



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS**  
**EXTRACTIVAS**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA INDUSTRIAL**

**ESTUDIO DE BIODEGRADACIÓN DEL FUNGICIDA PROCLORAZ A**  
**TRAVÉS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR RESONANCIA EN EL**  
**CICLOTRÓN**

**Tesis**

Que para obtener el título de:

**INGENIERO QUÍMICO INDUSTRIAL**

**P R E S E N T A**

Bryan Martínez Monzón

**Directores:**

Dr. Yair Cruz Narváez

Dr. José Javier Castro Arellano



Ciudad de México

Febrero, 2024



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Politécnico Nacional  
"La Técnica al Servicio de la Patria"

**Escuela Superior de Ingeniería  
Química e Industrias Extractivas  
Subdirección Académica  
Departamento de Evaluación y  
Seguimiento Académico**

**Folio**

T-DEySA-003-24

**Asunto**

Autorización de tema

100 Aniversario del CECyT "Gonzalo Vázquez Vela"  
60 Aniversario del Centro Cultural "Jaime Torres Bodet"  
50 Aniversario de la ESIME Unidad Culhuacán,  
ESIA Unidad Tecamachalco y de la Escuela Superior de Turismo  
40 Aniversario del CIEMAD, CEPROBI y del CITEDI

CDMX, 19 de enero de 2024

**Pasante**

Bryan Martínez Monzón  
PRESENTE

**Boleta**

2019321356

**Programa Académico**

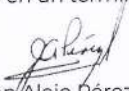
I.Q.I.


Mediante el presente se hace de su conocimiento que la Subdirección Académica a través de este Departamento autoriza al **Dr. Yair Cruz Narváez** y al **Ing. José Javier Castro Arellano** sean asesores en el tema que propone usted desarrollar como prueba escrita en la opción **Tesis Individual**, con el título y contenido siguiente:


**"Estudio de biodegradación del fungicida procloraz a través de espectrometría de masas por resonancia en el ciclotrón"**

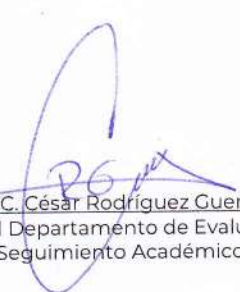
- Justificación
- Objetivos
- Introducción
- I. Marco teórico
- II. Metodología
- III. Resultados y análisis
- Conclusiones
- Bibliografía
- Anexos


De acuerdo al artículo 28 del Reglamento de Titulación Profesional del Instituto Politécnico Nacional, el trabajo deberá ser concluido en un término no mayor de un año, a partir de esta fecha.

  
Ing. Juan Alejo Pérez Legorreta  
Presidente de la academia de  
Química Analítica

  
Dr. Yair Cruz Narváez  
Director del trabajo escrito

  
Ing. José Javier Castro Arellano  
Director de trabajo escrito

  
M. en C. César Rodríguez Guerrero  
Jefe del Departamento de Evaluación  
y Seguimiento Académico.

  
Dra. Jahel Valdés Saucedo  
Subdirectora académica

c.c.p.- Depto. de Evaluación y Seguimiento Académico.  
c.c.p.- Depto. de Gestión Escolar.  
CRG/mlcp





**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Politécnico Nacional  
"La Técnica al Servicio de la Patria"

Escuela Superior de Ingeniería  
Química e Industrias Extractivas  
Subdirección Académica  
Departamento de Evaluación y  
Seguimiento Académico

**Folio**

T-DEySA-003-24

**Asunto**

Cesión de derechos

2023. Año de Francisco Villa  
30 Aniversario de la Declaración sobre  
la Eliminación de la Violencia contra la Mujer (ONU)  
60 Aniversario del CECyT 7 "Cuauhtémoc" y del CENAC  
90 Aniversario de la Escuela Superior de Ingeniería Textil  
40 Aniversario del CIDIIR, Unidad Oaxaca

Ciudad de México, a 26 de enero de 2024

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

El que suscribe **Bryan Martínez Monzón** estudiante del Programa de: **Ingeniería Química Industrial** con número de Boleta: **2019321356**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo escrito, por la opción: **Tesis Individual**, bajo la dirección de los profesores **Dr. Yair Cruz Narváez** y el **Ing. José Javier Castro Arellano**, ceden lo derechos del trabajo "**Estudio de biodegradación del fungicida procloraz a través de espectrometría de masas por resonancia en el ciclotrón**" al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico [bmartinezm1803@alumno.ipn.mx](mailto:bmartinezm1803@alumno.ipn.mx) [ycruzn@ipn.mx](mailto:ycruzn@ipn.mx) y [jjcastro@ipn.mx](mailto:jjcastro@ipn.mx) Sí, el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente

  
Yair Cruz Narváez

Nombre y Firma  
Director del trabajo escrito

  
José Javier Castro A.

Nombre y Firma  
Director del trabajo escrito

  
Bryan Martínez Monzón

Nombre y Firma  
Del estudiante



2023  
Francisco  
VILLA



**EDUCACIÓN**  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



Instituto Politécnico Nacional  
"La Técnica al Servicio de la Patria"

Escuela Superior de Ingeniería  
Química e Industrias Extractivas  
Subdirección Académica  
Departamento de Evaluación y  
Seguimiento Académico

**Folio**

T-DEySA-003-24

**Asunto**

Autorización de Impresión

2023. Año de Francisco Villa  
30 Aniversario de la Declaración sobre  
la Eliminación de la Violencia contra la Mujer (ONU)  
60 Aniversario del CECyT 7 "Cuauhtémoc" y del CENAC  
90 Aniversario de la Escuela Superior de Ingeniería Textil  
40 Aniversario del CIIDIR, Unidad Oaxaca

Ciudad de México, a 26 de enero de 2024

**Pasante**

**Bryan Martínez Mozón**  
**PRESENTE**

**Boleta**  
**2019321356**

**Programa Académico**  
**I.Q.I.**

Los suscritos tenemos el agrado de informar a usted, que habiendo procedido a revisar el borrador de la modalidad de titulación correspondiente denominado:

**"Estudio de biodegradación del fungicida procloraz a través de espectrometría de masas por resonancia en el ciclotrón"**

encontramos que el citado trabajo escrito de **Tesis Individual**, reúne los requisitos para **autorizar el examen profesional y proceder a su impresión** según el caso, debiendo tomar en consideración las indicaciones y correcciones que al respecto se le hicieron.

Ing. José Javier Castro Arellano  
Presidente

Atentamente  
**JURADO**

Dr. Gregorio Zacahua Tlacuati  
Secretario

Dr. Yair Cruz Narváez  
Vocal 1

M. en C. David Correa Coyac  
Vocal 2

Ing. Enrique Rico Arzate  
Vocal 3

c.c.p.- Depto. de Evaluación y Seguimiento Académico.  
c.c.p.- Depto. de Gestión Escolar.  
CRC/mlcp.



**2023**  
**Francisco**  
**VILLA**  
ESTADO DE GUJARATO

# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## RESUMEN

En las últimas décadas, ha surgido y agravado una preocupación ambiental relacionada con el uso de plaguicidas, sobre la cual aún falta cierta conciencia en la sociedad. Los residuos de estos productos tienden a acumularse en suelos destinados a la agricultura, cuerpos de agua y alimentos, lo que provoca problemas de salud en las comunidades circundantes. Un ejemplo de estos plaguicidas es el procloraz, un fungicida ampliamente utilizado para controlar plagas de origen fúngico, pero que, además de ser tóxico para los seres humanos, actúa como un disruptor endocrino. También, al descomponerse, da origen a un compuesto aún más peligroso: el 2,4,6-triclorofenol (TCP).

La presente tesis desarrolla un proyecto de investigación sobre la biodegradación del fungicida procloraz, abordando tanto aspectos cualitativos como cuantitativos que inciden en dicho proceso. Se llevaron a cabo experimentos de biodegradación en dos lapsos temporales: uno de un mes y otro de 24 horas, precedidos por una fase de adaptación de cepas bacterianas en un medio mínimo enriquecido con procloraz. Este enfoque permitió un análisis detallado de la cinética de la biodegradación en ambas escalas temporales, ajustando los datos cinéticos a modelos como el de Monod o el de primer orden.

Un componente esencial de la investigación fue la utilización del Carbono Orgánico Total para evaluar la eficacia de la biodegradación del fungicida. Además, se implementó la Espectrometría de Masas de Ultra Alta Resolución para medir con alta precisión la concentración de procloraz a lo largo del tiempo e identificar los metabolitos resultantes de la biodegradación.

Un aspecto significativo fue la evaluación de la toxicidad post-biodegradación, donde se comparó la germinación de semillas de lechuga regadas con soluciones de procloraz puro y

procloraz biodegradado, evidenciando cambios en la toxicidad tras el proceso de biodegradación. El producto después de la biodegradación presentó una considerable menor toxicidad comparado con una muestra de procloraz sin degradar.

Los resultados obtenidos indican una notable eficiencia de biodegradación en un corto periodo de 24 horas, destacando una ruta metabólica que descompone al TCP y que presenta una significativa reducción en la toxicidad del procloraz después del proceso de biodegradación. Estos hallazgos ofrecen información valiosa para el tratamiento eficiente de residuos contaminados con procloraz, contribuyendo así a la preservación del medio ambiente y la protección de la salud pública.

**Palabras clave:** Procloraz, biodegradación, ruta metabólica, mineralización.

# ÍNDICE

Índice de figuras.....	6
Índice de tablas .....	9
Agradecimientos institucionales.....	10
Agradecimientos personales.....	10
Justificación .....	11
Objetivos.....	12
Introducción .....	13
Capítulo 1: Marco teórico.....	17
1.1. La contaminación de plaguicidas en México .....	17
1.1.1. Antecedentes históricos.....	19
1.1.2. Fungicidas.....	22
1.1.3. El procloraz .....	25
1.2. Normatividad de los plaguicidas en México .....	32
1.3. La biorremediación de plaguicidas .....	34
1.3.1. Estudio del arte.....	34
1.3.2. Modelos cinéticos.....	43
Capítulo 2: Metodología.....	48
2.1. Materiales y reactivos.....	48
2.1.1. Instrumentos utilizados .....	48
2.1.2. Reactivos empleados .....	49
2.2. Etapas del proceso experimental.....	50
2.2.1. Adaptación del consorcio.....	51
2.2.2 Estudio cinético .....	52
2.2.3 Estudio metabolómico.....	55
2.2.4 Prueba de mineralización.....	58
2.2.5 Prueba toxicológica.....	60
Capítulo 3: Resultados y análisis.....	64

3.1. Resultados y tratamiento de datos.....	64
3.1.1. Etapa de adaptación del consorcio .....	64
3.1.2. Etapa cinética.....	65
3.1.2.1. Cálculo del porcentaje de la biodegradación.....	71
3.1.2.2. Determinación del modelo cinético .....	72
3.1.3. Estudio metabolómico.....	79
3.1.4. Cálculo del porcentaje de la mineralización.....	95
3.1.5. Cálculo de los porcentajes de germinación .....	98
3.2. Descripción de hallazgos.....	106
Conclusiones y recomendaciones .....	109
Bibliografía .....	112
Anexo A. Glosario .....	115



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>No. Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1.1	Parcela de maíz en el municipio de Angamacutiro, Michoacán.	17
1.2	Volumen de producción mensual de insecticidas entre enero de 2019 y marzo de 2023.	18
1.3	Estructura molecular del procloraz.	26
1.4	Procloraz comercial de la marca Sportak.	27
1.5	Estructura molecular del procloraz y de sus productos de biodegradación.	28
1.6	Rutas metabólicas obtenidas con EAWAG-PPS.	30
1.7	Crecimiento bacteriano durante la biodegradación del plaguicida permetrina a 50 mg/L	36
1.8	Crecimiento bacteriano durante la biodegradación del plaguicida permetrina a 100 mg/L	37
1.9	Crecimiento bacteriano durante la biodegradación del plaguicida cipermetrina a 50 mg/L	37
1.10	Crecimiento bacteriano durante la biodegradación del plaguicida cipermetrina a 100 mg/L	38
1.11	Porcentaje de biodegradación del plaguicida permetrina a 50 mg/L mediante espectrofotometría UV-Vis	39
1.12	Porcentaje de biodegradación del plaguicida permetrina a 100 mg/L mediante espectrofotometría UV-Vis	39
1.13	Espectros de biodegradación del plaguicida permetrina a 100 mg/L mediante IR.	41
1.14	Espectros de biodegradación del plaguicida cipermetrina a 100 mg/L mediante espectrofotometría IR	41
1.15	Fases de crecimiento de células bacterianas	47
2.1	Esquema de la metodología en la adaptación del consorcio	51
2.2	Proceso metodológico general de la prueba cinética	52
2.3	Proceso metodológico detallado de la toma de variables.	54
2.4	Espectrofotómetro UV-Vis HACH DR 5000.	55
2.5	Proceso metodológico del análisis de muestras en el espectrómetro de masas.	56
2.6	Diagrama para la preparación del calibrante de trifluoroacetato de sodio o NaTFA.	57
2.7	Proceso metodológico para la prueba de biodegradación a 24 horas.	58
2.8	Proceso metodológico para la prueba de Carbono Orgánico Total COT	59

2.9	Proceso metodológico de la prueba toxicológica.	60
3.1	Espectro UV-Vis del procloraz a través del tiempo durante la primera fase de adaptación del procloraz a 100 mg/L	64
3.2	Absorbancia vs tiempo del sistema, a 260 nm.	65
3.3	Espectro UV-Vis del procloraz a través del tiempo durante la etapa cinética.	66
3.4	Gráfico del comportamiento de la biomasa	67
3.5	Comportamiento del pH.	67
3.6	Comportamiento de los niveles de oxígeno	68
3.7	Curva de calibración del procloraz por espectrometría de masas.	69
3.8	Concentración en mg/L de procloraz de las muestras en la prueba a un mes.	70
3.9	Concentración en mg/L de procloraz de las muestras en un día.	70
3.10	Gráfico experimental ajustado para el crecimiento de biomasa.	73
3.11	Gráfico teórico ajustado para el crecimiento de biomasa.	74
3.12	Gráfico teórico ajustado para el crecimiento de biomasa a 24 horas	75
3.13	Curva cinética de biodegradación de procloraz utilizando el modelo de Monod.	76
3.14	Curva cinética de biodegradación de procloraz utilizando el modelo de primer orden.	78
3.15	Comparación de espectros de masas del procloraz	80
3.16	Espectro correspondiente al fragmento 6	81
3.17	Espectro correspondiente al fragmento 9	82
3.18	Espectro correspondiente al fragmento 41	82
3.19	Espectro correspondiente al fragmento 42	83
3.20	Metabolitos encontrados con el software MetaboScape de Bruker a un mes.	83
3.21	Espectro correspondiente al fragmento 3	84
3.22	Espectro correspondiente al fragmento 6	85
3.23	Espectro correspondiente al fragmento 16	86
3.24	Espectro correspondiente al fragmento 20	87
3.25	Espectro correspondiente al fragmento 37	88
3.26	Espectro correspondiente al fragmento 41	89
3.27	Espectro correspondiente al fragmento 42	90
3.28	Espectro correspondiente al fragmento 47	90
3.29	Metabolitos encontrados con el software MetaboScape de Bruker a 24 horas.	91
3.30	Ruta metabólica propuesta.	94
3.31	Curva de calibración de Carbono Orgánico Total	96

3.32	Muestras iniciales M1, M2 y M3.	99
3.33	Muestras finales M1, M2 y M3, con el número de semillas germinadas por caja Petri.	99
3.34	Muestras iniciales MP1, MP2 y MP3.	100
3.35	Muestras finales MP1, MP2 y MP3, con el número de semillas germinadas por caja Petri.	100
3.36	Muestras iniciales MG1, MG2 y MG3.	101
3.37	Muestras finales MG1, MG2 y MG3, con el número de semillas germinadas por caja Petri.	101
3.38	Muestras iniciales MPG1, MPG2 y MPG3.	102
3.39	Muestras finales MPG1, MPG2 y MPG3, con el número de semillas germinadas por caja Petri.	102
3.40	Muestras iniciales PF1, PF2 y PF3.	103
3.41	Muestras finales PF1, PF2 y PF3, con el número de semillas germinadas por caja Petri.	103
3.42	Muestras finales de cada muestra sin marcas.	104
3.43	Semillas germinadas con cada solución. Fuente: Elaboración propia.	106
3.44	Metabolitos finales del proceso de biodegradación del procloraz.	108

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>No. Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1.1	Características y propiedades del procloraz	26
1.2	Composición del procloraz comercial Sportak.	27
1.3	Propiedades y características del TCP.	28
1.4	Lista de plaguicidas permitidos en México y prohibidos en otros países.	33
1.5	Comparación de modelos cinéticos, en su forma $\mu$ .	45
2.1	Instrumentos.	48
2.2	Reactivos.	49
2.3	Método para análisis de procloraz en el espectrómetro Solarix XR.	56
3.1	Niveles de oxígeno medidos	67
3.2	Concentraciones obtenidas con la curva de calibración en la prueba de biodegradación a 24 horas.	71
3.3	Biomasa obtenidas con los datos corregidos.	72
3.4	Datos de biomasa teóricos a 1 mes obtenidos con la Ecuación 20.	73
3.5	Datos de biomasa teóricos a 24 horas obtenidos con la Ecuación 20.	74
3.6	Datos cinéticos para el modelo de Monod.	75
3.7	Datos cinéticos para el modelo de primer orden.	77
3.8	Metabolitos encontrados en ambos experimentos.	91
3.9	Áreas obtenidas para las muestras analizadas por COT	95
3.10	Cálculo de concentraciones de las muestras al inicio y al final de la biodegradación.	96
3.11	Porcentajes de germinación por caja y por solución.	105

## **Reconocimientos**

Este trabajo se desarrolló gracias a los proyectos apoyados por CONACYT: 302670 en la convocatoria 2019 apoyos para adquisición y mantenimiento de infraestructura en instituciones y laboratorios de investigación especializada, CF-2019/6669 en la convocatoria ciencia de fronteras; y a los proyectos SIP 20230349 y 1533-2021, y al proyecto de innovación y desarrollo de la convocatoria de proyectos de desarrollo tecnológico o innovación en el IPN 2023.

## **Reconocimientos institucionales**

RECONOCIMIENTOS: Al INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, mi alma máter, por ser la institución puntera en ingeniería en nuestro país y contagiarme con el espíritu politécnico, motivándome a poner la técnica al servicio de la patria en cualquier trabajo en el que me desempeñe. A la ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS por formar profesionistas de calidad y convertirme en parte de ellos. Reconocimientos a todos los organismos e instituciones que permitieron el desarrollo de este proyecto de manera directa o indirecta: el LABORATORIO DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DE OPERACIONES UNITARIAS DE LA ESIQIE, el CINVESTAV y la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO.

## **Agradecimientos personales**

No existen palabras para describir el profundo agradecimiento que siento hacia mis padres, por el apoyo brindado desde mi nacimiento hasta este punto de mi vida en el cual me encuentro concluyendo la licenciatura, por enseñarme a caminar hacia adelante aún en la más impetuosa de las tormentas. A mis hermanos por las andanzas y el tiempo compartido. A mis amigos, a los cuales guardo un particular cariño y con quienes he llevado un apoyo mutuo con nuestros proyectos de vida. Quiero desatacar aquellas amistades y relaciones forjadas durante mi etapa universitaria, pues de alguna manera hicieron más provechoso el tiempo que pasé como estudiante de esta gloriosa escuela. A mi asesor de tesis, el Dr. Yair Cruz Narváez por promover la ciencia dentro del instituto y darme la oportunidad de crecer en el ámbito de la investigación. A mis profesores por la amplia cantidad de conocimiento que me transmitieron. A todas las personas que antes de mí crearon el conocimiento que construye mi profesión, y me han permitido pararme sobre los hombros de gigantes.

## **JUSTIFICACIÓN**

Los fungicidas, así como los plaguicidas en general, son imprescindibles para suplir las necesidades que demanda la sociedad actual, ya que garantizan mayores rendimientos en los cultivos, por lo tanto, mayores utilidades. No obstante, aparte de los motivos económicos también existen motivos de salubridad que ocasionan un uso muy amplio de los fungicidas. Las enfermedades son comunes en las plantas y uno de los agentes patógenos son los hongos, los cuales producen micotoxinas dañinas para los animales y seres humanos que consumen la planta infectada; los fungicidas controlan las enfermedades de origen fúngico, inhibiendo o eliminando al hongo patógeno.

Sin embargo, su aplicación en situaciones innecesarias y en cantidades insanas ha causado un problema ecológico y de salud que no se puede continuar ignorando. Se han encontrado

residuos de fungicidas tanto en las tierras de cultivo como en los cuerpos de agua en donde desembocan las corrientes de riego; en adición a lo anterior, los alimentos también absorben este tipo de compuestos que son tóxicos a la población. Tan sólo en México en 2018 se consumieron 28,600 toneladas de fungicidas y bactericidas en conjunto (CEDRSSA, 2020). Otro problema que supone el uso indebido de los plaguicidas y, por lo tanto, de los fungicidas, es la resistencia que pueden generar los organismos a los que desea erradicar.

El procloraz, un fungicida, debe su toxicidad al grupo imidazol presente en su estructura, que puede reaccionar con enzimas distintas a las de los hongos que son el objetivo de este producto. El procloraz ataca algunas enzimas clave en la biosíntesis y metabolismo de esteroides en vertebrados, por lo que actúa como disruptor endócrino, alterando el equilibrio hormonal y factores de transcripción que regulan la expresión genética (Kojima et al., 2004). Además, los productos de degradación del procloraz quedan como residuos en suelos, cuerpos de agua y en las plantas; algunos como el TCP (2,4,6-triclorofenol) presentan una mayor toxicidad que el mismo procloraz.

La solución propuesta en el presente proyecto es la de eliminar residuos del fungicida procloraz mediante su biodegradación. Es una alternativa que no elimina este fungicida del mercado e introduce nuevas opciones en la agricultura y en la economía, enriqueciéndola. Actualmente se ha comprobado que la biodegradación funciona en otros plaguicidas como atrazina o glifosfato. El presente trabajo pone a prueba un grupo de bacterias para biodegradar en un plazo determinado una muestra del fungicida procloraz; obteniendo datos cinéticos en el proceso. También se analiza mediante metabolómica el proceso de biodegradación, conociendo la ruta metabólica de descomposición del contaminante procloraz, con el fin de comprender y optimizar las variables que intervienen, para la posterior implementación práctica del método y avanzar en la solución del problema de los fungicidas en los ecosistemas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Estudiar el cambio que sufre el metaboloma de un consorcio microbiano con actividad degradadora del fungicida procloraz, durante la fase cinética, utilizando Espectrometría de Masas por Resonancia Magnética (MRMS). Con el fin de medir su potencial de biodegradación.

### **Objetivos específicos**

- Realizar la adaptación del consorcio bacteriano al fungicida procloraz.
- Determinar el modelo cinético de biodegradación en reactor de tipo Batch.
- Proponer una ruta metabólica en la degradación del procloraz.
- Realizar pruebas de toxicidad del producto de degradación a través de la germinación de semillas de lechuga.
- Identificar metabolitos biomarcadores del proceso de biodegradación.



## INTRODUCCIÓN

### Problemática

Los fungicidas, al igual que los pesticidas en general, son fundamentales para satisfacer los requerimientos de la sociedad contemporánea, ya que aseguran incrementos significativos en la producción agrícola, generando así mayores beneficios económicos. Sin embargo, su aplicación en situaciones innecesarias y en cantidades insanas ha causado un problema ecológico y de salud que no se puede continuar ignorando. Bien lo dijo Albert Schweitzer, premio Nobel de la Paz en 1952: “El hombre ha perdido su capacidad de prever y de aprovisionarse. Terminará por destruir la Tierra”. Y ya bien entrado el siglo XXI se está cumpliendo. Ahora es una misión de primera prioridad para la ciencia el remediar los daños causados, así como proponer, diseñar y ejecutar tecnologías que lleven a la humanidad por el camino de la sustentabilidad.

El procloraz en particular, es un fungicida imidazol con una toxicidad elevada, del cual algunos experimentos han demostrado que se degrada con facilidad, dichos subproductos generalmente se encuentran en contacto con suelos, cuerpos acuíferos y con materia orgánica. Uno de los subproductos, el TCP (2,4,6-triclorofenol), es aún más peligroso que el procloraz. La problemática radica en el aumento considerable en el medio ambiente tanto del procloraz como de sus productos de degradación, que ocasionan un impacto ecológico y de salud en la población.

Aportar el granito de arena en la lucha contra los efectos producidos por la contaminación es una labor que debe estar presente en la mente de cualquier persona de ciencia. Han sido décadas de un mal uso de los recursos, estamos a tiempo para que, con pequeños resultados de cada investigación científica, se siga caminando hacia una sociedad sustentable y con mejor calidad de vida.

## **Hipótesis**

Un grupo de microorganismos previamente adaptado es capaz de degradar muestras del fungicida procloraz con un rendimiento aceptable en un periodo inferior a 30 días. El proceso de biodegradación constará de una serie de etapas en el que la molécula de procloraz se descompone en moléculas más sencillas y menos peligrosas para el medio ambiente, que incluye los suelos y cuerpos de agua. Dichas moléculas en las que se descompone el procloraz son capaces de identificarse mediante Espectroscopía de Masas (MRMS); con los resultados obtenidos pueden obtenerse el rendimiento de la biodegradación y la ruta metabólica de descomposición, así como el modelo cinético que rige el proceso, se espera que modelos cinéticos de primer orden o el modelo de Monod por su simplicidad y versatilidad serán adecuados para describir el proceso de biodegradación de procloraz.

## **Metodología**

Para alcanzar el cumplimiento de los objetivos el procedimiento experimental se desglosa en cinco etapas fundamentales: en la primera, denominada adaptación del consorcio se busca habituar a las bacterias a las condiciones del medio enriquecido con el fungicida, es decir, la mezcla que se pretende degradar. La segunda etapa, conocida como estudio cinético, implica medir la variación en el tiempo de propiedades del sistema, como la concentración de procloraz, masa orgánica, pH, entre otras. Una vez que los microorganismos han sido adaptados; esto se realiza con el objetivo de ajustar los datos a un modelo cinético, se pondrán a prueba el modelo cinético de primer orden y el modelo de Monod. La tercera etapa consiste en el estudio metabolómico, cuyo propósito es identificar metabolitos, biomarcadores y otras sustancias relevantes mediante la técnica de MRMS de ultra alta resolución. Luego, se destacará la importancia de emplear esta técnica de espectrometría de masas para medir la concentración de procloraz. La cuarta etapa se centra en la medición del Carbono Orgánico

Total (COT), comparando el nivel de carbono orgánico al inicio y al final del proceso de biodegradación. Finalmente, la quinta etapa, que constituye la última, es la prueba de toxicidad, donde se evalúa la germinación de muestras de semillas de lechuga regadas con soluciones que contienen cantidades variables de procloraz y glucosa, con el propósito de analizar la toxicidad tanto del procloraz activo como del mismo después de pasar por el proceso de biodegradación.

# *Capítulo 1*

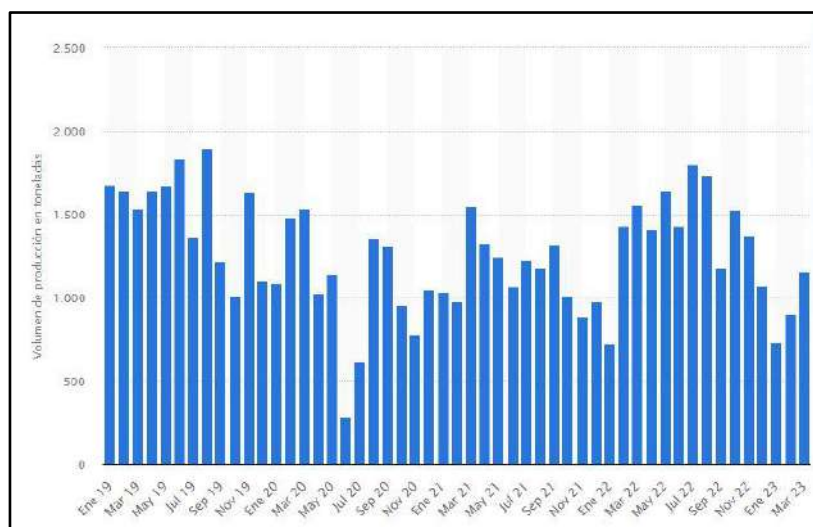
## **MARCO TEÓRICO**

### **1.1. LA CONTAMINACIÓN DE PLAGUICIDAS EN MÉXICO**

La cantidad de plaguicidas utilizados en la producción agrícola ha aumentado de forma exponencial desde la segunda mitad del siglo pasado, por lo tanto, la cantidad de estas sustancias y de sus productos de degradación tanto en el medio ambiente en suelos y cuerpos de agua como en productos de consumo humano, también han aumentado amenazando a la integridad de los ecosistemas y a la salud pública. A esto hay que añadir que en países que no son del primer mundo como México, los agricultores, ya sea por negocio o por negligencia, hagan un uso desmedido de los plaguicidas, en cantidades inadecuadas y en épocas del año innecesarias, pues se trata de productos económicos y con una alta eficacia (Figura 1.1). Prueba de que en México existe una alta demanda de plaguicidas es el hecho de que entre enero de 2019 y marzo de 2023 se produjeron cada mes alrededor de mil toneladas métricas de insecticidas, ver la Figura 1.2 (Statista Research Department, 2023).



**Figura 1.1.** Parcela de maíz en el municipio de Angamacutiro, Michoacán. El uso de plaguicidas es muy común en estas zonas. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 1.2.** Volumen de producción mensual de insecticidas entre enero de 2019 y marzo de 2023 (Statista Research Department, 2023).

Un estudio realizado en el año 2020 reportó que en los 10 años previos hubo disparidades significativas entre el promedio anual de exportaciones (más de 36 mil toneladas) e importaciones (más de 54 mil toneladas). En el año 2018, las exportaciones superaron las 34,000 toneladas y las importaciones superaron las 61,000 toneladas, generando un déficit del 79% en comparación con las exportaciones. En cuanto al consumo medio de plaguicidas en las últimas dos décadas, se identificaron diferencias significativas entre las estadísticas disponibles de la FAOSTAT, una organización internacional (más de 39,000 toneladas de ingredientes activos) y la SEMARNAT (más de 53,000 toneladas). Estas discrepancias equivalen a un uso adicional de 14,000 toneladas de plaguicidas (Moo-Muñoz et al., 2020), lo que es indicio de otro problema sobre el control que se tiene sobre este tipo de productos en el país.

La alta demanda y consumo de estos productos son consecuencia también del impulso de la agricultura industrial en el país en las últimas décadas, se ha observado un aumento preocupante en el uso de plaguicidas (insecticidas, fungicidas y herbicidas) y fertilizantes sintéticos. Esta promoción del modelo agrícola ha resultado en el control corporativo de todo el sistema alimentario, desde la concentración del mercado de insumos como semillas y

agrotóxicos por parte de unas pocas empresas (Omar Arellano Aguilar & Jaime Rendón von Osten, 2016), hasta prácticamente la extinción de las prácticas milenarias de cultivo de alimentos saludables tanto para las personas como para el medio ambiente. Por ejemplo, México es la cuna del maíz, con 64 razas de maíces nativos que se encuentran en peligro de desaparecer debido a factores como las malas praxis de cultivo, que incluyen el uso desmedido de plaguicidas (Peralta Vázquez, 2019).

¿Cómo hemos llegado a esta situación? Bien se dice popularmente que para entender nuestro presente y predecir nuestro futuro, hay que conocer nuestro pasado.

### **1.1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS**

Con la agricultura comienza la vida sedentaria del ser humano, y uno de los primeros problemas a los que aquella primitiva civilización se enfrentó fueron las plagas. Las primeras plagas azotaban pueblos y reducían drásticamente las poblaciones; ejemplo de ello fueron las plagas que sufrieron los egipcios en el 1223 a.C., acontecimiento que tiene registro arqueológico. La solución que encontraron en aquellas épocas para combatir a las plagas fue el uso de azufre, flores de piretro y arsenitos; así da inicio la época de los plaguicidas (Bertomeu-Sánchez, 2019). Los romanos fueron otra civilización de la que se tiene registro que utilizaron plaguicidas, usaron el alpechín, también conocido como amurca, un extracto de aceite de oliva que se obtiene al trabajar bajo presión las aceitunas, Plinio el viejo en su obra *Naturalis historia*, describe los usos de la amurca, como herbicida, pesticida, fungicida, conservante de frutos secos y fertilizante (Janakat et al., 2015).

Los plaguicidas hoy en día son agroquímicos imprescindibles en la agricultura, ayudan a combatir plagas y a mejorar las propiedades de los cultivos; sin embargo, su origen, así como mucha de la tecnología moderna, tiene tintes oscuros en la guerra. Es en la Segunda Guerra Mundial cuando un científico, Paul Hermann Müller (1899-1965), desarrolla una molécula capaz de matar un organismo rápidamente: el DDT (dicloro difenil tricloroetano), que como

era de esperarse fungió como arma química y se cobró la vida de cientos de personas al frente de la Alemania nazi (Bertomeu-Sánchez, 2019).

Otro uso que se le dio fue el de insecticida de piojos, pulgas y garrapatas, como sustituto del pelitre, un insecticida natural que sufrió un desabasto con la guerra. El descubrimiento de Müller acerca de las propiedades insecticidas de esta sustancia y de otra que sería un plaguicida muy utilizado en las siguientes décadas: el DDT (dicloro difenil tricloroetano) le valdría un Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1948, una vez culminada la Segunda gran guerra y el holocausto (César Tomé, 2014).

El DDT comenzó a aplicarse de inmediato con gran éxito en el control de mosquitos, por lo que también se combatieron enfermedades el tifus y la malaria. Gracias a esto se habían salvado millones de vidas en todo el planeta. Su bajo costo, potencia y una aparente inocuidad a los seres humanos, le permitieron al DDT ser conocido como la “sustancia milagrosa”. Cabe destacar que en esta época no era común realizar estudios de una sustancia previos a su producción en masa y comercialización, en el caso del DDT algunos cálculos estiman que entre 1945 y 1955 su producción se incrementó de 125 a 600 millones de libras anuales (César Tomé, 2014).

Tras una época en la que había un uso indiscriminado del DDT (de hecho, los civiles eran rociados con esta sustancia en sus ropas a manera de protección contra mosquitos), Rachel Carson fue la primera persona en denunciar sus efectos nocivos (César Tomé, 2014).

Rachel preocupada por lo que se habla en los sectores de la ciencia (numerosas especies que no eran insectos se estaban extinguiendo, y se presentaban casos de intoxicación posiblemente a raíz de insecticidas), por lo que comienza una investigación sobre el DDT y sus efectos. A pesar de demostrar sus efectos nocivos, Rachel fue fuertemente calumniada por parte de las compañías productoras de DDT; cabe destacar que Rachel nunca se opuso a la utilización de insecticidas, sino que promovía la mayor vigilancia y control de estos productos. No obstante, el tiempo le dio la razón y Rachel Carson es conocida como promotora del ecologismo (*El caso de Rachel Carson*, 2014).

Rachel Carson escribió en su artículo, que posteriormente sería publicado como libro:

[...] por primera vez en la historia del mundo, todo ser humano está ahora en contacto con productos químicos peligrosos, desde el momento de su concepción hasta su muerte... Se han encontrado en peces en remotos lagos de montaña, en lombrices enterradas en el suelo, en los huevos de los pájaros y en el propio hombre, ya que estos productos químicos están ahora almacenados en los cuerpos de la vasta mayoría de los seres humanos. Aparecen en la leche materna y probablemente en los tejidos del niño que todavía no ha nacido (Rachel Louise Carson, 1962).

Con trabajos como el de Rachel Carson dio inicio la Revolución Verde que tiene como fin el reparar y prevenir los atentados que nuestra civilización ha hecho con la naturaleza. Parte de la Revolución verde abarca el desarrollo de tecnologías que conduzcan por el camino de la sustentabilidad. Una de las tendencias más estudiadas actualmente es el tema de la biodegradación, la cual consiste en la descomposición por medio de microorganismos, de los desechos generados, como es el caso de los plaguicidas o los funguicidas (Cruz-Narváez y Rico-Arzate, 2018). Desde entonces se ha estudiado el impacto de sustancias contaminantes en el medio ambiente; el más relevante es el que ocurre por combustibles fósiles. Desde el derrame de petróleo del buque Exxon Valdez en 1989, se han realizado estudios sobre la capacidad de los microorganismos para degradar este tipo de contaminantes (Cruz-Narváez y Rico-Arzate, 2018).

Los resultados han sido favorables; por ejemplo, se realizó un estudio en 2011 sobre la biodegradación de permetrina y cipermetrina en concentraciones de 50 y 100 mg/L mediante el uso de cepas de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium violaceum* y *Burkholderia cepacia* en reactores por lotes. Se observó que las cepas de *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas mendocina* presentaron una destacada capacidad de biodegradación: tanto la cinética de crecimiento como los espectros de infrarrojo revelaron una mayor capacidad de mineralización para la permetrina en comparación con la cipermetrina, por lo que estas bacterias podrían ser utilizadas en procesos de biodegradación (Mendoza et al., 2011).



### **1.1.2. FUNGUICIDAS**

Un funguicida es una sustancia utilizada para combatir enfermedades causadas por hongos al inhibir o eliminar el hongo responsable de la enfermedad. Sin embargo, no todos los trastornos fúngicos pueden ser adecuadamente controlados mediante el uso de funguicidas. Por ejemplo, enfermedades vasculares como los marchitamientos ocasionados por los géneros *Fusarium spp* y *Verticillium spp* no pueden ser combatidos eficazmente con estos productos. Además, los funguicidas no son efectivos contra enfermedades ocasionadas por otros tipos de organismos, trastornos causados por factores no biológicos y daños provocados por insectos. Por tanto, es crucial determinar la causa de los síntomas antes de aplicar un funguicida (McGrath, 2004).

### **APLICACIÓN DE LOS FUNGUICIDAS**

Los funguicidas se utilizan en diversas formas, como polvos, gránulos, gases y, principalmente, líquidos. Se aplican de diferentes maneras (McGrath, 2004):

- A) En semillas, bulbos, raíces de plántulas y otros órganos de propagación. Estos tratamientos suelen ser realizados por empresas de semillas o por los cultivadores al momento de la siembra. El objetivo es eliminar los patógenos presentes en el material de siembra o proteger a las plántulas de los patógenos presentes en el suelo (McGrath, 2004).
- B) En el suelo, ya sea en el surco de siembra durante la plantación, después de la plantación mediante el riego con una solución funguicida (incluido el riego por goteo) o mediante pulverización directa alrededor de la base de la planta (McGrath, 2004).
- C) En el follaje y otras partes aéreas de la planta mediante aspersion (McGrath, 2004).

D) En el interior de los árboles mediante inyección en el tronco (McGrath, 2004).

E) En espacios cerrados como invernaderos y suelos cubiertos. Los funguicidas también pueden ser llamados fumigantes cuando actúan en forma gaseosa. Algunos fumigantes también son efectivos contra nematodos, insectos y semillas de malezas (McGrath, 2004).

F) En productos cosechados, mediante inmersión o pulverización en las empacadoras (McGrath, 2004).

Los funguicidas se presentan como productos formulados que consisten en un ingrediente activo junto con ingredientes inertes que mejoran su acción. Por lo general, se mezclan con agua y se aplican mediante aspersión. Existen diferentes tipos de equipos de aplicación, desde aspersores manuales y de mochila hasta grandes unidades de aspersión acopladas a tractores o aeronaves. Aquellos funguicidas que se presentan en forma de polvo también se pueden aplicar en invernaderos mediante humo, vapor, nebulización o aerosol (Melgarejo García, 2011).

Es importante lograr una cobertura adecuada en todas las partes susceptibles de la planta, ya que pocos funguicidas pueden moverse eficientemente a través de ella. Se realizan constantes avances en el desarrollo de boquillas y aspersores para mejorar la cobertura (McGrath, 2004).

Para muchas enfermedades, se requiere un control efectivo mediante múltiples aplicaciones, a veces tan frecuentes como cada cinco días. Estas aplicaciones repetidas son necesarias para proteger los nuevos crecimientos y compensar la pérdida del funguicida en la planta debido a la degradación química, la descomposición por la luz ultravioleta y su eliminación por el viento y el agua (McGrath, 2004).

## TIPOS DE FUNGUICIDAS

Los funguicidas pueden categorizarse de varias maneras dependiendo de la característica a considerar, algunas de las categorías se mencionan a continuación (Greg Forbes, 2003):

**1. Movilidad en la planta:** Los funguicidas pueden ser de contacto o sistémicos. Los de contacto permanecen en la superficie de la planta, mientras que los sistémicos son absorbidos y se mueven a través de la planta. Algunos sistémicos se desplazan a corta distancia, otros se mueven a través del tejido xilemático (movimiento xilemático) o del floema (movimiento floemático) (Greg Forbes, 2003).

**2. Función de protección:** Los funguicidas pueden ser preventivos o curativos. Los de contacto se utilizan principalmente de forma preventiva, actuando en la superficie de la planta. Algunos funguicidas sistémicos tienen tanto acción preventiva como curativa, pudiendo afectar al patógeno después de la infección (Greg Forbes, 2003).

**3. Rango de actividad:** Los funguicidas pueden tener un punto de acción específico en el patógeno o afectar múltiples puntos. Los de punto de acción único son más específicos y tienen menos efecto en otros organismos. Los de múltiple punto de acción suelen afectar a diferentes clases de hongos (Greg Forbes, 2003).

**4. Modo de acción:** Los funguicidas pueden dañar la membrana celular del hongo, inactivar enzimas o proteínas esenciales, interferir con procesos metabólicos o afectar la producción de esteroides o quitina. Algunos funguicidas también pueden inducir la resistencia sistémica adquirida en la planta huésped, activando sus mecanismos de defensa. Es importante comprender el modo de acción de los funguicidas para seleccionar el producto adecuado. Esto determina qué hongos se verán afectados y qué enfermedades pueden ser controladas. Además, se necesitan funguicidas con diferentes modos de acción para evitar el desarrollo de resistencia (Greg Forbes, 2003).

**5. Grupo químico:** Considera si los funguicidas son de tipo orgánico o inorgánico (Greg Forbes, 2003).

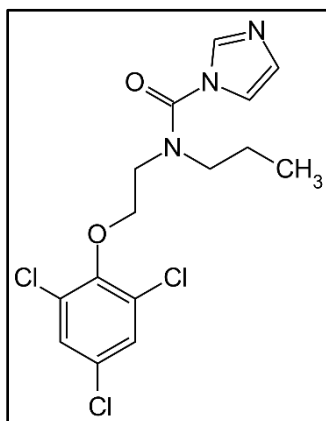
## **PROBLEMÁTICA**

La problemática asociada con los fungicidas radica en su toxicidad para los seres vivos expuestos a ellos, no limitándose únicamente a los organismos del reino fungi que se busca eliminar. Estos productos químicos tienen un impacto a corto plazo en el entorno cercano a la aplicación, resultando en la contaminación inmediata de elementos no vivos como suelos, aguas superficiales y subterráneas, así como el aire. Además, causan la muerte de diversos organismos sensibles que no eran el objetivo deseado, como insectos que son enemigos naturales de las plagas o aquellos considerados beneficiosos por los humanos. En el corto plazo, los pesticidas también provocan la muerte de organismos susceptibles que forman parte de la plaga, perturbando temporalmente el equilibrio fisiológico de todos los organismos expuestos, incluyendo a los seres humanos (González et al., s. f.). Además, poseen la capacidad de eliminar o afectar el número y las funciones de diversos organismos del suelo no deseados, lo que resulta en la disminución de la diversidad microbiana y posiblemente en la reducción de la fertilidad del suelo (Núñez-Zofío et al., 2011).

### **1.1.3. EL PROCLORAZ**

El procloraz es un fungicida de tipo imidazol de amplio espectro utilizado para controlar enfermedades foliares causadas por ciertos tipos de hongos como *Ascomycota* y *Fungi imperfecti* en cultivos como el trigo u ornamentales. Actúa inhibiendo la producción de ergosterol, un componente importante en los hongos, lo que resulta en su muerte. El procloraz tiene una alta toxicidad selectiva debido a su estructura química única (Figura 1.3). Sin embargo, todavía hay incertidumbre sobre cómo los hongos pueden ser naturalmente insensibles a este fungicida o desarrollar resistencia a través de mecanismos de

desintoxicación (Bock et al., 1996). Las características y propiedades del procloraz se presentan en la Tabla 1.1.



**Figura 1.3.** Estructura molecular del procloraz ( $C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$ ) (Obianom & Sivakumar, 2018).

**Tabla 1.1.** Características y propiedades del procloraz (FMC, 2017).

Nombre comercial	Procloraz
Nombre IUPAC	N-propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi)-etil]imidazol-1-carboxamida
CAS	67747-09-5
Código SMILES	<chem>CCCN(CCOc1c(Cl)cc(Cl)cc1Cl)C(=O)n1ccnc1</chem>
Masa molar	376.67 g/mol
Fórmula química	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$
Familia	Imidazol
DT <sub>50</sub> oral	1715 mg/kg (rata)
<b>Indicaciones de peligro CLP:</b> H302 - Nocivo en caso de ingestión H315 - Provoca irritación cutánea H319 - Provoca irritación ocular grave	

H370 - Provoca daños en los órganos

H410 - Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos

El procloraz Sportak físicamente es un líquido de color blanco y espeso, además contiene el solvente, dispersantes y un emulsificante, estos representan el 57.90% del producto (tabla 1.2) y en el envase del producto se identifican como “inertes” (Figura 1.3).

**Tabla 1.2.** Composición del procloraz comercial Sportak.

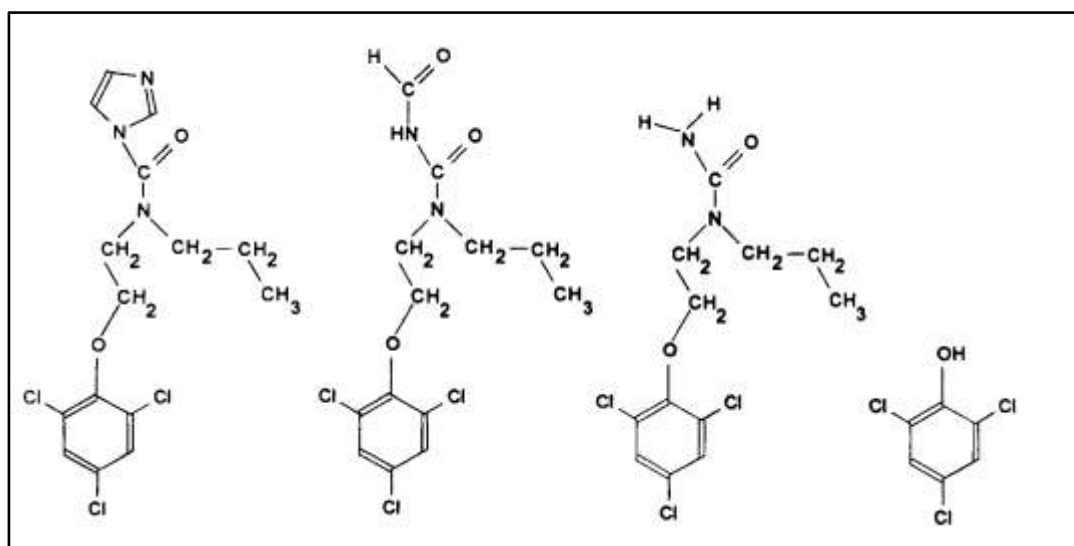
Ingrediente	Composición porcentual
42.10%	Procloraz equivalente a 450 g/L a 20°C (ingrediente activo).
57.90%	Solvente, dispersantes y emulsificante (ingredientes inertes).
<b>Total: 100%</b>	



**Figura 1.4.** Procloraz comercial de la marca Sportak.

Al igual que otros compuestos utilizados en aplicaciones foliares, el procloraz debe cumplir dos requisitos: mantenerse estable en el cultivo y degradarse rápidamente cuando llega al

suelo. Sin embargo, se degrada lentamente en el suelo, y se han identificado varios pasos enzimáticos necesarios para su completa degradación. De acuerdo con un artículo publicado en 1996, dos reacciones importantes en este proceso son la apertura del anillo de imidazol, que resulta en la pérdida de actividad antifúngica, y la degradación del 2,4,6-triclorofenol (TCP). Se realizaron estudios en bacterias aisladas de suelo contaminado con procloraz para investigar estos pasos de degradación. De acuerdo con la Figura 1.5, el 2,4,6-triclorofenol (TCP), es el compuesto final de biodegradación (Bock et al., 1996). Las propiedades y características del TCP se muestran en la Tabla 1.3.



**Figura 1.5.** Estructura molecular del procloraz y algunos de sus productos de biodegradación (Bock et al., 1996).

**Tabla 1.3.** Propiedades y características del TCP.

<b>Nombre IUPAC</b>	2,4,6-Triclorofenol
<b>CAS</b>	88-06-2
<b>Código SMILES</b>	<chem>Oc1c(Cl)cc(Cl)cc1Cl</chem>
<b>Masa molar</b>	197.45 g/mol
<b>Fórmula química</b>	$C_6H_3Cl_3O$

<b>DT<sub>50</sub> oral</b>	820 mg/kg (rata)
<b>Indicaciones de peligro CLP:</b> H351 - Se sospecha que provoca cáncer. H302 - Nocivo en caso de ingestión. H315 - Provoca irritación cutánea. H319 - Provoca irritación ocular grave. H410 - Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.	

Las herramientas tecnológicas actuales permiten encontrar al alcance de unos clicks las posibles rutas de biodegradación que un compuesto orgánico puede sufrir. Una de ellas es la herramienta EAWAG-BBD: Pathway Prediction, que predice trayectorias plausibles para la degradación microbiana de compuestos químicos. Las predicciones se basan en reglas de biotransformación, derivadas de reacciones encontradas en la base de datos EAWAG-BBD o en la literatura científica. Se asumen biotransformaciones aeróbicas en las siguientes condiciones: exposición al aire húmedo, en suelo húmedo o agua, pH neutro, 25 °C y sin presencia de otros compuestos competidores o tóxicos (EAWAG, 2019). La Figura 1.6 muestra todas las rutas posibles de biodegradación y los metabolitos involucrados.





La problemática con el procloraz es debida al grupo imidazol presente en su estructura, que puede reaccionar con enzimas distintas a las de los hongos, incluyendo algunas enzimas clave implicadas en la biosíntesis y metabolismo de esteroides en vertebrados; también actúa como disruptor endócrino, es decir, que puede alterar el equilibrio hormonal y factores de transcripción que regulan la expresión genética (Kojima et al., 2004). Sin olvidar que los productos de degradación de este también representan algún peligro, como el TCP, que comparando las Tablas 1.1 y 1.3, este presenta una menor dosis letal media que la del procloraz, en otras palabras, se requiere menor cantidad de este para que un organismo presente efectos tóxicos (ver el glosario el término **Dosis Letal Media DT<sub>50</sub>**).

Existen cultivos que requieren de fungicidas como el procloraz para el control de plagas de hongos; el trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de ellos el cual cuando se siembra bajo condiciones de temporal se ve afectado por hongos que provocan manchas y tizones foliares, llegando a reducir el rendimiento de la cosecha hasta en un 60%. Dado que no hay disponibles materiales resistentes a estas enfermedades y las variedades actuales sembradas bajo estas condiciones sufren pérdidas de rendimiento, se recurre al control químico como una alternativa complementaria en este cultivo (Mariscal-Amaro et al., 2020). Nótese que el trigo es uno de los cultivos mencionados en la etiqueta del procloraz marca Sportak (Figura 1.4).

Después de llevar a cabo estos estudios, surgió una preocupación generalizada acerca del uso extendido de procloraz como fungicida en numerosos países. Aunque aún no se ha establecido una conexión causal entre la exposición a pesticidas y trastornos reproductivos en humanos, existen investigaciones que indican una mayor incidencia de criptorquidia (un trastorno testicular) en hijos de mujeres embarazadas dedicadas a la jardinería (Weidner et al., 1998). Incluso se ha observado una menor fertilidad en mujeres que trabajan en invernaderos, lo que ha llevado a la recomendación de reducir su uso como medida para disminuir el riesgo de exposición humana (Rosano et al., 2009).

## 1.2. NORMATIVIDAD DE LOS PLAGUICIDAS EN MÉXICO

En México, la normatividad de plaguicidas está regida por diversas leyes y regulaciones con el objetivo de proteger la salud humana, el medio ambiente y garantizar la seguridad alimentaria. La autoridad responsable de su regulación y control es la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), organismos que además proporcionan guías para las buenas prácticas con plaguicidas (SADER, 2019).

La normatividad mexicana establece requisitos estrictos para la fabricación, importación, distribución, comercialización y uso de plaguicidas. Se requiere la obtención de registros y autorizaciones previas por parte de las empresas que deseen comercializar estos productos. Estos registros son otorgados después de evaluar la toxicidad, eficacia y riesgos asociados con su uso (SADER, 2019). Algunas normas en materia de plaguicidas son las siguientes:

- **NORMA Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009**, Plaguicidas: que establece los requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos grado técnico y para uso agrícola, forestal, pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico (NOM, 2009).
- **PROY-NOM-003-STPS-2016**, Actividades agrícolas-Condiciones de seguridad y salud en el trabajo (DOF, 2016).
- **NORMA Oficial Mexicana NOM-044-SSA1-1993**. Envase y embalaje. Requisitos para contener plaguicidas (DOF, 1993).

Es importante destacar que México ha adoptado convenios y acuerdos internacionales relacionados con el uso seguro de plaguicidas, como el Convenio de Róterdam sobre el procedimiento de consentimiento fundamentado previo para ciertos plaguicidas y productos químicos peligrosos objeto de comercio internacional. Esto pretende garantizar que los

plaguicidas importados y exportados cumplan con los requisitos establecidos a nivel internacional (SADER, 2019).

Por otro lado, existen ciertos plaguicidas que están prohibidos en México, como el ácido 2,4,5-T, el dieldrín, el fumisel, el nitrofen, el BHC y el sulfato de talio. Otros plaguicidas sólo tienen uso restringido como el 1,3-dicloropropeno, el aldicarb, el clordano, el fosfuro de aluminio, el pentaclorofenol y el quintozeno, estos requieren de un permiso y de una manipulación estricta conforme a la normatividad vigente (*Catálogo Oficial de Plaguicidas*, 1996).

Otro grupo de plaguicidas son aquellos que están permitidos en México; no obstante se encuentran prohibidos en otras zonas del mundo, estos se presentan en la Tabla 1.4 (Omar Arellano Aguilar & Jaime Rendón von Osten, 2016). Cabe destacar que el procloraz no se encuentra en ninguno de estos grupos y está permitido en nuestro país.

**Tabla 1.4.** Lista de plaguicidas permitidos en México y prohibidos en otros países (Omar Arellano Aguilar & Jaime Rendón von Osten, 2016).

<b>Plaguicida</b>	<b>Tipo</b>	<b>Países en donde está prohibido</b>
2,4-D	Herbicida	Dinamarca, BÉlice, Noruega y Suecia
Captafol	Fungicida	Argentina, Alemania, Colombia, Hungría, Nueva Zelanda, Noruega, Holanda, Honduras y USA.
Captan	Fungicida	Finlancia, considerado como cancerígeno por el gobierno de California, USA.
Carbofuran	Insecticida	Unión Europea
Maneb	Fungicida	Colombia
Quintozeno (en México está restringido)	Fungicida	Unión Europea
Tridemorf	Fungicida	Unión Europea
Glifosato	Herbicida	Francia, Holanda, El Salvador, Sri Lanka, Bélgica y Dinamarca

### **1.3. LA BIORREMEDIACIÓN DE PLAGUICIDAS COMO ESTRATEGIA DE DESCONTAMINACIÓN**

#### **1.3.1. ESTUDIO DEL ARTE**

El diseño experimental del presente trabajo tomó como base trabajos previos que se han realizado en el tema de biodegradación desde que esta entró en auge con los experimentos en hidrocarburos (Cruz-Narváez y Rico-Arzate, 2018). Como se mencionó en el capítulo anterior, ya se han realizado trabajos de biodegradación con moléculas de permetrina y cipermetrina con buenos resultados. El trabajo se realizó a través de un biorreactor de tipo Batch usando la metodología de la técnica de espectroscopía infrarroja para estudiar su degradación (Mendoza et al., 2011).

En dicho trabajo se realizaron aislamientos bacterianos a partir de suelos contaminados por hidrocarburos en el municipio de Acatzingo, Puebla. Estas bacterias fueron identificadas utilizando el sistema APINE-20 y se mantuvieron a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización (Mendoza et al., 2011).

Se identificaron las cepas de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mendocina*, *Chromobacterium violaceum* y *Burkholderia cepacia*, se propagaron en un medio mínimo mineral compuesto por 3 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.25 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mg de NaCl, 100 mg de  $\text{MgSO}_4$ , 1 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 200 mg de EDTA por litro de medio. El cultivo se llevó a cabo a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. Posteriormente, se realizó un ajuste espectrofotométrico para obtener una absorbancia de 0.2 A a una longitud de onda de 600 nm, lo cual corresponde aproximadamente a una concentración de  $1 \times 10^6$  bacterias por mililitro (Mendoza et al., 2011).

Los reactores biológicos se prepararon utilizando matraces redondos de 1000 mL, cada uno con 500 mL de medio mínimo mineral. Se agregó el plaguicida (permetrina o cipermetrina)

a concentraciones de 50 o 100 mg/L, junto con una concentración bacteriana de  $1 \times 10^5$  bacterias/mL. Para cada bacteria se utilizó un reactor individual, mientras que el consorcio bacteriano consistió en una mezcla de cada una de las cepas en proporciones iguales. Cada experimento se realizó por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados (Mendoza et al., 2011).

Una vez preparados, los reactores se incubaron a una temperatura de 25°C con agitación constante a 90 rpm. Esta condición de agitación permitió una distribución uniforme de las bacterias en el medio y promovió la interacción entre los microorganismos y el plaguicida (Mendoza et al., 2011).

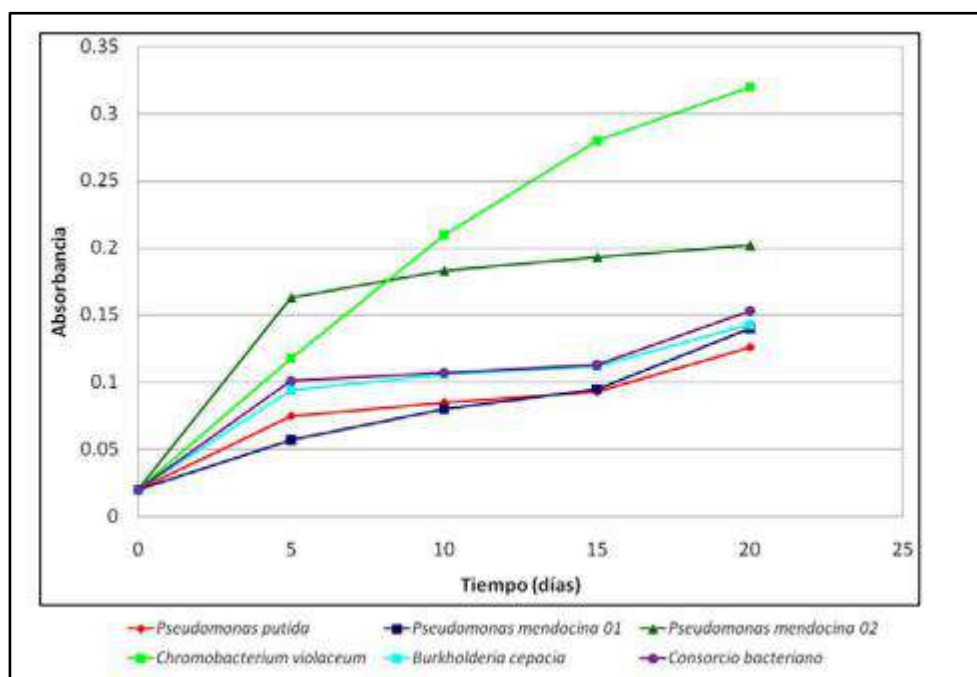
Durante un período de 20 días, se tomaron muestras de 5 mL cada 5 días para realizar el seguimiento del proceso de biodegradación. Estas muestras se sometieron a centrifugación a 15,000 rpm durante 30 minutos, lo que permitió separar el paquete celular formado por las bacterias del líquido sobrenadante (Mendoza et al., 2011).

El sobrenadante obtenido fue sometido a análisis mediante espectrofotometría UV/Vis para determinar el porcentaje de biodegradación logrado por cada cepa en presencia de los diferentes plaguicidas. Para el análisis de los plaguicidas permetrina y cipermetrina, las lecturas espectrofotométricas se realizaron a una longitud de onda de 220.5 nm y 219.1 nm, respectivamente. Estas longitudes de onda específicas permitieron cuantificar la cantidad de plaguicida degradado en las muestras. Cabe destacar que todas las determinaciones mencionadas se llevaron a cabo por triplicado, lo que garantizó la precisión y reproducibilidad de los resultados obtenidos en el estudio (Mendoza et al., 2011).

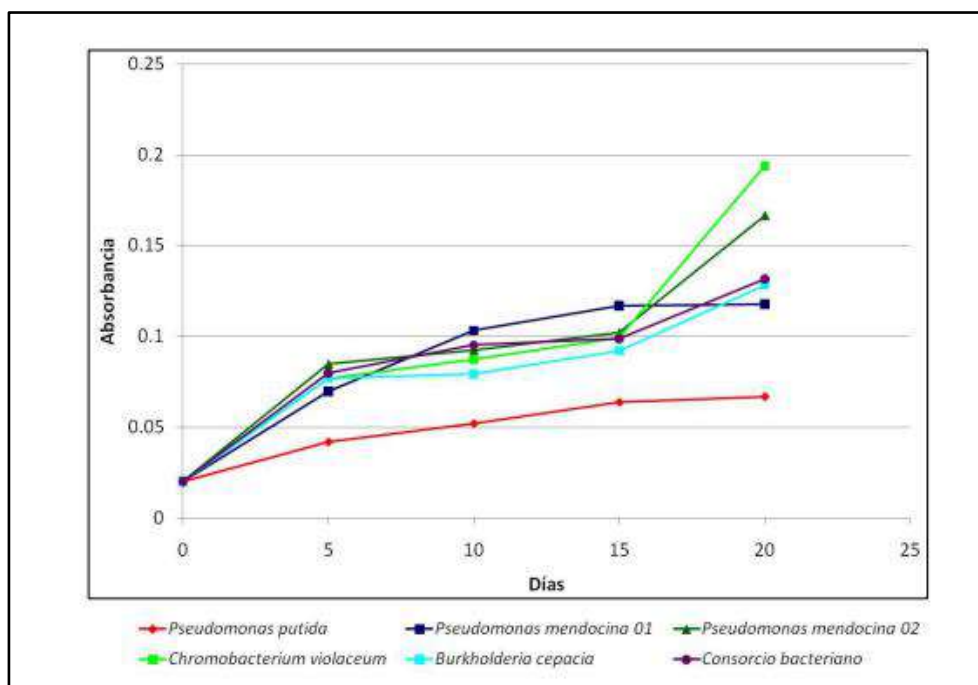
Para cuantificar el crecimiento bacteriano, el paquete celular obtenido después de la centrifugación se resuspendió en 10 mL de medio mínimo mineral. A continuación, se determinó la absorbancia de esta suspensión utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. La absorbancia a 600 nm es una medida comúnmente utilizada como indicador indirecto del crecimiento bacteriano, ya que está relacionada con la densidad celular (Mendoza et al., 2011).

Además, para observar la biodegradación de los plaguicidas en el sobrenadante, se realizó un barrido en el rango de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  utilizando el sistema ATR (Reflectancia Total Atenuada) del espectrofotómetro de Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR), específicamente el modelo Spectrum One de Perkin Elmer. El FTIR es una técnica que permite analizar la composición química de las muestras mediante la medición de la absorción de radiación infrarroja por parte de los diferentes componentes presentes. En este caso, el análisis FTIR se utilizó para observar los cambios en los espectros infrarrojos del sobrenadante y así evaluar la biodegradación de los plaguicidas (Mendoza et al., 2011).

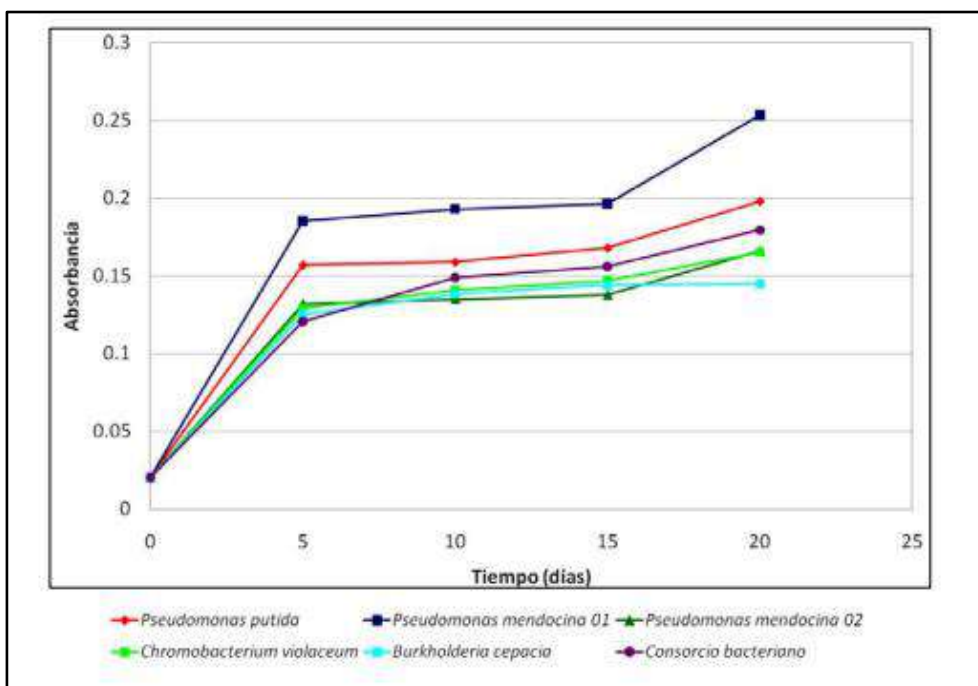
Estas técnicas fueron empleadas con el objetivo de cuantificar el crecimiento bacteriano y evaluar la biodegradación de los plaguicidas en el estudio. Con resultados satisfactorios, pues la cinética de biodegradación proporciona una evidencia del potencial de mineralización de las bacterias Mendoza et al., 2011). Las Figuras 1.7 a 1.10 muestran el crecimiento bacteriano medido durante la biodegradación de la permetrina y la cipermetrina a dos concentraciones, 50 y 100 mg/L.



**Figura 1.7.** Crecimiento bacteriano durante la biodegradación del plaguicida permetrina a 50 mg/L (Mendoza et al., 2011).

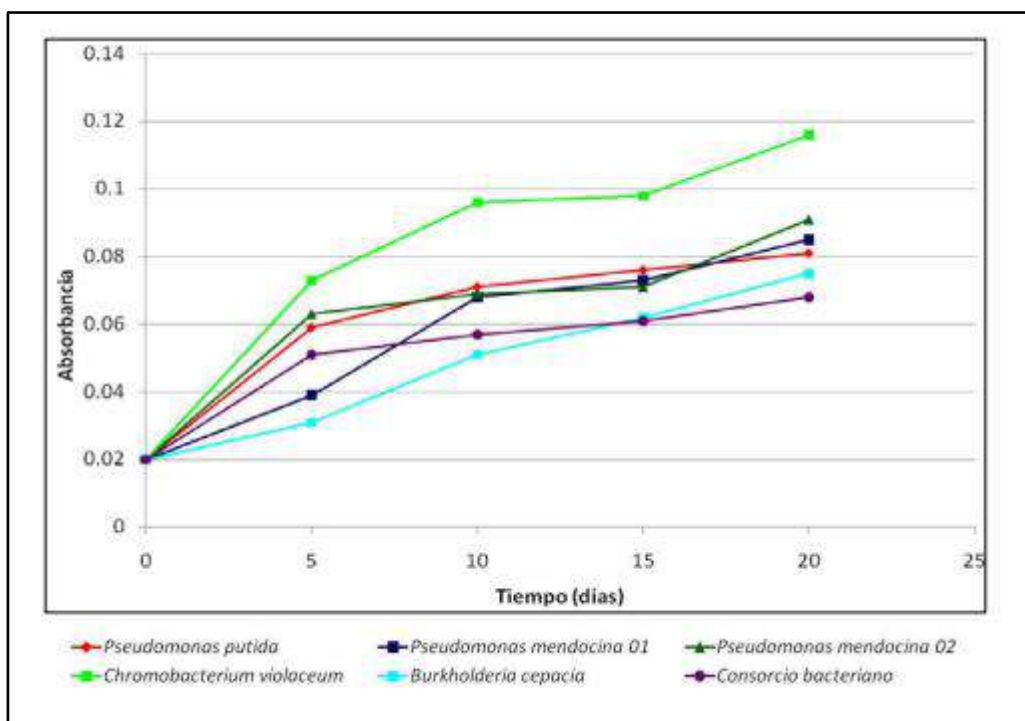


**Figura 1.8.** Crecimiento bacteriano durante la biodegradación del plaguicida permetrina a 100 mg/L (Mendoza et al., 2011).



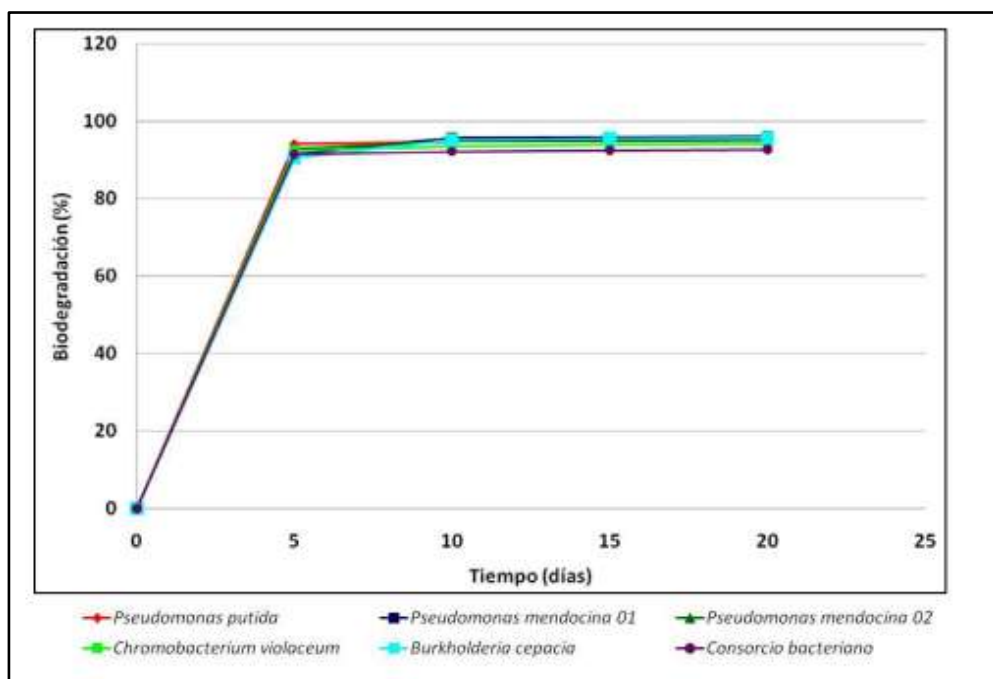
**Figura 1.9.** Crecimiento bacteriano durante la biodegradación del plaguicida cipermetrina a 50 mg/L (Mendoza et al., 2011).



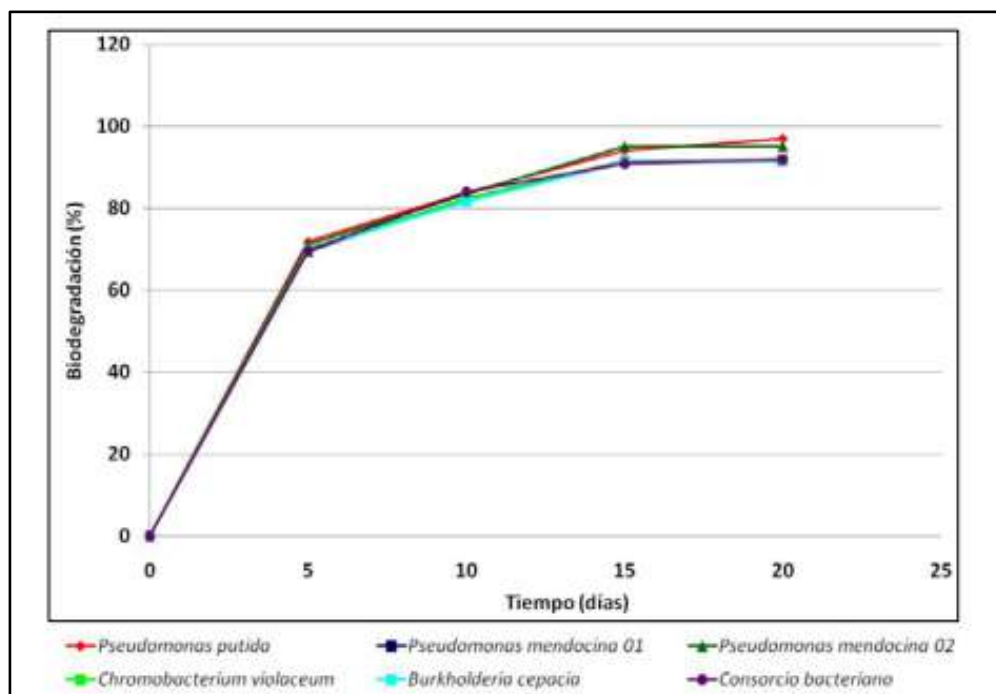


**Figura 1.10.** Crecimiento bacteriano durante la biodegradación del plaguicida cipermetrina a 100 mg/L (Mendoza et al., 2011).

Para la cinética de biodegradación, se puede observar que, para una concentración de 50 mg/L de permetrina, el porcentaje de biodegradación a los 5 días oscila entre un mínimo del 90% realizado por *Burkholderia cepacia* y un máximo del 94% logrado por *Pseudomonas putida*. A partir de ese punto, el porcentaje de biodegradación se mantiene prácticamente constante. A los 20 días, la biodegradación alcanza un 96% para *Pseudomonas mendocina 01*, un 95.6% para *Burkholderia cepacia*, un 95.1% tanto para *Pseudomonas putida* como para *Pseudomonas mendocina 02*, un 94% para *Chromobacterium violaceum* y un 92.6% para el consorcio formado por todas las bacterias evaluadas (Mendoza et al., 2011). La Figura 1.11 muestra los resultados obtenidos, mientras que la Figura 1.12 muestra los resultados obtenidos para la muestra a una concentración de 100 mg/L, se trata de un proceso más lento, pero con un mayor porcentaje de biodegradación (Mendoza et al., 2011).



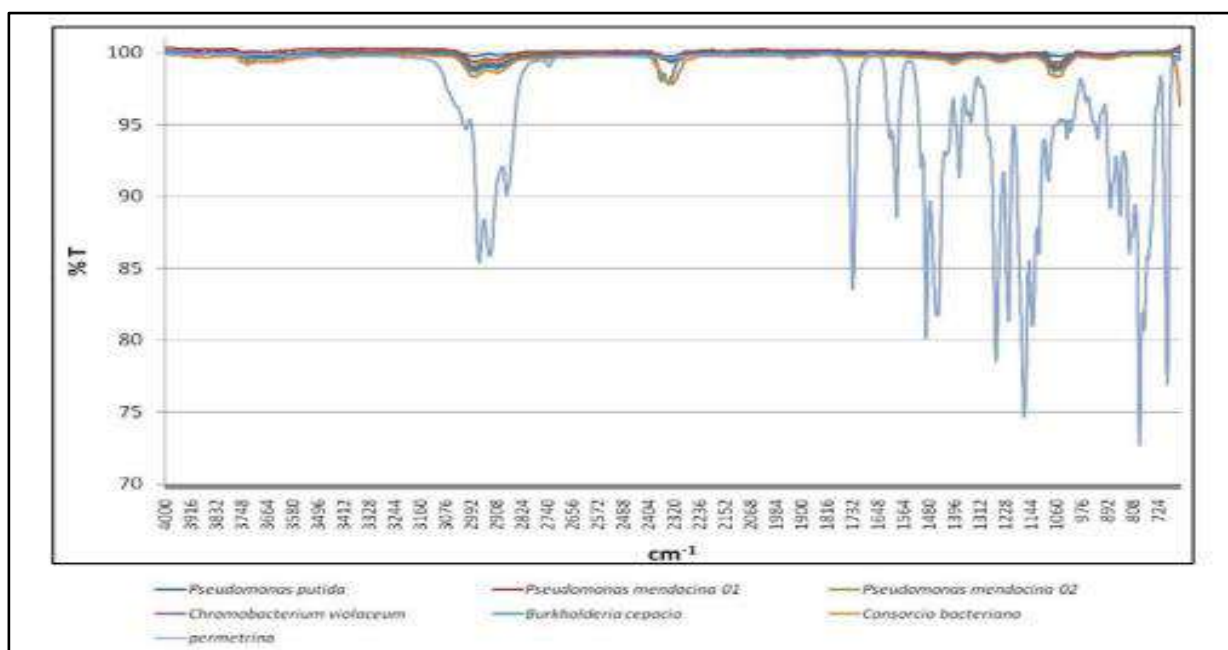
**Figura 1.11.** Porcentaje de biodegradación del plaguicida permetrina a 50 mg/L mediante espectrofotometría UV-Vis (Mendoza et al., 2011).



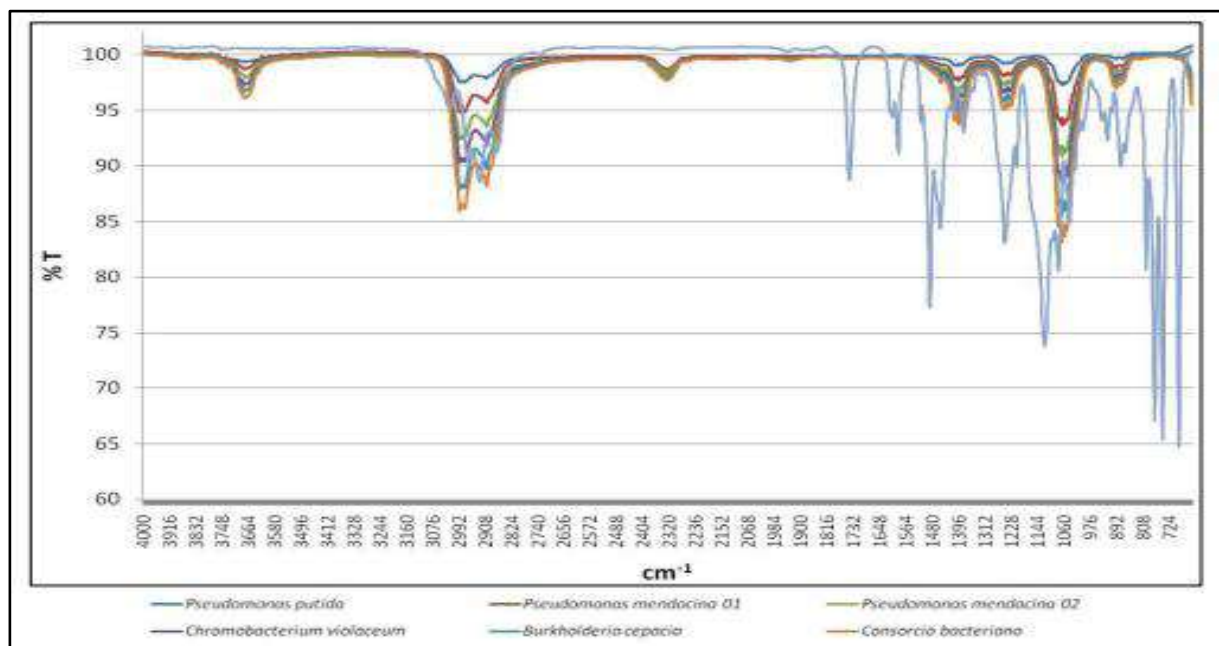
**Figura 1.12.** Porcentaje de biodegradación del plaguicida permetrina a 100 mg/L mediante espectrofotometría UV-Vis (Mendoza et al., 2011).

El análisis de los espectros infrarrojos de la biodegradación de los plaguicidas permetrina y cipermetrina proporciona una confirmación de la capacidad de mineralización de las bacterias, ya que se observa una disminución considerable en la presencia de diferentes grupos aromáticos, los cuales son transformados en grupos alifáticos más simples. Específicamente, las bacterias *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas mendocina* demostraron un desempeño destacado, ya que los picos de absorción correspondientes a todos los grupos funcionales prácticamente desaparecieron (Mendoza et al., 2011).

Los grupos alcalinos, que absorben en la región de 2855-2990, y los aril-éter, presentes en la región de 1075-1140, fueron los menos degradados. Además, se observaron picos en la región de 2330, indicando la presencia de una fuerza de tensión relacionada con el enlace C=O. Todos estos resultados evidencian un proceso exitoso de mineralización de la permetrina por parte de las bacterias, con una reducción significativa en la presencia de los compuestos originales (Mendoza et al., 2011). En las Figuras 1.13 y 1.14 se muestran los espectros IR obtenidos para ambos plaguicidas; aunque cabe destacar que en el presente proyecto el seguimiento del proceso de mineralización del procloraz se llevó a cabo mediante Carbono Orgánico Total (COT).



**Figura 1.13.** Espectros de biodegradación del plaguicida permetrina a 100 mg/L mediante espectrofotometría IR (Mendoza et al., 2011).



**Figura 1.14.** Espectros de biodegradación del plaguicida cipermetrina a 100 mg/L mediante espectrofotometría IR (Mendoza et al., 2011).

Otro trabajo experimental analizó la capacidad de grupos de microorganismos, obtenidos del ecosistema de bosque de niebla en México, para la degradación de compuestos aromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y antraceno). Para obtener las muestras de microbiomas, se realizó una recolección en la Sierra Madre del Sur, ubicada en el estado de Oaxaca. Durante esta recolección, se obtuvieron diversas muestras ambientales que contenían microorganismos. Estos microorganismos fueron aislados y posteriormente identificados utilizando técnicas moleculares, lo que permitió determinar las especies y cepas presentes en las muestras (Cruz-Narváez et al., 2018).

Una vez identificados, se procedió a evaluar la capacidad de estos microorganismos para degradar hidrocarburos aromáticos. Para realizar esta evaluación, se utilizó un biorreactor de lecho empacado, una configuración que permite el crecimiento y la actividad de los microorganismos en un medio controlado. En este caso, se enfocó específicamente en la degradación de hidrocarburos aromáticos (Cruz-Narváez et al., 2018).

La evaluación cuantitativa de la capacidad de degradación se llevó a cabo utilizando cromatografía de alta resolución acoplada a un detector de matriz de fotodiodo (HPLC-PDA). Esta técnica permite separar y detectar los compuestos presentes en las muestras, incluyendo los hidrocarburos aromáticos y sus productos de degradación. El uso del detector de matriz de fotodiodo (PDA) permitió una detección sensible y selectiva de los compuestos de interés (Cruz-Narváez et al., 2018).

Para la experimentación se diseñó y construyó un biorreactor utilizando un tubo de borosilicato con un diámetro de 10 cm y una longitud de 70 cm. Este biorreactor se configuró en un modo isotérmico, lo que significa que se mantuvo a una temperatura constante durante todo el experimento (Cruz-Narváez et al., 2018).

Para crear el lecho fijo en el biorreactor, se utilizó fibra de algodón estéril de alta calidad. Esta fibra se seleccionó cuidadosamente para garantizar que estuviera libre de aditivos y cumpliera con los estándares farmacéuticos, lo que aseguraba la pureza del sistema y evitaba cualquier interferencia no deseada en los procesos de degradación (Cruz-Narváez et al., 2018).

El flujo continuo en el biorreactor se mantuvo mediante el uso de una bomba dosificadora de diafragma de alta precisión de la marca Seko, procedente de los Estados Unidos. Esta bomba permitía ajustar el flujo en un rango del 0 al 100%, lo que brindaba un control preciso sobre el gasto volumétrico. La capacidad de la bomba era de permitir un gasto volumétrico de 500 mL/min, asegurando así un suministro constante de sustrato y condiciones óptimas para la actividad de los microorganismos (Cruz-Narváez et al., 2018).

En el proceso de biodegradación de estos hidrocarburos, la concentración de contaminantes disminuyó 97 % y se produjo mineralización de 91 % en un tiempo menor de 25 h. Estos microorganismos mostraron actividad degradadora sobre compuestos aromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y antraceno) que constituyen los combustibles hidrocarbonados, hasta su mineralización. Esta metodología demostró la actividad degradadora en los compuestos aromáticos. La biodiversidad en el bosque de niebla en la región Loxicha fue clave para garantizar una mejor biodegradación (Cruz-Narváez et al., 2018).

### 1.3.2. MODELOS CINÉTICOS

Normalmente los modelos cinéticos se expresan mediante la ley de velocidad. Esta indica la ecuación que relaciona la velocidad con las concentraciones de las especies químicas involucradas en la velocidad de reacción; la ley de potencias indica el efecto de los exponentes a los que se potencian las concentraciones como se mencionan a continuación (Fogler, 2001):

- Orden cero. Elevar cualquier número a la cero, es uno. Por lo que una concentración con este exponente, indica que dicho reactivo no contribuye a la velocidad de reacción.
- Primer orden. El cambio en la concentración de una especie tiene un efecto lineal sobre la rapidez de reacción.

Para la obtención del modelo lineal que se empleará en el Capítulo 3, se parte de la siguiente ecuación de velocidad:

$$-\frac{dC}{dt} = kC^n \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

$C$ . Concentración del contaminante procloraz (mg/L, g/L, mol/L, equivalentes/L, etc.).

$t$ . Tiempo de reacción (segundos, minutos, horas, etc.).

$k$ . Constante cinética ( $C^{1-n}$ /tiempo).

$n$ . Orden de reacción (adimensional).

Dado que  $n = 1$ , la Ecuación 1 se simplifica de la siguiente manera:

$$-\frac{dC}{dt} = kC \quad (Ec. 2)$$

Reordenando y resolviendo la ecuación diferencial mediante integración por variables separables, estableciendo como límites de integración

$$\frac{dC}{C} = -kdt \quad (Ec. 3)$$

$$\int_{C_0}^C \frac{dC}{C} = -k \int_0^t dt$$

$$\ln C - \ln C_0 = -kt \quad (Ec. 4)$$

Al reorganizar la Ecuación 4 se obtiene la forma de una ecuación de la línea recta:

$$\ln C = -kt + \ln C_0 \quad (Ec. 5)$$

$$y = mx + b \quad (Ec. 6)$$

En donde:

$$y = \ln C$$

$$m = -k$$

$$x = t$$

$$b = \ln C_0$$

- Segundo orden. El cambio en la concentración de una especie tiene un efecto cuadrático sobre la rapidez de reacción, o bien, que la velocidad tenga dependencia lineal de dos especies.

En las reacciones con microorganismos en las que intervienen procesos enzimáticos más complejos, se requieren de otros modelos para expresar la cinética, estos dependen de la cantidad de células presentes ( $C_c$ ) y del sustrato que limita su crecimiento ( $C_s$ ). Algunos de estos modelos se expresan en la Tabla 1.5 (Trejos et al., 2009).

**Tabla 1.5.** Comparación de modelos cinéticos, en su forma  $\mu$  (Trejos et al., 2009).

Modelo	Monod (Ec.7)	Teissier (Ec.8)	Moser (Ec.9)	Haldane (Ec.10)	Hinshelwood (Ec.11)
Ecuación de crecimiento celular	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{C_s}{K_m + C_s}$	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} (1 - e^{-C_s/K_m})$	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{C_s^n}{K_m + C_s^n}$	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{C_s}{K_m + C_s + K_1 C_s^2}$	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{C_s}{K_m + C_s} (1 - K_p P)$

El modelo más popular y el más simple pues es el que menos parámetros maneja, es el modelo de Monod. En su forma C vs velocidad tiene la siguiente expresión (Fogler 2001):

$$r_g = \mu_{m\acute{a}x} * \frac{C_c * C_s}{K_s + C_s} \quad (Ec. 12)$$

Donde:

$r_g$ . Velocidad de crecimiento celular (Cc/tiempo).

$\mu$ . Tasa de crecimiento específica de los microorganismos (tiempo<sup>-1</sup>).

$\mu_{m\acute{a}x}$ . Tasa de crecimiento específica máxima de los microorganismos (tiempo<sup>-1</sup>).

$K_s$ . Constante de Monod (Cs).

$C_c$ . Concentración de células (masa, mg/L, mg, etc.).

$C_s$ . Concentración del sustrato (masa, mg/L, mg, etc.).

La Ecuación 6 se puede linealizar de la siguiente manera, una ecuación linealizada es más práctica de usar para graficar datos cinéticos. El primer paso es elevar toda la Ecuación 12 a la potencia -1, invirtiendo los términos (Ec. 13).



$$(rg = \mu_{\max} * \frac{Cc * Cs}{Ks + Cs})^{-1}$$

$$\frac{1}{rg} = \frac{1}{\mu_{\max}} * \frac{Ks + Cs}{Cc * Cs} \quad (Ec. 13)$$

El último término de la Ecuación 7 puede separarse como una suma de fracciones, obsérvese que en el segundo término de esta suma Cs puede eliminarse de la ecuación (Ec.14).

$$\frac{1}{rg} = \frac{1}{\mu_{\max}} * \left( \frac{Ks}{Cc * Cs} + \frac{Cs}{Cc * Cs} \right)$$

$$\frac{1}{rg} = \frac{1}{\mu_{\max}} * \left( \frac{Ks}{Cc * Cs} + \frac{1}{Cc} \right) \quad (Ec. 14)$$

Se elimina la factorización que acompaña a la suma de fracciones (Ec. 15).

$$\frac{1}{rg} = \frac{Ks}{\mu_{\max} * Cc * Cs} + \frac{1}{\mu_{\max} * Cc} \quad (Ec. 15)$$

Para eliminar la variable Cc en el término b de la ecuación lineal, se multiplica la Ecuación 15 por Cc. Hay términos que pueden expulsarse de la ecuación (Ec. 16).

$$\left( \frac{1}{rg} * Cc \right) = \left( \frac{Ks}{\mu_{\max} * Cc * Cs} + \frac{1}{\mu_{\max} * Cc} \right) * Cc$$

$$\frac{Cc}{rg} = \frac{Ks * Cs}{\mu_{\max} * Cs * Cs} + \frac{Cs}{\mu_{\max} * Cs}$$

$$\frac{Cc}{rg} = \frac{Ks}{\mu_{\max} * Cs} + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (Ec. 16)$$

Esta ecuación tiene la forma  $y = mx + b$  , en donde:

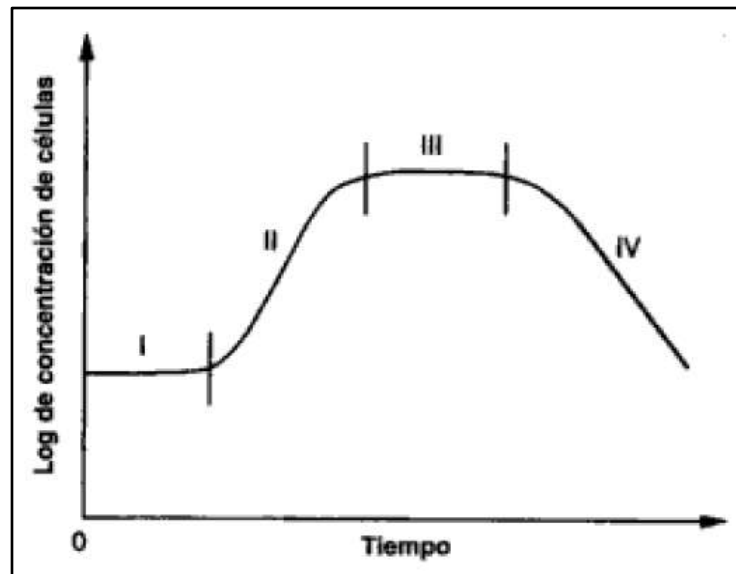
$$y = \frac{Cc}{rg}$$

$$m = \frac{Ks}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

$$x = \frac{1}{Cs}$$

$$b = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}}$$

Las células involucradas en el proceso muestran un crecimiento y decrecimiento descrito en cuatro fases (Figura 1.14). En la **fase I de latencia** la célula se adapta y las que no lo hacen son eliminadas por el mismo medio. En la **fase II de crecimiento exponencial**, la velocidad de crecimiento celular ( $rg$ ) es directamente proporcional a la concentración de las células y la rapidez es máxima, es en esta fase cuando aplica el modelo de Monod. Durante la **fase III estacional**, la falta de nutrientes limita el crecimiento, así como la acumulación de ácidos y toxinas. La **fase final IV o fase de muerte**, muestra una disminución de la cantidad de biomasa, por el efecto del desabasto de nutrientes o por subproductos tóxicos (Fogler, 2001).



**1.15.** Fases de crecimiento de células bacterianas (Fogler, 2001).

# Capítulo 2

## METODOLOGÍA

### 2.1. MATERIALES Y REACTIVOS

La presente experimentación que tiene como objetivo determinar la capacidad degradativa del procloraz requirió de ciertos instrumentos, equipos y reactivos los cuales se encuentran presentes dentro del Laboratorio de Investigación y Posgrado de Operaciones Unitarias de la ESIQIE. Los instrumentos utilizados se especifican a continuación (Tabla 2.1).

#### 2.1.1. INSTRUMENTOS UTILIZADOS

**Tabla 2.1.** Instrumentos.

<b>Instrumento</b>	<b>Marca</b>
Balanza analítica	Sartorius
Parrilla de agitación	IKA
Espectrofotómetro UV-VIS	Hach
Potenciómetro	Metrohm
Medidor de oxígeno	Mil Waukee
Centrífuga clínica	Velaquin
Microcentrífuga	Thermo Scientific
Autoclave	Lorma
Espectrómetro de Masas de Ultra Alta Resolución	BRUKER
Sonicador	Misonix

Sistema de Purificación de agua	Merck
Analizador de Carbono Orgánico Total HiPerTOC	Thermo Scientific
Generador de oxígeno	DEDAKJ

### 2.1.2. REACTIVOS EMPLEADOS

Los reactivos utilizados en actividades como la preparación del medio mínimo, la prueba toxicológica o en análisis por espectrometría de masas o COT, son los siguientes (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Reactivos.

Nombre	Pureza	Marca
Procloraz Sportak	42.10%	Bayer
Consortio	No aplica	No aplica
Agua desionizada	No aplica	No aplica
Glucosa	No aplica	ITW Reagents
Cloruro ferroso	Solución al 0.1%	ITW Reagents
Fosfato ácido de potasio	99.99%	ITW Reagents
Cloruro de magnesio	99.99%	ITW Reagents
Cloruro de sodio	99.99%	ITW Reagents
Cloruro de amonio	99.99%	ITW Reagents
Cloruro de calcio	99.99%	ITW Reagents
Solución traza	No aplica	No aplica
Hidróxido de sodio	99.99%	ITW Reagents
Trifluoro acetato de sodio	98%	Sigma Aldrich

Agua Milli-Q	No aplica	No aplica
Acetonitrilo grado HPLC	$\geq 99.99\%$	J.T. Baker
Persulfato de sodio	99.99%	No aplica
Ácido fosfórico	85%	Fermont

## 2.2. ETAPAS DEL PROCESO EXPERIMENTAL

El proceso experimental se divide en cinco grandes etapas: la primera de ellas es la **adaptación** del consorcio, en la que se busca avezar a las bacterias a las condiciones del medio enriquecido con el funguicida: la mezcla a degradar. La segunda etapa es el **estudio cinético**, donde una vez los microorganismos han sido adaptados, se mide la variación con el tiempo de algunas propiedades del sistema, como concentración de procloraz, masa orgánica, pH, etc.; con el fin de ajustar los datos con el modelo cinético de Monod. La tercera etapa es el **estudio metabolómico**, que tiene como objetivo la identificación de metabolitos, biomarcadores y otras sustancias de interés, mediante la técnica de MRMS de ultra alta resolución. Posteriormente se hará énfasis en la importancia de medir la concentración del procloraz mediante esta técnica de espectrometría de masas. La cuarta etapa es la **medición de Carbono Orgánico Total (COT)**, en la que se comparó el nivel de carbono orgánico al inicio y al final de la biodegradación. La quinta etapa y la última fue la **prueba de toxicidad**, aquí se comparó la germinación de algunas muestras de semillas de lechuga, las cuales se regaron con soluciones con cantidades variables de procloraz y glucosa; lo anterior con el fin de evaluar la toxicidad del procloraz activo y de este una vez que pasó por el proceso de biodegradación.

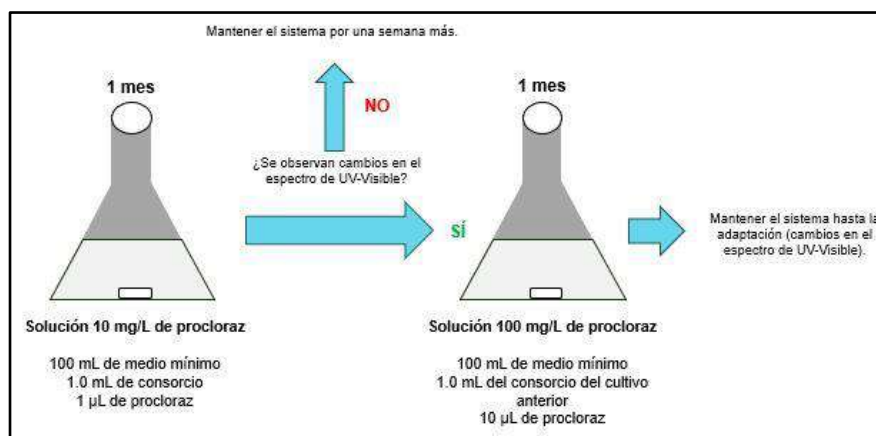
### 2.2.1. ADAPTACIÓN DEL CONSORCIO

Para la fase de adaptación, se preparó en un matraz Erlenmeyer de 125 mL una solución a 100 mg/L de procloraz en medio mínimo: se inoculó con 1 mL del consorcio. Se realizó la siguiente consideración:

$$1 \text{ mg procloraz} \approx 1 \mu\text{L muestra}$$

El matraz se dejó en agitación por exactamente 1 mes, del que cada día hábil en el calendario escolar se extrajo 5 mL, se centrifugó y del sobrenadante se extrajeron 0.5 mL para diluir a 10 mL, la solución resultante se analizó por espectroscopía de UV-Vis.

Al finalizar el mes se repitió el experimento variando la concentración del contaminante (procloraz) de 10 mg/L a 100 mg/L, donde el consorcio se obtuvo de la mezcla anterior, es decir, del sistema previamente adaptado (Figura 2.1). Con el segundo experimento a 100 mg/L de procloraz se produce una adaptación en condiciones más agresivas al aumentar la cantidad del contaminante en el medio.



**Figura 2.1.** Esquema de la metodología en la adaptación del consorcio. Fuente:  
Elaboración propia.

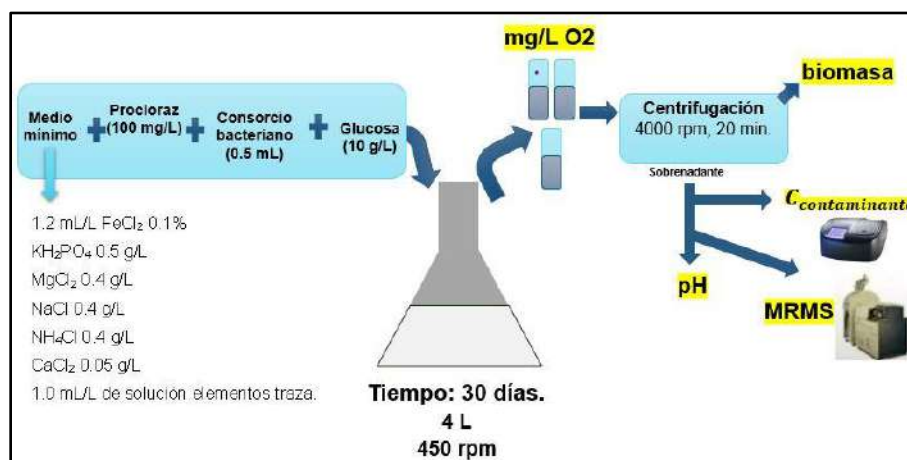
El medio mínimo consiste en una solución salina ajustada a pH 7.0 con los siguientes solutos:  $1.2 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{FeCl}_2$  0.1 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$   $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  de solución elementos traza (Cruz-Narváez y Rico-Arzate, 2018). Los elementos traza consisten en otras sales y ácidos minerales de

concentración más reducida, como  $\text{ZnSO}_4$   $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{MnCl}_2$   $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{CoCl}_2$   $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{CuCl}_2$   $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{NiCl}_2$   $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$   $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  y  $\text{H}_2\text{BO}_4$   $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (Cruz-Narváez y Rico-Arzate, 2018).

### 2.2.2. ESTUDIO CINÉTICO

Un biorreactor de tipo Batch esterilizado y con agitación, fue inoculado con un consorcio bacteriano previamente adaptado, con el objetivo de biodegradar el fungicida procloraz (en su presentación comercial) en una solución de medio mínimo. El biorreactor consistió en un matraz Erlenmeyer con 4.0 L de la solución de procloraz a  $100 \text{ mg/L}$  en medio mínimo, con 0.5 mL del consorcio bacteriano extraído de la etapa anterior y con 40 g de glucosa (en una concentración de  $10 \text{ g/L}$ ). Se mantuvo sobre una parrilla de agitación a una velocidad del motor de 450 rpm; al biorreactor se le introdujo un agitador magnético de 9 x 45 mm (diámetro por longitud) para asegurar una agitación constante durante los 30 días del experimento. Se tapó con una almohadilla de algodón cubierta con gasa, se trata de un material altamente poroso que permite un medio aerobio dentro del biorreactor.

Se realizó el monitoreo diariamente por un periodo de 30 días de la biomasa, el pH, el nivel de  $\text{O}_2$  disuelto y la concentración del contaminante, esta última se determinó por medio de espectroscopía UV-Vis (Figura 2.2).

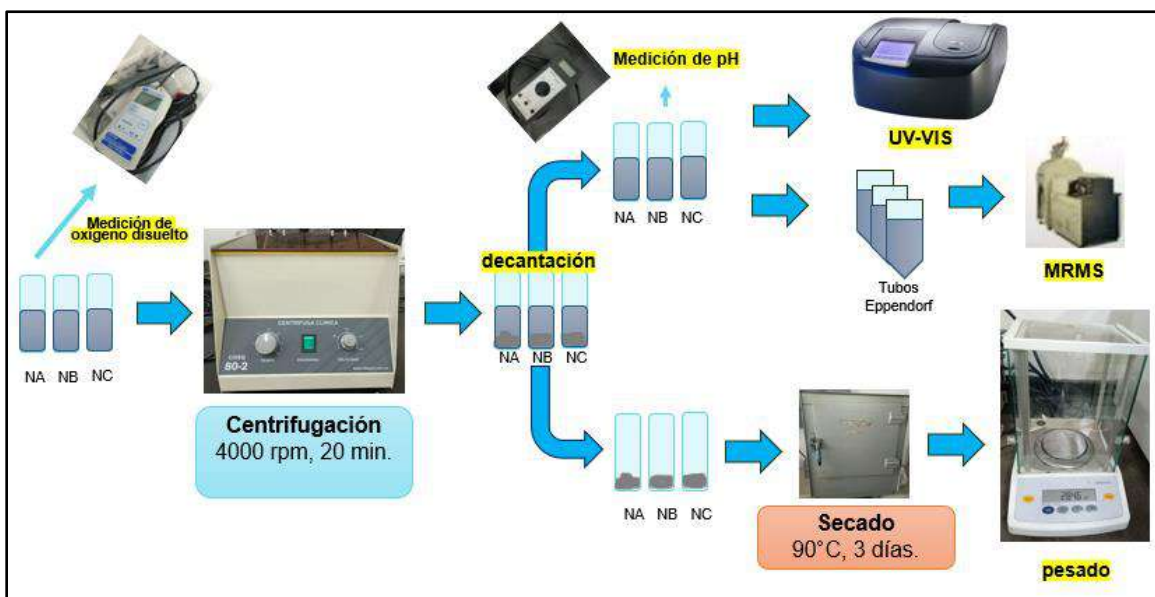


**Figura 2.2.** Proceso metodológico general de la prueba cinética. Fuente: Elaboración propia.

**2.2.2.1. Montaje del biorreactor.** El medio mínimo una vez preparado, esterilizado y enfriado, se agregó a un matraz Erlenmeyer de 4 L de capacidad, añadiendo el contaminante procloraz en una concentración de 100 mg/L, 0.5 mL del consorcio extraído de la adaptación y 10 g de glucosa por cada litro de medio mínimo.

**2.2.2.2. Monitoreo del proceso.** El biorreactor se lleva a agitación constante a 450 rpm. Cada 24 horas por 30 días se midieron los siguientes parámetros: pH, nivel de oxígeno, biomasa y concentración del contaminante. Diariamente se extrajeron 5 mL por triplicado, los cuales se centrifugaron a 4000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante del precipitado se separa mediante decantación. El precipitado representa la biomasa obtenida, mientras que el sobrenadante contiene el procloraz y los posibles productos de biodegradación. El sobrenadante de cada tubo se recolectó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL para su posterior análisis por el espectrómetro de masas (Figura 2.3).





**Figura 2.3.** Proceso metodológico detallado de la toma de variables. La nomenclatura de los tubos NA, NB y NC, en donde N es el día de la toma de muestras. Fuente: Elaboración propia.

**2.2.2.3. Medición de biomasa.** La cantidad de biomasa se determina por la técnica de peso seco (NORMA Oficial Mexicana. Determinación de cenizas en desechos sólidos DGN-AA-18-1975., 1975). El precipitado obtenido de la centrifugación se secó en una estufa por 3 días a 90°C, posteriormente se pesó en la balanza analítica (Arana, s. f.), que cuenta con una precisión de 0.1 mg.

**2.2.2.4. Medición de pH y nivel de oxígeno.** Se utilizó un potenciómetro para monitorear el pH y un electrodo de oxígeno disuelto para asegurar las condiciones de saturación de oxígeno del sistema.

**2.2.2.5. Medición de la concentración de contaminante.** El sobrenadante del centrifugado obtenido de las muestras tomadas diariamente, fueron analizadas en un espectrofotómetro de UV-Vis para cuantificar la concentración de cada uno de los herbicidas estudiados (Figura 2.5).



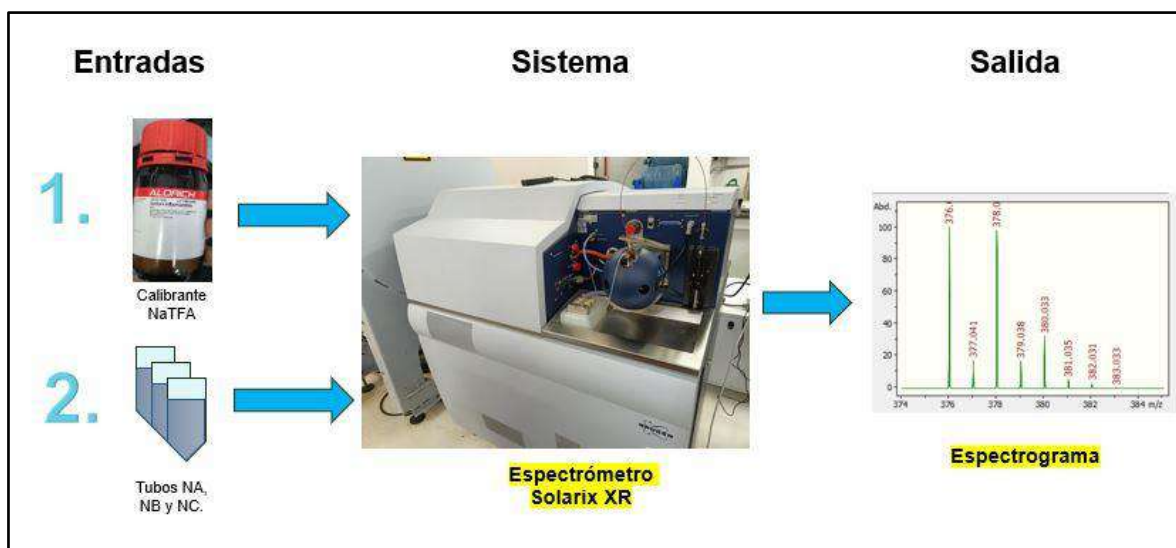
**Figura 2.4.** Espectrofotómetro UV-Vis HACH DR 5000.

### **2.2.3. ESTUDIO METABOLÓMICO.**

Esta etapa tiene como objetivos medir la disminución de la concentración de procloraz con el tiempo, así como la identificación de metabolitos para la propuesta de la ruta metabólica de biodegradación.

**2.2.3.1. Experimento a un mes.** Como se especificó en el estudio cinético, se guardaron tres tubos Eppendorf con el sobrenadante por cada día de medición. Estos se llevaron a congelación hasta el fin de la etapa, con el fin de detener cualquier reacción que pueda ocurrir dentro del sistema. Una vez recolectadas las 60 muestras repartidas en 3 tubos cada día por 20 días, se procedió a analizarlas en el espectrómetro de masas Solarix XR.

La metodología del análisis de las muestras consistió en una etapa de calibración utilizando trifluoroacetato de sodio ( $\text{CF}_3\text{COONa}$ ). Una vez calibrado el equipo se inyectaron las muestras desde el día cero hasta el último día, generando así un espectro de masas por cada muestra (Figura 2.5). La jeringa con la que se inyectaron las muestras, así como el capilar del espectrómetro se enjuagaron entre cada muestra con una mezcla de acetonitrilo y agua 50/50 en volumen. Para la construcción de la curva de calibración se inyectaron soluciones a 100, 75, 50, 25, 10, 5 y 1 mg/L de procloraz.



**Figura 2.5.** Proceso metodológico del análisis de muestras en el espectrómetro de masas.

Fuente: Elaboración propia.

Las condiciones a las que se operó el instrumento se determinaron a partir de un análisis de la muestra original al día cero variando algunos parámetros, aquellas condiciones en las que se observó una mayor intensidad del pico correspondiente al ion molecular del procloraz ( $m/z=376$ ), fueron las óptimas para la experimentación y se especifican en la siguiente tabla:

<b>Tabla 2.3. Método para análisis de procloraz en el espectrómetro Solarix XR.</b>	
<b>Polaridad.</b>	Positivo
<b>Resolución.</b>	8 M
<b>Límite inferior de <math>m/z</math></b>	43.00
<b>Límite superior de <math>m/z</math></b>	2000.00
<b>Escaneos promedio</b>	30
<b>Accum (s)</b>	0.100
<b>Velocidad de flujo</b>	500.0 $\mu\text{L/h}$
<b>Fuente API</b>	
<b>Capilar</b>	4000 V

<b>E.P. offset</b>	-500 V
<b>Source Gas Tune</b>	
<b>Nebulizador</b>	2.0 bar
<b>Gas seco</b>	4.0 L/min.
<b>Temperatura</b>	180°C
<b>API alto voltaje</b>	Sin calentador ECD.

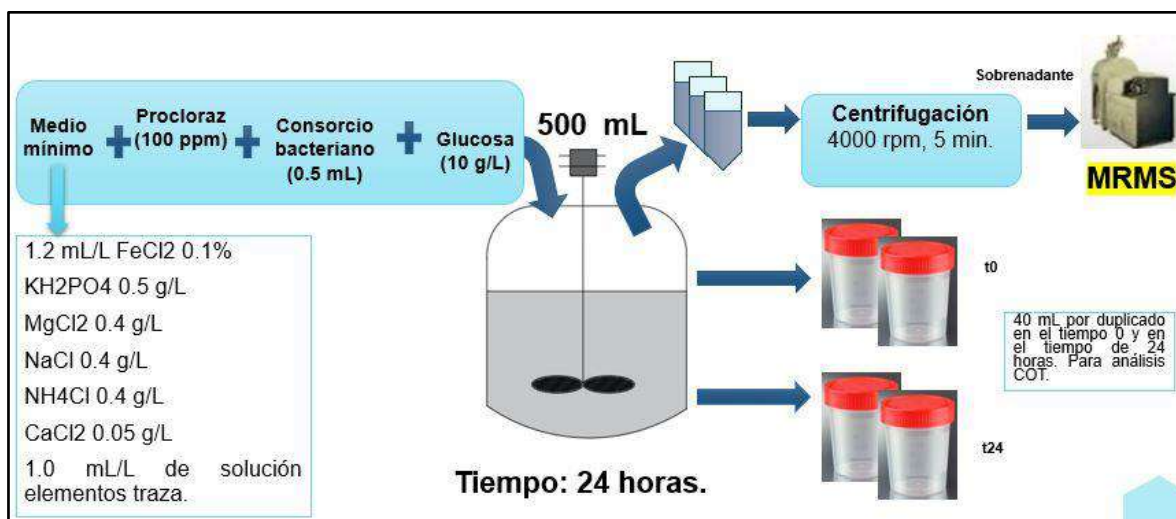
Para la preparación del calibrante se disolvieron en un tubo Eppendorf 5.0 mg de trifluoroacetato de sodio (NaTFA) en 1.5 mL de agua milli-Q. Posteriormente, se llevó al sonicador por 5 minutos para asegurar la homogenización de la solución (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Diagrama para la preparación del calibrante de trifluoroacetato de sodio o NaTFA. Fuente: Elaboración propia.

**2.2.3.2. Experimento a 24 horas.** Como se explicará más adelante en la sección de resultados en el Capítulo 3, fue necesario realizar una segunda prueba de biodegradación a 24 horas, ya que los espectros de masas y de UV-VIS indican una rápida biodegradación del procloraz. Para esta prueba se utilizaron las mismas concentraciones de procloraz a 100 mg/L y 10 g/L de glucosa, pero a un volumen de 500 mL de medio mínimo. El inóculo se obtuvo de 0.5 mL del sistema anterior a un mes. Además, se extrajeron dos volúmenes de 40 mL al

inicio (tiempo cero), y otros dos volúmenes al final (tiempo 24 h), para su posterior análisis de Carbono Orgánico Total (Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Proceso metodológico para la prueba de biodegradación a 24 horas. Fuente: Elaboración propia.

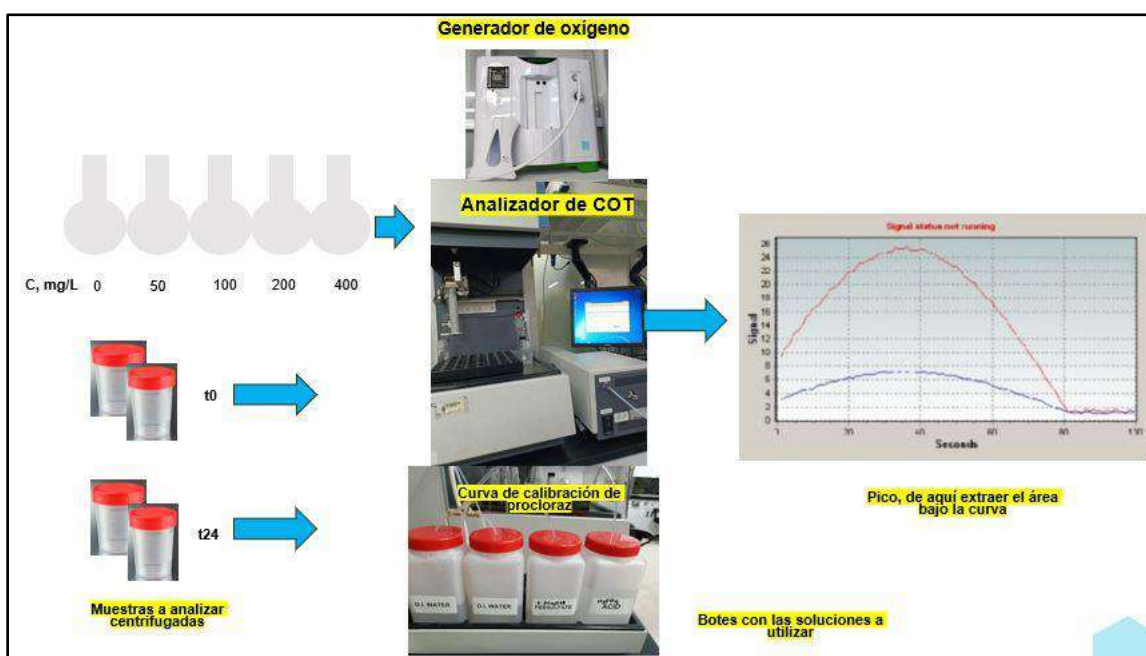
#### 2.2.4. PRUEBA DE MINERALIZACIÓN.

De la prueba de biodegradación realizada para el estudio metabolómico a 24 horas, se guardaron y congelaron 40 mL de muestra del medio de biodegradación, al inicio y al final del proceso, por duplicado. Estas muestras se centrifugaron en una centrífuga clínica para eliminar la biomasa. Posteriormente se midieron en el Analizador de Carbono Orgánico Total de Thermo Scientific, obteniendo un área que es directamente proporcional a la concentración del procloraz. Previamente se realizó una curva de calibración a distintas concentraciones de mg/L de carbono: 0, 50, 100, 200 y 400 mg/L.

Para la medición de una muestra en el equipo de Carbono Orgánico Total se prepararon las siguientes soluciones:

- 1) **Solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  a 120 g/L con NaOH a 9 g/L.** Para preparar 500 mL de solución, se pesaron 60 g y 4.5 g de escamas de NaOH, se depositaron en un matraz aforado de 500 mL y se agregó agua destilada lentamente hasta el aforo.
- 2) **Solución de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 18 %w.** Se preparó 500 mL de solución con una alícuota de 58.8 mL de ácido fosfórico grado reactivo (85%) y se diluyó en un matraz aforado con un volumen de agua. Posteriormente se le agregó más agua destilada hasta los 500 mL del aforo. El orden de dilución se efectuó con el fin de evitar un sobrecalentamiento de la solución al adicionar agua al ácido.

El método utilizado para la medición de COT fue la oxidación con persulfato de sodio en el reactor de UV, para la generación de oxígeno de arrastre se utilizó el generador DEDAKJ conectado al analizador de COT, con un flujo de 4 mL/s. Para determinar la concentración de carbono presente en las muestras se identificó el área bajo la curva en el pico generado, para ello se usó el software ThEuS 1.4.x (Figura 2.8).

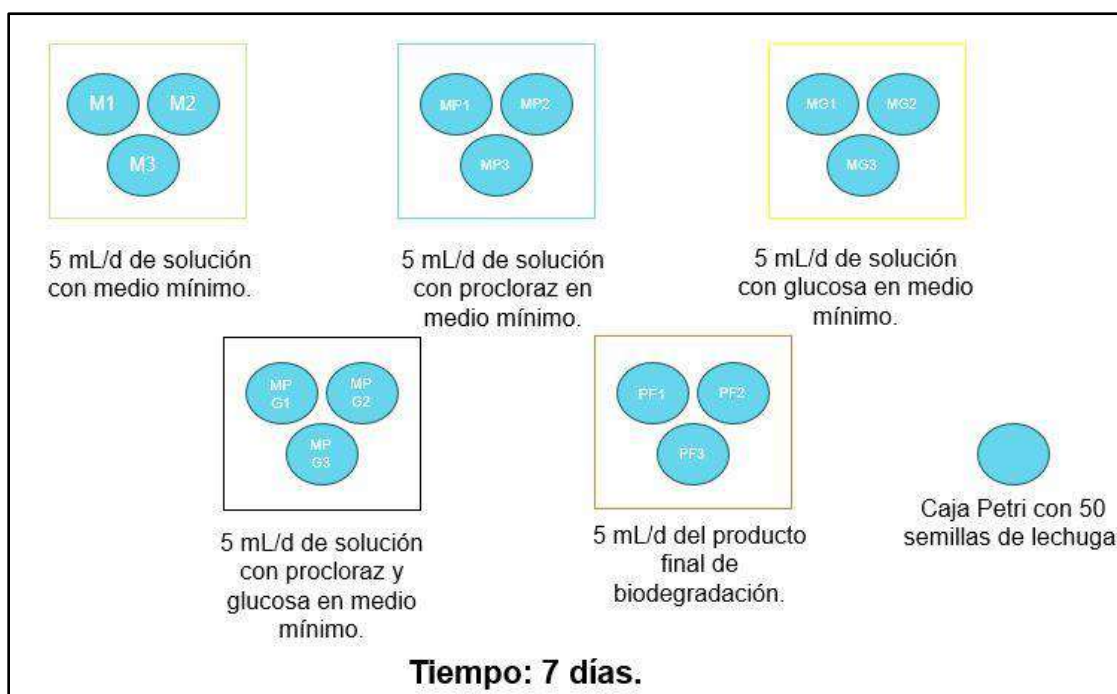


**Figura 2.8.** Proceso metodológico para la prueba de Carbono Orgánico Total COT. Fuente: Elaboración propia.



### 2.2.5. PRUEBA TOXICOLÓGICA.

Con el fin de comprobar la disminución de la toxicidad de los productos de biodegradación, se realizó una prueba en la que se trataron por triplicado cinco muestras que contenían 50 semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) cada una. Se esterilizaron en el autoclave 15 cajas Petri, a las cuales se le agregó una cama de algodón sobre una capa de papel filtro donde se sembraron las semillas, a la primera muestra se le roció medio mínimo previamente preparado (M); a la segunda muestra se le agregó una mezcla de medio mínimo con glucosa al 0.1% (MG); en la tercera muestra se roció medio mínimo con el contaminante procloraz a 100 mg/L (MP); a la cuarta muestra se agregó la mezcla de medio mínima, glucosa y procloraz en las mismas concentraciones (MPG); y en la quinta muestra se roció el producto final de la biodegradación obtenido de la prueba a 24 horas (PF). A cada caja Petri se le roció un volumen de 5.0 mL de cada solución diariamente por 7 días (Figura 2.9). Para evaluar la toxicidad de cada una de las 5 soluciones, al final de los 7 días se realizó un conteo de las semillas que han germinado, obteniendo un promedio de las tres cajas para cada solución utilizada, con el promedio obtenido se obtuvo un % de germinación para cada solución.



**Figura 2.9.** Proceso metodológico de la prueba toxicológica. Fuente: Elaboración propia.

Para determinar el número de disparos que equivalen a 5 mL en cada atomizador, se midió el volumen obtenido en una probeta de 25 mL con 10 disparos de cada aspersor, esto por triplicado. Los resultados fueron los siguientes:

1. Atomizador con solución de medio mínimo:

Volumen 1	Volumen 2	Volumen 3	Volumen promedio
3.0 mL	3.5 mL	3.0 mL	3.17 mL

$$\frac{3.17 \text{ mL}}{10 \text{ disparo}} = 0.317 \text{ mL/disparo}$$

2. Atomizador con la solución de medio mínimo y procloraz:

Volumen 1	Volumen 2	Volumen 3	Volumen promedio
13.0 mL	13.0 mL	13.0 mL	13.0 mL

$$\frac{13.0 \text{ mL}}{10 \text{ disparo}} = 1.30 \text{ mL/disparo}$$

3. Atomizador con la solución de medio mínimo y glucosa:

Volumen 1	Volumen 2	Volumen 3	Volumen promedio
13.0 mL	13.0 mL	13.0 mL	13.0 mL

$$\frac{13.0 \text{ mL}}{10 \text{ disparo}} = 1.30 \text{ mL/disparo}$$

4. Atomizador con la solución de medio mínimo, procloraz y glucosa:

Volumen 1	Volumen 2	Volumen 3	Volumen promedio
14.0 mL	13.5 mL	13.5 mL	13.67 mL



$$\frac{13.67}{10} \frac{mL}{disparo} = 1.367 mL/disparo$$

5. Atomizador con el producto final de biodegradación:

Volumen 1	Volumen 2	Volumen 3	Volumen promedio
8.5 mL	9.0 mL	8.5 mL	8.67 mL

$$\frac{8.67}{10} \frac{mL}{disparo} = 0.867 mL/disparo$$

Por lo tanto, la cantidad de disparos por día que usará cada aspersor en el tratamiento de las semillas fue:

1. Atomizador con solución de medio mínimo:

$$\frac{5 mL/día}{0.317 mL/disparo} = 16 disparo/día$$

2. Atomizador con la solución de medio mínimo y procloraz:

$$\frac{5 mL/día}{1.30 mL/disparo} = 4 disparo/día$$

3. Atomizador con la solución de medio mínimo y glucosa:

$$\frac{5 mL/día}{1.30 mL/disparo} = 4 disparo/día$$

4. Atomizador con la solución de medio mínimo, procloraz y glucosa:

$$\frac{5 \text{ mL/día}}{1.367 \text{ mL/disparo}} = 4 \text{ disparo/día}$$

5. Atomizador con el producto final de biodegradación:

$$\frac{5 \text{ mL/día}}{0.867 \text{ mL/disparo}} = 6 \text{ disparo/día}$$

Las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) utilizadas en la prueba de toxicidad fueron de la marca Vita.

# Capítulo 3

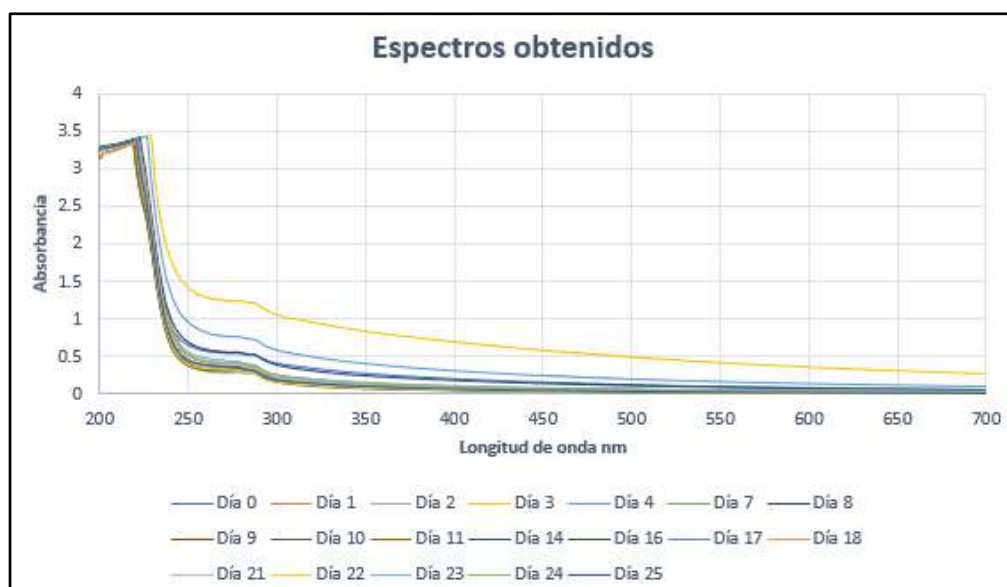
## RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS Y TRATAMIENTO DE DATOS

En la presente sección se muestran los resultados obtenidos de cada etapa del proceso experimental descrito en el Capítulo 2, así como el tratamiento y proceso de estos datos.

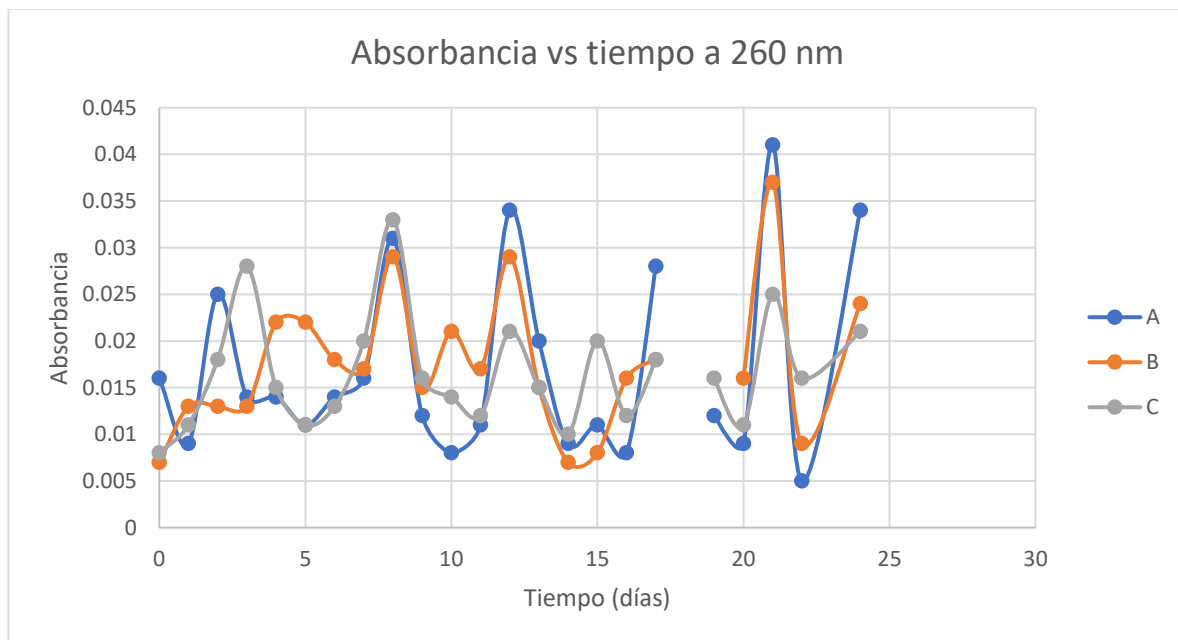
#### 3.1.1. ETAPA DE ADAPTACIÓN DEL CONSORCIO

Los resultados obtenidos indican una clara disminución de la concentración del procloraz en la solución de 100 mg/L, durante los primeros tres días hay un aumento en la intensidad de los espectros, a partir del cuarto día comienza a disminuir progresivamente; sin embargo, la intensidad del espectro oscila en los días subsecuentes (ver Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Espectro UV-Vis del procloraz a través del tiempo durante la primera fase de adaptación del procloraz a 100 mg/L. Fuente: Elaboración propia.

La oscilación de los espectros puede observarse de una mejor manera graficando la absorbancia a una única longitud de onda (ver Figura 3.2). La longitud de onda utilizada es 260 nm, aquella en la que el procloraz presenta una mayor absorbancia.

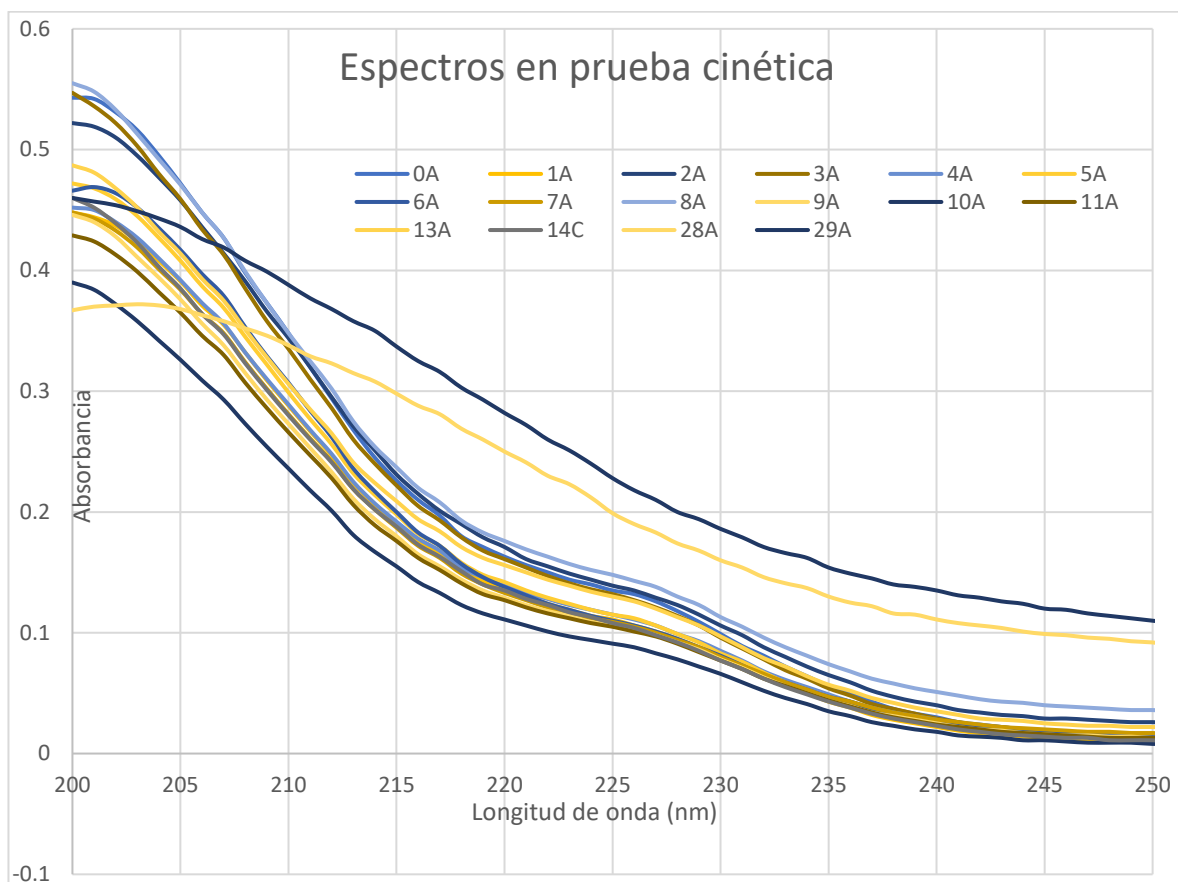


**Figura 3.2.** Absorbancia vs tiempo del sistema, a 260 nm, la longitud de onda de máxima absorbancia del procloraz. Fuente: Elaboración propia.

### 3.1.2. ETAPA CINÉTICA.

Los espectros de UV-Vis obtenidos durante la etapa cinética continuaron la misma tendencia de la fase de adaptación (ver Figura 3.3). Los datos de biomasa se registran en la Figura 3.4, la biomasa en los 5 días comienza a presentar un comportamiento constante con ligeras variaciones, un segundo gráfico se realizó posteriormente en la sección 3.1.2.2 eliminando los datos que están por fuera de la tendencia; del gráfico corregido se obtuvo mediante un ajuste polinómico, una ecuación que describe el crecimiento de las bacterias. El pH aumentó en los primeros días para luego disminuir a un mínimo y volver a subir hasta un comportamiento constante en el día 15 (ver Figura 3.5). El monitoreo del nivel de oxígeno

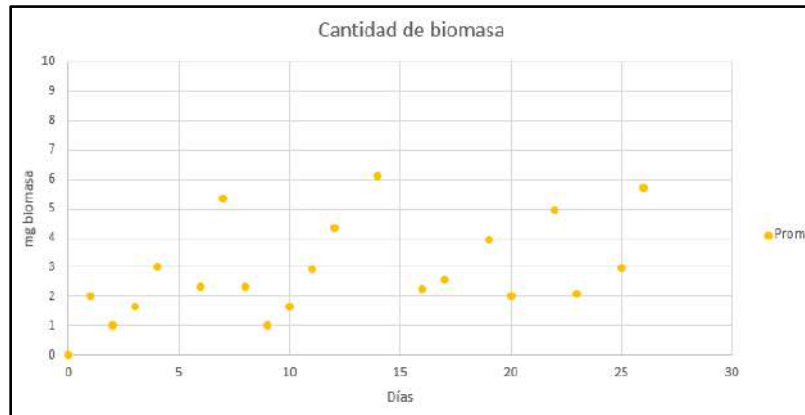
(ver Tabla 3.1) se mantuvo con pocas variaciones a lo largo del proceso, el cual se mantuvo en todo momento en presencia de aire y, por lo tanto, de oxígeno (ver Figura 3.6).



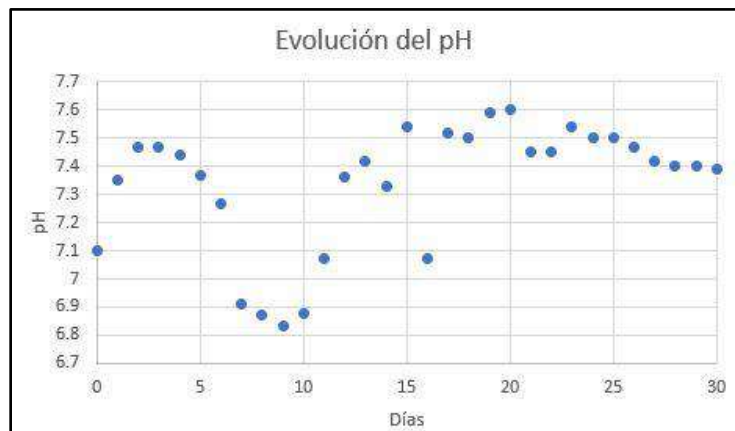
**Figura 3.3.** Espectro UV-Vis del procloraz a través del tiempo durante la etapa cinética.

Fuente: Elaboración propia.

La tendencia oscilatoria de los datos obtenidos en los espectros UV-Visible hacen inviable calcular las concentraciones de procloraz con esta técnica; por ende, se optó por realizar el seguimiento de la concentración de procloraz mediante los datos obtenidos por espectrometría de masas, ya que es muy específica para cada molécula.



**Figura 3.4.** Gráfico del comportamiento de la biomasa. Fuente: Elaboración propia.

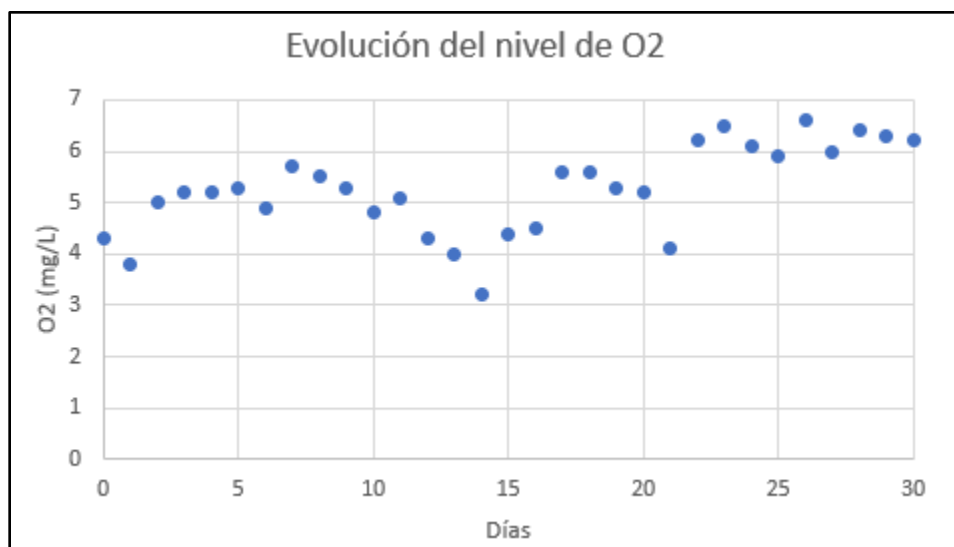


**Figura 3.5.** Comportamiento del pH. Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 3.1.** Niveles de oxígeno medidos, la tendencia es muy estable. Fuente: Elaboración propia.

Día	O <sub>2</sub> (mg/L)	Día	O <sub>2</sub> (mg/L)
0	4.3	16	4.5
1	3.8	17	5.6
2	5	18	5.6

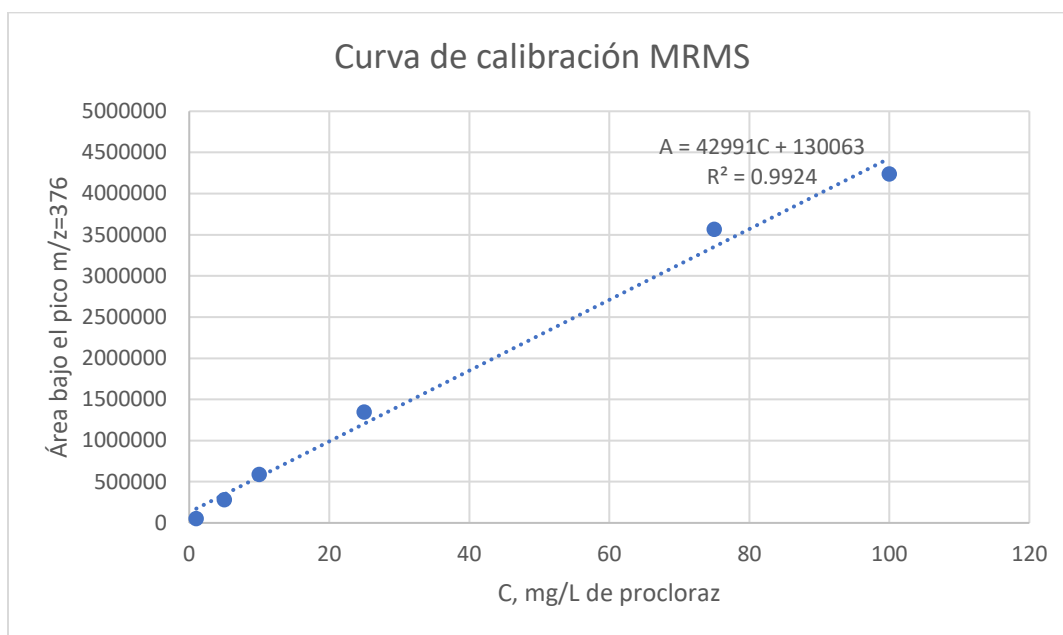
3	5.2	19	5.3
4	5.2	20	5.2
5	5.3	21	4.1
6	4.9	22	6.2
7	5.7	23	6.5
8	5.5	24	6.1
9	5.3	25	5.9
10	4.8	26	6.6
11	5.1	27	6
12	4.3	28	6.4
13	4.0	29	6.3
14	3.2	30	6.2
15	4.4	Prom.	<b>5.24</b>



**Figura 3.6.** Comportamiento de los niveles de oxígeno. Fuente: Elaboración propia.

**Disminución de la concentración de procloraz.** Como la técnica de UV-Vis no resultó adecuada para medir las concentraciones de procloraz, estas se determinaron mediante espectrometría de masas. Utilizando el software Data Analysis de Bruker, se obtuvieron datos

de área bajo los picos de procloraz obtenidos a los distintos tiempos en los que se realizaron mediciones. Para la curva de calibración se eliminó el dato obtenido a 50 mg/L ya que se encontró fuera de la tendencia (ver Figura 3.7).



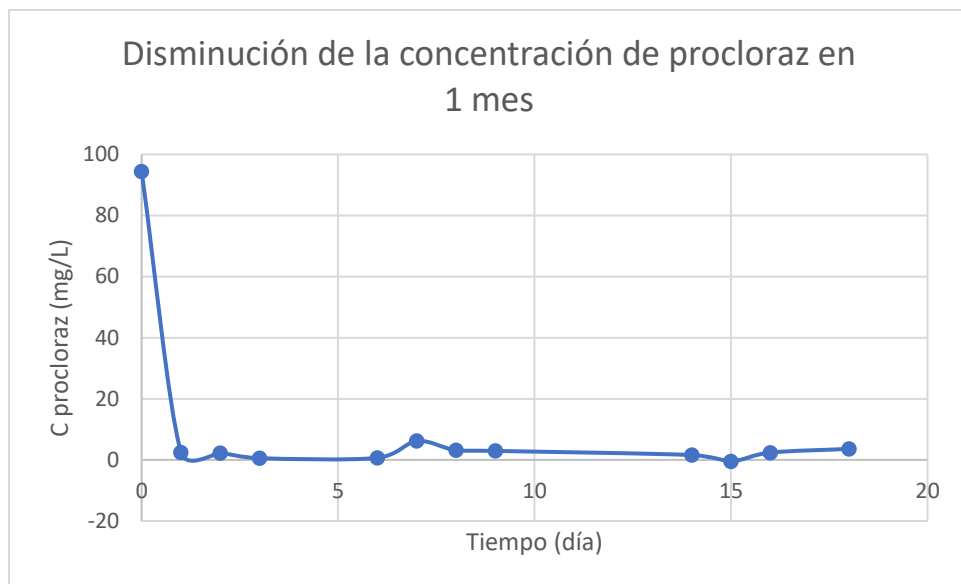
**Figura 3.7.** Curva de calibración del procloraz por espectrometría de masas con la ecuación lineal obtenida y el factor de determinación. Fuente: Elaboración propia.

La curva de calibración del procloraz por MRMS es la siguiente:

$$A = 42991C + 130063 \quad (Ec. 17)$$

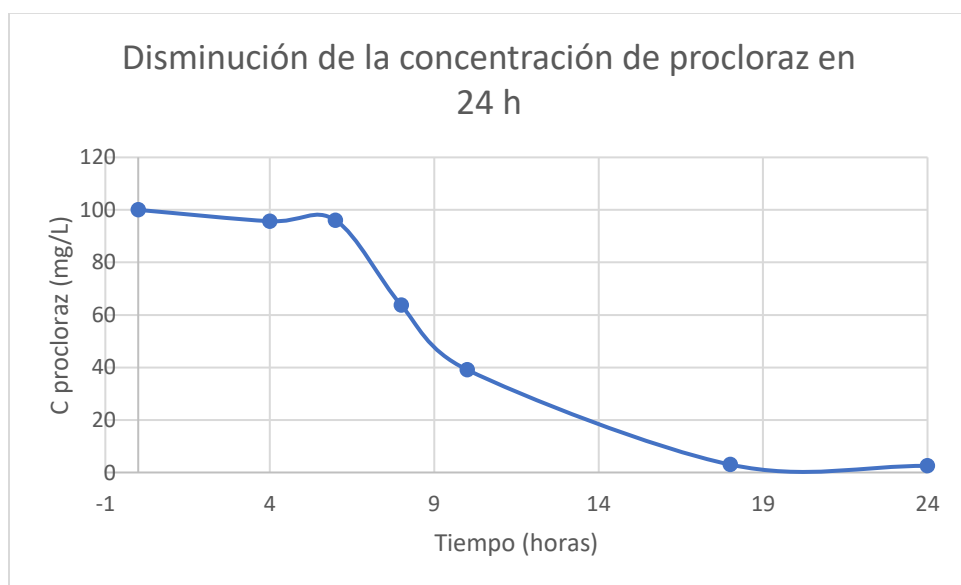
Con el modelo lineal de la curva de calibración se calcularon las concentraciones de procloraz tanto en el experimento de un mes como el de 24 horas. Los resultados se indican en las Figuras 3.8 y 3.9.





**Figura 3.8.** Concentración en mg/L de procloraz de las muestras en la prueba a un mes.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 3.9.** Disminución de la concentración de procloraz en un día. Fuente: Elaboración propia.

### 3.1.2.1. CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE LA BIODEGRADACIÓN.

Para determinar la eficiencia de la biodegradación, se tomaron los datos de concentración del procloraz al inicio y al final de la prueba de biodegradación a 24 h (ver Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Concentraciones obtenidas con la curva de calibración en la prueba de biodegradación a 24 horas. Fuente: Elaboración propia.

Horas	C (ppm de procloraz)
0	100
4	95.69
6	96.02
8	63.67
10	39.12
18	3.01
24	2.51

El porcentaje de biodegradación se expresa como la cantidad de procloraz degradada respecto a la cantidad de procloraz inicial, multiplicado por cien:

$$\% \eta_{biodegradación} = \frac{C_{degradada}}{C_{inicial}} * 100 \quad (Ec. 18)$$

La cantidad degradada es la diferencia entre las concentraciones inicial y final, dado que el volumen se mantuvo constante las concentraciones pueden restarse:

$$\% \eta_{biodegradación} = \frac{C_{inicial} - C_{final}}{C_{inicial}} * 100 \quad (Ec. 19)$$

Sustituyendo valores con los datos a 0 y 24 horas:

$$\% \eta_{biodegradación} = \frac{(100.00 - 2.51) \text{ mg/L}}{100.00 \text{ mg/L}} * 100$$

Y el porcentaje de biodegradación es el siguiente:

$$\% \eta_{biodegradación} = 97.49\%$$

### 3.1.2.2. DETERMINACIÓN DEL MODELO CINÉTICO.

El modelo cinético que describe el proceso estará determinado por factores como la concentración de la biomasa y del procloraz. El modelo de Monod está en función de las concentraciones de células y de sustrato (biomasa y procloraz, respectivamente), así que a continuación, se muestra el tratamiento de los datos experimentales obtenidos:

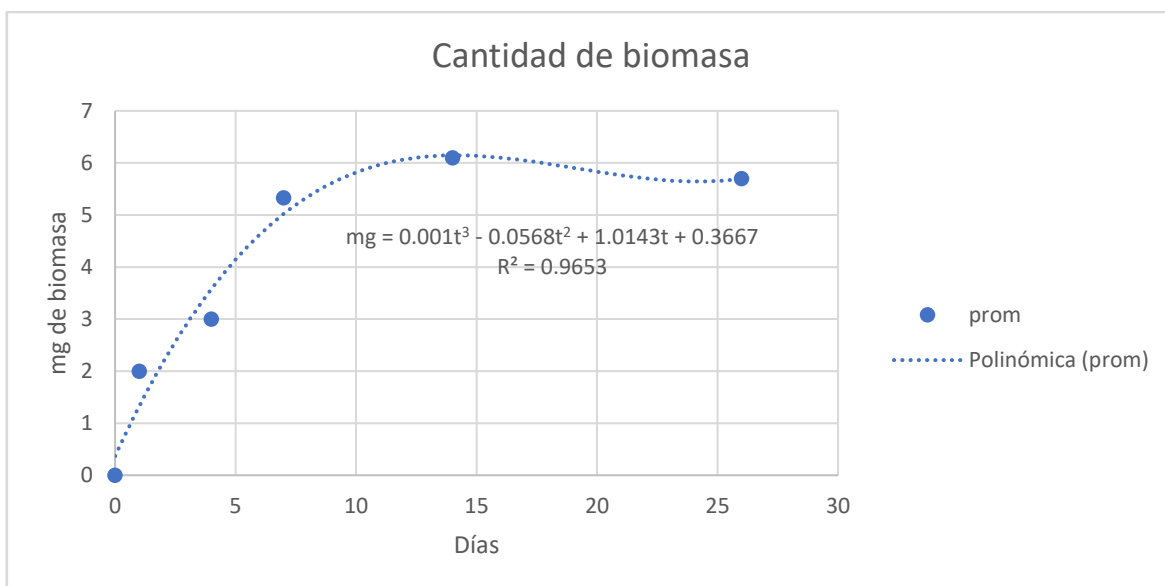
**Crecimiento de biomasa.** Como se explicó en la Sección 3.1.2. Los datos experimentales que no siguieron la tendencia se eliminaron, los datos remanentes se utilizaron para el gráfico ajustado de biomasa vs. tiempo y se recolectan en la Tabla 3.3:

**Tabla 3.3.** Biomosas obtenidas con los datos corregidos.

	Tubo Vacío (g)			Tubo Total (g)			Biomasa (mg)			
Día	A	B	C	A	B	C	A	B	C	Prom.
0	12.793	12.826	12.757	12.793	12.826	12.757	0	0	0	0.0
1	12.793	12.826	12.757	12.795	12.828	12.759	2.0	2.0	2.0	2.0
4	12.862	13.133	12.672	12.864	13.136	12.676	2.0	3.0	4.0	3.0
7	12.830	12.737	12.829	12.836	12.741	12.835	6.0	4.0	6.0	5.3
14	12.791	12.755	13.042	12.798	12.759	13.049	7.2	4.4	6.7	6.1
26	12.852	12.826	12.741	12.857	12.830	12.750	4.5	4.1	8.5	5.7

Los mg de biomasa obtenidos se graficaron en función del tiempo. La ecuación de la línea de tendencia de comportamiento logarítmico (Ecuación 19) se obtuvo mediante una regresión polinómica a partir del mismo Excel (Figura 3.10).

$$mg = 0.001t^3 - 0.0568t^2 + 1.0143t + 0.3667 \quad (Ec. 20)$$

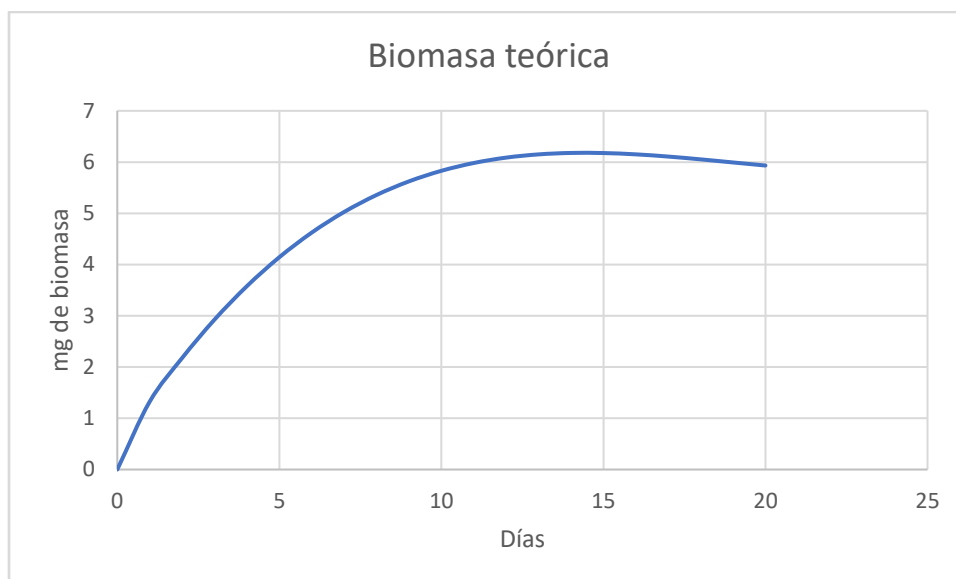


**Figura 3.10.** Gráfico experimental ajustado para el crecimiento de biomasa. Fuente:  
 Elaboración propia.

La Figura 3.10 sugiere que el modelo de Monod solamente es aplicable a la fase de crecimiento exponencial de la biomasa. Con la ecuación obtenida se calcularon datos corregidos de biomasa (ver Tabla 3.4 y Figura 3.11).

**Tabla 3.4.** Datos de biomasa teóricos a 1 mes obtenidos con la Ecuación 20:  $mg = 0.001t^3 - 0.0568t^2 + 1.0143t + 0.3667$ .

Día	mg teo.	Día	mg teo.
0	0	11	5.98
1	1.32	12	6.08
2	2.17	13	6.15
3	2.92	14	6.17
4	3.57	15	6.17
5	4.14	16	6.15
6	4.62	17	6.10
7	5.02	18	6.05
8	5.35	19	5.99
9	5.62	20	5.93
10	5.82		



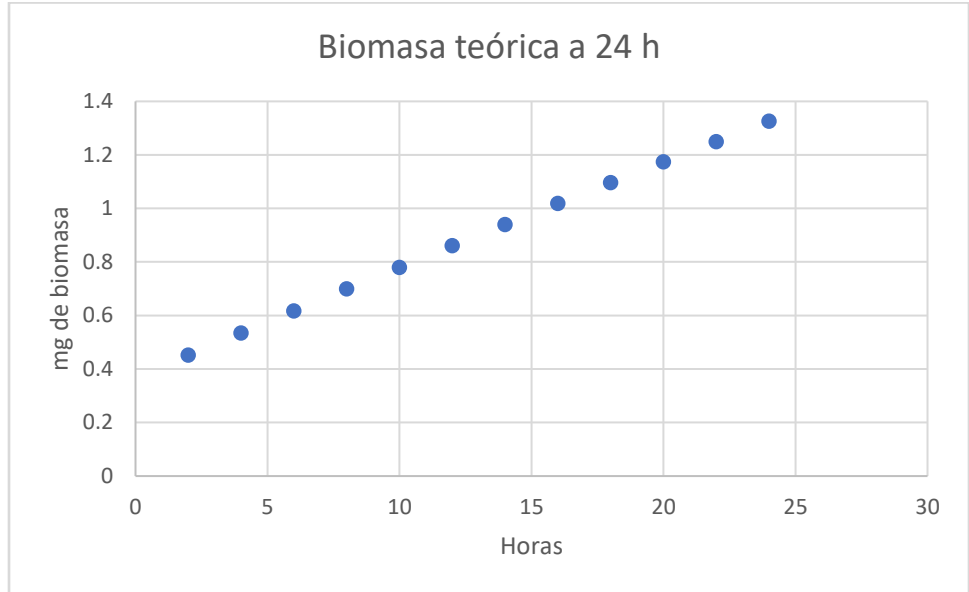
**Figura 3.11.** Gráfico teórico ajustado para el crecimiento de biomasa. Fuente: Elaboración propia.

Para el caso del experimento a 24 horas se utilizó la Ecuación 20, los resultados se encuentran en la Tabla 3.5 y en la Figura 3.12. Obsérvese que en la Tabla 3.5 las celdas marcadas con amarillo corresponden a aquellas horas en las que se observó una mayor biodegradación del procloraz (ver la Figura 3.9).

**Tabla 3.5.** Datos de biomasa teóricos a 24 horas obtenidos con la Ecuación 19:  $mg =$

$$0.001t^3 - 0.0568t^2 + 1.0143t + 0.3667.$$

Hora	Eq. en días	mg teo.
0	0	0
2	0.08333333	0.45
4	0.16666667	0.53
6	0.25	0.62
8	0.33333333	0.69
10	0.41666667	0.78
12	0.5	0.86
14	0.58333333	0.94
16	0.66666667	1.01
18	0.75	1.10
20	0.83333333	1.17
22	0.91666667	1.25
24	1	1.33



**Figura 3.12.** Gráfico teórico ajustado para el crecimiento de biomasa a 24 horas. Fuente: Elaboración propia.

**Modelo cinético de Monod.** Para encontrar el modelo cinético que describe el proceso de biodegradación se utilizaron los datos en el experimento a 24 horas, cuando ocurrió la mayor cantidad de cambios en el biorreactor. Los datos cinéticos utilizados se muestran en la Tabla 3.6. Se usaron los datos de tiempo en los que hubo una mayor biodegradación del contaminante fue más pronunciando pues es el momento en el que el consorcio muestra un crecimiento exponencial usando al procloraz como nutriente principal (ver la Figura 3.9 y la Tabla 3.5).

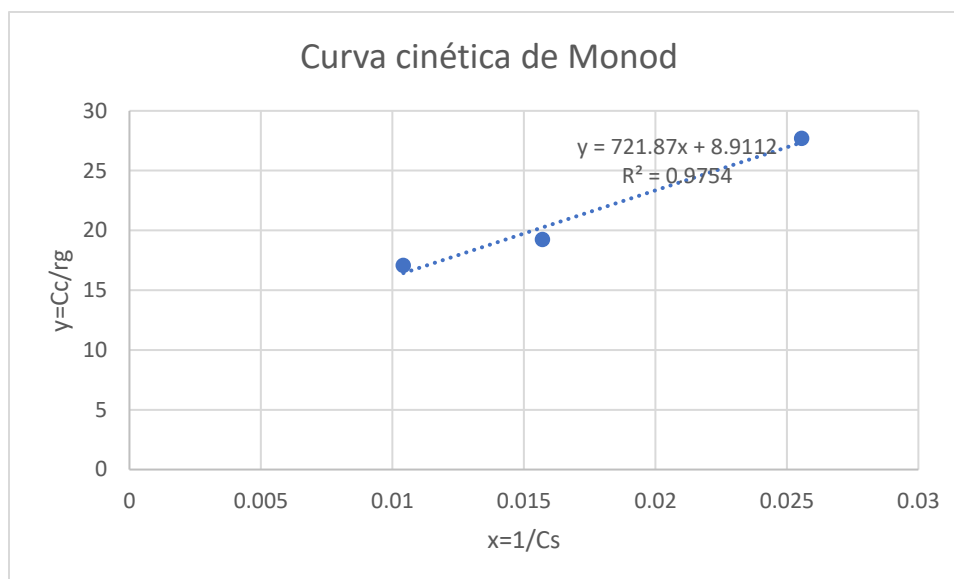
**Tabla 3.6.** Datos cinéticos para el modelo de Monod.

Horas	Cs (mg/L de procloraz)	Cc(mg biomasa)	$rg=(\Delta bio,n-\Delta bio,n-1)/\Delta t$	$x=1/Cs$	$y=Cc/rg$
6	<b>96.01</b>	0.62	---	0.0104	---
8	<b>63.67</b>	0.70	0.0408	0.0157	17.0819
10	<b>39.12</b>	0.78	0.0405	0.0256	19.2453
18	<b>3.01</b>	1.10	0.0395	0.3319	27.7126

La ecuación linealizada del modelo de Monod especificada en el Capítulo 1 es la siguiente:

$$\frac{Cc}{rg} = \frac{Ks}{\mu_{m\acute{a}x}} * \frac{1}{Cs} + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (Ec. 16)$$

El gráfico obtenido de la ecuación (16) se muestra en la Figura 3.13:



**Figura 3.13.** Curva cinética de biodegradación de procloraz utilizando el modelo de Monod. Se adjunta la ecuación del gráfico y el coeficiente de determinación  $R^2$ . Fuente: Elaboración propia.

Los datos no se ajustan a una línea recta, por lo que el modelo de Monod a priori no se ajusta al proceso de biodegradación de procloraz. Los valores obtenidos de m y b del modelo lineal son:

$$b = \frac{Ks}{\mu_{m\acute{a}x}} = 51.01 \text{ ppm/h}$$

$$m = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} = 12.874 \text{ h}$$

A partir de estos resultados se calculan las constantes, tanto la tasa de crecimiento específica máxima de los microorganismos como la constante de Monod:

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{1}{m} = \frac{1}{12.874} = 0.00138 \text{ h}^{-1}$$

$$Ks = b * \mu_{m\acute{a}x} = 8.9112 \frac{ppm}{h} * 0.00138 h^{-1} = 0.0123 ppm = 0.0123 mg/L$$

Y un hipotético modelo de Monod queda de la siguiente forma:

$$rg = \mu_{m\acute{a}x} * \frac{m_{biomasa \text{ en } mg} * C_{procloraz (mg/L)}}{Ks + C_{procloraz (mg/L)}}$$

Sustituyendo las constantes se tiene el modelo cinético final:

$$rg \left( \frac{mg_{biomasa}}{h} \right) = 0.00138 h^{-1} * \frac{mg_{biomasa} * C_{procloraz} \left( \frac{mg}{L} \right)}{0.0123 \frac{mg}{L} + C_{procloraz} \left( \frac{mg}{L} \right)} \quad (Ec. 21)$$

**Modelo cinético de primer orden.** Para obtener una ecuación cinética de primer orden, se utilizaron aquellos datos del experimento a 24 horas que no presentan un comportamiento asintótico (ver Figura 3.9). A partir de estos datos se construyó la Tabla 3.7 con los datos cinéticos finales. Nótese que se emplearon los mismos tiempos que con el modelo de Monod.

**Tabla 3.7.** Datos cinéticos para el modelo de primer orden.

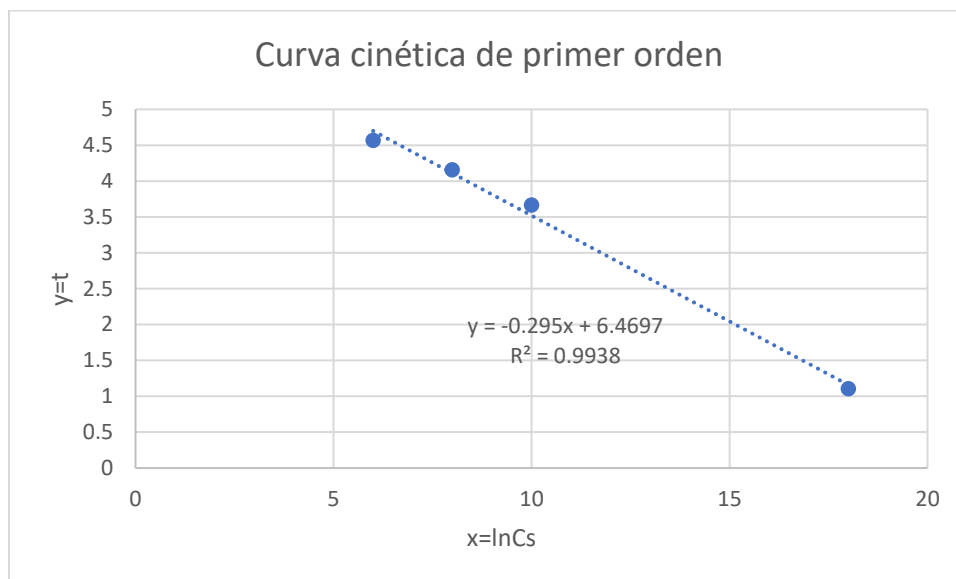
Horas (x)	C (ppm de procloraz)	ln C (y)
6	96.02	4.564537652
8	63.67	4.153749306
10	39.12	3.666728429
18	3.01	1.102890843

La ecuación linealizada del modelo cinético de primer orden especificada en el Capítulo 1 es la siguiente:

$$\ln C = -kt + \ln C_0 \quad (Ec. 5)$$



El gráfico obtenido de la ecuación (5) se muestra en la Figura 3.14:



**Figura 3.14.** Curva cinética de biodegradación de procloraz utilizando el modelo de primer orden. Se adjunta la ecuación del gráfico y el coeficiente de determinación  $R^2$ . Fuente: Elaboración propia.

Los datos se ajustan mucho mejor a este modelo que al de Monod. Los valores obtenidos de m y b del modelo lineal son:

$$m = -k$$

$$b = \ln C_0$$

A partir de estos resultados se calcula la constante de primer orden.

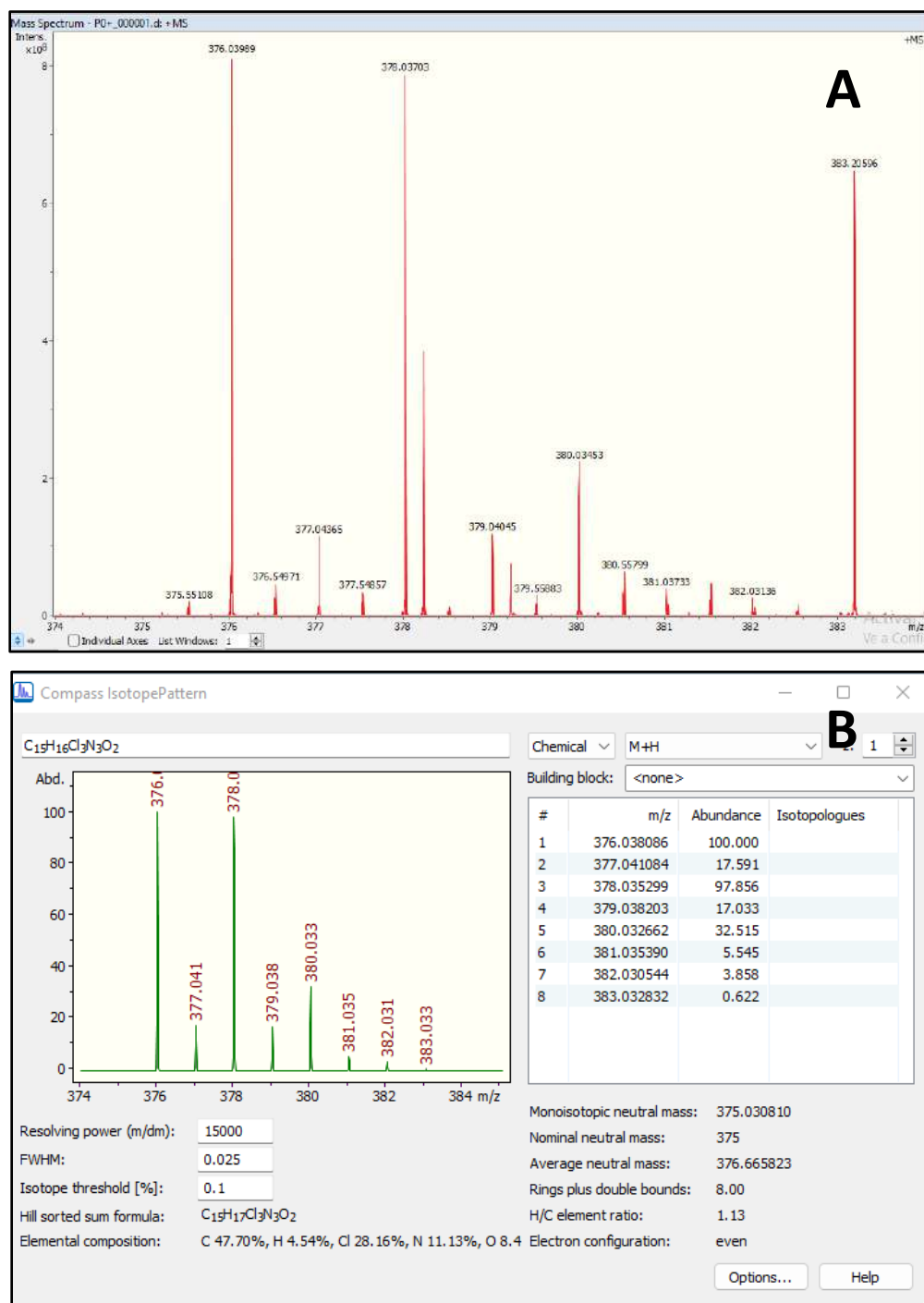
$$k = -m = -(-0.2950) = 0.2950 \text{ h}^{-1}$$

Y el modelo cinético de primer orden adquiere la siguiente forma, con la restricción que solamente es aplicable al momento en el que disminuye la concentración del procloraz.

$$\ln C = -0.2950t(h) + \ln C_0 \quad (\text{Ec. 22})$$

### 3.1.3. ESTUDIO METABOLÓMICO

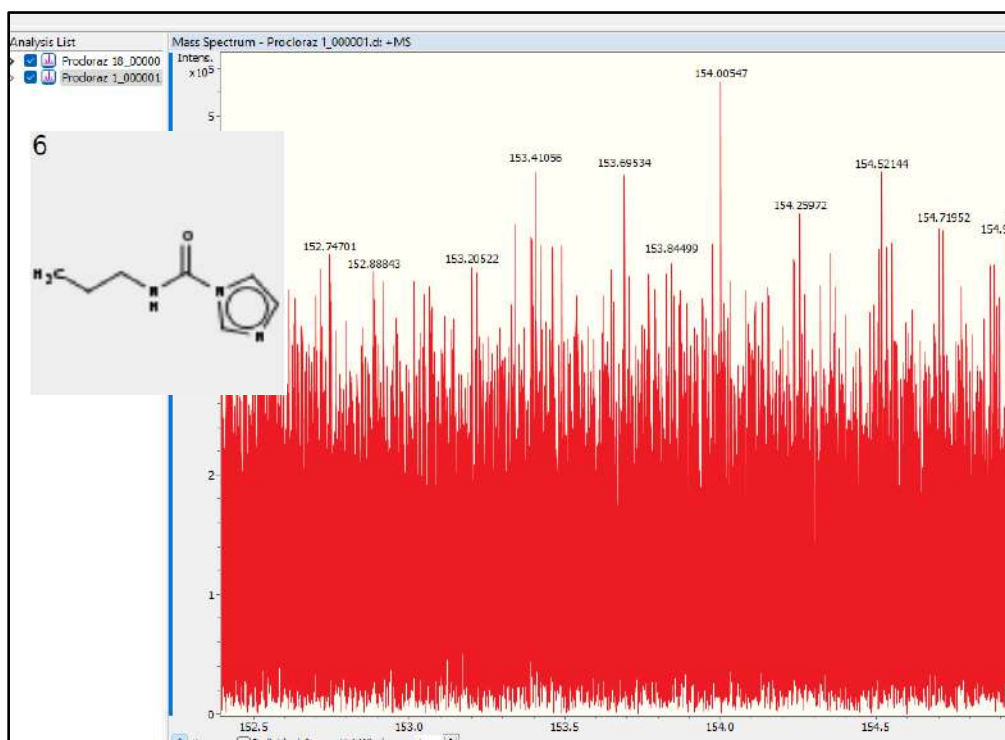
**Espectros de masa del procloraz.** El sobrenadante recolectado en tubos Eppendorf durante la prueba de biodegradación a un mes, una vez descongelado se inyectó en el espectrómetro de masas Solarix XR. Se obtuvo el espectro de masas de procloraz experimental al día cero, y se comparó con el espectro teórico calculado con la herramienta Isotope Pattern de Bruker (ver Figura 3.15).



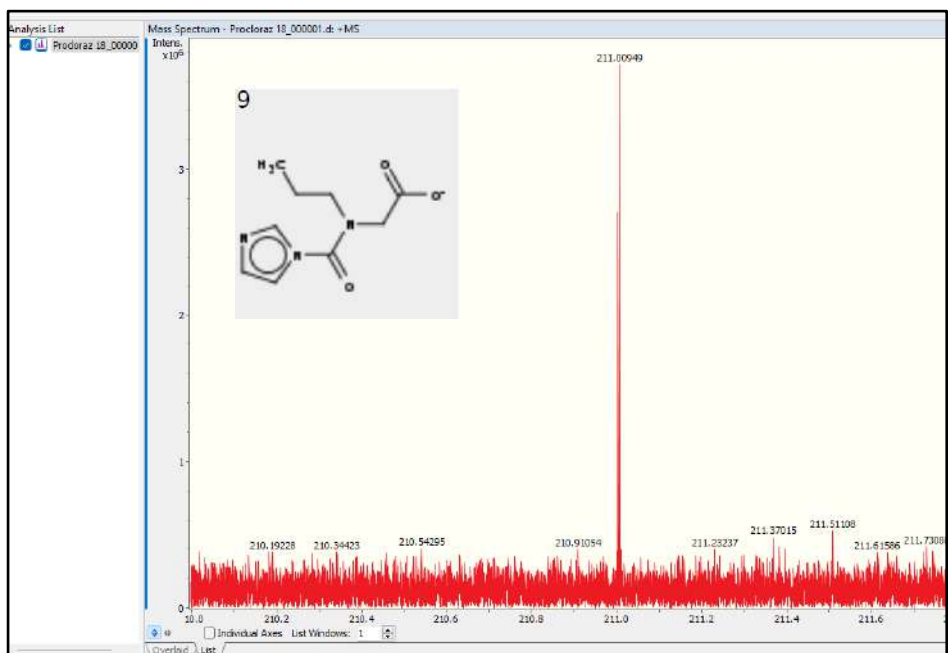
**Figura 3.15.** Comparación de espectros de masas del procloraz. **A).** El espectro de masas experimental obtenido en el día cero de la prueba a un mes. **B).** El espectro de masas teórico obtenido con el software Isotope Pattern.

**Datos para el análisis de metabolitos.** Para la identificación de metabolitos o productos de biodegradación, se utilizó el software MetaboScape en el que se leyeron los espectros obtenidos en la prueba a un mes y a un día. Las moléculas de interés son las mostradas en la Figura 1.6 del Capítulo 1 en la que se encontró lo siguiente:

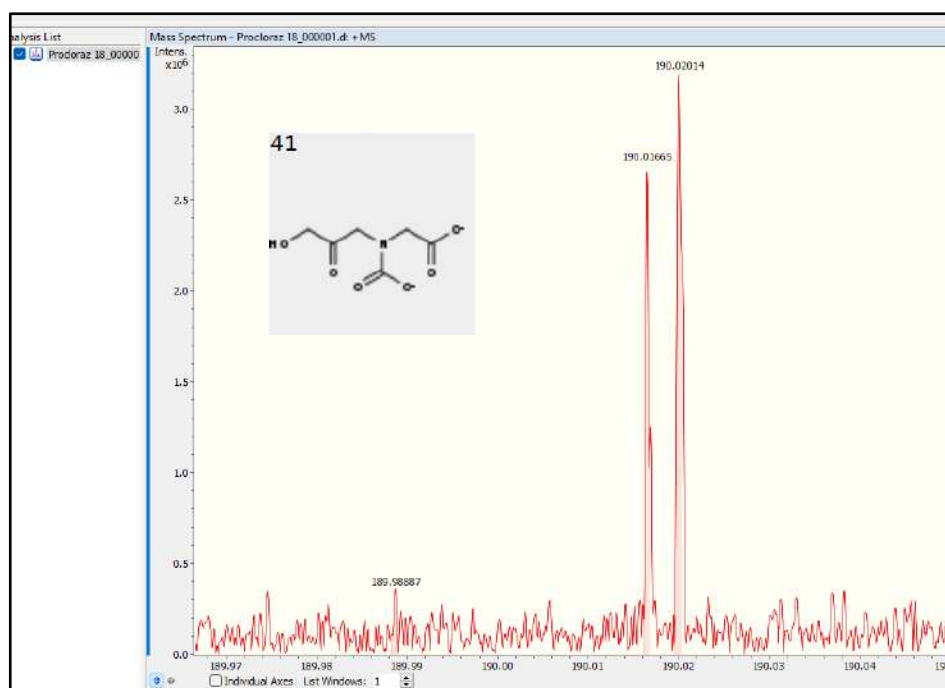
**Metabolitos encontrados en la prueba a un mes.** Se encontró la presencia de los fragmentos 6, 9, 41 y 42 en todas las muestras, a excepción del fragmento 9 que aparece desde el día 14 (ver Figuras 3.16 a 3.19). También se encontraron los fragmentos 18, 2 y 5 pero en muy baja concentración y cuyos picos pueden confundirse con el ruido (ver la Figura 3.20 con los resultados obtenidos en el MetaboScape).



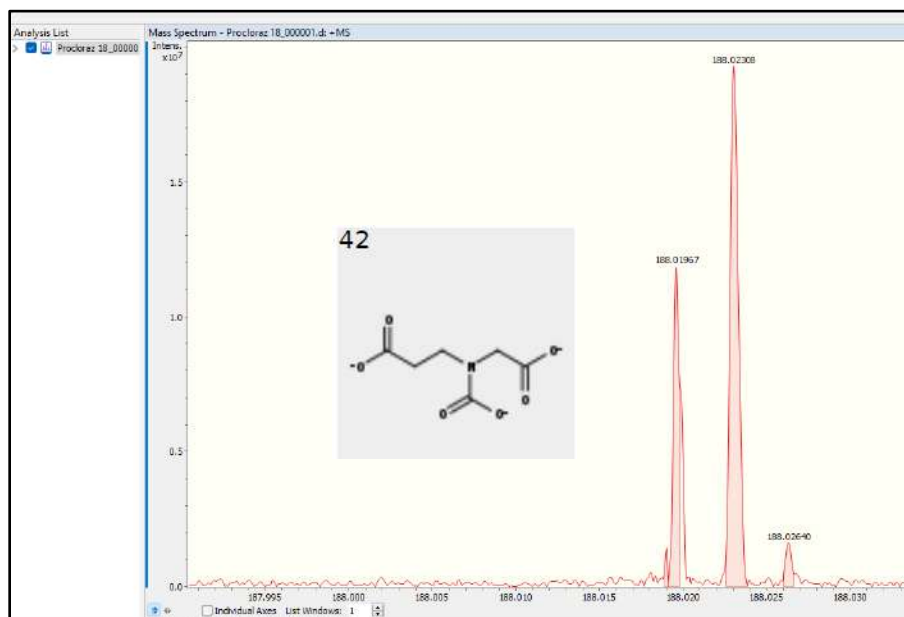
**Figura 3.16.** Espectro correspondiente al fragmento 6 con ion molecular  $m/z=154.00547$ .



**Figura 3.17.** Espectro correspondiente al fragmento 9 con ion molecular  $m/z=211.00949$ .



**Figura 3.18.** Espectro correspondiente al fragmento 41 con ion molecular  $m/z=190.01665$ .



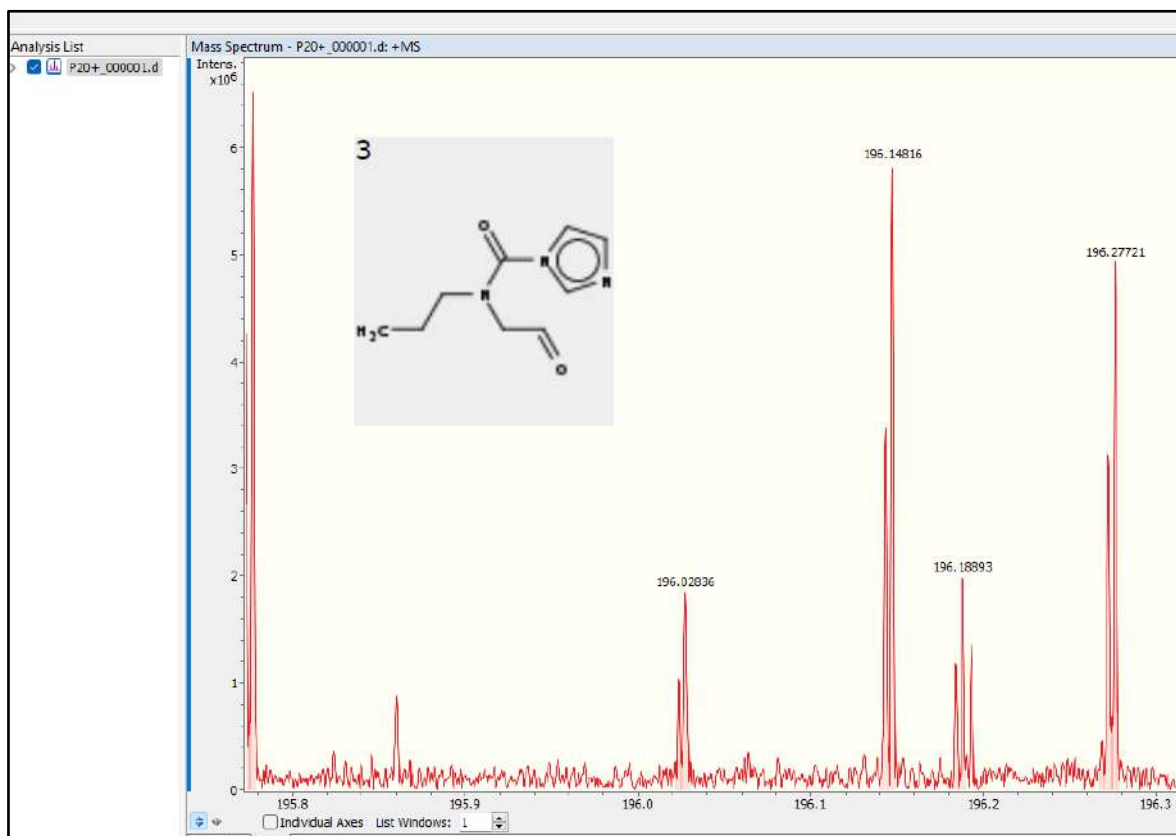
**Figura 3.19.** Espectro correspondiente al fragmento 42 con ion molecular  $m/z=188.01967$ .

*Feature Table											
	m/z meas.	M meas.	Ions	Name	Molecular For...	Annotations	AQ	Annotation So...	Boxplot	Flags	Include
1	372.87033	337.92116	±	Frac18	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>4</sub>			Procloraz fórm...			✓
2	219.00256	196.02067	±	Frac2	C <sub>8</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O			Procloraz fórm...			✓
3	218.90676	195.96729	±	Frac2	C <sub>8</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O			Procloraz fórm...			✓
4	196.87969	195.87242	±	Frac2	C <sub>8</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O			Procloraz fórm...			✓
5	224.03025	189.00232	±	Frac41	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>8</sub>			Procloraz fórm...			✓
6	190.01986	189.01258	±	Frac41	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>8</sub>			Procloraz fórm...			✓
7	189.02117	188.01559	±	Frac42	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>8</sub>			Procloraz fórm...			✓
8	206.14065	188.10663	±	Frac42	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>8</sub>			Procloraz fórm...			✓
9	189.01814	188.01086	±	Frac42	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>8</sub>			Procloraz fórm...			✓
10	189.01926	188.01198	±	Frac42	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>8</sub>			Procloraz fórm...			✓
11	188.96997	187.96270	±	Frac42	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>8</sub>			Procloraz fórm...			✓
12	69.04545	68.03817	±	Frac5	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>			Procloraz fórm...			✓
13	154.00366	152.99639	±	Frac6	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O			Procloraz fórm...			✓
14	211.08150	210.07422	±	Frac9	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>			Procloraz fórm...			✓
15	211.00985	210.00257	±	Frac9	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>			Procloraz fórm...			✓
16	211.19149	210.18421	±	Frac9	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>			Procloraz fórm...			✓
17	398.02445	375.01648	±								✓

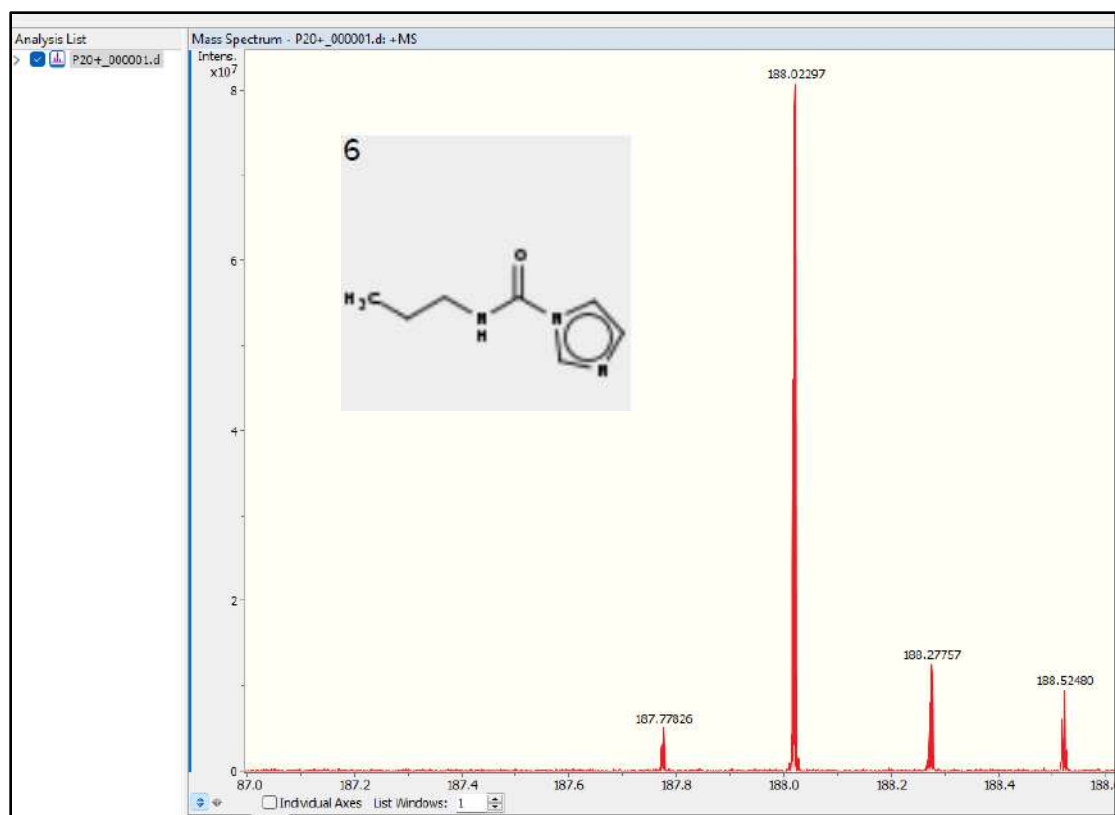
**Figura 3.20.** Metabolitos encontrados con el software MetaboScape de Bruker a un mes.

Ver las relaciones m/z determinadas.

**Metabolitos encontrados en la prueba a un día.** En el experimento a 24 horas se encontró una mayor diversidad de metabolitos, que incluyen los fragmentos 3, 6, 16, 20, 37, 41, 42 y 47 (Figuras 3.21 a 3.28). Otros metabolitos fueron detectados por el programa MetaboScape (Figura 3.29) en cantidades muy pequeñas y que pueden confundirse con ruido.

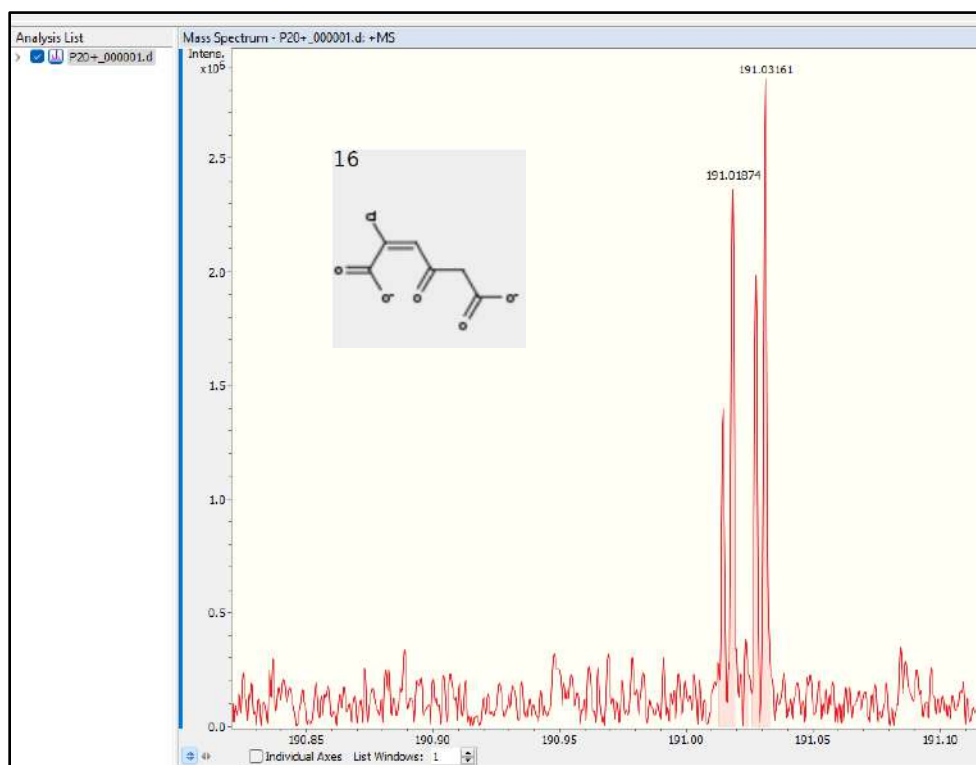


**Figura 3.21.** Espectro correspondiente al fragmento 3 con ion molecular  $m/z=193.14816$ .

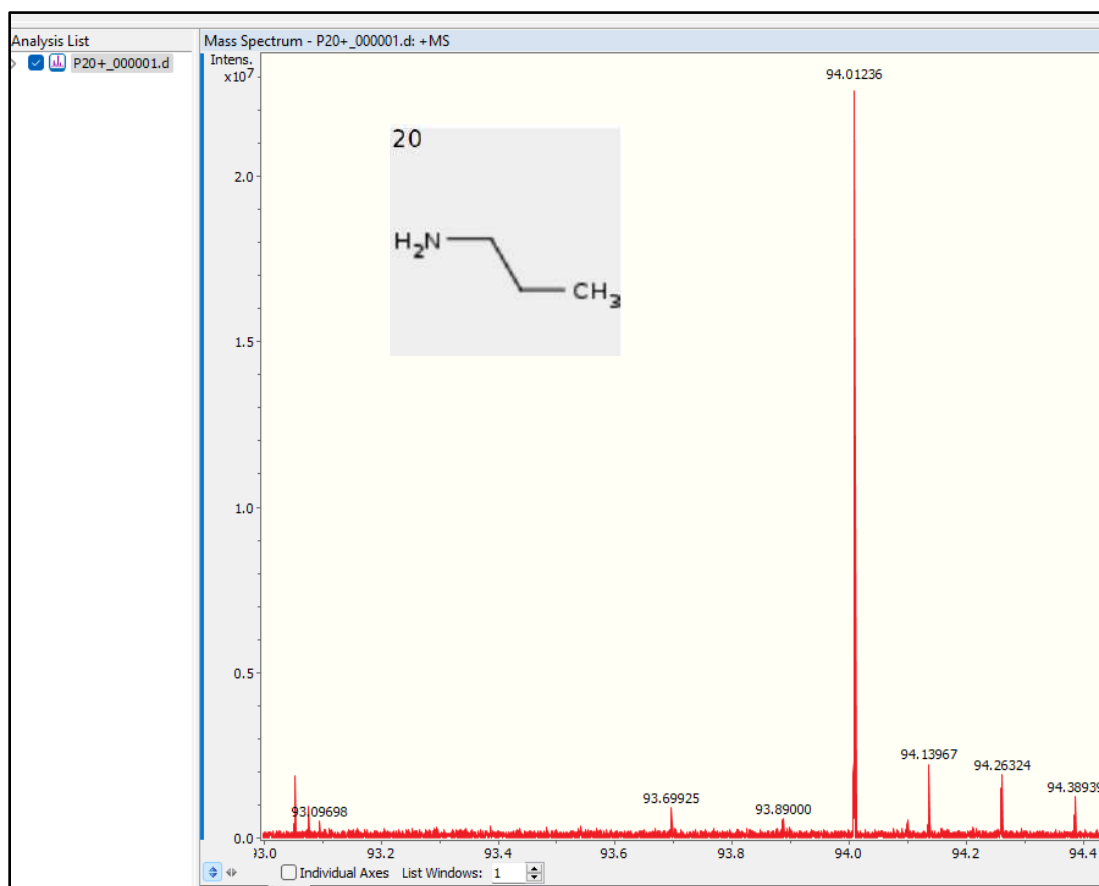


**Figura 3.22.** Espectro correspondiente al fragmento 6 con ion molecular  $m/z=188.02297$ .

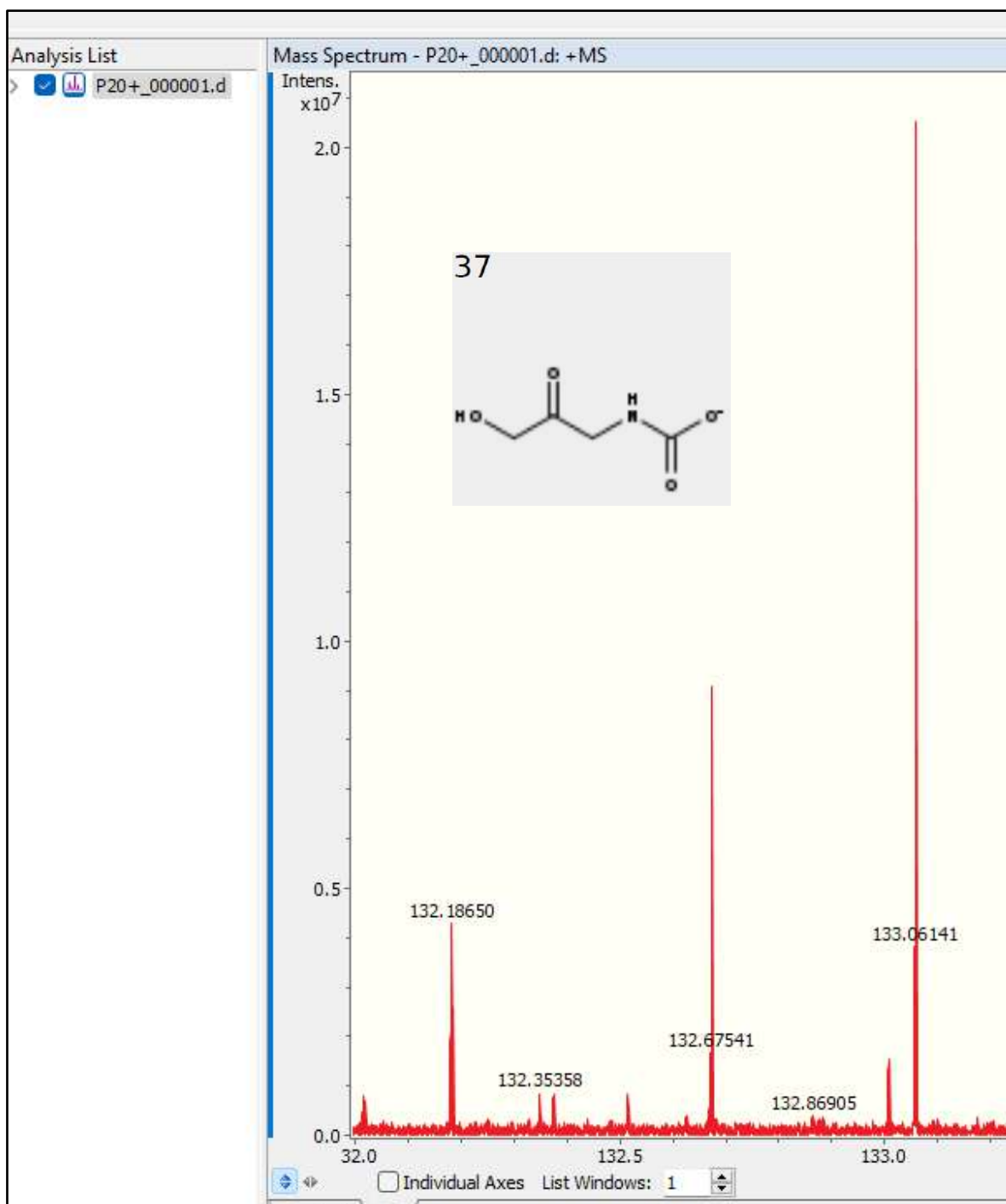




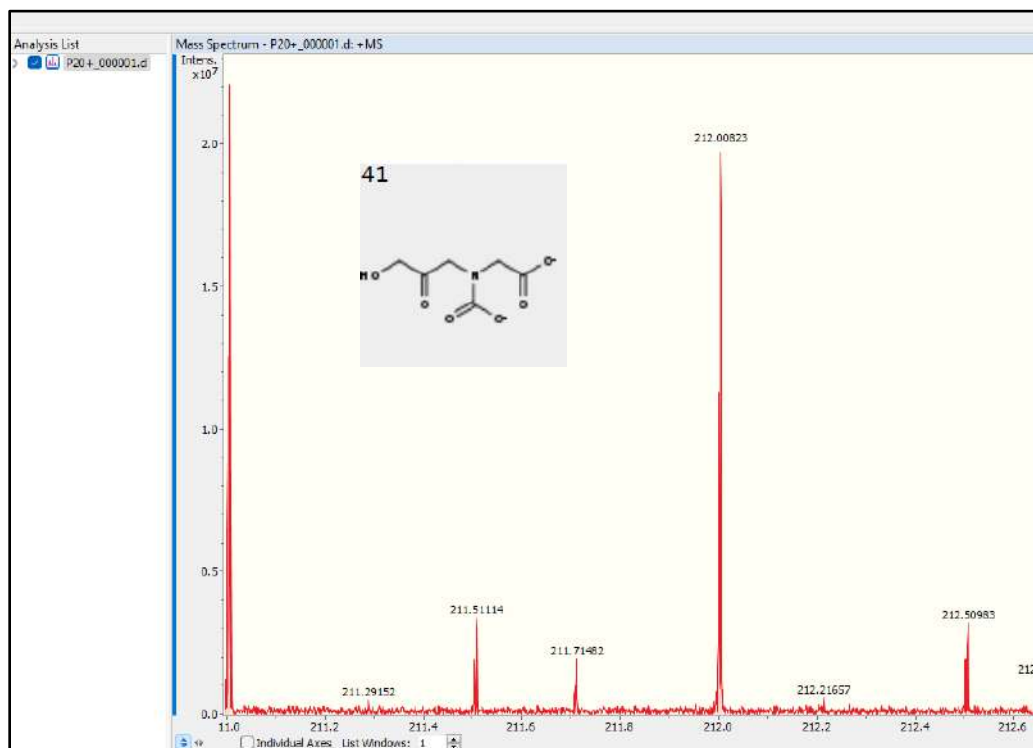
**Figura 3.23.** Espectro correspondiente al fragmento 16 con ion molecular  $m/z=191.03161$ .



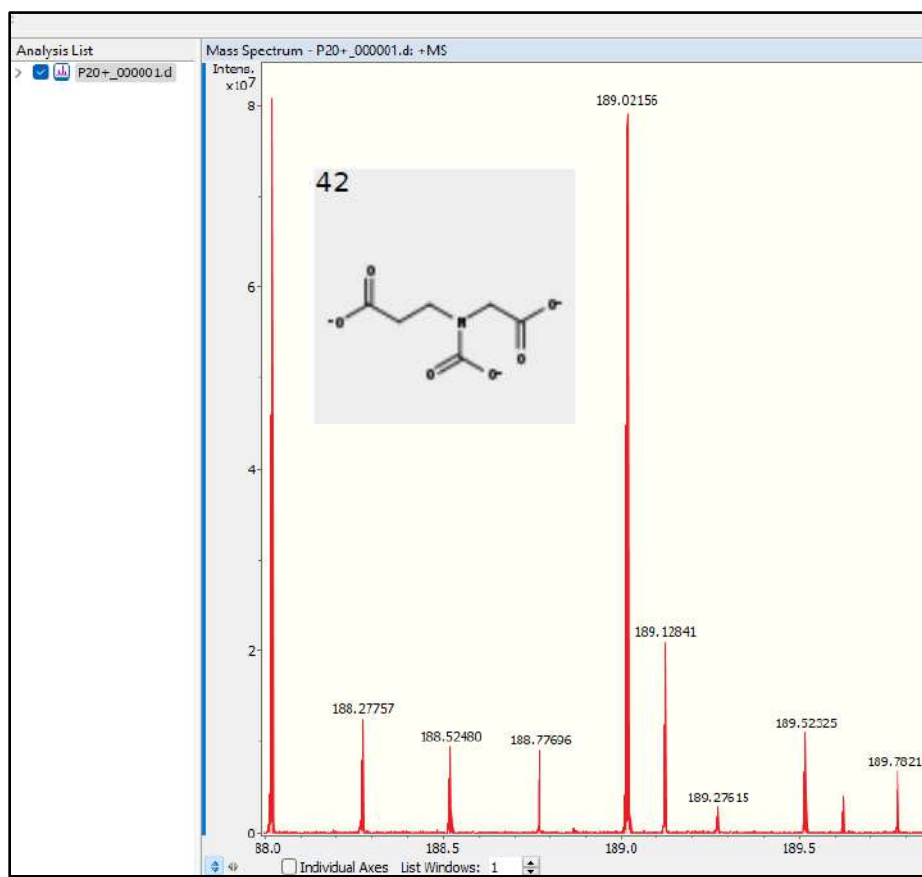
**Figura 3.24.** Espectro correspondiente al fragmento 20 con ion molecular  $m/z=94.01236$ .



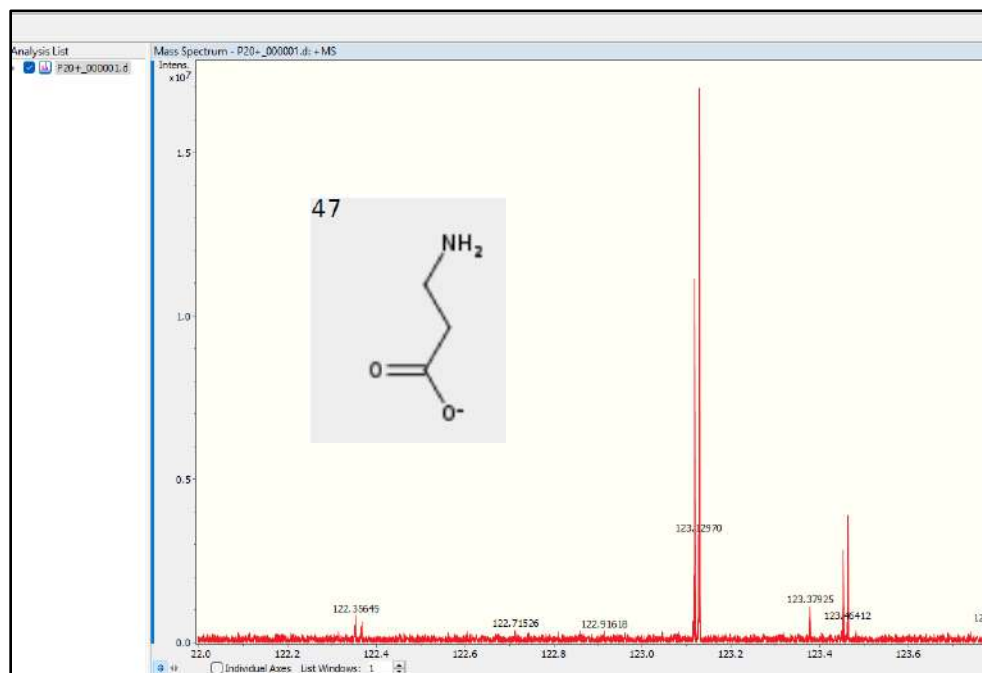
**Figura 3.25.** Espectro correspondiente al fragmento 37 con ion molecular  $m/z=133.06141$ .



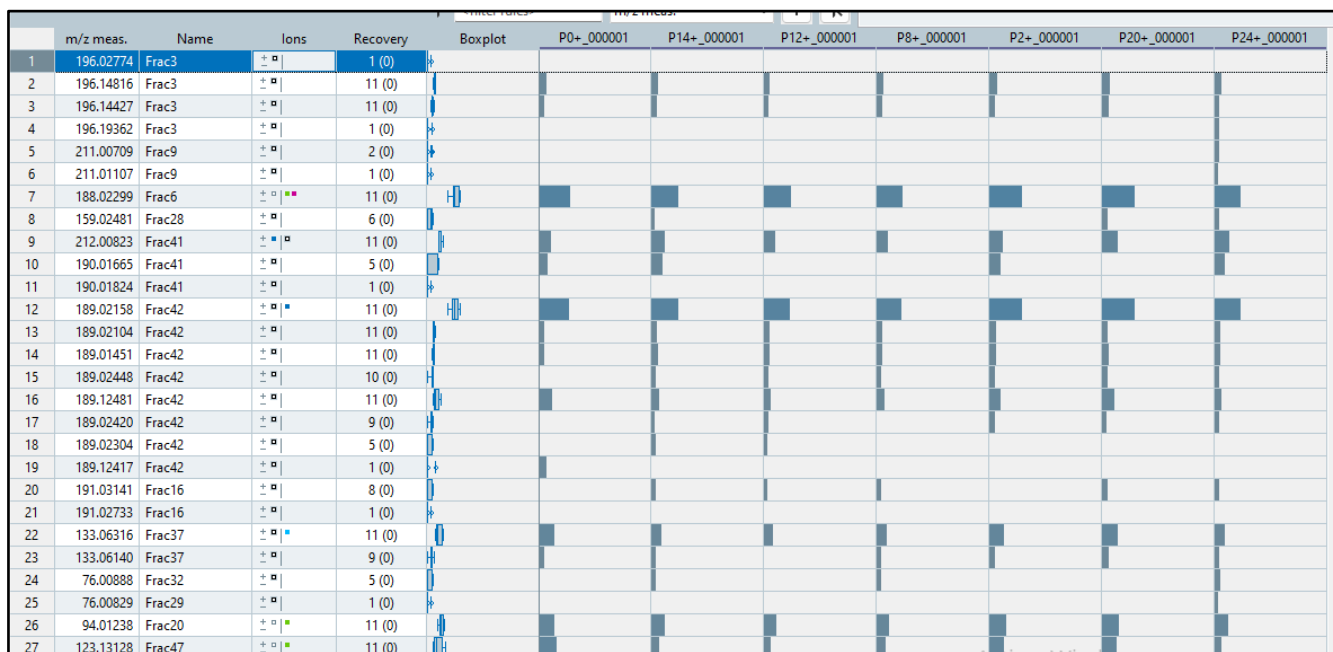
**Figura 3.26.** Espectro correspondiente al fragmento 41 con ion molecular  $m/z=212.00823$ .



**Figura 3.27.** Espectro correspondiente al fragmento 42 con ion molecular  $m/z=189.02156$ .



**Figura 3.28.** Espectro correspondiente al fragmento 47 con ion molecular  $m/z=123.12970$ .



**Figura 3.29.** Metabolitos encontrados con el software MetaboScape de Bruker a 24 horas.  
Ver las relaciones m/z determinadas.

En resumen, los metabolitos de la lista encontrados en ambos experimentos se encuentran en la Tabla 3.8, las casillas marcadas (X) indican que el metabolito fue identificado con éxito.

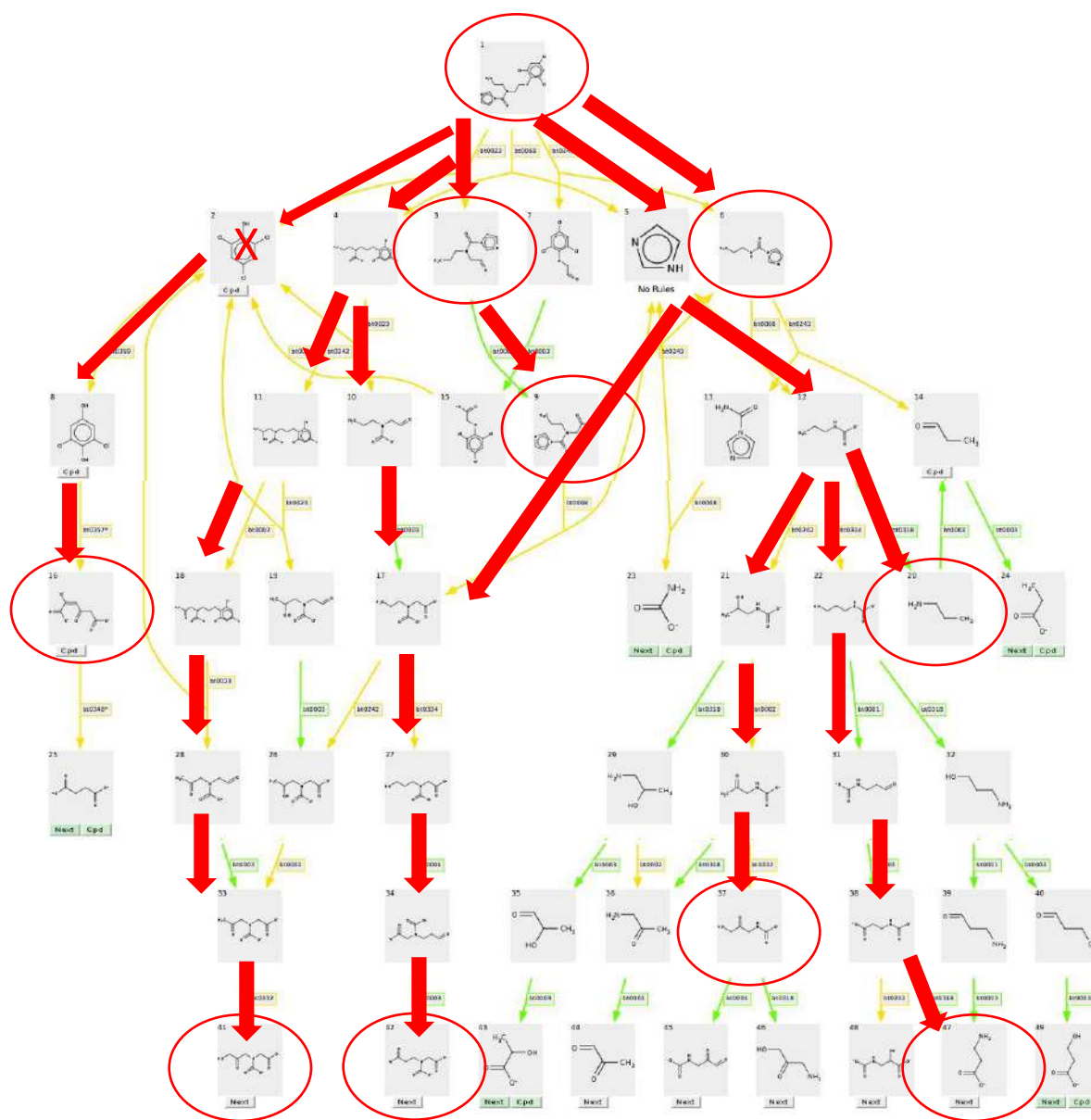
Tabla 3.8. Metabolitos encontrados en ambos experimentos.		
Fragmento	Prueba 1 mes	Prueba 24 h
1		
2		
3		X
4		
5		
6	X	X

7		
8		
9	X	
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		X
17		
18		
19		
20		X
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		

37		X
38		
39		
40		
41	X	X
42	X	X
43		
44		
45		
46		
47		X
48		
49		



La presencia de estos metabolitos sugiere las siguientes rutas metabólicas (ver Figura 3.30).



**Figura 3.30.** Ruta metabólica propuesta. Las flechas de color rojo representan las vías seguidas durante la biodegradación, los círculos rojos son los metabolitos encontrados (biomarcadores). Se recalca la no identificación del metabolito 2 correspondiente al TCP.

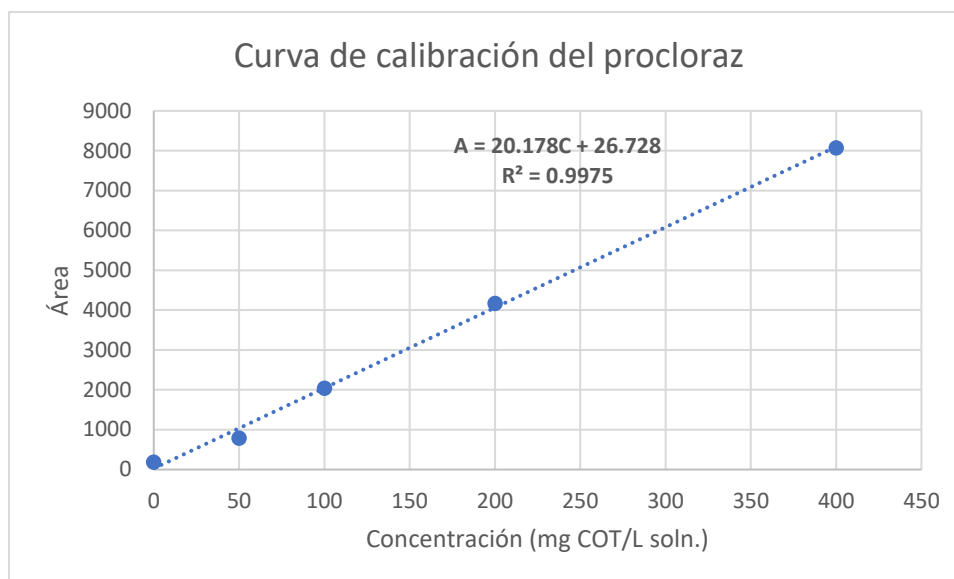
Fuente: Elaboración propia.

### 3.1.4. CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE LA MINERALIZACIÓN

De las lecturas obtenidas del análisis de COT se obtuvieron las áreas promedio de cada muestra, tanto de las soluciones que componen la curva de calibración como de las muestras iniciales y finales analizadas del proceso de biodegradación a 24 horas. Los resultados se indican en la Tabla 3.9. El software utilizado para analizar, monitorear las variables del proceso y leer los resultados fue ThEuS.

<b>Tabla 3.9.</b> Áreas obtenidas para las muestras analizadas por COT	
Concentración (mg/L)	<b>Área prom.</b>
0	188.03
50	786.09
100	2046.445
200	4173.66
400	8073.12
Muestras	<b>Área prom.</b>
Muestra inicial:	7528.46
Muestra final:	1652.395

A partir de los datos experimentales de áreas obtenidos a cada concentración, se construyó la curva de calibración para carbono orgánico total. Se adjuntan la ecuación lineal obtenida por regresión lineal y el coeficiente de determinación  $R^2$  (Figura 3.31).



**Figura 3.31.** Curva de calibración de Carbono Orgánico Total. Fuente: Elaboración propia.

Curva de calibración para el método de Carbono Orgánico Total:

$$A = 20.178C + 26.728 \quad (\text{Ec. 23})$$

Con la ecuación obtenida se calculó la concentración de carbono orgánico total presente en las muestras al inicio y al final del experimento de biodegradación a 24 horas (Tabla 3.10):

<b>Tabla 3.10.</b> Cálculo de concentraciones de las muestras al inicio y al final de la biodegradación.			
<b>Muestras</b>	<b>Área prom.</b>	<b>Cálculo</b>	<b>Concentración (mg/L)</b>
Muestra inicial (0h):	7528.46	$\frac{7528.46 - 26.728}{20.178} =$	371.78
Muestra final (24 h):	1652.395	$\frac{1652.395 - 26.728}{20.178} =$	80.57

La eficiencia de la biodegradación en un lapso de 24 horas es la relación entre la diferencia de concentración de COT respecto a la concentración inicial, dado que la diferencia

representa la cantidad de carbono orgánico que se ha mineralizado durante el proceso de biodegradación.

$$\% \eta_{\text{mineralización}} = \frac{C_{\text{mineralizada}}}{C_{\text{inicial}}} * 100 \quad (\text{Ec. 24})$$

La cantidad mineralizada representa la diferencia entre los datos inicial y final, se trata de un proceso a volumen constante y las concentraciones pueden restarse.

$$\% \eta_{\text{mineralización}} = \frac{C_{\text{inicial}} - C_{\text{final}}}{C_{\text{inicial}}} * 100 \quad (\text{Ec. 25})$$

Sustituyendo valores:

$$\% \eta_{\text{mineralización}} = \frac{(371.78 - 80.57) \text{ mg/L}}{371.78 \text{ mg/L}} * 100$$

Se obtiene el siguiente porcentaje de mineralización:

$$\% \eta_{\text{mineralización}} = 78.33\%$$

Resultado que es equivalente a expresar que el 100-78.33=21.67% del carbono orgánico no se ha mineralizado después de un lapso de 24 horas. Cabe destacar que el porcentaje de mineralización es menor al porcentaje de biodegradación (78.33% < 97.49%), esto ocurre porque existen otras moléculas aparte del procloraz que pueden mineralizarse, como el disolvente, los aditivos y otros subproductos de biodegradación.

### **3.1.5. CÁLCULO DE LOS PORCENTAJES DE GERMINACIÓN.**

Los resultados de la prueba de toxicidad después de una semana indican que hay mayor germinación cuando se riega con la solución de medio mínimo con glucosa; mientras que las muestras que mostraron menor germinación fueron aquellas en las que se roció con la solución de medio mínimo con procloraz, de hecho, no hubo germinación. Las muestras regadas con el producto final mostraron una mayor germinación. La cantidad de semillas germinadas obtenidas después de una semana se muestran a continuación:

1. Atomizador con solución de medio mínimo:

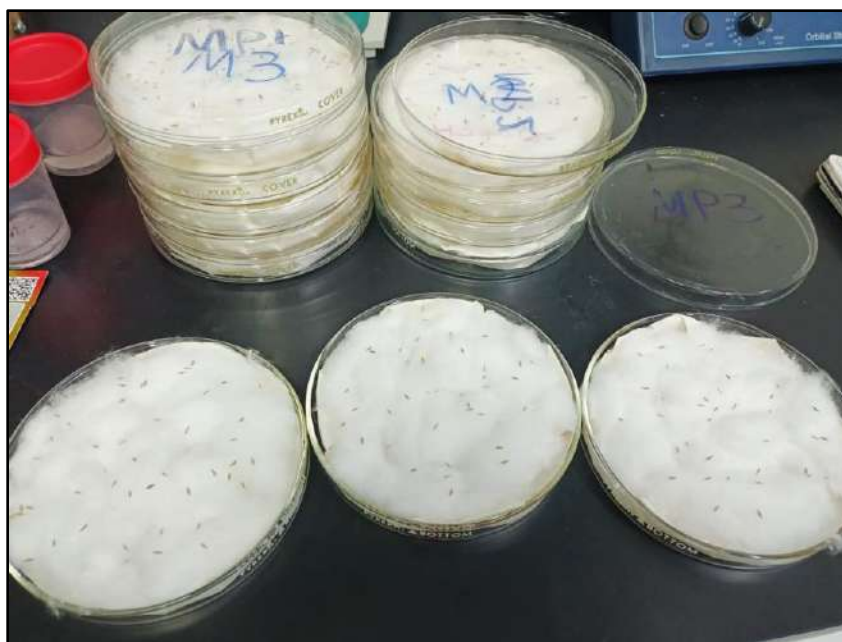


**Figura 3.32.** Muestras iniciales M1, M2 y M3.



**Figura 3.33.** Muestras finales M1, M2 y M3, con el número de semillas germinadas por caja Petri.

2. Atomizador con la solución de medio mínimo y procloraz:



**Figura 3.34.** Muestras iniciales MP1, MP2 y MP3.



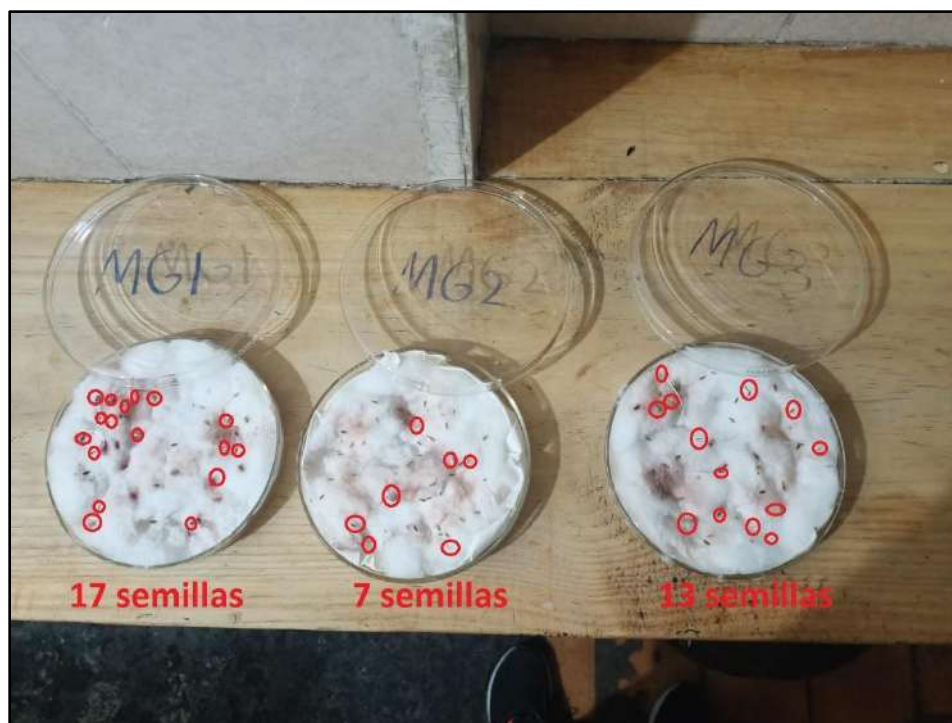
**Figura 3.35.** Muestras finales MP1, MP2 y MP3, con el número de semillas germinadas por caja Petri.



3. Atomizador con la solución de medio mínimo y glucosa:



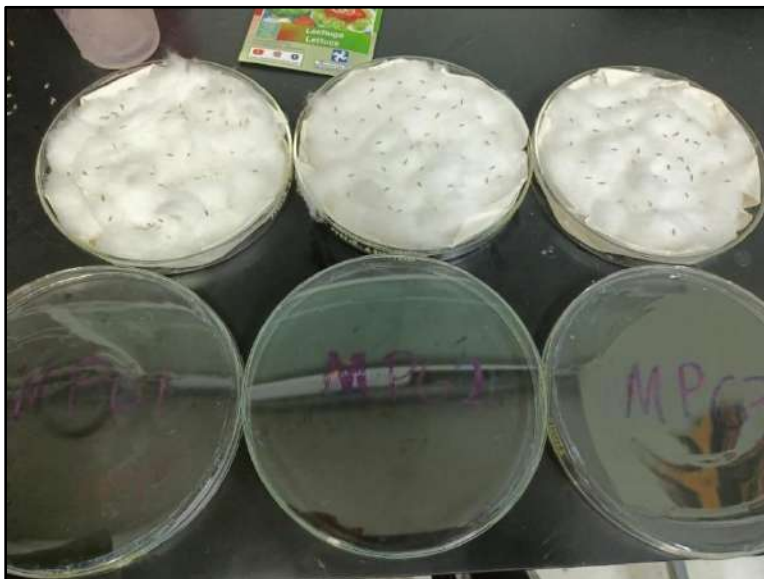
**Figura 3.36.** Muestras iniciales MG1, MG2 y MG3.



**Figura 3.37.** Muestras finales MG1, MG2 y MG3, con el número de semillas germinadas por caja Petri. El algodón se tornó de un color café.



4. Atomizador con la solución de medio mínimo, procloraz y glucosa:



**Figura 3.38.** Muestras iniciales MPG1, MPG2 y MPG3.



**Figura 3.39.** Muestras finales MPG1, MPG2 y MPG3, con el número de semillas germinadas por caja Petri.

5. Atomizador con el producto final de biodegradación:



**Figura 3.40.** Muestras iniciales PF1, PF2 y PF3.



**Figura 3.41.** Muestras finales PF1, PF2 y PF3, con el número de semillas germinadas por caja Petri. Fe de erratas: en la imagen se muestra como F1, F2 y F3; sin embargo, representa la misma nomenclatura PFN que se ha utilizado a lo largo del trabajo.

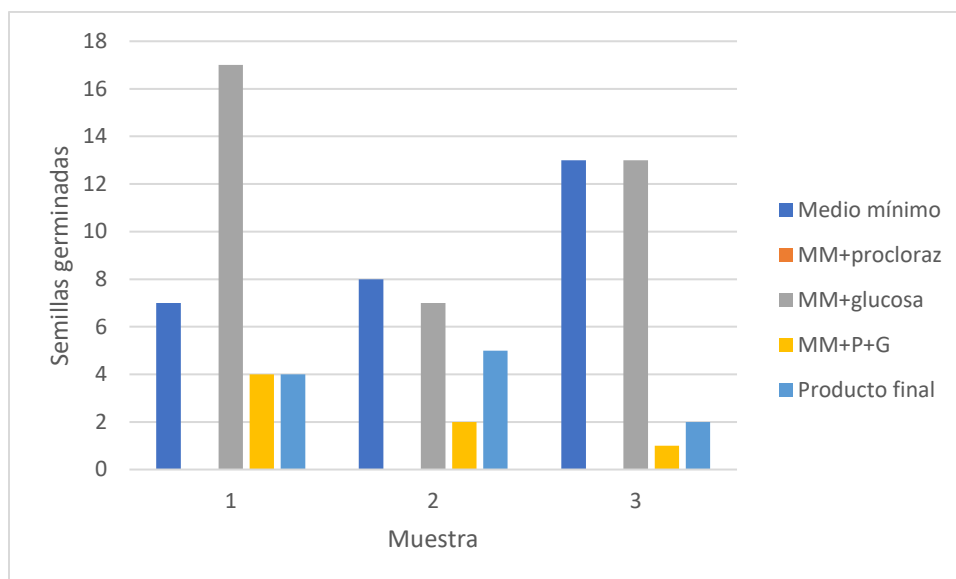


**Figura 3.42.** Muestras finales de cada muestra sin marcas. De izquierda a derecha y arriba hacia abajo: regadas son medio mínimo, regadas con medio mínimo y procloraz, regadas con medio mínimo y glucosa, regadas con medio mínimo, procloraz y glucosa, regadas con el producto final de biodegradación.

A partir de los datos de semillas germinadas por caja Petri, se calculó el porcentaje de las semillas que germinaron, posteriormente se obtuvo el promedio para cada solución con la que se regaron las semillas (Tabla 3.10). En la Figura 3.43 se muestra un gráfico de barras con las semillas germinadas en cada muestra y con cada solución.

**Tabla 3.10.** Porcentajes de germinación por caja y por solución. M=medio mínimo. MP=medio mínimo + procloraz. MG= medio mínimo + glucosa. MPG= medio mínimo + procloraz + glucosa. PF= producto final.

<b>Muestra</b>	<b>Semillas germinadas</b>	<b>Semillas totales</b>	<b>% Germinación</b>	<b>Promedio</b>
M1	7	50	14	18.67%
M2	8	50	16	
M3	13	50	26	
MP1	0	50	0	0 %
MP2	0	50	0	
MP3	0	50	0	
MG1	17	50	34	24.67 %
MG2	7	50	14	
MG3	13	50	26	
MPG1	4	50	8	4.67 %
MPG2	2	50	4	
MPG3	1	50	2	
PF1	4	50	8	7.33 %
PF2	5	50	10	
PF3	2	50	4	



**Figura 3.43.** Semillas germinadas con cada solución. Fuente: Elaboración propia.

### 3.2. DESCRIPCIÓN DE HALLAZGOS

Los resultados obtenidos indican un comportamiento esperado para el procloraz y sus productos de degradación. Para la fase de adaptación se encontró que el consorcio bacteriano mostró una adaptación rápida al procloraz incluso en el primer mes. Los espectros de UV-Vis mostraron una rápida degradación; sin embargo, los espectros no disminuyeron en los días subsecuentes, lo que indica que hay otros compuestos que absorben en esta región del espectro y estos se superponen al espectro del procloraz. Alrededor del día 10 se encontró que la forma del espectro cambia, lo cual coincide con la aparición del metabolito 9 en el análisis por espectrometría de masas, y justamente también en estos días es que hay un aumento del pH, por lo que se encuentra a este metabolito como responsable de los cambios sufridos en el sistema alrededor del décimo día. El análisis de las muestras por espectrometría de masas confirma que la biodegradación ocurre con satisfacción en un tiempo corto de 24 horas respecto al mes contemplado inicialmente.

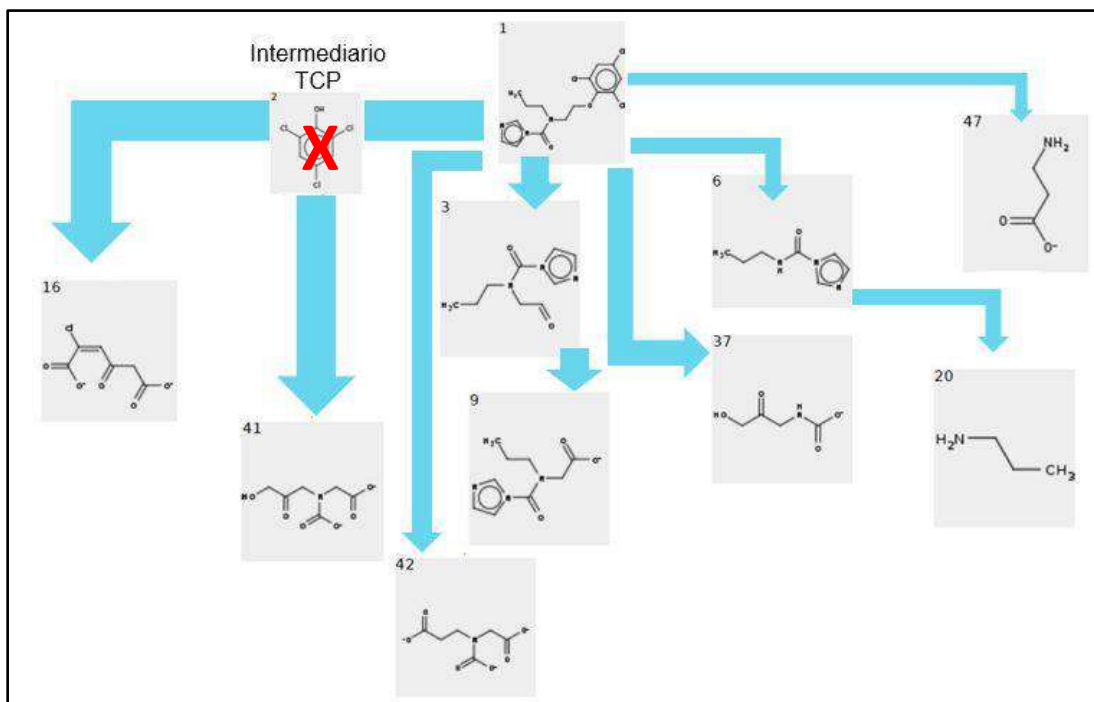
La eficiencia de biodegradación calculada de 78.33% coincide con la disminución alta de la concentración de procloraz en la prueba por espectrometría de masas, lo que sugiere que una

considerable cantidad de este contaminante es mineralizada y el resto forma parte de los subproductos, tales como la propanamina (fragmento 20). Es importante señalar que el porcentaje de mineralización (78.33%) es inferior al de biodegradación (97.49%). Esta discrepancia se debe a la presencia de otras moléculas, además del procloraz, que pueden experimentar mineralización, como el disolvente, los aditivos y otros subproductos de biodegradación.

También se encontró una clara disminución de la toxicidad, dado que las semillas de lechuga rociadas con el procloraz después de la biodegradación germinan mejor que aquellas regadas con la solución de procloraz a 100 mg/L con glucosa y aquellas regadas solamente con la solución de procloraz, donde no hubo germinación alguna; no obstante, aún hay mayor germinación con una solución que contiene solamente medio mínimo y más aún cuando hay presencia de glucosa, la cual funge como catalizador en el proceso de biodegradación al suministrar de nutrientes extra a las bacterias.

Un descubrimiento bastante importante, fue el que no se encontró la presencia de TCP (fragmento 2) durante la búsqueda de metabolitos. Lo que sugiere que una degradación bacteriana del procloraz no transcurre por la ruta de la formación de este tóxico subproducto; aunque cabe destacar que el fragmento 16 es un producto del TCP, por lo que es probable que todo el TCP es degradado (ver la Figura 1.6). A partir de los metabolitos encontrados y las rutas generadas por la herramienta EAWAG-BBD: Pathway Prediction. La aparición de los metabolitos, 3, 6, 9, 16, 20, 37, 41, 42 y 47 dan información sobre las rutas metabólicas y se consideran como los biomarcadores del proceso (ver Figura 3.44).





**Figura 3.44.** Metabolitos finales del proceso de biodegradación del procloraz. Fuente: Elaboración propia.

Respecto al modelo cinético, este proceso no es adecuado para el modelo de Monod, lo que pudo haberse predicho a partir del comportamiento de las variables como el crecimiento celular y la concentración del procloraz. Un modelo cinético de primer orden es muy adecuado, pero solamente para el tiempo en el que disminuye la concentración del procloraz. Los modelos finales son los siguientes:

Modelo de Monod.

$$rg \left( \frac{mg_{biomasa}}{h} \right) = 0.0778h^{-1} * \frac{mg_{biomasa} * C_{procloraz} \left( \frac{mg}{L} \right)}{3.9622 \frac{mg}{L} + C_{procloraz} \left( \frac{mg}{L} \right)} \quad (Ec. 21)$$

Modelo de primer orden.

$$\ln C = -0.2950t(h) + \ln C_0 \quad (Ec. 22)$$

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de la investigación proporcionan una visión esclarecedora del comportamiento del procloraz y sus productos de degradación cuando se someten a la biodegradación por un consorcio bacteriano. El procloraz es un compuesto de rápida degradación que presenta algunos subproductos, los cuales presentan cierta toxicidad, pero no mayor a la del procloraz, y el TCP sí se forma durante el proceso, pero es totalmente biodegradado en otro compuesto (fragmento 16). La degradación del procloraz ocurrió de manera satisfactoria en un corto período de 24 horas, por lo que un análisis a un tiempo mayor es innecesario para pruebas cinéticas, pero muy necesario para monitorear otras variables como la variación del pH o la aparición de otros metabolitos que puedan frenar el crecimiento bacteriano. Una vez alcanzada la máxima cantidad de procloraz degradado el consorcio continúa creciendo consecuencia de la presencia de los subproductos, la glucosa residual y del nitrógeno presente en el medio mínimo en forma de amonio; sin embargo, ya no es necesario mantener el reactor en funcionamiento después de alcanzado este punto.

El cambio en la forma del espectro UV-Vis alrededor del décimo día coincidió con la aparición del metabolito 9, que se identificó mediante espectrometría de masas. Este metabolito también se correlacionó con un aumento del pH en el sistema, sugiriendo su responsabilidad en las alteraciones observadas en ese período. Por este motivo NO se recomienda un análisis por espectroscopía UV-Vis para medir la concentración de procloraz, otras técnicas como HPLC empleando algún método presente en la literatura, o bien, por espectrometría de masas usando el método descrito en el Capítulo 2, son mejores opciones para medir la concentración de este fungicida en póstumos trabajos de investigación.

La eficiencia de mineralización, calculada de 78.33% por COT, se alineó con la notable disminución en la concentración de procloraz, indicando que una cantidad significativa de este contaminante se mineralizó, mientras que el resto contribuyó a la formación de subproductos y que también corresponde al procloraz que no ha sido degradado. Otro motivo por el cual es complicado la biodegradación del 100% del procloraz es por su toxicidad consecuencia del grupo imidazol en su molécula, y a la presencia de cloro, que también pueden ser motivos del poco desarrollo bacteriano a partir del décimo día.



Un hallazgo relevante fue la ausencia de TCP (fragmento 2) durante la búsqueda de metabolitos; pero la presencia de metabolitos como el 16 (ver Figura 3.30) sugieren que la ruta bacteriana de degradación del procloraz involucra la formación de este subproducto tóxico, pero se descompone en algún momento. El resto de los subproductos que desaparecen después de un mes fueron mineralizados; mientras que en algún momento cuando la cantidad de procloraz es escasa, hay una predilección por la formación del metabolito 9.

La reducción evidente de toxicidad, respaldada por un mejor rendimiento de germinación en semillas de lechuga tratadas después de la biodegradación, destaca los beneficios ambientales de este proceso. Además, la presencia de diversos metabolitos (3, 6, 9, 16, 20, 37, 41, 42 y 47) proporciona información valiosa sobre las rutas metabólicas involucradas en la biodegradación del procloraz, el cual sigue diversas rutas para convertirse en los subproductos finales identificados, y en otros que en algún momento del análisis se degradaron por completo. Los mecanismos por los cuales ocurren estas reacciones son tema de futuras investigaciones. En conjunto, estos resultados ofrecen perspectivas significativas para el entendimiento y control de los impactos ambientales de este fungicida.



## BIBLIOGRAFÍA

Belchik, S. M. (mayo de 2009). Biochemical Characterization of 2,4,6-Trichlorophenol degradation in a bacterium cupriavidus Necator JMP134. Obtenido de <https://www.proquest.com/docview/305018864/7A8C9A768675499BPQ/2?accountid=161093>

Bertomeu-Sánchez, J. R. (2019). Introduction. Pesticides: Past and Present. *HoST - Journal of History of Science and Technology*, 13(1), 1–27. <https://doi.org/10.2478/host-2019-0001>

Bhasker Reddy, G. V., Sollewijn Gelpke, M. D., & H. Gold, M. (octubre de 1998). Degradation of 2,4,6-Trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of Reductive Dechlorination. *Journal of Bacteriology*, 180(19), 5159-5164. doi:0021-9193/98/\$04.0010

Bock, C., Kroppenstedt, R. M., Schmidt, U., & Diekmann, H. (1996). Degradation of prochloraz and 2,4,6-trichlorophenol by environmental bacterial strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(1-2), 257-262. <https://doi.org/10.1007/s002530050680>

*Catálogo Oficial de Plaguicidas*. (1996). México.

César Tomé. (2014, abril 14). *El caso de Rachel Carson*. Cuaderno de Cultura Científica. <https://culturacientifica.com/2014/04/14/el-caso-de-rachel-carson/>

Claudia Peralta Vázquez. (2019, julio 9). En riesgo, cultivo de maíz en México. *Universo - Sistema de noticias de la UV*. <https://www.uv.mx/prensa/reportaje/en-riesgo-cultivo-de-maiz-en-mexico/>

Cruz-Narváez, Y., Rico-Arzate, E., Castro-Arellano, J. J., Noriega-Altamirano, G., Piña-Escobedo, A., Murugesan, S., & García-Mena, J. (2018). Obtaining microorganisms in cloud forest soils for the degradation of aromatic hydrocarbons. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 25(1), 95-106. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2018.06.055>

C. Sinuco, D., C. Pérez, A., & Moreno, N. (enero-junio de 2017). Evaluación de la actividad fungicida e. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIX(1), 63-70. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.65969

Díaz, J. C. (enero-junio de 2011). Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 64(1), 5867-5882. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179922364012>

EAWAG. (2019). *EAWAG-BBD Pathway Prediction System*. <http://eawag-bbd.ethz.ch/predict/>

Fogler, H. S. (2001). Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas (Tercera ed.). México: Pearson Educación.

*Hoja-de-Seguridad-Sportak-45-CE.pdf*. (s. f.). Recuperado 23 de enero de 2024, de <https://fmcagroquimica.com.mx/wp-content/uploads/2023/03/Hoja-de-Seguridad-Sportak-45-CE.pdf>

Janakat, S., Al-Nabulsi, A. A. R., Allehdan, S., Olaimat, A. N., & Holley, R. A. (2015). Antimicrobial activity of amurca (olive oil lees) extract against selected foodborne pathogens. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(2), 259-265. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6508>

Ji, H., Chang, F., Hu, X., Qin, W., & Shen, J. (2013). Photocatalytic degradation of 2,4,6-trichlorophenol over g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> under visible light irradiation. *Chemical Engineering Journal*, 218, 183-190. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.12.033>

Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K., & Kobayashi, K. (2004). Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives*, 112(5), 524-531.

Mariscal-Amaro, L. A., Villaseñor-Mir, H. E., Solís-Moya, E., Hortelano-Santa Rosa, R., Martínez-Cruz, E., Mariscal-Amaro, L. A., Villaseñor-Mir, H. E., Solís-Moya, E., Hortelano-Santa Rosa, R., & Martínez-Cruz, E. (2020). Efecto de fungicidas sobre caracteres agronómicos, rendimiento y tizones foliares en trigo de temporal en México. *Revista fitotecnica mexicana*, 43(1), 71-78. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.1.71>

Melgarejo García, J. (2011). Fungicidas :mecanismos de acción de los fungicidas. *Revista Ventana al Campo Andino*, 193-202.

Mendoza, J. C., Perea, Y. S., & Salvador, J. A. (2011). Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote. *Avances en ciencias e ingeniería*, 2.

Moo-Muñoz, A., Azorín-Vega, E., Ramírez-Durán, N., & Moreno-Pérez, P. (2020). Estado de la producción y consumo de plaguicidas en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(2). <https://doi.org/10.56369/tsaes.3225>

Núñez-Zofío, M., Larregla, S., & Garbisu, C. (2011). Application of organic amendments followed by soil plastic mulching reduces the incidence of *Phytophthora capsici* in pepper crops under temperate climate. *Crop Protection*, 30(12), 1563-1572. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.08.020>

Obianom, C., & Sivakumar, D. (2018). Differential response to combined prochloraz and thyme oil drench treatment in avocados against the control of anthracnose and stem-end rot. *Phytoparasitica*, 46. <https://doi.org/10.1007/s12600-018-0663-9>

Omar Arellano Aguilar & Jaime Rendón von Osten. (2016). *La huella de los plaguicidas en México*.

Rosano, A., Gemelli, V., Giovannelli, C., Paciotti, G., Sabatucci, A., & Spagnolo, A. (2009). [Fertility changes in women working in greenhouses]. *La Medicina del lavoro*, 100(6), 448-454.

Statista Research Department. (2023, diciembre 12). *Volumen de producción mensual de insecticida agrícola en polvo México 2023*. Statista. <https://es.statista.com/estadisticas/594593/volumen-de-produccion-de-insecticida-en-polvo-en-mexico/>

Trejos, V. M., Fontalvo Alzate, J., & Gómez Garcia, M. Á. (2009). Descripción matemática y análisis de estabilidad de procesos fermentativos. *DYNA*, 76(158), 111-121.

Weidner, I. S., Møller, H., Jensen, T. K., & Skakkebaek, N. E. (1998). Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environmental Health Perspectives*, 106(12), 793-796. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106793>

## APÉNDICE A. GLOSARIO

**Adaptación.** Fase del experimento en la que las bacterias son adaptadas a un medio tal que estas puedan realizar sus funciones vitales con normalidad.

**Análisis cualitativo.** Análisis que busca conocer la composición química de una muestra. Responde a la pregunta. ¿Qué hay?

**Análisis cuantitativo.** Análisis que busca conocer la proporción o cantidad en la que se encuentra una sustancia en una muestra. Responde a la pregunta. ¿Cuánto hay?

**Análisis instrumental.** Análisis químico moderno en el cual se analizan las muestras usando instrumentos científicos.

**Biodegradación.** Proceso bioquímico en el cual un compuesto se descompone en moléculas más pequeñas gracias a microorganismos.

**Consortio.** Población bacteriana en la que coexisten diferentes especies y se comportan como una sola comunidad.

**Dosis Letal Media DT<sub>50</sub>.** Dosis de una sustancia en la que el 50% de la población (generalmente ratas) sufre de efectos tóxicos.

**Mineralización.** Proceso en el cual el carbono orgánico de una molécula pasa a ser carbono inorgánico, degradándose normalmente a CO<sub>2</sub> o carbonatos.

