



**UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA**

**Biodegradación del (Herbicida) ácido 2,4-diclorofenoxiacético  
mediante bacterias nativas de suelos agrícolas de la comunidad de  
San Víctor en Corozal, Belice.**

**TESIS  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
INGENIERO AMBIENTAL**

**PRESENTA  
REINER AMIR YAH**

**DIRECTOR DE TESIS  
DRA. NORMA ANGÉLICA OROPEZA GARCÍA**

**ASESORES  
M.I.A. MIRIAM VEGA HERNÁNDEZ  
M.I.A. JUAN CARLOS ÁVILA REVELES  
DR. VÍCTOR HUGO DELGADO BLAS  
I.A. ÁNGEL SILVETI LOEZA**







**UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA**

**TRABAJO DE TESIS TITULADO**

**"Biodegradación del (Herbicida) ácido 2,4-diclorofenoxiacético mediante bacterias nativas de suelos agrícolas de la comunidad de San Victor en Corozal, Belice."**

**ELABORADO POR**  
**REINER AMIR YAH**

**BAJO SUPERVISIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA Y APROBADO COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**INGENIERO AMBIENTAL**

**COMITÉ DE TESIS**


**DIRECTOR:**

  
**DRA. NORMA ANGELICA OROPEZA GARCÍA**


**ASESORA:**

  
**M.I.A. MIRIAM VEGA HERNÁNDEZ**

**ASESOR:**

  
**M.I.A. JUAN CARLOS ÁVILA REVELES**

**ASESOR:**

  
**DR. VÍCTOR HUGO DELGADO BLAS**



**UNIVERSIDAD DE**  
**QUINTANA ROO**  
**CONTROL ESCOLAR**  
**TITULACIONES**

  
**I.A. ANGEL SILVETI LOEZA**



**DCI** DIVISIÓN DE  
CIENCIAS E  
INGENIERÍA

## **Dedico este trabajo a...**

A mis padres, Celia Aurea Yah y Amadeo Yah, las personas que me dieron la vida y quienes más admiro porque han sido el pilar en mi formación como ser humano, porque siempre me han motivado a superarme y alcanzar mis metas, y con su esfuerzo me han podido brindar la herencia más importante: mi educación.

A mis hermanas, Damaris, Ysenia, y Lorena, por el esfuerzo constante de mejorar las cosas día con día y su apoyo incondicional en todo momento. Espero poder ser un ejemplo para sus hijas e hijos.

A mis hermanos, Leiber y Leider por su paciencia y apoyo en momentos difíciles.

Gracias a ustedes por estar siempre conmigo y apoyarme en todo momento, por su confianza incondicional y su motivación para lograr mis metas.

Tal vez no existen palabras para expresarles todo lo que siento...los quiero mucho y estoy orgulloso de formar parte de esta familia.

## **Agradecimientos**

Agradezco la a Secretaria de Relaciones Exteriores, por haberme becado por cuatro años para realizar mis estudios:

**Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México.**

A mi familia por todo su apoyo y confianza incondicional.

A la maestra Miriam Vega Hernández y maestro Ángel Silveti Loeza por permitirme formar parte de su equipo de investigación en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por su paciencia, tiempo, enseñanzas y apoyo incondicional en todo momento. Por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo de tesis.

A la doctora Norma Angélica Oropeza García por su tutoría durante la realización del presente, a quien admiro por ser una persona dedicada a su trabajo.

A la doctora Esmeralda García Díaz por realizar las determinaciones cromatografías correspondientes para la culminación del proyecto en el Instituto de Ciencias de la BUAP.

A mi comité de tesis por el tiempo brindado en la revisión de este trabajo de tesis y por las correcciones realizadas. Así como a mi tutor, Dr. Joel Omar Yah Gamboa, y a los profesores que durante mis estudios me inspiraron y contribuyeron a mi formación académica.

A Jorge Deciderio Carillo Méndez, alumno de la UACJ, que durante su intercambio en la UQRoo aportó la bases para iniciar mi investigación.

A Elisa, Irma, Uzziel, Paula, Pablo por compartir experiencias durante la carrera y con los que concluí esta primera meta. Wendy, Grecia, Isma, y mis compañeros de la BUAP quienes me apoyaron en mis intercambios. Sasha, Andy, Lupita y amigos por acompañarme a la distancia, gracias su apoyo y por siempre creer en mí.

# Tabla de contenido

Dedicatoria.....	Página i
Agradecimientos.....	Página ii
Índice de Tablas .....	Página a
Índice de Figuras .....	Página b
Capítulo I: Introducción .....	1
1.1    Introducción .....	2
1.2    Antecedentes .....	4
1.3    Planteamiento del problema .....	7
1.3.1    Justificación.....	7
1.3.2    Objetivo General .....	8
1.3.3    Objetivos Específicos:.....	8
Capítulo II: Marco Teórico .....	9
2.1    Agricultura en Belice .....	10
2.2    Industria de caña de azúcar en Belice .....	10
2.3    Plaguicidas .....	11
2.3.1    Clasificación de plaguicidas.....	12
2.3.1.1 Concentración .....	12
2.3.1.2 Destino de aplicación .....	12
2.3.1.3 El grado de toxicidad según .....	13
2.3.1.4 Organismos que controlan.....	14
2.3.1.5 Clasificación de los plaguicidas por su modo de acción .....	14
2.3.1.6 Composición química.....	14
2.4    2,4-D.....	15
2.4.1    Propiedades fisicoquímicas .....	15
2.4.2    Modo de acción .....	16
2.4.3    Usos del 2,4-D.....	17
2.4.4    Persistencia.....	17
2.4.4.1 Aire.....	18
2.4.4.2 Agua .....	18
2.4.4.3 Suelo.....	19
2.4.5    Ruta metabólica:.....	19
2.5    Contaminación de suelos por plaguicidas .....	20
2.6    Tratamiento de suelos contaminados con plaguicidas.....	21

2.6.1	Fisicoquímicos .....	22
2.6.1.1	Extracción por vapores del suelo.....	22
2.6.1.2	Airsparging.....	22
2.6.1.3	Decloración o dehalogenación .....	23
2.6.1.4	Lavado de suelos .....	23
2.6.1.5	Extracción de solventes.....	24
2.6.1.6	Solidificación/ estabilización .....	24
2.6.2	Biológicos.....	25
2.6.2.1	Landfarming.....	25
2.6.2.2	Atenuación natural .....	25
2.6.2.3	Composteo.....	26
2.6.2.4	Fitorremediación .....	26
2.6.3	Tecnologías de biorremediación .....	27
2.6.3.1	Bioestimulación.....	27
2.6.3.2	Bioaumentación.....	27
Capítulo III: Materiales y Métodos .....		29
3.1	Plan de trabajo.....	30
3.2	Muestreo.....	31
3.2.1	Zona de estudio .....	31
3.2.2	Obtención de la muestra.....	31
3.3	Caracterización fisicoquímica del suelo.....	32
3.4	Aislamiento .....	32
3.4.1	Preparación de agar y medio de cultivo .....	32
3.4.2	Enriquecimiento .....	32
3.4.3	Preparación de diluciones y siembra en placa.....	33
3.4.4	Identificación y caracterización.....	33
3.4.4.1	Caracterización morfológica .....	33
3.4.4.2	Caracterización mediante tinción de Gram .....	34
3.5	Viabilidad de crecimiento en 2,4-D .....	34
3.6	Preparación de inóculos .....	35
3.7	Cinética de degradación: .....	35
3.7.1	Diseño experimental:.....	35
3.7.2	Preparación de la muestra: .....	36
3.8	Análisis analítico .....	36
Capítulo IV: Resultados y Discusiones.....		37
4.1	Caracterización fisicoquímica de la muestra de suelo.....	38

4.2	Aislamiento Bacteriano .....	41
4.2.1	Viabilidad de Crecimiento.....	42
4.2.2	Tinción de Gram.....	43
4.3	Cinética de crecimiento:.....	44
4.3.1	Cepa B01 .....	44
4.3.3	Cepa B03 .....	47
Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones.....		51
5.1	Conclusiones .....	52
5.2	Recomendaciones e investigación a futuro .....	54
Referencias y Bibliografía.....		55
Anexos.....		62
Anexo 1: Materiales y métodos.....		63
Anexo 2: Resultados .....		64
Curva de calibración .....		64
Cromatograma del estándar.....		65
Cromatograma de Blanco.....		66
Cromatograma de muestras de la cepa B01 .....		67
Cromatograma de muestras de la cepa B03 .....		68



## Índice de Tablas

Tabla 2.1	Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su toxicidad, expresado en DL50 (mg/kg) (García et al. 2012).	Página 13
Tabla 2.2	Clasificación de los plaguicidas en base a los organismos que controlan (CICLOPLAFEST, 1996).	Página 14
Tabla 4.1	Parámetros fisicoquímicos medidos.	Página 36
Tabla 4.2	Cantidades de nutrientes y micronutrientes en la muestra de suelo.	Página 37
Tabla 4.3	Características morfológicas de las cepas resistentes al 2,4-D.	Página 39
Tabla 4.4	Resultados de la viabilidad de crecimiento en agar con 2,4-D en 24 horas.	Página 40
Tabla 4.5	Tinción de Gram de las cepas aisladas.	Página 41
Tabla 4.6	Concentración y densidad óptica de los alícuotas en los intervalos de tiempo	Página 44
Tabla 4.7	Concentración y densidad óptica de los alícuotas en los intervalos de tiempo.	Página 46
Tabla 7.1	Composición del Medio Mínimo Mineral (Mendoza et al., 2011)	Página 60
Tabla 7.2	Composición de caldo Luria Bertani.	Página 60



## Índice de Figuras

Figura 3.1	Plan de trabajo realizado.	Página 29
Figura 4.1	Crecimiento de la cepa B01 en la cinética de degradación.	Página 42
Figura 4.2	Porcentaje de remoción del 2,4-D por la cepa B01 al finalizar las 144 horas.	Página 43
Figura 4.3	Cinética de degradación bacteriana del 2,4-D por la cepa B01.	Página 44
Figura 4.4	Crecimiento de la cepa B03 en la cinética de degradación.	Página 45
Figura 4.5	Porcentaje de remoción del 2,4-D después de las 144 horas por la cepa B03.	Página 46
Figura 4.6	Cinética de degradación bacteriana del 2,4-D por la cepa B03.	Página 47
Figura 7.1	Curva de calibración para el 2,4-D.	Página 63
Figura 7.2	Cromatograma del estándar del 2,4-D.	Página 64
Figura 7.3	Cromatograma de los blancos durante la cinética de degradación.	Página 65
Figura 7.4	Cromatograma de las muestras obtenidas durante la cinética de degradación de la cepa B01.	Página 66
Figura 7.5	Cromatograma de las muestras obtenidas durante la cinética de degradación de la cepa B03.	Página 67

# Capítulo I: Introducción

## 1.1 Introducción

La biorremediación emplea el uso de organismos vivos, muchas veces microorganismos, plantas o ambos, o productos producidos a partir de los mismos para degradar, desintoxicar o encapsular sustancias químicas, tóxicas, presentes en aguas y suelos naturales (Crawford & Rosegner, 2013). Esta técnica puede adaptarse para su uso en el tratamiento del suelo, los sedimentos, los lodos, el agua o incluso el aire ya sea *in situ* u *ex situ*.

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un tipo de herbicida fenoxiácido. El 2,4-D y sus sales, así como ésteres, son eficientes, y altamente selectivos y reguladores del crecimiento de las plantas. Su uso se registró inicialmente en 1947 y, sigue siendo uno de los más utilizados en el mundo. Sin embargo, después de su aplicación en los suelos de cultivo puede entrar en cuerpos de agua. El uso se realiza de forma indiscriminada es decir, no es controlado resultando en la presencia de sus residuos en el ambiente (Bian, Chen & Ji, 2013).

La OMS (Organización Mundial de la Salud) lo ha clasificado como un herbicida hormonal con toxicidad de nivel II. Se considera que es un agente cancerígeno que afecta el hígado y el corazón. De igual forma al sistema nervioso central, provocando convulsiones (Han, Zao & Li, 2015)

La vía de degradación de este compuesto es una de las mejor entendidas, y proporciona un buen modelo para tales investigaciones. Este herbicida se ha liberado en el ambiente durante más de 40 años. Muchas bacterias de diferentes géneros son capaces de degradarlo completamente (Maltseva *et al.*, 1996).

En el país de Belice es comúnmente utilizado en la agricultura de manera anual, en especial para el cultivo de la caña de azúcar. Sin embargo, existe una gran gama de plaguicidas que por tiempos prolongados han estado alterando la calidad del suelo. Por lo tanto, dichos suelos son candidatos para recibir un tratamiento en caso de encontrarse los compuestos químicos; por lo que los microorganismos nativos pueden presentar diversos mecanismos de resistencia, así como el potencial para degraarlos, y un uso potencial dentro de la biorremediación.

Recientemente resulta más económico y viable utilizar técnicas biológicas para la remediación de suelos agrícolas a diferencia las técnicas fisicoquímicas. Los microorganismos autóctonos, en muchos casos, tienen la capacidad de utilizar como fuente de carbono los contaminantes presentes en su medio, por lo que pueden ser empleados para la degradación de metales pesados, plaguicidas, entre otros contaminantes (Benavides et al. 2008).

## 1.2 Antecedentes

La biorremediación es una técnica que puede ser utilizada para la remoción de contaminantes como los plaguicidas e hidrocarburos. Se puede definir como la degradación de compuestos orgánicos mediante el metabolismo de diversos microorganismos. Los mecanismos de acción son estudiados para determinar su efectividad y la potencial ruta de degradación de contaminantes persistentes como el del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), dentro de los resultados que esta técnica busca encontrar.

En el país de Belice no se han realizado estudios en cuanto a la caracterización de los suelos en los últimos cinco años ni se ha buscado proveer un tratamiento para los que se encuentran contaminados con plaguicidas. Sin embargo, se ha observado un deterioro en las cantidades de producción por lote, así como una notable variación en el color y textura de los suelos.

En cuanto al uso de plaguicidas, ya sean fungicidas, insecticidas, herbicidas, existe una gran gama y dentro de los cuales destacan la Ametrina, Glifosfato, Flash, Diuron, Paraquat, y 2,4-D, entre otros. Cabe recalcar, que este último se encuentra registrado como un herbicida de uso en la producción de caña de azúcar por el departamento de control de plaguicidas por sus siglas en inglés (Pesticides Control Board) de Belice. Por lo tanto, el presente estudio pretende evaluar la presencia de microorganismos autóctonos de los suelos agrícolas zona cañera con la capacidad de degradar el 2,4-D.

El empleo de microorganismos autóctonos resulta viable para la degradación de plaguicidas, petróleo, y bioacumulación de metales pesados. Existe una gran gama de micro biota en los suelos que resultan de interés. Para la degradación del compuesto de interés se han realizado valiosos estudios para la obtención de cepas microbianas con la capacidad degradadora, dentro de los cuales destacan *Serratia marcescens*, *Penecillium sp.*, *Cupriavidus campinensis*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas sp.*, *Sphingomonas paucimobilis*, entre otras (Stets et al., 2017; Han et al., 2015; Cycoń et al, 2011; Li et al., 2015).

*Serratia marcescen* y *Penecillium sp.*, presentaron un gran potencial de degradación del 2,4-D. Dichas cepas fueron aisladas de suelos contaminados de Brasil en el año 2007, cabe mencionar que el suelo había sido expuesto al contaminante cuatro meses antes de



ser utilizado. Estas fueron identificadas por pruebas bioquímicas, tinción de Gram y se cultivaron en agar selectivo de MacConkey. Se observó mayor degradación entre las horas 10 y 20 después de ser expuestas a una concentración de 806 g/L. El porcentaje de degradación se determinó empleando la técnica HPLC (cromatografía de alta resolución) (Stets et al. 2017).

Por otra parte la bacteria, *Cupriavidus campinensis*, aislada de suelos contaminados con 2,4-D en Beijing, China. Han, Zhao, y Li (2015), identificaron la cepa basándose en la secuencia de 16S rRNA, sus características morfológicas, fisiológicas, y bioquímicas. En este estudio los microorganismos se inocularon en suelos (20 gramos) que contenían una concentración de 350 ppm de contaminante en condiciones controladas. Han et al, (2015) reportaron una remoción del 99.57% del compuesto después de 6 horas, esto fue determinado mediante HPLC. La cepa se denominó BJ71 y es un candidato potencial para la biorremediación de 2,4-D.

En suelos procedentes del norte de Silesta, Polonia Cycoń, Źmijowska, Piotrowska-Seget (2011) lograron aislar tres cepas bacterianas de una muestra que presentaban un historial de contaminación por 2,4-D. Se identificaron las bacterias como *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas sp.*, y *Sphingomonas paucimobilis* y presentaron la capacidad de utilizar el contaminante como fuente única de carbono en un medio mineral basal. Estas degradaron el 69%, 73%, y 54% respectivamente, de una concentración total de contaminante de 50 mg/L en un periodo de 10 días. A los primeros 4 días se observó mayor crecimiento y degradación de 2,4-D. Los porcentajes se cuantificaron empleando la técnica de HPLC.

El uso de cepas bacterianas aisladas de suelos con un historial de exposición presenta un gran potencial para ser empleados en la biorremediación de los suelos contaminados. En muchos casos se ha realizado la identificación de los genes presentes en los microorganismos para que puedan tener la capacidad degradadora del 2,4-D.

En la cepa bacteriana de la especie *Novosphingobium* Dai, Li, Zhao, y Xie (2015) lograron identificar el gen que permite la asimilación del 2, 4-D. Misma que fue aislada de suelos procedentes de la provincia Jiangsu en China, empleando un medio peptonado de extracto de carne. Posteriormente, se realizó la codificación del gene que se resultó ser TfdA $\alpha$ , de igual forma, presentó una degradación del 50 a 95% del herbicida. Se determinó a través de la bioaumentación en suelos contaminados que contenían una concentración inicial de 200 mg/Kg del 2,4-D.

Por otra parte, Robles-González et al. (2006), emplearon microorganismos previamente aislados en biorreactores de lodo en escala laboratorio para tratar suelos arcillosos con contenido elevado de materia orgánica. Los suelos contenían una concentración de 300 mg 2,4-D/Kg y un contenido de 48% de arcilla y 4% de materia orgánica. Para el tratamiento se emplearon reactores aerobios y en biorreactores de lodos reductores de azufre por un lapso de 14 días resultando con eficiencia de 93% y 25% respectivamente. Por lo que concluyeron que un tratamiento de suelos contaminados con 2,4-D en biorreactores resulta como una alternativa para el tratamiento biológico de los mismos.

## 1.3 Planteamiento del problema

### 1.3.1 Justificación

El país de Belice es considerado como un país en vías de desarrollo y sus principales ingresos son obtenidos mediante el turismo y la agricultura. Dentro del sector agrícola se incluyen los siguientes subsectores: producción de caña de azúcar; frutas como naranjas, toronjas, plátanos, y piñas; productos avícolas y ganadería; y por último la industria de madera.

La agricultura emplea un 13% de la fuerza laboral en el país, teniendo como exportaciones en el primer y segundo lugar el plátano y azúcar con 13.6% y 12.2%, respectivamente (OEC, s.f.). La producción de caña de azúcar tiene mayor auge en la zona norte, distrito de Corozal y Orange Walk, siendo este la principal fuente de ingresos para sostener a la población de dicha zona. Por tal motivo, se observa una explotación de los suelos puesto que muchos productores buscan obtener una mayor productividad en parcelas pequeñas.

En el proceso de la producción de este vegetal los cañeros aplican de manera anual plaguicidas ya sean fungicidas, herbicidas, insecticidas, así como fertilizantes sintéticos. Los tipos de fertilizantes comúnmente aplicados son de tipo 15-20-15 (cantidad de Nitrógeno, Fósforo, Potasio, respectivamente). Por otra parte, los plaguicidas comúnmente utilizados son el 2,4-D, Ametrina, Glifosfato, Diuron, Paraquat, Flash, entre otros.

La aplicación de los compuestos químicos se realiza con base a las recomendaciones que se dieron a inicios de la producción de dicho vegetal por parte de la Belize Sugar Cane Farmers Association (BSFA). Asimismo, algunos productores se basan en las recomendaciones de las etiquetas en los envases de los plaguicidas. Conforme pasó el tiempo no se realizaron estudios para determinar su eficiencia, y se desconoce las afectaciones de estas en los suelos.

La presente investigación tiene como propósito aislar bacterias de suelos agrícolas expuestos a plaguicidas al plaguicida 2,4-D, para estudiar su potencial para degradación del mismo y las posibles estrategias de biorremediación en los sitios afectados por el plaguicida. Esto para aportar una contribución a la base de datos del país y servir para investigaciones a futuro.

### 1.3.2 Objetivo General

Evaluar el potencial de degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) por bacterias nativas de suelos agrícolas de la comunidad de San Víctor en Corozal, Belice.

### 1.3.3 Objetivos Específicos

- Identificar la zona expuesta al herbicida y obtener una muestra de la misma.
- Caracterizar físico-químicamente la muestra de suelo obtenida.
- Aislar bacterias del suelo y estudiar su capacidad degradadora del plaguicida.
- Evaluar la capacidad degradadora de las bacterias mediante HPLC.

# Capítulo II: Marco Teórico



## 2.1 Agricultura en Belice

Belice es un país independiente ubicado en el extremo sureste de la península de Yucatán (Norte de Centroamérica), limita al norte con México, al sur y oeste con Guatemala y al este con el mar Caribe. Tiene una superficie total de 22.700 km<sup>2</sup> (8.764 millas<sup>2</sup>) y una población de 333,200 habitantes Belice se encuentra entre 15 ° 52'9 "y 18 ° 29 '55" de latitud norte y 87 ° 28 "y 89 ° 13' 67" de longitud oeste (Statistical Institute of Belize, 2010).

La agricultura en Belice se caracteriza por tres subsectores principales: a) un sector de exportación tradicional organizado para el azúcar, el banano, los cítricos y los productos marinos; b) un sector agrícola tradicional, de pequeña escala, que produce alimentos principalmente para el consumo local, y c) un sector comercial bien integrado a gran escala (es decir, menonitas) (FAO, Country Programming Framework for Belize: 2011-2015, 2011).

La caña de azúcar se cultiva en los distritos del norte de Orange Walk y Corozal en más de 5,300 agricultores de caña en aproximadamente 23,100 a 26,300 hectáreas de tierra (IICA, 1996). Por lo que es la principal fuente ingresos económicos en las familias de los distritos anteriormente mencionados.

## 2.2 Industria de caña de azúcar en Belice

La industria azucarera se inició poco después de que los refugiados mestizos llegaron a Belice durante la Guerra de Castas a principios de 1847. Uno de los primeros inmigrantes mestizos para plantar la caña fue don Justo Rejón, quién alquiló 13 acres de tierra del Sr. James Welsh para establecer Santo Tomas Estate. Estos inmigrantes produjeron azúcar para consumo local, pero en 1857 realizaron sus primeros envíos a Inglaterra. La llegada de los confederados americanos en 1865 también vio la adición de más cañas de caña en el sur en granjas como Spice Hill, Dixie, Big Hill, Forest Home, Little Rock, Sunny Hill y Missouri Farm.

En la década de 1880, el gobierno colonial eliminó un impuesto de importación de 3 centavos por libra sobre la azúcar en los países europeos y la producción disminuyó de 2,800 toneladas de azúcar a 100 toneladas en 1893. A partir de entonces, la industria

creció lentamente y la Fábrica Libertad fue comprada en Guantánamo, Cuba y reconstruida en Corozal en 1935. La industria creció lentamente hasta la década de 1950 cuando Belice tenía garantizada una cuota anual de azúcar por parte de los británicos.

En la actualidad, más de 60,000 acres de caña de azúcar están en producción en los distritos de Orange Walk y Corozal. El procesamiento de la azúcar se lleva a cabo en la fábrica de Tower Hill en las afueras del sur de Orange Walk Town. En 2009, se cosecharon 917,728 toneladas de caña en el país. El precio por tonelada de caña en 2011 fue de \$ 72,17, lo que significó que se pagaron más de \$ 61 millones de dólares a los agricultores. El precio pagado a Belice por tonelada de azúcar en 2011 fue de €335,14 o aproximadamente \$ 907. La industria azucarera produce azúcar blanco, azúcar morena, melaza y electricidad de la caña de azúcar. La electricidad es producida por la quema de bagazo de caña de azúcar que se utiliza para convertir el agua en vapor. El vapor se usa para convertir turbinas que producen electricidad (Smith, 2012).

## 2.3 Plaguicidas

Plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, se incluyen en esta definición las sustancias defoliantes y las desecantes (CICLOPLAFEST, 1996).

Los plaguicidas tienen las siguientes finalidades (Bartual y Berenguer, 1980)

- Combatir los agentes nocivos para los vegetales y productos vegetales o prevenir su acción,
- Favorecer o regular la producción vegetal, con excepción de los nutrientes y los destinados a la enmienda de suelos.
- Conservar los productos vegetales, incluida la protección de las maderas,
- Destruir parte de los vegetales o prevenir un crecimiento indeseable de los mismos,
- Hacer inofensivos, destruir o prevenir la acción de otros organismos nocivos o indeseables distintos de los que atacan a los vegetales.

Todas estas sustancias son compuestos químicos tóxicos y por su aplicación en tierras de cultivo, evidentemente son compuestos que se encuentran como contaminantes de grandes extensiones de suelos en todo el país. En México aún continúan en el mercado agroquímicos organoclorados como el ácido 2,4 dicloro-fenoxiacético, el pentaclorofenol (PCP) y dicofol, además de plaguicidas a base de carbamatos y los organofosforados como el malatión (Volke y Velasco, 2002).

### 2.3.1 Clasificación de plaguicidas

Los plaguicidas se pueden clasificar de varias maneras. A continuación se presentan las más comunes (CICLOPLAFEST, 1996):

#### 2.3.1.1 Concentración

- Plaguicida técnico: la máxima concentración del ingrediente activo obtenida como resultado final de su fabricación, de la cual se parte para preparar un plaguicida formulado.
- Plaguicida formulado: mezcla de uno o más plaguicidas técnicos, con un o más ingredientes conocidos como inertes, cuyo objeto es dar estabilidad al ingrediente activo o hacerlo útil y eficaz; constituye la forma usual de aplicación de los plaguicidas.

#### 2.3.1.2 Destino de aplicación

- Uso fitosanitario o productos fitosanitarios: los destinados a su utilización en el ámbito de la sanidad vegetal o el control de vegetales.
- Uso ganadero: los destinados a su utilización en el entorno de los animales o en actividades relacionadas con su explotación.
- Uso en la industria alimentaria: los destinados a tratamientos de productos o dispositivos relacionados con la industria alimentaria.
- Uso ambiental: los destinados al saneamiento de locales u otros establecimientos públicos o privados.

- Uso en higiene personal: aquellos preparados útiles para la aplicación directa sobre el hombre.
- Uso doméstico: cualquier preparado destinado para aplicación por personas no especialmente calificadas en viviendas o locales habitados.

### 2.3.1.3 El grado de toxicidad

El grado de toxicidad de los plaguicidas se lista a continuación (Bertual y Berenguer, 1980):

- Baja peligrosidad: los que por inhalación, ingestión, y/o penetración cutánea no entrañan riesgos apreciables.
- Nocivos: los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan entrañar riesgos de gravedad limitada.
- Tóxicos: los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan entrañar riesgos graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte.
- Muy tóxicos: los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan entrañar riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte.

La OMS (Organización Mundial de la Salud) propuso una clasificación de los plaguicidas en base a su toxicidad en ratas u otros animales de laboratorio vía administración oral y dermal estimando la dosis letal media (DL50, produce la muerte del 50% de la población expuesta). En la siguiente tabla se desglosa la clasificación propuesta por la OMS.

**Tabla 2.1.** Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a su toxicidad, expresado en DL50 (mg/kg) (García et al. 2012).

CLASE	TOXICIDAD	EJEMPLOS
CLASE IA	Extremadamente peligroso	Paration, Dieldrin
CLASE IB	Altamente peligroso	Eldrin, Dichlorvos
CLASE II	Moderadamente peligroso	DDT, Chloradane
CLASE III	Ligeramente peligroso	Malathion

#### 2.3.1.4 Organismos que controlan

En este tipo de clasificación, los plaguicidas se nombran después del nombre de la plaga correspondiente en el objetivo véase la tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Clasificación de los plaguicidas en base a los organismos que controlan (CICLOPLAFEST, 1996).

<b>TIPO DE PLAGUICIDAS</b>	<b>ORGANISMOS QUE CONTROLAN</b>
<b>INSECTICIDA</b>	Insectos
<b>ACARICIDA</b>	Ácaros
<b>FUNGICIDA</b>	Hongos y levaduras
<b>HERBICIDA</b>	Hierba y maleza
<b>RODENTICIDA</b>	Roedores
<b>MOLUSQUICIDA</b>	Moluscos
<b>BACTERICIDA</b>	Bacterias

#### 2.3.1.5 Clasificación de los plaguicidas por su modo de acción

La clasificación de los plaguicidas por su modo de acción es la siguiente (CICLOPLAFEST, 1996):

- De contacto: actúa principalmente al ser absorbido por los tejidos externos de la plaga.
- De ingestión: debe ser ingerido por la plaga para su acción efectiva.
- Sistémico: al aplicarse en plantas o animales, se absorbe y traslada por su sistema vascular a puntos remotos del lugar en que se aplica y en los cuales actúa.
- Fumigante: se difunde en estado gaseoso o de vapor y penetra por las vías de absorción.
- Repelente: impide que las plagas ataquen.
- Defoliante: causa la caída del follaje de las plantas.

#### 2.3.1.6 Composición química

Los plaguicidas según su composición química puede ser (CICLOPLAFEST, 1996):



Compuestos inorgánicos: Estos son compuestos que carecen de carbono. En este catálogo sólo se consideran los derivados de cobre, azufre, zinc y aluminio.

Compuestos orgánicos: son aquellos que contienen átomos de carbono en su estructura química, la mayoría son de origen sintético, fabricados a partir de compuestos químicos básicos; algunos son extraídos de plantas, por lo que se conocen como botánicos. Los compuestos orgánicos sintéticos utilizados como plaguicidas pertenecen a distintos grupos o familias químicas. Cada una de estos grupos tiene algunas características comunes y en cualquiera de ellos puede haber insecticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas u otros tipos de plaguicidas.

Plaguicidas biológicos: se llama a los virus, microorganismos o sus metabolitos, formulados como insumos, que pueden controlar a una plaga en particular.

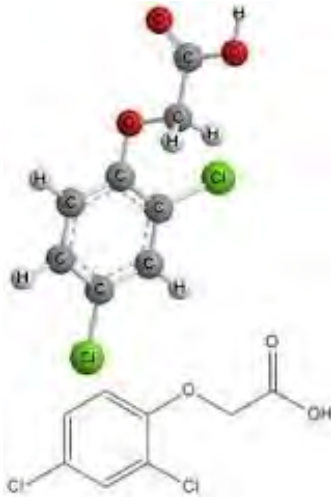
## 2.4 2,4-D

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), un compuesto organoclorado, se usa como un herbicida sistémico selectivo para el control de malezas de hoja ancha anual y perenne. Sus sales se absorben fácilmente por las raíces de las plantas y se trasladan a los tejidos meristemáticos de las raíces y los brotes (Tomlin, 1994). Donde se acumula y actúa como una hormona vegetal, causando un crecimiento incontrolado en los tejidos meristemáticos. Dentro de estos tejidos, inhibe la síntesis de ADN y proteínas, por lo tanto previene el crecimiento y desarrollo normal de las plantas. Es uno de los herbicidas más utilizados a nivel mundial (Copping, 2002; Watkins, 2002).

### 2.4.1 Propiedades fisicoquímicas

A continuación se ilustran las propiedades fisicoquímicas del 2,4-D más sobresalientes y que influyen en su potencial de contaminación:

- Fórmula química:  $C_6H_6Cl_2O_3$ ,
- En la imagen 2.1 se ilustra la estructura química del 2,4-D:



**Imagen 2.1.** Estructura química del 2,4-D. Recuperado de:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24-dichlorophenoxyacetic-acid#section=Top>.

- Peso molecular: 221.033 g/mol,
- Color: polvo cristalino blanco tendiendo a amarillo,
- Olor: inodoro,
- Punto de ebullición: no tiene punto de ebullición a presión normal, se descompone al ser calentado,
- Punto de fusión: 280 °F,
- Solubilidad: soluble en agua,
- Densidad: 1.563 g/ml a 68°F.

#### 2.4.2 Modo de acción

Este herbicida es un "imitador de auxina" o auxina sintética. Este tipo, mata a la hierba objetivo al imitar a la auxina de la hormona de crecimiento vegetal (ácido indol-acético), y cuando se administra en dosis efectivas, causa un crecimiento vegetal descontrolado y desorganizado que conduce a la muerte de la planta. El modo exacto de acción de 2,4-D no se entiende completamente, y es posible que cause una variedad de efectos que son fatales cuando se combinan. Se cree que acidifica las paredes celulares lo que permite que las células se alarguen de manera incontrolada. Las bajas concentraciones de 2,4-D

también pueden estimular el RNA, el ADN y la síntesis de proteínas, lo que lleva a una división y crecimiento celular descontrolado y, en última instancia, a la destrucción del tejido vascular. Por otro lado, altas concentraciones de 2,4-D pueden inhibir la división y el crecimiento celular. La muerte de la planta generalmente ocurre dentro de tres a cinco semanas después de la aplicación. (Tu et. al 2001).

### 2.4.3 Usos del 2,4-D

En América Latina y el Caribe, el 2,4-D es uno de los herbicidas de mayor uso, junto con el glifosato, paraquat y, atrazina. Se usa para controlar malezas de hoja ancha, en una gran variedad de cultivos. En México, por ejemplo, se recomienda para el control de malezas en arroz, caña de azúcar, maíz, sorgo, trigo, cebada, avena, limón, naranja, mandarina, tangerino, lima, centeno, potreros, pastizales, sitios acuáticos, e incluso en el césped en la ciudad, aunque los principales usos varían según el país (RAP-AL, 2007).

En Argentina es el plaguicida más usado después del glifosato y la atrazina se usa principalmente para controlar malezas de hoja ancha; no está prohibido ni restringido para cultivo alguno. En Paraguay se usa principalmente en pasturas para controlar las malezas de hojas anchas y algunas semileñosas y también en trigo. La mayor parte de los países importan el 2,4-D ya sea como ingrediente activo o como producto formulado. Es común también que un país importe el ingrediente activo, lo formule y lo exporte de nuevo a otro país (RAP-AL, 2007).

Destaca México como productor de 2,4-D en América Latina, pero la región lo ha importado de una gran variedad de países no solo de México sino también de Estados Unidos (donde Dow Agrosiences lo produce), China, Alemania, Austria, Colombia, Inglaterra, India, Argentina y Polonia(RAP-AL, 2007).

### 2.4.4 Persistencia

Las sales y ésteres de amina de este plaguicida no son persistentes en la mayoría de las condiciones ambientales. Típicamente, se espera que las formas éster y amina del 2,4-D

se degraden rápidamente a la forma ácida. Se han estimado los valores de semivida del suelo a los 10 días para las formas de ácido, sal de dietilamina y éster (Jervais et, al 2008).

#### 2.4.4.1 Aire

La principal fuente de 2,4-D en el aire deriva de las aplicaciones de pulverización del herbicida (Howard, 1991). Si no se utilizan las técnicas de aplicación adecuadas, los ésteres de alta volatilidad pueden ser propensos a la pulverización y causar efectos tóxicos en los cultivos cercanos (Ghassemi et al., 1981). Con la excepción de las formulaciones de ésteres altamente volátiles, la pequeña cantidad de 2,4-D que entra al aire está sujeta a fotooxidación por reacción con radicales hidroxilo con una vida media estimada de 1 día (Howard, 1991) o se disuelve en gotas de agua y es transportado de regreso a la superficie de la tierra a través de deposición húmeda (Ghassemi et al., 1981). Las formulaciones de éster y amina poco volátiles se utilizan en los bosques, por lo que la deriva de esas aplicaciones es relativamente insignificante.

#### 2.4.4.2 Agua

La persistencia del 2,4-D en el agua es controlada principalmente mediante procesos biológicos y están mediados por las condiciones ambientales del entorno. Pueden entrar en estanques y arroyos por aplicación directa o por deriva accidental, escurrimiento de suelos o por lixiviación a través de la columna de suelo (Norris, 1981). En el ambiente acuoso se encuentra más comúnmente como el anión libre (Halter, 1980). Las formulaciones de sal de amina se disocian a las formulaciones de aniones y ésteres que se hidrolizan al anión, generalmente en un día (Ghassemi et al., 1981). La descomposición del anión parece ser el resultado de microbios o fotodegradación, y la fotólisis desempeña un papel menor si la degradación microbiana es rápida.

La tasa de biodegradación dependerá del nivel de nutrientes presentes, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno y si el agua ha sido previamente contaminada con 2,4-D u otros ácidos fenoxiacéticos (Howard, 1991). Tanto la degradación aeróbica como anaeróbica son posibles en el agua, aunque la degradación anaeróbica es relativamente lenta con una vida media de 312 días. La degradación acuática anaeróbica es una vía menor, los principales metabolitos son 2,4-diclorofenol (DCP) y dióxido de carbono, con 4-

clorofenol y 2,4-dicloroanisol (2,4-DCA) como metabolitos menores (Concha y Kathryn, 1994).

No se espera que la fotodescomposición de 2,4-D en aguas superficiales naturales sea significativa debido a la radiación ultravioleta más débil de la luz solar natural y la presencia de materia suspendida y orgánica que reduce los efectos de la radiación solar (Ghassemi et al., 1981).

#### 2.4.4.3 Suelo

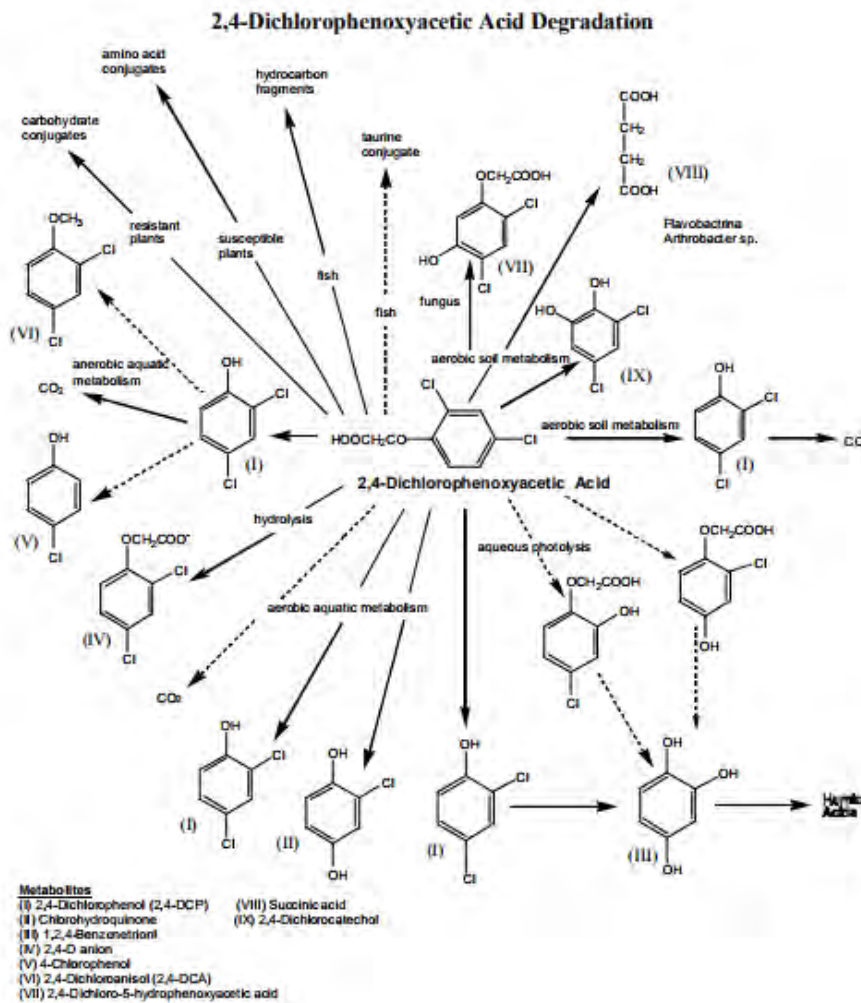
La vida media de este herbicida es relativamente corta y tiende a permanecer inmóvil en el suelo. Su vida media en los suelos varía entre una y seis semanas. En el suelo se produce tanto la hidrólisis como la degradación microbiana de los herbicidas fenoxi (Alstofil, 1984). Se degrada rápidamente en el suelo, especialmente por la acción de los microorganismos del suelo. Los metabolitos principales que se forman en el suelo son el 2,4-diclorofeno (DCP) y el 4-clorofeno, y finalmente, formas inocuas. La materia orgánica, el pH del suelo y el aluminio intercambiable son los determinantes principales del porcentaje adsorbido. Es probable que el 2,4-D se una más fuertemente a suelos con un alto contenido de materia orgánica que a aquellos con un contenido bajo (Anon, 1995).

En suelos con elevada acidez o en suelos de regiones frías o áridas, la degradación del 2,4-D es aparentemente lenta. La mineralización del mismo en suelos arcillosos fue más alta que en suelo de textura franca arcillosa, bajo condiciones anaeróbicas (Zayed, 2002).

#### 2.4.5 Ruta metabólica

La ruta metabólica de dicho compuesto no se conoce con precisión sin embargo muchos autores han propuesto las vías de degradación. En la Imagen 2.2 se ilustra los principales procesos mediante los cuales el 2,4-D puede ser degradado.





**Imagen 2.2.** Principales rutas de degradación ambiental de 2,4-D.

Fuente: Walters, 1999.

## 2.5 Contaminación de suelos por plaguicidas

La contaminación del suelo se debe tanto a tratamientos específicos (por ejemplo: insecticidas aplicados al suelo), como a contaminaciones provenientes de tratamientos al caer al suelo el excedente de los plaguicidas, o ser arrastradas por las lluvias las partículas depositadas en las plantas.

La mayoría de los herbicidas, los derivados fosforados y los carbamatos, sufren degradaciones microbianas y sus residuos desaparecen en tiempo relativamente corto. En la acumulación de residuos de plaguicidas influye el tipo de suelo; los arcillosos y orgánicos retienen más residuos que los arenosos. Los mayores riesgos se presentan con

la aplicación de algunos plaguicidas organoclorados, que son de eliminación más difícil, persistiendo en el suelo más tiempo.

La evaluación del grado de contaminación del suelo por plaguicidas es de gran importancia por la transferencia de ellos a los alimentos. Algunos pueden permanecer durante períodos de 5 a 30 años, como es el caso del DDT. En el caso de la ganadería, los residuos de plaguicidas pasan del suelo al forraje y finalmente a los animales, concentrándose en la grasa, y por consiguiente, incrementan la concentración de residuos persistentes en la carne y la leche (Puerto-Rodriguez *et. al.*, 2014)

## 2.6 Tratamiento de suelos contaminados con plaguicidas

En la actualidad se dispone de un amplio abanico de tecnologías de recuperación de suelos contaminados, algunas de aplicación habitual y otras todavía en fase experimental, diseñadas para aislar o destruir las sustancias contaminantes alterando su estructura química mediante procesos generalmente químicos, térmicos o biológicos. Su aplicación depende de las características del suelo y del contaminante, de la eficacia esperada con cada tratamiento, de su viabilidad económica y del tiempo estimado para su desarrollo (Reddy *et al.*, 1999).

Según la forma en la que se apliquen las técnicas de recuperación de suelos se habla de tratamientos *in situ*, que actúan sobre los contaminantes en el lugar en el que se localizan, y tratamientos *ex situ*, que requieren la excavación previa del suelo para su posterior tratamiento, ya sea en el mismo lugar (tratamiento *on-site*) o en instalaciones externas que requieren el transporte del suelo contaminado (tratamiento *off-site*). Los tratamientos *in situ* requieren menos manejo, pero por lo general son más lentos y más difíciles de llevar a la práctica dada la dificultad de poner en contacto íntimo a los agentes de descontaminación con toda la masa de suelo contaminada. Los tratamientos *ex situ* suelen ser más costosos, pero también más rápidos, consiguiendo normalmente una recuperación más completa de la zona afectada (Bernard *et. al* 2007).

## 2.6.1 Fisicoquímicos

Las técnicas fisicoquímicas se basan en fenómenos físicos y / o químicos. En esta sección, las técnicas más importantes basadas en la aplicación de métodos fisicoquímicos para la descontaminación del suelo serán revisadas.

### 2.6.1.1 Extracción por vapores del suelo

Dentro de las técnicas físico-químicas, una de las más utilizadas es la extracción de vapor del suelo (SVE), que es una tecnología no biológica para el tratamiento de compuestos orgánicos volátiles compuestos (COV), compuestos orgánicos semivolátiles (SVOC), bifenilos policlorados (PCB) y dioxinas existentes en la zona no saturada del suelo (es decir, zona de infiltración), donde se aplica una fuente de vacío a la matriz del suelo creando una presión gradiente que origina el movimiento del aire presente en los pozos de extracción (Wilson & Clarke, 1994).

Bio-venting es una tecnología similar a SVE. Mientras que en SVE el principal mecanismo de eliminación es la volatilización, en bioventilación se promueve la biodegradación, presentando tasas más bajas de volatilización en los pozos. De la aplicación de este proceso generalmente resulta una fase gaseosa que necesita tratamiento adicional antes de ser lanzada a la atmósfera (mediante el uso, por ejemplo, adsorción en carbón activado).

### 2.6.1.2 Airsparging

Esta tecnología, que también se conoce como "extracción de aire *in situ*" o "volatilización *in situ*", involucra la inyección de aire libre de contaminantes en la subsuperficie de la zona saturada, permitiendo una transferencia de fase de los hidrocarburos desde un estado disuelto a una fase de vapor. El aire se ventila a través de la zona no saturada (Norris, 1994).

### 2.6.1.3 Decloración o dehalogenación

Es una técnica química que se basa en la pérdida de átomos halógenos (átomos de cloro, flúor, bromo y yodo) de las moléculas orgánicas halogenadas, convirtiendo compuestos tóxicos en sustancias menos tóxicas, que con frecuencia son solubles en agua, facilitando así su separación del suelo (Castelo-Grande & Barbosa, 2003). Esta técnica aplica la reacción de sustitución nucleofílica de átomos de cloro (u otros halógenos) para otros menos peligrosos, utilizando como agentes de deshalogenación, hidróxidos de sodio y potasio y polietilenglicol, entre otros.

Básicamente, esta tecnología se presenta en dos variantes: descomposición catalizada por bases (BCD) y glicolato / polietilenglicol alcalino (APEG). El primero de estos usos como reactivo el hidrogenocarbonato de sodio y se ha aplicado en el tratamiento de suelos y sedimentos contaminados con compuestos orgánicos clorados, principalmente PCB, dioxinas y furanos. En el proceso alternativo, la reacción química utilizada es un glicol alcalino de polietileno que genera agua residual que necesita tratamiento adicional (Castelo-Grande & Barbosa, 2010).

### 2.6.1.4 Lavado de suelos

La descontaminación del suelo también es posible mediante el lavado *in situ* del suelo ("lavado del suelo"), que consiste en la extracción de contaminantes del suelo por disolución, suspensión en soluciones acuosas, o mediante la reacción química con el líquido que pasa a través de las capas de suelo contaminadas (Castelo-Grande & Barbosa, 2003). El lavado del suelo también puede llevarse a cabo *ex situ*, yendo en este caso a través de las siguientes etapas: excavación, fragmentación, separación en diferentes tamaños de grano, lavado de las diferentes fracciones y disposición. Esta técnica permite la eliminación de compuestos orgánicos e inorgánicos, metales y sustancias radiactivas. Su eficacia puede aumentarse mediante el uso de aditivos apropiados.

El lodo resultante de este proceso puede reutilizarse si se mezcla con tierra o, dependiendo del contaminante, puede someterse a un tratamiento específico, como, por ejemplo: extracción con solvente, solidificación o vitrificación. Esta técnica a menudo se considera como un pretratamiento para la reducción de la cantidad de material (suelo contaminado) que se tratará con otra tecnología de descontaminación.

#### 2.6.1.5 Extracción de solventes

El lavado del suelo generalmente utiliza agua o agua con aditivos que mejoran el lavado, esta tecnología usa una sustancia química orgánica como solvente. Las unidades de escala comercial ya están en operación, y varían en función del tipo de suelo, tipo de equipo utilizado y modo de operación.

Suelen consistir en una etapa preliminar de preparación del suelo (después de su eliminación y transporte) seguida de su inserción en una unidad extractiva junto con una corriente de solvente; dos flujos salen del extractor: uno que contiene el suelo tratado que generalmente requiere tratamiento adicional, y otro que se envía a un separador para la recuperación del disolvente y la concentración de los contaminantes eliminados. Estos son luego eliminados por un tratamiento químico o biológico. La técnica de extracción con solvente no logra la eliminación de los contaminantes, sino solo su separación del suelo, por lo que se considera una técnica de pretratamiento similar al lavado del suelo (Castelo-Grane & Barbosa, 2003).

El éxito de esta técnica depende de la elección del disolvente, que debe elegirse teniendo en cuenta el tipo de contaminante a extraer. Como se señaló anteriormente, esta técnica se usa habitualmente en asociación con otras tecnologías de remediación.

#### 2.6.1.6 Solidificación/ estabilización

La remediación del suelo también es posible a través de la técnica de solidificación / estabilización que consiste en mezclar un material reactivo (por ejemplo, cemento u hormigón) con sólidos, semisólidos y lodo para la inmovilización de los contaminantes. La solidificación produce bloques con una gran estabilidad física mediante la adición de agentes estabilizantes (por ejemplo, cenizas lixiviadas y residuos de los hornos) con el fin de limitar la movilidad y la solubilidad de los constituyentes de los residuos. Existen algunas variantes de esta técnica, principalmente: solidificación basada en cemento (adición directa del cemento al suelo); solidificación basada en silicato (donde el material, como cenizas lixiviadas, se agrega al cemento y a los agentes estabilizantes para luego mezclarse con el suelo); y microencapsulación (Castelo-Grane & Barbosa, 2003).

## 2.6.2 Biológicos

Las técnicas biológicas se basan en el principio de biorremediación, donde los microorganismos se utilizan para eliminar los contaminantes del suelo y para el tratamiento de lodos y aguas subterráneas.

### 2.6.2.1 Landfarming

Es una forma de biorremediación, un proceso sobre el terreno que involucra colocar suelo contaminado sobre una superficie preparada y regularmente girado para airear el mismo. Enmiendas del suelo (para ejemplo, fertilizantes) a veces se agregan. El movimiento de oxígeno a través de la pila de suelo promueve la degradación aeróbica de productos químicos orgánicos. Landfarming es una forma pasiva de biorremediación y generalmente requiere un marco de tiempo extendido.

Este tratamiento probablemente liberará las emisiones directamente a la atmósfera, no debería usarse donde puede tener un efecto adverso en los receptores sensibles, y particularmente en las áreas residenciales. Como opción de remediación, el landfarming es ineficaz en el tratamiento de sustancias tales como metales y PAH complejos, pero puede ser útil para algunos productos químicos orgánicos volátiles (EPA, 2005).

### 2.6.2.2 Atenuación natural

La atenuación natural es un componente de todas las soluciones correctivas para la contaminación subsuperficial. Se refiere a los procesos físicos, químicos y biológicos naturales que reducen la concentración de contaminantes en el subsuelo (Sellers 1999). Los ejemplos son advección, dispersión y dilución de contaminantes por infiltración; transferencia de contaminantes en el agua subterránea al aire en los poros del suelo por volatilización; biorremediación de contaminantes orgánicos; o reducción de la movilidad de contaminantes por sorción en las superficies de partículas del suelo (Wiedemeier et al., 1999).

La atenuación natural *in situ* puede ser una tecnología de remediación apropiada cuando los contaminantes se degradan o se dispersan fácilmente y no representan un riesgo

significativo para la salud pública y/o el medio ambiente durante el proceso, en particular cuando la fuente de contaminación ha sido eliminada o contenida.

En general, no es una tecnología apropiada cuando el sitio contiene una cantidad significativa de líquidos en fase no acuosa (NAPL); las concentraciones de contaminantes son tan altas que representan un riesgo inaceptable para la salud pública y / o un ecosistema, o se vuelven tóxicas para los microorganismos; y la tasa de atenuación es inaceptablemente lenta (Yeung, 2009).

#### 2.6.2.3 Composteo

El compostaje es un proceso biológico controlado mediante el cual los contaminantes orgánicos biodegradables se convierten en subproductos inocuos y estabilizados debido a la actividad de microorganismos (en condiciones aeróbicas o anaeróbicas). En general, las condiciones termófilas se mantienen (54-65 °C) para que el compostaje de los suelos contaminados con contaminantes orgánicos peligrosos puede llevarse a cabo adecuadamente. El suelo contaminado es excavado y mezclado con dispersantes orgánicos y agentes correctores, tales como vegetales y desechos de animales, aserrín y residuos, a fin de aumentar la porosidad del material que se va a tratar. La máxima eficiencia de degradación se alcanza manteniendo constante la humedad, pH, concentración de oxígeno, temperatura y relación carbono/nitrógeno (Castelo-Grane et al. 2010).

#### 2.6.2.4 Fitorremediación

Esta técnica es *in situ* y limpia basada en el uso de algunas especies de plantas con la capacidad de degradar contaminantes orgánicos específicos. Su costo es un 20-50% inferior al costo de procesos alternativos químicos, físicos y térmicos *in situ*. Las principales desventajas de esta técnica son sus características estacionales y la posibilidad de provocar una bioacumulación de los contaminantes en los animales. Las principales categorías de esta técnica de remediación son: biodegradación en la rizosfera (una de las regiones inmediatamente adyacentes a las raíces de las plantas, donde se pueden encontrar los nutrientes y microorganismos); fitoacumulación (un proceso utilizado en la eliminación de metales pesados del suelo, lo que lleva a su acumulación en la planta, que luego se seca o se incinera); fitodegradación (que consiste en la metabolización de los

contaminantes por las plantas); y la fitoestabilización (donde ocurre la inmovilización de contaminantes usando compuestos producidos por las plantas).

### 2.6.3 Tecnologías de biorremediación

#### 2.6.3.1 Bioestimulación

Consiste en la inyección de una mezcla de agua no contaminada y los elementos necesarios para el desarrollo microbiano, es decir, nutrientes y aceptores o donadores de electrones. Los nutrientes son generalmente: carbono, nitrógeno y fósforo en forma de CO<sub>2</sub>, amonio o urea y fosfatos, y el aceptor de electrones suele ser el oxígeno disuelto (Suthersan, 1997).

La técnica se ha usado con éxito para remediar suelos contaminados con gasolinas, compuestos orgánicos volátiles (COV), compuestos orgánicos solubles (COS) y plaguicidas. Estudios a escala piloto, han mostrado la biodegradación de suelos contaminados con desechos de municiones (Volke y Velasco, 2002).

Esta tecnología no es recomendable para suelos arcillosos, altamente estratificados o demasiado heterogéneos, ya que pueden provocar limitaciones en la transferencia de oxígeno. Otros factores que pueden limitar su aplicación son, que el tipo del suelo no favorezca el crecimiento microbiano; el incremento en la movilidad de los contaminantes; o que haya obstrucción en los pozos de inyección provocada por el crecimiento bacteriano (Volke y Velasco, 200).

#### 2.6.3.2 Bioaumentación

Implica la adición de un inóculo microbiano con capacidad de degradar contaminantes. El uso de organismos nativos que se han cultivado y propagado en laboratorio se recomiendan para ser aplicados nuevamente al suelo contaminados (Stroud et al., 2007).

Los microorganismos reportados en la degradación del 2,4-D son *Acinetobacter sp*, *Stenothrophomonas maltophilia* y *Flavobacterium sp* (Chaudhry y Huang 1998; Motosugi y Soda 1986; Smejkl et al., 2003).



Antes de llevar a cabo la bioaumentación en un sitio, deben realizarse cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de cometabolizar o utilizar el contaminante como fuente de carbono, y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Volke y Velasco, 2002).

# Capítulo III: Materiales y Métodos

### 3.1 Plan de trabajo

La presente investigación se desarrolló en los laboratorios de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería Química y en el laboratorio de Cromatografía del Instituto de Ciencias en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. En la siguiente figura se ilustra el plan de trabajo que se realizó.

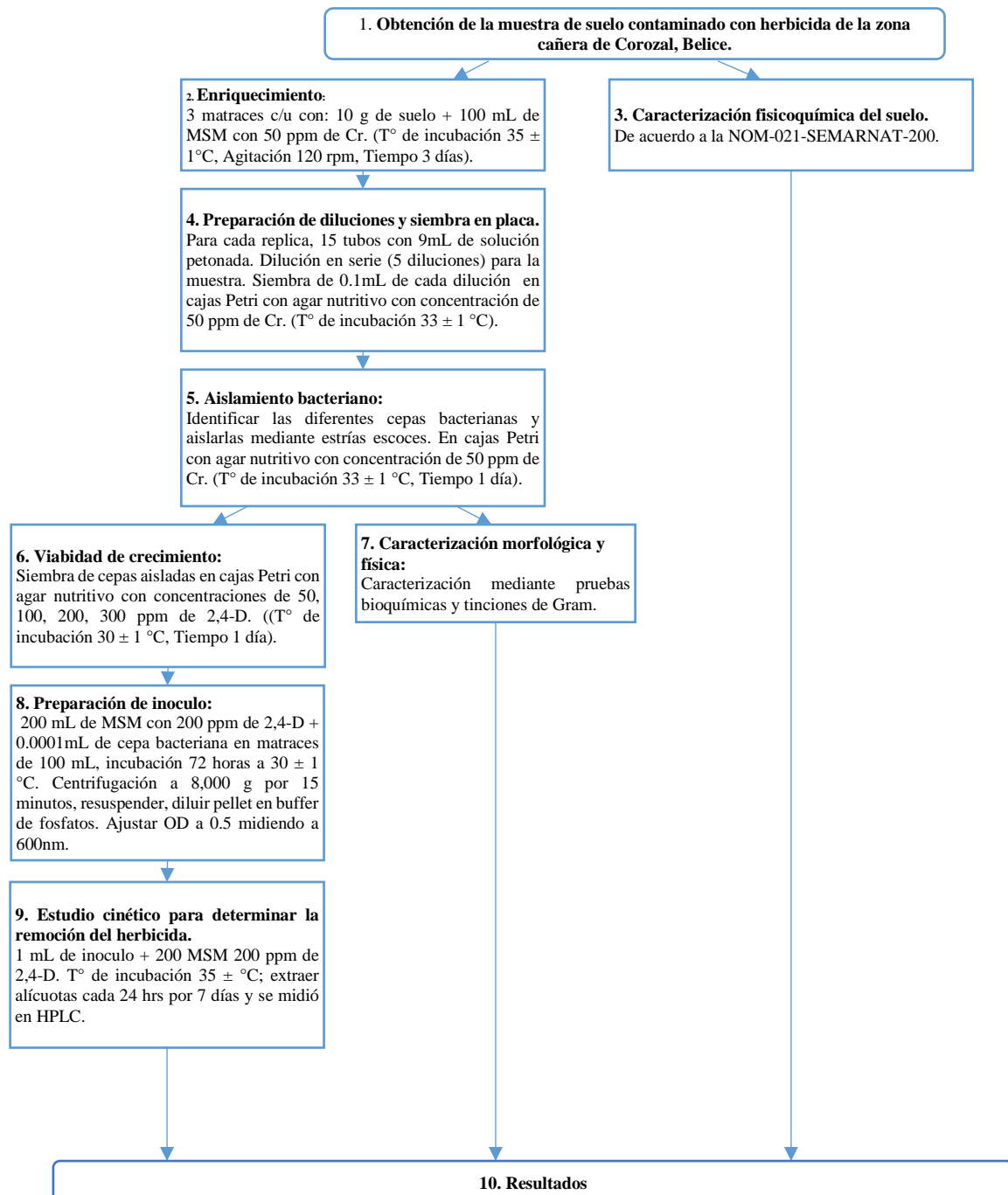


Figura 3.1. Plan de trabajo realizado.

Fuente: Elaboración propia.

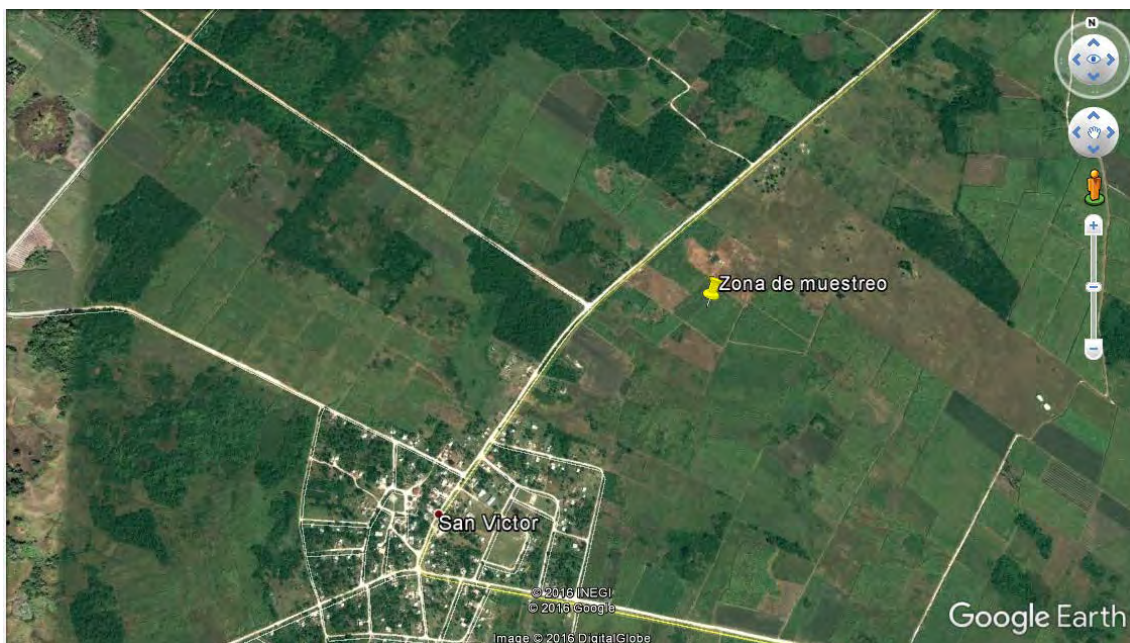
## 3.2 Muestreo

### 3.2.1 Zona de estudio

Se obtuvo una muestra compuesta de una parcela de 22 acres que se encuentra ubicada en el poblado de San Víctor en Corozal, Belice, véase Imagen 3.1.

Las coordenadas de la parcela son las siguientes:

- $18^{\circ}15'56.40''\text{N}$
- $88^{\circ}34'10.89''\text{O}$ .



**Imagen 3.1.** Ubicación de zona de muestreo en la comunidad de San Víctor.

Fuente: Google Earth.

### 3.2.2 Obtención de la muestra

Se empleó el método Zig-Zag para la colección de la muestra. En cinco puntos de la parcela se extrajo aproximadamente un kilogramo de suelo a partir de los primeros 20 cm del mismo. Estas fueron colocadas en una bolsa para obtener una muestra compuesta, del cual se extrajo 1 kilogramo (NOM-021-SEMARNAT-2000).

### 3.3 Caracterización fisicoquímica del suelo

Se determinarán los parámetros fisicoquímicos correspondientes para clasificar la fertilidad del suelo empleando las técnicas establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.

### 3.4 Aislamiento

El aislamiento de las cepas bacterianas se realizó en primera instancia para la degradación de metales pesados, siendo estos el Cromo (Cr) y Plomo (Pb). Posteriormente se realizó una resistencia al 2, 4-D.

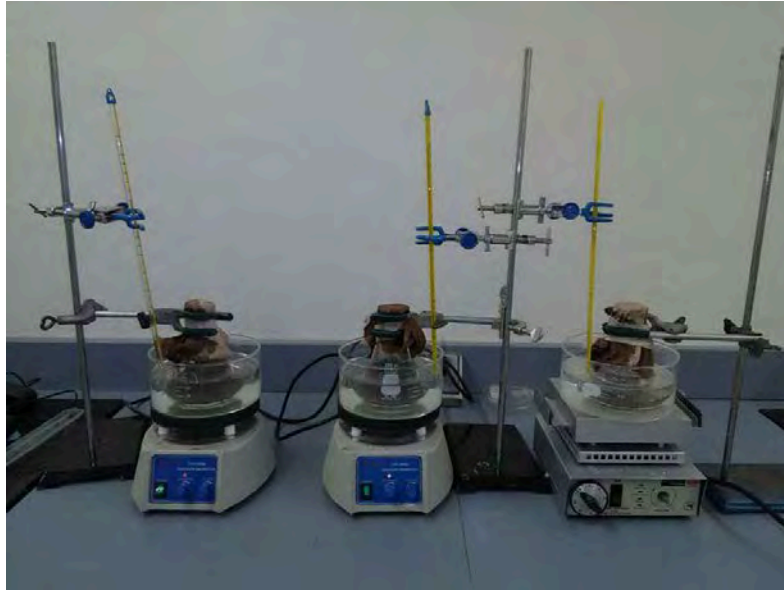
#### 3.4.1 Preparación de agar y medio de cultivo

Todo el material empleado durante el desarrollo metodológico se esterilizó antes de ser utilizado.

Se preparó un litro de medio mineral mineral (MSM), y se esterilizó a presión por 15 minutos. La composición del medio se encuentra en el Anexo 1.

#### 3.4.2 Enriquecimiento

Para el aislamiento de los microorganismos del suelo se agregó la muestra y MSM en una relación 1:10 en un matraz de 300 mL. Es decir, 10 gramos de suelo y 100 mL del medio que contenía una concentración de 50 ppm de Cr, por triplicado. Los matraces se etiquetaron I1, I2, I3; la incubación se realizó a baño maría con una temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , con agitación, durante 72 horas.



**Imagen 3.2.** Enriquecimiento del suelo.

### 3.4.3 Preparación de diluciones y siembra en placa

Se prepararon cinco tubos con nueve mL de solución peptonada al 10%, con el fin de tener diluciones con las concentraciones de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 y 1:100000 partiendo de la solución stock.

De cada concentración se agregó 0.1 mL de las diluciones a placas con agar nutritivo que contenían una concentración de 50 ppm de Cr, previamente esterilizados, para aislar las cepas resistentes al Cr. El periodo de incubación fue de 24 horas a una temperatura de  $30 \pm 1$  °C.

Lo anterior, se realizó para las muestras de los matraces I2, I3 puesto que no se mantuvo las condiciones en el matraz tres y la muestra se secó.

### 3.4.4 Identificación y caracterización

#### 3.4.4.1 Caracterización morfológica

Se identificaron las cepas presentes en las placas al observar la morfología de las colonias. Las características físicas que las diferenciaron fueron: color, borde, diámetro, elevación,

textura y forma. Estas fueron aisladas mediante estrías escocesas en cajas Petri con 50 ppm de Cr.

#### 3.4.4.2 Caracterización mediante tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram a las cepas aisladas. La cepa se fijó a una gota de agua y a esta se le agregó Cristal Violeta por un minuto. Posteriormente se lavó con agua destilada, después se le agregó Lugol Gram por un minuto. Se realizó una decoloración con alcohol de acetona por 30 segundos y se le agregó Safranina (contracolor) durante un minuto. Finalmente se lavó con agua y dejó secar para examinar en el microscopio (Jáncome *et. al.*, 2014).

### 3.5 Viabilidad de crecimiento en 2,4-D

En cajas Petri con concentraciones de 50, 100, 200, 300 ppm de 2,4-D se realizó la siembra de las cepas aisladas. 0.001 mL de la cepa se colocó en el agar mediante estrías cerradas para determinar la viabilidad de crecimiento de las mismas. A partir de lo anterior se determinó el rango óptimo de crecimiento a las 24 horas de incubación para evaluar la capacidad de degradación. Se utilizó un herbicida comercial durante la elaboración del presente (Imagen 3.3)



**Imagen 3.3.** Herbicida con ingrediente activo 2,4-D.

Con lo anterior se estableció la concentración máxima de resistencia. Posteriormente en medio Luria Bertani (LB) se determinó cuáles son las cepas que presentan mayor crecimiento a las 24 horas.

### 3.6 Preparación de inóculos

La cepa B01 y B03 se propagaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 200 mL de caldo LB (composición en Anexo 1) suplementado con una concentración de 200 ppm de 2,4-D a 80 rpm, una temperatura de  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

Posteriormente se realizó una separación por centrifugación a 8000 g por 15 minutos en un tubo Corning de 50 mL, se retiró el sobrenadante.

Al finalizar la recuperación de toda la biomasa fue resuspendida en solución buffer de fosfatos y el ajuste del inóculo a 0.5 midiendo la densidad óptica (OD) 600 nm en un espectrofotómetro de UV-VIS (SMART Spectrophotometer, 2000) para obtener una concentración final de  $2.5 \times 10^6$  células/mL.



**Imagen 3.4.** Magnificación de las cepas en caldo LB y 200 ppm de 2,4-D.

### 3.7 Cinética de degradación:

#### 3.7.1 Diseño experimental:

En matraces Erlenmeyer se agregó 1ml d inóculo y 200 mL de medio mineral basal suplementado (composición en Anexo 3) con **200** ppm de 2,4-D, por triplicado para



ambas cepas. Se sometieron a incubación por 144 horas a una temperatura de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ . Se retiraron alícuotas de cinco mL cada 24 horas.

### 3.7.2 Preparación de la muestra

Los alícuotas se centrifugaron a 4500 g por 20 minutos y se sobrenadante se colecto en viales de 20 mL. Posteriormente se realizó una extracción de fase sólida (SPE) empleando cartuchos Strata X de la marca Phenomenex ® con capacidad de un mililitro condicionado con 1 ml de agua, 1 mL de metanol, se agregó la muestra, un lavado con 1 mL de 5% metanol y se eluyó con 2% ácido fórmico en metanol en viales Agilent de 1 mL.

## 3.8 Análisis analítico

La concentración del 2,4-D y del analito 2,4-DCP se determinó empleando un cromatógrafo de alta resolución (HPLC) Agilent modelo 1260 Infinity, Agilent Technologies (Imagen 3.4) equipado con una columna Eclipse Plus C18 ( $3.5 \mu\text{m} \times 4.6 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$ ), con una mezcla de acetonitrilo ACN y agua (60:40%) a un flujo de 1mL/min como fase móvil. El tiempo de retención fue de 1.902 minutos a una longitud de onda de 285 nm. Para efectuar el análisis se realizó una curva de calibración (ver Anexo 2) en el intervalo de concentración adecuado para las muestras y se inyectaron por duplicados.



**Imagen 3.5.** Cromatógrafo Agilent modelo 1260 Infinity, Agilent Technologies.

# Capítulo IV: Resultados y Discusiones

## 4.1 Caracterización fisicoquímica de la muestra de suelo

La Tabla 4.1 exhibe las principales características fisicoquímicas de la muestra de suelo analizada. La textura del suelo resulto ser franco limoso con un porcentaje de arena, limo y arcilla de 30, 8.52, 63.28 respectivamente. Un pH de 7.32, casi neutro, la densidad de 1.33 g/ml y una capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 66.64 meq/100g. Contiene 19.79% de materia orgánica, y un 11.48% de carbono orgánico.

**Tabla 4.1.** Parámetros fisicoquímicos medidos.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>VALOR</b>	<b>UNIDADES</b>
<b>PH EN AGUA</b>	7.32	
<b>DENSIDAD APARENTE</b>	1.3374	g/ml
<b>HUMEDAD</b>	10.52643	%
<b>MATERIA ORGÁNICA</b>	19.7989	%
<b>CARBONO ORGÁNICO</b>	11.4843	%
<b>TEXTURA</b>	Franco Limoso	
<b>ACIDEZ EXTRAÍBLE</b>	21.46	meq/100 g
<b>CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO</b>	66.64	meq/100 g

Por otra parte, los nutrientes esenciales para el cultivo de caña de azúcar son los siguientes: nitrógeno se cuenta con 18.82mg/Kg, fósforo soluble de 5.9609 mg/Kg y potasio de 0.99995 mg/Kg. De acuerdo con la norma (NOM-021-SEMARNAT-2000) la cantidad de nitrógeno y fósforo son bajas y el potasio está presente en una concentración media.

De igual manera se determinaron los micronutrientes presentes en el suelo, de acuerdo a la metodología establecida en la normatividad mexicana utilizando un espectrofotómetro de Absorción Atómica. Siendo estos los siguientes: zinc, manganeso, sodio, magnesio, hierro. Al igual que los metales cromo, plomo y níquel. Los resultados se ilustran en la Tabla 3.2. Conforme a la norma, las concentraciones de zinc, manganeso, hierro, son adecuadas, por lo que el suelo no presenta una deficiencia. Respecto a los metales plomo

y níquel resultaron estar presentes en concentraciones bajas, y no se detectó Cr en la muestra de suelo.

**Tabla 4.2.** Cantidades de nutrientes y micronutrientes en la muestra de suelo.

<b>NUTRIENTES</b>	<b>MG/KG</b>	<b>LBS/ACRE</b>
<b>ZINC</b>	3.7909	7.5818
<b>NÍQUEL</b>	0.0474	0.0948
<b>PLOMO</b>	1.3643	2.7286
<b>CROMO</b>	No detectable	-
<b>MANGANESO</b>	0.606	1.212
<b>SODIO</b>	64.7267	129.4534
<b>MAGNESIO</b>	3.089	6.178
<b>HIERRO</b>	10.425	20.85
<b>POTASIO</b>	1.9999	3.998
<b>FÓSFORO SOLUBLE</b>	5.9609	11.9218
<b>NITRÓGENO INORGÁNICO</b>	0.001882 (%)	
	18.82	37.64

El pH resulta ser un factor importante que influye en la presencia de microfauna que permita la mineralización del 2,4-D (Boivin *et al.*, 2005). En este caso, se tiene un suelo neutro (pH en agua: 7.32). Por ejemplo, Han *et al.*, (2015) reportó que en suelos arcillosos con pH neutro el herbicida es mineralizado después de 42 días de incubación. Por otra parte, Prado *et al.*, (2016), vincularon el pH con la formación de enlaces iónicos del herbicida con las partículas del suelo. Tomando en consideración lo anterior, a la presente investigación se puede decir que, la muestra de suelo es apta para procesos de degradación del herbicida.

En cuanto a la materia orgánica (MO) (Entry *et al.*, 1995; Voos and Groffman, 1997) han reportado una correlación entre la cantidad de MO y la tasa de degradación del 2,4-D. De igual manera, Prado *et al.*, (2001), han demostrado que la MO es un factor importante en la sorción del herbicida en el suelo. El suelo estudiado cuenta con un porcentaje de 19.79 de MO, por lo tanto, pueden ocurrir procesos de mineralización del 2,4-D.

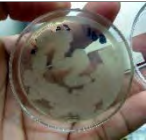


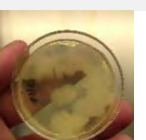

La presencia de carbono, nitrógeno, potasio y fósforo está vinculada con la sorción del 2,4-D sin embargo hay una variación de la misma a diferentes pH, contenido de arcilla y/o materia orgánica. (Duah y Kuwatsuka, 2012). Específicamente, Picton y Farenhorst (2004) evaluaron los factores fisicoquímicos que influyen en la sorción y mineralización del herbicida en suelos. Un incremento en el porcentaje de carbono orgánico (CO) en el suelo con llevó a una mayor sorción de 2,4-D por unidad de CO. Así como las tasas de mineralización fueron mayores en suelos que absorbieron más 2,4-D por unidad de carbono orgánico, y que tenían mayor contenido de nitrógeno del suelo.

Tomando en cuenta lo anterior, el suelo estudiado cuenta con un porcentaje elevado de materia y carbono orgánico (19.79 y 11.48, respectivamente), y cantidad de nitrógeno (18.82). Las tasas sorción y mineralización del 2,4-D resultaría ser elevado y posiblemente asistido por la microbiota ya adaptada a subsistir en dichas condiciones y/o capaz de utilizarlo como fuente de carbono.

## 4.2 Aislamiento Bacteriano

Para el aislamiento de las bacterias del suelo contaminado, se seleccionaron cinco colonias de manera aleatoria, crecidas sobre agar nutritivo suplementado con  $\text{Cr}^{6+}$ . Estas se sembraron en agar con 2,4-D para determinar si sobreviven en medios con el contaminante de interés. Las colonias presentaron diferentes morfologías, las cuales se mencionan en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3.** Características morfológicas de las cepas resistentes al 2,4-D.

CEPA	COLOR	FORMA	ELEVACIÓN	SUPERFICIE	ASPECTO	BORDES	IMAGEN
<b>B01</b>	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Seco	Ondulados	
<b>B02</b>	Blanco	Irregular	Plana	Lisa	Seco	Ondulados	
<b>B03</b>	Blanco	Irregular	Elevada	Rugosa	Seco	Ondulados	
<b>B04</b>	Amarillo	Irregular	Plana	Rugosa	Húmedo	Ondulados	
<b>B05</b>	Blanco	Puntiforme	Convexa	Lisa	Húmedo	Puntiforme	

### 4.2.1 Viabilidad de Crecimiento

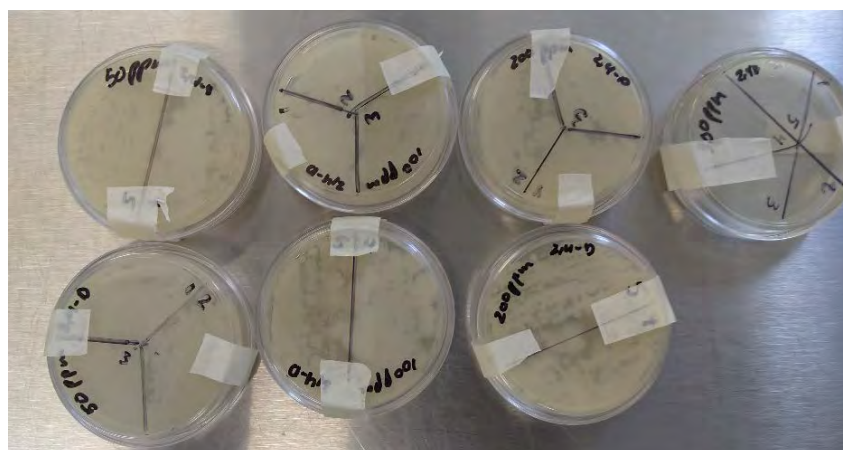
Se realizó una viabilidad de crecimiento en agar nutritivo suplementado con diferentes concentraciones del 2,4-D dejando incubar por 24 horas. En la siguiente tabla se ilustran los resultados obtenidos.

Las cepas B01, B03, B04 presentaron crecimiento en la concentración más alta (300 ppm) sin embargo, solo las primeras dos se desarrollaron sobre toda la sección de la placa. Por ello se tomó como la concentración máxima **200 ppm** para desarrollar la cinética de degradación del 2,4-D.

**Tabla 4.4.** Resultados de la viabilidad de crecimiento en agar con 2,4-D en 24 horas.

CEPA	CRECIMIENTO			
	Concentración de 2,4-D (ppm)			
	50	100	200	300
B01	+	+	+	+
B02	+	+	+	-
B03	+	+	+	+
B04	+	+	+	+
B05	+	+	+	-


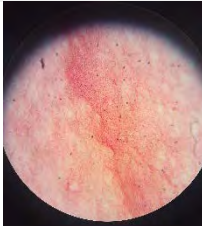
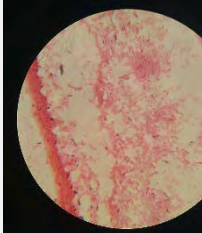
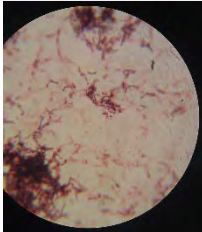
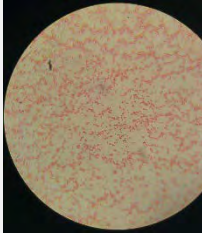
**Imagen 4.1.** Crecimiento bacteriano en placas con agar nutritivo suplementado con 2,4-D después de 24 horas.



## 4.2.2 Tinción de Gram

En la tabla 3.5 se ilustra los resultados obtenidos de la Tinción de Gram que se le realizó a las cinco cepas aisladas. La cepa B04 resultó ser Gram positiva, y las demás son Gram negativas.

**Tabla 4.5.** Tinción de Gram de las cepas aisladas.

<b>CEPA</b>	<b>GRAM</b>	<b>MORFOLOGÍA</b>	<b>IMAGEN</b>
<b>B01</b>	Gram Negativo	Cocos	
<b>B02</b>	Gram Negativo	Cocos	
<b>B03</b>	Gram Negativo	Estreptococos	
<b>B04</b>	Gram Positivo	Bacilos	
<b>B05</b>	Gram Negativo	Micrococos	

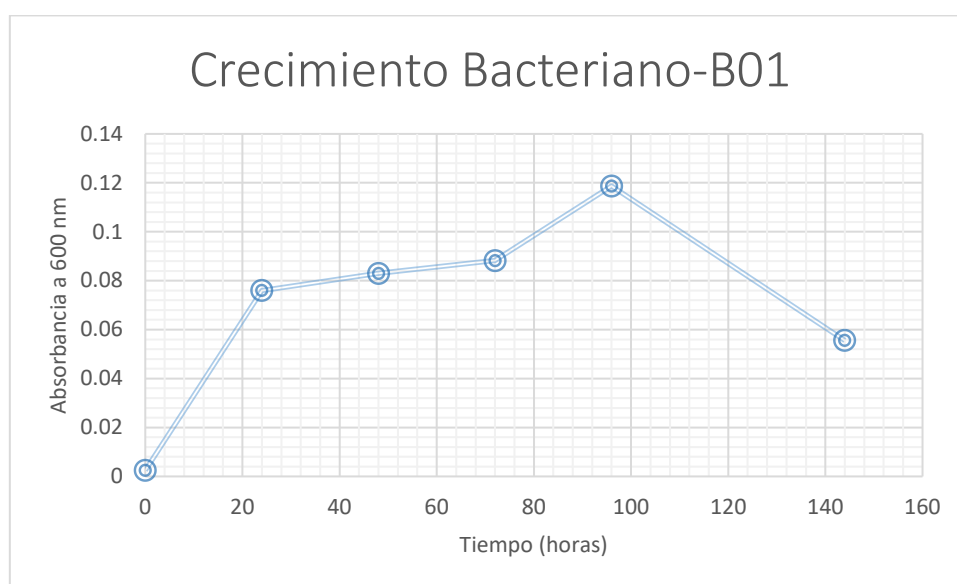


### 4.3 Cinética de crecimiento:

En el estudio cinético realizado para determinar la remoción del 2,4-D de las dos cepas (B01 y B03) bacterianas se analizaron las muestras al tiempo 24, 48, 72, 96, y 144 horas, mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) obteniendo los siguientes resultados.

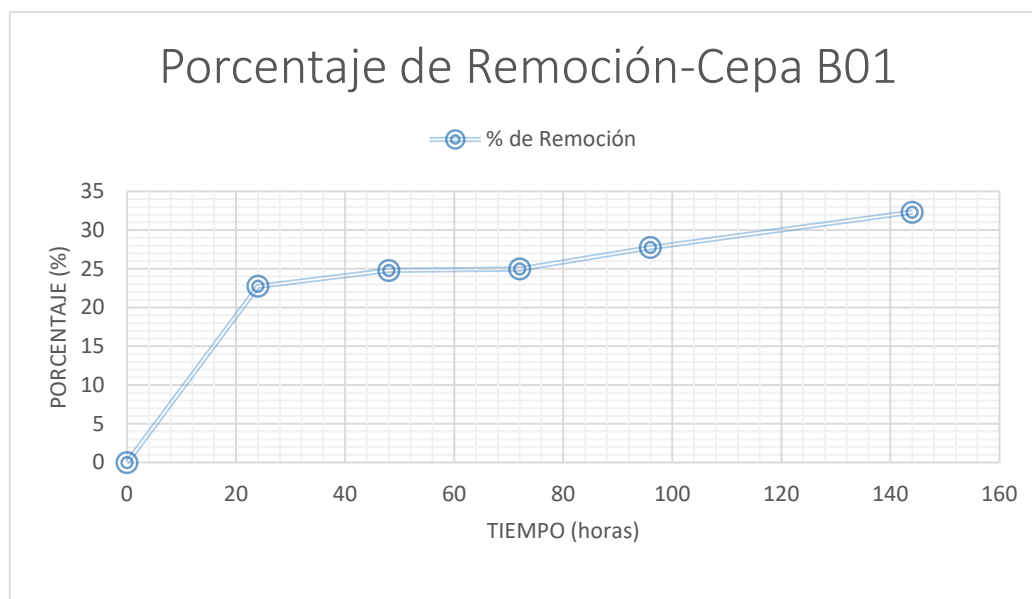
#### 4.3.1 Cepa B01

La densidad óptica (OD) de los inóculos se ajustaron a una absorbancia de 0.5, equivalente a  $2.5 \times 10^6$  células/mL. Para evaluar el potencial de degradación se agregó un mL del inóculo, teniendo una concentración inicial  $1.25 \times 10^4$  células/mL. El crecimiento bacteriano resultó ser lento durante las primeras 72 horas, sin embargo, entre la hora 72 a 96 se observó el crecimiento máximo. En la siguiente figura se ilustra el padrón del crecimiento bacteriano durante el diseño experimental, el cuál fue medido mediante la absorbancia a 600nm.



**Figura 4.1.** Crecimiento de la cepa B01 en la cinética de degradación.

La concentración inicial empleada fue de 660 ppm y la degradación del 2,4-D se determinó por la disminución de la concentración (en ppm) del inicio de la cinética. A las 24 horas se presentó una disminución de 660 a 509.8 ppm, arrojando un 22.75% de remoción. De las 48 a las 72 horas el porcentaje de remoción fue el más bajo, presentando una disminución de 0.1969%. A las 144 horas se detectó la máxima remoción, con una disminución del valor inicial (660 ppm) a 446.7 ppm, lo que corresponde a un total 32.31% (Figura 4.1). Esta cepa presentó el porcentaje más alto de degradación.



**Figura 4.2.** Porcentaje de remoción del 2,4-D por la cepa B01 al finalizar las 144 horas.

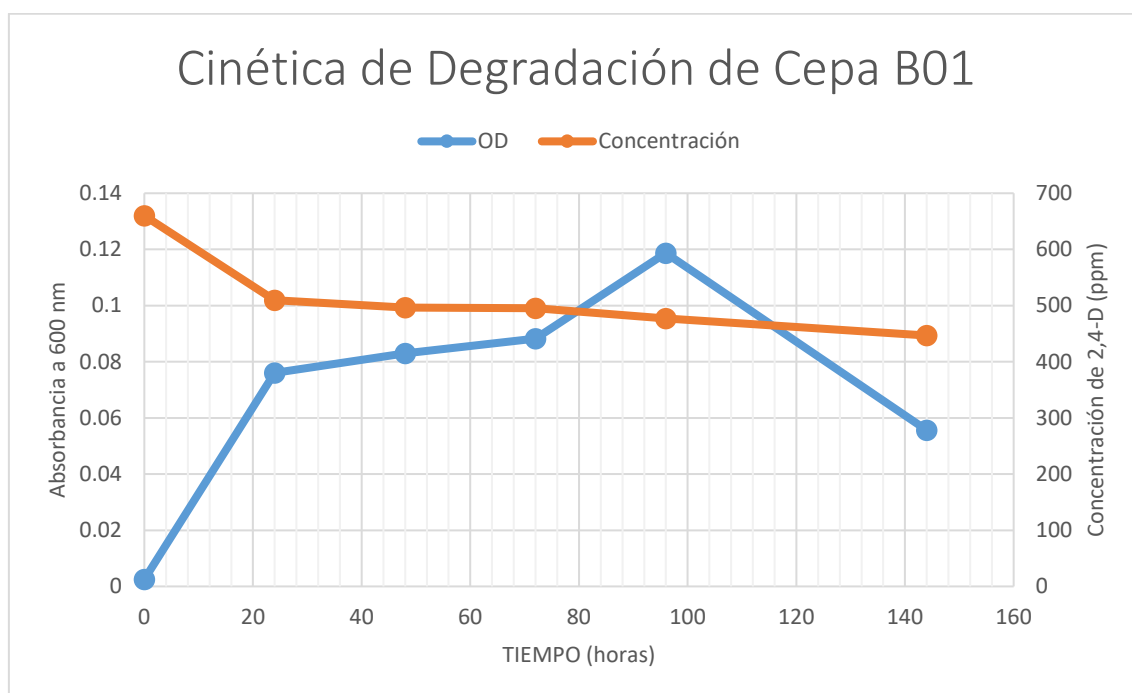
La cepa B01 degradó un total de 32.31% del 2,4-D después de las 144 horas. En las primeras 24 horas se presentó la mayor degradación (22.75%) de la concentración total. De igual forma, a las 24 horas se observó crecimiento máximo de la bacteria. En la siguiente tabla se ilustran las concentraciones de herbicida y la absorbancia en los tiempos específicos. Los cromatogramas se encuentran en los Anexos 2. En la siguiente tabla se ilustran los porcentajes de remoción diarios que fueron observados.

**Tabla 4.6.** Concentración y densidad óptica de los alícuotas en los intervalos de tiempo.

<b>B01</b>			
<b>OD A 600NM</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Porcentaje de remoción</b>
0.0025	0	660	0
0.076	24	509.8	22.75757576
0.083	48	496.4	2.03030303
0.0882	72	495.1	0.196969697
0.1187	96	476.9	2.757575758
0.0556	144	446.7	4.575757576

La Figura 4.3 ilustra la cinética de degradación obtenida para la cepa B01, en donde se observa un crecimiento exponencial de la bacteria en las primeras 24 horas, estático entre la hora 24 a 72, exponencial de 72 a 96 y muerte celular de la hora 96 a 144.

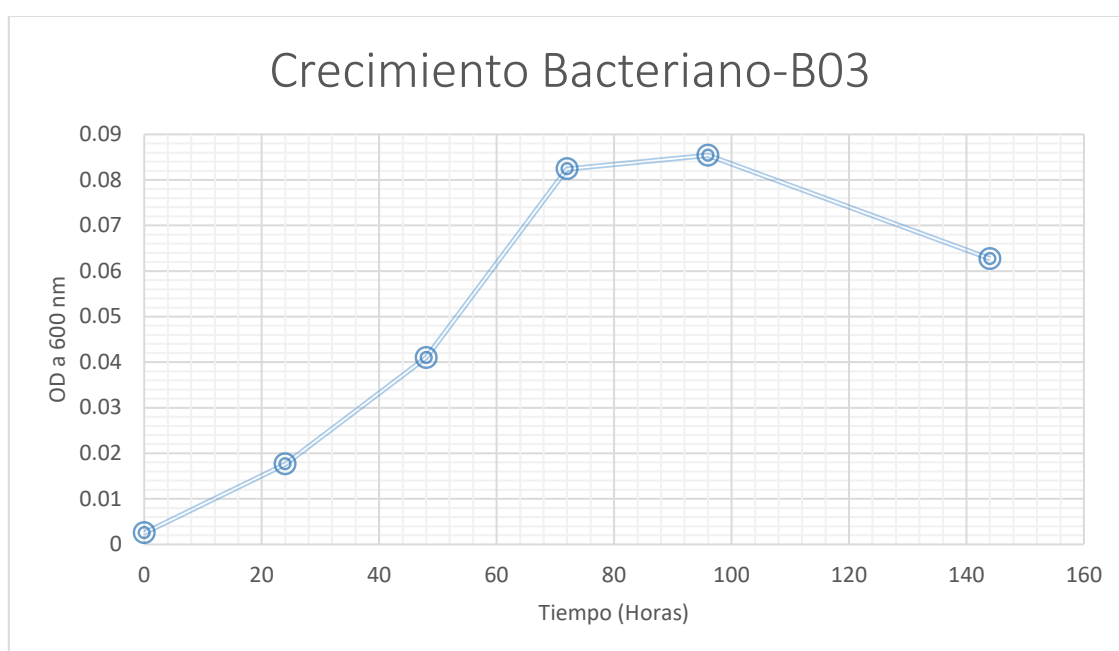
En cuanto a la concentración del 2,4-D se observa una disminución rápida en las primeras 24 horas. A partir de la misma a la hora 144 es lenta y baja.



**Figura 4.3.** Cinética de degradación bacteriana del 2,4-D por la cepa B01.

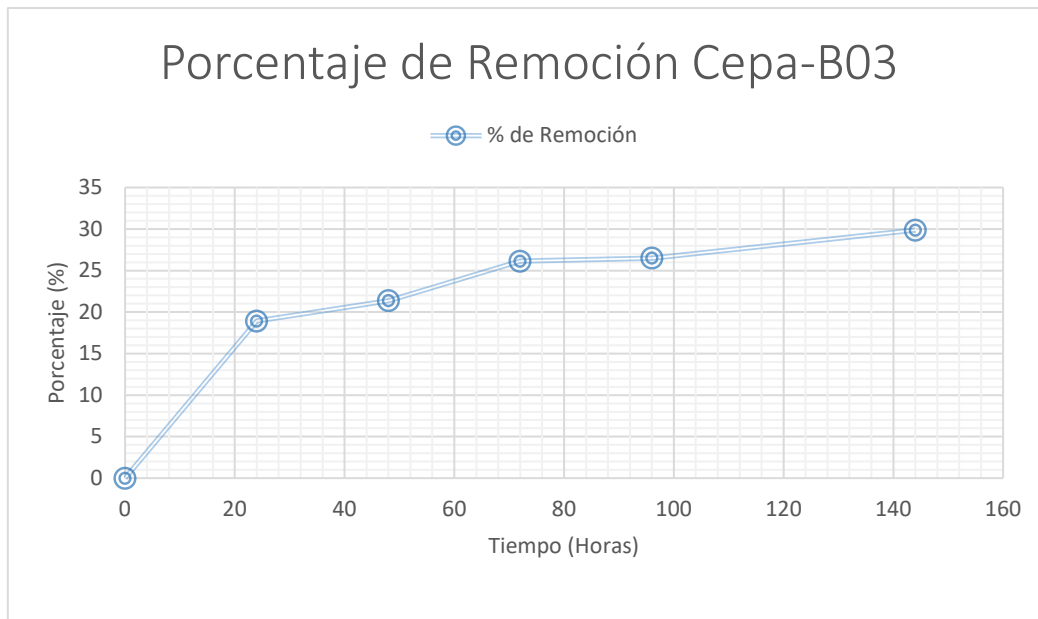
### 4.3.3 Cepa B03

La concentración inicial de bacteria fue de  $1.25 \times 10^4$  células/mL. Para la cepa B03 se observó un crecimiento exponencial durante las primeras 72 horas. Entre las horas 72 a 96 fue estático y finalmente la fase de declinación inició a partir de la hora 96. En la figura 4.4 se ilustra una gráfica para el crecimiento, mismo que fue determinado midiendo la absorbancia a 600 nm.



**Figura 4.4.** Crecimiento de la cepa B03 en la cinética de degradación.

De igual manera, la concentración inicial empleada fue de 660 ppm y la degradación del herbicida se determinó por la disminución de la concentración (en ppm) al inicio de la cinética. A las 24 horas se presentó una disminución de 660 a 535.1 ppm, arrojando un 18.92 % de remoción. De las 48 a las 96 horas la remoción fue baja, presentando una disminución de 7.19%. A las 144 horas se detectó la máxima remoción, con una disminución de 660 a 462.8 ppm, lo que corresponde a un 29.87% (Figura 4.5). Esta cepa presentó el porcentaje más bajo de degradación.



**Figura 4.5.** Porcentaje de remoción del 2,4-D después de las 144 horas por la cepa B03.

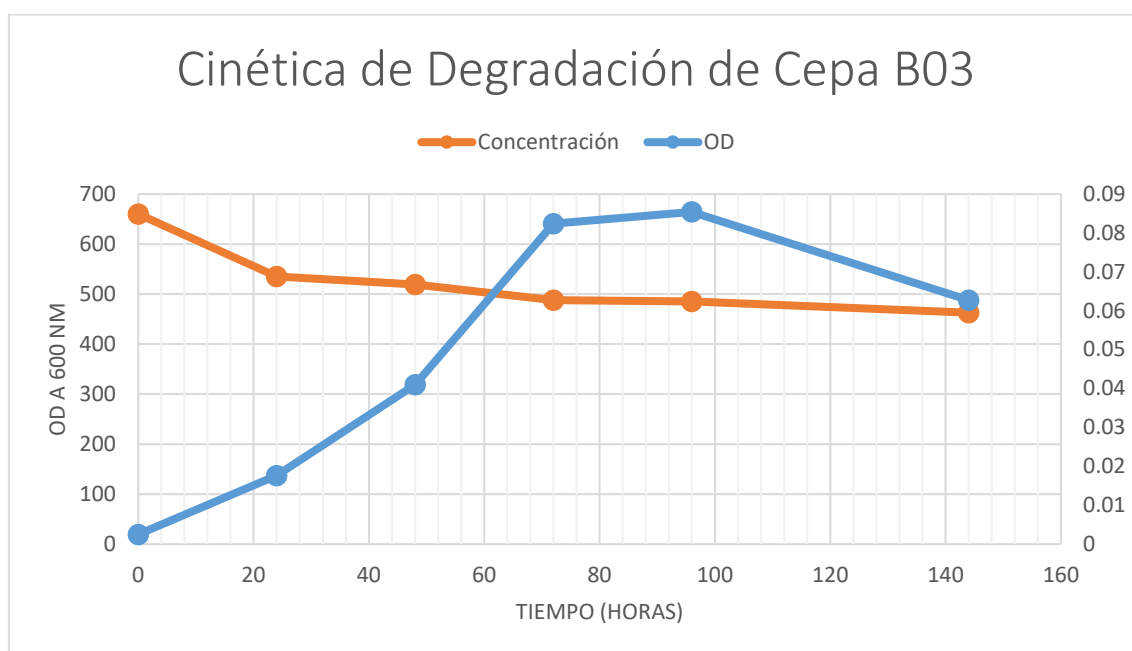
La cepa B03 degradó un total de 29.87 % del 2,4-D después de las 144 horas. En las primeras 24 horas se presentó la mayor degradación (18.92%) de la concentración total. De igual forma, se observa el crecimiento máximo de la bacteria. En la tabla 4.7 se ilustran las concentraciones de herbicida y la absorbancia en los tiempos específicos así como el porcentaje de remoción diaria que fue observado.

**Tabla 4.7.** Concentración y densidad óptica de los alícuotas en los intervalos de tiempo.

B03			
OD a 600 nm	Tiempo (Horas)	Concentración (ppm)	Porcentaje de remoción
0.0025	0	660	0
0.01764	24	535.1	18.92
0.041	48	519	2.43
0.0824	72	487.6	4.75
0.0854	96	485.1	0.37
0.0627	144	462.8	3.37

La Figura 4.6 ilustra la cinética de degradación, es decir la relación entre crecimiento bacteriano y remoción del herbicida, obtenida para la cepa B03. Se observa un crecimiento exponencial de la bacteria en las primeras 72 horas, estático entre la hora 72 a 96 y decaimiento de la hora 96 a 144.

En cuanto a la concentración del 2,4-D se observa una disminución rápida en las primeras 72 horas. A partir de la misma a la hora 144 es lenta y baja.



**Figura 4.6.** Cinética de degradación bacteriana del 2,4-D por la cepa B03.

Se infiere que la disminución de la concentración de 2,4-D se debe al proceso metabólico; es decir, las cepas bacterianas utilizan el compuesto como fuente de carbono, y no se debe a las condiciones de temperatura presentadas durante la incubación de dichos microorganismos. Sin embargo, la cepa B01 presenta el mayor crecimiento en las primeras 24 horas de la cinética y la cepa B03 hasta la hora 72.

Algunos autores indican que hay mayor degradación del herbicida en las primeras 24 a 48 horas de la cinética de degradación (Cycoń *et al.*, 2001; Zabaloy y Gómez., 2017; Khalil, 2003). Aplicando este concepto al presente estudio se puede decir que, las cepas B01 y B03 son eficientes para remover el 2,4-D durante los primeros dos días al ser expuestos a ello en el medio.

En un estudio se evaluó la degradación de este herbicida por parte de los microorganismos nativos de suelos expuestos y se encontró que son capaces de remover concentraciones entre 69%, 73% y 54% en 10 días de incubación (Cycoń *et al.*, 2001), que comparados con los resultados obtenidos en este estudio, demuestran que las bacterias autóctonas de suelos expuestos presentan un potencial de degradación. También cabe resaltar que el porcentaje de degradación de 32.31% y 29.87% por parte de las cepas bacterianas es apenas en un periodo de 6 días y que no se pudo estimar en un rango mayor de tiempo por falta de tiempo y el número de muestras que se podían analizar era limitado.

Se han estudiado las especies nativas como *Serratia marcescens*, *Penicillium sp.*, *Cupriavidus campinensis*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas sp.*, *Sphingomonas paucimobilis*, mismas que han sido aisladas de suelos que se encuentran en estados de contaminación por el 2,4-D. Dichas bacterias han sido reportadas como biodegradadores del herbicida, presentando porcentajes de remoción entre el 80 al 95% (Chaudhty y Huang, 1988; Don y Pemberton, 1981; Silva *et al.*, 2007). Revelando la gran importancia de estudios como este y otros que permitan proponer técnicas de biorremediación para suelos expuestos al herbicida.

Cabe señalar que las investigaciones que se citan anteriormente se realizaron con el herbicida en su forma pura, es decir, reactivos grado analítico y en la presente se empleó un herbicida comercial. Esto causa variación en los resultados puesto que se efectuaron varias pruebas con diferentes concentraciones y al realizar las determinaciones en HPLC se llegó a la conclusión que el herbicida no contiene el porcentaje de ingrediente activo que reporta en la etiqueta.

La importancia de realizar estudios como este, con plaguicidas comerciales, radica en que si se realizan estudios posteriores en campo habrá muchos factores que no podrán ser controlados, como lo sería la pureza del 2,4-D. Se desconoce los compuestos presentes en plaguicidas comerciales, y en muchos suelos ocurren **procesos** ya sean **sinérgicos** o **antagónicos** de los mismos.

# Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones



## 5.1 Conclusiones

Los suelos de la zona cañera del poblado de San Víctor en Corozal, Belice, están expuestos al herbicida, 2,4-D, desde hace más de 12 años, ya que los agricultores han aplicado el herbicida para controlar las malezas que interfieren en el desarrollo del cultivo. Para la realización de este trabajo se seleccionó una sección de una parcela que ha estado expuesta al herbicida 2,4-D.

El presente estudio se realizó a nivel laboratorio y se logró la caracterización fisicoquímica de la muestra de suelo empleando como referencia las técnicas descritas en la sección de fertilidad de la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos.

La muestra resulto ser neutra (pH 7.32), rica en materia y carbono orgánico, con niveles altos, medios y bajos de nitrógeno, fósforo, potasio, respectivamente, estas características deben ser tomadas en cuenta durante los procesos de sorción, mineralización y/o degradación del 2,4-D una vez que este es aplicado, y durante su latencia en el suelo.

Por otra parte, se aislaron, a través de técnicas microbiológicas, cinco cepas a partir de un suelo que presentaba un historial de exposición al herbicida proveniente de la zona cañera de Belice. Las cuales demostraron ser capaces de degradar el 2,4-D en un medio mínimo mineral.

De las cepas aisladas, solo se emplearon dos (B01 y B03) para evaluar la capacidad degradadora del herbicida en un medio, suplementado con 660 ppm de la misma. Las bacterias B01 y B03 degradaron un total de 32.31 y 29.87% respectivamente, de la concentración inicial en un tiempo de 144 horas. Cepa B01 presentó mayor degradación en las primeras 24 horas y B03 en las primeras 72 horas de exposición.

Los porcentajes de degradación son bajos en comparación con otros estudios, sin embargo, indican que los microorganismos son capaces de utilizar el 2,4-D como única fuente de carbono y participan en la biodegradación del mismo cuando es aplicado en los suelos agrícolas. Por otra parte, es importante considerar que las bacterias presentes en estos suelos, normalmente desarrolla mecanismos de adaptación después de la aplicación de plaguicidas durante tiempos prolongados.

Si bien, el aislamiento de cepas autóctonas de zonas expuestas a xenobióticos resulta ser idónea para poder emplearlas en procesos de remediación de los mismos es importante considerar las diferencias que pueden existir cuando se desarrollan estudios a nivel laboratorio e in situ. En este caso, las cepas aisladas de suelos tratados regularmente con 2,4-D tienen un considerable potencial de biorremediación ya sea mediante una bioestimulación y/o bioaumentación del medio, ya que los organismos se han adaptado a la presencia de pesticidas.

Al respecto, es importante mencionar que se requiere realizar más investigación relacionada con los aspectos bioquímicos y genéticos de la degradación de 2,4-D por las cepas bacterianas aisladas, la relación con los diversos factores ambientales que afectan su supervivencia, y el potencial de degradación, así como conocer las rutas metabólicas del herbicida en presencia de diversos organismos.

## 5.2 Recomendaciones e investigación a futuro

Las recomendaciones y líneas de trabajo que a continuación se proponen para investigar más a fondo los procesos de biodegradación a los que el herbicida es sometido cuando ingresa al ambiente, así como al manejo de suelos, son los siguientes:

- Caracterizar el herbicida comercial que se empleó para determinar a qué concentración se encuentra en ingrediente activo y que otros compuestos se encuentran en la misma.
- Determinar la concentración de 2,4-D presente en muestras de suelos que han sido cultivados para determinar el nivel de persistencia que este presenta en la zona cañera.
- Investigar el comportamiento del 2,4-D en el ambiente, es decir, realizar pruebas de disipación en muestras de suelo procedentes de la zona cañera en condiciones ambientales sin presencia de microorganismos (suelos estériles) de manera que se encuentren vínculos entre los parámetros fisicoquímicos y los procesos de sorción del herbicida.
- Realizar pruebas con un herbicida de grado analítico para determinar la eficiencia de las cepas bacterianas bajo condiciones controladas de concentración y asegurar el empleo del 2,4-D como fuente única de carbono.
- Realizar variaciones en el pH, temperatura, concentración de 2,4-D con el fin de determinar las condiciones óptimas de funcionamiento de las bacterias
- Caracterizar mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) las cepas.

# Referencias y Bibliografía

1. Æ, R. E. M., Wheeler, J. T., Burr, M. D., & Inskip, W. P. (2007). Impacts of 2,4-D application on soil microbial community structure and on populations associated with 2,4-D degradation, 162. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.05.007>
2. Bartaul S., J., y Berenguer S., M., J., (1980). NTP 143: Pesticidas: clasificación y riesgos principales. Centro de Investigación y Asistencia Técnica-Barcelona. .
3. Bian, X., Chen, J., & Ji, R. (2013). Degradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) by Novel Photocatalytic Material of Tourmaline-Coated TiO<sub>2</sub> Nanoparticles: Kinetic Study and Model, 1530–1542. <https://doi.org/10.3390/ma6041530>
4. Boivin, A., Amellal, S., & Schiavon, M. (2005). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils, 138, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.02.016>
5. Buchel, K. H. (1983). Chemistry of Pesticides, John Wiley & Sons, Inc. New York, USA
6. Castelo-Grande. T., Augusto. P., A., Monteiro P., Estevez A., M., y Barbosa D., (2010). Remediation of soils contaminated with pesticides: a review. Intern. J. Environ. Anal. Chem. Vol. 90. Nos. 3-6.
7. Chaudhry, G.R.; Huang, G.H. (1988). Isolation and characterization of a new plasmid from a *Flavobacterium sp.* which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate. J. Bacteriol., 170, 3897-3902.
8. Chaves, M. (2002). Nutrición y Fertilización de la Caña de Azúcar en Costa Rica (en línea). Nutrición del cultivo. Consultado 22 sept. 2002. Disponible en <http://www.infoagro.go.cr/tecnologia/cana/NUTRI%20Y%20FERT.html>.
9. CICLOPLAFEST, (1996). Catálogo Oficial de Plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. (CICOPLAFEST). Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGARPA), Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), Secretaría de Salud (SS), Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI).
10. Claudia, A., & Marcato, D. C. (2017). Herbicide 2,4-D : A Review of Toxicity on Non-Target Organisms. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3301-0>

11. Concha, M and Kathryn, S. (1994) “Anaerobic Aquatic Metabolism of [14C] 2,4-D Acid.” Dow Elanco. Data package ABM-148646-E, DPR#142-155. Department of Pesticide Regulation. Sacramento, CA.
12. Copping L., C., (2002). Post-Emergent Herbicides. Agrow Reports, PJB Publications, Richmond, UK.
13. Crawford, R. L., & Rosenberg, E. (2013). 11 Bioremediation. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8>
14. Cycoń, M., Żmijowska, A., Piotrowska-seget, Z. (2011). Biodegradation kinetics of 2,4-D by bacterial strains isolated from soil, 6(2). <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0005-0>
15. D.J. Wilson and A.N. Clarke, (1994) Soil Vapor Stripping in Hazardous Waste Site Soil Remediation. Marcel Dekker, New York.
16. Dai, Y., Li, N., Zhao, Q., & Xie, S. (2015). Bioremediation using *Novosphingobium* strain DY4 for and impact on microbial community structure, 161–170. <https://doi.org/10.1007/s10532-015-9724-7>
17. Entry, J. A., Donnelly, P. K., & Emmingham, W. H. (1995). Atrazine and 2, 4-D mineralization in relation to microbial biomass in soils of young-, second-, and old-growth riparian forests, 2, 77–84.
18. Environmental Protection Agency. (2005). Soil Bioremediation. EPA 589/05: This guideline has been to assist environmental consultants and their clients with ex situ soil bioremediation in South Australia.
19. García et al (2013). Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *Journal of Research in Environmental Science and Toxicology*. Vol. 1(11) pp. 279-293.
20. Ghassemi, M., L. Fargo, P. Painter, S. Quinlivan, R. Scofield and A. Takata. (1981). “Environmental Fates and Impacts of Major Forest Use Pesticides.” P. A-101-148. U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances. Washington D.C.
21. Halter, MT. (1980). “2,4-D in the Aquatic Environment.” Section II in Literature Reviews of Four Selected Herbicides: 2,4-D, Dichlobenil, Diquat, and Endothall. Municipality of Metropolitan Seattle.
22. Han, L., Liu, Y., & He, A. (2014). 16S rRNA gene phylogeny and *tfdA* gene analysis of 2,4-D-degrading bacteria isolated in China, 2567–2576. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1680-6>

23. Han, L., Zhao, D., & Li, C. (2015). Isolation and 2,4-D-degrading characteristics of *Cupriavidus campinensis* BJ71, 441, 433–441.
24. Howard, P. (1991) Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals, Volume III Pesticides. Lewis Publishers. IICA, (1996). Agriculture Sector Stud. San Jose, Costa Rica. Center for Programs and Investment Project.
25. Jácome, L., R., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., Franco-Cendejas, R.,. (2014) Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2014/ir141b.pdf>
26. Jervais, G.; Luukinen, B.; Buhl, K.; Stone, D. (2008). 2,4-D Technical Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/2,4-DTech.html>.
27. Juwarkar, A. A., & Singh, S. K. (2010). A comprehensive overview of elements in bioremediation, 215–288. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9215-6>
28. Khalil A., B., (2003). Isolation and Characterization of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degrading Organisms from Soil in Jordan Valley. *Biotechnology*, 2: 73-85.
29. Maltseva, O., MCGowan, C., Fulthorpet, R., & Oriol, P. (2017). Degradation of 2,4=dichlorophenoxyacetic acid by haloalkaliphilic bacteria, (1996).
30. Mendoza JC, Perea YS, Salvador J. A., Morales, J. A., Pérez, G. (2011). Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote. *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 2(3): 45-55.
31. Merini, L. J., Cuadrado, V., Flocco, C. G., & Giulietti, A. M. (2007). Dissipation of 2, 4-D in soils of the Humid Pampa region , Argentina : A microcosm study, 68, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.01.012>
32. Motosugi, K.; Soda, K. (1983). Microbial degradation of synthetic organochlorine compounds. *Experientia*, 39, 1214-1220.
33. NOM-021-SEMARNAT-2000. 2000. Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Secretaria de medio ambiente y recursos naturales. México, D. F.
34. Norris, LA. (1981) “The Movement, Persistence, and Fate of the Phenoxy Herbicides and TCDD in the Forest.” *Residue Reviews*, 80, 65-135.

35. Norris, R., D. (1994) Handbook of Bioremediation. Lewis Publishers, Boca Raton.
36. Ortiz-Bernad I., Sanz-García J., Dorado-Valiño M., Villar-Fernández S. (2007). Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Informe de Vigilancia Tecnológica.
37. Ortiz-hernández, M. L., Rodríguez, A., Sánchez-salinas, E., & Castrejón-godínez, M. L. (n.d.). Bioremediation of Soils Contaminated with Pesticides : Experiences in Mexico. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-05738-5>
38. Peterson, M. A., McMaster, S. A., Riechers, D. E., Skelton, J., Phillip, W., Peterson, M. A., ... Stahlman, P. W. (n.d.). 2,4-D Past , Present , and Future : A Review 2 , 4-D Past , Present , and Future : A Review, 30(2), 303–345. <https://doi.org/10.1614/WT-D-15-00131.1>
39. Picton P., y Farenhorst A., (2004) Factors Influencing 2,4-D Sorption and Mineralization in Soil, Journal of Environmental Science and Health, Part B, 39:3, 367-379, DOI: 10.1081/PFC-120035923
40. Prado, A. G. S., Vieira, E. M., Rezende, M. O. D. O., Química, I. De, Carlos, D. S., Paulo, U. D. S., & Sp, S. C. (2001). Monitoring of the Harmful Concentrations of 2 , 4-Dichlorophenoxyacetic Acid ( 2 , 4-D ) in Soils with and without Organic Matter, 12(4), 485–488.
41. Prado, B., Strozzi, A. G., Huerta, E., Duwig, C., Zamora, O., Delmas, P., Márquez, J. (2016). Geoderma 2 , 4-D mobility in clay soils : Impact of macrofauna abundance on soil porosity. Geoderma, 279, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.06.007>
42. Puerto Rodríguez, Asela M, Suárez Tamayo, Susana, & Palacio Estrada, Daniel E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 52(3), 372-387. Recuperado en 11 de enero de 2018, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S156130032014000300010&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156130032014000300010&lng=es&tlng=es).
43. Qurratu, A., & Reehan, A. (2016). A Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Derivatives: 2,4-D Dimethylamine Salt and 2,4-D Butyl Ester. International Journal of Applied Engineering Research, 11(19), 9946–9955.
44. R, E. (2014). Bioremediation of a Mineral Soil With High Contents of Clay and Organic Matter Contaminated With Herbicide ... using slurry bioreactors : Effect



- of electron acceptor and supplementation with an organic carbon source, (May).  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.004>
45. RAPAL, (2007). 2,4-D, Respuestas a preguntas frecuentes. Razones para su prohibición mundial. Estado de México. México.
  46. Reddy, K. R., Admas, J. F., and Richardson, C. (1999). Potential technologies for remediation of Brownfield. Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management, 3 (2): 61-68.
  47. Sellers K (1999). Fundamentals of hazardous waste site remediation. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, U.S.A.
  48. Smejkal, C.W.; Seymour, F.A.; Burton, S.K.; Lappin-Scott, H.M. (2003). Characterization of bacterial cultures enriched on the chlorophenoxyalkanoic acid herbicides 4-(2,4-dichlorophenoxy) butyric acid and 4-(4-chloro-2-methylphenoxy) butyric acid. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 30, 561-567.
  49. Smith F., (2012). The Sugar Industry. Recuperado de: <http://belizeinfocenter.org/industries/sugar-industry/>
  50. Statistical Institute of Belize, (2010). Belize Population and Housing Census: Country eport 2010. Recuperado de: [http://www.sib.org.bz/wp-content/uploads/2017/05/Census\\_Report\\_2010.pdf](http://www.sib.org.bz/wp-content/uploads/2017/05/Census_Report_2010.pdf)
  51. Stets, M. I., Cantú, M. D., Silva, T. M., Stets, M. I., Mazzetto, A. M., Andrade, F. D., Fávero, P. R. (2017). Degradation of 2,4-d Herbicide by Microorganisms Isolated From Brazilian Contaminated Soil. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300026>
  52. T. Castelo-Grande and D. Barbosa, (2003). Chemical Industry and Environment IV. Edited by A. Macias-Machin and J. Umbria, EMA, Universidad de Las Palmas de Gran Canarias, Spain.
  53. Tomlin C., (1994). The Pesticide Manual. 10th edn. British Crop Protection Council/Royal Society of Chemistry, London.
  54. Tu, M., Hurd, C., Randall, J., M., The Nature Conservancy, (2001). "Weed Control Methods Handbook: Tools & Techniques for Use in Natural Areas". All U.S. Government Documents (Utah Regional Depository). Paper 533. <http://digitalcommons.usu.edu/govdocs/533>
  55. Volke T. L. y Velasco J. A., (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Mexico: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto de Ecología, Instituto Nacional de Ecología.

56. Walters J. (S.F) Environmental Fate of 2,4-Dichlorophenoxyacetic, AcidEnvironmental Monitoring and Pest Management, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA 95814-3510.  
<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/24-d.pdf>
57. Watkins S., (2002) World Non-Agricultural Pesticide Markets Agrow Report. 2nd edn. PJB Publications, Richmond, UK.
58. Wiedemeier TH, Rifai HS, Newell CJ, Wilson JT (1999). Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface. John Wiley & Sons, New York, NY, U.S.A.
59. Yentumi, S. D., & Kuwatsuka, S. (2012). Soil Science and Plant Nutrition Microbial degradation of benthocarb, MCPA and 2, 4-d herbicides in perfused soils amended with organic matter and chemical fertilizers, 0768.  
<https://doi.org/10.1080/00380768.1982.10432368>
60. Yeung, A., T., (2009). Remediation technologies for contaminated sites. Proc. Of Int. Symp. On Geoenvironmental Eng. Hangzhou. China.
61. Zabaloy, M. C., & Gómez, M. A. (2014). Isolation and characterization of indigenous 2, 4-D herbicide degrading bacteria from an agricultural soil in proximity of Sauce Grande River, Argentina, 969–974.  
<https://doi.org/10.1007/s13213-013-0731-9>

# Anexos

## Anexo 1: Materiales y métodos

**Tabla 7.1.** Composición del Medio Mínimo Mineral (Medoza et al., 2011)

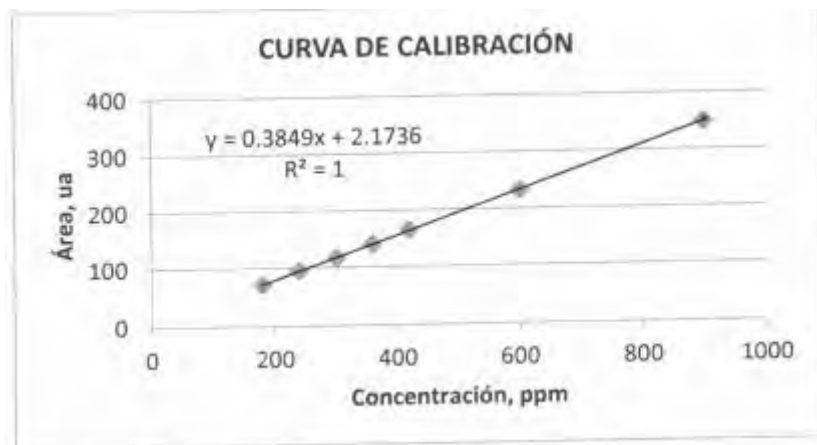
<b>COMPONENTE</b>	<b>FORMULA</b>	<b>CANTIDAD</b>
<b>FOSFATO DIPOTÁSICO</b>	$K_2HPO_4$	3 g
<b>FOSFATO DE POTASIO MONOBÁSICO</b>	$KH_2PO_4$	0.5 g
<b>SULFATO DE AMONIO</b>	$(NH_4)_2SO_4$	1.25 g
<b>CLORURO DE SODIO</b>	NaCl	10 mg
<b>SULFATO DE MAGNESIO HEPTAHIDRATADO</b>	$MgSO_4$	100 mg
<b>SULFATO DE HIERRO</b>	$FeSO_4$	1 mg
<b>ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO</b>	EDTA	200 mg
<b>AGUA DESTILADA</b>	$H_2O_d$	1 Litro

**Tabla 7.2.** Composición de caldo Luria Bertani.

<b>COMPONENTE</b>	<b>FORMULA</b>	<b>CANTIDAD</b>
<b>CLORURO DE SODIO</b>	NaCl	5 g
<b>PEPTONA DE CASEINA</b>		10 g
<b>EXTRACTO DE LEVADURA</b>		5 g
<b>AGUA DESTILADA</b>	$H_2O$	1 Litro

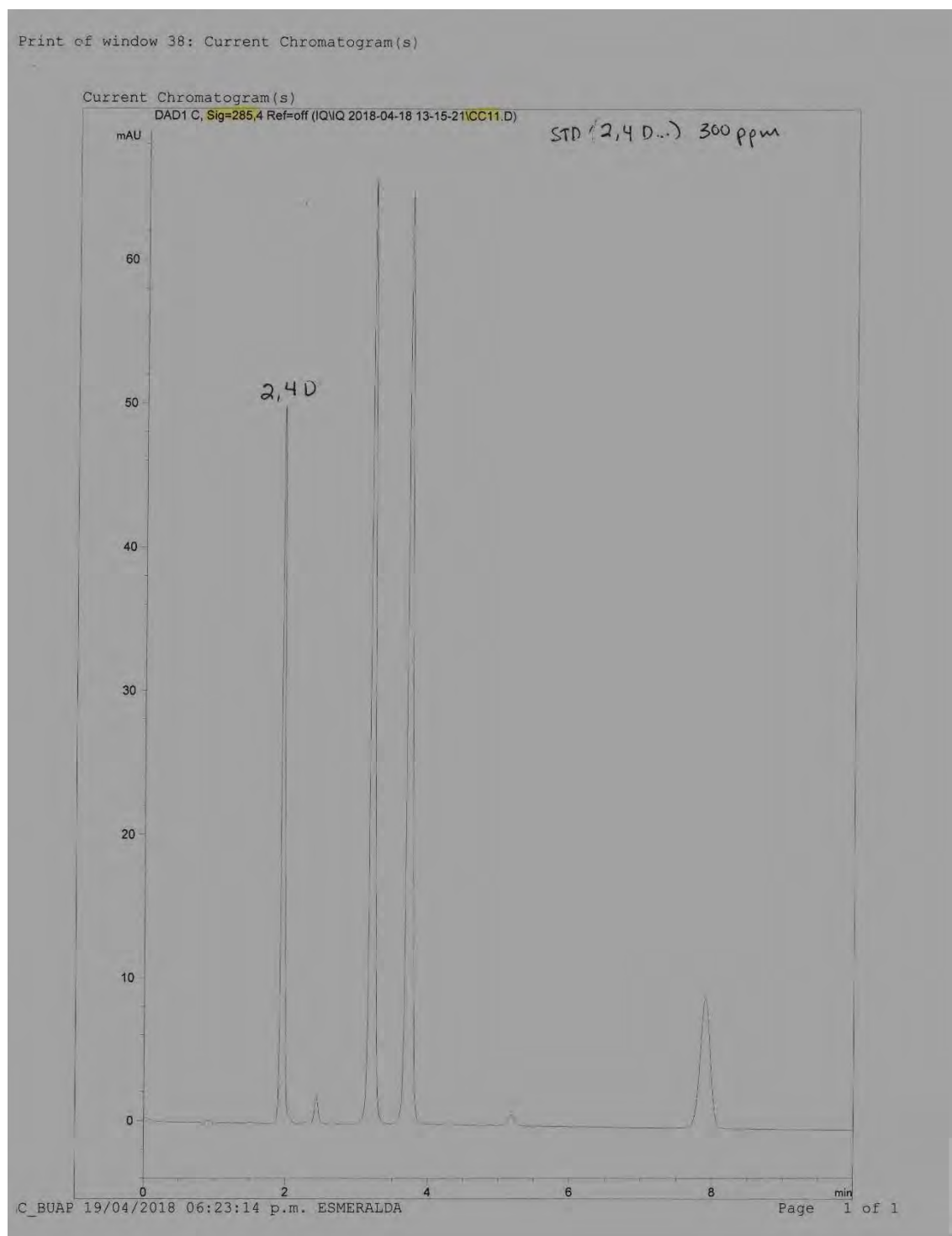
## Anexo 2: Resultados

### Curva de calibración



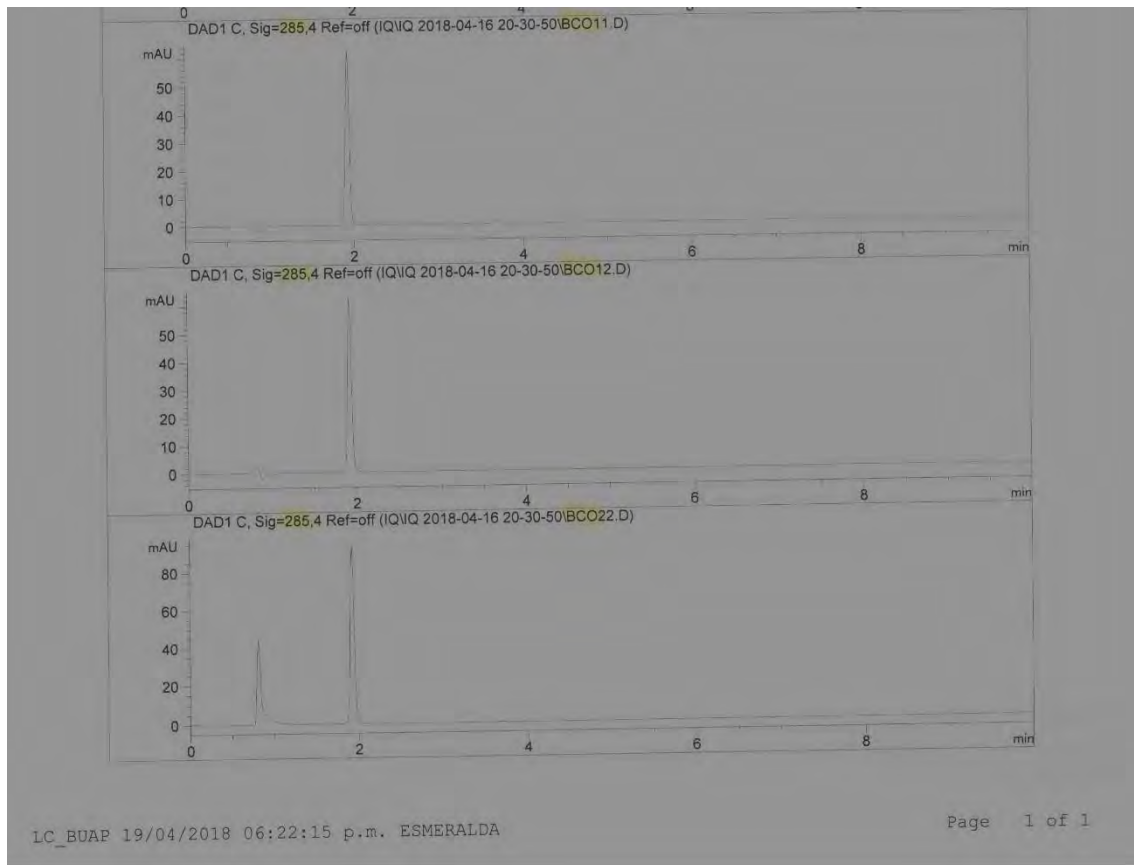
**Figura 7.1.** Curva de calibración para el 2,4-D.

## Cromatograma del estándar



**Figura 7.2.** Cromatograma del estándar del 2,4-D.

## Cromatograma de Blanco



**Figura 7.3.** Cromatograma de los blancos durante la cinética de degradación.

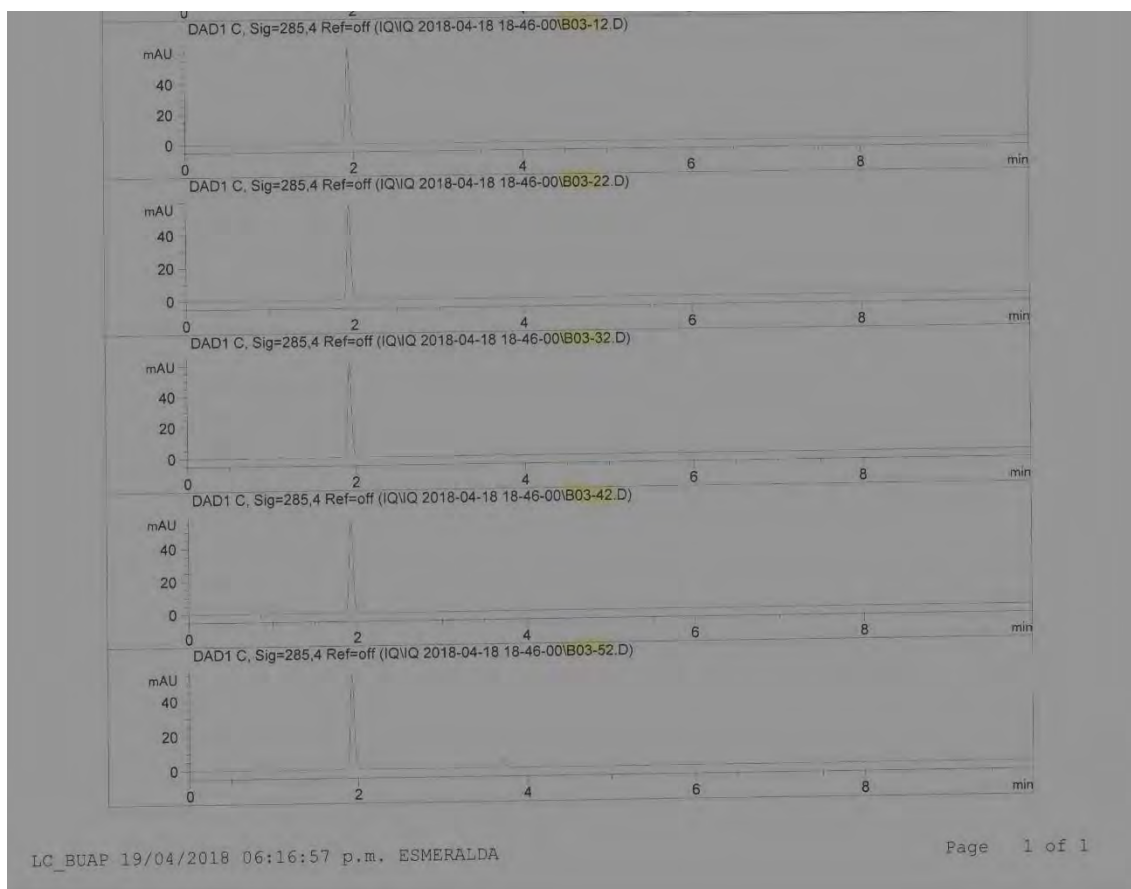
## Cromatograma de muestras de la cepa B01



**Figura 7.4.** Cromatograma de las muestras obtenidas durante la cinética de degradación de la cepa B01.



## Cromatograma de muestras de la cepa B03



**Figura 7.5.** Cromatograma de las muestras obtenidas durante la cinética de degradación de la cepa B03.