



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA AGRÍCOLA
Y FORESTAL SUSTENTABLE**

PROYECTO TERMINAL

EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE BIORREMEDIACIÓN (*IN VITRO*) DE MICROORGANISMOS LOCALMENTE ADAPTADOS A SUELOS CON HISTORIAL DE USO DE ACETOCOLOR EN CULTIVO DE MAÍZ.

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal
Sustentable

PRESENTA

Ing. Zianya Gómez Soto

Director

Dr. Alfredo Madariaga Navarrete

Codirectora

Dra. Margarita Islas Pelcastre

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., diciembre de 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
AGRÍCOLA Y FORESTAL SUSTENTABLE**

PROYECTO TERMINAL

EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE BIORREMEDIACIÓN (*IN VITRO*) DE MICROORGANISMOS LOCALMENTE ADAPTADOS A SUELOS CON HISTORIAL DE USO DE ACETOCOLOR EN CULTIVO DE MAÍZ.

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

PRESENTA

Ing. Zianya Gómez Soto

Director

Dr. Alfredo Madariaga Navarrete

Codirectora

Dra. Margarita Islas Pelcastre

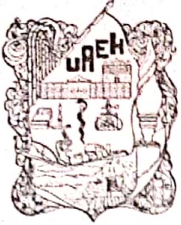
Asesores

Dr. Antonio Vázquez Alarcón

Dra. Eliazar Aquino Torres

Dra. Mariana Saucedo García

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., diciembre de 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Agropecuarias

School of Forestry and Environmental Studies

Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

Master's in Sciences and Technology of Agriculture and Forestry

ICAP-MCTAFS/010/2022

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE

Por este conducto se le comunica que el Comité Revisor asignado a la alumna **Zianya Gómez Soto**, de la Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable, con número de cuenta **242872**, que presenta el manuscrito de tesis titulado **“Evaluación de la acción de biorremediación (*in vitro*) de microorganismos localmente adaptados a suelos con historial de uso de acetoclor en cultivo de maíz”**, ha autorizado la impresión del mismo.

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE

“Amor, Orden y Progreso”

Tulancingo de Bravo, Hgo. a 02 de diciembre del 2022.

Dra. Eliazar Aquino Torres
Coordinadora de la Maestría en
Ciencias y Tecnología Agrícola y
Forestal Sustentable


Dr. Armando Peláez Acero
Director del ICAP

Avenida Universidad Km. 1 s/n, Exhacienda Aquetzalpa
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México; C.P. 43600
Teléfono: 771 71 72000 ext 2430
maestria_agricola_forestal@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Agropecuarias

School of Forestry and Environmental Studies

Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

Master's in Sciences and Technology of Agriculture and Forestry

COORDINACION DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Evaluación de la acción de biorremediación (*in vitro*) de microorganismos localmente adaptados a suelos con historial de uso de acetoclor en cultivo de maíz", que desarrolla la estudiante Zianya Gómez Soto.

Asistentes:

Dr. Alfredo Madariaga Navarrete

Dra. Margarita Islas Pelcastre

Dra. Eliazar Aquino Torres

Dra. Mariana Saucedo García

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por Zianya Gómez Soto, comunicando a la estudiante, realizó oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 01 de diciembre de 2022

Dr. Alfredo Madariaga Navarrete

Dra. Margarita Islas Pelcastre

Dra. Eliazar Aquino Torres

Dra. Mariana Saucedo García



[Handwritten signatures]
Mariana S. G.



Avenida Universidad Km. 1 s/n, Exhacienda Aquetzalpa
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México; C.P. 43600
Teléfono: 771 71 72000 ext 2430
maestria_agricola_forestal@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Índice general

AGRADECIMIENTO	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
1 Introducción	1
§1.1 Introducción	1
§1.2 Trabajos relacionados	3
§1.3 Justificación	4
§1.4 Planteamiento del problema	4
§1.5 Hipótesis	5
§1.6 Objetivo general	5
§1.6.1 Objetivos específicos	5
§1.7 Descripción de la tesis	6
§1.8 Literatura citada	7
2 Fundamentos teóricos	10
§2.1 Los Plaguicidas	10
§2.1.1 Clasificación de los plaguicidas	11
§2.1.2 Uso de plaguicidas	11
§2.2 Los Herbicidas	12
§2.2.1 Clasificación de los herbicidas	12
§2.2.2 Dinámica de los herbicidas en el suelo	15
§2.3 Harness®	17

§2.3.1	Composición porcentual	17
§2.3.2	Malezas que controla	18
§2.3.3	Época de aplicación	18
§2.3.4	Dosis de aplicación	18
§2.3.5	Método de preparación y aplicación del producto	19
§2.4	Acetoclor	19
§2.4.1	Propiedades Físicoquímicas	19
§2.4.2	Modo de acción	20
§2.4.3	Aplicación de acetoclor en cultivo de maíz	20
§2.4.4	Impactos ambientales por uso de acetoclor	21
§2.4.5	Riesgo en la salud por uso de acetoclor	21
§2.4.6	Marco Normativo del acetoclor	21
§2.5	Biotecnología del medio ambiente	22
§2.5.1	La Biorremediación	22
§2.5.2	Biorremediación de plaguicidas por medio de microorganismos	22
§2.5.3	Procesos microbianos en la biorremediación de suelos	23
§2.5.4	Biorremediación de acetoclor	24
§2.6	Literatura citada	26
3	Determinación de las propiedades físico-químicas de un suelo con presencia de acetoclor	31
§3.1	Introducción	31
§3.2	Diseño experimental y análisis de datos	32
§3.3	Procedimientos experimentales	32
§3.3.1	Localización, muestreo, preparación y almacenamiento de muestras de suelo.	33
§3.3.2	Cálculo de concentración de acetoclor en el suelo	34
§3.3.3	Análisis de las propiedades físico-químicas del Suelo	34
§3.4	Resultados y discusiones	37
§3.4.1	Información de la zona de muestreo	37

§3.4.2	Concentración de acetoclor en suelo	40
§3.4.3	Parámetros Físico-químicos del suelo	41
§3.5	Conclusiones	42
§3.6	Literatura Citada	43
4	Aislamiento de los microorganismos presentes en el suelo con antecedentes de acetoclor	44
§4.1	Introducción	44
§4.2	Procedimientos experimentales	45
§4.2.1	Siembra y aislamiento de hongos y bacterias de suelo con acetoclor	45
§4.2.2	Purificación de cepas	47
§4.3	Descripción morfológica de cepas	48
§4.4	Tinción de Gram	48
§4.5	Resultados y discusiones	49
§4.5.1	Aislamiento de bacterias presentes en el suelo con antecedentes de acetoclor	49
§4.5.2	Aislamiento de hongos presentes en el suelo con antecedentes de acetoclor	52
§4.6	Conclusiones	55
§4.7	Literatura Citada	56
5	Evaluación de la actividad biológica (<i>in vitro</i>) de los microorganismos aislados de suelos con historial de acetoclor	58
§5.1	Introducción	58
§5.2	Diseño experimental y análisis de datos	59
§5.3	Procedimientos experimentales	59
§5.3.1	Concentración Mínima Inhibitoria en bacterias	60
§5.3.2	Concentración Mínima Inhibitoria en hongos	61
§5.4	Resultados	62
§5.4.1	Inhibición de crecimiento en cepas bacterianas	62
§5.4.2	Inhibición de crecimiento en cepas de hongos	66

§5.5 Conclusiones	71
§5.6 Literatura Citada	71
6 Evaluación de la asimilación (<i>in vitro</i>) de acetoclor como única fuente de carbono de los microorganismos aislados de suelos con historial de acetoclor	73
§6.1 Introducción	73
§6.2 Procedimientos experimentales	74
§6.2.1 Prueba de cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por el método del Número más Probable (NMP)	74
§6.2.2 Crecimiento de biomasa en medio líquido	74
§6.2.3 Pruebas de Degradación en Medio Líquido con Acetoclor	75
§6.3 Resultados	76
§6.3.1 Prueba de cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por el método del Número más Probable (NMP)	76
§6.3.2 Pruebas de Degradación en Medio Líquido de la cepa C y Acetoclor	77
§6.3.3 Pruebas de Degradación en Medio Líquido de la cepa E y Acetoclor	78
§6.4 Discusiones	79
§6.5 Conclusiones	79
§6.6 Literatura Citada	80
7 Conclusiones Generales	81
8 Trabajo a futuro	83
9 Anexos	84
§9.1 Protocolo de muestreo de suelo	84
§9.2 Ficha Técnica de Acetoclor	88
§9.3 Memoria en Extenso del Congreso Academia Journals Fresnillo 2022	89
§9.4 Artículo publicado en la revista South Florida Journal of Development	90

||

Índice de tablas

2.1	Clasificación de plaguicidas de acuerdo a su organismo objetivo	11
2.2	Composición porcentual en peso de los ingredientes activo e inertes que conforman el Harness®	17
2.3	Dosis de aplicación de Harness® en L/ha de acuerdo al tipo de suelo . . .	19
2.4	Propiedades Fisicoquímicas del Acetoclor	20
3.1	Parámetros físico-químicos de suelo con acetoclor	42
3.2	Porcentaje de contenido de partículas del suelo	42
4.1	Descripción morfológica de las cepas A, B, C, D, E.	51
4.2	Descripción morfológica de las cepas F, G, H, I, J.	54
5.1	Tratamientos con acetoclor para pruebas de inhibición de crecimiento de bacterias.	60
5.2	Tratamientos con acetoclor para pruebas de inhibición de crecimiento de hongos.	62
5.3	Pruebas de Inhibición de crecimiento de la cepa A, halo bacteriano en mm a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)	63
5.4	Pruebas de Inhibición de crecimiento de la cepa B, halo bacteriano en mm a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)	64
5.5	Pruebas de Inhibición de crecimiento de la cepa F, crecimiento en mm a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)	66

5.6	Pruebas de Inhibición de crecimiento de la cepa G, crecimiento en mm a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)	67
5.7	Pruebas de Inhibición de crecimiento de la cepa H, crecimiento en mm a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)	67
5.8	Pruebas de Inhibición de crecimiento de la cepa J, crecimiento en mm a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)	70
6.1	Conteo de UFC de Bacteria de las cepas C y E.	76

||

Índice de figuras

2.1	Clasificación de Herbicidas por modo de acción	14
3.1	Medición de pH por el método AS-02 (NOM-021-RECNAT-2000)	34
3.2	Conductividad eléctrica (dS/m) por el método AS-18 (NOM-021-RECNAT-2000)	35
3.3	Medición de materia orgánica por el método Walkley y Black (NOM-021-RECNAT-2000)	36
3.4	Medición de textura de suelo por el método de Bouyoucos	37
3.5	Mapa de ubicación de zona de muestreo, Jamay, Jal	39
3.6	Absorbancia de Acetoclor por espectrofotometría de luz UV-Visible	40
3.7	Curva de calibración y modelo matemático para calcular la concentración de acetoclor	41
4.1	Técnica de aislamiento de microorganismos por dilución en serie	47

4.2	Dinámica de crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias en suelo con antecedentes de acetoclor.	50
4.3	Cepas de bacterias A, B, C, D y E de un suelo con contenido de acetoclor .	52
4.4	Dinámica de crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de hongos en suelo con antecedentes de acetoclor.	53
4.5	Cepas de hongos F, G, H, I y J de un suelo con contenido de acetoclor . .	55
5.1	Prueba de Inhibición de Crecimiento por la técnica de discos para bacterias	61
5.2	Prueba de Inhibición de Crecimiento por la técnica de envenenamiento del medio para hongos	62
5.3	Crecimiento de la cepa A en Pruebas de Inhibición de Crecimiento a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)	64
5.4	Crecimiento de la cepa B en Pruebas de Inhibición de Crecimiento a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)	65
5.5	Inhibición de crecimiento de la cepa E	66
5.6	Crecimiento de la cepa H en Pruebas de Inhibición de Crecimiento a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)	68
5.7	Inhibición de crecimiento de la cepa H, de izquierda a derecha: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)	69
5.8	Crecimiento de la cepa J en Pruebas de Inhibición de Crecimiento a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)	70
6.1	Medición de la concentración de Acetoclor por Espectrofotometría de luz UV-Visible	76
6.2	Prueba de Degradación de Medio Líquido de la Cepa C vs Acetoclor	77
6.3	Prueba de Degradación de Medio Líquido de la Cepa E vs Acetoclor	78
6.4	Ruta de degradación de acetoclor	79

9.1 Ficha Técnica de Acetoclor, pág. 1. 88

9.2 Gómez Soto, Z., Madariaga Navarrete, A., Islas Pelcastre, M., Aquino Torres, E., Prieto Méndez, J., Delgado González, C. R. (2022). Presencia de *Bacillus* en Suelo con Antecedente de Acetoclor. *Congreso Academia Journals Fresnillo 2022*. (p.355–359). Fresnillo, Zacatecas, México.: Artículos del Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Fresnillo 2022. ISSN online 1946-5351. 89

9.3 Gómez Soto, Z., Madariaga Navarrete, A., Vázquez Alarcón, A., Islas Pelcastre, M., Aquino Torres, E., Prieto Méndez, J., Delgado González, C. R. (2022). Aislamiento de consorcio bacteriano localmente adaptado a suelo con antecedentes de acetoclor. *South Florida Journal of Development*, 3(2), 2699–2707. ISSN 2675-5459. 90

||

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por permitirme terminar este proyecto tan importante en mi vida. Agradezco a todos los colaboradores que han participado en el presente proyecto de vida, como mi director Dr. Alfredo Madariaga Navarrete, como mi co-directora Dra. Margarita Islas Pelcastre, como asesor externo Dr. Antonio Vázquez Alarcón y asesora Dra. Eliazar Aquino Torres, entre otros, por la confianza depositada en mi persona, además hago notar que mediante su motivación, amistad y dedicación constante se consiguieron excelentes resultados en el presente trabajo de tesis.

Agradezco a CONACYT por el apoyo otorgado a través de la beca No. 1034082, la cual me permitió el desarrollo del presente trabajo de tesis.

Y finalmente de forma especial le agradezco a mi país y a la institución que me ha formado Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) por la hospitalidad y factibilidad prestada para la realización del presente trabajo de tesis.

A todos ustedes mi más sincero agradecimiento

RESUMEN

La aplicación desmedida de herbicidas como el acetoclor en la producción de maíz tiene como resultado efectos negativos en la microbiota benéfica del suelo, así como en los cuerpos de agua y la salud de las personas directamente expuestas. Por ello, se deben desarrollar técnicas de biorremediación que lleven a una recuperación parcial o total de este recurso. El propósito de este proyecto de estudio es aislar y evaluar la acción de biorremediación (*in vitro*) de microorganismos localmente adaptados en suelo con presencia de acetoclor. La toma de muestras de suelo se realizó en una zona de producción de maíz en la que los productores realizaron aplicaciones de acetoclor en ciclos de cultivos anteriores. Al suelo contaminado se le realizó el análisis de pH, conductividad eléctrica, materia orgánica, textura y cuantificación de acetoclor. Se llevó a cabo el aislamiento de microorganismos mediante la técnica dilución en serie (hongos en medio de cultivo de PDA y bacterias en Medio de Wright), llegando a descripciones macroscópicas de los microorganismos aislados. Se realizaron ensayos con el método de discos (bacterias) y envenamiento del medio (hongos) con el objetivo de evaluar su actividad biológica. Se seleccionaron las cepas de mejor resultados, llevando a la evaluación del mecanismo de acción por medio de una cinética de generación de biomasa y degradación de acetoclor utilizando espectrofotometría de luz UV-Vis. Se aislaron diez microorganismos del suelo (cinco cepas bacterianas y cinco de hongos) consiguiendo que una de las cepas bacterianas (como suposición, pertenece al género *Rhizobium*) lleve a la disminución del acetoclor a una concentración menor de 0.5 mg/mL a las 24 horas y crecimiento máximo de biomasa de aproximadamente 1 g en peso húmedo, se sugiere que el mecanismo derivado de la degradación involucra la formación de compuestos.

ABSTRACT

The excessive application of herbicides such as acetochlor in corn production has negative effects on the beneficial microbiota of the soil, as well as on bodies of water and the health of directly exposed people. Therefore, bioremediation techniques must be developed that lead to a partial or total recovery of this resource. The purpose of this study project is to isolate and evaluate the bioremediation action (*in vitro*) of microorganisms locally adapted to soils with the presence of acetochlor. A corn production area with a history of soil with acetochlor was selected for sampling. The contaminated soil was analyzed for pH, electrical conductivity, organic matter, texture, and acetochlor quantification. The isolation of microorganisms was carried out using the serial dilution technique (fungi in PDA culture medium and bacteria in Wright's Medium), reaching macroscopic descriptions of the isolated microorganisms. Trials were set up with the method of discs (bacteria) and poisoning of the medium (fungi) in order to evaluate their biological activity. The strains with the best results were selected, leading to the evaluation of the mechanism of action through biomass generation kinetics and acetochlor degradation using UV-Vis light spectrophotometry. Ten microorganisms from the soil (five bacterial strains and five fungi) were isolated, achieving that one of the bacterial strains (as a supposition, it belongs to the genus *Rhizobium*) leads to a decrease in acetochlor to a concentration of less than 0.5 mg/ml at 24 hours and maximum biomass growth of approximately 1 gr in wet weight. Finally, the assumption is made that compounds similar to acetochlor reported in the literature are generated.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Introducción

A lo largo de la historia de la humanidad, el ser humano ha desarrollado tecnologías con el propósito de asegurar su supervivencia y mejorar su calidad de vida. Así, todo lo que el hombre ha creado ha tenido un origen en el medio natural, de donde se extraen la mayoría de las materias primas. En este sentido, uno de los recursos naturales más importantes para su existencia es el suelo debido a que provee una serie de servicios ambientales. De éstos, una parte importante es la producción de alimentos. Aunado a esto, la población presenta un crecimiento exponencial y demanda cada vez más una mayor cantidad del alimentos, por lo que, la producción agrícola se ha tenido que eficientizar combatiendo obstáculos, como la presencia de enfermedades, mediante el uso de agroquímicos tales como los plaguicidas.

Estos productos, se aplican con el propósito de destruir, prevenir, repeler o mitigar una plaga y comprende una gama de productos como herbicidas, fungicidas e insecticidas. [1].

Por otro lado, los plaguicidas promueven una serie de beneficios para el agricultor debido a que su acción implica menor tiempo, mayor eficiencia y permiten erradicar patógenos y elementos que perjudican el desarrollo de cultivos agrícolas [2].

Sin embargo, hay factores que presentan los plaguicidas y, que contribuye al desequilibrio ecológico como, alta movilidad de los compuestos activos, cuyo destino puede tener lugar en cuerpos de agua mediante procesos tales como lixiviación, acción del viento, y

escurrimientos, entre otros [3]. Dichos productos, se convierten, además, en una amenaza para las redes tróficas y poblaciones antropogénicas. Se reportan riesgos para la salud por estos productos que están en función a la exposición directa o indirecta de sus compuestos [4]. No obstante, en países subdesarrollados o tercermundistas se han llevado a cabo pocos estudios acerca de estas situaciones. Por lo que se aplican plaguicidas que no están permitidos, en cantidades inadecuadas, provocando costos socioambientales que recaen en las comunidades rurales donde se practican los monocultivos [5].

La mayoría de los agroquímicos que son aplicados con mayor frecuencia tienden a ser cancerígenos. Por ejemplo, alrededor del 73 % de los aplicadores no hacen uso de las medidas de seguridad y equipo de protección a causa de la falta de información de su modo de empleo y aplicación de productos [6]. Cabe mencionar, que la importancia de seguir las instrucciones adecuadas es debido a que este tipo de productos se transporta de un medio a otro (subsuelo, cuerpos de agua, sedimentos, mantos acuíferos, entre otros), donde puede sufrir una degradación por organismos anaerobios [7], sin embargo, si la aplicación excede los límites máximos recomendados, se pueden reflejar efectos tóxicos del agroquímico en el ecosistema.

Específicamente, acetoclor, es un herbicida de la familia de los cloroacetamida utilizado para el control de malezas. Reportes indican que, solo China presenta un consumo anual aproximado de 10 millones de kg [8,9]. En México, se han realizado investigaciones acerca del uso de este producto en combinación con otros. Al respecto, en el municipio de Zapopan, Jalisco, se produce maíz de temporal sobre una superficie aproximada de 280,000 ha y se presentan especies amenazadoras como *Brachiaria plantaginea*, *Tithonia sp*, *Simsia sp*, *Amaranthus sp*, *Helianthus sp*. Por lo cual, el principal objetivo es el de controlar la proliferación de estas malezas, realizando ejercicios de diagnóstico que consistieron en combinar acetoclor con diversos productos y se determinó que las concentraciones: acetoclor (2.0 litros/ha), acetoclor+atrazina (2.0 + 1.0 litros/ha) y acetoclor +flurocloridona (1.5 + 1.5 litros/ha) obtienen mejores resultados en el control de malezas [10].

Recientemente, en un predio para cultivo de cebolla en el Valle de San Lorenzo, Culiacán, Sinaloa, se aplicaron diferentes mezclas de herbicidas preemergentes y se determinó que la combinación más eficiente fue Acetoclor con Flumioxazin porque tienen modos de

acción diferentes y así pueden abarcar un mayor número de tipos de malezas [11].

La ubicuidad en el suelo de acetoclor tiene como consecuencia una inhibición de actividad enzimática y daña las funciones de replicación y reparación, metabolismo energético, motilidad celular y procesos celulares de las comunidades bacterianas como *Acidobacteriota* y alteración del ciclo de los nutrientes [12]. Como propuesta de solución a la contaminación general de suelos, se ha utilizado una serie de técnicas para remediación basadas en métodos físicoquímicos y biológicos denominadas *biorremediación*, que consiste en utilizar el metabolismo de organismos como bacterias y hongos para la disminución de los efectos de contaminación [13]. Con frecuencia, la práctica de biorremediación en el medio natural resulta muy distinto del modo *in vitro* [14], sin embargo, los microorganismos autóctonos presentan cierto grado de adaptación que les permite tolerar su presencia y en casos particulares, metabolizar este compuesto. Se ha demostrado que los géneros *Sporomusa*, *Sporobacterium*, *Dechloromonas*, *Azotobacter* and *Methanobacterium* presentan potencial de degradación anaeróbica de acetoclor [15].

1.2. Trabajos relacionados

Hoy en día existen una serie de estudios relacionados con el empleo de microorganismos para la remediación de suelos con presencia de contaminantes. En el campo agronómico, una de las situaciones más relevantes es la aplicación de agroquímicos como herbicidas en la producción de alimentos. Una propuesta reciente de estudio es el aislamiento de microorganismos autóctonos de suelos contaminados con estos productos, se considera que, al haber estado en presencia de estos compuestos, han desarrollado adaptación y en el caso que se presente, la capacidad de asimilación del producto para una recuperación parcial o total de un suelo [16]. La primer acción del estudio es la ubicación de un sitio empleado para la producción de un cultivo donde se usó el herbicida en cuestión. Se consiguen muestras y se hace un análisis diagnóstico de las características físicoquímicas del suelo para definir las condiciones en que se desarrolla la microbiota y determinar si la presencia del compuesto genera un cambio en las propiedades del medio. Posteriormente, a partir de estas muestras de suelo, se realizó un aislamiento de microorganismos por medio

del método de dilución en serie de Waksman (1922) utilizando medio de cultivo de Papa y Dextrosa (PDA) para hongos y medio de Wright para bacterias del género *Rhizobium* [17]. Para evaluar la actividad biológica in vitro de bacterias, se utilizó la técnica de discos utilizada en el trabajo de Madariaga *et al.* (2017) [18]. En el caso de los hongos, se utilizó la técnica de dilución del extracto en agar [19].

1.3. Justificación

El realizar esta investigación permitirá contribuir al avance y creación de estrategias que en el mediano plazo permitan recuperar paulatinamente aquellos suelos alterados por el uso desmedido de herbicidas como acetoclor y reconvertirlos nuevamente, ya que se ha estudiado que el acetoclor induce daño a la microflora benéfica del suelo, disminuyendo el crecimiento y la reproducción de organismos no objetivo en el medio ambiente del suelo a exposiciones que superan los 20 mg/kg de acetoclor [19] y la línea celular de carcinoma de hígado humano [20]. De acuerdo con la situación de demanda actual y futura de tierras o áreas para la producción de alimentos, resultado del acelerado crecimiento poblacional y la constante pérdida y contaminación de suelo, que amenaza las necesidades básicas alimentarias de la sociedad, así como la salud por la exposición directa o indirecta a los residuos tóxicos del suelo. Coadyuvar al fortalecimiento de la línea de investigación de biorremediación de suelos contaminados por medio de microorganismos localmente adaptados y fomentar mediante una posible interacción con las comunidades el desarrollo sustentable, ya que ésta tecnología suele tener costos bajos porque se puede hacer en el lugar (eliminando los costos de transporte y pasivos), provoca una mejor intrusión en el sitio afectado y, por lo tanto, un daño ecológico menos significativo en el proceso de destrucción de los productos contaminantes [21].

1.4. Planteamiento del problema

El uso inadecuado de herbicidas como acetoclor para cultivo de maíz, ha provocado altos niveles de perturbación en suelos productivos convirtiéndose en una amenaza para el

bienestar de las comunidades y los ecosistemas. Al encontrarse expuestos a este producto se pueden desarrollar enfermedades cancerígenas en las poblaciones de personas. El acetoclor ataca la microbiota benéfica del suelo y afecta negativamente los rendimientos de la producción de maíz, además, este se puede mover a otros medios como los cuerpos de agua y disminuir la presencia de la vida silvestre. Dentro de estos suelos alterados se pueden encontrar diversos microorganismos que poseen la capacidad de degradar estos contaminantes y biorremediar el suelo. La interrogante que se busca resolver es la identificación de estos microorganismos localmente adaptados y evaluar su potencial de degradación de residuos de acetoclor.

1.5. Hipótesis

Los suelos con historial de acetoclor en cultivo de maíz presentan microorganismos localmente adaptados con capacidad de biorremediar la presencia del herbicida.

1.6. Objetivo general

Aislar y evaluar la acción biológica (biorremediación) de microorganismos localmente adaptados a suelos con presencia de acetoclor.

1.6.1. Objetivos específicos

- Determinar las propiedades físico-químicas de un suelo con presencia de acetoclor.
- Aislar los microorganismos presentes en el suelo con antecedentes de acetoclor.
- Evaluar la actividad biológica (*in vitro*) de los microorganismos aislados de suelos con historial de acetoclor.
- Evaluar la asimilación (*in vitro*) de acetoclor como única fuente de carbono de los microorganismos aislados de suelos con historial de acetoclor.

1.7. Descripción de la tesis

En el presente trabajo de tesis se establecen las bases de biorremediación (*in vitro*) de acetoclor por medio de microorganismos autóctonos aislados de un suelo con historial de aplicación de dicho compuesto, presentado como ingrediente activo del herbicida Harness®[®], que es empleado en el cultivo de maíz y presenta residualidad, potencial para lixiviarse y afectar a la microbiota benéfica del suelo y a los organismos acuáticos. El trabajo de tesis se organiza de la siguiente manera:

En el capítulo 1 se presenta una introducción del tema, los trabajos que se relacionan con esta tesis, la justificación, el planteamiento del problema, el diseño de la hipótesis, los objetivos que de ella se desprenden, y se muestra la estructura literaria.

En el capítulo 2 se describen las bases teóricas en las que se apoya este estudio incluyendo los conceptos y principios básicos que forman parte de este fenómeno.

En el capítulo 3 se determinan las propiedades fisico-químicas de un suelo con presencia de acetoclor, se describe una breve introducción de las características generales reportadas de este tipo de suelo, resaltando si se han reportado cambios en pH, porcentaje de materia orgánica, conductividad eléctrica y/o textura por la presencia de acetoclor. A continuación, se describen los esquemas experimentales, análisis estadísticos y procedimientos; posteriormente, se muestran los resultados junto con la discusión y conclusiones. Finalmente, se enlista la bibliografía consultada en el presente capítulo.

En el capítulo 4 se describe el procedimiento para el aislamiento de microorganismos presentes en el suelo con antecedentes de acetoclor. Se realiza con dos tipos de microorganismos identificados: bacterias y hongos. Se presentan por separado en dos secciones incluyendo una breve introducción de cada tipo de organismo, los experimentos establecidos para cada uno, los resultados con su análisis estadístico y las discusiones con conclusiones y bibliografía consultada para este capítulo.

El capítulo 5 se evalúa la actividad biológica (*in vitro*) de los microorganismos previamente aislados. Se expone una breve introducción, el diseño experimental, resultados, discusiones, conclusiones y bibliografía consultada.

En capítulo 6 evalúa la asimilación (*in vitro*) de acetoclor como única fuente de carbono de los microorganismos con actividad biológica más eficiente. Este apartado se desarrolla de la misma forma que el capítulo 5.

El capítulo 7 concluye de forma general los trabajos desarrollados y los productos arrojados durante la presente tesis, además se discuten los trabajos que se pueden generar a partir de la presente investigación. Por último, se exponen los anexos que fortalecieron la ejecución del estudio.

1.8. Literatura citada

- [1] Arias, D. M., Mora, R. E. G., Romero, O. S. D. (2019). Uso de herbicidas en el control de malezas. Importancia de su conocimiento para el profesional agrónomo. *Opuntia Brava*, 11(1), 204–210.
- [2] March, G. (2014). Agricultura y plaguicidas. Un Análisis Global. *Fundación Agropecuaria Para El Desarrollo de Argentina (FADA)*, 1–6.
- [3] Martínez, V. J., Ramires, T. L. A. (2017). *Destino de los plaguicidas en el ambiente. Un estudio de caso para el programa de apoyo a proyectos para la innovación y mejoramiento de la enseñanza de la UNAM.*
- [4] Garzón Gómez, L. A. (2017). *Identificación y Control de Factores de Riesgo Asociados al Uso de Plaguicidas en el Cultivo de Fresa, Municipio de Guasca Cundinamarca.*
- [5] Velázquez, Y. F., de Vivar Mercadillo, M. R. R., Navarrete, J. A. S., Velázquez, D. J. F. (2022). ESTADO DEL ARTE SOBRE RIESGO SOCIAL Y AMBIENTAL POR USO DE PLAGUICIDAS EN LA PRODUCCIÓN DE FRESA. *Textual*, 79, 000–000.

- [6] Ordoñez-Beltrán, V., Frías-Moreno, M. N., Parra-Acosta, H., Martínez-Tapia, M. E. (2019). Estudio sobre el uso de plaguicidas y su posible relación con daños a la salud. *Revista de Toxicología*, 36(2), 148–153.
- [7] Liu, J., Bao, Y., Zhang, X., Zhao, S., Qiu, J., Li, N., He, J. (2022). Anaerobic biodegradation and detoxification of chloroacetamide herbicides by a novel *Proteiniclasticum sediminis* BAD-10T. *Environmental Research*, 209, 112859.
- [8] Konda, L. N., Pásztor, Z. (2001). Environmental distribution of acetochlor, atrazine, chlorpyrifos, and propisochlor under field conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3859–3863.
- [9] Foley, M. E., Sigler, V., Gruden, C. L. (2008). A multiphasic characterization of the impact of the herbicide acetochlor on freshwater bacterial communities. *The ISME Journal*, 2(1), 56–66.
- [10] Calderon Fuentes, E. (1991). Evaluating pre-emergent herbicides for rainfed maize at Tlajomulco, Jalisco. *Publicación Especial. INIFAP (México)*.
- [11] López-Urquidez, G. A., Murillo-Mendoza, C. A., Martínez-López, J. A., Ayala-Tafoya, F., Yañez-Juárez, M. G., López-Orona, C. A. (2020). Efecto de herbicidas preemergentes en el control de malezas y el desarrollo de cebolla bajo condiciones de fertirriego. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(5), 1149–1161.
- [12] Zhang, Y., Hu, Y., An, N., Jiang, D., Cao, B., Jiang, Z., Han, W. (2023). Short-term response of soil enzyme activities and bacterial communities in black soil to a herbicide mixture: Atrazine and Acetochlor. *Applied Soil Ecology*, 181, 104652.
- [13] Covarrubias, S. A., García Berumen, J. A., Peña Cabriaes, J. J. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria*, 25(NE-3), 40–45.
- [14] Liu, J., Zhou, X., Wang, T., Fan, L., Liu, S., Wu, N., Dong, W. (2022). Construction and comparison of synthetic microbial consortium system (SMCs) by non-living or living materials immobilization and application in acetochlor degradation. *Journal of Hazardous Materials*, 438, 129460.

- [15] Liu, J., Zhang, X., Xu, J., Qiu, J., Zhu, J., Cao, H., He, J. (2020). Anaerobic biodegradation of acetochlor by acclimated sludge and its anaerobic catabolic pathway. *Science of the Total Environment*, 748, 1–10.
- [16] Islas-Pelcastre, M., Villagómez-Ibarra, J Rodríguez-Pastrana, B., Perry, G., Madariaga-Navarrete, A. (2015). Identification of an indigenous atrazine herbicide tolerant microbial consortium in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a potential soil bioremediator. *Agrotechnology*, 5, 141.
- [17] Pelcastre, M. I., Ibarra, J. V, Navarrete, A. M., Rosas, J. C., Sandoval, O. A. (2013). Bioremediation perspectives using autochthonous species of *Trichoderma* sp. for degradation of atrazine in agricultural soil from the Tulancingo Valley, Hidalgo, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16(2).
- [18] Madariaga-Navarrete, A., Rodríguez-Pastrana, B. R., Villagómez-Ibarra, J. R., Acevedo-Sandoval, O. A., Perry, G., Islas-Pelcastre, M. (2017). Bioremediation model for atrazine contaminated agricultural soils using phytoremediation (using *Phaseolus vulgaris* L.) and a locally adapted microbial consortium. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(6), 367-375.
- [19] Xiao, N., Jing, B., Ge, F., Liu, X. (2006). The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. *Chemosphere*, 62(8), 1366–1373.
- [20] Chang, Y., Mao, L., Zhang, L., Zhang, Y., Jiang, H. (2020). Combined toxicity of imidacloprid, acetochlor, and tebuconazole to zebrafish (*Danio rerio*): acute toxicity and hepatotoxicity assessment. *Environmental Science and Pollution Research*.
- [21] Di Paola, M., Vicien, C. (2010). Biorremediación: vinculaciones entre investigación, desarrollo y legislación. *CEUR-CONICET*.

Capítulo 2

Fundamentos teóricos

En este capítulo se exponen los fundamentos teóricos en la que se gesta la investigación y la forma de como se establecen las bases de un proceso de biorremediación de microorganismos autóctonos con capacidad para desarrollarse y metabolizar acetoclor en un suelo empleado para producción de maíz.

2.1. Los Plaguicidas

Los plaguicidas son productos comerciales conformados por sustancias químicas sintetizadas que tienen el propósito de controlar, prevenir, destruir, repeler o mitigar organismos considerados como plagas (malezas, insectos, hongos, nemátodos, entre otros) que generan graves daños en la producción de cultivos [1].

El empleo de Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAPs) en zonas agrícolas de México en los últimos veinte años, presenta efectos dañinos en los ecosistemas terrestres y acuáticos; perjuicios en la salud de los trabajadores en el campo como hematologías, desajustes hormonales, alteraciones genéticas y celulares, y se han detectado residuos en alimentos como leche, hortalizas y granos [2]

2.1.1. Clasificación de los plaguicidas

Los plaguicidas presentan diversas clasificaciones en función de sus principales características. Estas clasificaciones proporcionan información sobre su estructura química, el modo de acción, el organismo objetivo, la toxicidad, la presentación comercial y comportamiento ambiental [3]. De acuerdo a su estructura, se dividen en organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides y neonicotinoide. Esta categorización brinda información sobre la función del plaguicida y su comportamiento sobre la plaga. También se clasifican de acuerdo a su acción sobre los organismos objetivo, esta sistematización es una de las más utilizadas (Tabla 2.1) [4].

Plaguicida	Organismo Objetivo
Acaricida	Acaros o garraptas
Alguicida	Algas
Avicida	Pájaros
Bactericida	Bacterias
Bioplaguicida	Control biológico de plagas
Fungicida	Hongos
Herbicida	Malezas
Herpecida	Reptiles
Insecticida	Insectos
Larvicida	Larvas de insectos
Molusquicida	Caracol y babosas
Micocida	Hongos
Nematicida	Nematodos
Ovicida	Huevos
Piscicida	Peces
Rodenticida	Roedores
Virucida	Virus

Tabla 2.1: Clasificación de plaguicidas de acuerdo a su organismo objetivo [4]

2.1.2. Uso de plaguicidas

Estos compuestos permiten controlar la proliferación de plagas y enfermedades de los cultivos y del ganado, así como reducir o evitar las pérdidas en la producción de alimentos y contribuir al control de los vectores de diversas enfermedades. No obstante, para la importancia económica de los plaguicidas, es necesario destacar que su aplicación indiscriminada y sin control ha generado diversos problemas como intoxicación a seres humanos, efectos

carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos, además de numerosos problemas ambientales como contaminación de mantos freáticos, aguas continentales y costeras; contaminación del suelo y bioacumulación en las cadenas alimentaria [5].

Actualmente, los residuos de plaguicidas han sido identificados en todos los compartimientos ambientales (aire, agua y suelo), así como en regiones geográficas tales como océanos, desiertos y zonas polares. Igualmente se ha demostrado su presencia en diferentes organismos de todos los niveles tróficos, ya que se bioacumulan y se biomagnifican en las cadenas alimentarias. Los seres humanos no están exentos de esta contaminación y los plaguicidas se han podido identificar en diversos tejidos y secreciones humanas, inclusive de los habitantes de regiones muy aisladas [6].

2.2. Los Herbicidas

El control de malezas es uno de los mayores obstáculos en la producción agropecuaria del mundo. Debido a ello, los herbicidas son el principal grupo de plaguicidas consumidos en la agricultura [3]. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) define a los herbicidas como “el control químico de la maleza, productos que inhiben o interrumpen el crecimiento y desarrollo de una planta” [7].

2.2.1. Clasificación de los herbicidas

Existen compuestos registrados como herbicidas que se pueden clasificar de diversas formas incluyendo el método de uso y momento de aplicación [7]:

Método de uso

Contacto: se aplica al follaje y afectan solamente la parte tratada y sistémicos: se trasladan del punto de aplicación a otros lugares de la planta.

Momento de aplicación

Pre-plantación: se refiere a herbicidas activos en el suelo, aplicados antes de la plantación del cultivo y de la emergencia de las malezas; pre-emergencia: se emplea después de

la siembra, antes de que emerja la maleza y el cultivo. Requieren de riego o precipitación pluvial para su incorporación en el suelo y post-emergencia: se utilizan después que el cultivo y (generalmente) las malezas han emergido, pero en cultivos trasplantados puede aplicarse antes de la emergencia de las malezas.

Otros criterios de clasificación de los herbicidas se relacionan con su estructura química y según su mecanismo de acción (Figura 2.1) [8].

Grupo	Modo de Acción	Estructura química	Principio activo
A	Inhibición del acetil coenzima carboxilasa (ACCase)	Aryloxfenoxipropionatos Ciclohexanodionas Sulfanilureas	clodinafop-propargil, butil-cihalofop, metildiclofop, etil-p-fenoxaprop cletodim, cloxidim, tralkoxidim amidosulfuron, azimsulfuron, metil-bensulfuron, clorsulfuron
B	Inhibición de la acetolactato sintetasa (ALS)	Imidazolinonas Triazolpirimidinas Pirimidinil, tiobenzoatos	metil-imazametabenz, imazamox, imazaquin metil-cloransulam, diclosulam, flumetsulam, metosulam bispiribac, piribenzoxim, perithiobac-na, metilpriminobac
C	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Triazonas Uracilos Piridazinona Fenil-carbamatos	ametrina, atrazina, cianazina, desmetrina, prometrina hexazinona, metamitrona, metribuzina ienacilo, terbacilo pirazona = cloridazona desmedifam, fenmedifam
D	Desviación del flujo electrónico en el fotosistema	Bipiridilos	dicuat, paracuat
E	Inhibición de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	Difeniléteres N-fenil-ítalimidias Tiadiazoles Oxadiazol Triazolinona	acifluorfen, aclonifen, bifenox, etil-fluoroglicofen, fomesafen, oxifluorfen flumioxazin tidiazimina oxadiazon carfentrazona, sufentrazona
F1	Decoloración: inhibición de la síntesis de los carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)	Nicotiananlida	diflufenican
F2	Decoloración: inhibición de la 4- hidroxifenil-xosazol piruvatodioxigenasa (4-HPPD)	Triketona Pirazol	sulcotriona Isoxaflutol pirazolinato, pirazoxifen
F3	Decoloración: inhibición de la síntesis de los carotenoides (punto desconocido)	soxazolidiona Urea Triazol	clomazona fluometuron amitrol
G	Inhibición de la sintetasa EPSP	Glicinas	fliosato, sulfosato
H	Inhibición de la glutamino sintetasa	Ácido fosfórico	flufosinato-amonio, bialafos = bilanafos
I	Inhibición del dihidropteroatosintetasa	Carbamatos	asulam
K1	Inhibición de la unión de los microtúbulos en la mitosis	Dinitroanilinas Fosforoamidatos Piridazina Acido benzoico Chloroacetamide	benefin=benfluralina, etalfluralina, pendimetalina amiprofos metil ditiopir, tiazopir DCPA = clortal Acetochlor
K2	Inhibición de la mitosis	Carbamatos	clorprofam
L	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)	Benzonitrilos Benzamida	diclobenil, clortiamida isoxaben
N	Inhibición de la síntesis de los lípidos (no ACCasa)	Tiocarbamatos Benzofurano	molinato, prosulfocarb, tiobencarb=bentiocarb, trialato etofumesato
O	Auxinas sintéticas (como la acción del ácido indolacético AIA)	Ácidos fenoxicarboxílicos Ácido benzoico Ácidos picolinico Ácidos quinolin carboxílicos	2,4-D, 2,4-DB, diclorprop, 2,4-DP, MCPA dicamba clopiralida, fluroxipir, picloram quinclorac, quinmerac
P	Inhibición del AIA	Ftalamato diflufenzopir	naptalam

Figura 2.1: Clasificación de Herbicidas por modo de acción [8]

2.2.2. Dinámica de los herbicidas en el suelo

La persistencia de los residuos bioactivos de los herbicidas se convierte en un efecto negativo cuando permanecen en el suelo hasta el cultivo subsiguiente, ya que, resultan en efectos fitotóxicos aditivos o sinérgicos en la rotación de cultivos. La persistencia en el suelo y el destino de los herbicidas en el ambiente están determinados por las interacciones que se dan entre las propiedades intrínsecas del herbicida, el ambiente edáfico y las condiciones meteorológicas. Los principales parámetros y procesos que intervienen son: a) Química del herbicida, b) Propiedades intrínsecas del suelo (textura, materia orgánica -MO-, pH), c) Propiedades extrínsecas del suelo (sistema de labranza), d) Factores meteorológicos (temperatura y precipitación), e) Otros (modo y dosis de aplicación, cobertura, historia del uso del herbicida, topografía) [9].

Propiedades físicoquímicas de los herbicidas

Las propiedades intrínsecas de los compuestos que definen el comportamiento de los herbicidas en el suelo son [9]:

1. Adsorción. Propiedad que retarda el transporte de los plaguicidas disueltos en el suelo, sin embargo, esta característica puede mejorar el transporte de partículas o de formas coloidales asociadas si la lluvia o el riego provocan la descarga de la materia en suspensión [10].
2. Solubilidad. Tendencia de un plaguicida a disolverse en agua y afecta su potencial de lixiviación. A medida que el agua se filtra través del suelo, lleva consigo las sustancias químicas solubles, este proceso se denomina lixiviación. Los plaguicidas altamente solubles tienen una tendencia a ser transportados en la escorrentía superficial. Los plaguicidas poco solubles aplicados al suelo que no fueron incorporados tienen un alto potencial de movilidad a través de la escorrentía o la erosión [11].
3. Persistencia. La persistencia de un plaguicida se mide en términos de vida media; es decir, el tiempo en días requerido para que un plaguicida se degrade a la mitad de la cantidad original [12].
4. Volatilidad. Propiedad que representa la tendencia del plaguicida a pasar a la fase ga-

seosa, el mecanismo consiste en que el flujo del compuesto se transfiere hacia la fase aire [13]. Si el plaguicida es altamente volátil y no es muy soluble en agua, es probable que se transfiera a la atmósfera y disminuye la disponibilidad para la lixiviación a las aguas subterráneas. Las condiciones ambientales como la temperatura, humedad y velocidad del viento afectan a las pérdidas por volatilización [11].

5. Ionizabilidad. Se refiere a la fuerza que presentan los grupos funcionales ionizables, si son básicos, ácidos, anfóteros (que se comportan como ácidos y bases) o no ionizables. Depende del pH al cual la mitad del químico se encuentra ionizado y la otra mitad en forma neutra (no ionizada) [9].

6. Estructura química y peso molecular. Las moléculas de bajo peso molecular y de estructuras más simples tienden a ser degradadas con mayor facilidad y por lo tanto, tienen cortas vidas medias, por el contrario, moléculas más complejas (ramificadas, saturadas, presencia de anillos aromáticos y sustituyentes halogenados) son más persistentes [9].

Factores edáficos que afectan la persistencia de los herbicidas

Las propiedades edáficas como factores influyentes en el comportamiento de los herbicidas en el suelo [9]:

1. pH. El pH afecta las cargas de las especies ionizables y la reactividad de las cargas de la superficie de los coloides.
2. Conductividad eléctrica. La influencia positiva de las sales en la adsorción de los herbicidas se debe en parte a que los cationes que componen las sales sustituyen los protones en las superficies minerales y orgánicas del suelo, causando una ligera disminución en el pH y aumentando la carga positiva del suelo y favoreciendo así la adsorción del compuesto [14].
3. Contenido de Materia Orgánica (MO). La actividad microbiana es mayor en los suelos con mayor porcentaje de materia orgánica, con lo cual la persistencia se puede ver reducida por la propia degradación microbiana. Sin embargo, el proceso de adsorción está asociado a la materia orgánica, esta puede prolongar la persistencia de los productos [9]
4. Textura. La adsorción puede variar marcadamente según la composición mineralógica del suelo. Los suelos con textura que varía de arenosa a franco; carecen de capacidad de adsorción para los plaguicidas, los cuales pueden pasar rápidamente a subsuelo y pueden

contaminar los niveles freáticos; debido a la baja capacidad de retención de agua fundamentalmente por su escaso espesor. En general, la mayoría de los plaguicidas se adsorben en suelos arcillosos y se retienen [3].

5. Contenido de humedad del suelo. Los herbicidas deben hallarse en solución para estar biodisponibles. Se ha observado que la ecuación del Porcentaje de disponibilidad en solución tiene una relación inversa con la adsorción y directa con el contenido de humedad del suelo. Períodos prolongados de sequía no solo reducen la eficacia de los herbicidas debido a la deficiente absorción por las malezas, sino que también reduce la tasa de degradación de los mismos. Una normal actividad microbiana está relacionada con óptimo contenido de humedad por lo tanto la persistencia se reduce como consecuencia de la degradación microbiana [9].

2.3. Harness®

Harness® es un herbicida de tipo preemergente que contiene el ingrediente activo Acetoclor. Tiene como titular, importador y distribuidor a Monsanto Comercial, S. de R. L. de C. V. Se recomienda para el control preemergente selectivo de malezas de hoja ancha y angosta en los cultivos de maíz y agave [15].

2.3.1. Composición porcentual

En la Tabla 2.2 se puede observar la composición porcentual del ingrediente activo Acetoclor y los ingredientes inertes que conforman el herbicida.

Ingrediente activo	Porcentaje en peso
Acetoclor: 2-cloro-N-etoximetil-6'etilacet-o-toluidida [Equivale a 839 g de i.a/L a 20°C]	73.5
Ingredientes inertes	
Protector, solvente, emulsificante, estabilizador y portador	24.7
Total	100

Tabla 2.2: Composición porcentual en peso de los ingredientes activo e inertes que conforman el Harness® [15]

2.3.2. Malezas que controla

Según la etiqueta del envase original del agroquímico [15], este posee la capacidad de controlar los siguientes tipos de malezas:

Hoja Angosta

Zacate pitillo (*Ixophorus unisetus*), zacate pinto o choneano (*Echinochloa colonum*), zacate de agua (*Echinochloa crusgalli*), zacate sabana (*Brachiaria plantaginea*), zacate cola de zorra (*Setaria spp.*), zacate pata de gallina (*Eleusine indica*), zacate escamoso o salada (*Leptochloa filiformis*), zacate ilusión (*Panicum trichoides*), zacate triguillo (*Panicum mileaceum*), zacate pata de gallo (*Digitaria sanguinalis*), zacate cadillo o huachapore (*Cenchrus echinatus*), coquillo amarillo de semilla (*Cyperus esculentus*).

Hoja Ancha

Quelite o bledo (*Amaranthus hybridus*), polocote (*Tithonia tubaeiformis*), Verdolaga (*Portulaca oleracea*), chual (*Chenopodium album*), flor amarilla (*Melampodium, divaricatum*), aceitilla (*Bidens pilosa y Bidens frondosa*), cabeza de negro (*Borreria asperifolia*), hierba del pollo (*Conmelina difusa*), chicalote (*Argemone mexicana*), flor blanca (*Richardia escarba*).

2.3.3. Época de aplicación

El suelo a tratar debe de estar bien preparado y libre de terrones grandes. Aplicar Harness® inmediatamente después de la siembra, antes de la emergencia de las malezas y el cultivo. Una vez emergida del suelo, las malezas no son controladas por Harness®. La lluvia o riego posterior a la aplicación es necesaria para activar el producto [15].

2.3.4. Dosis de aplicación

Harness® controla las malezas antes de que emerjan, por lo que las dosis a usarse varían dependiendo de la textura del suelo [15], las cantidades de herbicida de acuerdo al tipo de suelo se pueden observar en la Tabla 2.3.

Tipo de suelo	Dosis (L/ha)
Suelos ligeros (arenosos)	1.5
Suelos medianos (francos y limosos)	2
Suelos pesados (arcillosos)	2.5

Tabla 2.3: Dosis de aplicación de Harness® en L/ha de acuerdo al tipo de suelo [15]

2.3.5. Método de preparación y aplicación del producto

La dosis recomendada de Harness® debe diluirse en suficiente agua para lograr un cubrimiento total y uniforme del terreno. Para aspersiones terrestres, se recomienda un volumen de aspersión de 300-400 litros de agua/ha en cobertura total [15].

2.4. Acetoclor

El acetoclor es un herbicida pre-emergente para el control de malezas de hoja ancha, zacates anuales y coquillo de semilla. Es selectivo a los cultivos de maíz, suprime la maleza durante la etapa crítica en que afecta o compite contra el cultivo en los primeros 45 días, permitiendo llegar al “cierre” del cultivo limpio sin maleza. Este producto puede ser combinado con otros herbicidas para ampliar su espectro de control [16].

2.4.1. Propiedades Físicoquímicas

En la Tabla 2.4 se pueden observar las características y propiedades físico-químicas del producto [16].

Nombre Común	ACETOCLOR
Nombre Químico	2-cloro-N-extoximetil-6'-etilacetato-toluidida
Clase	Cloro acetamida
Fórmula condensada	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂
Fórmula estructural	
Peso Molecular	269.76 g/mol
Estado físico	Líquido denso de color ámbar claro a violeta
Densidad específica	1.10 g/ml a 30 °C, 1.136 g/ml a 20 °C
Punto de fusión	>100 °C
Solubilidad en agua	233 mg/L a 25 °C
Estabilidad	Estable en condiciones normales de temperatura y presión
Compatibilidad	Atrazina, Simazina, Terbutrina, Paraquat
pH	5.6 (1% en dioxano)

Tabla 2.4: Propiedades Fisicoquímicas del Acetoclor [16]

2.4.2. Modo de acción

El producto es absorbido por la radícula y posteriormente por las raíces, se trasloca acropétalmente y se concentra en las partes vegetativas (hojas y tallos) más que en las partes reproductivas (flores y frutos). Afecta o inhibe la división celular, interfiere en la absorción y transporte de metabolitos, afecta también la síntesis de aminoácidos, proteínas y moléculas relacionadas con el metabolismo de las giberelinas y la biosíntesis de ácidos grasos [16].

2.4.3. Aplicación de acetoclor en cultivo de maíz

La efectividad de los herbicidas preemergentes para el control de especies de malezas que se presentan en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en el centro y sur del estado de Texas. Destacan las especies: *Panicum fasciculatum*, *Echinochloa crus-galli*, *Urochloa texana*, *Brachiaria reptans*, *A. palmeri*, *Acalypha ostryifolia* y *Helianthus annuus*. Dichas plantas presentan una amenaza al cultivo debido a su capacidad de sobrevivir en muchos ambientes por sus características biológicas, ya que, tienen una ventana de germinación prolongada, un hábito de crecimiento fuerte y un sistema productor de semillas prolífico. Sin embargo, el autor encontró que el Acetoclor (presentación Degree Xtra, Harness y Warrant), ya sea solo o en combinación con otros herbicidas pueden controlar desde el 93 % de la población

hasta un 100 % [17].

2.4.4. Impactos ambientales por uso de acetoclor

En la etiqueta del envase original del Harness® se observa que éste es altamente tóxico si se ingiere o se inhala, además de indicar que, una vez realizada la aplicación, debe esperarse 12 horas antes de volver a entrar al cultivo [14]. Debido a su baja absorción, alta solubilidad en agua y larga persistencia, el acetoclor tiene un alto potencial para contaminar el agua y el suelo [18, 19]. La vida media de biodegradación del acetoclor es baja, esta oscila entre 8 y 100 días en el medio natural y aproximadamente el 33 % del acetoclor podría degradarse después de 1 mes cuando se aplica a una concentración de 10 mg de acetoclor / kg de suelo [20]. Se han detectado concentraciones de 0.03 – 709.37 mg/Kg en muestras de suelo del noreste de China y que las concentraciones residuales de acetoclor en suelos de cultivos de maíz llega a alcanzar los 54.76 mg/kg [21].

Las materias activas de los herbicidas son contaminantes de suelo, producto y aire. Las partículas por acción del viento, por acción humana, pueden ser llevadas hacia diferentes lugares insertándose en los productos que a veces son consumidos en fresco. Este herbicida disminuye la diversidad de las comunidades microbianas [19, 22].

2.4.5. Riesgo en la salud por uso de acetoclor

El acetoclor incrementa el riesgo de contraer cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer colorectal y melanoma [23]. El acetoclor es un carcinógeno y un disruptor endócrino y lo ha caracterizado como un agente de clase B-2 (probable carcinógeno) [24].

2.4.6. Marco Normativo del acetoclor

De acuerdo con el Codex Alimentarius de la FAO (2016), el límite máximo permisible de presencia de acetoclor en el commodity (Maíz) es de 0.02 mg/kg.

2.5. Biotecnología del medio ambiente

La biotecnología se presenta como un conjunto de tecnologías con potencial para contribuir al desarrollo sostenible. La biorremediación es un actor muy importante en la problemática de la contaminación ambiental, por lo cual, han volteado aver la biotecnología ambiental [25]

Dependiendo de la naturaleza de los contaminantes, los métodos de remediación de suelos contaminados se clasifican en: 1) Físicoquímicos, que son aquéllos que utilizan las propiedades físicas y químicas de los compuestos o del medio contaminado para transformar, separar o inmovilizar dicha sustancia [26] y 2) Biológicos, también denominados Biorremediación, aquéllos que aprovechan el potencial metabólico de organismos vivos (bacterias, hongos y plantas) para limpiar ambientes contaminados [27].

2.5.1. La Biorremediación

La biorremediación se entiende como la aplicación de microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para la restauración del ambiente [28]. Esta tecnología actúa a través de las intervenciones de la diversidad biológica para los propósitos de mitigación (y siempre que sea posible, la eliminación) de los efectos nocivos causados por los contaminantes ambientales en un sitio dado [29].

2.5.2. Biorremediación de plaguicidas por medio de microorganismos

Los compuestos tóxicos más usados son los plaguicidas, los cuales en muchos casos son fuentes de carbono y donadores de electrones para algunos microorganismos del suelo [30]. Una característica importante de los microorganismos es la capacidad de adaptación a través de la mutación para desarrollar la habilidad de degradar compuestos difícilmente degradables o tóxicos, probablemente debido a la evolución de sistemas de transporte más adecuados a través de la pared celular [31]. Con las reacciones metabólicas se transforman a los plaguicidas conduciendo a cambios en su estructura química por reacciones de oxida-

ción, reducción, hidrólisis, sustitución o eliminación de grupos funcionales, dando lugar a compuestos inorgánicos como CO_2 , H_2O , haluros, amonio y fosfatos, entre otros. En este caso al proceso se le conoce como degradación [32]. El metabolismo de los plaguicidas incluye un proceso de tres fases. En la fase I, el compuesto original es transformado a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y generalmente se genera un producto más soluble en agua y menos tóxico que el compuesto original. La segunda fase incluye la conjugación del plaguicida o de sus metabolitos a azúcares y aminoácidos, lo cual también resulta en una mayor solubilidad en agua y una menor toxicidad. La tercera fase incluye la conversión de los metabolitos de la fase II en conjugados secundarios, que son menos tóxicos. En estos procesos, los hongos y las bacterias generan enzimas intra o extracelulares como son las hidrolasas, peroxidasas, oxigenasas y otras [33].

2.5.3. Procesos microbianos en la biorremediación de suelos

Los procesos microbianos utilizados en el tratamiento de suelos contaminados son:

1. Biosorción. Los compuestos pueden ser absorbidos pasivamente por los componentes celulares de los microorganismos debido a atracciones electrónicas. Al tener el contaminante carga positiva, son atraídos por las cargas negativas de los grupos carboxilos, fosforilos y aminos presentes en las paredes celulares, membranas y material extracelular de bacterias y hongos. Una vez adheridos a la superficie celular algunos contaminantes se internalizan en la célula, donde los cationes metálicos pueden ser ligados o precipitados dentro de vacuolas u otras estructuras para minimizar su toxicidad [34].
2. Bioprecipitación. Ciertas sustancias como los metales pesados pueden ser inmovilizados eficientemente debido a la acción de bacterias con la capacidad de reducirlos a un estado redox menor, reduciendo la biodisponibilidad de estos elementos [35]. Este fenómeno se conoce como reducción biológica, y es reconocido como un proceso metabólico importante que controla el transporte y el destino de los metales pesados en el suelo [36].
3. Biolixiviación (heterotrófica y autotrófica). El proceso de biolixiviación heterotrófica consiste en la acidificación del medio por la movilización de protones a través de la membrana plasmática, ocasionando una liberación de elementos a través de varias rutas; la competencia entre protones y metales en un complejo metal-anión o cuando se encuentran

en una forma asimilada con algún otro elemento, lo cual genera una liberación de cationes metálicos. También el metabolismo heterotrófico puede ocasionar lixiviación debido a la producción de ácidos orgánicos y sideróforos [37].

4. Biovolatilización. Algunas bacterias y hongos pueden llevar a cabo la metilación de contaminantes. Los compuestos metilados difieren en su solubilidad, toxicidad y volatilidad [38]. Las sustancias metiladas pueden ser reducidos a otras formas por medio de reacciones enzimáticas bacterianas [35].

2.5.4. Biorremediación de acetoclor

El proceso de degradación de plaguicidas a menudo involucra a más de una especie de microorganismos, ya que cada uno contribuye con diferentes reacciones; por ello es importante la presencia de consorcios microbianos. Ejemplos de microorganismos que degradan plaguicidas son los basidiomicetos y bacterias tales como las gamma-Proteobacteria (*Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Plesiomonas*), beta-Proteobacteria (*Burkholderia*, *Neisseria*), alfaproteobacterias (*Sphingomonas*), actinobacterias (*Micrococcus*) y Flavobacterias (*Flavobacterium*) [39]. El género *Bacillus sp.* tiene la capacidad de degradar el compuesto de forma eficiente (>60 %) después de dos días bajo condiciones de pH 6.0, 42 °C en solución y concentración inicial de 30 mg/L. Posteriormente identificó un producto de degradación de acetoclor, 2-cloro-N- (2-metil-6 etilfenil) acetamida (CME-PA), y dos hormonas de crecimiento vegetal, ácido indolacético (IAA) y zeatina. De este modo, concluyó que la inoculación de la cepa en el suelo contaminado podría mejorar el crecimiento de la planta (>9.4 %), la absorción de fósforo (>14.8 %) y disminuir la acumulación (>70 %) y los efectos tóxicos del acetoclor en las plántulas [40]. La lombriz de tierra es el invertebrado dominante en el suelo y promueve la descomposición de contaminantes orgánicos. Tanto los microorganismos autóctonos como las lombrices de tierra desempeñan funciones importantes en la degradación del acetoclor. Este resultado está relacionado con el pH neutralizado, una mayor actividad enzimática y una mayor diversidad y riqueza de la comunidad microbiana del suelo en presencia de lombrices de tierra. La lombriz de tierra estimula degradadores autóctonos como *Sphingomonas* y *Microascales*, supuestos degradadores intestinales como *Mortierella* y *Escherichia coli* y especies

de degradación anaeróbica como *Rhodococcus*, *Pseudomonas fulva* y *Methylobacillus* [41]. Las cepas bacterianas *Sphingobium quisquiliarum* DC-2 y *Sphingobium baderi* DE-13 fueron aisladas de un lodo activado y se encontró que *Sphingobium quisquiliarum* transforma el acetoclor en un intermedio transitorio, 2-cloro-N-(2-metil-6-etilfenil)acetamida (CMEPA), como el *Bacillus sp.*, pero después, el CMEPA se transformó en 2 metil6 -etilnilina (MEA), y este a su vez no pudo ser degradado por la cepa DC-2. La *S. baderi* DE-13, no pudo degradar el acetoclor, pero presentó capacidad para transformar MEA en un intermedio, 2-metil-6-etilaminofenol (MEAOH), y este se transformó adicionalmente en 2 metil-6 etilbenzoquinonimina (MEBQI), que se mineralizó por medio de esta misma cepa. A partir de lo anterior, el autor clonó un gen, *cmeH*, que codifica una amidasa que catalizó la escisión del enlace amida de CMEPA a partir de la cepa DC-2. La *CmeH* se expresó en *Escherichia coli* BL21. Al final, *CmeH* hidrolizó eficazmente CMEPA y otros herbicidas importantes, como propanil, fenoxaprop-petil y clodinafop-propargyl [42]. De acuerdo a la información recopilada, se puede inferir que el éxito de la biorremediación de acetoclor empleando microorganismos es altamente dependiente de las características físico-químicas del herbicida y de las condiciones de las propiedades del suelo como el pH, el porcentaje de materia orgánica y la textura, ya que afectan su biodisponibilidad. Sin embargo, la diversidad microbiana difiere de un medio a otro, es muy extensa y presenta diferentes mecanismos de acción en la degradación de este compuesto. Las tecnologías de biorremediación han tenido aplicaciones limitadas debido a las restricciones impuestas por el sustrato, la variabilidad ambiental, el potencial limitado de biodegradación y la viabilidad de los microorganismos de origen natural. Es por ello que la clave del éxito de la biorremediación está en seguir profundizando la investigación científica en cuanto a la complejidad de las comunidades microbianas para obtener razones válidas que permitan utilizar adecuadamente estas tecnologías para el bienestar y la seguridad de la sociedad [43].

2.6. Literatura citada

- [1] EPA, (2016). Basic Information about pesticide ingredients.
<http://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products>.
- [2] García Hernández, J., Leyva Morales, J. B. Matínez Rodríguez, I. E., Hernández Ochoa, M. I., Aldana Madria, M. L., Rojas García, A. E., Perera Rios, J. H. (2018). Estado actual de la investigación sobre plaguicidas en México. In *CONACYT*.
- [3] Rangel, P., (2017). Determinación de herbicidas en las matrices ambientales: suelo y agua, en Papantla, Veracruz. *Centro Interdisciplinario de investigadores y estudios sobre medio ambiente y desarrollo*. Instituto Politécnico Nacional.
- [4] Eldridge, B., (2008). Pesticide application and safety training for applicators of public health pesticides. California.
- [5] De la Rosa Cruz, N. L., Sánchez-Salinas, E., Ortiz-Hernández, M. L. (2014). Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 5(1), 47–67. <https://doi.org/10.7603/s40682-014-0004-8>.
- [6] Malato, R. S., Maldonado, R. M., Blanco, J. G. 2001. Descontaminación de Aguas de Lavado de Plaguicidas Mediante Photocatálisis Solar. CIEMAT, Madrid. 189p.
- [7] Rosales, E., Sánchez, R., (2006). Clasificación y uso de los herbicidas por su modo de acción. México.
- [8] Nikoloff, N., (2013). Genotoxicidad de herbicidas de importancia agroeconómica en Argentina. Universidad Nacional de la Plata.
- [9] Montoya, J. C. (2017). kairós. *Comportamiento de los herbicidas en el suelo*, 1–8.
- [10] Tang, X., Zhu, B., Katou, H. (2012). A review of rapid transport of pesticides from sloping farmland to surface waters: Processes and mitigation strategies. *Journal of Environmental Sciences*, 24(3), 351–361.
- [11] Geyikçi, F., (2011). Pesticides and their movement surface water and ground water, en: Stoytcheva, M. (Ed.), *Agricultural and Biological Sciences “Pesticides in the modern*

world - risks and benefits". *InTech*, pp. 411– 422.

[12] Bedmar, F., Costa, J. L., Gimenez, D., Daniel, P. (2013). Comparación de dos métodos de obtención de índices para la estimación del riesgo de lixiviación de plaguicidas en dos perfiles de suelo. *AgriScientia*, 30(2)(0), 69–78.

[13] Morell, I., Candela, L., (1998). Plaguicidas: aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos. Castelló de la Plata: Universitat Jaume, España.

[14] De Jonge H. y De Jonge L.W. (1999). Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. *Chemosphere*, 39, 753-763.

[15] Montanto. (2020). Etiqueta del fabricante Harness.

[16] Acetogram. FICHA TÉCNICA. Agronova. www.agronova.com.mx. Recuperado de: <https://www.agronova.com.mx/Pdfs/acetogram.pdf>.

[17] Janak, T. W., Grichar, W. J. (2016). Weed Control in Corn (*Zea mays* L.) as Influenced by Preemergence Herbicides. *International Journal of Agronomy*, 2016(0), 1–9.

[18] Hildebrandt, A., Guillamón, M., Lacorte, S., Tauler, R., Barcelo, D. (2008). Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Research*, 42(0), 3315–3326.

[19] Liu, J., Zhang, X., Xu, J., Qiu, J., Zhu, J., Cao, H., He, J. (2020a). Anaerobic biodegradation of acetochlor by acclimated sludge and its anaerobic catabolic pathway. *Science of the Total Environment*, 748, 1–10.

[20] Luo W, Gu QY, Chen WT, Zhu XC, Duan ZB, Yu XB (2015) Biodegradation of Acetochlor by a newly isolated *Pseudomonas* strain. *Appl Biochem Biotechnol* 176:636–644.

[21] Li, Y., Liu, X., Wu, X., Dong, F., Xu, J., Pan, X., Zheng, Y. (2018). Effects of biochars on the fate of acetochlor in soil and on its uptake in maize seedling. *Environmental Pollution*, 241(0), 710–719.

[22] Vilca, H. (2019). Análisis de la residualidad de plaguicidas en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea*) mediante HPLC (Cromatografía Líquida) para las zonas de Sachaca y Cayma del Departamento de Arequipa. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

- [23] Lerro, C. C., Koutros, S., Andreotti, G., Hines, C. J., Blair, A., Lubin, J., Beane Freeman, L. E. (2015). Use of acetochlor and cancer incidence in the Agricultural Health Study. *International Journal of Cancer*, 137(5), 1167–1175.
- [24] EPA, U.S, (2006). Report of the Food Quality Protection Act (FQPA) tolerance reassessment progress and risk management decision (TRED) for acetochlor. Report EPA738-R-00- 009. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- [25] Guerrini-Schenberg AC (2010). Biotechnology and sustainable development. *Estud Avançados*. 7-17.
- [26] Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J. A., De la Rosa-Pérez, D. A. (2005). Suelos contaminados por metales pesados y metaloides. México: INE Semarnat.
- [27] Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 237–241.
- [28] Muñoz A, Guillen G. (2015). Biorremediación: fundamentos y aspectos Sistema de biorremediación para la regeneración de suelos hidromorfo del estero Chicharrón y Río Cucaracha de la comuna Montañita, Provincia de Santa Elena. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- [29] Prasad MN V, Freitas H, Fraenzle S, Wuenschmann S, Markert B. (2010). Knowledge explosion in phytotechnologies for environmental solutions. *Environ Pollut.*158(1):18–23.
- [30] Galli, C. (2002). Degradación por medios bacterianos de compuestos químicos tóxicos. Comisión Técnica Asesora en Ambiente y desarrollo sustentable. Buenos Aires, Argentina.
- [31] Razek, M., Folch-Mallol J. L., PerezgasgaCiscomani L., Sánchez-Salinas E., Castrejón-Godínez M. L. and OrtizHernández M. L. (2013). Optimization of methyl parathion biodegradation and detoxification by cells in suspension or immobilized on tezontle expressing the opd gene. *J Environ Sc. Health*, B. 48(6): 449-461.
- [32] Guzmán-Alcalá M. (2007). La contaminación de suelos y aguas. En: Publidisa (Ed). Introducción a la contaminación medioambiental: plaguicidas, metales pesados y técnicas de remediación con arcillas y organoarcillas. Sevilla España. pp 19-50. De la rosa (biosurfactantes).

- [33] Ortiz-Hernández, M.L., Sánchez-Salinas, E., Olvera-Velona, A. Folch, J.L. (2011). Pesticides in the Environment: Impacts and its Biodegradation as a Strategy for Residues Treatment, Pesticides. In: Stoytcheva M. (Ed.). Formulations, Effects, Fate. InTech. Rijeka, Croatia. pp. 551-574.
- [34] Kirchman, D. L. (2012). Processes in microbial ecology. UK: Oxford University Press.
- [35] Valls, M., & De Lorenzo, V. (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 327-338.
- [36] Volke-Sepúlveda, T., Velasco-Trejo, J. A., De la Rosa-Pérez, D. A. (2005). Suelos contaminados por metales pesados y metaloides. México: INE Semarnat.
- [37] Gadd, G. M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122(2-4), 109-119.
- [38] Tabak, H. H., Lens, P., van Hullebusch, E. D., Dejonghe, W. (2005). Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides –1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination and influencing metal toxicity and transport. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 4(3), 115-156.
- [39] Velázquez-Fernández, J.B., Martínez-Rizo, A.B., Ramírez-Sandoval, M., Domínguez-Ojeda, D. (2012). Biodegradation and Bioremediation of Organic Pesticides. In: R.P. Soundararajan (Ed.). Pesticides-Recent Trends in Pesticide Residue Assay. InTech. Rijeka, Croatia. pp. 253-272.
- [40] Li, H., Wang, Y., Fu, J., Hu, S., Qu, J. (2020). Degradation of acetochlor and beneficial effect of phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. ACD-9 on maize seedlings. *3 Biotech*, 10(2), 1–9.
- [41] Hao, Y., Zhao, L., Sun, Y., Li, X., Weng, L., Xu, H., Li, Y. (2018). Enhancement effect of earthworm (*Eisenia fetida*) on acetochlor biodegradation in soil and possible mechanisms. *Environmental Pollution*, 242, 728–737.
- [42] Li, Yi, Che, Q., Wang, C.-H., Cai, S., He, J., Huang, X., Li, S.-P. (2013). Degradation

of acetochlor by consortium of two bacterial strains and cloning of a novel amidase gene involved in acetochlor-degrading pathway. *Bioresource Technology*, 148, 628–631.

[43] Garzón, J., Rodríguez Miranda, J., Hernández Gómez, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad Y Salud*, 19(2), 309-318.

Capítulo 3

Determinación de las propiedades físico-químicas de un suelo con presencia de acetoclor

En este capítulo se determinan las propiedades físico-químicas de un suelo con presencia de acetoclor, se describe una breve introducción de las características generales reportadas de este tipo de suelo, resaltando si se han reportado cambios en pH, porcentaje de materia orgánica, conductividad eléctrica y/o textura por la presencia de acetoclor. A continuación, se describen los esquemas experimentales, análisis estadísticos y procedimientos; posteriormente, se muestran los resultados junto con la discusión y conclusiones. Finalmente, se enlita la bibliografía consultada en el presente capítulo.

3.1. Introducción

El suelo es un material con espacios porosos constituido de partículas sólidas de tamaños variables ($1\ \mu\text{m}$ - $2000\ \mu\text{m}$) que se encuentran entre arcilla, limo y arena. Es un sistema estructurado, heterogéneo y discontinuo fundamental irremplazable, parte de su origen se encuentra en la materia orgánica y los minerales . Se conforma también como un microecosistema con características físico-químicas específicas y diferenciadas de acuerdo al tipo, origen y condiciones ambientales. Ciertos parámetros proporcionan las condiciones

óptimas para el desarrollo de la vida, como plantas y microorganismos [1].

La contaminación del suelo por agroquímicos puede derivar por sus modos de entrada al recurso, como la aplicación directa, el derrame accidental del producto, el arrastre de partículas por acción pluvial, entre otros. En la acumulación de residuos de plaguicidas influye el tipo de suelo, ya que, los arcillosos y con alto contenido de materia orgánica, retienen más los compuestos que los arenosos [1]. La capacidad del suelo como reactor natural, depende de características como porcentaje de materia orgánica, contenidos de carbonatos, óxidos e hidróxidos de hierro y magnesio; la textura, capacidad de intercambio catiónico, pH, permeabilidad y actividad biológica [2]. Los parámetros de pH y conductividad eléctrica fungen como indicadores indirectos para determinar y delimitar áreas de suelo que presentan contaminación residual [3]. La aplicación de agroquímicos puede ocasionar cambios en los valores de estos parámetros, por lo tanto, el propósito de este capítulo es realizar las mediciones para determinar las condiciones que presenta un suelo expuesto a concentraciones de acetoclor.

3.2. Diseño experimental y análisis de datos

Para este estudio, se planteó realizar las pruebas para medir los valores de pH, conductividad eléctrica y porcentaje de materia orgánica. Los datos obtenidos se sometieron a un diseño experimental denominado completamente al azar y con prueba Tukey.

3.3. Procedimientos experimentales

Para llevar a cabo este estudio, se identificó una parcela con antecedentes y aplicación actual de acetoclor para la producción de maíz. Se realizó un protocolo de muestreo con base en la NOM-021-RECNAT-2000 [4] para solicitar las muestras a la empresa Bayer Cropscience con sede en Guadalajara, Jalisco.

Una vez obtenidas las muestras con la información, se realizó un mapa de ubicación de su origen por medio de la paquetería de ArcMap y se midieron las magnitudes de los parámetros físico-químicos del suelo como pH por medio de la metodología AS-02, conductividad

eléctrica (AS-18), porcentaje de materia orgánica (Método de Walkley Y Black) y textura (AS-09) descritas en la NOM-021-RECNAT-2000 [4].

Aunado a esto, se determinó la concentración de acetoclor en el suelo por medio del análisis de la absorbancia medida a través de espectrofotometría de luz UV-Vis. Ya que, se ha demostrado la eficacia que este método de análisis para diagnóstica la presencia y concentración de plaguicidas en un medio como agua o suelo. [5].

3.3.1. Localización, muestreo, preparación y almacenamiento de muestras de suelo.

En primer lugar, se redactó un documento (Documento 1, Anexos) de solicitud de muestras de suelo, basado en la Norma Oficial Mexicana (NOM-021-RECNAT-2000), de un cultivo de maíz con antecedentes de acetoclor, a continuación, se estableció contacto con un ingeniero investigador de la empresa Bayer Cropscience, quien realizó la ubicación de una parcela que reunió las condiciones descritas previamente.

Dentro de la información solicitada se encontraba: Nombre del sitio, Localidad, Municipio, Estado, Coordenadas, Cultivo actual y cultivo anterior.

A partir de las coordenadas proporcionadas se diseñó el mapa de ubicación por medio de la paquetería ArcMap. Se descargaron de la página del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) las capas de Uso de Suelo con la siguientes características:

Información estructurada en 13 capas de datos (6 capas de polígonos, 6 capas de puntos y 1 capa de líneas), en las cuales se incluyen las áreas agrícolas clasificadas de acuerdo a la forma de recibir el agua los cultivos y por su ciclo agrícola y la distribución de la cubierta vegetal en su estado original, en sus fases sucesionales y la vegetación inducida de acuerdo con el sistema de clasificación de Uso del Suelo y Vegetación del INEGI. El conjunto de datos se generó durante el periodo 2015 - 2017, se derivó con base en la información presentada en la Serie IV de Uso del Suelo y Vegetación y actualizada con imágenes del satélite LANDSAT del año 2014. Se presenta en un conjunto nacional los 149 conjuntos de datos escala 1:250 000 del país.

3.3.2. Cálculo de concentración de acetoclor en el suelo

Se consiguió el producto comercial Harness® con acetoclor como ingrediente activo, se realizó una dilución de 1:2500 mL en diclorometano y se leyó con el espectrofotometro de luz UV-Vis para obtener la concentración (mg/mL), longitud de onda y absorbancia. Se pesó 1g de suelo, se filtró con diclorometano por medio de papel filtro hasta obtener una dilución de 25 ml y se leyó en el espectrofotometro de luz UV-Vis para determinar su presencia como en la metodología de Fu *et al.* (2019) [5].

3.3.3. Análisis de las propiedades físico-químicas del Suelo

3.3.2.1 Medición de pH

Se pesaron 10 g de suelos y se depositaron en vasos de precipitado de vidrio con 20 mL de agua destilada, con una varilla se agitó a intervalos de 5 minutos durante 30 minutos y se tomaron lecturas de pH con ayuda de un potenciómetro (Figura 3.1).

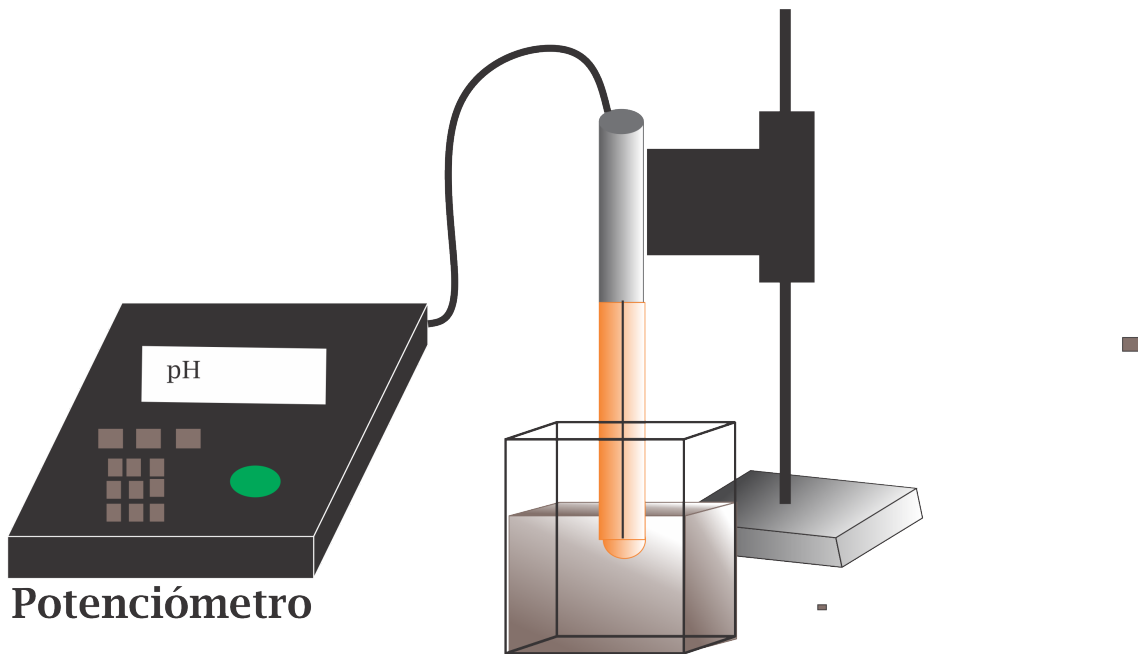


Figura 3.1: Medición de pH por el método AS-02 (NOM-021-RECNAT-2000) [4]

3.3.2.2. Medición de Conductividad eléctrica (CE)

Se pesaron 100g de suelo, se agregaron 100 mL de agua y se dejó reposar 24 horas sin mover sobre una superficie no metálica ni de cemento. Para el extracto al vacío, pasadas las 24 horas, se cortó un papel filtro del tamaño del embudo de Büchner, se vertió la muestra en matraces de kitazato, se encendió la bomba de vacío, se vertió el filtrado en un vaso de precipitado y se realizó un doble filtrado. Al final, se tomó la lectura con el potenciómetro (Figura 3.2) [4].

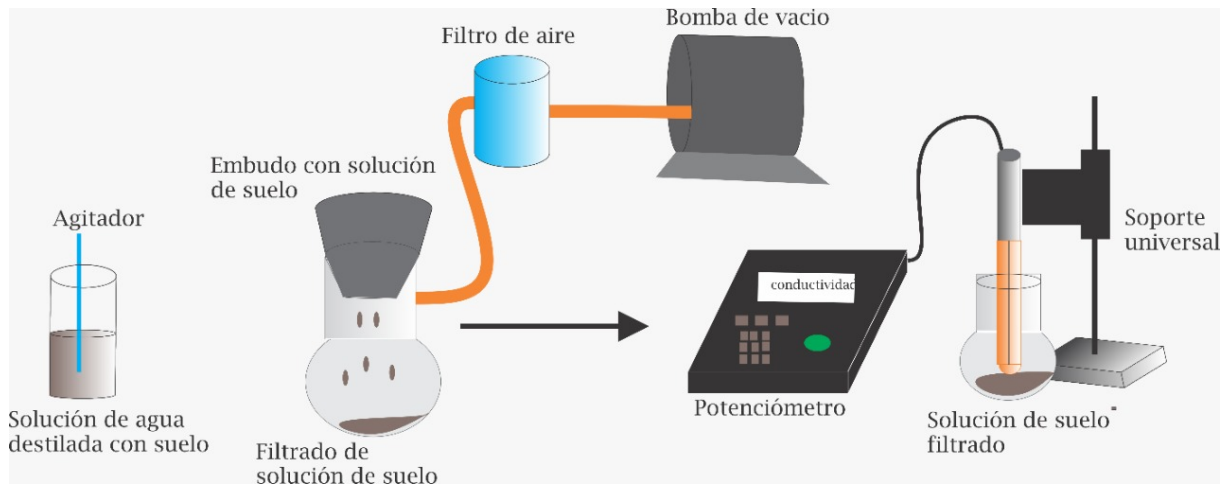


Figura 3.2: Conductividad eléctrica (dS/m) por el método AS-18 (NOM-021-RECNAT-2000) [4]

3.3.2.3. Prueba de Materia Orgánica (MO %)

El porcentaje de materia orgánica (%MON), como indica la metodología de Walkley y Black, pesando 0.5 g de suelo en un matraz de Erlenmeyer de 500 mL, se añadieron 500 mL de Dicromato de potasio 1.0 N, se agitó suavemente y se agregaron 20 mL de Ácido Sulfúrico concentrado, se agitó un minuto y se dejó reposar por 20 minutos. Se adicionaron 200 mL de agua destilada, 10 mL de Ácido fosfórico concentrado y 24 gotas de indicador de Difenilamina. Finalmente se tituló con Sulfato ferroso 0.5 N hasta que la muestra obtuvo un color azul (Figura 3.3) [4].

Cálculos

$$\%MO = 10\left(1 - \frac{M}{B}\right) * 1.34 \quad (3.1)$$

M= mL de sulfato ferroso en la muestra

B= mL de sulfato ferroso en el blanco

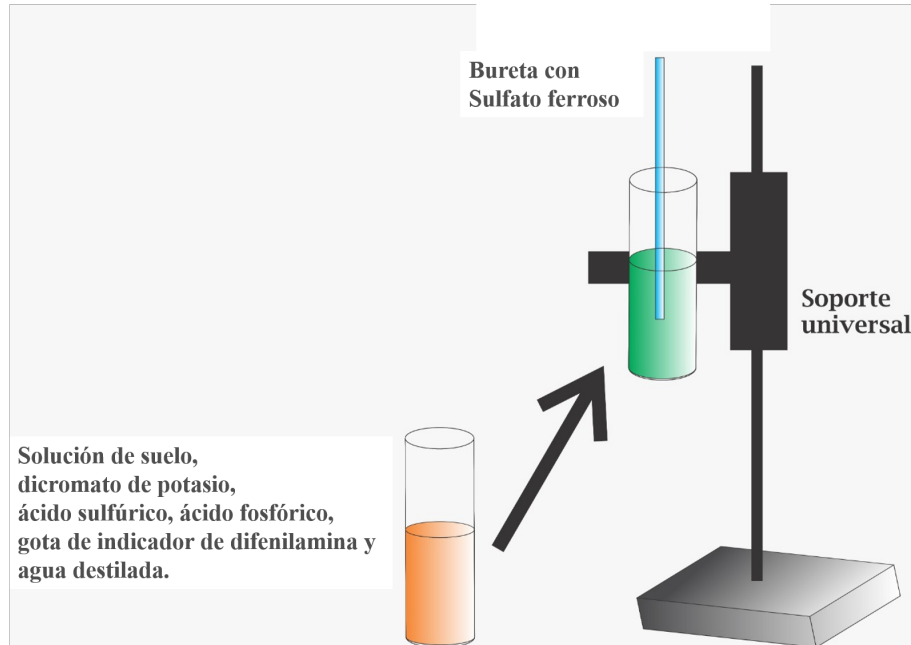


Figura 3.3: Medición de materia orgánica por el método Walkley y Black (NOM-021-RECNAT-2000) [4]

3.3.2.4. Determinación de Textura del Suelo

Se pesaron 60 g de suelo, se depositó en un vaso de precipitado de 500 mL, se agregó 40 mL de agua oxigenada, se dejó secar y se repitieron estos pasos hasta que cesó la efervescencia. Posteriormente, se pesaron 50 g de suelo seco, se adicionó agua hasta cubrir la superficie con una lámina de 2 cm más 10 mL de solución defloculante y se dejó reposar 15 min. Una vez húmeda la muestra, se mezcló con un agitador. Después, se pasó el contenido a una probeta de 1000 mL enjuagando el vaso con una piceta, se agregó agua destilada hasta completar el litro con el hidrómetro dentro de la suspensión. Se tomó la primera lectura a los 40 segundos y la segunda después de 2 horas junto con la temperatura (Figura 3.4) [4].

Se corrigieron las lecturas del hidrómetro agregando $0.36 \cdot ^\circ\text{C}$ arriba de $19.5 \cdot ^\circ\text{C}$. La lectura a los 40 segundos multiplicado por 2 es el porcentaje de arcilla + limo. Restando de 100, se

obtuvo el porcentaje de arena. La lectura obtenida en 2 horas, se multiplicó por 2 siendo el porcentaje de arcilla. El porcentaje de limo se obtuvo por diferencia. Con los porcentajes de arena, limo y arcilla, se determinó la textura correspondiente con el Triángulo de Texturas [4].

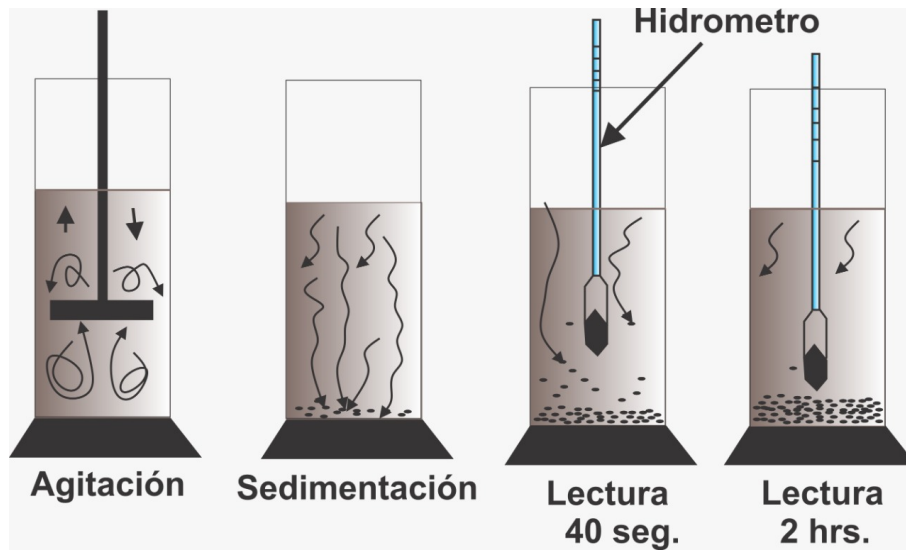


Figura 3.4: Medición de textura de suelo por el método de Bouyoucos [4]

3.4. Resultados y discusiones

Los resultados obtenidos por medio de la metodología previamente descrita se muestran a continuación:

3.4.1. Información de la zona de muestreo

Las muestras de suelo testigo y suelo con antecedente de acetoclor se obtuvieron de una parcela utilizada para la producción de maíz con la siguiente información y a partir de la cual, se diseñó un mapa de ubicación (Figura 3.5):

Información básica de la parcela muestreada

Fecha de muestreo: Julio de 2021

Nombre del sitio: “Las Agujas”

Localidad: San Agustín

Municipio: Jamay

Estado: Jalisco

Coordenadas: 20.249075 -102.626954

Cultivo actual: Maíz

Cultivo anterior: Trigo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable

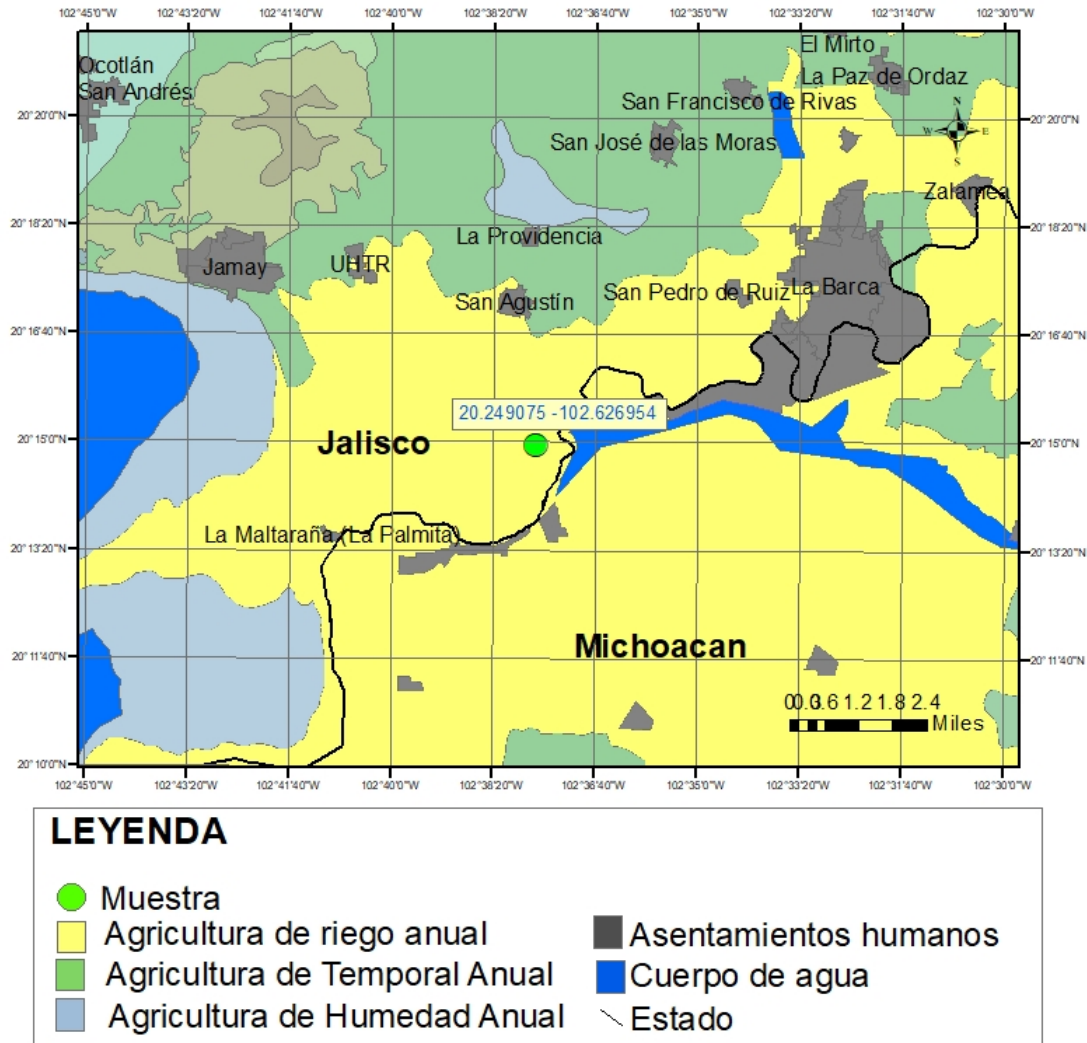


Figura 3.5: Mapa de ubicación de zona de muestreo, Jamay, Jalisco

3.4.2. Concentración de acetoclor en suelo

De acuerdo con la dilución obtenida a partir del Harness®[®], se obtuvo una concentración de acetoclor de 0.3356 mg/mL. A partir de la lectura, se definió una longitud de onda de 278 nm y una absorbancia de 1.88 u. a.

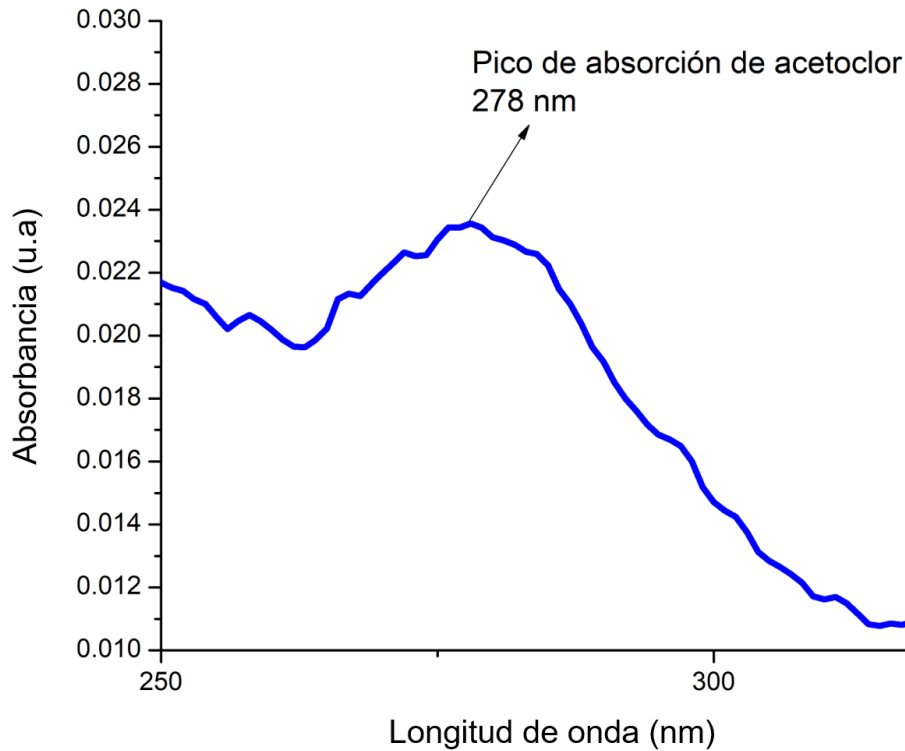


Figura 3.6: Absorbancia de Acetoclor por espectrofotometría de luz UV-Visible

3.4.2.1. Curva de calibración

Se hizo la lectura de la muestra de acetoclor y se obtuvo una absorbancia de 0.02 y se sustituyó en la ecuación obtenida en la curva de calibración (Figura 3.7) y se obtuvo una concentración de 0.21142 mg/ml de acetoclor.

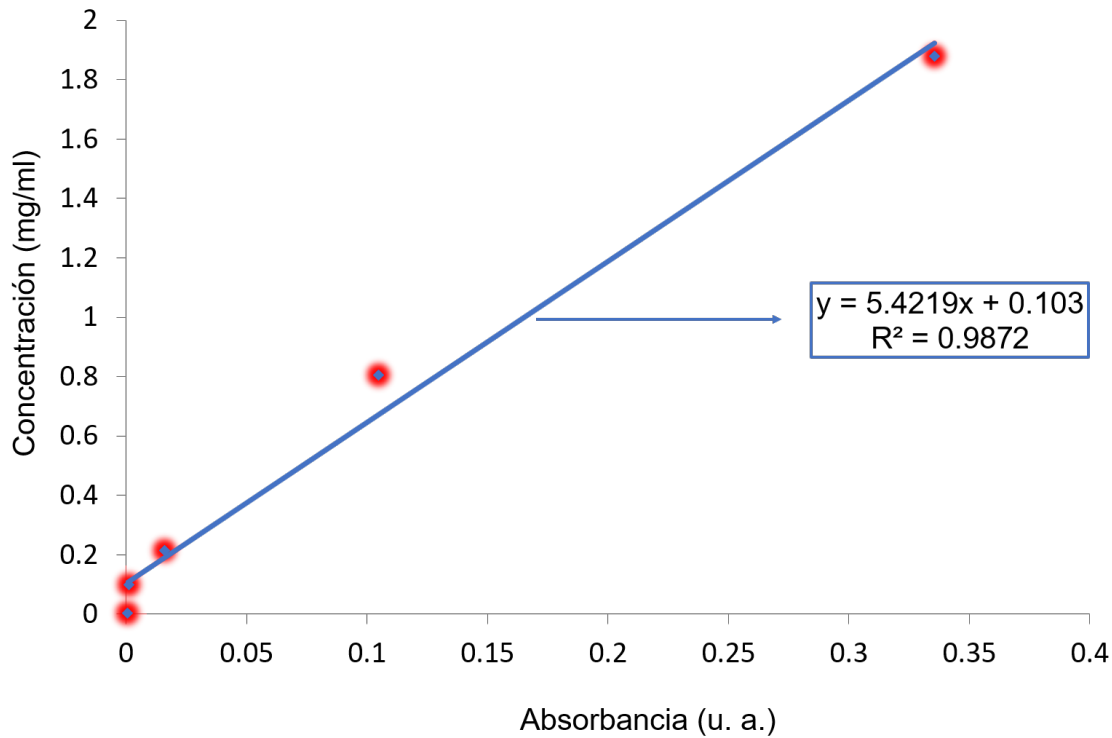


Figura 3.7: Curva de calibración y modelo matemático para calcular la concentración de acetoclor

Se escanearon una serie de soluciones estándar de acetoclor y se definió un ancho de banda de 190–350 nm en un espectrofotómetro de luz UV-vis, por lo tanto, las lecturas realizadas para calcular la concentración de acetoclor se encontraban en ese pico de absorción, lo que concuerda con la experimentación realizada en el laboratorio.

De acuerdo con los datos obtenidos, se define que el suelo obtenido de la zona de producción agrícola del municipio Jamay, estado de Jalisco; presenta residualidad de acetoclor.

3.4.3. Parámetros Físico-químicos del suelo

Los resultados obtenidos de las pruebas de pH, conductividad eléctrica y materia orgánica de suelo con antecedentes con acetoclor presentó los siguientes resultados (Tabla 3.1):

Los resultados obtenidos en la Tabla 3.1, indican que hay variabilidad estadística de pH entre el suelo testigo y el suelo con antecedente de acetoclor. Ambos suelos se encuentran

Parámetro	Testigo	Suelo con acetoclor
pH	6.88 _a	6.78 _a
CE (dS/m)	0.314 _a	0.246 _b
MO (%)	5.05 _a	3.98 _a

Tabla 3.1: Parámetros físico-químicos de suelo con acetoclor

dentro de un rango neutro, por lo tanto, el acetoclor no afecta el pH del suelo. Anteriormente se han evaluado las características de muestras de suelo contaminados con acetoclor que indican valores de pH de 4.51, 5.44 y 5.48, es decir, la presencia de este agente tóxico no promueve fluctuaciones en este parámetro [7].

Los resultados de la prueba de conductividad eléctrica (Tabla 3.1) muestran una diferencia media de 68.6 ($\mu\text{S}/\text{cm}$), siendo el suelo con acetoclor ligeramente más salino, no obstante, ambos suelos se encuentran en el rango de moderadamente salinos. Por lo tanto, el acetoclor puede presentar efectos despreciables de salinidad en el suelo. Las pruebas de los porcentajes de materia orgánica, para suelos no volcánicos, está en niveles bajos [4]. Los resultados de la prueba de Bouyoucos (Tabla 3.2) indican que el presente suelo tiene una textura franca, que se considera con condiciones estructurales idóneas para el desarrollo de cultivos agrícolas.

Partícula	Porcentaje (%)
Arena	44.76
Limo	41.04
Arcilla	14.2

Tabla 3.2: Porcentaje de contenido de partículas del suelo

3.5. Conclusiones

De acuerdo con lo anterior expuesto, se puede confirmar que el estado de Jalisco es una zona con alta actividad agrícola en producción de maíz con uso de acetoclor. Las muestras de suelo obtenidas, presentan este herbicida, por lo tanto, este compuesto tiende a presentar cierto grado de residualidad. En adición, los parámetros físico-químicos de pH, conductividad eléctrica, materia orgánica y textura, no se ven alterados por la presencia del compuesto, sino, por las prácticas agrícolas en el suelo que se realizan en el área [8].

3.6. Literatura Citada

- [1] RODAS, J. J. (2017). Contaminación del suelo agrícola provocado por agroquímicos en la parroquia San Juan. Cuenca: Ecuador.
- [2] Yaguana, G., Sánchez, F., Aguilar, M., Pozo, E. (2019). Contaminación de suelos: el caso de los plaguicidas. *Grupo de Investigación en Manejo y Recuperación de Suelos y Aguas, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Técnica del Norte, Ibarra-Ecuador.*
- [3] Romero-Lázaro, E. M., Ramos-Pérez, D., Romero, F. M., Sedov, S. (2019). Indicadores indirectos de contaminación residual en suelos y sedimentos de la cuenca del Río Sonora, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 35(2), 371-386.
- [4] NOM-021-RECNAT-2000. Norma Oficial Mexicana, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de los suelos. Estudios, muestreo y análisis. México. <http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3335/1/nom-021-semarnat-2000.pdf>.
- [5] Fu, Y., Li, Y., Hu, J., Li, S., Qin, G. (2019). Photocatalytic degradation of acetochlor by -Fe₂O₃ nanoparticles with different morphologies in aqueous solution system. *Optik*, 178, 36-44.
- [6] Angarita Cardona, K. T. (2019). Estandarización de la técnica de análisis del plaguicida clorpirifos en matriz acuosa por espectrofotometría de luz ultravioleta.
- [7] Yu, J., Zhang, J., Zheng, X., Zhang, Y., Chen, D., Ding, H. (2022). Divergent modulation of land use-driven changes in soil properties and herbicide acetochlor application on soil nitrogen cycling. *Soil and Tillage Research*, 215, 105231.
- [8] Yu, J., Zhang, J., Zheng, X., Zhang, Y., Chen, D., Ding, H. (2022). Divergent modulation of land use-driven changes in soil properties and herbicide acetochlor application on soil nitrogen cycling. *Soil and Tillage Research*, 215, 105231.

Capítulo 4

Aislamiento de los microorganismos presentes en el suelo con antecedentes de acetoclor

En este capítulo, se lleva a cabo el aislamiento de microorganismos presentes en el suelo con antecedentes de acetoclor. Se realiza con dos tipos de microorganismos: bacterias y hongos. Se presentan por separado en dos secciones incluyendo una breve introducción de cada tipo de organismo, los experimentos establecidos para cada uno, los resultados con su análisis estadístico y las discusiones con conclusiones y bibliografía consultada.

4.1. Introducción

La microbiota del suelo presenta funciones fundamentales como la descomposición y acumulación de materia orgánica, influye en la dinámica de nutrientes y la degradación de compuestos químicos que pueden formar parte de los plaguicidas que tienen efectos tóxicos para los microorganismos, sin embargo, se pueden presentar especies que desarrollen un mecanismo de adaptación y tolerancia a ciertas concentraciones [1]. Los agroquímicos tienen efectos negativos en la dinámica de las poblaciones de microorganismos del suelo y por lo tanto, también en las funciones que estos desempeñan en la degradación de residuos vegetales y compuestos químicos, ciclaje de nutrientes, entre otros [2]. Las poblaciones

microbianas del suelo pueden tener diferentes respuestas fisiológicas a la presencia de plaguicidas de acuerdo a la aplicación de buenas prácticas de manejo [3].

En el caso de uso de acetoclor, se han aislado consorcios bacterianos con este potencial biorremediador como el género *Serratia*, que tiene la capacidad de utilizar el acetoclor como fuente de carbono una concentración de 500 mg/L [4]. De forma similar, se aislaron cepas de hongos de suelos agrícolas en Turquía que presentaron potencial de biorremediador de acetoclor como *Tolyposcladium geodes* y *Cordyceps cicadae* [5]. Por otro lado, en este estudio, se realiza un aislamiento de bacterias y hongos de suelo proveniente del estado Jalisco, México; por lo que, se espera encontrar algún consorcio perteneciente a cualquiera de estos dos grupos con esta capacidad.

4.2. Procedimientos experimentales

En este apartado, se llevó a cabo el aislamiento de microorganismos (hongos y bacterias) utilizando medios de cultivo específicos, medio de Wright para bacterias del género *Rhizobium* y Medio de papa y dextrosa (PDA, marca Bioxon) para hongos. Se ejecutaron las siembras por medio de dilución en serie de 1:10 a 1:100,000. Se incubaron las muestras obtenidas, se contaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) periódicamente, se resembraron las cepas para su purificación y descripción morfológica descrito en Montanez (2018) [6] e Islas-Pelcastre *et al.*, (2016) [7]. Los datos obtenidos se graficaron para su visualización.

4.2.1. Siembra y aislamiento de hongos y bacterias de suelo con acetoclor

Para realizar un cultivo de bacterias y hongos presentes en suelos con acetoclor, se utilizaron los medios de Wright y PDA (Agar dextrosa y papa). El Medio de Wright se utiliza para el aislamiento de las cepas del género *Rhizobium* y germinación sobre las placas de Petri.

Para preparar 300 mL de medio de Wright, se pesaron 0.06 g de cloruro de sodio (NaCl),

0.15 g de fosfato dipotásico (K_2HPO_2), 0.09 g de sulfato de magnesio ($MgSO_4$), 0.03 g de sulfato de calcio ($CaSO_4$), 0.03 g de carbonato de calcio ($CaCO_3Ca$), 3 g de manitol, 30 cc de levadura, 4.5 g de Gelosa y 300 mL de agua destilada.

Para la preparación del medio Agar Dextrosa y Papa, se pesó 5.85 g del producto y se introdujo en dos matraces con 150 mL de agua destilada cada uno.

Una vez preparado el medio, se esterilizó dentro del autoclave junto con 90 mL de agua destilada, puntas de pipeta, perlas de cristal y 5 tubos de centrífuga para diluciones llenos con 9 mL de agua destilada cada uno. Posteriormente, se preparó la campana de flujo laminar con la balanza, asa bacteriológica, espátula, cajas Petri nuevas, mechero y gradilla. A continuación, se cernió 10 g de suelo para diluir en los 90 mL agua esterilizada. Una vez que salieron los utensilios del autoclave se prosiguió a introducirlos en la campana de flujo laminar. Se dejó enfriar el medio, se sirvió en cajas Petri y se dejó solidificar.

Una vez listo el material, se pesó el suelo cernido y se introdujo al matraz con 90 mL de agua y se mezcló, en seguida, se tomó la pipeta y con una punta esterilizada se extrajo un mL de la mezcla de agua con suelo y se introdujo en un tubo esterilizado con 9 mL y se rotuló (10^{-1}), a continuación, se tomó una punta nueva y se introdujo en el tubo 10^{-1} , después, con una punta nueva, se extrajo 1 mL de este tubo y se introdujo en uno nuevo y se rotuló (10^{-2}) y así sucesivamente hasta llegar a 10^{-5} (Figura 4.1).

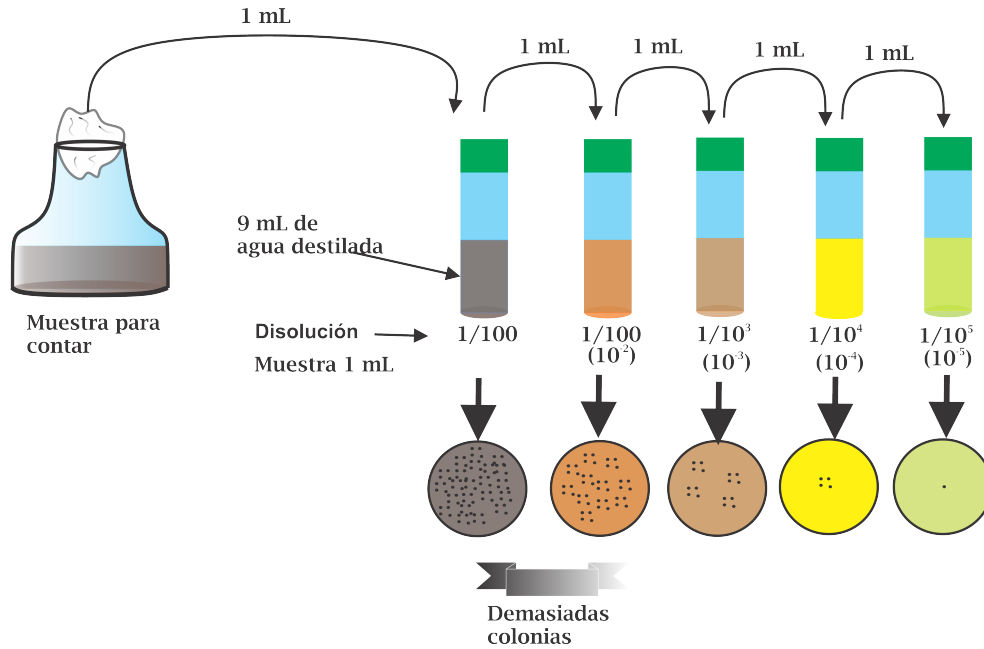


Figura 4.1: Técnica de aislamiento de microorganismos por dilución en serie [7]

Finalmente, con una punta limpia para cada dilución, se extrajo de cada tubo 1 mL, se vertió en una caja con medio, se agregaron tres perlas de cristal, se agitó vigorosamente por tres minutos, se retiraron las perlas de cristal, se sellaron las cajas y se rotuló con fecha, nombre del medio y dilución correspondiente. Se dejó reposar y se registró el crecimiento y temperatura los próximos días. Se realizó el mismo procedimiento para el cultivo en medio de PDA.

Una vez que crecieron las colonias de bacterias, se hizo un registro de la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) en las diferentes diluciones y se eligieron las colonias separadas entre sí [7].

4.2.2. Purificación de cepas

4.2.2.1. Purificación de hongos

Para el caso de los hongos, se seleccionó la caja con unidades más dispersas, se abrió la caja dentro de la campana de flujo laminar, se tomó un bisturí y se sostuvo sobre mechero 10 segundos, se dejó enfriar, después, se cortó un cuadro en medio alrededor de la unidad seleccionada, se transportó a una caja Petri con medio PDA nuevo, se colocó la unidad

boca abajo, se selló la caja, se rotuló y se dejó reposar para observar su crecimiento [7].

4.2.2.2. Purificación de bacterias

Para este proceso, se abrió la caja seleccionada dentro de la campana de flujo laminar, se tomó un asa bacteriológica, se sostuvo sobre la llama del mechero por 10 segundos después de que esta adquiriera un color rojo, se dejó enfriar, se raspó con asa la colonia previamente seleccionada, se tomó la caja con medio, se deslizó el asa desde la orilla hacia el centro en un movimiento de zig-zag, se repitió este movimiento tres veces hasta formar una T dejando un espacio limpio como indicador de contaminación. Finalmente se selló la caja, se rotuló y se dejó reposar dentro de la incubadora a 34°C para observar su crecimiento posterior [7].

4.3. Descripción morfológica de cepas

Para tipificar la morfología macroscópica de las cepas bacterianas se observaron los siguientes parámetros: forma de la colonia (irregular, rizoide, filamentosa, circular, puntiforme), elevación de las colonias (efusa, plana, rizada, convexa, umbonada), bordes de las colonias (rizada, filamentosa, crenada, ondulada, entera) y superficie (rugosa, concéntrica, radial, ondulada y lisa) y se construyó una tabla para registrar las observaciones. Para la caracterización morfológica de cepas de hongos, se tomó en cuenta: tipo de hongo (micelio o levadura), tamaño (diminuto, pequeño, mediano, grande, gigante), color, superficie (algodonosa, agamuzada, áspera, farinácea, arrugada), densidad (traslúcida, opaca, gomosa), forma (circular, puntiforme, rizoide, irregular), margen (entero, lobulado, ondular), elevación (plano, elevado, convexo) y se organizó la información en una tabla [6].

4.4. Tinción de Gram

Para llevar a cabo estas pruebas, se dió seguimiento a la metodología de Tinción de Gram. Para comenzar, se esterilizó un espacio en la mesa para trabajar, se lavaron los portaobjetos, y se desengrasaron utilizando un algodón con alcohol, después, se comenzó

a preparar el frotis de la bacteria. Con ayuda de un asa bacteriológica previamente esterilizada, se hizo un toque sobre la superficie del medio en el que se encontraba la muestra. Se vertió una gota de agua estéril sobre el portaobjetos, se extendió la muestra contenida en el asa y se dejó secar al aire hasta que se observó una película fina fijada sobre el portaobjetos. Una vez lista la muestra, se adicionó una gota de solución de cristal violeta que cubriera todo el frotis y se dejó reposar por un minuto. Se lavó el portaobjetos colocado en de canto con agua y se agregó una gota de Lugol, reposó 1 minuto, se lavó con solución alcohol-acetona para decolorar, se enjuagó con agua, se adicionó una gota de safranina, se dejó un minuto reposando, se lavó con agua y se dejó secar para observar al microscopio [8].

4.5. Resultados y discusiones

4.5.1. Aislamiento de bacterias presentes en el suelo con antecedentes de acetoclor

De acuerdo con la siembra de bacterias, en la Figura 4.2, se muestra la dinámica del crecimiento de las unidades formadoras de colonias (UFC), en una escala de 1 (sin crecimiento) a 4 (incontables), las diluciones 10^{-1} (1), 10^{-2} (2), 10^{-3} (3) y 10^{-4} (4).

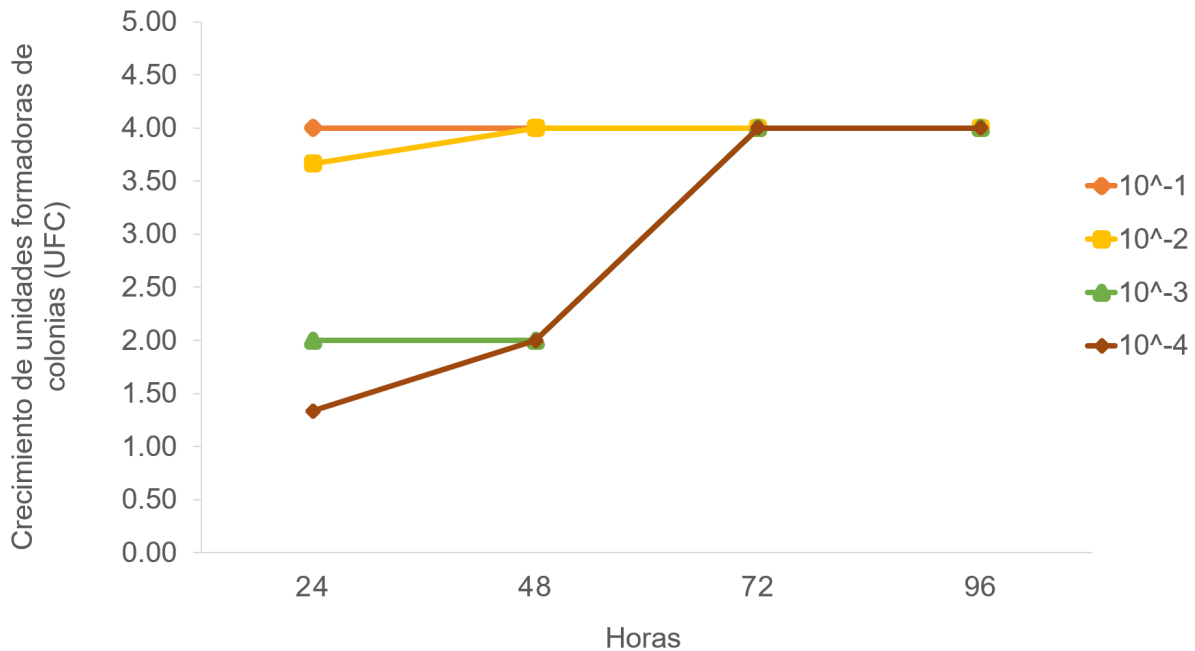


Figura 4.2: Dinámica de crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de bacterias en suelo con antecedentes de acetoclor.

En la Figura 4.2 se observó que la dilución 1 presentó un crecimiento mayor de UFC a las 24 horas, la siguiente dilución presentó un crecimiento cercano a incontable, sin embargo, a las 48 horas las UFC aumentaron su biomasa y crecimiento a incontables siendo este de tipo potencial. La dilución 3 presentó UFC separadas y distribuidas por toda la caja a las 24 horas, a las 48 horas aún se podía diferenciar las UFC, su desarrollo fue de tipo lineal, alcanzando la incontabilidad a las 72 horas y finalmente la dilución 4, presentó el crecimiento más lento con casi cero UFC a las 24 horas, sin embargo, en términos de tiempo presentó un crecimiento similar a la dilución 3, alcanzando la incontabilidad a las 72 horas y con un crecimiento potencial.

Previamente, se aisló y purificó diecisiete cepas de bacterias de cuatro comunidades microbianas de cuatro muestras de suelos provenientes de diferentes zonas: un vertedero de una fábrica de plaguicidas que había producido acetoclor por varios años, de la que crecieron ocho cepas y tres cepas del suelo de dicha fábrica, del suelo del lecho del río cercano a la misma fábrica que había sido contaminado con acetoclor y de un lodo residual

de una planta de tratamiento de agua residual doméstica e industrial [9].

De la misma forma, se llevó a cabo un aislamiento bacteriano utilizando una muestra de suelo de una fábrica de pesticidas en Hangzhou, China; a partir de esta situación, seleccionaron la cepa con mejor desarrollo y la denominaron D-12 debido a que presentó mejor desarrollo frente a condiciones de acetoclor [10]. De esta manera se puede definir que en suelos con presencia de acetoclor se puede disponer de microorganismos autóctonos que sobreviven y pueden ser utilizados para pruebas de biorremediación que apoyen a la mitigación de sus efectos negativos sobre el ambiente.

A partir de estas diluciones, se aislaron las cepas reportadas en la Tabla 4.1, de igual forma, presentaron la siguientes características morfológicas y resultados de tinción de Gram.

Cepa	A	B	C	D	E
Dilución de origen	4	3	3	3	1
Forma de colonias	Circular	Irregular	Irregular	Circular	Irregular
Elevación de colonias	Convexa	Efusa	Umbonada	Umbonada	Convexa
Bordes de colonias	Entera	Rizada	Rizada	Rizada	Entera
Superficie de colonias	Lisa	Concéntrica	Concéntrica	Concéntrica	Lisa
Tinción de Gram	+	+	+	+	+

Tabla 4.1: Descripción morfológica de las cepas A, B, C, D, E.

La Tabla 4.1 muestra que las cepas aisladas y purificadas pertenecen a diferentes especies, ya que presentan por lo menos una característica diferente a las demás cepas. De acuerdo a los resultados previamente obtenidos, en un suelo con antecedentes de Acetoclor se pueden desarrollar cepas adaptadas a las condiciones, y al suelo analizado. Por lo menos cinco cepas poseen la capacidad de sobrevivir a estas condiciones de Acetoclor residual (Figura 4.3). Estos resultados pueden ser el principio de un estudio para evaluar la capacidad de adaptación y consumo de las cepas aisladas de un suelo con residuos de este compuesto ya que estudios previos reportan consorcios, que evaluaron en suelos con acetoclor y sugieren que tanto los microorganismos autóctonos como las lombrices de tierra desempeñan un papel importante en la dinámica del suelo. Estos consorcios pertenecieron a los grupos de *Sphingomonas* y *Microascales* y algunas posibles especies como *Rhodococcus*, *Pseudomonas fulva* y *Methylobacillus* [11]. Por otro lado, se identificaron microorganismos

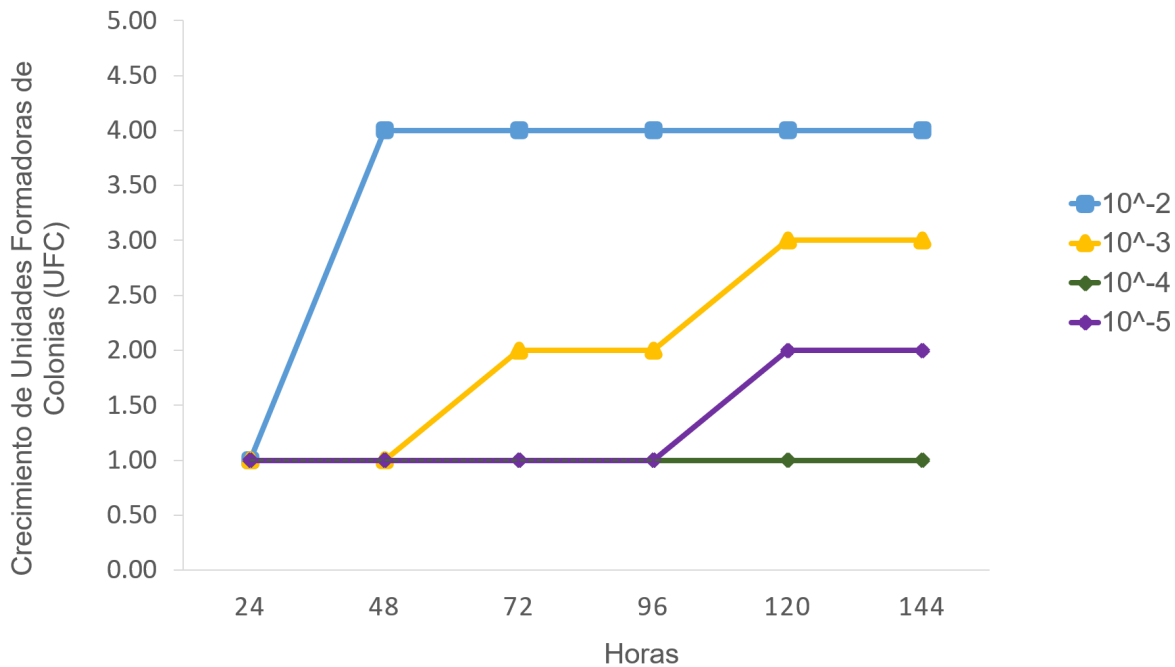


Figura 4.4: Dinámica de crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de hongos en suelo con antecedentes de acetoclor.

Las siembras realizadas para aislar hongos de un suelo con historial de acetoclor no mostraron crecimiento a las 24 horas de incubación, lo cual representa un resultado positivo, ya que, es indicador de no contaminación de las muestras. La presencia de biomasa en la dilución 10^{-1} , fue la más acelerada (crecimiento logarítmico). A esta le siguieron en orden 10^{-2} y 10^{-3} con diferencias significativas en cuanto al número de unidades formadoras de colonias y de 24 a 48 horas de diferencia para su desarrollo. De esta siembra, se aislaron y purificaron las cepas registradas en la Tabla 4.2, que indica además la descripción morfológica de cada una de las cepas.

Característica	F	G	H	I	J
Tipo de hongo	Micelio	Micelio	Micelio	Levadura	Micelio
Tamaño	Pequeño	Grande	Pequeña	Pequeño	Mediano
Color	Marrón	Gris cenizo	Marrón	Naranja	Gris pardo
Superficie	Algodonosa	Algodonoso	Algodonosa	Arrugada gomosa	Algodonosa
Densidad	Opaca	Opaca	Opaca	Irregular	Opaca
Forma	Circular	Circular	Circular	Lobular	Circular
Margen	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Plano	Ondulado
Elevación	Elevado	Elevado	Elevado	Plano	Elevado

Tabla 4.2: Descripción morfológica de las cepas F, G, H, I, J.

La mayoría de los hongos de un suelo agrícola pueden sobrevivir degradando un herbicida y que los métodos químicos y físicos para degradar plaguicidas pueden ser más costosos y complicados, se ha sugerido el uso de la biorremediación para combatir este problema [5]. Las cepas reportadas en la Tabla 4.1 marcan ciertas características generales que indican que pueden pertenecer a un grupo similar de hongos, pero, presentan al menos una característica diferente (Figura 4.5).

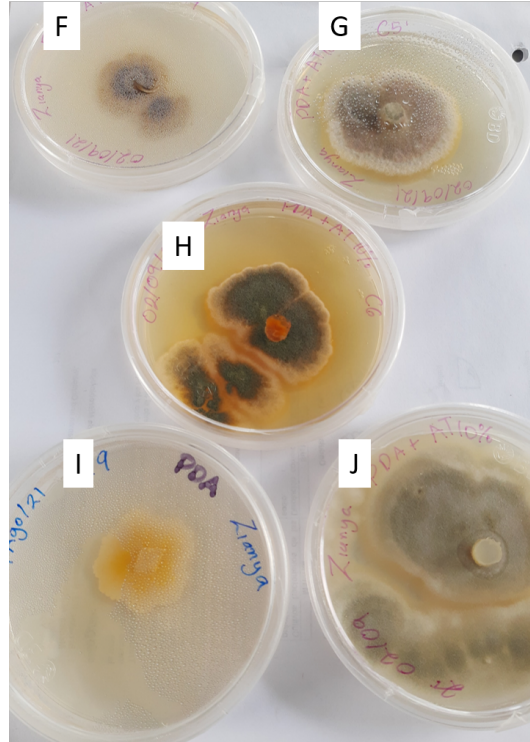


Figura 4.5: Cepas de hongos F, G, H, I y J de un suelo con contenido de acetoclor

Se aislaron cultivos de hongos de una zona agrícola en la región de Tracia en Turquía, los enriqueció en medio de caldo de extracto de malta, inoculó las cepas en 100 mL de soluciones de acetoclor (concentración recomendada para agricultores) en la producción de maíz y se concluyó que la tolerancia hacia el compuesto depende del tipo de hongo y que los más aptos para tener una aplicabilidad futura en biorremediación, tales como *Tolypocladium geodes* y *Cordyceps cicadae* [5].

4.6. Conclusiones

De acuerdo con lo anterior expuesto, se puede confirmar que el estado de Jalisco es una zona con alta actividad agrícola en producción de maíz con uso de acetoclor. Las muestras de suelo obtenidas, presentan acetoclor, por lo tanto, este compuesto tiende a presentar cierto grado de residualidad, sin embargo, se registra una alta carga microbiana y se aislaron

cinco cepas de bacterias y cinco cepas de hongos con potencial de biorremediación.

4.7. Literatura Citada

- [1] Azcarate, M. P., Frasier, I., Montoya, J. C., Porfiri, C. (2021). *Efecto de los herbicidas fomesafen y biciclopirona sobre la microbiota del suelo en secuencias de cultivo con soja y maíz.*
- [2] Barros, Y. J., Melo, V. D. F., Dionísio, J. A., Oliveira, E. B. D., Caron, L., Kummer, L., Souza, L. C. D. P. (2010). Indicadores de qualidade de solos em área de mineração e metalurgia de chumbo: I-microrganismos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34, 1397-1411.
- [3] Sterren, M. A., Benintende, S. M., Uhrich, W., Barbagelata, P. (2019). Efecto de la aplicación de glifosato sobre los microorganismos del suelo en distintas prácticas de manejo. *Ciencia del suelo*, 37(1), 66-76.
- [4] Xin, Y., Zhai, Z., Qu, X. (2021). Identification of a Pb-Resistant Acetochlor-Degrading Bacterium for Bioremediation of Soils Contaminated with Herbicides. *Water, Air, and Soil Pollution*, 232(2), 1-9.
- [5] Erguven, G. O. (2018). Comparison of some soil fungi in bioremediation of herbicide acetochlor under agitated culture media. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 100(4), 570-575.
- [7] Islas-Pelcastre, M., Villagómez-Ibarra, J. R., Rodríguez-Pastrana, B. R., Perry, G., Madariaga-Navarrete, A. (2016). Identification of an Indigenous Atrazine Herbicide Tolerant Microbial Consortium in Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a Potential Soil Bioremediator. *Agrotechnol*, 5, 141.
- [8] Llagas López, J. A., Vega Villafaña, M. Á., Gutiérrez Don, J. (2019). *Tinción de microorganismos en laboratorio.*
- [9] Jun, X., Yang, M., Dai, J., Cao, H., Pan, C., Qiu, X., Xu, M. (2008). Degradation of acetochlor by four microbial communities. *Bioresource Technology*, 99(16), 7797-7802.

- [10] Xu, C., Ding, J., Qiu, J., Ma, Y. (2013). Biodegradation of acetochlor by a newly isolated *Achromobacter* sp. strain D-12. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48(11), 960–966.
- [11] Hao, Y., Zhao, L., Sun, Y., Li, X., Weng, L., Xu, H., Li, Y. (2018). Enhancement effect of earthworm (*Eisenia fetida*) on acetochlor biodegradation in soil and possible mechanisms. *Environmental Pollution*, 242, 728–737.
- [12] Han, L., Fang, K., Liu, Y., Fang, J., Wang, F., Wnag, X. (2021). Earthworms accelerated the degradation of the highly toxic acetochlor S-enantiomer by stimulating soil microbiota in repeatedly treated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 420, 126669.
- [13] Yufeng, X., Zhenzhen, Z., Xiaohua, Q. (2021). Identification of a Pb-Resistant Acetochlor-Degrading Bacterium for Bioremediation of Soils Contaminated with Herbicides. *Water, Air and Soil Pollution*, 232(2).
- [14] Pelayo, M. M., Vázquez, H. C., Martínez, J. M. M., López, M. R., Moya, C. A. (2005). Aislamiento e identificación de *Rhizobium* en *Lupinus silvestres* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Revista@ Cient ó Fica*, 175.

Capítulo 5

Evaluación de la actividad biológica (*in vitro*) de los microorganismos aislados de suelos con historial de acetoclor

En el capítulo 5 se evalúa la actividad biológica (*in vitro*) de los microorganismos previamente aislados. Se expone una breve introducción, el diseño experimental, resultados, discusiones, conclusiones y bibliografía consultada.

5.1. Introducción

La aplicación de herbicidas puede inhibir (debido a sus toxicidades) o estimular los microorganismos del suelo cuando éstos los pueden utilizar como fuente de nutrientes [1]. Cabe considerar, que el metabolismo de microorganismos difiere de acuerdo a la especie y el tipo al que pertenezcan, debido a que reúnen características particulares. Un ejemplo son los organismos nitrificantes encontrados en el suelo, ya que, poseen mucha sensibilidad hacia los compuestos químicos antropogénicos porque sus cadenas transportadoras de electrones son débiles [2].

Otro factor influyente en la inhibición del crecimiento de microorganismos en el suelo depende del ingrediente activo, la tolerancia del microorganismo [3], el tipo de plaguicida y la cantidad aplicada [4,5,6].

Se ha determinado que la combinación de acetoclor con atrazina tiene la capacidad de alterar la comunidades bacterianas como la *Acidobacteriota* y disminuir la actividad enzimática del suelo [7]. Aunado a esto, la presencia residual de acetoclor en el suelo altera las comunidades de hongos [8].

5.2. Diseño experimental y análisis de datos

Para este estudio, se planteó realizar las pruebas de inhibición de crecimiento utilizando la técnica de discos para bacterias. Se midió el tamaño del halo bacteriano en *mm* y los datos obtenidos se sometieron a un diseño experimental denominado completamente al azar y con prueba tukey tomando como referencia las horas de incubación (24, 48, 72 y 96 horas).

Los datos resultantes de las pruebas de envenamiento del medio se obtuvieron mediante la medición del micelio que presentó el crecimiento del hongo en *mm* y se sometió a un diseño experimental completamente al azar y con prueba Tukey tomando como referencia las horas de incubación (24, 48, 72 y 96 horas).

5.3. Procedimientos experimentales

Se utilizaron las cepas (bacterias y hongos) previamente aisladas y purificadas para llevar a cabo las pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI). Para el diseño de los tratamientos se tomaron en cuenta las instrucciones de aplicación del fabricante (Prueba 1) y diferentes concentraciones equiparando la fuente de carbono standar del medio de cultivo (Prueba 2) para evaluar el desarrollo de las cepas a diferentes concentraciones de acetoclor por medio de la técnica de discos para bacterias de acuerdo con Madariaga *et al.* (2017) [9] y envenenamiento del medio para hongos como en Soto *et al.* (2020) [10].

5.3.1. Concentración Mínima Inhibitoria en bacterias

Los procedimientos que se llevaron a cabo para evaluar la inhibición de crecimiento que tiene el acetoclor sobre bacterias y hongos se describen a continuación.

5.3.1.1. Prueba 1

Se prepararon cajas Petri con Medio de Wright sólido y con el asa bacteriológica se raspó una UFC (Unidad Formadora de Colonia), se sumergió en un tubo de centrifuga con 9 mL de agua destilada estéril y se agitó. Posteriormente, con la pipeta, se extrajo 1 mL de este tubo, se vertió sobre una caja con medio de Wright, se agregaron tres perlitas de cristal, se agitó vigorosamente, se retiraron y se colocaron cuatro discos de papel filtro con 1 cm de diámetro.

Para preparar los tratamientos, se esterilizaron en autoclave cuatro tubos de centrifuga con 5 mL de agua destilada, se extrajeron las cantidades correspondientes de acuerdo a los tratamientos presentes en la Tabla 5.1.

Tratamiento	Harness® (µL/5 mL agua destilada)	Acetoclor (mg/L)
T1	0	0
T2	41.6	6999.38
T3	20.8	3495.69
T4	10.4	1747.84

Tabla 5.1: Tratamientos con acetoclor para pruebas de inhibición de crecimiento de bacterias.

A continuación, de cada tratamiento (0, 6999.38, 3495.69 y 1747.84 mg/L de acetoclor) se tomó con la micropipeta 15 µL de cada tratamiento y se colocó sobre cada disco (Figura 5.1), se selló, rotuló y se produjeron tres repeticiones de cada cepa. Al último, se introdujeron en la incubadora y se hicieron lecturas del crecimiento de las cepas con un vernier calibrado cada 24 horas.

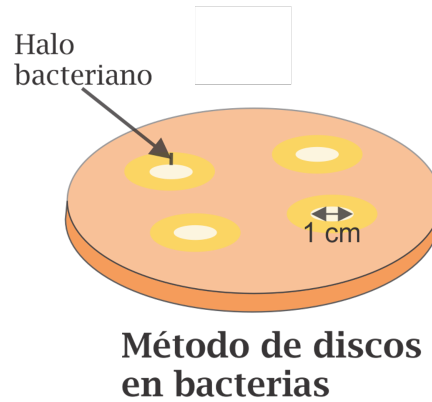


Figura 5.1: Prueba de Inhibición de Crecimiento por la técnica de discos para bacterias [9]

5.3.1.2. Prueba 2

Para realizar la Prueba 2, se definieron los tratamientos de concentración de acetoclor tratando de igualar la concentración estándar de manitol en el medio de Wright, que funciona como fuente principal de carbono de la bacteria, por lo tanto, se estimaron los tratamientos (0, 500, 1000, 2500, 5000 y 10000 mg/L) de concentración de acetoclor.

Posteriormente se repitió el mismo procedimiento del método de los discos descrito en la Prueba 1. Se observó su crecimiento y se tomaron medidas.

5.3.2. Concentración Mínima Inhibitoria en hongos

5.3.2.1. Prueba 1

Se llevó a cabo el método de envenenamiento del medio. En un principio se preparó 240 mL del medio Agar Dextrosa de Patata (PDA, por sus siglas en inglés), se esterilizó y para cada tratamiento, se agregó en cada frasco de 50 mL de vidrio la cantidad de Harness® (0, 0.48, 0.24, 0.12 mL) que representan el porcentaje de aplicación de Harness® de cada tratamiento definido en la Tabla 5.2 con respecto a la recomendación del fabricante. A cada frasco, se le adicionaron 60 mL del medio PDA, se vertió en cajas Petri de 20 mL (tratamiento por triplicado), se dejó solidificar, se realizó la siembra de una misma cepa en cada caja (Figura 5.2), se selló, rotuló, se introdujo en la incubadora y se realizaron lecturas de su crecimiento con un vernier cada 24 horas.

Tratamiento	Harness (mL)	Acetoclor (mg/L)
T1	0	0
T2	0.16	7000
T3	0.083	3500
T4	0.041	1700

Tabla 5.2: Tratamientos con acetoclor para pruebas de inhibición de crecimiento de hongos.

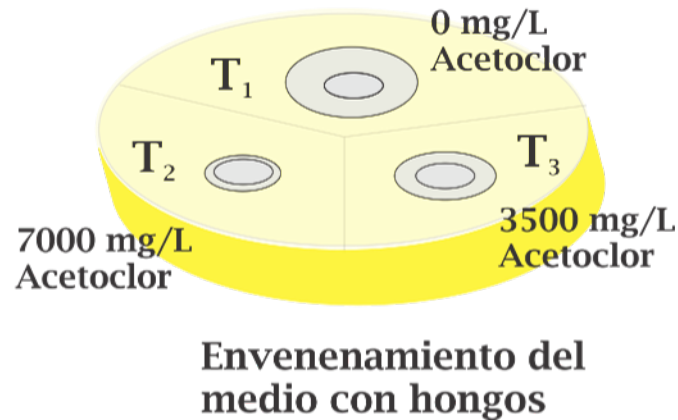


Figura 5.2: Prueba de Inhibición de Crecimiento por la técnica de envenenamiento del medio para hongos [10]

5.3.2.2. Prueba 2

Para esta prueba se volvieron a tomar como base las concentraciones de acetoclor equiparadas con el manitol (0, 500, 1000, 2500, 5000 y 10000 mg/L). Se replicó a la metodología de envenenamiento del medio, descrita anteriormente.

5.4. Resultados

Los resultados de las pruebas de Inhibición de crecimiento de las cepas bacterianas (A, B, C, D y E) y de hongos (F, G, H, I y J) se muestran a continuación.

5.4.1. Inhibición de crecimiento en cepas bacterianas

Se llevaron a cabo pruebas de concentración mínima inhibitoria con cuatro tratamientos que representan diferentes concentraciones de Harness para las cepas bacterianas. Se llevó a cabo la Prueba 1 de la metodología descrita anteriormente y se registró el crecimiento

identificando cada caja con el número de la cepa y el número de la repetición midiendo las distancias de las UFC más cercanas a los discos con los tratamientos, es decir, distancia sin crecimiento (Tabla 5.3). En la Figura 5.3 se muestran estos resultados de manera gráfica del halo bacteriano de la cepa A y la Figura 5.4 muestra el halo bacteriano de la B.

Tratamiento	Horas			
	24	48	72	96
T1	20.00 _a	6.34 _a	6.07 _a	3.31 _a
T2	20.00 _a	5.00 _a	4.27 _a	0.47 _a
T3	20.00 _a	2.99 _a	3.24 _a	0 _a
T4	20.00 _a	2.97 _a	2.74 _a	0 _a

Tabla 5.3: Pruebas de Inhibición de crecimiento de la cepa A, halo bacteriano en mm a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)

La Tabla 5.3 muestra que para la cepa A, no existe diferencia significativa en crecimiento de los tratamientos con respecto al testigo (T1), los cuatro tratamientos presentaron halo bacteriano excepto los T3 y T4, que a las 96 horas las UFC de la cepa estuvieron en contacto con los discos con el tratamiento. Por este motivo, esta cepa no presenta tolerancia a la presencia de acetoclor y está sujeta a un lento crecimiento.

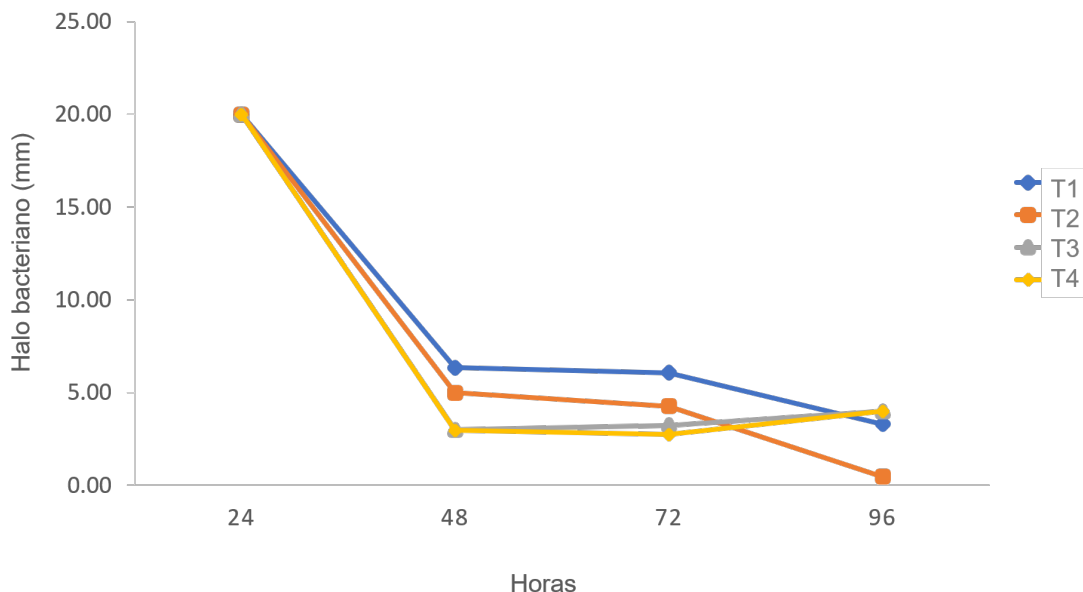


Figura 5.3: Crecimiento de la cepa A en Pruebas de Inhibición de Crecimiento a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)

La Figura 5.3 ilustra la disminución del halo bacteriano alrededor de los discos con el tratamiento que le corresponde. Representa un resultado positivo, ya que, el microorganismo se acerca a 0 mm en los tratamientos T2, T3 y T4, lo que indicaría un contacto directo con el acetoclor. La cepa presenta contacto directo con el compuesto en los discos con T3 y T4 a las 96 horas.

La cepa B mostró el siguiente desarrollo frente a diferentes tratamientos de la Prueba 1 (Tabla 5.4) descrita en la metodología.

Tratamiento	Horas			
	24	48	72	96
T1	1.39 _a	0.77 _a	0.64 _a	0.49 _a
T2	1.25 _a	0.49 _a	0.39 _a	0.33 _a
T3	0.95 _a	0.48 _a	0.20 _a	0.16 _a
T4	0.61 _a	0.37 _a	0.20 _a	0.00 _a

Tabla 5.4: Pruebas de Inhibición de crecimiento de la cepa B, halo bacteriano en mm a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)

Al igual que la cepa A, la Tabla 5.4 muestra que para la cepa B no hay diferencia significativa en el cierre del halo bacteriano entre el testigo (T1) y los tratamientos con acetoclor (T2, T3 y T4), por lo tanto, esta cepa presenta condiciones similares a la anterior. En la Figura 5.2 se puede apreciar la dinámica de su crecimiento.

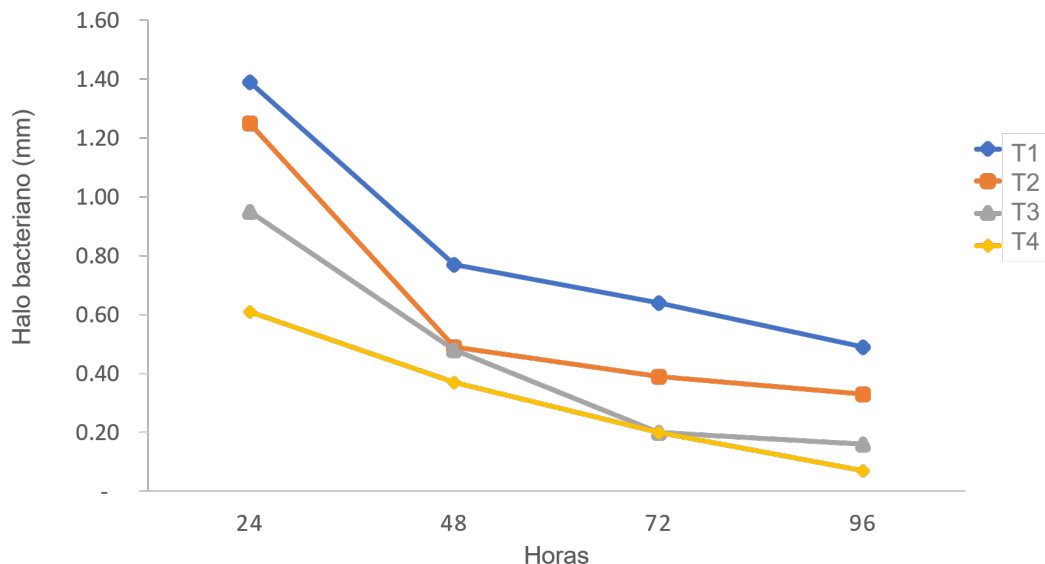


Figura 5.4: Crecimiento de la cepa B en Pruebas de Inhibición de Crecimiento a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)

La Figura 5.4 ilustra el decrecimiento del halo bacteriano de la cepa frente a los diferentes tratamientos, mostrando un proceso potencial en los tratamientos T1 y T2 y exponencial en los tratamientos T3 y T4.

En las Tablas 5.3 y 5.4, se muestran los halos (*mm*) que se presentaron en cada uno de los tratamientos, por lo que, las cepas A y B no presentan el crecimiento adecuado para las próximas pruebas (Degradación en Medio Líquido).

Por otro lado, las cepas C, D y E presentaron crecimiento acelerado a las 24 horas de incubación, ya que se observó 0 mm de halo bacteriano (Figura 5.5). De esta forma, se convierten en candidatas para realizar la Prueba 2 de inhibición de crecimiento.

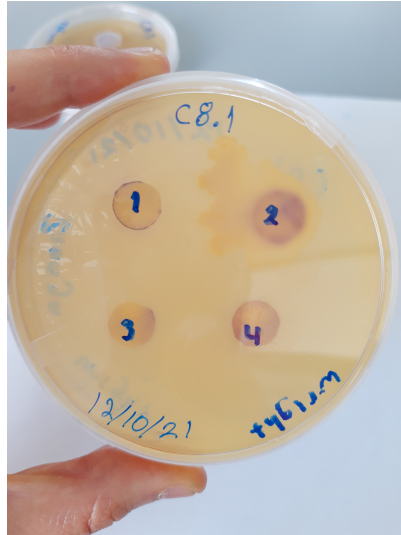


Figura 5.5: Inhibición de crecimiento de la cepa E

5.4.2. Inhibición de crecimiento en cepas de hongos

Se sometieron las cepas F, G, H, I y J a la Prueba 1 de Inhibición de crecimiento con cuatro tratamientos que representan diferentes concentraciones de Harness descritas en la metodología.

Se registró el crecimiento de la cepa F frente a los tratamientos en la Tabla 5.5.

Tratamiento	Horas			
	24	48	72	96
T1	0 _a	1.549 _a	3.22 _a	4.96 _a
T2	0 _a	0 _b	0 _b	0 _b
T3	0 _a	0 _b	0 _b	0 _b
T4	0 _a	0 _b	0 _b	0 _b

Tabla 5.5: Pruebas de Inhibición de crecimiento de la cepa F, crecimiento en mm a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)

La Tabla 5.5 indica que esta cepa no presenta la capacidad de desarrollarse en condiciones directas de acetoclor. Un caso similar se puede presentar en la Cepa G (Tabla 5.6).

Tratamiento	Horas			
	24	48	72	96
T1	0 _a	1.22 _a	3.48 _a	5.83 _a
T2	0 _a	0 _b	0 _b	0 _b
T3	0 _a	0 _b	0 _b	0 _b
T4	0 _a	0 _b	0 _b	0 _b

Tabla 5.6: Pruebas de Inhibición de crecimiento de la cepa G, crecimiento en mm a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)

La Tablas 5.5 y 5.6 muestran una amplia similitud entre las cepas F y G, tanto en intolerancia al acetoclor como en velocidad de crecimiento en ausencia de este, por lo tanto, estas se descartan para la Prueba 2 de inhibición de crecimiento. La cepa I presentó un crecimiento muy lento y limitado, por ello, se descartó también para realizar la Prueba 2.

Por otro lado, la cepa H manifestó el siguiente crecimiento (Tabla 5.7) a diferencia de las cepas F, G e I:

Tratamiento	Horas			
	24	48	72	96
T1	1.42 _a	4.73 _a	7.86 _a	10.14 _a
T2	0 _a	0 _b	0 _b	0 _b
T3	0 _a	0 _b	0 _b	0 _b
T4	0 _a	0 _b	0.93 _b	1.13 _b

Tabla 5.7: Pruebas de Inhibición de crecimiento de la cepa H, crecimiento en mm a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)

Como se puede apreciar en la Tabla 5.7, el tratamiento T1 (testigo sin acetoclor), presentó un crecimiento diferente a los demás tratamientos: T2, T3 y T4 (presencia de acetoclor). A pesar de que el tratamiento T4 (25 % presencia de acetoclor a la recomendación de fabricante), no mostró diferencias significativas con los demás tratamientos. Sin embargo, se le considera para realizar pruebas exploratorias en la Prueba 2. La Figura 5.6 muestra una comparación gráfica del crecimiento entre tratamiento T1 y T4.

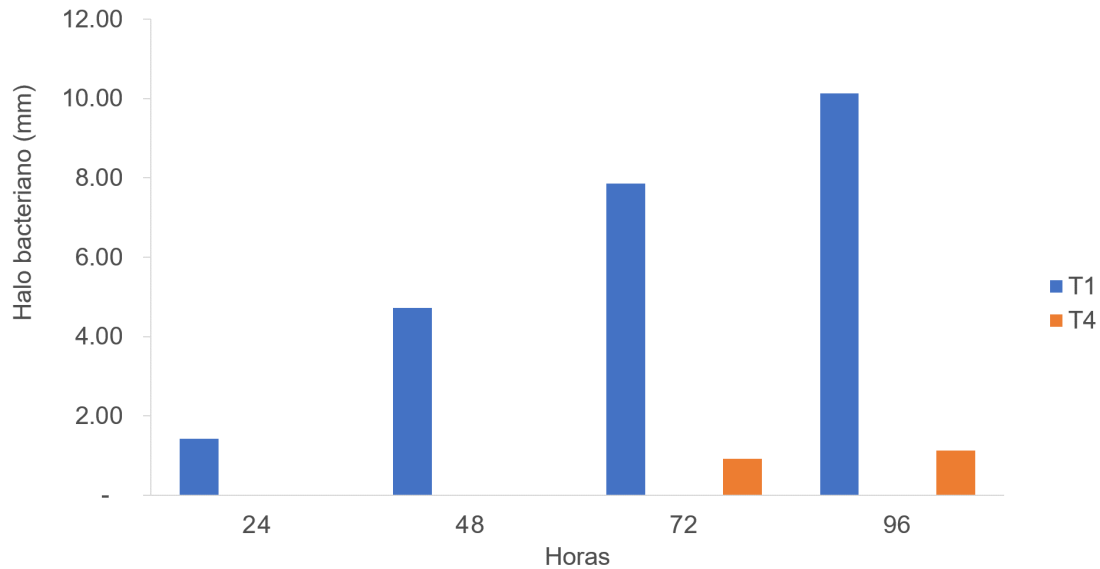


Figura 5.6: Crecimiento de la cepa H en Pruebas de Inhibición de Crecimiento a diferentes concentraciones de acetochlor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)

De acuerdo con la figura anterior (Figura 5.6), el tratamiento testigo (T1) (Figura 5.7) presenta crecimiento a las 24 horas, que se puede considerar relativamente acelerado, sin embargo, a comparación del T4 (24 % presencia de acetochlor a la recomendación de fabricante) tiene crecimiento a las 72 horas, que representa un 11.83 % del crecimiento del T1.

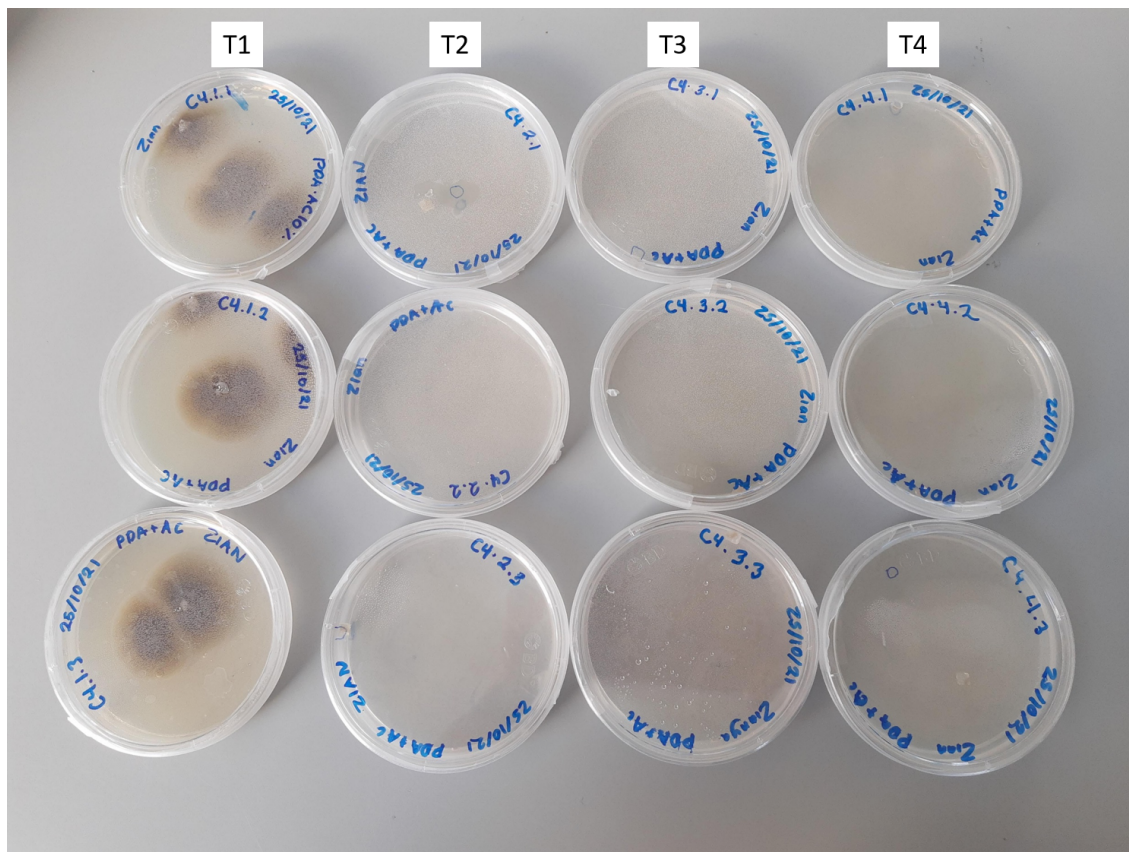


Figura 5.7: Inhibición de crecimiento de la cepa H, de izquierda a derecha: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)

Se ha identificado que existe una correlación inversa entre las concentraciones de herbicidas y el crecimiento del micelio de *Glomus etunicatum*, este fenómeno puede ser resultado de la influencia del acetochlor sobre el metabolismo del hongo y en el mecanismo de provisión de nutrientes [11].

En la Tabla 5.8, se muestran los resultados del crecimiento de la cepa J frente a los cuatro tratamientos de la Prueba 1.

Como se observa en la Tabla 5.8, la cepa J presenta un crecimiento más rápido que las otras cepas, sin embargo, entre tratamientos con acetochlor no se muestran diferencias significativas. De acuerdo a esto, se puede definir que la cepa tiene un crecimiento diferente frente a la presencia de acetochlor (Figura 5.8) pero, es indiferente a la concentración, aunado a esto, se han seleccionado las cepas H y J para llevar a cabo la Prueba 2.

Tratamiento	Horas			
	24	48	72	96
T1	2.27 _a	5.56 _a	10.25 _a	25.75 _a
T2	0 _b	1.07 _b	1.62 _b	3.28 _b
T3	0 _b	0.82 _b	1.57 _b	3.27 _b
T4	0 _b	0.99 _b	1.45 _b	3.15 _b

Tabla 5.8: Pruebas de Inhibición de crecimiento de la cepa J, crecimiento en mm a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)

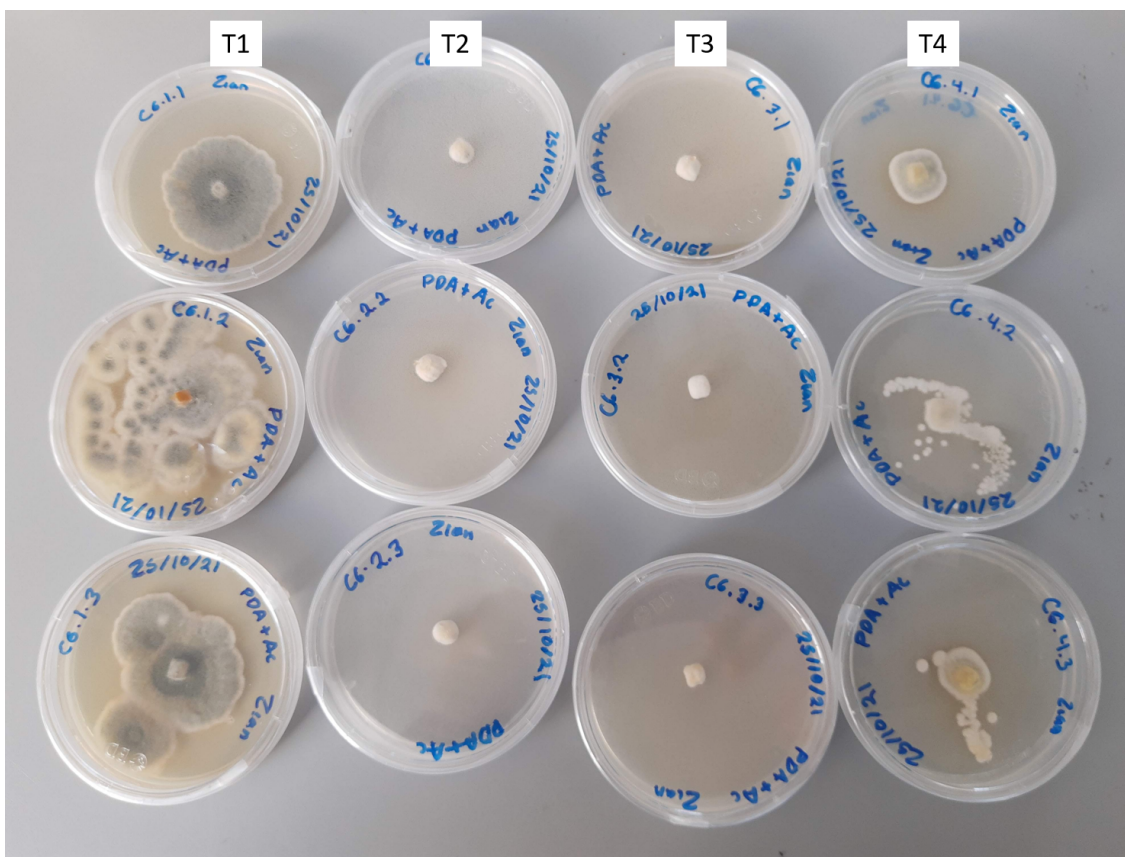


Figura 5.8: Crecimiento de la cepa J en Pruebas de Inhibición de Crecimiento a diferentes concentraciones de acetoclor: T1 (0 mg/L), T2 (6999.38 mg/L), T3 (3495.69 mg/L), T4 (1747.84 mg/L)

En la Figura 5.8, se muestra una diferencia significativa entre el crecimiento del tratamiento T1 (testigo) y los demás tratamientos T2, T3 y T4 que presentan acetoclor. Este es un efecto positivo debido a que la cepa J a diferencia de las cepas F, G e I difícilmente presentaron crecimiento en condiciones de acetoclor y a diferencia de la H, la J tiene un crecimiento más rápido. Estudios han demostrado que el uso de acetoclor en el suelo puede causar

un incremento en el desarrollo de hongos patógenos y provocar un brote de diversidad enfermedades derivadas de estos [12].

Por lo tanto, se descartaron las cepas de hongos para realizar las pruebas de degradación en medio líquido.

5.5. Conclusiones

Las cepas bacterianas A y B presentaron halo bacteriano y crecimiento inconsistente, mientras que las cepas C, D y E presentaron un crecimiento acelerado y uniforme. En la prueba 2 la cepa D mostró un crecimiento más lento que las cepas C y E, por lo tanto, se toman C y E para realizar las pruebas de degradación en medio líquido.

Las cepas de hongos F, G e I no mostraron crecimiento en los tratamientos con presencia de acetoclor, la cepa H presentó un crecimiento lento en el tratamiento 4 (25%) a la recomendación del fabricante y la cepa J tuvo el mayor crecimiento frente a los tratamientos con acetoclor. Se consideró únicamente a la cepa C para pruebas de degradación de medio líquido por tener un metabolismo más eficiente.

5.6. Literatura Citada

- [1] Mahía, J., Cabaneiro, A., Carballas, T., Díaz-Raviña, M. (2008). Microbial biomass and C mineralization in agricultural soils as affected by atrazine addition. *Biology and Fertility of Soils*, 45(1), 99-105.
- [2] Bundy, L. G., Bremner, J. M. (1974). Effects of urease inhibitors on nitrification in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 6(1), 27–30.
- [3] Baćmaga, M., Kucharski, J., Wyszowska, J. (2015). Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with azoxystrobin. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(10).
- [4] Ataikiru, T. L., Okpokwasili, G. S. C., Okerentugba, P. O. (2019). Impact of Pesticides on Microbial Diversity and Enzymes in Soil. *South Asian Journal of Research in Microbiology*, 4(2), 1–16.

- [5] Pastor, J., Vera, M., Martínez, A. (2015). Efecto de los plaguicidas sobre la calidad química y biológica del suelo. *Química Viva*, 14(1), 69–89.
- [6] Torres, D., Rojas, P., López, M., Zamorra, F. (2009). Efecto de los insecticidas methyl-parathion, carbofuran y lambda-cyhalotrina sobre la actividad biológica del suelo. *Revista Unelles de ciencia y tecnología*, 27, 18–31.
- [7] Zhang, Y., Hu, Y., An, N., Jiang, D., Cao, B., Jiang, Z., ... Han, W. (2023). Short-term response of soil enzyme activities and bacterial communities in black soil to a herbicide mixture: Atrazine and Acetochlor. *Applied Soil Ecology*, 181, 104652.
- [8] Hao, Y., Zhao, L., Sun, Y., Li, X., Weng, L., Xu, H., Li, Y. (2018). Enhancement effect of earthworm (*Eisenia fetida*) on acetochlor biodegradation in soil and possible mechanisms. *Environmental Pollution*, 242, 728-737.
- [9] Madariaga-Navarrete, A., Rodríguez-Pastrana, B. R., Villagómez-Ibarra, J. R., Acevedo-Sandoval, O. A., Perry, G., Islas-Pelcastre, M. (2017). Bioremediation model for atrazine contaminated agricultural soils using phytoremediation (using *Phaseolus vulgaris* L.) and a locally adapted microbial consortium. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(6), 367-375.
- [10] Soto, I. H., Méndez, J. P., Navarrete, A. M., Montiel, R. G. C., Alvarado, R. J., Fuentes, A. D. H. (2020). Actividad biológica in vitro del extracto acuoso de *Argemone mexicana* L. en un hongo fitopatógeno: *Sclerotinia sclerotiorum*. *Boletín de Ciencias Agropecuarias Del ICAP*, 6(12), 12–14.
- [11] Li, X., Miao, W., Gong, C., Jiang, H., Ma, W., Zhu, S. (2013). Effects of prometryn and acetochlor on arbuscular mycorrhizal fungi and symbiotic system. *Letters in applied microbiology*, 57(2), 122-128.
- [12] Xin-Yu, L., Zhen-Cheng, S., Xu, L., Cheng-Gang, Z., Hui-Wen, Z. (2010). Assessing the effects of acetochlor on soil fungal communities by DGGE and clone library analysis. *Ecotoxicology*, 19(6), 1111-1116.

Capítulo 6

Evaluación de la asimilación (*in vitro*) de acetoclor como única fuente de carbono de los microorganismos aislados de suelos con historial de acetoclor

En capítulo 6 evalúa la asimilación (*in vitro*) de acetoclor como única fuente de carbono de los microorganismos con actividad biológica más eficiente. Este apartado se desarrolla de la misma forma que el capítulo 5.

6.1. Introducción

Algunos ejemplos reportados como degradadores de plaguicidas son los basidiomicetos y bacterias tales como las gamma-Proteobacteria (*Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Plesiomonas*), beta-Proteobacteria (*Burkholderia*, *Neisseria*), alfaproteobacterias (*Sphingomonas*), actinobacterias (*Micrococcus*) y Flavobacterias (*Flavobacterium*) [1].

En el estudio de Liu *et al.*(2022) [2], se aisló la cepa bacteriana *Cupidesulfovibrio* sp. de un lodo activado anaeróbico, su ruta de degradación ataca el enlace C-Cl del acetoclor por medio de la reducción de sulfato a sulfuro. Posteriormente, forma acetochlor-thioalcohol

and *dis*-S-acetochlor abióticamente, por lo tanto, la cepa SRB-5 presenta un alto potencial de aplicación en la biorremediación compuestos chloroacetamidae.

6.2. Procedimientos experimentales

En este estudio, se generó biomoasa de las cepas C y E en medio de Wright líquido para realizar un ejercicio de cuantificación de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por el número más probable. Se propone que un mecanismo de acción tiene lugar en la asimilación de acetoclor como fuente de carbono, por lo que, se montó un ensayo de degradación en medio líquido las cepas, sustituyendo el manitol por acetoclor según Delgado González, 2022) [3]. Posteriormente, se pesó la biomasa generada y se determinó la concentración de acetoclor por espectrofometría de Luz UV-Vis [4].

6.2.1. Prueba de cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por el método del Número más Probable (NMP)

Para esta prueba se llevó a cabo una siembra por dilución en serie, que consistió en preparar y esterilizar 6 tubos falcon con 9 mL de agua destilada cada uno por cepa. Posteriormente, se tomó una asada del cultivo, se disolvió en un tubo con 9 mL de agua, se denominó 10^{-1} , se extrajo 1 mL de este tubo, se insertó en otro con 9 mL de agua destilada (10^{-2}), se agitó, se extrajo nuevamente 1 mL del tubo, se vertió en otro y así sucesivamente hasta realizar la dilución 10^{-5} . Finalmente se sembró 1 mL de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} en cuatro repeticiones cada una [5].

6.2.2. Crecimiento de biomasa en medio líquido

Una vez que se definió la cepa con mejor crecimiento, se prosiguió a hacer la prueba de generación de biomasa en medio líquido para su cuantificación.

Para realizar esta prueba, se preparó medio de Wright líquido (30 mL) en 6 matraces de Erlenmeyer y 2 blancos. Se tomó una asada por matraz (sin tomar en cuenta los blancos)

y se disolvió en cada una de las repeticiones. Se incubaron a una temperatura de 28 °C con agitador (100 rpm). A las 24 horas, se pesaron los tubos (esterilizados), se registró su peso, se vertió el medio de Wright dentro de tubos de falcon de 50 mL, se centrifugaron a 5000 rpm, con una temperatura de 15°C por 17 minutos. Después, se descartó el sobrenadante y se volvieron a pesar [3].

6.2.3. Pruebas de Degradación en Medio Líquido con Acetoclor

Se llevó a cabo una siembra por triplicado de la cepa C en medio líquido en presencia de acetoclor como única fuente de carbono a una concentración de 2500 mg/mL de i.a; Se Tomaron muestras cada 12 horas, se pesaron tubos de falcón para centrifugar de 50 mL, se centrifugaron las muestras, se volvieron a pesar para determinar la biomasa en peso húmedo y el sobrenadante se guardó para determinar la concentración de acetoclor de acuerdo a su espectro de absorbancia por medio de un espectrofotómetro de luz UV-Vis de acuerdo con la metodología propuesta por Fu *et al.* (2019). [4].

Por otro lado, se propone utilizar métodos ópticos para la detección y cuantificación de acetoclor en un medio (suelo y agua) de acuerdo a la metodología reportada en FuSe escanearon una serie de soluciones estándar de acetoclor (20, 35, 50, 75 y 100 mg/L) a 190–350 nm con un espectrofotómetro UV-vis (Figura 6.1) y la longitud de onda de absorción característica fue de 215 nm [4].

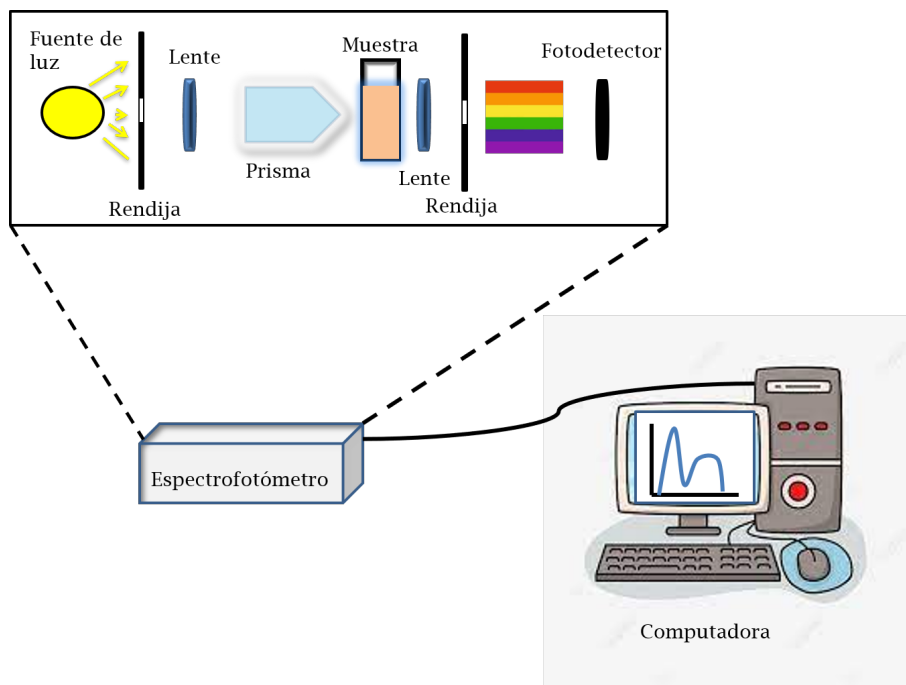


Figura 6.1: Medición de la concentración de Acetoclor por Espectrofotometría de luz UV-Visible [4]

6.3. Resultados

6.3.1. Prueba de cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por el método del Número más Probable (NMP)

Los resultados del conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por el número más probable de las cepas C y E se reportan en la Tabla 6.1.

	Conteo de UFC No. más probable
Cepa C	3.3×10^{-8} UFCg-1mL-1
Cepa E	4.5×10^{-8} UFCg-1mL-1

Tabla 6.1: Conteo de UFC de Bacteria de las cepas C y E.

6.3.2. Pruebas de Degradación en Medio Líquido de la cepa C y Acetoclor

Los resultados de las lecturas de las pruebas de degradación en medio líquido del peso húmedo de la biomasa vs la concentración de acetoclor se presenta en la Figura 6.2.

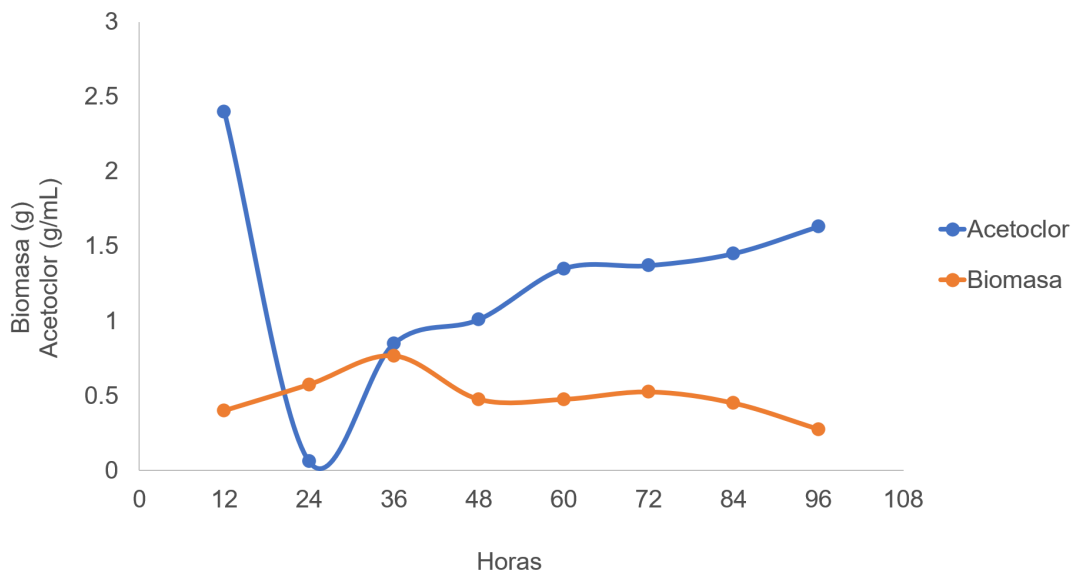


Figura 6.2: Prueba de Degradación de Medio Líquido de la Cepa C vs Acetoclor

La Figura 6.2. indica una concentración inicial de la bacteria que llega a un crecimiento máximo a las 36 horas y comienza a descender, lo que indica un comportamiento normal de un organismo. En contraste con el acetoclor, este comienza con una concentración aproximada de 2500 mg/mL, su concentración mínima llega a las 24 horas y se asume que se genera un compuesto similar detectado por el espectrofotómetro. Por lo tanto, a medida que la biomasa aumenta, la concentración disminuye.

De acuerdo con este comportamiento, propone que la cepa C asimila el acetoclor a su metabolismo y biomasa, y por medio de un mecanismo de acción, genera un compuesto similar.

6.3.3. Pruebas de Degradación en Medio Líquido de la cepa E y Acetoclor

Los resultados de las lecturas de las pruebas de degradación en medio líquido del peso húmedo de la biomasa vs la concentración de acetoclor en la cepa E se presenta en la Figura 6.3.

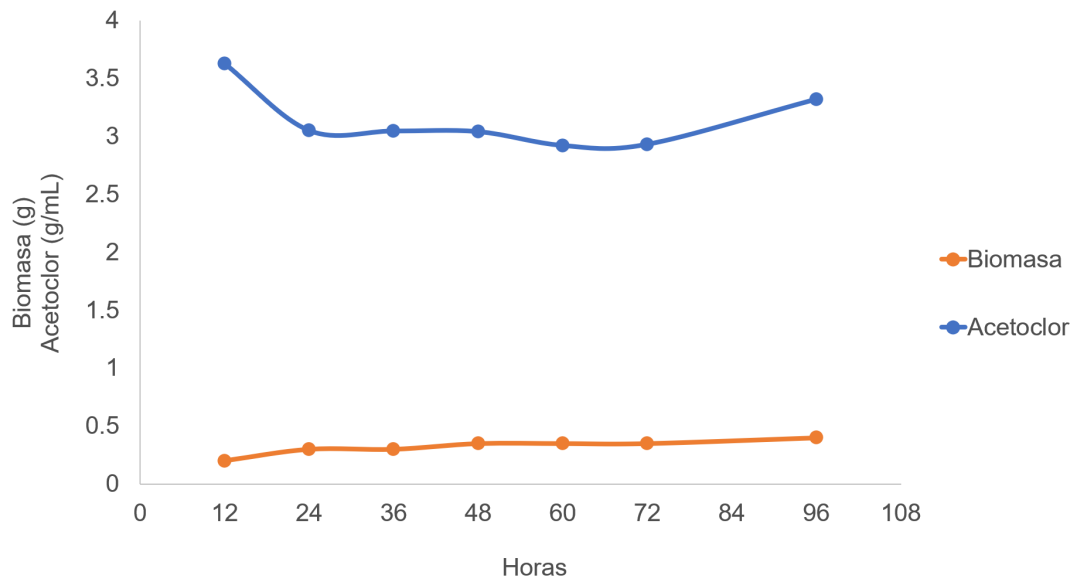


Figura 6.3: Prueba de Degradación de Medio Líquido de la Cepa E vs Acetoclor

En la Figura 6.3. se puede apreciar un comportamiento más constante, al igual que la cepa C, la concentración de acetoclor es inversamente proporcional al crecimiento de la biomasa, es decir, a medida que aumenta la cantidad de biomasa de la cepa, disminuye la concentración de acetoclor. En este caso, se propone la presencia de un mecanismo de acción, ya que las cepas asimilan el acetoclor presente como única fuente de carbono para su desarrollo. Sin embargo, se observa que las lecturas de concentración de acetoclor aumentan su valor al disminuir la biomasa, por lo que se conjetura que las cepas producen un metabolito con características ópticas similares al acetoclor, que es detectado por el espectrofotómetro de luz UV-Vis.

6.4. Discusiones

Se escanearon una serie de soluciones estándar de acetoclor y se definió un ancho de banda de 190–350 nm en un espectrofotómetro de luz UV-vis [4], por lo tanto, las lecturas realizadas para calcular la concentración de acetoclor se encontraban en ese pico de absorción.

A partir del estudio de Li *et al.* (2013) [6], donde se reporta el aislamiento de dos cepas bacterianas *Sphingobium quisquiliarum* DC-2 y *Sphingobium baderi* DE-13 de un lodo con acetoclor, generan una ruta de degradación de acetoclor (Figura 6.4) en la que por medio de N-desalquilización, se forma un compuesto denominado 2-cloro-N-(2-metil-6-etilfenil)acetamida (CMEPA) y posteriormente por medio de escisión del enlace amida, se forma 2 methyl-6 -ethylaminophenol (MEA).

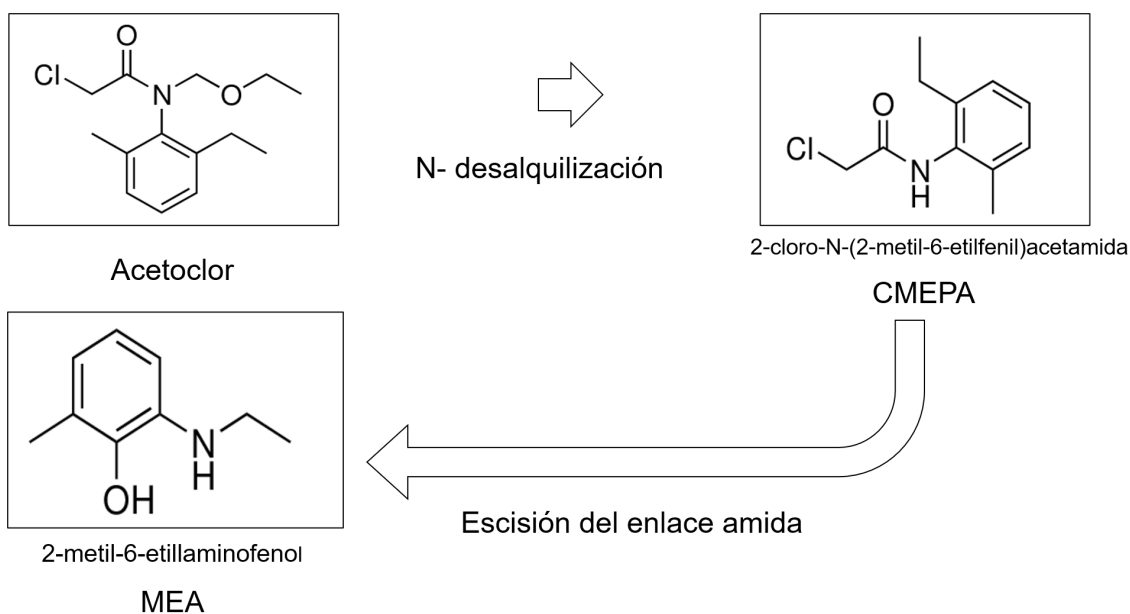


Figura 6.4: Ruta de degradación de acetoclor [6]

6.5. Conclusiones

De acuerdo con lo anterior, se puede hacer la proposición de que existe la posibilidad de que las cepas bacterianas C y E al metabolizar el acetoclor, producen uno de los compuestos anteriormente mencionados y estos son detectados por el espectrofotómetro, sin

embargo, se requiere de realizar más estudios para determinar su aislamiento, identificación y caracterización exacta, y definir su inocuidad para corroborar que existe un proceso de biorremediación.

6.6. Literatura Citada

- [1] Velázquez-Fernández, J.B., Martínez-Rizo, A.B., Ramírez-Sandoval, M., Domínguez-Ojeda, D. (2012). Biodegradation and Bioremediation of Organic Pesticides. In: R.P. Soundararajan (Ed.). Pesticides-Recent Trends in Pesticide Residue Assay. *InTech. Rijeka, Croatia*. pp. 253-272
- [2] Liu, J., Zhao, S., Wu, N., Hu, G., Qiu, J., He, J., Qiao, W. (2022). Sulfate-Dependent Anaerobic Degradation of Herbicide Acetochlor by a Sulfate-Reducing Bacterium *Cupide-sulfovibrio* sp. SRB-5. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- [3] Delgado González, C. R. (2022). Propuesta para un modelo de biorremediación de suelos salino-sódico con la lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.) asistida mediante bioestimulación de un consorcio bacteriano nativo del género *Bacillus* spp.
- [4] Fu, Y., Li, Y., Hu, J., Li, S., Qin, G. (2019). Photocatalytic degradation of acetochlor by -Fe₂O₃ nanoparticles with different morphologies in aqueous solution system. *Optik*, 178, 36-44.
- [5] Islas-Pelcastre, M. (2013). Propuesta de un modelo biológico de remediación en suelos agrícolas contaminados por atrazina.
- [6] Li, Y., Chen, Q., Wang, C.-H., Cai, S., He, J., Huang, X., Li, S.-P. (2013). Degradation of acetochlor by consortium of two bacterial strains and cloning of a novel amidase gene involved in acetochlor-degrading pathway. *Bioresource Technology*, 148(0), 628–631.

Capítulo 7

Conclusiones Generales

En esta sección del trabajo de tesis se dan las conclusiones que se derivan de cada objetivo específico efectuado y descrito en cada capítulo, se exponen a continuación. El suelo con antecedente de acetoclor, a una concentración de 0.21142 mg/mL, presenta un pH neutro, efectos despreciables de salinidad y textura franca, por lo tanto, es un ambiente óptimo para el desarrollo de microorganismos y del cultivo.

El acetoclor a una dilución de Harness® de 1:2500 presenta una absorbancia de 0.023 u.a. de luz UV-Vis y se ubica en un ancho de banda de 265-285 nm.

Del suelo se aislaron cinco cepas bacterianas y cinco cepas de hongos, por lo que, el suelo presenta las condiciones para el desarrollo de estos organismos.

En el caso de hongos, su crecimiento se presentó a las 48 horas en las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} ; sus características generales se presentaron entre tipo de hongo micelio o levadura; tamaño pequeño, mediano o grande; color Marrón, Gris cenizo/pardo, Marrón o Naranja; superficie algodonosa, arrugada o gomosa; densidad opaca o irregular; forma circular o orregular; margen ondulado o plano y elevación elevada o plana. Para bacterias, su crecimiento fue acelerado (<24 horas) entre las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} la descripción morfológica presentó por lo menos una característica diferente entre cepas, forma de colonia circular o irregular; elevación convexa, efusa o umbonada; borde entera o rizada; superficie lisa o concéntrica y todas pertenecen al grupo Gram +.

A continuación, en pruebas de inhibición de crecimiento, las cepas de hongos H y J presentaron crecimiento frente a condiciones de acetoclor, sin embargo, el crecimiento comparado

con el testigo sin acetoclor, era significativamente menor. Las cepas C y E presentaron un crecimiento más eficiente sin halo de inhibición. La cepa C asimila el acetoclor a su metabolismo y aumenta su biomasa a aproximadamente 1 g a las 36 horas y disminuye la concentración de acetoclor (0.1-0.2 g/mL) a las 24 horas. La cepa E mantuvo un comportamiento constante. La concentración de acetoclor disminuyó aproximadamente (0.5 g/mL) a las 24 horas y la biomasa aumentó (0.2-0.5 g) a las 24 horas. Por lo tanto, la cepa C presenta un crecimiento y desarrollo más eficiente. A partir de lo anterior, se realiza la proposición de que se presenta un mecanismo de acción, generando un compuesto similar reportado por Li *et al.* (2013), como 2-cloro-N-(2-metil-6-etilfenil)acetamida (CMEPA), y posteriormente se convierte en 2-metil-6-etilanilina (MEA).

Capítulo 8

Trabajo a futuro

1. Identificación molecular de consorcio bacteriano autóctono de suelo con historial de acetoclor.
2. Diseño de un quimio sensor selectivo hacia acetoclor para permitir su cuantificación e identificación.
3. Aislamiento e identificación de anabolitos resultantes de la secuencia de degradación de acetoclor por género *Rhizobium*.
4. Establecimiento de bioensayo en invernadero de biorremediación de suelo contaminado por acetoclor utilizando una cepa previamente aislada.

Capítulo 9

Anexos

9.1. Protocolo de muestreo de suelo

Zianya Gomez Soto

Objetivo

Definir las características físico-químicas y biológicas de un suelo utilizado para la producción de maíz con antecedentes de acetoclor.

Justificación

El uso inadecuado de herbicidas como acetoclor para cultivo de maíz, ha provocado altos niveles de perturbación en suelos productivos, convirtiéndose en una amenaza para el bienestar de las comunidades y los ecosistemas. Dentro de estos suelos alterados se pueden encontrar diversos microorganismos que poseen la capacidad de degradar estos contaminantes y biorremediar el suelo. La interrogante que se busca resolver es la identificación de estos microorganismos localmente adaptados y evaluar su potencial de degradación de residuos de acetoclor.

Evaluación de la conformidad para muestreo de suelos

De acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis, el muestreo de suelos es un procedimiento para la obtención de una o más muestras representativas de un terreno. El muestreo se realizará con base en los parámetros a ser evaluados. Mediante el muestreo la heterogeneidad de los parámetros del suelo a ser evaluados puede ser estimados en su valor promedio, colectando un determinado número de muestras. Realizar el siguiente procedimiento en un suelo para producción de maíz con aplicación de acetoclor y en un suelo fuera de la producción para ser utilizado como testigo.

Equipo y material

El material y equipo mínimo necesario para la colecta de muestras de suelo en campo es:

1. Barrena de cilindro cerrado o pala recta. La herramienta de muestreo debe garantizar que la muestra obtenida tenga el mismo volumen en espesor y profundidad, de un tamaño suficiente que facilite y permita la formación de las muestras compuestas, que sea fácil de limpiar, resistente al desgaste, útil en suelos arenosos secos y en arcillosos húmedos, y que no contamine las muestras con impurezas. La barrena debe ser fácil de manejar y permitir rapidez en el muestreo.
2. Bolsas de plástico transparente con capacidad para dos kilogramos de suelo
3. Marcadores de tinta indeleble
4. Plano, mapa o fotografías de la zona y fotografías aéreas.

Unidades de muestreo

La unidad de muestreo debe ser un área donde el tipo de suelo en cuanto a textura, color, pendiente, cultivo, manejo, etc., sea aparentemente homogéneo.

La unidad de muestreo debe ser utilizada para la producción de cultivo de maíz y debe tener antecedentes de aplicación de acetoclor de 5 años al presente, independiente de la

temporada de aplicación y del cultivo.

Las unidades de muestreo pueden tener una extensión de dos a ocho hectáreas si el área en cuestión es muy homogénea.

Ubicación de sitios de muestreo

El muestreo más práctico es en zig-zag, este inicia por un lado del terreno, escogiendo al azar el punto de partida para definir el plano del muestreo que cubra homogéneamente la unidad de muestreo. Ya definido el plano de muestreo se decide la distancia entre 5 puntos de muestreo.

Profundidad del muestreo

El muestreo en la mayoría de los cultivos se recomienda realizara una profundidad entre 0-25 cm. Es importante señalar que la profundidad comienza a contar después de haber removido los residuos orgánicos no descompuestos.

Muestra final

La muestra final se debe preparar con submuestras que contengan un mismo volumen de suelo y podrán ser sometidas a un buen proceso de homogeneización.

La homogeneización de las submuestras debe realizarse dentro de un recipiente grande de plástico o lona, evitando la contaminación con otros materiales. El mezclado dentro de la tina de plástico o lona se realiza con una pala de aluminio o de acero inoxidable, de uso manual.

Después del mezclado de las muestras se forma una torta circular, la que se divide en cuatro partes, de las cuales se desechan dos cuartos opuestos y con los dos restantes se repite el proceso de mezclado indicado anteriormente.

Repetir el proceso tantas veces como sea necesario, hasta que la muestra final tenga un peso de 1.5 kg. Guardar las muestras en bolsas de plástico estéril (Nasco-whirl-pak®) de 1 kg etiquetada para análisis microbiológico.

Anexar información acerca de la dosis de aplicación de acetoclor en el cultivo de maíz,

época de aplicación, malezas que se controlan, manejo en general del suelo y del cultivo y características climáticas de la región.

Transporte

Debe evitarse que las muestras colectadas sean expuestas directamente al sol o a otras fuentes de calor durante su transporte, el que debe ser en el menor tiempo posible. Además, se debe reducir el riesgo de eventuales contaminaciones externas durante el envío al laboratorio.

Etiqueta

- Fecha de muestreo:
- Número de muestra:
- Nombre:
- Interesado: Ing. Zianya Gómez Soto
- Nombre del propietario:
- Coordenadas:
- Nombre del sitio:
- Dirección:

9.2. Ficha Técnica de Acetoclor

ACETOCLOR

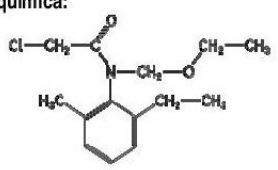
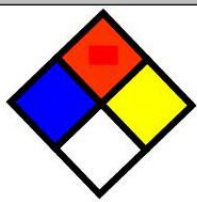
DATOS DE IDENTIFICACIÓN	
Nombre químico (IUPAC): 2-Cloro-N-etoximetil-6'-etilacet-O-toluidida	No. CAS: 34256-82-1
Sinónimos: 2-Cloro-2'-metil-6-etil-N-etoximetilacetanilida; 2'-Etil-6'-metil-N-(etoximetil)-2-cloroacetanilida; 2-Cloro-N-(etoximetil)-6'-etil-o-acetotoluidida; 2-Cloro-N-(etoximetil)-N-(2-etil-6-metilfenil)acetamida; 2-cloro-N-etoximetil-6'-etilacet-o-toluidida; Acetamida, 2-cloro-N-(etoximetil)-N-(2-etil-6-metilfenil)-; Acetoclor; Acetochlor (ANSI); Acetochlore , Acetokl—r; Harness , MON 097	
Nombre comercial, Formulación (%), Presentación: Para uso Agrícola: Acetoclor Técnico, 90.000, Líquido Técnico; Anaclor 880 / Riactor 880 / Acetam 880, 72.700, Concentrado Emulsionable; Harness y/o Harness Plus, 75.300, Concentrado Emulsionable; Proboc 880 Ce / Proclor 880 CE, 72.700, Concentrado Emulsionable; Surpass / Trophy, 68.570, Concentrado Emulsionable; Trophy y/o Surpass, 68.570, Concentrado Emulsionable	
Estructura química: 	Fórmula química: C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂
	Peso molecular: 269.8
Tipo de plaguicida: Herbicida	Clasificación: Cloroacetamida
Uso: Agrícola	
Presentaciones comerciales: <u>Agrícola:</u> Para control de malezas: como concentrado emulsionable en equivalentes en gramos de ingrediente activo (l.A./kg o lL) de: 768, 800 y 839. Para uso exclusivo en plantas formuladoras de plaguicidas agrícolas: como líquido técnico en equivalentes en gramos de ingrediente activo (l.A./kg o l) de: 1089.	
PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS	
El producto en grado técnico a temperatura ambiente es un líquido denso y aceitoso, de color ámbar claro a violeta y olor aromático. Su punto de fusión es menor a los 0°C. Su densidad específica es igual a 1.136 g/ml a 20°C, 1.107 g/ml a 25°C y 1.1 g/ml a 30°C. Su solubilidad en agua es de 233 mg/l a 25°C. Es soluble en alcohol, acetona, tolueno y tetracloruro de carbono. Su presión de vapor es de 3.4 X 10 ⁻⁸ mm Hg a 25°C. Su constante de la Ley de Henry se ha estimado en un valor de 5.4 X 10 ⁻¹¹ atm m ³ /mol. Es ligeramente corrosivo para el acero e incompatible con el cloruro de polivinilo (PVC) y el hule. Es estable bajo condiciones normales de temperatura y presión. Los productos de su descomposición térmica incluyen: óxidos tóxicos de nitrógeno y carbono y vapores tóxicos y corrosivos de cloruros.	
PELIGROSIDAD	
	Salud (Azul): Inflamabilidad (Rojo): Riesgo de Explosión (Amarillo):
DESTINO EN EL AMBIENTE	
Persistencia: Poco persistente (hasta 12 semanas). Este compuesto es liberado directamente al ambiente. En aire se espera encontrarlo sólo en la fase particulada. La precipitación junto con la lluvia y polvo es su mecanismo principal de eliminación de la atmósfera. Se une a los coloides del suelo y por ello presenta un potencial de lixiviación marginal. Su persistencia media a tasas normales de aplicación varía de 8 a 12 semanas, dependiendo del tipo de suelo y condiciones climáticas. Su degradación biológica es	

Figura 9.1: Ficha Técnica de Acetoclor, pág. 1.

9.3. Memoria en Extenso del Congreso Academia Journals Fresnillo 2022

Artículos del Congreso Internacional
de Investigación Academia Journals
Fresnillo 2022

© Academia Journals 2022

Fresnillo, Zacatecas, México
28, 29, y 30 de marzo, 2022

Presencia de *Bacillus* en Suelo con Antecedente de Acetoclor

Ing. Zianya Gómez Soto¹, Dr. Alfredo Madariaga Navarrete², Dra. Eliazar Aquino Torres³,
Dra. Judith Prieto Méndez⁴, Dra. Margarita Islas Pelcastre⁵, Dr. Antonio Vázquez Alarcón⁶ y Dr. Cristian Raziel
Delgado González⁷

Resumen

El acetoclor es un herbicida utilizado en maíz y ha generado daños en la dinámica de la microbiota del suelo convirtiéndose en una amenaza para la seguridad agroalimentaria. El suelo presenta una gran diversidad de microorganismos que tienen la capacidad de desarrollarse bajo condiciones adversas, como el género *Bacillus*. Objetivo: sembrar, aislar e identificar una cepa bacteriana de un suelo con antecedentes de acetoclor para su futura aplicación biorremediadora para la recuperación de un suelo contaminado. Se obtuvieron muestras de suelo del área de cultivo e hizo la siembra en medio de Wright por técnica de dilución, se identificó morfológicamente y por tinción de Gram. Los resultados obtenidos fueron: forma circular, elevación convexa, borde entero, superficie lisa, prueba de tinción de Gram + y con forma de bastón. Se integró dentro del grupo *Bacillus* y permitió abrir un panorama hacia la aplicación de esta cepa para la biorremediación de suelos.

Palabras clave— Bacillus, acetoclor, biorremediación, herbicida

Introducción

La agricultura moderna depende del uso extensivo de agroquímicos para mejorar las condiciones de productividad y controlar plagas, patógenos, malezas, entre otros. Sin embargo, a consecuencia del mal uso de estos productos, se han derivado nuevas amenazas a la seguridad alimentaria, a la salud del ser humano, al medio ambiente y a la conservación de la biodiversidad del suelo. El empleo desmedido y a largo plazo de agroquímicos puede producir un cambio en la comunidad de microorganismos beneficiosos, que participan activamente en los ciclos de nutrientes (fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo y biotransformación de otros nutrientes esenciales) (Mandal et al., 2020). Tal es la situación del uso de Acetoclor, que es un compuesto de la familia de los Chloroacetamidas, ha sido ampliamente utilizado para el control de malezas en las últimas décadas, por lo tanto, la contaminación por este residuo ha generado preocupación (Liu et al., 2020).

El género *Bacillus* es uno de los grupos microbianos con mayor predominancia en el suelo y se ha reportado una gran variedad de estas especies de nichos ecológicos, debido a su diversidad genética y metabólica, *Bacillus* spp. Lleva a cabo múltiples funciones dentro del ecosistema del suelo que va desde el ciclo de nutrientes hasta el otorgamiento de tolerancia al estrés para las plantas. Cabe mencionar que, a causa de esto, se han identificado cepas para la aplicación en la industria agrobiotecnológica (Saxena et al., 2020).

Los miembros de la familia Bacillaceae pertenecen a uno de los grupos de bacterias más resistente, debido principalmente a su capacidad para formar endosporas resistentes al calor radiación, químicos y periodos de sequía, lo que le permite al microorganismo sobrevivir a condiciones de adversidad por un periodo de tiempo prolongado. Estos organismos llevan a cabo importantes roles en la ecología del suelo (p. ej. Procesos de la materia orgánica) y en la salud y estimulación de crecimiento de las plantas (inhibición de patógenos y solubilización del fósforo). Estos organismos se pueden encontrar en el suelo, sedimento, y aire, así como lugares no convencionales como zonas sépticas (Mandic-Mulec et al., 2015).

¹Ing. Zianya Gómez Soto estudiante de la Maestría en Ciencias y Tecnología Agrícola y Forestal Sustentable de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEH), Tulancingo, Hgo; México go242874@uaeh.edu.mx

²Dr. Alfredo Madariaga Navarrete profesor investigador del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la (UAEH), Tulancingo, Hgo. México. alfredo_madariaga@uaeh.edu.mx

³Dra. Eliazar Aquino Torres profesora investigadora del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la (UAEH), Tulancingo, Hgo. México. eaquino@uaeh.edu.mx

⁴Dra Judith Prieto Méndez profesora investigadora del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la (UAEH), Tulancingo, Hgo. México. jprieto@uaeh.edu.mx

⁵Dra. Margarita Islas Pelcastre profesora investigadora del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la (UAEH), Tulancingo, Hgo. México. mislas@uaeh.edu.mx

⁶Dr. Antonio Vázquez Alarcón profesor investigador de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, México. antoniovazquez@gmail.com

⁷Dr. Cristian Raziel Delgado González cristian_delgado@uaeh.edu.mx

Figura 9.2: Gómez Soto, Z., Madariaga Navarrete, A., Islas Pelcastre, M., Aquino Torres, E., Prieto Méndez, J., Delgado González, C. R. (2022). Presencia de *Bacillus* en Suelo con Antecedente de Acetoclor. *Congreso Academia Journals Fresnillo 2022*. (p.355–359). Fresnillo, Zacatecas, México.: Artículos del Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Fresnillo 2022. ISSN online 1946-5351.

9.4. Artículo publicado en la revista South Florida Journal of Development

South Florida Journal of Development, Miami, v.3, n.2, p.2699-2707, mar./apr., 2022. ISSN 2675-5459



Cristian Raziel Delgado González

Doctor

Institución: Instituto de Ciencias Agropecuarias

Dirección: Avenida Universidad Km. 1 s/n, Exhacienda Aquetzalpa, C.P. 43600, Tulancingo de Bravo, Hgo, México

Correo electrónico: cristian_delgado@uaeh.edu.mx

RESUMEN

El acetoclor es un herbicida ampliamente utilizado en la producción de maíz, cuyo frecuente uso ha provocado persistencia grave en el suelo ocasionando alteraciones en las poblaciones del microbiota, lo que causa bajos rendimientos y dificultad para el establecimiento de otros cultivos, así como también genera amenazas en el ecosistema y en la salud de las personas. Por tal motivo, el propósito de este estudio es aislar e identificar microorganismos bacterianos asociados a los suelos con presencia de acetoclor para abrir un panorama hacia el uso de la biorremediación como biotecnología para la recuperación parcial o total de este recurso. EL proyecto se llevó a cabo dentro de las instalaciones del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp), se ubicó un productor de maíz que ha utilizado con frecuencia acetoclor para el control de malezas. Se tomaron muestras de suelo de la parcela y se llevó a cabo el aislamiento de microorganismos por técnica de dilución. Se realizaron lecturas periódicas cada 24 horas de incubación y se aislaron cinco colonias visualmente diferentes para proceder a su purificación. Se llevó a cabo identificación morfológica, la cual la mayoría fueron diferentes en al menos un aspecto, así como pruebas de tinción de Gram en las que resultaron del grupo Grampositivas. Este estudio puede sentar las bases para la identificación de un consorcio bacteriano que pueda tener aplicabilidad biorremediadora en el futuro.

Palabras clave: herbicida, suelo, microorganismo.

ABSTRACT

Acetochlor is a herbicide widely used in corn production, whose frequent use has caused severe persistence in the soil causing alterations in the microbiota populations, which causes low yields and difficulty for the establishment of other crops, as well as generating threats to the ecosystem and people's health. For this reason, the purpose of this study is to isolate and identify bacterial microorganisms associated with soils with the presence of acetochlor in order to open a panorama towards the use of bioremediation as a biotechnology for the partial or total recovery of this resource. The project was carried out within the facilities of the Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp), a corn producer who has frequently used acetochlor for weed control was located. Soil samples were taken from the plot and the isolation of microorganisms was carried out by dilution technique. Periodic readings were taken every 24 hours of incubation and five visually different colonies were isolated for purification. Morphological identification was carried out, most of which were different in at least one aspect, as well as Gram staining tests in which they were Gram-positive. This study may lay the foundation for the identification of a bacterial consortium that may have bioremedial applicability in the future.

Keywords: herbicide, soil, microorganism.

1 INTRODUCCIÓN

Uno de los recursos naturales más afectados a causa de las aplicaciones de productos químicos para el control plagas sin asesoría profesional y poco control de su uso es el suelo. Estos productos generan

2700

Figura 9.3: Gómez Soto, Z., Madariaga Navarrete, A., Vázquez Alarcón, A., Islas Pelcastre, M., Aquino Torres, E., Prieto Méndez, J., Delgado González, C. R. (2022). Aislamiento de consorcio bacteriano localmente adaptado a suelo con antecedentes de acetoclor. *South Florida Journal of Development*, 3(2), 2699–2707. ISSN 2675-5459.