



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**BIORREMEDIACIÓN DE UN PLAGUICIDA
ORGANOFOSFORADO CON DIFERENTES CEPAS
FÚNGICAS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANGÉLICA ISABEL AMAYA MÁRQUEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN MANUEL ARCE ORTEGA**

2013

1. Datos del alumno

Amaya
Márquez
Angélica Isabel
52086687
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304043578

2. Datos del tutor

Dr.
Juan Manuel
Arce
Ortega

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Alfonso
Vázquez
Botello

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Víctor Manuel
Luna
Pabello

5. Datos del sinodal 3

M en C
Alfonso José
Vilchis
Peluyera

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Cecilia
Izcapa
Treviño

7. Datos del trabajo escrito.

Biorremediación de un plaguicida organofosforado con diferentes cepas fúngicas.
49 p
2013

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCION | 6 |
| 2. RESUMEN..... | 7 |
| 3. MARCO TEÓRICO | 8 |
| 3.1 Plaguicidas | 8 |
| 3.1.1. Propiedades de los plaguicidas | 9 |
| 3.1.2. Toxicidad de los plaguicidas | 11 |
| 3.1.3. Clasificación de plaguicidas de acuerdo a su toxicidad | 11 |
| 3.2 Plaguicidas organofosforados | 12 |
| 3.2.1. Mecanismo tóxico..... | 14 |
| 3.3 Metil Paratión | 14 |
| 3.3.1. Propiedades físico-químicas | 15 |
| 3.3.2. Destino en el ambiente | 16 |
| 3.3.3. Peligro ambiental | 17 |
| 3.3.4. Metabolitos comunes del Metil Paratión | 17 |
| 3.4 Legislación sobre plaguicidas | 18 |
| 3.4.1. Legislación sobre Metil Paratión | 18 |
| 3.4.2. Legislación en México | 20 |
| 3.4.3. Cantidades de Metil Paratión documentadas | 21 |
| 3.5 Biorremediación de plaguicidas | 21 |
| 3.5.1. Compuestos xenobióticos y su degradación biológica | 21 |
| 3.5.2. Biodegradación de plaguicidas por especies fúngicas | 22 |
| 3.6 Hongos filamentosos..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6.1 Generalidades de los hongos filamentosos | 24 |
| 3.7 Objetivo | 25 |
| 3.7.1 Objetivo general..... | 25 |
| 3.7.2 Objetivos particulares | 25 |
| 3.8 Hipótesis | 25 |
| | |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 26 |
| | |
| 4.1 Métodos de análisis..... | 26 |
| 4.1.1. Métodos de Extracción líquido-líquido | 26 |
| 4.1.2. Eficiencia de Extracción líquido-sólido | 26 |
| | |
| 4.2 Análisis y cuantificación del plaguicida | 27 |
| 4.2.1. Evaporación y concentración del plaguicida | 27 |
| 4.2.2. Cromatografía de gases | 27 |
| 4.2.3. Extracto patrón de Metil Paratión | 27 |
| | |
| 4.3 Desarrollo y análisis microbiológicos | 28 |
| 4.3.1. Crecimiento microbiano..... | 28 |
| 4.3.2. Inóculo | 28 |
| 4.3.3. Crecimiento microbiano en cultivo sólido (Placa) | 29 |
| 4.3.4. Crecimiento microbiano en medio líquido | 29 |
| | |
| 4.4 Determinación de parámetros para determinar la actividad fúngica | 29 |
| 4.4.1. Medio líquido | 29 |
| 4.4.2. Determinación de pH | 30 |
| 4.4.3. Azúcares Reductores | 30 |
| 4.4.4. Biomasa | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 5. DISEÑO EXPERIMENTAL | 31 |
| 5.1 Selección del hongo..... | 31 |
| 5.2 Cinética de biodegradación de Metil Paratión | 32 |
| | |
| 6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 33 |
| | |
| 6.1 Análisis y discusión de resultados de la biodegradación de metil paratión por las cuatro especies fúngicas | 33 |
| 6.1.1. Cromatograma de extracción de Metil Paratión | 33 |
| 6.1.2. Resultados de la cinética de remoción de Metil Paratión por la especie <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 34 |
| 6.1.3. Resultados de la cinética de remoción de Metil Paratión por la especie <i>Penicillium pinophilum</i> | 34 |
| 6.1.4. Resultados de la cinética de remoción de Metil Paratión por la especie <i>Aspergillus niger</i> | 35 |
| 6.1.5. Resultados de la cinética de remoción de Metil Paratión por la especie <i>Penicillium sp.</i> | 35 |
| 6.1.6 Análisis y discusión de resultados de la cinética de remoción de MP por <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , y <i>Penicillium sp.</i> | 36 |
| | |
| 6.2 Análisis y discusión de resultados de la biodegradación de Metil Paratión utilizando a la especie <i>Aspergillus niger</i> | 37 |
| 6.2.1 Resultados de la cinética de remanente y remoción de Metil Paratión..... | 37 |
| 6.2.2 Análisis y discusión de resultados del remanente y remoción de Metil Paratión | 38 |
| 6.2.3 Otros compuestos detectados | 39 |
| 6.2.4 Seguimiento de pH | 41 |
| 6.2.5 Azúcares Reductores | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 6.2.6 Biomasa | 43 |
| 7.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 44 |
| 7.1 Conclusiones | 44 |
| 7.2 Recomendaciones | 44 |
| Anexo A. | 45 |
| Anexo B. | 45 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 46 |

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación por plaguicidas, de los cuales la mayoría son compuestos orgánicos, es consecuencia del uso extensivo de éstos en la agricultura para el control de plagas, o en la aplicación para la higiene pública, así como al mal manejo de los residuos de dichos xenobióticos.

Esta contaminación puede aparecer en la atmósfera, suelo, agua y biósfera de diferentes ambientes por causa de la movilidad y persistencia que presentan los plaguicidas, como resultado de la dinámica e interrelaciones que presentan los ecosistemas.

Dentro de los plaguicidas existen dos grandes grupos químicos, los plaguicidas organofosforados y los plaguicidas organoclorados. En la actualidad los compuestos organofosforados (OPs) son primordialmente utilizados como insecticidas en el ámbito agrícola así como en otras prácticas, han reemplazado a los plaguicidas organoclorados (OCs) ya que comparados con éstos, presentan una menor bioacumulación y son degradados rápidamente en el ambiente.

La toxicidad de los compuestos OPs está basada en inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), obteniendo como resultando la acumulación de acetilcolina (ACh), neurotransmisor que interfiere en las terminaciones nerviosas causando alteraciones bioquímicas que actúan en respuestas musculares, respiratorias, cardíacas e incluso la muerte del organismo.

La contaminación por compuestos OPs en ambientes acuáticos, aéreos y terrestres, ha creado problemas ambientales asociados a la aguda toxicidad de estos plaguicidas, por lo cual es requerido eliminar o minimizar los riesgos a los cuales están expuestas las poblaciones de los ecosistemas a estos contaminantes.

Entre las posibles técnicas de tratamiento aplicables para la descontaminación de un determinado ambiente se encuentran los procesos de degradación biológica, útiles para muchos tipos de contaminantes orgánicos entre los que se encuentran los plaguicidas.

La degradación biológica de contaminantes implica procesos naturales que no suponen un impacto adicional sobre los ecosistemas y que se pueden realizar a un bajo costo. Los procesos biológicos tienen la ventaja de requerir inversiones de capital moderadas, bajo consumo de energía, ser ambientalmente seguros y no generar residuos.

Los tratamientos biológicos se basan en la capacidad de diversos microorganismos, ya sean plantas, algas, bacterias u hongos para romper o degradar sustancias xenobióticas, donde la clave de la degradación son enzimas involucradas en el proceso, convirtiendo los contaminantes en productos menos tóxicos o inocuos.

2. RESUMEN

El trabajo realizado en el presente estudio, fue evaluar la capacidad de degradación de cuatro especies de hongos filamentosos, para ser aplicada en la biorremediación de un plaguicida organofosforado de uso común en México, el Metil Paratión.

Las especies fúngicas a evaluar fueron seleccionadas previamente en relación a su potencial lignolítico; estuvieron cultivadas en un medio sólido (PDA) y posteriormente inoculadas en un medio líquido, con una concentración de carbono (dextrosa) de 10 g/L para un óptimo crecimiento. Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de biodegradación con el plaguicida igualmente en un medio líquido pero con una concentración modificada de la fuente de carbono (40% menos de dextrosa), diseñando diferentes series de sistemas de cultivos fúngicos para determinar la remoción del plaguicida en diferentes condiciones.

Los resultados obtenidos en estos ensayos permitieron seleccionar a *Aspergillus niger* como la especie con mayor eficacia para remover el Metil Paratión del medio de cultivo líquido.

Ya seleccionada la especie más exitosa, se llevó a cabo el ensayo de biodegradación con *Aspergillus niger*, evaluando la cinética de remoción del plaguicida y otros parámetros para dilucidar los posibles mecanismos de transformación o asimilación del plaguicida; las series de tratamiento que se realizaron por separado fueron: crecimiento fúngico con plaguicida, crecimiento fúngico sin plaguicida y control abiótico.

En el ensayo de biodegradación con *Aspergillus niger* se evaluaron parámetros clave que manifiestan la actividad biológica del organismo: pH, azúcares reductores y biomasa. Por otro lado, para determinar el nivel de Metil Paratión en el medio y los cambios presentados por la actividad biológica, las muestras con los extractos orgánicos fueron analizadas por Cromatografía de Gases acoplado al Espectrómetro de Masas. (GC-MS)

El resultado obtenido de dicho trabajo, muestra un potencial de biodegradación del plaguicida utilizando a la especie *Aspergillus niger* capaz de remover la cantidad del contaminante del medio de hasta un 93% de la concentración inicial a los 7 días de tratamiento. Lo anterior indica la existencia de un gran potencial de *Aspergillus niger* para ser utilizado en procesos de biorremediación de aguas contaminadas con el plaguicida organofosforado Metil Paratión.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 PLAGUICIDAS

Se denomina plaguicida a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal. En la tabla 3.1 se muestra la denominación y etiqueta de los principales plaguicidas de acuerdo al organismo que controlan.

Tabla 3.1. Denominación de plaguicidas de acuerdo a su uso.

| Organismo Control | Etiqueta |
|--------------------------|----------|
| Acaricidas | AC |
| Larvicida | L |
| Aficida | AP |
| Molusquicidas | M |
| Bacteriostático (suelos) | B |
| Nematicidas | N |
| Herbicidas | H |
| Fungicida | F |
| Insecticida | I |

Fuente: Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2009.

El mecanismo de acción de los plaguicidas puede ser múltiple, ya sea de contacto, ingestión, sistémico, fumigante, repelente o defoliante.

Otra clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su composición química, se presenta en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Clasificación de plaguicidas de acuerdo a su composición química.

| Tipo Químico | Abreviatura |
|---------------------------|-------------|
| Compuestos de Arsénico | AS |
| Bipiridílicos (derivados) | BP |
| Carbamatos | C |
| Compuestos de cobre | CU |
| Compuestos de Mercurio | HG |
| Derivados de Nitrofenol | NP |
| Organoclorados | OC |
| Organofosforados | OP |
| Piretroides | PY |
| Triazinas (derivados) | T |
| Tiocarbamatos | TC |

Fuente: Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2009

3.1.1 Propiedades de los plaguicidas

Entre las propiedades físicas y químicas de los plaguicidas que influyen en su comportamiento ambiental y pueden favorecer la exposición a los ecosistemas y a los seres humanos, se encuentran:

Solubilidad en agua.

- Solubilidad acuosa mayor a 500 mg/l son muy móviles en los suelos y otros elementos de los ecosistemas. Su mayor concentración se encuentra en ecosistemas acuáticos.
- Solubilidad mayor a 25 mg/l (como ocurre en general con los organofosforados) no son persistentes en los organismos.
- Solubilidad menor (organoclorados) tienden a inmovilizarse en suelos y concentrarse en los organismos vivos.

Coeficiente de partición octanol/ agua.

- . Proporciona información sobre la solubilización y distribución de un plaguicida en un organismo vivo. Coeficiente mayor a uno son liposolubles, se absorben fácilmente a través de las membranas biológicas y se acumulan en tejido graso.

Disociación e ionización.

- . Las sustancias al solubilizarse pueden o no disociarse; las que no se disocian son sustancias no iónicas sin carga y las que si lo hacen son iónicas y pueden tener carga positiva (catiónicas) o negativa (aniónicas). Los plaguicidas aniónicos y los no iónicos son móviles en los suelos en tanto que los catiónicos se adsorben inmovilizándose en ellos. (Lo que usted debe saber sobre los plaguicidas. SEMARNAP, INE., 1996)

Degradabilidad

- . Por otra parte, la molécula de plaguicida no permanece intacta por tiempo indefinido en el medio ambiente, ya que con el tiempo sufre una degradación influenciada por microorganismos, actividad química, pH, clima, y contenido de materia orgánica del suelo, entre otros. Características físico químicas de los plaguicidas y su transporte en el ambiente. (Características físico-químicas de los plaguicidas y su transporte en el ambiente. INE., 2012)

Persistencia

- . La persistencia de un plaguicida se define como la capacidad que tiene para retener sus características físicas, químicas y funcionales en el medio, por un periodo limitado después de su emisión. Aquellos que persisten más tiempo en el ambiente, tienen mayor probabilidad de interacción con los diversos elementos que conforman los ecosistemas.

Se clasifican de acuerdo con su periodo de persistencia en:

- . Ligeramente persistentes (menos de cuatro semanas)
- . Poco persistentes (de cuatro a 26 semanas)
- . Moderadamente persistentes (de 26 a 52 semanas)
- . Altamente persistentes (más de un año y menos de 20)
- . Permanentes (más de 20 años). (Lo que usted debe saber sobre los plaguicidas. SEMARNAP, INE., 1996)

3.1.2 Toxicidad de los plaguicidas

Aproximadamente 2,358,680,324 de kilogramos de plaguicidas fueron utilizados mundialmente en 2006, (US-EPA, 2011) pero sólo el 1% de esta cantidad llega a plagas de interés exponiendo a múltiples organismos a estos compuestos debido a su selectividad limitada.

La exposición de los plaguicidas puede ocurrir a través de múltiples vías (por ejemplo en alimentos, agua potable, residencial u ocupacional) o por diversas rutas (en la ingesta, inhalación o por contacto). El tipo, gravedad y los efectos a la salud causados por la exposición a dichos compuestos, es determinado por la categoría química del plaguicida, la dosis, la duración de la exposición y la ruta de exposición; ya que presentan efectos indeseables nocivos a organismos sensibles no objetivo, tales como la población humana y organismos de los ecosistemas en general. (Hernández *et al.*, 2012)

3.1.3 Clasificación de plaguicidas de acuerdo a su toxicidad

Ante tales riesgos, la Organización Mundial de la Salud (WHO) por sus siglas en inglés, ha clasificado a los plaguicidas en categorías, donde se distingue la peligrosidad de cada plaguicida basándose en la toxicidad del compuesto. (The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2009)

- . LC₅₀: concentración letal media: es la concentración derivada de una sustancia en un ambiente, que se espera extermine al 50% de los organismos de una población bajo condiciones y un tiempo determinado. (IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 1997)
- . LD₅₀: dosis letal media: es la cantidad mínima del plaguicida en miligramos (mg), microgramos (ug), o nanogramos (ng) por kilogramo de peso corporal que es letal para el 50% de organismos muestreados. Las rutas de suministro pueden ser dérmica u oral. Las unidades usadas son: ppm (mg/kg), ppb (ug/kg) y ppt (ng/kg). (The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2009)

En relación a su categoría, los plaguicidas son etiquetados y evaluados de acuerdo al suministro de la dosis para establecer parámetros de concentraciones letales y dosis letales, dependiente de la categoría del plaguicida como se observa en la tabla 3.3

Tabla 3.3 Concentraciones letales y dosis letales dependientes de la categoría del plaguicida.

| Categoría | Etiqueta | Oral LD ₅₀ (mg/kg)* | Dérmica LD ₅₀ (mg/kg)* | Inhalación LC ₅₀ (mg/l)* |
|----------------------|----------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--|
| Altamente tóxico | Peligro veneno | <50 | <200 | <0.05 |
| Altamente tóxico | Peligro | <50 | <200 | <0.05 |
| Moderadamente tóxico | Alerta | 50-500 | 200-2000 | 0.05-0.5 |
| Escasamente tóxico | Precaución | 500-5 000 | 2000-5000 | 0.5-2 |
| No agudamente tóxico | Ninguna | >5 000 | >5 000 | >2 |

*Valores para toxicidad aguda en ratas.

Fuente: The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2009.

3.2 PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

La investigación de los primeros compuestos orgánicos del fósforo se inició con Lassaing en 1820, quién preparó los primeros ésteres fosfóricos; sin embargo las propiedades insecticidas fueron descubiertas hasta 1937 por el Dr. Schrader; quien sintetizó hasta 1944 el primer plaguicida organofosforado, paratión etílico, el cual se introdujo a la producción industrial. A partir del descubrimiento de las propiedades insecticidas de los ésteres fosfóricos, a su relativa baja persistencia en el medio ambiente y a la alta efectividad, son ampliamente usados en todo el mundo.

Los plaguicidas organofosforados, por sus siglas en inglés, (OPs) son ésteres orgánicos del ácido fosfórico, (fig. 3.1a) dependiendo de la sustitución de sus radicales en la fórmula básica, pudiendo dar origen a nuevos grupos de compuestos. (fig. 3.1b)

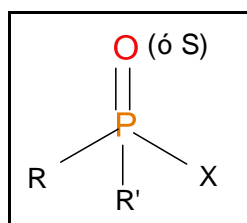


Figura 3.1(a). Fórmula general de los compuestos organofosforados.
Adaptada de (Pundir y Chauhan, 2012)

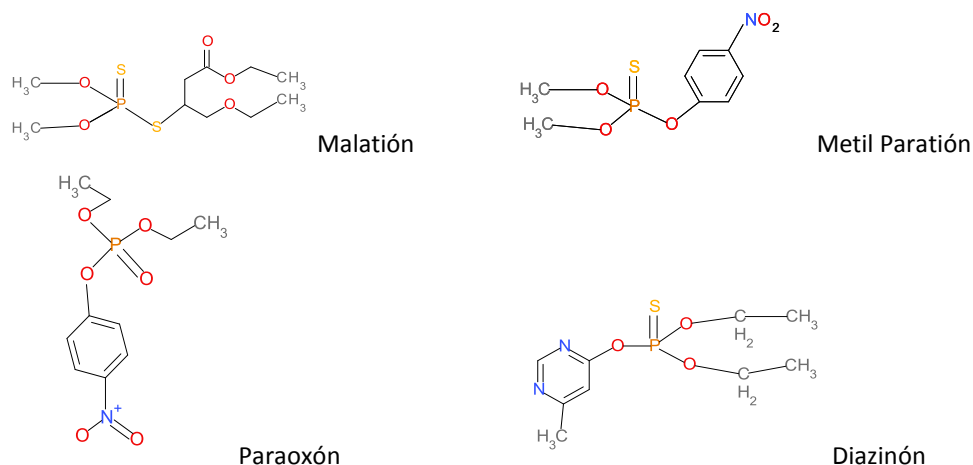


Figura 3.1 (b). Estructuras de plaguicidas organofosforados más comunes. Adaptada de (Pundir y Chauhan, 2012)

En la tabla 3.4, se observa la clasificación de algunos plaguicidas organofosforados, según (Cremlym 1990).

Tabla 3.4. La mayoría de los plaguicidas organofosforados pueden ser agrupados en:

Plaguicidas organofosforados

- Fosfatos
 - Fosforotionato
 - Fosforoditioato
 - Fosforotiolato
 - Fosforoamidato
 - Fosfordiamidato
 - Pirofosfato
 - Fosfotionato
-

Fuente: (Lezama-García *et al.*,) (Badii y Varela, 2008)

Los plaguicidas OPs, también llamados plaguicidas contemporáneos han sido considerados como “no persistentes” por lo que han reemplazado mayoritariamente a los compuestos organoclorados (OCs) por sus siglas en inglés, ya que comparados con los OCs, los compuestos OPs, son de menor bioacumulación debido a que son metabolizados y excretados del cuerpo en varios días y rápidamente son degradados en el ambiente,

cobraron un gran auge después de la prohibición de varios plaguicidas OCs y han resultado ser muy eficientes y económicos en el control de plagas. Su eficacia ha sido demostrada frente a áfidos, como el pulgón lanífero del manzano (*Eriosoma lanigerum*), insectos minadores, moscas de la fruta (*Ceratitis capitata*), ácaros, cochinillas, entre otros. En la actualidad, los OPs, representan aproximadamente un tercio del consumo total de plaguicidas en el mundo. (Barr y Larry, 2002) (Liu *et al.*, 2006) (Pérez *et al.*, 2009) (The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2009)

3.2.1 Mecanismo tóxico

La toxicidad de los compuestos organofosforados, es atribuida a la capacidad de inhibir la acetilcolinesterasa (AChE), la cual pertenece a la clase de enzimas que cataliza la hidrólisis del agente neurotransmisor la acetilcolina (ACh). La inhibición de la AChE, y esterasas afines, ha sido demostrada que es el resultado de una reacción química entre la enzima y el organofosfato; la enzima fosforilada no es capaz de hidrolizar la ACh, dando como resultado una acumulación del neurotransmisor en una sinapsis nerviosa o en una unión muscular. (Fukuto *et al.*, 1990)

Adicionalmente se ha encontrado que tales contaminantes llevan a daño cromosomal asociado a cáncer de vejiga, (Fang-yao *et al.*, 2007), son potentes inhibidores del metabolismo humano de testosterona y estradiol, se ha observado que la exposición a largo tiempo puede llevar a complicaciones respiratorias, enfermedades neurodegenerativas, polineuropatías, toxicidad reproductiva y del desarrollo, particularmente afectando al sistema endócrino y sistema nervioso ya que ambos objetivos son muy sensibles. (Hernández *et al.*, 2012)

3.3 METIL PARATIÓN

Entre los plaguicidas organofosforados, comúnmente utilizados, se encuentra el Metil Paratión (MP) por sus siglas en inglés, es un plaguicida de amplio espectro usado para el control de insectos tales como áfidos, oniscídeos, conocidos como “cochinillas” y ácaros en variedades de cultivos, incluyendo algodón, maíz, arroz, manzanas, avena, duraznos, alfalfa, girasoles frutos cítricos etc., observando su uso en porcentajes en la tabla 3.5 (Jiang, 2007) (Pino, 2011)

Tabla 3.5. Porcentaje de uso de Metil Paratión por tipo de cosecha

| Protección de consumo | Porcentaje |
|---|------------|
| Algodón | 83% |
| Soja | 8% |
| Granos incluyendo maíz | 5% |
| Avena | 2% |
| Tabaco, cacahuate, vegetales y cítricos | 2% |

Fuente: Programa Internacional en Seguridad Química.

3.3.1 Propiedades físico-químicas

- . Su fórmula molecular: $C_8H_{10}NO_5PS$
- . Masa molecular relativa: 263.23
- . Nombres comunes: Paratión metílico; aceptado por la Sociedad Americana Entomológica, por sus siglas en inglés (ESA) y WHO.
- . Nombre químico CAS: *O,O*-dimetil *O*-(4-nitro-fenil)fosforotioato
- . Nombre IUPAC: *O,O*-Dimetil *O*-4-nitrofenil fosforotioato
- . Número de registro CAS:298-00-0
- . Pureza: se encuentra disponible como solución, conteniendo las siguientes impurezas identificadas de una muestra de grado técnico del plaguicida, *O,O*-dimetil- *S*-metil ditiofosfato, nitroanisol, nitrofenol.
- . Estado físico puro: sólido cristalino blanco.
- . Punto de fusión: 35°C a 38 °C
- . Punto de congelación: aprox. 29°C (producto técnico)
- . Punto de ebullición: 143°C
- . Presión de vapor:1.3 mPa at 20 °C
- . Coeficiente de partición octanol/agua: $\log K_{ow} = 1.83-3.43$ (WHO, 2009)
- . Solubilidad en agua: 55-60 mg/litro a 25 °C (puro), 37.7 mg/litro a 19 °C (puro), 57 mg/litro a 22 °C (grado analítico.)
- . Solubilidad no-acuosa: etanol, cloroformo, solventes alifáticos
- . Vida media en solución acuosa: a 20 °C, pH 1-5, 175 días
- . 1 ppm Metil Paratión = 10.76 mg/m³ at 25 °C, 1066 mbar
- . 1 mg Metil Paratión /m³ = 0.0929 ppm

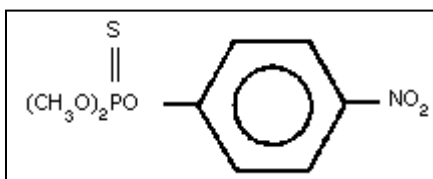


Figura 3.2. Fórmula molecular de Metil Paratión

El compuesto fue desarrollado en 1940s por el Químico Alemán, Gerhard Schrader; pero fue introducido comercialmente al mercado hasta 1949.

Es sintetizado por la reacción del *O,O*-dimetil fosforo-cloridotioato, con la sal sódica del 4-nitrofenol.

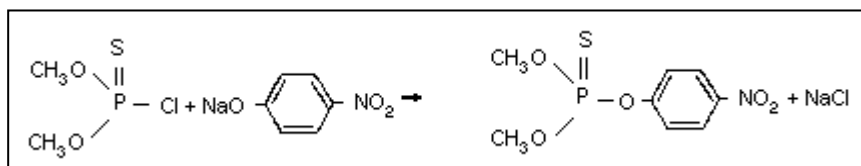


Figura 3.3. Síntesis del Metil Paratión. (Programa Internacional en Seguridad Química.)

3.3.2 Destino en el ambiente

Desde que los plaguicidas son aplicados al ambiente, sus residuos pueden ser encontrados tanto en productos de consumo como alimentos y agua para potable, o en ambientes acuáticos incluyendo aguas superficiales y subterráneas que albergan vida acuática y poblaciones que la consume exponiéndose a tales contaminantes y a sus compuestos degradados. (Hernández *et al.*, 2012)

Cuando los plaguicidas son introducidos en el ambiente, una parte de estos químicos se queda en el área donde es aplicado pero una mayor parte es transportada a otros compartimentos ambientales. El fenómeno de absorción/desorción de plaguicidas en suelos es de gran importancia desde el punto de vista ambiental; ya que este fenómeno afecta a otros procesos tales como transporte, degradación, volatilización y bioacumulación del compuesto. (Krishna y Philip, 2008)

La aplicación del Metil Paratión como insecticida, resultará en una liberación directa al ambiente, como primer paso se encontrará en la atmósfera en fase de vapor y en partículas. La molécula se degradará en la atmósfera por una reacción fotoquímica (fotólisis directa) que producirá radicales hidroxilo, la vida media de esta reacción en ha sido estimada en 6.5 horas.

En el caso de ambientes acuáticos se indica que la volatilización del paratión metílico en la superficie de aguas no es esperada (esto se sustenta en la Constante de Henry; pudiendo sufrir hidrólisis donde la vida media de la partícula en el agua es de 6.5 a 13 días a 40°C. (Hazardous Substances Data Bank, 1990.)

Hasta ahora se sabe que el Metil Paratión puede sufrir hidrólisis ó degradación oxidativa por la presencia de luz ultravioleta (UV), radiación o luz solar. (Programa Internacional en Seguridad Química, 2012)

3.3.3 Peligro ambiental

Aunque es considerado un plaguicida relativamente no persistente en el ambiente, ya que puede ser degradado por la acción de microorganismos, sus residuos pueden ser encontrados en suelos o aguas debido a las extensivas aplicaciones en la agricultura y a varios mecanismos que interfieren en el transporte del plaguicida incluyendo volatilización, viento, erosión, infiltración. (Mubeena- Akhtar *et al.*, 2007) (Programa Internacional en Seguridad Química, 2012)

El uso extensivo de dicho plaguicida en la práctica agrícola afecta seriamente a invertebrados acuáticos, insectos (principalmente polinizadores) mamíferos silvestres, aves y peces.

Los rangos de toxicidad para invertebrados acuáticos, van desde $LC_{50} < 1 \mu\text{g}$ a $40 \mu\text{g/L}$. Sin embargo, para la mayoría de peces de mar y de agua fresca, los rangos de LC_{50} , oscilan entre 6 mg/L y 25 mg/L , para los anfibios, dichos valores están situados similarmente. (Programa Internacional en Seguridad Química, 2012)

Por su comportamiento en el ambiente, y con base en la dosis letal LD_{50} oral administrada en ratas de 14 mg/kg , la Organización Mundial de la Salud clasifica al paratión metílico como “extremadamente peligroso” (Clase Ia). (The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, 2009)

3.3.4 Metabolitos comunes del Metil Paratión

El metabolito más común del Metil Paratión y paratión etílico es el 4-nitrofenol. Este metabolito es cuantificado utilizando un disolvente de extracción o extracción en fase sólida y el análisis de alto rendimiento se realiza utilizando cromatografía líquida-ionización química a presión atmosférica con espectrometría de masas tandem (HPLC-APCI-MS-MS). Alternativamente el 4-nitrofenol puede ser cuantificado utilizando GC-MS. (Barr y Larry, 2002) Otro compuesto que es formado en menor cantidad, es

dialquiltiofosfato (DATP); aunque es el 4-nitrofenol el mayor producto de la degradación. (Chávez-López *et al* 2011)

3.4 LEGISLACIÓN SOBRE PLAGUICIDAS

Actualmente existe un catálogo con aproximadamente 800 plaguicidas formulados en 21,000 productos diferentes, dichos productos se encuentran registrados en la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US), por sus siglas en inglés (EPA). Lamentablemente a pesar de los beneficios del uso de plaguicidas para el óptimo suministro de alimentos, su impacto en el ambiente y en la salud pública es substancial, ya que con el amplio uso de estas sustancias, es virtualmente imposible evitar la exposición a cualquier nivel. (Barr y Larry, 2002)

Se ha reportado que aproximadamente tres millones de personas han sufrido algún tipo de envenenamiento por plaguicidas, y que existen 200,000 personas que mueren cada año, alrededor del mundo por envenenamiento de tales compuestos. (Ilyas-Tariq *et al.*, 2007)

Lamentablemente, tanto poblaciones humanas como otras especies llegan a exponerse a dosis elevadas de plaguicidas; ante esta problemática se llevó a cabo la Convención de Róterdam, para desarrollar la legislación internacional sobre el uso adecuado de plaguicidas y químicos peligrosos, la cual promueve información de riesgos químicos, su uso comercial apropiado, y protección a la población y al medio ambiente.

3.4.1 Legislación sobre Metil Paratión

El Metil Paratión está reglamentado por el convenio de Róterdam existiendo otras organizaciones o convenios, que regulan, evalúan, restringen cantidades de Metil Paratión, como se puede observar en la tabla 3.6.

Tabla 3.6. Órganos reguladores y cantidades máximas permisibles de Metil Paratión en distintos usos agrícolas y medios.

| Órgano regulador | Limite permisible | Presencia |
|------------------|------------------------|---|
| FAO/WHO(JMPR) | 0.05 mg/kg a 0.2 mg/kg | LMR* para alimentos |
| FDA* y la EPA | 0.1 a 1 ppm | Residuos en cosechas |
| DOF* México | 0.00003 mg/L | Abastecimiento de agua potable |
| DOF* México | 0.00004 mg/L | Protección de agua dulce y vida acuática. |
| Rusia | 0.02 mg/L | Agua Superficial |
| Rusia | 0.1 mg/kg | Suelos |

*LMR (límites máximos de residuos)

*FDA (Administración Federal de Alimentos y Drogas de Estados Unidos)

*DOF (Diario Oficial de la Federación diciembre de 1989)

Fuente: (Programa Internacional en Seguridad Química) (ATSDR: Metil paratión y Resumen de salud pública) (Wallis *et al.*, 2001)

También existen cantidades recomendadas para el uso agrícola dependiendo de la cosecha, como se muestra en la tabla 3.7.

Tabla 3.7. Cantidades recomendadas para su uso en diferentes cosechas.

| Cantidades | Tipo de cosecha |
|----------------|------------------|
| 0.5-1 kg/ha | Vegetales |
| 1-2 kg/ha | Cereales |
| 1.5-6 kg/ha | Árboles frutales |
| 2-5 kg/ha | Cítricos |
| 0.12-1.0 kg/ha | Algodón |

Fuente: (Programa Internacional en Seguridad Química) (ATSDR: Metil paratión y Resumen de salud pública)

3.4.2 Legislación en México

En México, la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas CICOPALFEST es el organismo encargado de establecer las actividades relacionadas con la regulación y el control de riesgos químicos simplificando la reglamentación y gestión. (Pérez *et al.*, 2009)

Para ubicar en contexto la situación en México respecto a las sustancias peligrosas; el INEGI en coordinación con la SEMARNAT y el Instituto Nacional de Ecología (INE) notifican en el “Informe de Estadísticas del Medio Ambiente 1997” que en el país, el plaguicida de mayor uso a nivel nacional es el Metil Paratión con reportes de la Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria A.C (AMIFAC), la Unión Mexicana de Fabricantes y Formuladores de Agroquímicos, SC (UMFFASC) y los Comités Estatales de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (COESPLAFEST)

En el caso específico del Metil Paratión, dicha sustancia, se utiliza como ingrediente activo presentando un porcentaje de uso del 37.47%, volumen (kg/L). (Indicadores de la situación del país. INE, 2012)

En el ámbito legislativo dicho plaguicida es de uso restringido y conforme el Diario Oficial de la Federación los límites permisibles son de 0.00003 mg/L para aguas potables y de 0.00004 mg/L para protección de vida acuática. (INE. Dirección general de normatividad. 2012)

En la tabla 3.8 se presentan los límites máximos de residuos establecidos para Metil Paratión y otros plaguicidas por diferentes instituciones:

Tabla 3.8. Límites de residuos establecidos por CICOPALFEST y FAO/OMS

| Plaguicida | LR (mg/kg ⁻¹) | LR* (mg/kg ⁻¹) |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Diazinón | 0.7 | 0.5 |
| Dimetoato | 2 | - |
| Endosulfán | 2 | 0.5 |
| Fenvalerato | 2 | 2 |
| fosfamidón | 0.5 | - |
| Malatión | 8 | 5 |
| Metamidofos | 1 | - |
| Metomilo | 3 | - |
| Metil Paratión | 1 | 0.2 |
| Endosulfán + Metil Paratión | 2+1 | - |
| Carbarilo + Endosulfán | 10+2 | - |
| Azadiractina | Exento | - |
| Carbarilo | 10 | - |

| | | |
|--|-----|---|
| Azinfos metílico | 2 | 1 |
| Permetrina | 1 | 2 |
| Lambda cialotrina | 0.4 | - |
| Naled | 1 | - |
| LR Límite de residuos (CICOPLAFEST 2005) | | |
| LR* Límite de residuos (FAO/OMS 2006) | | |

Fuente: (Pérez et-al., 2009)

3.4.3 Cantidades de Metil Paratión documentadas

En el caso de México, en sitios donde es practicada la agricultura como es el caso de Xochimilco, desde 1990 se han utilizado grandes cantidades de Metil Paratión aplicadas a los suelos agrícolas (280 mg/kg), siendo que dicho plaguicida es de uso restringido. (Chávez-López *et al* 2011)

En Estados Unidos, datos de poblados agrícolas del centro del país reportaron que concentraciones en agua llegaron hasta 0.46 µg/l. (Methyl Parathion in Drinking-water) Igualmente en dicho país, en una localidad en Mississippi, en 1988, se detectó en el agua subterránea, niveles de 88 ppm de Metil Paratión. (ATSDR. Resumen de salud pública, 2012)

3.5 BIORREMEDIACIÓN DE PLAGUICIDAS

El término biorremediación puede definirse como una tecnología de biorrestauración de ambientes naturales previamente contaminados con compuestos xenobióticos, utilizando la capacidad metabólica de los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas) y algunas plantas, para acelerar los procesos de biodegradación natural. Durante la biodegradación se produce una transformación parcial o total de los contaminantes. La transformación parcial es la obtención de un compuesto menos tóxico que el inicial, mientras que la mineralización o transformación total es la degradación hasta dióxido de carbono (procesos aerobios), agua y metano (condiciones anaerobias). (Nápoles y Abalos, 2008)

3.5.1 Compuestos xenobióticos y su degradación biológica

La contaminación es definida como la introducción de elementos, componentes o energía al ambiente a concentraciones que perjudican las funciones biológicas ó que presentan un riesgo a la población humana u otros blancos que usen o estén vinculados al medio ambiente. (Fernández-Luqueño *et al.*, 2011).

Un compuesto xenobiótico (del griego *xenos*: extraño) es aquel que no se encuentra de forma natural en el ambiente y cuando está presente afecta la ecología de éstos. La contaminación con xenobióticos rompe el equilibrio normal entre el medio físico, químico y biológico, compatible con la vida. (Nápoles y Abalos, 2008)

Entre las posibles técnicas de tratamiento aplicables para la descontaminación de un determinado espacio natural, los procesos de degradación biológica son importantes ya que son útiles para muchos tipos de residuos orgánicos; son procesos naturales que no suponen un impacto adicional sobre los ecosistemas y pueden realizarse a un bajo costo.

El tratamiento microbiológico se basa en la capacidad de diversos microorganismos, ya sean levaduras, hongos o bacterias para romper o degradar sustancias peligrosas convirtiéndolas en productos menos tóxicos o inocuos. Una vez que los contaminantes son degradados, la población microbiana decrece, al consumirse lo que constituía su fuente nutritiva.

Distintos microorganismos degradan diferentes tipos de compuestos y sobreviven en diferentes condiciones; para la degradación biológica es recomendable utilizar microorganismos endógenos del ambiente que se pretende descontaminar. Para estimular el crecimiento de estos microorganismos y forzar la degradación de los contaminantes, puede que sea necesario establecer condiciones específicas, principalmente la temperatura, oxigenación y contenido de nutrientes.

Cuando en el ecosistema no esté presente la actividad biológica que se requiere para degradar la contaminación existente, pueden incorporarse microorganismos de otra procedencia cuya eficacia haya sido probada anteriormente, microorganismos exógenos. Cuando esto sucede, hay que asegurarse de que las condiciones de este nuevo emplazamiento permitirán el desarrollo de la microflora incorporada. (Martín *et al.*, 2004)

3.5.2 Biodegradación de plaguicidas por especies fúngicas

El incremento del uso de plaguicidas y la contaminación de suelos, aguas subterráneas y superficiales por dichos contaminantes es actualmente un asunto de preocupación mundial, ya que dichos compuestos son perjudiciales a la vida silvestre y a la humanidad, ya que la toxicidad de la molécula original y sus productos degradados, hacen a estas sustancias químicas un peligro potencial. (Krishna y Philip, 2008)

El control de plaguicidas como contaminantes es de gran importancia ya que son compuestos tóxicos y recalcitrantes, pero pueden ser biodegradados por microorganismos naturales. (Fang-yao *et-al.*, 2007). Existen varias técnicas de descontaminación disponibles para la remoción de estos contaminantes, donde los microorganismos juegan un papel importante en la eliminación de compuestos xenobióticos, y pueden potencialmente degradar estos contaminantes a productos inocuos (principalmente H₂O y CO₂). El uso de

microorganismos para la biorremediación de plaguicidas contaminantes debe ser una alternativa viable como un método físico y químico limpio, ya que una amplia variedad de microorganismos son conocidos por utilizar a los plaguicidas como su única fuente energética de carbono. Algunos microorganismos han sido aislados y son capaces de degradar plaguicidas organofosforados incluyendo al Metil Paratión. (Jiang, 2007)

La descomposición biológica de plaguicidas es un camino trascendente y efectivo para la remoción de tales compuestos del ambiente. Los microorganismos tienen la habilidad de interactuar química y físicamente con sustancias llevándolas a cambios estructurales o a la completa degradación de la molécula.

Entre las comunidades microbianas, bacterias y hongos son los principales transformadores y degradadores de plaguicidas. En el caso de los hongos, generalmente biotransforman plaguicidas y otros xenobióticos introduciendo cambios estructurales menores a la molécula, cambiándola a una estructura no tóxica y liberando el plaguicida biotransformado al medio para una posterior degradación bacteriana. (Diez, 2010) (Pinto *et al.*, 2012) (Tejomye y Pravin 2009)

Comparados con otros organismos como bacterias, los hongos presentan ventajas al ser capaces de crecer en condiciones adversas tales como medios con bajo pH, bajas cantidades de nitrógeno y bajas temperaturas. (More *et al.*, 2010)

La degradación con el uso de cepas fúngicas, ocurre extracelularmente en dos pasos: primero por la acción de su sistema enzimático con el uso de hidrolasas responsables de la degradación de macromoléculas y subsecuentemente por la acción del sistema lignolítico oxidativo. Este sistema es un complejo no específico extracelular, limitado a condiciones nutritivas del ambiente, capaz de degradar compuestos lignolíticos, colorantes y diversos contaminantes ambientales que no son degradados por otros organismos.

Varias especies, han sido evaluadas por su habilidad para degradar plaguicidas; estudios sobre la degradación de plaguicidas con *Aspergillus oryzae* han demostrado que capaz de degradar monocrotofos, un plaguicida organofosforado; estudios con *Aspergillus niger* han comprobado que degrada piretoides, endosulfán, carbaril, fenitrotión y dimetoato, *Fusarium oxysporum* es capaz de degradar pendimetalina y *Aspergillus flavus* ha sido reportado para degradar metolaclor; todos estos reportes, enfatizan el enorme potencial de uso de los hongos para la bioremediación. (Diez, 2010) (Pinto *et al.*, 2012) (Tejomye y Pravin 2009)

3.6 HONGOS FILAMENTOSOS

3.6.1 Generalidades de los hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariontes, aerobios, con reproducción sexual, asexual o por esporas, ausentes de clorofila, quimioautótrofos (lo que significa que obtienen la energía que necesitan y el carbono por oxidación de compuestos orgánicos u otros compuestos de carbono complejos, de igual forma, aprovechan fuentes de nitrógeno inorgánico como sales de amonio o nitratos) y cuentan con una pared celular formada por quitina. La estructura fúngica consta de un complejo llamado talo ó micelio, que a su vez está constituido por estructuras filamentosas en forma ramificada o hifas, con un diámetro usual de 2-18 μm . (Owen, 2012)

El crecimiento de los hongos filamentosos puede ser dividido cualitativamente, presentando tres fases en la curva de crecimiento: la primera es un crecimiento no evidente, seguida de una fase de crecimiento rápido y finalmente una fase sin crecimiento neto o de autólisis y disminución de peso seco. No todas las especies presentan este esquema, algunos presentan curvas de dos fases, en la que la primera fase se presenta un crecimiento inicial seguido de una fase de síntesis de polisacáridos sin aumento de otros componentes celulares, o puede depender de una movilización de nitrógeno de las hifas más viejas para un crecimiento neto, reutilizado después de agotar fuentes exógenas de nitrógeno disponible. (Kavanagh, 2005)

Según Alexopoulos *et al.*, 1996, la temperatura influye en el crecimiento, la germinación de esporas, la reproducción y en general en todas las actividades del organismo. Pudiéndose clasificar como psicrófilicos, mesófilicos o termófilicos; los psicrófilicos tienen un mínimo de temperatura de crecimiento menor a los 0°C y una máxima menor a los 20°C; los mesófilicos que agrupan a la mayoría de las especies, tienen una temperatura mínima de 0°C, y una máxima menor a los 50°C; finalmente los termófilos presentan una mínima mayor a los 20°C y una máxima mayor a los 50°C. Generalizando para todas las especies, la temperatura en la que la mayoría crecen óptimamente tiene un rango de entre 25°C a 30°C. (Arias y Piñeros, 2008)

3.7 OBJETIVO

3.7.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de biodegradación de Metil Paratión, por cuatro especies fúngicas en cultivo líquido.

3.7.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la factibilidad de degradación del Metil Paratión en medio líquido, utilizando como inóculo por separado a las especies, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, y *Penicillium sp.*

Evaluar el porcentaje máximo de degradación en medio líquido de cada una de las especies utilizadas y seleccionar la que presente mayor remoción del plaguicida.

Determinar la cinética de degradación del Metil Paratión, utilizando como inóculo a la especie seleccionada.

3.8 HIPÓTESIS

Considerando los mecanismos de oxidación que utilizan algunos de los grupos fúngicos para la asimilación y degradación de materiales recalcitrantes como la lignina y la celulosa; se propone que por lo menos una de las cuatro cepas podrá degradar Metil Paratión en medio líquido.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MÉTODOS DE ANÁLISIS

4.1.1 Métodos de extracción líquido-líquido

La extracción del plaguicida de los medios de cultivo líquido se llevó a cabo mediante la técnica de extracción líquido-líquido. Dicho procedimiento se realizó con el siguiente orden: el contenido del tratamiento líquido se trasladó a un embudo de separación adicionando 20ml de diclorometano/acetona 1:1 grado HPLC en el matraz donde se tenía el tratamiento enjuagando paredes del matraz con el disolvente, posteriormente se vació el disolvente al embudo de separación mezclando las dos fases y dejándolas reposar hasta su completa separación; consecutivamente se extrajo la fase orgánica o hidrofóbica en un matraz bola para su posterior evaporación, mientras que la fase acuosa o hidrofílica permaneció en el embudo de separación repitiendo el procedimiento una vez más con el propósito de tener una extracción más eficiente.

4.1.2 Eficiencia de extracción líquido-sólido

Con el fin de adicionar el Metil Paratión en los tratamientos, así como para determinar la eficiencia de extracción sólido-líquido, a partir de un plaguicida de producción comercial de grado industrial al 3%, se extrajo el compuesto. Se consideró en el proceso de extracción, se establece un equilibrio entre las fases (en este caso sólida y líquida) lo cual está en función de la polaridad del disolvente. Se probaron varios disolventes para determinar cuál de estos realizaba una extracción más efectiva, considerando entre estos disolventes el acetato de etilo y el acetonitrilo reportados respectivamente por Chávez-López *et al.*, (2001) y Pino y Peñuela, (2011).

Los disolventes a evaluar fueron los siguientes:

- . 1.- Acetato de etilo
- . 2.- Diclorometano
- . 3.- Diclorometano-acetona (1:1)
- . 4.- Acetonitrilo
- . 5.- Hexano
- . 6.- Agua desionizada

* Los disolventes utilizados fueron grado HPLC (99.99% de pureza).

Para la selección del disolvente con base en la eficiencia de extracción, se estableció el siguiente procedimiento de extracción:

Se pesó un gramo de Metil Paratión (grado industrial con 3% de plaguicida) para cada ensayo de extracción, colocando el plaguicida en un tubo de plástico y adicionándole 10 ml del disolvente a evaluar, después se agitó con la ayuda de vórtex por 5 min y se centrifugó a 6000rpm por 5 minutos; la mezcla se separó en una fase sólida y en otra líquida vaciando únicamente la parte líquida en un matraz bola, evaporando y concentrando como se describe en el punto 3.2.1 pero recuperando el concentrado con su mismo disolvente para su posterior análisis por cromatografía de gases.

Los resultados de los ensayos realizados se presentan en el Anexo A, donde se observa que el hexano fue el disolvente con el que se logró la máxima eficiencia de extracción de Metil Paratión, además de presentar una mayor selectividad sobre el analito de interés, es decir una mayor pureza del producto.

4.2 ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE PLAGUICIDA

4.2.1 Evaporación y concentración del plaguicida

Los extractos obtenidos en la fase orgánica contenida en el matraz bola, fueron evaporados casi a sequedad en rota evaporador a 50°C, aplicando un vacío de 150 mmHg, posteriormente se recuperó con 2ml de hexano grado HPLC.

4.2.2 Cromatografía de Gases

Las muestras con extractos orgánicos evaporadas y concentradas fueron analizadas en el cromatógrafo de gases GC-MS Thermoscientific modelo Trace GC Ultra acoplado a un espectrómetro de masas DSQII, utilizando una columna MS-5, programando las siguientes condiciones de temperatura en el horno: temperatura inicial 80 °C por 1min, 15°C/min hasta 165 °C, 10°C/min hasta 270 °C manteniendo esta temperatura por 1min, se utilizó como gas acarreador He, a un flujo 0.9 ml/min, inyector a una temperatura de 250°C en modo Split 40 ml/min.

Para estimar el remanente de plaguicida en las muestras se obtuvo el área bajo la curva del pico del Metil Paratión, la cual se correlacionó directamente con la máxima concentración del extracto en el tratamiento a tiempo cero.

4.2.3 Extracto patrón de Metil Paratión

Para adicionar el plaguicida a los tratamientos, se preparó una disolución patrón de Metil Paratión siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.1.2 el cual se recuperó a un

volumen determinado que permitió adicionar en cada tratamiento cantidades mínimas de la disolución del plaguicida.

4.3 DESARROLLO Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

4.3.1 Crecimiento microbiano

El material utilizado en los ensayos de biodegradación fue esterilizado en autoclave, en tanto que los lugares donde se manejaron medios de cultivo y microorganismos fueron desinfectados con Antibenzil concentrado solución, cloruro de benzalconio 1.0g, nitrito de sodio 0.5g vehículo C.B.P100ml. Solución acuosa color rojo.

4.3.2 Inóculo

Para llevar a cabo los ensayos de biodegradación con el objetivo de observar la posible remoción de Metil Paratión en medio líquido, se dispuso de cuatro especies fúngicas de la División del Reino Fungi: División Ascomicota, las cuales fueron utilizadas como inóculo por separado, las cepas utilizadas se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Clasificación de las cepas fúngicas utilizadas en los ensayos.

| Espece | Género | Orden | División |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|------------|
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | <i>Cladosporium</i> | Capnodiales | Ascomicota |
| <i>Penicillium pinophilum</i> | <i>Penicillium</i> | Eurotiales | Ascomicota |
| <i>Aspergillus niger</i> | <i>Aspergillus</i> | Eurotiales | Ascomicota |
| <i>Penicillium sp.</i> | <i>Penicillium</i> | Eurotiales | Ascomicota |

Fuente: (Herrera y Ulloa, 2005)

4.3.3 Crecimiento microbiano en cultivo sólido (placa)

El medio de cultivo sólido (placa) que se utilizó para hacer las resiembras y mantener el inóculo viable fue papa-dextrosa-agar (PDA) preparado acorde con las instrucciones de manufactura (Sigma). Vaciando 20 ml del medio en estado líquido a cada caja Petri, dejando enfriar las cajas con el medio por 30 min. La especie a evaluar fue sembrada en ambiente estéril; cada especie se dejó en crecimiento por tres días en incubadora a una temperatura constante de 28°C, para un subsecuente crecimiento en medio líquido.

4.3.4 Crecimiento microbiano en medio líquido

Posteriormente del crecimiento en placa, se hizo crecer biomasa en medio líquido con el propósito de contar con el inóculo viable en alta concentración en el medio. El medio líquido contenía para un volumen de 1Litro, glucosa 10 g, polipeptona 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, MgSO_4 0.235 g, KH_2PO_4 0.875 g, K_2HPO_4 0.125 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, NaCl 0.1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g, 1000ml de agua desionizada. (esterilizado en autoclave a 121°C-20 min). A 200 ml del medio esterilizado y a temperatura ambiente fueron inoculados con 10 alícuotas cilíndricas del cultivo sólido con la especie sembrada anteriormente en estado latente (hechas con la ayuda de un sacabocados de 0.5cm diámetro) con el fin de crecer biomasa en este medio. El medio líquido permaneció en incubación a una temperatura de 28°C con agitación continua a rotación a 100rpm. Después de tres días, la biomasa fue colectada con la ayuda de un embudo Buchner unido a un matraz Kitasato, para eliminar el exceso del medio líquido y colectar los pellets de la biomasa; de ésta finalmente se tomaron 5 ml para inocular los tratamientos.

4.4 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD FÚNGICA

4.4.1 Medio líquido

Para llevar-a cabo los ensayos de biodegradación de Metil Paratión en medio líquido se utilizaron matraces de 250 ml con 50 ml de medio líquido Wunder modificado, (40 % menos de glucosa), a los cuales se adicionó el Metil Paratión dejando evaporar el Hexano y adicionando 5 ml del inóculo preparado como se refiere en el punto 4.3.4.

El medio líquido Wunder modificado contenía: glucosa 6 g, polipeptona 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, MgSO_4 0.235 g, KH_2PO_4 0.875 g, K_2HPO_4 0.125 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, NaCl 0.1 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g, para 1000ml de agua desionizada. (Esterilizado en autoclave a 121°C-20 min).

4.4.2 Determinación de pH

Para medir el pH en el medio de cultivo líquido se utilizó un potenciómetro marca BOECO, modelo BT-600

4.4.3 Azúcares Reductores

Los ensayos realizados fueron adaptados del método original, (Miller 1959) se utilizó 1gr de 3'-5'-dinitrosalicílico, DNS (ácido dinitrosalicílico), 43.8grs de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartrato de sodio y potasio) y 1.6grs de NaOH en constante agitación y 100ml de agua desionizada; conservando el siguiente orden: a 50ml de agua desionizada en rotación, se le agregaron 1.6grs de NaOH; posteriormente se le adicionaron 43.8grs de tartrato de sodio y potasio hasta su completa disolución; el recipiente se cubrió con papel aluminio para evitar la luz y se le agregó 1gr del reactivo DNS; finalmente se completó el volumen con 50 ml y se dejó en agitación toda la noche. Se realizó una curva de calibración como estándar a concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1mg/ml de dextrosa en agua desionizada.

La metodología para leer las muestras fue la siguiente, a 250 μl de muestra, se le adicionaron 250 μl del reactivo (DNS); se sumergió en baño María a punto de ebullición por 5 minutos; pasado este tiempo rápidamente se sumergió en hielo y se le adicionaron 2.5ml de agua desionizada. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro (UV VIS Perkin Elmer *Lambda* 25) a 540nm.

4.4.4 Biomasa

Para el cálculo de la biomasa adicionada inicialmente, se pesó el total de ml agregados con el uso de la termobalanza determinando la relación de los miligramos registrados en la termobalanza y el porcentaje de humedad determinada para así obtener el resultado del peso seco total de la biomasa adicionada. Posteriormente, para la determinación de biomasa seca, cada día de tratamiento se filtró ésta con la ayuda de un embudo Buchner conteniendo en la base un papel filtro de aproximadamente 4.5 cm de diámetro a peso constante; el embudo fue unido a un matraz Kitasato para la filtración de la biomasa con la ayuda de una bomba de vacío. Posteriormente filtrada y recolectada la biomasa en el papel filtro, se secó en la estufa para laboratorio (BINDER modelo FD53UL) a una temperatura de 120°C durante 60 minutos, finalmente el papel filtro junto con la biomasa secos, se pesaron en la balanza para determinar el peso seco de la biomasa.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 SELECCIÓN DEL HONGO

Con el propósito de determinar la factibilidad de biodegradación del Metil Paratión en medio líquido por alguno de los cultivos fúngicos señalados en el punto 4.3.2 se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Para cada uno de los cuatro inóculos señalados en el punto 4.3.2, se montaron de manera individual series de sistemas de cultivo líquido en matraces Erlenmeyer de 250ml por triplicado para cada uno de los tiempos establecidos, como se describe en el punto 4.4.1, estos fueron adicionados con Metil Paratión para tener una concentración de 50mg/l en el medio líquido. Asimismo, cada una de las series fue adicionada de manera individual con el respectivo inóculo de acuerdo con lo señalado en el punto 4.4.1.

De acuerdo con lo señalado por Jie Liu *et al.*, (2006) y Jiandong Jiang *et al.*, (2007), es posible biodegradar Metil Paratión en medio líquido a 50 mg/L, por organismos bacterianos. Concentración que es considerada por arriba de los parámetros permisibles, de acuerdo con lo establecido por el Diario Oficial de la Federación del 2 de diciembre de 1989, ya que según los criterios ecológicos en calidad de agua los niveles máximos de dicho plaguicida deben ser de: 0.00003 mg/L para una fuente de abastecimiento de agua potable y 0.00004 mg/L para protección de la vida acuática. (Indicadores de la situación del país. INE, 2012)

Paralelamente y de manera similar al procedimiento señalado se montó una serie de sistemas de cultivo líquido a la cual no se adicionó inóculo, pero adicionando el plaguicida a igual concentración el cual se utilizó como control abiótico.

Todos los sistemas fueron incubados a 28°C y 100rpm, se llevó a cabo la toma de muestras por triplicado, retirando tres sistemas (matraces) de cada serie a los tiempos 0, 5 y 8 días. Realizando en cada uno de ellos, el procedimiento de extracción líquido-líquido como se describe en el punto 4.1.1, y analizando los extractos por cromatografía de gases como se describe en la sección 4.2.

Los resultados obtenidos en este ensayo permitieron seleccionar *Aspergillus niger* como la especie con mayor eficacia para remover el Metil Paratión del medio de cultivo líquido.

5.2 CINÉTICA DE BIODEGRADACIÓN DE METIL PARATIÓN

Una vez seleccionada la especie fúngica capaz de remover el Metil Paratión del medio de cultivo líquido, se llevó a cabo el ensayo de biodegradación con el propósito de evaluar la cinética de remoción del plaguicida y dar seguimiento a otros parámetros para dilucidar los posibles mecanismos de transformación o asimilación del plaguicida.

Las series de tratamientos que se establecieron para este ensayo de acuerdo con lo señalado en el punto 3.3 fueron los siguientes:

- . Serie de Control abiótico: sistema de matraces con un volumen de 50ml de Medio Wunder, sin inóculo, con el cual se evaluó la remoción abiótica
- . Serie de Control biótico: sistema de matraces con un volumen de 50ml de Medio Wunder con inóculo, sin plaguicida, con el cual se evaluó la cinética de crecimiento del cultivo fúngico
- . Serie para evaluar la Cinética de remoción: sistema de matraces con un volumen de 50ml de Medio Wunder con una concentración de 50ppm del plaguicida y con inóculo.

Todos los sistemas fueron incubados a 28°C y 100rpm, se llevó a cabo la toma de muestras por triplicado, retirando tres sistemas (matraces) de cada serie a los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9 días; realizando en cada uno de ellos el procedimiento de extracción líquido-líquido como se describe en el punto 4.1.1, posteriormente se evaluaron los siguientes parámetros: pH, azúcares reductores, biomasa de acuerdo con los procedimientos señalados en el punto 4.4 y posteriormente se analizaron los extractos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como se describe en la sección 4.2.

6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA BIODEGRADACIÓN DE METIL PARATIÓN POR LAS CUATRO ESPECIES FÚNGICAS

De acuerdo con el diseño experimental señalado en el punto 4.4, se llevó a cabo el ensayo para seleccionar el cultivo fúngico capaz de remover el mayor porcentaje del plaguicida Metil Paratión en medio líquido. Los resultados de la cinética de biodegradación para las diferentes especies evaluadas se muestran a continuación.

6.1.1 Cromatograma de extracción de Metil Paratión

En la figura 6.1 se presenta el cromatograma de extracción de una muestra de Metil Paratión, dicho compuesto presenta un tiempo de retención de 12.12.

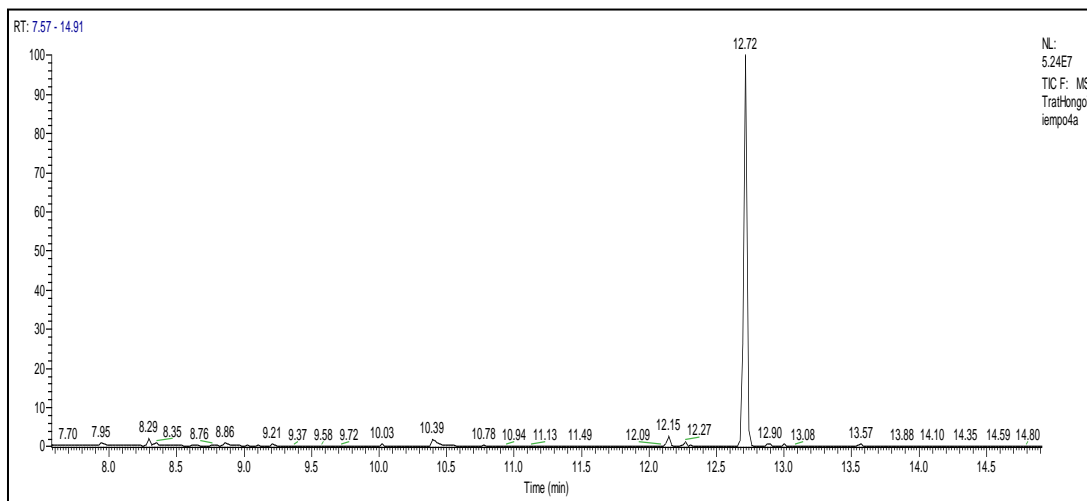


Figura 6.1. Cromatograma de la extracción de un estándar de Metil Paratión que muestra el pico correspondiente al Tiempo de retención 12. 12

6.1.2 Resultados de la cinética de remoción de MP por la especie *Cladosporium cladosporioides*

Como representación de la degradación del plaguicida en medio líquido, en la figura 6.2 se presenta el porcentaje de remoción de Metil Paratión con respecto al tiempo. Para dicho ensayo, se utilizó como inóculo a la especie *Cladosporium cladosporioides*, observando que al término del tratamiento se obtuvo una remoción del 76.87 %.

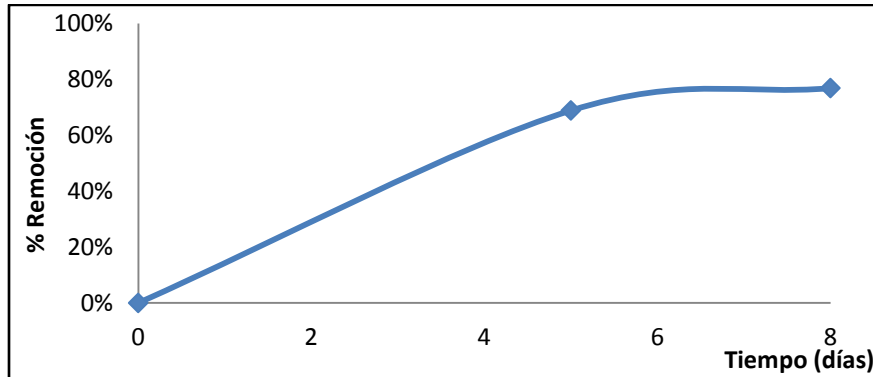


Figura 6.2. Porcentaje de remoción de MP usando como inóculo a la especie *Cladosporium cladosporioides* a los tiempos 0, 5 y 8 (días), teniendo un porcentaje de remoción del 76.87% al tiempo 8.

6.1.3 Resultados de la cinética de remoción de MP por la especie *Penicillium pinophilum*

En la figura 6.3 se puede observar la degradación del plaguicida Metil Paratión utilizando como inóculo a la especie *Penicillium pinophilum*, la cual presentó un porcentaje de degradación del 16% al término del tratamiento.

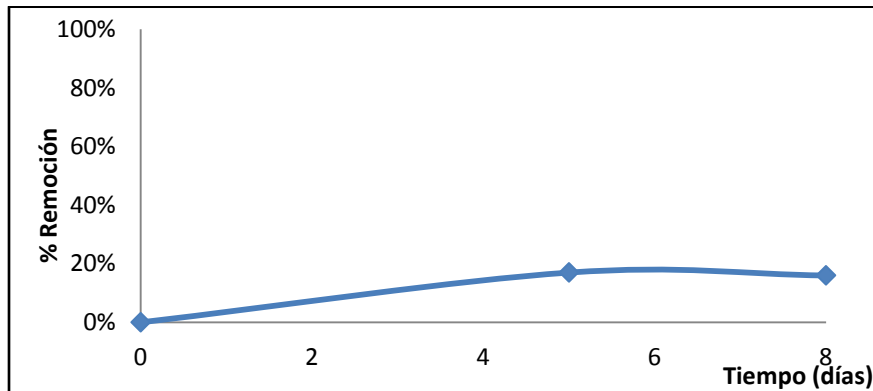


Figura 6.3. Porcentaje de remoción de MP usando como inóculo a la especie *Penicillium pinophilum* a los tiempos 0, 5 y 8 (días), mostrando un porcentaje de remoción del 16% a día 8.

6.1.4 Resultados de la cinética de remoción de MP por la especie *Aspergillus niger*

Se presenta en la figura 6.4, la degradación del plaguicida Metil Paratión en medio líquido, utilizando como inóculo la especie *Aspergillus niger*, para este ensayo el porcentaje de degradación después de 8 días de tratamiento fue del 97%.

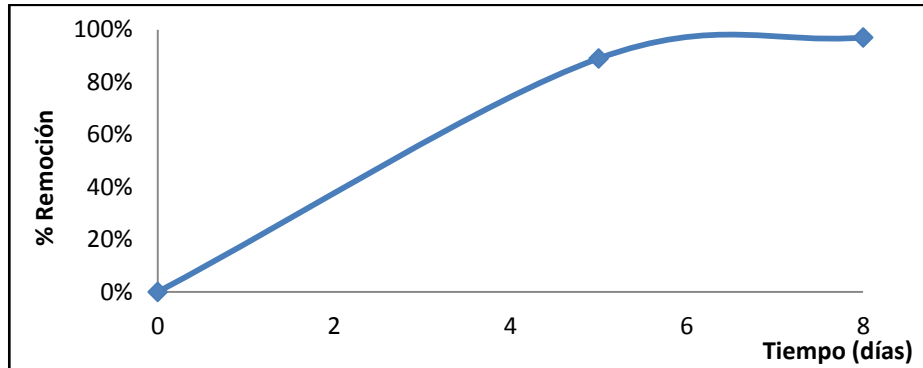


Figura 6.4. Porcentaje de remoción de MP usando como inóculo a la especie *Aspergillus niger* a los tiempos 0, 5 y 8 (días), con un porcentaje de remoción del 97% al día 8 de tratamiento.

6.1.5 Resultados de la cinética de remoción de MP por la especie *Penicillium sp.*

Finalmente en la figura 6.5 se observa la degradación del plaguicida en medio líquido utilizando como inóculo a la especie *Penicillium sp.*, presentando 8% de remoción al término del tratamiento.

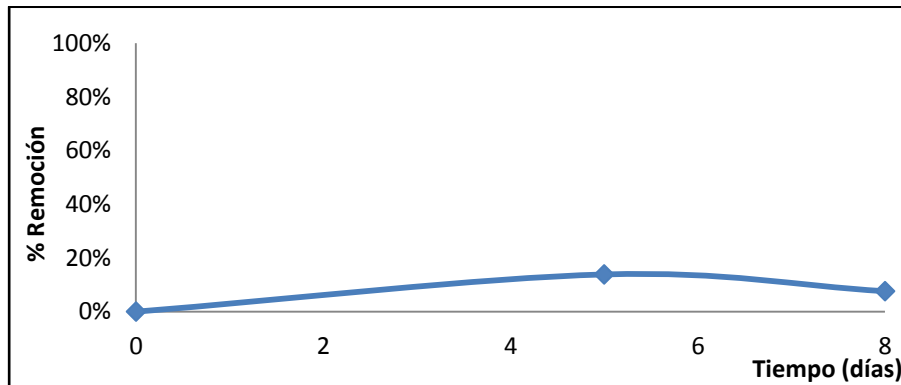


Figura 6.5. Porcentaje de remoción de MP usando como inóculo a la especie *Penicillium sp.* a los tiempos 0, 5 y 8 (días), teniendo un porcentaje de remoción del 8% al día 8 de tratamiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos con las diferentes especies, se seleccionó *Aspergillus niger* para continuar con los ensayos de cinética de degradación, ya que ésta presentó el mayor porcentaje de remoción del plaguicida, siendo del 97 % a los 8 días de tratamiento.

6.1.6 Análisis y discusión de resultados de la cinética de remoción de MP por *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, y *Penicillium sp.*

En las figuras 6.2 a 6.5 se observan los resultados de los ensayos de degradación de Metil Paratión en medio líquido con una concentración inicial de 50ppm usando como inóculo independiente a cada una de las cuatro especies *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium pinophilum*, *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.* Los resultados indicados en las figuras mencionadas se resumen en la tabla 6.1 mostrando los porcentajes de remoción correspondientes.

Tabla 6.1. Porcentaje de remoción de Paratión Metílico, por 4 especies fungicas.

| | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | <i>Penicillium pinophilum</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Penicillium sp</i> |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Tiempo (días) | % remoción | % remoción | % remoción | % remoción |
| 0 | 0 % | 0 % | 0 % | 0 % |
| 5 | 69 % | 17 % | 89% | 14 % |
| 8 | 77 % | 16 % | 97 % | 8 % |

Los resultados presentados en la tabla 6.1 permiten observar que:

- Penicillium pinophilum* y *Penicillium sp* a los 8 días de tratamiento presentan una remoción promedio en cultivo líquido de Metil Paratión de 16 y 8 % respectivamente, que en relación con los otros dos sistemas se podría considerarse como una baja remoción del plaguicida.
- Cladosporium cladosporioides* logra remover después de 8 días de tratamiento 77% del plaguicida inicial en cultivo líquido.
- Aspergillus niger* logra remover después de 8 días de tratamiento en cultivo líquido el 97 % del MP en una concentración inicial de 50 mg/l, sin embargo, la razón por cual se escogió esta especie para llevar a cabo la cinética de degradación, sobre *Cladosporium cladosporioides*, fue que desde el quinto día de tratamiento *Aspergillus niger* presento una remoción del 89% la cual fue superior a la presentada por las otras especies.

6.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA BIODEGRADACIÓN DE METIL PARATIÓN UTILIZANDO A LA ESPECIE *Aspergillus niger*

6.2.1 Resultados de la cinética de remanente y remoción de Metil Paratión

De acuerdo con el diseño experimental señalado en el punto 4.4, se llevó a cabo el ensayo de biodegradación de Metil Paratión con la especie *Aspergillus niger*, conforme se indicó en el capítulo anterior.

Cabe puntualizar que durante el ensayo, se observó un crecimiento fúngico en forma de pelets; por lo cual para llevar a cabo la extracción del plaguicida, los pelets fueron retirados del cultivo líquido realizando la extracción como se describe en el punto 4.1.1 en seguida el plaguicida en los pelets fue extraído de manera similar. Posteriormente se llevó a cabo el análisis y la cuantificación del plaguicida como se describe en la sección 4.2.

En la figura 6.6 se presenta el porcentaje remanente de Metil Paratión en las extracciones realizadas en el cultivo líquido y en los pelets, así como la suma del remanente de los dos estados denominado como porcentaje remanente total. En la misma figura se presenta el porcentaje remanente en el sistema experimental del control abiótico.

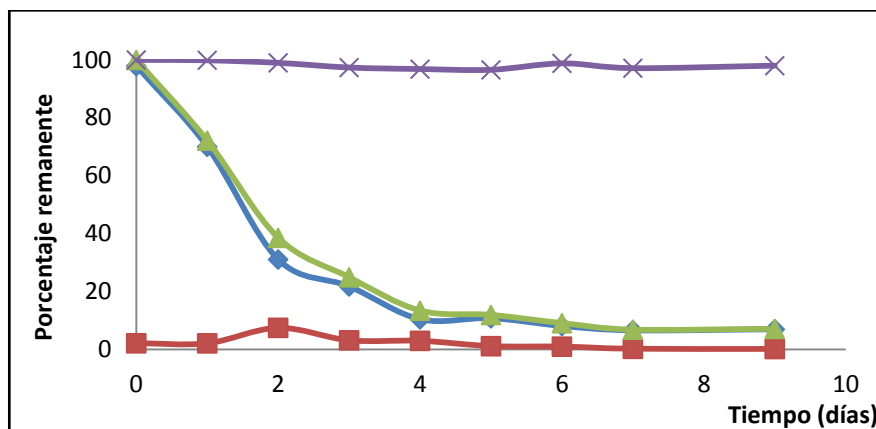


Figura 6.6. Porcentaje remanente de MP, en la extracción del: ♦Cultivo líquido ■Pelet ▲Remanente total y ✕Control abiótico durante el ensayo de biorremediación utilizando como inóculo a la especie *Aspergillus niger*.

A partir del porcentaje remanente de Metil Paratión, en la figura 6.7 se presenta el porcentaje de remoción de Metil Paratión en el cultivo líquido, en los pelets y el porcentaje remanente total, durante el ensayo de biorremediación utilizando como inóculo a la especie *Aspergillus niger*, así como para el ensayo de control abiótico.

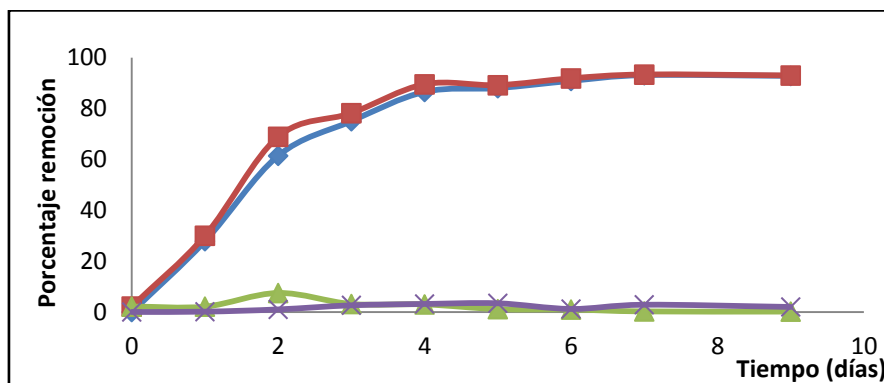


Figura 6.7 Porcentaje de remoción de MP en la extracción del: ♦Cultivo líquido ▲ Pelet ■ Remanente total y ✕Control abiótico durante el ensayo de biorremediación utilizando como inóculo a la especie *Aspergillus niger*.

6.2.2 Análisis y discusión de resultados del remanente y remoción de Metil Paratión

Analizando el estudio cinético de Metil Paratión remanente y el estudio cinético de remoción del plaguicida de los diferentes ensayos realizados, referidos respectivamente en las figura 6.6 y 6.7 podemos observar que, debido a algún proceso fisicoquímico se remueve un porcentaje promedio del 2.06% del Metil Paratión, lo anterior con base en lo que se observa en el ensayo señalado como control abiótico.

En la tabla 6.3 se indican los porcentajes correspondientes del plaguicida remanente en: el cultivo líquido, en los pellets, la remoción total; así como el remanente del plaguicida en el control abiótico.

Tabla 6.3. Porcentaje remanente ó remoción (según el caso) de Metil Paratión conforme los estados analizados incluyendo el control abiótico y los días transcurridos.

| Tiempo (días) | Remanente Cultivo líquido (%) | Adsorción en biomasa (%) | Remanente total (%) | Remoción total (%) | Remanente Control abiótico (%) |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------|
| 0 | 97.85 | 2.15 | 100.00 | 0.00 | 100.00 |
| 1 | 70.00 | 2.13 | 72.12 | 27.88 | 99.87 |
| 2 | 31.07 | 7.47 | 38.54 | 61.46 | 98.98 |
| 3 | 21.77 | 3.15 | 24.92 | 75.08 | 97.34 |
| 4 | 10.42 | 2.99 | 13.42 | 86.58 | 96.81 |
| 5 | 10.78 | 1.14 | 11.92 | 88.08 | 96.55 |
| 6 | 8.10 | 0.98 | 9.08 | 90.92 | 98.80 |
| 7 | 6.59 | 0.24 | 6.83 | 93.17 | 97.12 |
| 9 | 6.95 | 0.17 | 7.12 | 92.88 | 98.00 |

En las figuras 6.6 y 6.7 así como en los datos de la tabla 6.3 se observa que a los 2 días de tratamiento la remoción total del plaguicida fue del 61.46%, presentando una remoción del 33.58% entre los días 1 y 2. Aunado a lo anterior, se observa que en los pelets la adsorción de plaguicida presenta un máximo de 7.47% a los 2 días de tratamiento. En cuanto a la remoción total del plaguicida, se observa que al séptimo día de tratamiento, se obtuvo la máxima remoción del 93 %.

6.2.3 Otros compuestos detectados

Durante el análisis de los extractos en el cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas, se lograron detectar además del Metil Paratión, tres compuestos que de acuerdo con lo reportado en la bibliografía podrían estar presentes durante la biodegradación del plaguicida, los cuales son: metoxi 4-nitrofenol (4-Nitroanisol) Dimetil 4-nitrofenil éster (metil paraoxón) y 4-Nitrofenol (p-nitrofenol); con tiempos de retención de 8.81, 10.41 y 12.15 minutos respectivamente.

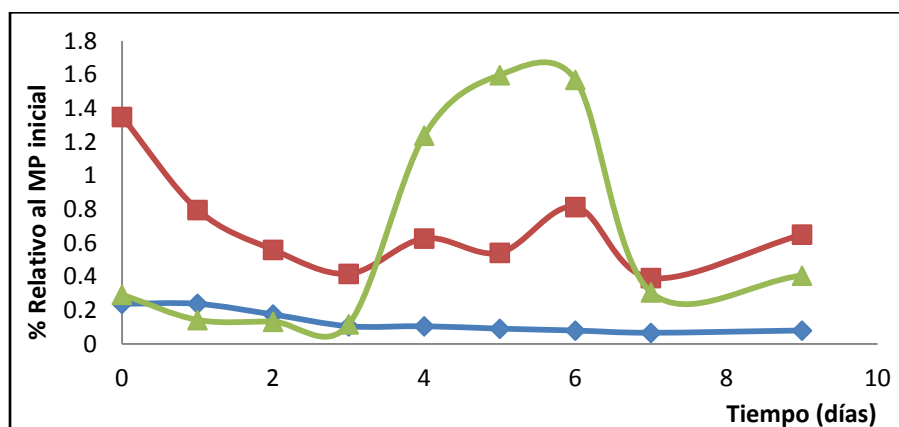
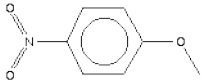
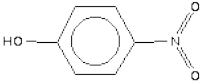
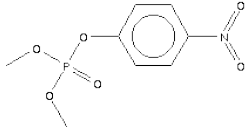


Figura 6.8. Analitos monitoreados durante la biodegradación de MP. ◆ Metoxi 4-nitrofenol (4-Nitroanisol) ■4-Nitrofenol ▲ Dimetil 4-nitrofenil éster (metil paraoxón).

La cinética de transformación de los compuestos señalados anteriormente se ilustra en la figura 6.8 y en la tabla 6.2 se muestran las estructuras correspondientes.

Tabla 6.2. Analitos detectados; tiempo de retención (RT), fórmula química y estructura química.

| Compuesto | Tiempo de retención RT | Fórmula química | Estructura |
|----------------|------------------------|--|---|
| 4-Nitroanisol | 8.81 | C ₇ H ₇ NO ₃ |  |
| p-nitrofenol | 10.41 | C ₆ H ₅ NO ₃ |  |
| Metil paraoxón | 12.15 | C ₈ H ₁₀ NO ₆ P |  |

Se observó en el análisis de los cromatogramas la presencia de los siguientes compuestos: metoxi 4-nitrofenol, metil paraoxón y p-nitrofenol, de los cuales metil paraoxón y p-nitrofenol aparecen en las rutas metabólicas propuestas para la degradación del Paratión, por la acción microbiana señaladas en la figura 6.12

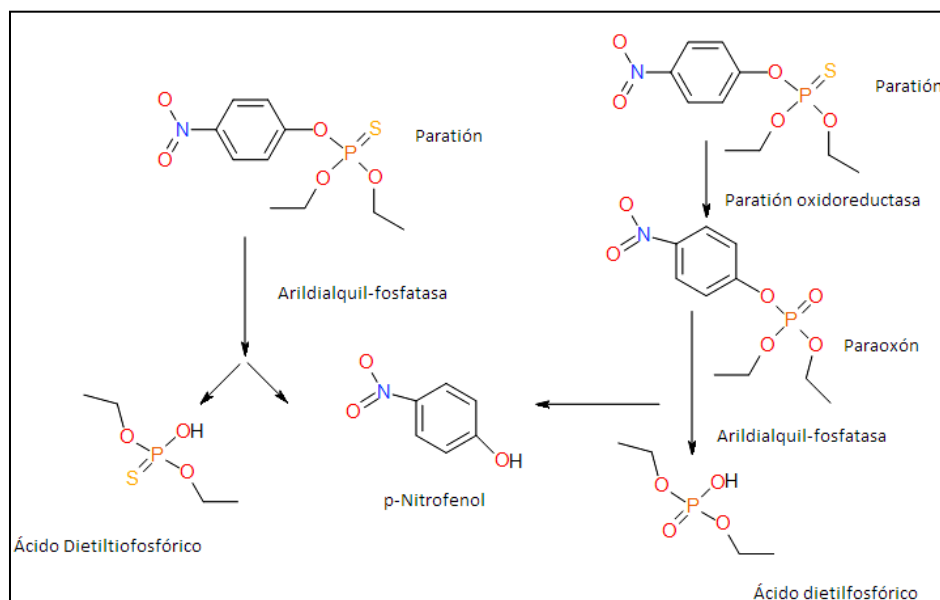


Figura 6.12 Ruta metabólica aerobia de Paratión, con las enzimas involucradas y los productos metabólicos producidos. (Adaptada de: Universidad de Minnesota Biotáctilisis/Biodegradación.

En la figura 6.12 se presentan las dos vías metabólicas para la degradación del Paratión reportadas en la página web de la Universidad de Minnesota (Munnecke y Hsieh, 1976); la ruta de la izquierda propone una hidrólisis inicial del Paratión a p-nitrofenol y ácido dietiltiofosfórico para la degradación del plaguicida con *Flavobacterium* sp. y *Brevundimonas diminuta*; la ruta de la derecha sucede para un cultivo mixto donde se propone la oxidación del Paratión transformándose a paraoxón y posteriormente a nitrofenol; tal como lo han reportado (Barr y Larry, 2002) (Chávez-López *et al.*, 2011) (Sandip *et al.*, 2010) y (Rasul *et al.*, 1988) para la degradación del Paratión por microorganismos bacterianos.

De los metabolitos detectados, es importante observar el cambio del metil paraoxón en la figura 6.8, se observa que al tercer día de tratamiento la cantidad del compuesto se incrementa y después del sexto día comienza a disminuir. Esto concuerda con los niveles de remoción del plaguicida, ya que al tercer día de tratamiento se observa el 61.46% de remoción total. Por lo que se sugiere podría ser evidencia de que el proceso de remoción del plaguicida se lleva a cabo por acción metabólica *Aspergillus niger* sugiriendo como vía un proceso oxidativo.

En adición a estas rutas, aislados bacterianos son capaces de utilizar el nitrito liberado del p-nitrofenol como fuente de nitrógeno, otras cepas bacterianas utilizan dimetil fosforotioato y dimetil fosforoditioato y sus derivados como fuente de fósforo. (Karpouzias y Singh, 2006)

6.2.4 Seguimiento de pH

Como un parámetro de seguimiento de la actividad metabólica durante el tratamiento se llevó a cabo la medición de pH, en la figura 6.9 se ilustran los registros de los tratamientos: crecimiento fúngico con plaguicida, crecimiento fúngico sin plaguicida y control abiótico.

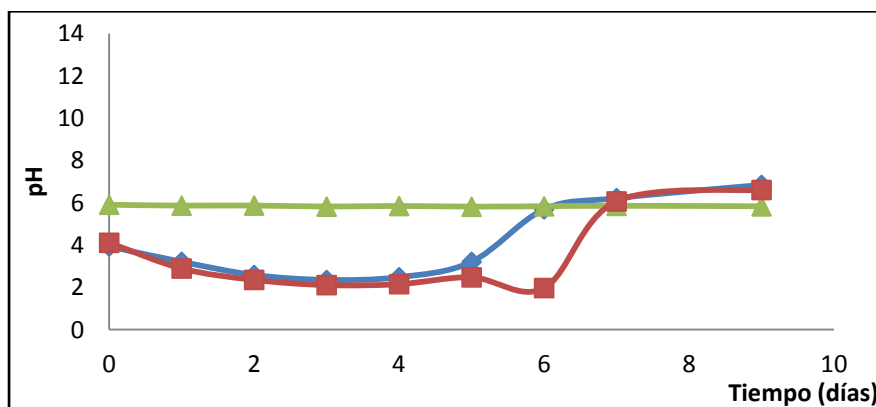


Figura 6.9. Medición de pH durante la cinética de biodegradación de MP utilizando a la especie *Aspergillus niger*, en los sistemas: ♦Crecimiento fúngico con plaguicida ■Crecimiento fúngico sin plaguicida ▲Control abiótico.

En la figura 6.9 se observa que en los tratamientos con plaguicida y sin plaguicida hay un decremento inicial, debido posiblemente a la formación de ácidos carboxílicos o a la actividad enzimática, en tal caso el decremento es mayor para el ensayo con plaguicida, debido posiblemente a la presencia de mayores compuestos oxidados. Los cambios detectados en el pH como indicadores de la actividad fúngica, nos indican la posible formación de ácidos carboxílicos producidos por el hongo como resultado de su metabolismo.

6.2.5 Azúcares Reductores

Otro parámetro para el seguimiento de la actividad biológica son los niveles de azúcares reductores. En la figura 6.10 se presentan los valores detectados durante la cinética de biodegradación determinados por espectrofotometría, lo cual permitió obtener la concentración en gramos/litro presentes en los distintos tratamientos crecimiento fúngico con plaguicida y crecimiento fúngico sin plaguicida.

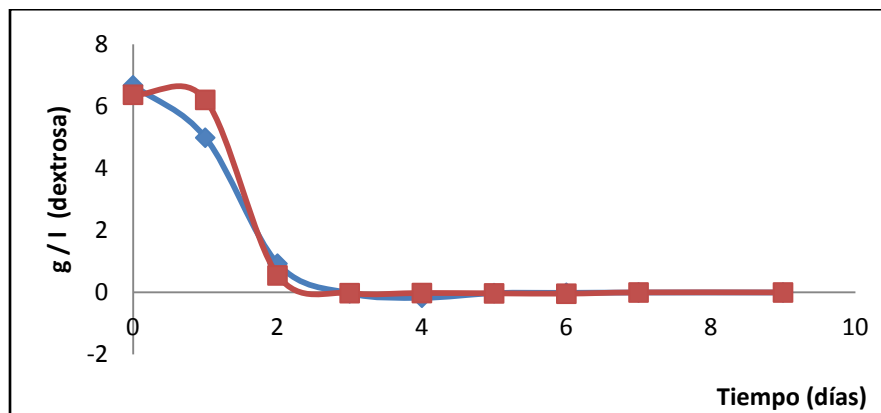


Figura 6.10. Detección de azúcares reductores por colorimetría en la cinética de biodegradación con la especie *Aspergillus niger*, mostrando las series de tratamiento que se realizaron: ♦Crecimiento fúngico con plaguicida ■Crecimiento fúngico sin plaguicida.

En cuanto a los azúcares reductores más que indicadores de la actividad biológica, se observan como una expresión de la actividad enzimática del organismo, ya que nos proporciona información sobre las reacciones enzimáticas, que pueden actuar como agentes reductores ya que su grupo aldehído presente puede ser oxidado para formar un ácido carboxílico, ó en presencia de una base formar un ion carboxilato. (Deng y Tabatabai, 2004) En ambos sistemas el consumo total de dextrosa adicionada a los tratamientos se observó al segundo día.

6.2.6 Biomasa

En la figura 6.11 se presenta el peso seco en miligramos de la biomasa fúngica producida durante la cinética de biodegradación, en los tratamientos: crecimiento fúngico con plaguicida y crecimiento fúngico sin plaguicida.

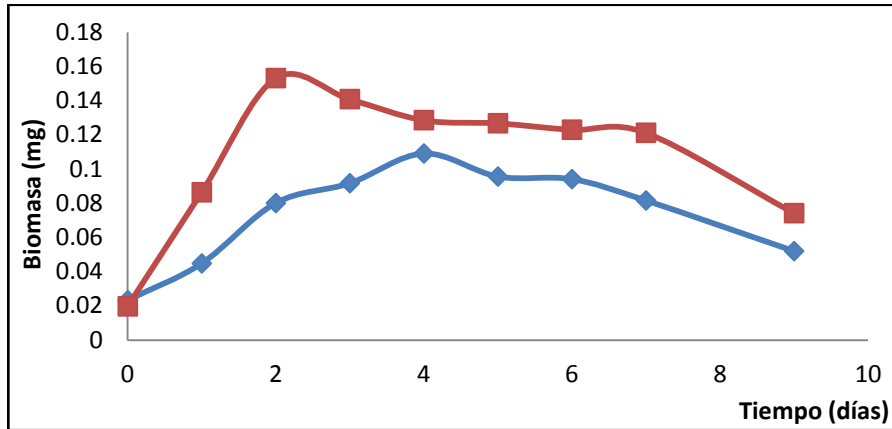


Figura 6.11. Crecimiento de biomasa en la cinética de biodegradación, mostrando las series de tratamiento: ♦Crecimiento fúngico con plaguicida ■Crecimiento fúngico sin plaguicida.

En cuanto a la biomasa se observa que sin el plaguicida el crecimiento de biomasa es mayor que en presencia del plaguicida, el máximo crecimiento en el sistema sin contaminante se presenta al segundo día de tratamiento, mientras que en el segundo caso se presenta al cuarto día.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de las cinéticas de degradación con las diferentes especies fúngicas a evaluar, se seleccionó *Aspergillus niger* como la especie que presentó un mayor porcentaje de remoción del plaguicida, en comparación con las otras.

Aspergillus niger fue capaz de degradar hasta un 93.0 % el plaguicida organofosforado Metil Paratión en un medio líquido, concentraciones de hasta 50 ppm después de siete días de tratamiento, esta concentración es superior a los límites máximos permisibles en agua potable y cuerpos de agua.

Considerando que es mínima la remoción del plaguicida Metil Paratión observado en el control abiótico atribuida a fenómenos físico-químicos; la remoción total que se observa en el ensayo líquido es atribuible a procesos biológicos de la especie *Aspergillus niger*.

A partir de los cambios que se detectaron en la medición de pH y azúcares reductores; así como a la formación de los metabolitos metoxi 4-nitrofenol, metil paraoxón y p-nitrofenol referidos en la bibliografía, es posible señalar que la biodegradación del plaguicida Metil Paratión se llevó a cabo por procesos oxidativos de *Aspergillus niger*.

7.2 RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta que el Metil Paratión es uno de los plaguicidas organofosforado que más se utiliza en el México, es probable que existan varios sitios contaminados con este plaguicida, por lo que resulta de mucho interés poder aplicar un método biológico para la degradación de este contaminante.

Aspergillus niger es factible de ser utilizado en el tratamiento de aguas contaminadas con Metil Paratión debido a los altos porcentajes de degradación de dicho plaguicida obtenidos en este proyecto de investigación.

Anexo A

Resultados de la extracción para la concentración del MP

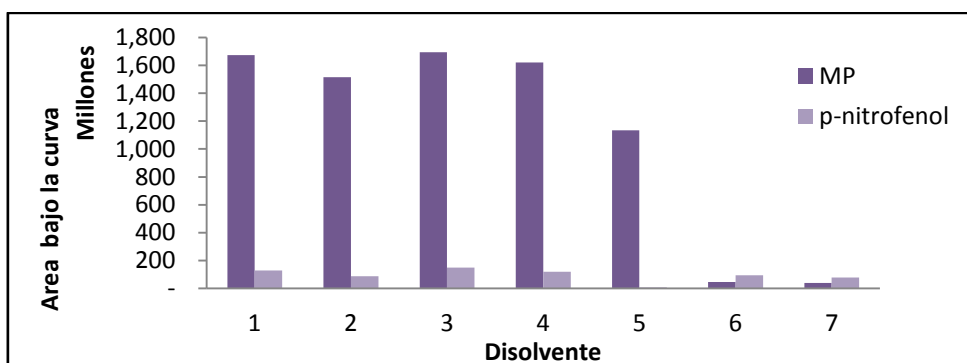


Figura a. Disolventes evaluados para la extracción efectiva del Paratión metílico 1. Acetato de etilo 2. Diclorometano 3. Diclorometano:acetona 4. Acetonitrilo 5. Hexano 6. Agua desionizado 7. Agua desionizada

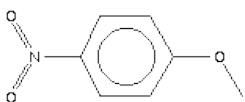
Anexo B

La Cromatografía de Gases acoplada al Espectrómetro de Masas (GC/MS), es un método particularmente valioso, para confirmar residuos de plaguicidas en muestras ambientales; Mestres *et al.*, (1977) (Programa Internacional en Seguridad Química. Criterio de salud ambiental 145. Paratión metílico) y Wilkins, (1990).

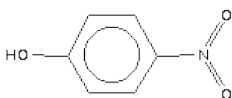
Para la ilustración de las moléculas se utilizó como software Simyx Draw 3.2

Analitos encontrados

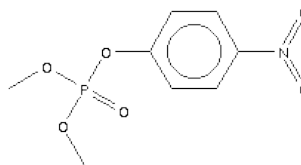
Nombre químico: 4-Nitroanisol
Sinónimos: 1-metoxi-4-nitrobenceno
Fórmula química: $C_7H_7NO_3$
Número CAS: 100-17-4



Nombre químico: 4-Nitrofenol
Sinónimos: p-nitrofenol
Fórmula química: $C_6H_5NO_3$
Número CAS: 100-02-7



Nombre químico: Dimetil 4-nitrofenil éster
Nombre alternativo: Metil Paraoxón, Ácido fosfórico
Fórmula química: $C_8H_{10}NO_6P$
Número CAS: 950-35-6



(Columbia Analytical Services. 2012)

8. BIBLIOGRAFIA

- Alexopolus, C., Mims C., Blackwell, M. 1996. Introductory mycology. Cuarta Edición. John Wiley & Sons. New York.
- Arias, C. E. y Piñeros E. P. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz verde. Trabajo de grado para el título de Microbiología industrial. Pontificia Universidad de Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología industrial. Bogotá, Colombia. 2008.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Metil paratión [En línea] www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts48.pdf [Consulta: abril 24, 2012].
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Resumen de salud pública [En línea]. www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs48.pdf [Consulta: abril 24, 2012].
- Badii, M. H.; y S. Varela. (2008). Insecticidas organofosforados: efectos sobre la salud y el ambiente. Culcyt Cultura Científica y Tecnológica. Toxicología de insecticidas. Año 5 núm 28.
- Barr, D. B.; y L. N. Larry. (2002). Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. *Journal of Chromatography B*. 778: 5–29.
- Características físico-químicas de los plaguicidas y su transporte en el ambiente. INE. Instituto Nacional de Ecología México. [En línea] www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/descargas/caracteristicas_fyq_plaguicidas.pdf [Consulta: abril 2, 2012].
- Columbia Analytical Services. [En línea] www.caslab.com. [Consulta: noviembre 8, 2012].
- Chandra, S. P.; y Nidhi Chauhan (2012), Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Analytical Biochemistry* 429: 19–31.
- Chávez-López C.; A. Blanco-Jarvio; M. Luna-Guido; L. Dendooven y N. Cabirol. (2011). Removal of methyl parathion from a chinampa agricultural soil of Xochimilco Mexico: A laboratory study. *European Journal of Soil Biology*. 47: 264-269.
- Deng, S. P.; y M. A. Tabatabai. (1994) Colorimetric determination of reducing sugars in soils. *Soil Bid. Biochem*. 26: 473-477.
- Diez, M.C. (2010). Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. *J. soil. sci. plant. nutr*. 10(3): 244 – 267.
- Fang-yao L., Ming-zhang H.; Dan-mei L.; Ya-wen L.; Pei-shun S.; Hai Yan, Guo-qing S. (2007). Biodegradation of methyl parathion by *Acinetobacter radioresistens* USTB-04. *Journal of Environmental Sciences*. 19(10): 1257-1260.
- Fernández-Luqueño F.; C. Valenzuela-Encinas; R. Marsch; C. Martínez-Suárez; E. Vázquez-Núñez y L. Dendooven (2011) Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review. *Environ Sci Pollut Res*. 18:12–30.
- Fukuto T.R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*. 87: 245-254.
- Hazardous Substances Data Bank, 1990. Methyl parathion. Environmental Fate & Exposure. [En línea] <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?/.temp/~f8Cucl:1:enex>. [Consulta: abril 26, 2012].
- Hernández, A.F.; T. Parrón; Tsatsakis A. M.; Mar Requena, R. Alarcón y O. López-Guarnido. (2012). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology (In Press, Corrected Proof)*
- Herrera, T., M. Ulloa. (1998). El Reino de los Hongos. Micología Básica y Aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica. México.
- Identificación de pesticidas organofosforados en naranjas de la variedad valenciana tardía en Cuauacán, Tabasco.

Ilyas-Tariq M.; S. Afzal; Ishtiaq Hussain; N. Sultana. (2007). Pesticides exposure in Pakistan: A review. *Environment International*. 33: 1107–1122.

Indicadores de la situación del país INE. Instituto Nacional de Ecología. [En línea] <www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/314/indicadores.html> [Consulta: abril 6, 2012].

INE. Instituto Nacional de Ecología. Dirección general de normatividad. Estudio: Anteproyecto de norma oficial mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a cuerpos receptores provenientes de la producción y formulación de plaguicidas. [En línea]. http://repositorio.ine.gob.mx/pdf2/PDFA/AE_009396.pdf. [Consulta: abril 6, 2012].

IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition (1997)

Jiandong J. (2007). Simultaneous biodegradation of methyl parathion and carbofuran by a genetically engineered microorganism constructed by mini-Tn5 transposon. *Biodegradation*. 18: 403–412.

Karpouzias, D. G.; y B. K. Singh. (2006). Microbial Degradation of Organophosphorus Xenobiotics: Metabolic Pathways and Molecular Basis. *Advances in Microbial Physiology*. 51: 119–185,225.

Kavanagh, K., Ed. (2005). *Fungi Biology and applications*. John Wiley & Sons, Ltd. Inglaterra.

Lezama-García R.; J. G. Torres-Torres; E. González Mujica y M. García Pérez.

Liu Jie; Ling W.; L. Zheng; Xiaoru W.; Frank S.C. Lee. (2006). Analysis of bacteria degradation products of methyl parathion by liquid chromatography/electrospray time-of-flight mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1137(2): 180-187.

Lo que Usted debe saber sobre los plaguicidas en México. Serie Plaguicidas No. 1. SEMARNAP. Secretaría de Medio Ambiente, *Recursos*

Naturales y Pesca de México, INE. Instituto Nacional de Ecología. pp. 1-22, 1996.

Martín, M. C.; González Becerra A.; Blanco Santos M. J. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev Iberoam Micol*. 21: 103-120

Methyl Parathion in Drinking-water. Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*. [En línea]. www.who.int/water_sanitation_health/dwg/chemicals/methylparathion.pdf [Consulta: abril 9, 2012].

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 31 (3): 426–428.

More, T.T.; S. Yan; R.D. Tyagi; R.Y. Surampalli. (2010). Potential use of filamentous fungi for wastewater sludge treatment. *Bioresource Technology*. 101 (20): 7691-7700.

Mubeena, A.; S. M. Hasany; M.I. Bhangar; Shahid Iqbal. (2007). Low cost sorbents for the removal of methyl parathion pesticide from aqueous solutions. *Chemosphere*. 66 (10): 1829-1838

Nápoles, A. J.; y Abalos R. A. (2008). Biorremediación de ecosistemas contaminados con xenobióticos. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba

Owen P. W. (2012). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. 30(5): 1119-1139

Pérez M. A.; A. Segura; R. García; Colinas T.; M. Pérez; Vázquez A. y H. Navarro. (2009). Residuos de plaguicidas organofosforados en cabezuela de brócoli (*Brassica oleracea*) determinados por cromatografía de gases. *Rev. Int. Contam. Ambient*. 25 (2) 103-110.

Pino N., (2011). Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a

contaminated site. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65: 827- 831

Pinto A.P.; C. Serrano; T. Pires; E. Mestrinho; L. Dias; D. Martins Teixeira; A.T. Caldeira. (2012). Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. *Science of the Total Environment*. vol. 435–436 402–410

Programa Internacional en Seguridad Química. Criterio de salud ambiental 145. Paratión metílico. [En línea]. www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc145.htm [Consulta: abril 9, 2012].

Rama Krishna, K.; y L. Philip. (2008). Adsorption and desorption characteristics of lindane, carbofuran and methyl parathion on various Indian soils. *Journal of Hazardous Materials*. 160: 559–567.

Rasul C. G.; A. N. Ali; y W. B. Wheeler. (1988). Isolation of a Methyl Parathion-Degrading *Pseudomonas* sp. That Possesses DNA Homologous to the opd Gene from a *Flavobacterium* sp. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 54, No. 2.

Sandip B. Bharate; John M. Prins; Kathleen M. George, y Charles M. Thompson. (2010). Thionate versus Oxon: A Comparison of Stability, Uptake, and Cell Toxicity of (14CH3O) 2-Labeled Methyl Parathion and Methyl Paraoxon with SH-SY5Y Cells. *J Agric Food Chem*. 58(14): 8460–8466

Tejomyye S. B.; y Pravin R. Puranik. (2009). Microbial degradation of monocrotophos by *Aspergillus oryzae*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63: 503–508.

The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. 2009. International Programme on Chemistry Safety (IPCS).

University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database [En línea]. <http://umbbd.ethz.ch/> [Consulta: noviembre 14, 2012].

Wallis, G.L.F.; R. J. Swift, R. Atterbury; S. Trappe; Rinas U.; F. W. Hemming; M. G. Wiebe; Anthony P.J Trinci; J. F. Peberdy. (2001). The effect of pH on glucoamylase production, glycosylation and chemostat evolution of *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1527 (3): 112-122.

Agradezco y dedico este logro a todos esos seres de la evolución que pintaron mi vida con los intensos e inimaginables colores del sol

Dedicado a mi querido papá, Carlos Amaya a quien amo con todo mi corazón.

A mi Tita, que desde el universo mira mi camino y me sigue acompañando no sólo en mis sueños.

A mi querida mami, efímera conexión como el mar y el fuego.

Agradezco a mi tío, Mario Márquez a quién admiro demasiado por esa lucha interminable.

A quien amo conservando la "Ley del mar" que compartimos nuestras risas, almas, logros y a ese hermoso ser llamado Jack... Regis.

Para esas hadas que encontré en el bosque: Daniela y Renata mis cómplices, mis amigas, mis hermanas.

Agradezco a mis queridos tutores Dr. Juan Manuel Arce y Dra. Cecilia Izcapa, quienes apoyaron este logro en todos los sentidos, incluso secando lágrimas.

A esas chicas talentosas que el azar de las empresas nos dio lo mejor del mundo, conocernos: Anaité y Mari Jó.

Christian mi consejero y ejemplo de fiesta a no seguir.

Toda la familia que me une en sangre a quienes pertenezco pero no.

Gracias a aquellos a los que me escucharon, aconsejaron, con los que soñé o me guiaron en este camino construyendo esculturas en mi ser.

A los profesores de la Facultad, que me formaron como una excelente profesionista y a nuestra Universidad Nacional Autónoma de México por todo lo que me permitió crecer y continuar creciendo.

... para mí, por luchar y sonreír en esta interminable travesía.

"Hemos nacido de la comunidad terrestre y de su infinita creatividad, deleite y aventura. Nuestro estado natural es la intimidad con la comunidad que nos rodea, nuestra herencia genética nos permite tener lazos profundos con las especies, así como con los componentes no vivos del universo. Cualquier separación definitiva de esta gran comunidad es imposible, y cualquier ideología que proponga que el universo no es sino un conjunto de materias primas y mercaderías solo puede ser mantenida a un precio espantoso."

Brian Swimme