (Franco arenoso), el consorcio inoculado estuvo conformado de nueve cepas que presentaron mayor tolerancia hasta una concentración de  $50 \text{ mgL}^{-1}$  de DDT (*Cellulosimicrobium cellulans*, *Arthrobacter luteolus*, *Bacillus pumilus*, y *Lysinibacillus* y *Sphingomonas* sp). Para el suelo B (Franco arcillo arenoso), el consorcio se conformó de dos cepas *Bacillus artrophaceus* y *Bacillus* sp.

Se llevaron a cabo diferentes tratamientos para comparar los procesos de bioestimulación con rastrojo de maíz que fue el que mostró mejores resultados. Se inoculó una concentración de  $10^6 \text{ UFC g}^{-1}$  de suelo. La actividad metabólica se midió de forma indirecta a través de la producción de  $\text{CO}_2$ , los resultados de los tratamientos con el suelo A se muestran en la figura 27, donde se observó que el tratamiento bioaumentado más DDT (S+A+DDT) tuvo diferencias significativas comparado con el control suelo estéril más DDT (SE+A+DDT), lo que indica que las bacterias adicionadas son capaces de adaptarse y crecer. Por otra parte aun cuando la actividad metabólica de los tratamientos bioestimulados + bioaumentado (S+B+A+DDT) mejora ligeramente con una producción de 15.83, no presentó diferencias significativas en su actividad metabólica comparados con los tratamientos bioestimulados con y sin DDT (S+B+DDT y S+B-DDT). Por último los tratamientos con suelo estéril + el consorcio + DDT y suelo estéril + DDT (SE+A+DDT y SE+DDT), no

mostraron una actividad metabólica considerable, lo que indica que la biomasa bacteriana adicionada no tuvo un efecto positivo probablemente debido a que la cantidad inoculada no fue la suficiente. Se ha demostrado que en procesos de bioaumentación la cantidad de inóculo del consorcio es un factor muy importante, por ejemplo Deepthi *et al.* (2007), observaron que el máximo porcentaje de degradación para diferentes concentraciones de DDT se obtuvieron con el inóculo más alto (1500 mg proteína ml) de un consorcio bacteriano. La adición de consorcios microbianos provee una herramienta para potenciar la degradación de plaguicidas. Sin embargo, factores ambientales como el pH, la temperatura y nutrientes que se encuentran en el ambiente pueden afectar el crecimiento de los microorganismos y sus habilidades metabólicas. Por ejemplo Depthi *et al.* (2007), con un consorcio microbiano que contenía 10 aislados por la técnica de enriquecimiento de suelo contaminado (*Flavobacterium*, *Vibrio*, *Burkholderia sp.* y siete cepas de *Pseudomonas*) pudieron degradar 98% de 35 mg kg<sup>-1</sup> de DDT en cultivo líquido en 72 horas a una temperatura de 25 °C con un pH entre un rango de 6-8, mientras que Bidlan *et al.* (2002), bajo condiciones de 30 °C reportan la degradación de 10 ppm en el mismo tiempo a un pH de 7. Por lo que factores como pH, temperatura, fuente de carbono alterna y tamaño del inóculo deben ser optimizados para influir en el crecimiento del consorcio bacteriano y sus habilidades degradadoras (Rajashekana *et al.*, 2007).

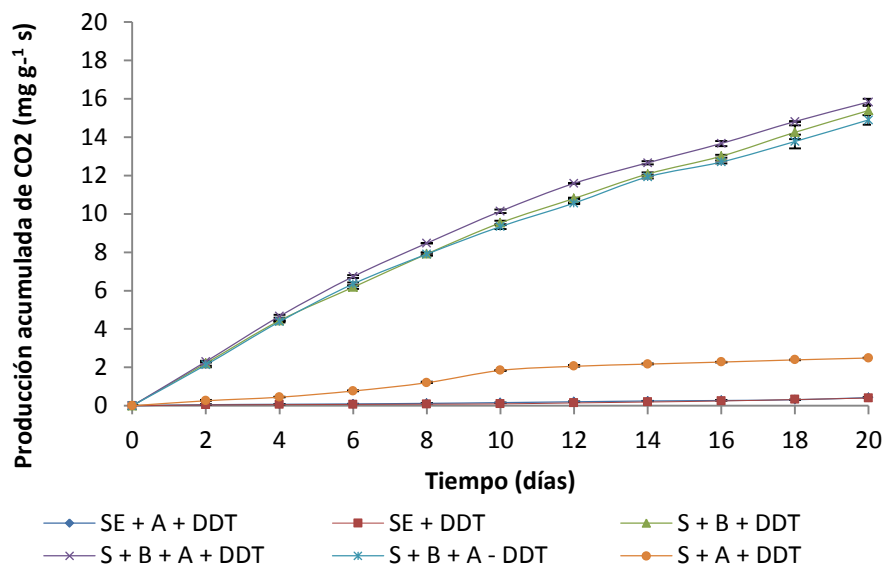


Figura 27. Actividad microbiana en cultivo sólido por consorcio microbiano en suelo A contaminado con DDT. (SE=suelo estéril, A=bioaumentación, B=bioestimulación).

En cuanto a los ensayos con el suelo B, el tratamiento bioestimulado + bioaumentado + DDT (S+B+A+DDT) mostró la actividad metabólica más alta con  $17.83 \text{ mg g}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ , seguido de los tratamientos bioestimulado + bioaumentado - DDT y bioestimulado + DDT (S+B+A-DDT y S+B+DDT) con una producción de  $16.57$  y  $16.33 \text{ mg g}^{-1} \text{ s}$  de  $\text{CO}_2$ , quienes no mostraron una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). El tratamiento bioestimulado (S+A+DD) mostró una producción de  $1.62 \text{ mg g}^{-1}$ , por último el tratamiento con suelo no estéril + bioaumentado no presentó una actividad metabólica considerable (Figura 28), pudiendo deberse como ya se mencionó en el caso del suelo A a que se deben optimizar diferentes factores con el fin de que el consorcio se adapte al ambiente y pueda crecer.

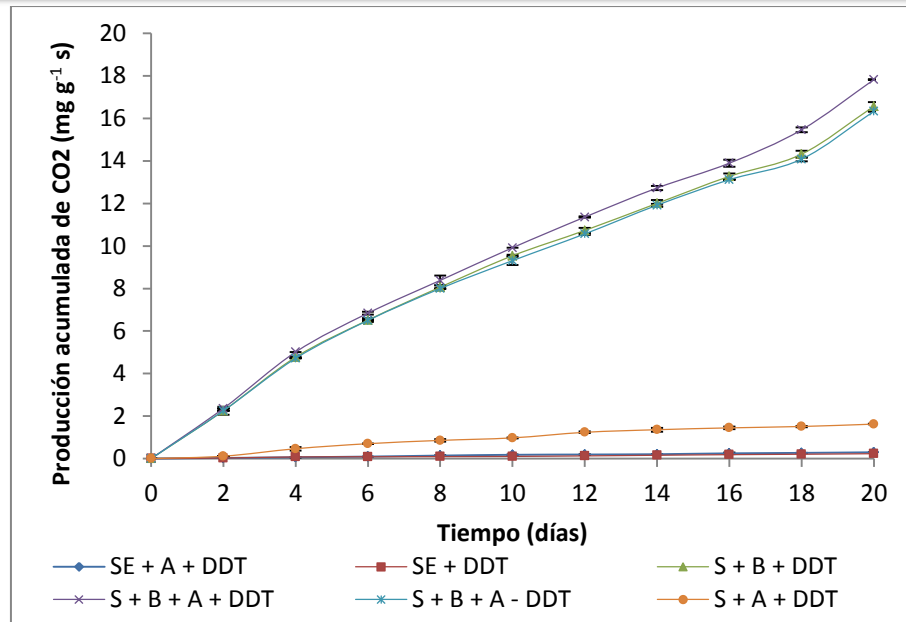


Figura 28. Actividad microbiana en cultivo sólido por consorcio microbiano en suelo B contaminado con DDT. (SE=suelo estéril, A=bioaumentación, B=bioestimulación).

---

## 7. Conclusiones

No se encontraron niveles altos de plaguicidas organoclorados y metil paratión en suelos agrícolas de Tepetila.

La adición de rastrojo de maíz al 5% mejoró la actividad microbiana del sistema en suelos con textura franco arenoso, franco arcillo arenoso y franco, obteniéndose hasta un 72.90% de remoción del DDT en el suelo franco arenoso.

Se aislaron 76 cepas de diferentes tratamientos de bioestimulación, de las cuales 34 se aislaron del suelo franco arenoso, 24 del franco arcillo arenoso y 18 del franco.

*Cellulosimicrobium cellulans*, *Arthrobacter luteolus*, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus* sp *Sphingomonas*, *Bacillus atrophaeus* y *Bacillus* sp. presentaron alta tolerancia al DDT, ya que no mostraron inhibición en su crecimiento cuando se expusieron a una concentración máxima de 50 mg kg<sup>-1</sup> de DDT.

---

## 8. Referencias

- Ahmad R., Nelson P.N., Kookana R.S. 2006. The molecular composition of soil organic matter as determined by <sup>13</sup>C NMR and elemental analyses and correlation with pesticide sorption. *Eur. J. Soil Sci.* 57: 883–893.
- Abou-Arab A. K. 2002. Degradation of organochlorine pesticides by meat starter in liquid media and fermented sausage. *Food Chem. Toxicol.* 40:33-41.
- Aislable J., Lloyd-Jones G. A. 1995. A review of bacterial degradation of pesticides, *Aust. Journal. Soil Res.* 33:925–942.
- Albone S., Eglington G., Evans C., Hunter M., Rhead M. 1972. Fate of DDT in Severn estuary sediments. *Environ. Sci. Technol.* 6(10):914-919.
- Alcalde M., Bulter T., Arnold F.H. 2002. Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *Journal of Biomolecular Screening*, 7(6):547-553.
- Al-Qurainy F., Abdel-Megged A. 2009. Phytoremediation and detoxification of two organophosphorous pesticides in Riyadh area. *World Applied Sciences Journal.* 6 (7):987-998.
- Álvarez-Solís J. Díaz-Pérez E., León-Martínez N. S., Guillén-Velásquez J. 2010. Enmiendas orgánicas y actividad metabólica del suelo en el rendimiento de Maíz. *Terra Latinoamericana* 28:239-245.
- Andrades M.S., Rodríguez-Cruz M.S, Bernal, M.A, Sánchez-Martín M.S., Sánchez Camacho M. 2003. Influencia de la modificación de suelos con surfactante catiónico en el incremento de adsorción de pesticidas por suelos Instituto de Recursos Naturales y Agro biología, CSIC. Apdo. 257.37071. Salamanca.

- 
- Anwar S., Liaquat F., Khan M., Zafar M., Khalid M., Iqbal S. 2009. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by bacillus pumilus strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*. 168:400-405.
- Atagana H.I., Haynes R.J., Wallis F.M. 2003. Optimization of soil physical and chemical conditions for the biorremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation*. 14(4):297-307.
- Baker K. H., Herson D.S. 1994. *Bioremediation*. McGraw Hill Inc. U.S.A.
- Bardi L., Ricci R., Marzona M. 2003. In situ bioremediation of a hydrocarbon polluted site with cyclodextrin as a coadjuvant to increase bioavailability. *Water, Air and Soil Pollution*. (4):297-307.
- Blackburn J., Hafker R. 1993. The Impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques *Trends Biotechnol*. 11:328-333.
- Benimeli C.S., Amoroso M.J., Chaile A.P., Castro G.R. 2003. Isolation of four aquatic streptomycetes strains capable of growth on organochlorine pesticides. *Bioresour. Technol*. 89:348-357.
- Bidlan R., Manonmani H. 2002. Aerobic degradation of dichloro-diphenyl-trichloro ethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT.-IP. *Proc. Biochem*. 38:49-56.
- Bolognesi C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation research*. 549(3): 251-272.
- Bossert Y., Bartha R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. *Petroleum Microbiology*, Atlas, R. M. Ed. Macmillan, New York, U.S.A. pp. 435-474.
- Bumpus J. A., Aust S. D. 1987. Biodegradation of DDT (1,1, 1-trichloro- 2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53 (9): 2001-2008.
-

- 
- Carrillo-Pérez E., Ruiz.-Manríquez, A., Yomans-Reina H. 2004. Aislamiento, identificación y evaluación de un cultivo mixto de microorganismos con capacidad para degradar DDT. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 20:69-75.
- Clark F.E. 1995. Agar-plate method for total microbial count. In Black C.A. *et al.*, Editor. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties Madison. WI: American Society of Agronomy*. p. 1460-1466
- CICOPLAFEST. 1998. *Cátalo go oficial de plaguicidas. México*.
- Chuck-Hernández C., Pérez-Carrillo E., Heredia-Olea E., Serna-Saldívar S.O. 2011. Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: Tecnologías, avances y áreas de oportunidad. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10(3):529-549.
- Critter S., Freitas S. Airoidi C. 2004. Comparison of microbial activity in some Brazilian soils by microcalorimetric and respirometric methods. *Thermochimia Acta* (410): 35-46.
- Colborn Theo., Dumanoski D., Peterson J. 1996. *Our Stolen Future*. Dutton. New York.
- Coquet Y. 2003. Sorption of pesticide atrazine, isoproturon, and metamitron in the Vadose Zone. *Vadose Zone J.* 2, 40–51.
- Chiron S., Fernandez-Alba A., Rodríguez A., García-Calvo E. 2000. Pesticide chemical oxidation: state of the art. *Water Research*. 34 (2):366-377.
- Dasgupta S., Meisner C., y Wheeler D. 2010. Stockpiles of obsolete pesticides and cleanup priorities: A methodology and application for Tunisia. *Environmental Management*. 91(4): 824-830.
-

- 
- De Jonge R.J., Breure A.M., Van-Andel JG. 1996. Reversibility of adsorption of aromatic compounds onto powdered activated carbon (PAC). *Water Res.* 30 (4): 883–892.
- Deepthi N., Rastogi N., Manonmani H. 2007. Degradation of DDT by a defined microbial consortium: Optimization of Degradation conditions by response surface methodology. *Research Journal of Microbiology.* 2(4):315-326.
- Díaz-Trujillo M.V. 2007. Estudios del Sistema Suelo-surfactante-plaguicida en los procesos de adsorción y desorción de Atrazina, MTB y Clorpirifos. Tesis para obtener el grado de Magíster en Química. Santiago de Chile, Junio.
- Dragun J. 1998. *The soil Chemistry of Hazardous Materials*, 2nd. Edition. Amherst Scientific Publishers. Massachusetts, 862 pp.
- Eaton R.W. 2001. Plasmid-encoded phthalate catabolic pathway in *Arthrobacter ketseri* 12B. *J. Bacteriology.* 183(12):3689-3703.
- Elliott M., Janes N.F., Potter C. 1978. The future of pyrethroids in insect control. *Annu. Rev. Entomol.* 23: 443-496.
- Eweirs J.B., Ergas D.P., Schroed E.D. 1998. *Biorremediation Principles*. McGraw Hill. International Editions.
- Environmental Protection Agency (EPA). 2001. Office of Prevention, Pesticides and Toxic substances. Washington, D.C.USA. <http://www.eoa.gov/oppbead1/pestsales/maket1999>.
- Fang H., Doung B., Yan H., Tang F., Yu Y. 2010. Characterization of bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil. *Journal of Hazard Materials.* 189: 281-289.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) 2002. Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Adoptado por el 123º periodo de sesiones del Consejo de la FAO. Roma pp. 1-31.
-

- 
- Ferrer A. 2003. Intoxicación por plaguicidas; pesticida. Poising. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 26:155-157.
- Fournier D., Halasz A., Spain, J., Fiurasek P., Hawari J. 2002. Determination of key metabolites during biodegradation of hexahidro-1,3,5-triazine with *Rhodococcus* sp. Strain DN 22. Applied and environmental Microbiology. 68:166-172.
- Gan J., Koskinen W., Becker R., Buhler D. 1995. Effect of concentration on persistence of alachlor in soil. Journal of Environmental Quality. 24:1162-1169.
- Gan J., Yates R., Crowley D. y Becker J. 1998. Acceleration of 1,3-dichloropene degradation by organic amendments and potential application for emissions reduction. Journal of Environmental Quality. 27: 408 – 414.
- Gamón M., Saéz E., Gil J., Boluda R. 2003. Direct and indirect exogenous contamination by pesticides of rice-farming soils in a Mediterranean wetland. Arch. Environment Contamination. Toxicology. 44:141-151.
- García B., Mesa M. 1991. Principales vías de contaminación por plaguicidas en neonatos lactantes residentes en Pueblo Yaqui, Sonora, México. ITSON-DIEP. 1(2):33-44.
- Giner de los Ríos D.C. 2007. Estudio. Precisión del inventario de plaguicidas obsoletos y sitios contaminados con éstos. Actividades de habilitación para ayudar a México a cumplir con el convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. 149.
- Golovleva L., Aharonson R., Greenhalg N., Sethunathan N., Vonk W. 1990. The role and limitations of the microorganism in the conversion of xenobióticos. Puer and apl. Chem 62: 351-354.
- Haimi J. 2000. Decomposer animals and biorremediation of soils. Environmental pollution. Volumen 107: 233-238.
-

- 
- Harrison H., Wearne S, Gem D.M., Gleadle M. G., Starting J., Thorpe S. 1998. Time trends in human dietary exposure to PCDDs, PCDFs and PCBs. *Chemosphere* 37:1657-1670.
- Hayatsu M, Hirano M, Nagata T. 2009. Involvement of two plasmids in the degradation of carbaryl by *Arthrobacter* sp. Strain RC100. *Appl Environ Microbiol.* 65:1015-1019.
- Hernández-Soriano M.C., Mingorance M.D., Peña A. 2007. Interaction of pesticides with a surfactant-modified soil interface. Effect of soil properties. *Colloids and Surfaces A:Physicochem. Eng. Aspects.* 306:49-55.
- Herrera-Portugal C., Franco-Sanchez G., Zelada V., Schlottfeld-Trujillo., Rodríguez-Feliciano M., Barrientos-Becerra H. 2008. Niveles de plaguicidas organoclorados (DDT y DDE) en niños de comunidades endémicas de paludismo en Chiapas, México. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales.* 4 (3): 349-356.
- Hotchkiss J. 1992. Pesticide residue controls to ensure food safety. *Critical. Food Sci. Nutrition* 31:191-203.
- Instituto Nacional de Ecología. <http://www.ine.gob.mx>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. <http://www.inegi.gob.mx>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 1997. El sector agroalimentario en México. Edición 1997. México, INEGU. P. 340.
- Juárez-Santacruz L., García-Nieto E., Costilla-Salazar R., García-Gallegos E., Coronel Olivares C., Gómez-Camarillo M., Gaytán-Oyarzún J. 2011. Assessment of the genotoxic potential of sediments contaminated with POPs and agricultural soils using *Vicia faba* micronucleus assay. *Journal Soil and sediment contamination.* Artículo en prensa.
-

- 
- Karam M.A., Ramírez G., Montes B., Galván J.M. 2004. Plaguicidas y Salud de la población. *Ciencia Ergo San.* Noviembre. Vol. II. Universidad Autónoma del Estado de México. 246-254.
- Kantachote D., Naidu R., Singleton I., McClure N., Harch B.D. 2001. Resistance of microbial populations in DDT-contaminated and uncontaminated soils. *Applied Soil Ecology.* 16: 85-90.
- Kantachote D., Naidu R., Williams B., McClure N., Megharaj M., Singleton I. 2004. Bioremediation of DDT-contaminated soil: enhancement by seaweed addition. 79:632-638.
- Kelce W.R., Stone C.R., Laws S.C., Gray L. E., Kemppainen J.A. Wilson E.M. 1998. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature.* 375:581-585.
- Kertesz M.A., Cook A.M., Leisinger T. 1994. Microbial metabolism of sulfur-containing and phosphorus-containing xenobiotics. *FEMS Microbiol.* 15:195–215
- Kijchavengkul T., Auras R., Rubino M., Ngouajio M., Fernández R.T. 2006. Development of an automatic laboratory scale respirometric system to measure polymer biodegradability. *Polymer Testing (25):* 1006-1016
- Larson B., Montonarella L., Mousty F. 1993. Technologies for environmental cleanup: soil and groundwater, Klumer academic Publishers. Dordrecht.
- Lal R., Saxena D. 1982. Accumulation, metabolism and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. *Microbiological reviews.* 46:95-127.
- Lindh-Lindh D. 2004. Degradación de paja de trigo adicionada de una fuente de carbono o nitrógeno por tres cepas de hongos. Tesis de Licenciatura. Valdivia Chile.
- Longnecker M., Rogan W., Lucier G. 1997. The human effects of DDT (dichlorodiphenyl trichloroethane) and PCBs, (polychlorinated bisphenyls) and
-

- 
- an overview of organochlorines in public health. *Annu Rev Public Health* 18: 211-244.
- Matsumura F., Boush G.M., Tai A. 1968. Breakdown of dieldrin in soil by microorganisms. *Nature (London)* 219:965-967.
- Maroni M., Fait A. 1993. Health effects in men from long-term exposure to pesticides. *Toxicology*. 78:1-180.
- Mitra J., Mukherjee p., Kale S., Murthy N. 2011. Biorremediation of DDT in soil by genetically improved strains of soils fungus *Fusarium solani*. *Biodegradation*. 12(4):235-245.
- Mishra S., Jyot J., Kuhad R., Lal B. 200. Evaluation of inoculum addition to estimate in situ biorremediation of oily-sludge-contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(4):1675-1681.
- Mosquera B.R. 2009. Biodegradación del malatión utilizando microorganismos nativos de suelos agrícolas. *Rev. Colomb Cienc Pecu.* 22: 189-198.
- Mohapatra S., Awasthi M.D. 1997. Enhancement of carbofuran degradation by soil enrichment cultures, bacteria cultures and by synergistic interaction among bacterial cultures. *Pestic. Sci.* 49:164-168.
- Nadeau L.J., Menn F., Breen A., Sayler G.S. 1994. Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by *alcaligenes eotrophus* A5. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 51-55.
- Nagata Y., Futamura A., Miyauchi K., Takagi M. 1999. Two different types of dehalogenases Lin A and Lin B involved in Y-HCH degradation *Sphingomonas paucimobilis* UT26 are localized in the periplasmic space without molecular processing, *J, Bacterial.* 181: 5409-5413.
- Nawab A., Aleem A., Malik A. 2003. Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to g-HCH degradation by *Pseudomonas* strains. *Bioresource Technol.* 88: 41-46.
-

- 
- Navarro I., Flores E., Valladares R. 2004. Estudio Ambiental. Informe. In Morales Eduardo (ed). Ambiente y Derechos Humanos. Centro Fray Julián Garcés, Derechos Humanos y Desarrollo Local A. C., Tlaxcala, México 27-59.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-021-SEMARNAT 2000.
- Oliveira S., Rodríguez-Iturralde D. 2005. Pesticidas, salud y medio ambiente. Departamento de Neuromiología. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. <http://iibce.edu.uy>.
- Olea N., Fernández M. 2001. Plaguicidas persistentes. Congreso Implementación del convenio de Contaminantes Orgánicos Persistentes Madrid, 26-27 de Noviembre.
- Ortiz I., Velasco A., Le Borgne S., Revah S. 2012. Biodegradation of DDT by stimulation of indigenous microbial populations in soils with cosubstrates. Biodegradation.
- Pimentel D. 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agric. Environ. Ethics*. 8:17-29.
- Pfaender F.K., Alexander M. 1973. Effect of nutrient additions on the apparent cometabolism of DDT. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2(3):397-399.
- Revollo E., Danuta S., Hernández T. 2012. Characterization of lignocelluloses-degrading rare actinobacteria: Demonstration of laccase activity in two isolates of *Tsukamurella sp* and *Cellulosimicrobium sp*. *Rev. Colomb. Ciotecnol*. Vol. XIV no. 2. 70-80.
- Rivera D., Camelo M., Estrada G., Obando M., Bonilla Ruth. 2010. Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*. *Rev. Colomb. Biotecnol*. XII:94-102.
-

- 
- Rajashekara H., Manonmani H. 2007. Aerobic degradation of technical hezachlorocyclohezane by a defined microbial consortium. *Journal of Hazardous Materials*. 149:18-25.
- Semple K.T., Reid B.J., Fermor T.R. 2001. Impact of composting strategies to tread organic pollutants in contaminated soils. *Enviromental Pollution* 112:269-283.
- Setyo P., Futoshio K., Toshio M., Ruychiro K. 2010. DDT degradation potential of cattle manure compost. *Chemosphere*. 80:619-624.
- Singh S., Kang S.H., Mulchandani A., Chen W. 2008. Biorremediation: environmental clean-up through pathway engineering. *Current opinion in biotechnology*. 19(5):437-444.
- Solanus P. 1972. Effect of DDT and fenitrothion on forest soil microflora- *J. Econ. Entomol.* 65:1089-1096.
- Strong L.C., Rosendahl C., Johnson G., Sadowsky M.J., Wackett L.P. 2002. *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5973–5980.
- Feei S., Hui-Shan C. 2008. Monitoring of pesticide chlorpyrifos residue in farmed fish: Investigation of possible sources. *Chemosphere* 71:1866-1869.
- Shalaby S., Abdou G. 2010. The influence of soils microorganisms and bio or organic fertilizers on dissipation of some pesticides in soil and potato tube. *Journal of Plant Protection Research*. 50(1). 86-92.
- Shapir N., Mongolin E.F., Sandowsky M.J., Daugherty S.C., Nelson KE., Wackett, L.P. 2007. Evolution of Catabolic Pathway: Genomic Insights into Microbial s-Triazine Metabolism. Minireview. *Journal of Bacteriology*. 189 (3): 674-682.
- Stegmann R., Brunner G., Calmano W., Matz G. 2001. Treatment of contaminated soil: Fundamentals, analysis, applications. *Geoderma* 111 (1-2):151-153.
-

- 
- Subba-Rao., Alexander M. 1997. Products formed from analogue of DDT metabolites by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ Microbiol.* 33:101-108.
- Spark K.M., Swift R.S. 2002. Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. *Sci. Total Environ.* 298 (1–3): 147–161.
- Tixier C., Sancelme M., Ait-Aissa S., Widehem P., Bonnemoy F., Cuer A. 2002. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere* 46:519–526.
- Torres K., Zuluaga M. 2009. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Universidad de Colombia, Bogotá-Colombia.
- Upegui S.A., Peñuela G.A., Botero L.R. 2010. Efecto del enriquecimiento con nutrientes en la degradación de clorpirifos, malatión y metil paratión. *Revista Ingeniería Universidad de Medellin.* 10(18):43-50.
- Van Deuren J., Wang Z., Ledbetter J. 1997. Remediation technologies screening matrix and reference Guide. 3ra. Ed. Technology Innovation Office, EPA, <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
- Van Gesteli C., Adema D., Dirven-van B. 1996. Phytotoxicity of some chloroanilines and chlorophenols in relation to bioavailability in soil. *Water, Air and Soil Pollution* 88 (1-2): 119-132
- Vásquez M., Reyes W. 2002. Degradación de Aroclor 1242 por *pseudomonas* sp. Biblioteca Nacional de Perú, Perú.
- Vogel T.M. 1996. Bioaugmentation as soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:311-316.
-

- Yamanaka H., Moriyoshi K., Ohmoto T., Ohe T., Sakai K. 2007. Degradation of bisphenol-A by *Bacillus pumilus* isolated from Kimchi, a traditional fermented food. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 136:39-51.
- Wedemeyer G. 1996. Dechlorination of DDT by *Aerobacter aerogenes*. *Science.* 152:647-654.
- Williams R.J., Brooke D., Mathiesen P., Mills M., Turnbull A., Harrison R. 1995. Pesticide Transport to Surface Waters within an Agricultural Catchments. *J. Inst. Water Environ. Man.* 9: 72-81.