



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

## Facultad de Química

### EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DEL PLAGUICIDA METAMIDOFOS POR CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE SUELO FLORÍCOLA DEL ESTADO DE MÉXICO

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:  
MARIBEL VERÓNICA ALBITER LÓPEZ

DIRIGIDA POR:  
DRA. PATRICIA BALDERAS HERNÁNDEZ  
DR. JORGE JAVIER RAMÍREZ GARCÍA  
M. EN SP. SERGIO HUMBERTO PAVÓN ROMERO

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, AGOSTO, 2019



## DEDICATORIAS

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo con número de registro MSCSQS-039, se desarrolló en los laboratorios de Análisis Instrumental y Microbiología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, los laboratorios de Absorción Atómica, Físicoquímicos y Adsorción del Instituto Tecnológico de Toluca y en los laboratorios de Biología Molecular y Microscopía Electrónica del Instituto de Biología de la Universidad Autónoma de México. La investigación forma parte del proyecto CONACYT “Proyectos de desarrollo científico para resolver problemas nacionales” con clave 215997.

## CONTENIDO

Síglas y símbolos .....	7
Índice de tablas .....	10
Índice de figuras .....	12
Resumen .....	14
Abstract .....	15
Introducción .....	16
1. Marco teórico .....	17
1.1. Plaguicidas .....	17
1.1.1. Clasificación .....	18
1.1.2. Plaguicidas organofosforados .....	21
1.1.3. Propiedades fisicoquímicas del metamidofos .....	25
1.1.4. Plaguicidas en Villa Guerrero .....	27
1.1.5. Plaguicidas en el suelo .....	30
1.1.6. Biodegradación de plaguicidas .....	31
1.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución .....	33
1.2.1. Mecanismos de sorción en HPLC .....	34
1.2.2. Instrumentación en un HPLC .....	35
1.3. Validación de métodos .....	36
Planteamiento del problema .....	41
Hipótesis y objetivos .....	44
2. Metodología .....	46
2.1. Muestreo y zona de estudio .....	46
2.2. Caracterización .....	48
2.2.1. Análisis textural y densidad aparente .....	49
2.2.2. Área superficial y tamaño de poro .....	49
2.2.3. pH .....	50
2.2.4. Conductividad eléctrica .....	50
2.2.5. Contenido de humedad .....	51

2.2.6. Análisis elemental .....	51
2.2.7. Carbono orgánico, materia orgánica y relación C/N.....	51
2.2.8. Nitrógeno total y amoniacal.....	52
2.2.9. Cuantificación de metales .....	53
2.2.10. Cuantificación de metamidofos .....	54
2.3. Aislamiento, identificación del consorcio bacteriano y estudios de biodegradación .....	57
2.3.1. Aislamiento del consorcio bacteriano.....	57
2.3.2. Identificación del consorcio bacteriano .....	58
2.3.3. Estudios de biodegradación del metamidofos .....	59
3. Resultados y discusión.....	60
3.1. Caracterización de suelo .....	60
3.1.1. Análisis textural y densidad aparente.....	60
3.1.2. Área superficial y tamaño de poro.....	60
3.1.3. Medición de pH .....	63
3.1.4. Medición de conductividad.....	65
3.1.5. Contenido de humedad.....	66
3.1.6. Carbono, nitrógeno, materia orgánica y relación C/N .....	66
3.1.7. Concentración de metales .....	71
3.1.8. Concentración de metamidofos .....	76
3.2. Identificación del consorcio bacteriano y pruebas de biodegradación.....	91
3.2.1. Identificación de cepas bacterianas .....	91
3.2.2. Pruebas de biodegradación .....	95
Conclusiones. ....	106
Referencias.....	108
Anexos.....	115

## SIGLÁS Y SÍMBOLOS

ACH <sub>E</sub>	Acetilcolinesterasa
Å	Ángstrom
ANOVA	Análisis de varianza
ATR	Reflexión Total Atenuada
b <sub>0</sub>	Ordenada al origen
b <sub>1</sub>	Pendiente
BET	Método Brunauer, Emmett y Teller
BJH	Modelo de Barreto, Joyner y Halenda
°C	grados Celsius
CENAM	Centro Nacional de Metrología
CLAR	Cromatografía de alta resolución, por sus siglas en español
CL <sub>50</sub>	Concentración letal 50
Cm	Centímetros
COPs	Compuestos orgánicos persistentes
CV	Coefficiente de variación
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
dNTPs	Dinucleótidos
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal 50
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
G	Gramos
H	Hora
HPLC	Cromatografía de alta resolución, por sus siglas en inglés
ICAMEX	Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México
IDA	Ingesta diaria aceptable

IR	Infrarrojo
K	Kelvin
Kg	Kilogramo
$K_{ow}$	Coeficiente de partición octanol-agua
kV	Kilovoltio
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ND	No detectable
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{L}$	Microlitros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
OMS	Organización Mundial de la Salud por sus siglas en español
OPs	Organofosforados
$P$	Presión absoluta
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
$p_o$	Presión de saturación
$p/p_o$	Presión relativa
$R^2$	Coeficiente de determinación
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
S	Desviación estándar
$S_{bo}$	Desviación estándar de la ordenada al origen
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido por sus siglas en inglés
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
STP	Estado estándar (T= 273.15 K y 101.3 kPa)

TCD	Detector de Conductividad Térmica
TSA	Agar tripticaseína
UI	Unidad Internacional
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible
$V_a$	Cantidad específica adsorbida expresada en volumen de gas.
WHO	Organización Mundial de la Salud, por sus siglas en inglés

Tabla 1. Clasificación química de los plaguicidas .....	19
Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas por su toxicidad .....	20
Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas según su persistencia .....	20
Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas por su uso .....	21
Tabla 5. Toxicidad de plaguicidas organofosforados en ratas .....	24
Tabla 6. Identificación de signos y síntomas de intoxicación por organofosforados .	25
Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas del metamidofos y acefato .....	27
Tabla 8. Organofosforados y carbamatos seleccionados por su importancia .....	29
Tabla 9. Concentraciones de metamidofos en un vivero de Villa Guerrero	29
Tabla 10 Mecanismos que influyen en la persistencia y evolución de los plaguicidas en el suelo .....	31
Tabla 11. Estudios de biodegradación del plaguicida metamidofos .....	33
Tabla 12. Condiciones de conservación de muestras de suelo para los diferentes parámetros de análisis .....	48
Tabla 13. Clasificación de suelo por densidad aparente .....	49
Tabla 14. Clasificación de suelo por pH .....	50
Tabla 15. Clasificación de suelo por conductividad .....	51
Tabla 16. Clasificación de suelo por materia orgánica .....	52
Tabla 17. Valores de referencia para metales en suelo .....	53
Tabla 18. Metales constituyentes de las rocas y minerales .....	54
Tabla 19. Características fisicoquímicas en los puntos de suelo .....	76
Tabla 20. Bandas del metamidofos por espectrofotometría de infrarrojo .....	78
Tabla 21. Absorbancia del metamidofos a diferentes longitudes de onda .....	80
Tabla 22. Resultados de adecuabilidad del sistema .....	80
Tabla 23. Resultados de linealidad del sistema .....	81
Tabla 24. Resultados de LD y LQ .....	82
Tabla 25. Resultados de linealidad del método .....	83
Tabla 26. Resultados de repetibilidad día 1 .....	85
Tabla 27. Resultados de repetibilidad día 2 .....	86
Tabla 28. Evaluación del método para la cuantificación de metamidofos .....	87

Tabla 29. Evaluación del método para la extracción de metamidofos.....	88
Tabla 30. Resultados de tinción de Gram, catalasa y oxídasa en las cepas aisladas .....	.91
Tabla 31. Identificación del consorcio bacteriano.....	.94
Tabla 32. Porcentaje de degradación del metamidofos en los blancos de pH .....	.98
Tabla 33. Porcentaje de degradación del metamidofos en los blancos de temperatura .....	.99

Figura 1. Consumo de plaguicidas en México.....	18
Figura 2. Estructura general de los plaguicidas organofosforados.....	22
Figura 3. Estructura del metamidofos.....	26
Figura 4. Separación de mezclas en cromatografía.....	34
Figura 5. Vista área del sitio de muestreo.....	46
Figura 6. Isoterma adsorción/desorción de suelo.....	62
Figura 7. BET-Plot de suelo.....	63
Figura 8. pH en puntos de muestreo.....	64
Figura 9. Conductividad en puntos de muestreo.....	65
Figura 10. % de humedad en puntos de muestreo.....	66
Figura 11. Carbono orgánico, carbono y nitrógeno total en puntos de muestreo.....	68
Figura 12. Nitrógeno total en mg kg <sup>-1</sup> método de Kjeldahl.....	68
Figura 13. Nitrógeno amoniacal en mg kg <sup>-1</sup> método de Kjeldahl.....	69
Figura 14. Materia orgánica en puntos de muestreo.....	70
Figura 15. Relación C/N. en puntos de muestreo.....	70
Figura 16. Cobre en puntos de muestreo.....	71
Figura 17. Zinc en puntos de muestreo.....	72
Figura 18. Hierro en puntos de muestreo.....	72
Figura 19. Manganeso en puntos de muestreo.....	73
Figura 20. Plomo en puntos de muestreo.....	73
Figura 21. Cadmio en puntos de muestreo.....	74
Figura 22. Níquel en puntos de muestreo.....	74
Figura 23. Cromo en puntos de muestreo.....	75
Figura 24. Espectro IR de metamidofos obtenido en el proyecto.....	77
Figura 25. Espectro IR de metamidofos según Fleming, Villagrán, y Koch.....	78
Figura 26. Espectro UV-Vis de metamidofos en agua.....	79
Figura 27. Cromatograma de metamidofos en HPLC.....	81
Figura 28. Linealidad del sistema.....	82
Figura 29. Curva de calibración para Límite de detección y Límite de cuantificación.....	83

Figura 30. Linealidad del método .....	84
Figura 31. Cromatograma de suelo punto 1 .....	89
Figura 32. Cromatograma de suelo punto 2 .....	90
Figura 33. Cromatograma de suelo punto 3 .....	90
Figura 34. Cromatograma de suelo punto 4 .....	90
Figura 35. Cromatograma de suelo punto 5 .....	91
Figura 36. Imagen SEM de cepa A. ....	92
Figura 37. Imagen SEM de cepa B .....	92
Figura 38. Imagen SEM de cepa C. ....	93
Figura 39. Imagen SEM de cepa D. ....	93
Figura 40. Imagen SEM de cepa E. ....	94
Figura 41. Degradación del metamidofos por las cepas de manera independiente y en consorcio .....	96
Figura 42. Degradación del metamidofos por el consorcio bacteriano a diferentes valores de pH y temperatura de 30 °C .....	97
Figura 43. Degradación del metamidofos por el consorcio bacteriano a diferentes temperaturas y pH 7.0 .....	99
Figura 44. Degradación del metamidofos por el consorcio bacteriano vs tiempo....	100
Figura 45. Degradación del metamidofos por el consorcio bacteriano a diferentes concentraciones .....	101
Figura 46. Degradación del metamidofos por el consorcio bacteriano con dextrosa como fuente adicional de carbono.....	102
Figura 47. Degradación de metamidafos vs tiempo con dextrosa como fuente adicional de carbono .....	103
Figura 48. Cromatograma en 10 días de estudio de biodegradación del metamidofos como única fuente de carbono .....	104
Figura 49. Cromatograma en 10 días de estudio de bidegradación del metamidofos con dextrosa como fuente adicional de carbono .....	104
Figura 50 Ruta de biodegradación del metamidofos .....	105

El metamidofos considerado uno de los insecticidas más tóxicos, es usado para controlar insectos y ácaros en cultivos intensivos como la floricultura. Dado el uso indiscriminado de este y otros plaguicidas organofosforados en la zona florícola del Estado de México, su acumulación puede provocar el deterioro ambiental afectando la supervivencia de especies que no son el organismo blanco. En este proyecto se propuso degradar al metamidofos por medio de cepas bacterianas aisladas de suelo florícola de Villa Guerrero. Adicionalmente se evaluó, que parámetros se modifican en el suelo por el uso constante de plaguicidas organofosforados y otros agroquímicos. La cuantificación de metamidofos se realizó por HPLC, el muestreo y análisis de suelo conforme a la NOM-021-SEMARNAT-2000. Se aislaron 5 cepas bacterianas Gram negativas de un invernadero de *Gerbera jamesonii*, capaces de degradar una concentración de 200 mg L<sup>-1</sup> de metamidofos. Se obtuvo un porcentaje máximo de remoción del 58.05 % utilizando el consorcio bacteriano, en diez días de prueba, a un valor de pH 7.0 y temperatura de 35 °C. Cuando se empleó dextrosa como fuente adicional de carbono, el porcentaje de degradación del plaguicida aumento a 92.03 % bajo las mismas condiciones. Las cepas aisladas se identificaron por PCR de punto final como pertenecientes a los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Shinella*, *Pseudochrobactrum* y *Brevundimonas*. Los resultados de los parámetros del análisis del suelo que actualmente se está cultivando, se contrastaron con respecto al que no se ha sembrado. Se observó que aumentan los valores de conductividad (3.73 a 105.30 dS m<sup>-1</sup>), nitrógeno total (0.17 a 0.22 %), carbono total (2.09 a 3.71 %), y disminuyen los de pH (5.33 a 4.60 unidades de pH), el carbono orgánico (2.06 a 1.84 %) y la relación C/N (12.12 a 8.36), el metamidofos se encontró en el suelo que se cultiva en una concentración de 80 ± 11 mg Kg<sup>-1</sup>. Los resultados muestran que se modifican los valores en la mayoría de los parámetros evaluados por el uso frecuente de agroquímicos, y que la degradación del metamidofos con el consorcio bacteriano es favorecida si se utiliza una fuente adicional de carbono.

**ABSTRACT**

Methamidophos, considered one of the most toxic insecticides, is used to control insects and mites in intensive crops such as floriculture. Given the indiscriminate use of this and other organophosphorus pesticides in the floricultural zone of the State of Mexico, its accumulation can cause environmental deterioration, and consequently, affect the survival of species that are not target organisms. In this project, it was proposed to degrade methamidophos by means of bacterial strains isolated from the floricultural soil of Villa Guerrero. Additionally, it was evaluated which parameters are modified in the soil by the constant use of organophosphorus pesticides and other agrochemicals. The quantification of methamidophos was performed by HPLC, sampling and soil analysis according to the NOM-021-SEMARNAT-2000. Five Gram negative bacterial strains were isolated from a *Gerbera jamesonii* greenhouse, capable of degrading a concentration of 200 mg L<sup>-1</sup> of methamidophos. A maximum removal percentage of 58.05% was obtained using the bacterial consortium, in ten days of testing, at a pH of 7.0 and a temperature of 35 ° C. When dextrose was used as an additional source of carbon, the percentage of degradation of the pesticide increased to 92.03% under the same conditions. The isolated strains were identified by PCR of end point as belonging to *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Shinella*, *Pseudochrobactrum* and *Brevundimonas*. The results of the parameters of soil that is currently being cultivated with respect to the one that has not been sown were contrasted, it was observed that increase values of conductivity (3.73 to 105.30 dS m<sup>-1</sup>), total nitrogen (0.17 to 0.22 %), total carbon (2.09 to 3.71 %), and decrease pH (5.33 to 4.60 pH units), organic carbon (2.06 a 1.84 %) and the C / N ratio (12.12 to 8.36). The pesticide methamidophos was found in soil grown at a concentration of 80 ± 11 mg Kg<sup>-1</sup>. The results show that the values are modified in most of the parameters evaluated by the frequent use of agrochemicals, and that the degradation of methamidophos with the bacterial consortium is favored if an additional source of carbon is used.

La creciente demanda de alimentos por el incremento de la población; así como los altos estándares de calidad impuestos a los productos agrícolas, hacen que el uso de plaguicidas sea indispensable para asegurar la producción de los cultivos. Por otro lado, también permiten el control de organismos propagadores de enfermedades que afectan a los seres humanos y ganado. Es indiscutible el beneficio que aportan los plaguicidas en estos campos, sin embargo, el costo por el uso indiscriminado de estos compuestos altamente tóxicos y poco específicos, es la acumulación, el deterioro y contaminación del medio ambiente, que pone en riesgo la supervivencia de diferentes especies y compromete la salud del hombre.

Por ello es necesario desarrollar tecnologías que sean sencillas, fáciles de aplicar, de bajo costo, eficientes y amigables con el ambiente para la remoción de estos contaminantes. La biorremediación es una alternativa que cumple con los puntos anteriores. Las bacterias son los seres vivos con la mayor capacidad de adaptarse a condiciones ambientales extremas, en las que ningún otro ser puede sobrevivir, como son altas temperaturas, pH ácido o alcalino y medios tóxicos.

El objetivo de la presente investigación fue aislar un consorcio bacteriano de suelo florícola contaminado por el uso frecuente de plaguicidas organofosforados, capaz de degradar al metamidofos, así como determinar las condiciones de pH y temperatura con los que se obtienen los más altos porcentajes de degradación. Para poder evaluar la biodegradación, es preciso asegurar que los resultados de la cuantificación del metamidofos son confiables, por lo que fue necesario validar el método analítico de cuantificación por cromatografía de líquidos.

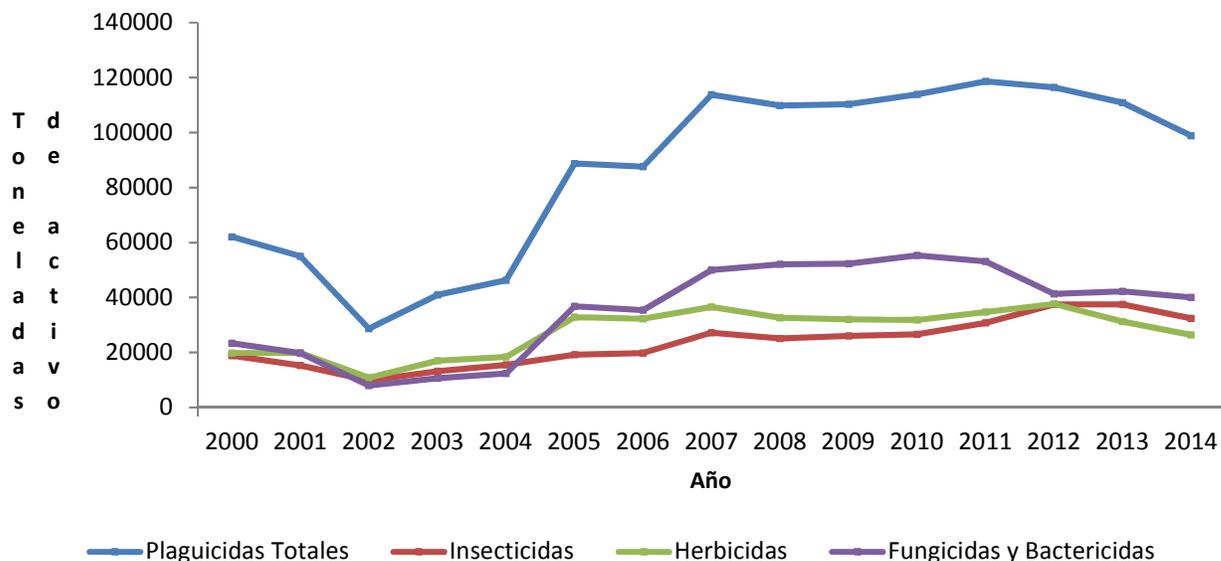
## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Plaguicidas

Los plaguicidas sintéticos surgen entre 1930 y 1940 como resultado de investigaciones enfocadas al desarrollo de armas químicas que originalmente fueron probadas en insectos. Uno de los primeros compuestos, el diclorodifeniltricloroetano (DDT) fue sintetizado por Zeidler en 1874, y sus propiedades insecticidas fueron descritas por Paul Müller hacia 1939 (Ramírez y Lacasaña, 2001).

El código internacional de conducta en la administración de plaguicidas, define los plaguicidas como: “Cualquier sustancia o mezcla de sustancias de ingredientes químicos o biológicos destinadas a repeler, destruir o controlar cualquier plaga, o regular el crecimiento de plantas” (FAO, 2014).

A partir del modelo de agricultura industrial impulsado en el país en las últimas décadas, el uso de plaguicidas (insecticidas, fungicidas y herbicidas) y fertilizantes sintéticos ha aumentado de forma preocupante (Arellano y Rendón, 2016). En el figura 1 se muestra el historial de consumo de plaguicidas en toneladas de activo en México, del año 2000 al 2014 según las estadísticas reportadas por la FAO (Faostat, 2018). Como consecuencia, el uso de fertilizantes sintéticos sigue ocasionando grandes daños a los suelos y ecosistemas. En el caso de los plaguicidas, amenazan a especies vitales para la producción de alimentos como los polinizadores, y a la salud de las personas debido a la alta toxicidad de las sustancias que se emplean en las tierras de cultivo y en los lugares de almacenamiento. Además, algunas de estas sustancias pueden ser altamente persistentes en los sistemas biológicos, es decir que permanecen y se transportan a través del ambiente aún después de su aplicación o después de haber sido prohibidos (Arellano y Rendón, 2016).



**Figura 1. Historial de consumo de plaguicidas en toneladas de activo en México, del año 2000 al 2014**

**Fuente: (Faostat, 2018)**

México destina el 85% de los plaguicidas producidos al sector agrícola y por esta razón, la población económicamente activa dedicada a esta actividad, está expuesta con mayor probabilidad a la intoxicación. El uso de plaguicidas genera beneficios a corto plazo (por ejemplo, incremento de cosechas, seguridad alimentaria, reducción del trabajo físico), pero las afectaciones que éstos pueden llegar a ocasionar en la salud pública son con frecuencia más altas y costosas que los beneficios. En los últimos 20 años, el uso de plaguicidas agrícolas en México ha aumentado y está acompañado de prácticas inadecuadas e irresponsables. Éstas últimas, tienen relación con el mal manejo que se hace durante y después de la actividad agrícola (González *et al.*, 2015).

### 1.1.1. Clasificación

Los plaguicidas se pueden clasificar por su composición química, toxicidad, persistencia en el ambiente y por su uso principal o los organismos que controlan.

De acuerdo a su composición química, los plaguicidas se dividen en diversas familias. La categorización química se incluye sólo por conveniencia, en el sentido de que, los compuestos de una familia tienen algo en común, como un grupo funcional o porque pueden causar los mismos efectos, o bien, utilizan un antídoto idéntico. Sin embargo, se debe entender que algunos plaguicidas podrían caer en más de una categoría por esta clasificación. En la tabla 1 se muestra la clasificación química de la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en Inglés) (WHO, 2002).

**Tabla 1. Clasificación química de los plaguicidas**

**Fuente: (WHO, 2002)**

Abreviatura	Familia
AS	Compuestos de arsénico
BP	Derivados de biperidilio
C	Carbamatos
CO	Derivados de cumarina
CU	Compuestos de cobre
HG	Compuestos de mercurio
NP	Derivados de nitrofenol
OC	Compuestos organoclorados
OP	Compuestos organofosforados
OT	Compuestos de organoestaño
PAA	Derivados de ácido fenoxiacético
PZ	Pirazol
PY	Piretroides
T	Derivados de triazina
TC	Tiocarbamatos

Así mismo, la Organización Mundial de la Salud estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda (Tabla 2), definida está como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de múltiples exposiciones, en un periodo de tiempo relativamente corto. La toxicidad está indicada como DL<sub>50</sub> (Dosis Letal 50), este valor, es una estimación estadística del número de miligramos de la sustancia tóxica por kilogramo de peso corporal requeridos para

provocar la muerte en el 50% de la población de los animales de prueba. Generalmente, los valores de ruta oral se usan a menos que los valores de la ruta dérmica coloquen el compuesto en una clase más peligrosa (WHO, 2002).

**Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas por su toxicidad**  
Fuente: (WHO, 2002)

Clase	Toxicidad	Vía Oral DL <sub>50</sub> mg kg <sup>-1</sup> en rata		Vía Dérmica DL <sub>50</sub> mg kg <sup>-1</sup> en rata	
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Clase Ia	Extremadamente peligrosos	5 ó menos	20 ó menos	10 ó menos	40 ó menos
Clase Ib	Altamente peligrosos	5-50	20-200	10-100	40-400
Clase II	Moderadamente peligrosos	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
Clase III	Ligeramente peligrosos	>500	>2000	>1000	>4000

Ramírez y Lacasaña reportan una categorización basada en la persistencia de los plaguicidas en el ambiente (Ramírez y Lacasaña, 2001).

**Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas según su persistencia**  
Fuente: (Ramírez y Lacasaña, 2001)

Persistencia <sup>a</sup>	Vida media <sup>b</sup>	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 Semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, Diametrín
Moderadamente Persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, metomilo
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo y arsénico

<sup>a</sup> Capacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó.

<sup>b</sup> Lapso de tiempo necesario para que se degrade la mitad del compuesto o mezcla aplicada.

Finalmente, por su uso principal o por los organismos que controlan, los plaguicidas se identifican como se describe en la tabla 4 (WHO, 2002).

**Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas por su uso**

**Fuente: (WHO, 2002)**

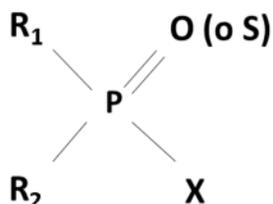
Uso	Abreviatura
Acaricida	AC
Aficida	AP
Bacteriostático (suelo)	B
Fumigante	FM
Fungicida (no para tratamiento de semillas)	F
Fungicida (para tratamiento de semillas)	FST
Herbicida	H
Insecticida	I
Regulador del crecimiento de insectos	IGR
Ixodida (para el control de garrapatas)	Ix
Larvicida	L
Moluscicida	M
Nematocida	N
Otros usos para patógenos de plantas	O
Regulador del crecimiento de plantas	PGR
Rodenticida	R
Repelente	RP
Aplicados a suelo, no utilizar con herbicidas o reguladores del crecimiento de plantas	-S
Sinergista	SY

### 1.1.2. Plaguicidas organofosforados

Los organofosforados (OPs) son insecticidas altamente tóxicos, con un precedente en los gases de guerra, a menudo conocidos como “gases nerviosos” y que se

desarrollaron a partir de la segunda guerra mundial. Las propiedades de estos compuestos como insecticidas, fue el motivo de que ya en 1959 se hubieran sintetizado alrededor de 50000 (Obiols, 1999).

Los plaguicidas organofosforados se ajustan a la siguiente fórmula general:



**Figura 2. Estructura general de los plaguicidas organofosforados**

La mayoría de los compuestos pueden ser considerados como ésteres del ácido fosfórico o sus derivados, y son descritos generalmente como ésteres de fosfato. Los compuestos están estructuralmente relacionados, y la mayoría experimenta las mismas reacciones. De particular importancia son aquellas con iones hidroxilo, agua y esterasas como la acetilcolinesterasa (AChE) (Timperley, 2014), (Díaz y López, 1999).

La mayor actividad de estos compuestos es insecticida, aunque algunos de ellos presentan actividad nematicida, fungicida y herbicida. Estos compuestos se caracterizan por tener un espectro de acción más estrecho que el de los organoclorados, metabolismo relativamente rápido en los vertebrados y ausencia de acumulación en los mismos, todo lo cual los hace preferibles a los organoclorados (Sánchez y Sánchez 2006).

Debido a su alta estabilidad química, los compuestos organofosforados resisten la descomposición natural y la biodegradación. Además, por su alta polaridad y capacidad de disolución, pueden infiltrarse fácilmente en el suelo y migrar a otras ubicaciones (Fleming, Villagrán y Koch, 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que cada año se producen tres millones de casos de envenenamiento por plaguicidas en todo el mundo, lo que

resulta en 250000 muertes. A nivel mundial, hay una escasez de información sobre la magnitud de intoxicaciones intencionales como no intencionales, y la incidencia de exposiciones relacionadas con pesticidas OPs parece estar subestimada (Timperley, 2014). En México, el registro de intoxicaciones agudas por plaguicidas inició en 1993 con 1576 casos, para 1996 fueron 7032 y en 2001 fueron 4606. Casos específicos por el uso de insecticidas organofosforados están bien documentados en Tejupilco, Estado de México y en Tixtla, Guerrero (Sánchez y Sánchez 2006).

El intervalo de toxicidad de pesticidas OPs en humanos se estima a partir de una dosis letal oral  $< 5 \text{ mg kg}^{-1}$  a  $0.5 - 5 \text{ g kg}^{-1}$ . En la tabla 5 se reporta la toxicidad en ratas de varios plaguicidas organofosforados (Timperley, 2014).

**Tabla 5. Toxicidad de plaguicidas organofosforados en ratas**

**Fuente: (Timperley, 2014)**

Plaguicida organofosforado	DL <sub>50</sub> oral mg kg <sup>-1</sup> en rata	DL <sub>50</sub> Dérmica mg kg <sup>-1</sup> en rata	CL <sub>50</sub> Inhalación (mg m <sup>3</sup> en 1 a 4 h)
Azinfos-metilo	4.4 -16	88-220	400 (1 h)
Clorpirifos	95-270	>2000	>200 (4 h)
Coumafos	13-41	860	340 (1 h)
Diclorvos	25-80	70.4-250	>200 (1 h)
Diazinon	300-400	3600 (conejo)	350 (4 h)
Dimetoato	180-330	100-600	>200 (4 h)
Disulfoton	1.9-12.5	3.6-15.9	300 (1 h)
Etion	21-191	62	864 (4 h)
Fenamifos	2-19	72-154	110-170
Fonofos	3.2-18.5	147	900 (4 h)
Isofenfos	28-38	188	130e144 (4 h)
Malation	1000 a 10,000	>4000	---
Metidation	25-54	85-94	360 (4 h)
Metil paration	6-50	67	240 (1 h)
Mevinfos	3-12	4.2	125 (1 h)
Naled	91-430	800	> 150 (6 h, ratón)
Paration	2-30	6.8-50	84 (4 h)
Forato	1.1-3.7	2.5-6.2	60 (4 h)
Fosmet	113-160	3160-4640	276 (1 h)
Propetamfos	75-119	2300-3100	204 (4 h, conejo)
Temefos	1226-13,000	---	---
Terbufos	1.3-1.74	1.1 (conejo)	---

La mayoría de los pesticidas OPs son altamente tóxicos por ingestión, inhalación o absorción a través de la piel. Su toxicidad se debe a que son efectivos inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) debido a la interacción covalente de la parte S-P de la molécula con el centro activo de la enzima (Fleming, Villagrán y Koch, 2013). La AChE hidroliza la acetilcolina, un neurotransmisor del Sistema Nervioso Central.

El incremento de la acetilcolina en los tejidos es la responsable de muchos de los síntomas por intoxicación en mamíferos por organofosforados (Singh, 1986). El

síndrome colinérgico es el resultado de la acumulación patológica de acetilcolina dentro de las sinapsis, la respuesta de los receptores de acetilcolina a la sobre estimulación por acetilcolina y los efectos posteriores en las células efectoras. La inactivación de las enzimas colinesterasas ocurre en varias etapas y se vuelve progresivamente irreversible. La toxicidad puede ocurrir dentro de los 5 minutos, como en los casos de ingestión masiva, pero puede retrasarse hasta 12 a 24 horas. La presencia de un nivel muy bajo de colinesterasa plasmática ( $126 \text{ UI mL}^{-1}$ ) es un buen parámetro de diagnóstico de la intoxicación (Díaz y López, 1999).

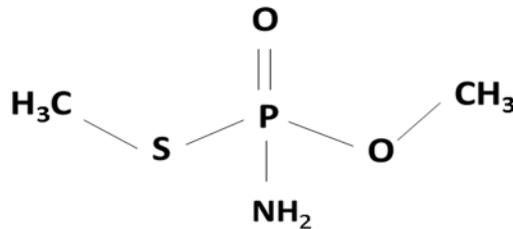
**Tabla 6. Identificación de signos y síntomas de intoxicación por organofosforados**  
**Fuente: (Díaz y López, 1999)**

Sistema físico	Signos y síntomas
Respiratorio	Disnea, taquipnea, broncoespasmo, edema pulmonar, aumento de las secreciones bronquiales
Cardiovascular	Hipotensión, arritmias, bloqueo de la conducción, taquicardia, bradicardia
Neurológico	Ansiedad, ataxia, fasciculaciones musculares, convulsiones, disminución del nivel de conciencia, confusión, coma, miosis
Gastrointestinal	Náuseas, vómitos, diarrea, calambres abdominales
Cutáneo-mucosa, sensorial	Salivación, lagrimeo, sudoración, Visión borrosa

### 1.1.3. Propiedades fisicoquímicas del metamidofos

El metamidofos (O, S-dimetilfosfamidotioato) es un plaguicida organofosforado, con un amplio espectro de actividad como insecticida-acaricida, utilizado en grandes cantidades en todo el mundo para controlar los insectos y ácaros en plantas ornamentales, cítricos, frutas y otros cultivos agrícolas intensivos. Este compuesto es derivado del ácido tiofosfórico (Hung, Wohlers y Thiemann, 2002), se introdujo en la agricultura en la década de 1970 (Rifai *et al.*, 2013), es un plaguicida efectivo, que es

persistente en el medio ambiente y altamente tóxico (Fleming, Villagrán y Koch, 2013). Es también un metabolito del acefato (O,S-dimetil N-acetilfosforoamidotioato), otro plaguicida organofosforado frecuentemente utilizado en la agricultura, que se produce por la N-acetilación del metamidofos. Mientras que el acefato y metamidofos son inhibidores comparables de AChE de insectos, el metamidofos es 75 a 100 veces más potente inhibidor de AChE de mamífero (Singh, 1986).



**Figura 3. Estructura del metamidofos**

Es tóxico a través de todas las vías de exposición (por contacto, ingestión e inhalación), inhibidor de la acetilcolinesterasa, capaz de sobreestimar el sistema nervioso central y causar mareos, confusión y finalmente la muerte. Se ha establecido una ingesta diaria aceptable (IDA) de  $0.004 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal por día para el plaguicida metamidofos (Garner y Jones, 2014). Es un plaguicida sistémico, clasificado por la OMS como Ib (altamente peligroso), con una  $DL_{50}$  de  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  en ratas (WHO, 2002). Es muy tóxico para los organismos acuáticos, la  $CL_{50}$  en pruebas de toxicidad de 96 horas para la trucha arco iris es de  $25\text{-}51 \text{ mg L}^{-1}$ , y concentraciones tan bajas como  $0.22 \text{ ng L}^{-1}$  son letales para las larvas de crustáceos (Hung, Wohlers y Thiemann, 2002). En abejas, la  $LD_{50}$  es  $1.37 \text{ }\mu\text{g/abeja}$  (Kumar *et al.*, 2015).

Tiene alta movilidad en suelo debido a que es hidrófilico, propiedad que comparte con el acefato. La sorción baja en suelo está en orden de acefato > metamidofos. En la tabla 7 se resumen algunas propiedades fisicoquímicas del metamidofos y del acefato. Estudios han revelado que el acefato y el metamidofos pueden persistir en los suelos, frutas, verduras, cereales y otros cultivos comerciales (Kumar *et al.*, 2015). En china se ha encontrado residuos de metamidofos en hortalizas que superan el máximo que es de  $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$  (Shi *et al.*, 2016).

**Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas del metamidofos y acefato**

**Fuente: (Kumar *et al.*, 2015)**

Plaguicida	Peso molecular g mol <sup>-1</sup>	Solubilidad en agua a 25 °C g L <sup>-1</sup>	Log $K_{ow}$ a 25 °C	Constante de Henry a 25 °C atm m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup>
Acefato	183.16	790	0.13	5.1 X 10 <sup>-13</sup>
Metamidofos	141.13	200	-0.65	8.64 X 10 <sup>-10</sup>

Por lo anterior, el metamidofos ya ha sido prohibido en varios países (Brasil, Unión Europea, China, Kuwait, Libia, Uruguay, Ecuador, República Dominicana e Indonesia) y en otros su uso está restringido (Bangladesh, India, Estados Unidos, Guatemala y Belice) (Arellano y Rendón, 2016). Sin embargo, todavía se utiliza a menudo en algunos países en desarrollo por su alta eficiencia y bajo costo. La contaminación con metamidofos es una amenaza continua al medio ambiente a través de la volatilización y lixiviación posterior a la aplicación, donde pueden someterse a transformaciones químicas y de transporte (Shi *et al.*, 2016).

#### 1.1.4. Plaguicidas en Villa Guerrero

El Estado de México produce actualmente el 90 por ciento de la flor de corte que se distribuye y vende en el país, incluso desde la entidad mexiquense se exporta este tipo de productos a mercados internacionales de Estados Unidos, Europa y Asia. En la zona centro sur del Estado de México hay poco más de 2 mil 500 hectáreas de terrenos que se dedican de forma íntegra a la producción de flor, en las que más de 75 mil familias trabajan diariamente (El Valle, 2017). La actividad florícola genera más de 70 mil empleos directos y otro tanto indirectos; sobre todo en la región sur del estado (Villa Guerrero, Tenancingo, Zumpahuacán, Coatepec de Harinas); más de 4 500 millones de pesos anualmente y exporta cerca de 30 millones de dólares (Terrazas, 2013). Las condiciones climáticas en el sur del Estado de México han favorecido la formación de un corredor natural para la producción de flor de corte, así como de hortalizas y huertas, cultivadas tanto en campo como en invernaderos, con un clima que va del templado subhúmedo en la parte alta al semicálido en la parte baja, con temperatura

media anual de 18.6 °C y una precipitación total anual entre 501 a 1500 mm (Velázquez, 2017).

Los plaguicidas utilizados en la zona de Villa Guerrero pertenecen a una gran variedad de clases químicas: organoclorados (endosulfán), organofosforados (metamidofos, paratión metílico, monocrotofos, etc.), carbamatos (carbarilo, metomilo, zineb, etc.), piretroides (permetrina, cipermetrina, deltametrina, etc.); y otros más de origen botánico, como Biocrak® (extracto de ajo) y microbiológicos como las avermectinas. La variedad de plaguicidas utilizados comprende todas las categorías toxicológicas que existen, desde ligera hasta extremadamente tóxicos (Oliva *et al.*, 2005).

Velázquez reporta plaguicidas de los grupos organofosforados y carbamatos (Tabla 8), seleccionados por su importancia ambiental, toxicológica; así como por uso común y frecuente (Velázquez, 2013; Garner y Jones, 2014; WHO, 2002).

**Tabla 8. Organofosforados y carbamatos seleccionados por su importancia ambiental, toxicológica y uso**

**Fuente: Adaptada de (Velázquez, 2013; Garner y Jones, 2014; WHO, 2002)**

Nombre plaguicida	Tipo	Grupo	DL <sub>50</sub> Oral (rata)	Ingesta Diaria Admisible	Movilidad	Clase movilidad
			mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	Log Koc	
Carbendazim	Fungicida	Carbamato	>1500	0,03	0,99	Sumamente móvil
Carbofurado	Insecticida Nematicida	Carbamato	8	0,002	1,3	Móvil
Dimetoato	Insecticida	Organofosforado	235	0,002	1,0	Sumamente móvil
Mancozeb	Fungicida	Carbamato	>5 000	0,03	3,3	Ligeramente Móvil
Metamidofos	Insecticida Acaricida	Organofosforado	30	0,004	0,58	Sumamente móvil
Metomilo	Insecticida	Carbamato	17	0,03	1,2	Móvil

Así mismo, Velázquez en el 2017, en un estudio para determinar la cantidad del metamidofos en un vivero en Villa Guerrero en donde se aplica de forma constante, encontró a diferentes profundidades del suelo las concentraciones que se indican en la tabla 9.

**Tabla 9. Concentraciones de metamidofos en un vivero de Villa Guerrero**  
Fuente: Adaptada de (Velázquez, 2017)

Profundidad cm	Rango de concentraciones encontradas ppm	Promedio ppm
Superficial	149.59 - 426.22	324.81
30	104.03 - 269.03	179.17
45	80.82 - 225.84	154.96

### 1.1.5. Plaguicidas en el suelo

El suelo es una colección de cuerpos naturales formados por sólidos (minerales y orgánicos), líquidos y gases, sobre la superficie de los terrenos. Presenta ya sea horizontes o capas, que se diferencian del material de origen como resultado de

adiciones, pérdidas, migraciones, y transformaciones de energía y materia; o por la habilidad de soportar raíces de plantas en un ambiente natural (SEMARNAT, 2002). La mayoría de los plaguicidas que se usan actualmente, contienen grupos funcionales muy activos que interaccionan con los ácidos fúlvicos y el humus del suelo; tales interacciones pueden conducir a uniones irreversibles y la formación de enlaces covalentes complejos con el suelo, lo cual hace que la recuperación del plaguicida sea extremadamente difícil por métodos convencionales. Los plaguicidas no se presentan de forma homogénea en el suelo, sino que aparecen más concentrados en la superficie, pero sin un reparto uniforme. En general, su zona de acción se ejerce hasta una profundidad de unos 30 o 40 cm, aunque cerca del 50 % del plaguicida vertido permanece a menos de 2.5 cm (Morales, 2010).

Cuando un plaguicida se aplica, este se distribuye en las distintas fases del ambiente (suelo, agua, aire, animales y plantas). La distribución tendrá lugar de forma que la concentración en cada una de las fases, sea función tanto de las propiedades químicas del compuesto como de la fase. Por el mecanismo de adsorción (fenómeno de atracción entre una superficie sólida y un líquido o vapor), las moléculas de plaguicida pueden ser retenidas por los coloides presentes en el suelo, la materia orgánica y arcilla. El mecanismo de desorción del compuesto dependerá principalmente de la energía de adsorción. Cuanto mayor sea esta energía, más difícil será la desorción del plaguicida de nuevo a la solución del suelo.

En la tabla 10 se muestran los mecanismos que influyen en la persistencia y evolución de plaguicidas en el suelo, los cuales dependen de otras variables, como humedad, temperatura, materia orgánica, tipo de arcilla, pH, intercambio iónico del suelo, así como de las características fisicoquímicas del plaguicida (Sánchez y Sánchez, 2006)

**Tabla 10. Mecanismos que influyen en la persistencia y evolución de los plaguicidas en el suelo**

**Fuente: (Sánchez y Sánchez, 2006)**

Mecanismo	Descripción
Descomposición química	Tiene lugar por procesos de oxidación, reducción, hidroxilación,

---

	dealquilación, ruptura de anillos, hidrólisis e hidratación.
Descomposición fotoquímica	Se produce por efecto del espectro de luz ultravioleta de la luz solar. Las fuentes de luz y su intensidad regulan el grado de descomposición de un compuesto.
Descomposición microbiana	Es probablemente el mecanismo de descomposición más importante, los microorganismos obtienen energía por descomposición de estos compuestos orgánicos sobre todo cuando carecen de otras fuentes.
Volatilización	Pérdida del compuesto en forma de vapor. Todas las sustancias orgánicas son volátiles en algún grado dependiendo de su presión de vapor, del estado físico en que se encuentren y de la temperatura del ambiente.
Movimiento	Transporte de un plaguicida en el suelo, por disolución o arrastre mecánico, se hace bajo influencia del agua. El grado de lixiviación está influido por las características físicoquímicas del suelo, solubilidad del producto, frecuencia e intensidad de la lluvia.
Descomposición por las plantas y organismos	Como consecuencia de los procesos metabólicos en los organismos

---

### 1.1.6. Biodegradación de plaguicidas

Existen diversas tecnologías para la remoción y degradación de plaguicidas, que van desde tratamientos físicos como la adsorción, hasta tratamientos biológicos y procesos de oxidación avanzada.

Los tratamientos de oxidación avanzada son generalmente no selectivos y son capaces de mineralizar más especies químicas orgánicas. La degradación de contaminantes orgánicos se efectúa por la generación del grupo hidroxilo libre (OH<sup>·</sup>), los radicales usan varias tecnologías tales como: ozonización, radiación ultravioleta (UV), catalizadores semiconductores, peróxido de hidrógeno y ultrasonido (Khuzwayo y Chirwa, 2017). Las desventajas de los procesos de oxidación avanzada son los costos por el uso de la radiación UV, y la generación de otros productos que podrían ser aún más tóxicos que el compuesto original. La biorremediación es una alternativa para tratar suelos y agua contaminada. Estudios reportan altos índices de degradación de plaguicidas por bacterias aisladas de medios contaminados, que se han adaptado al ambiente tóxico generado por los plaguicidas.

Algunos ejemplos de estos estudios se describen a continuación, en los que se emplearon plaguicidas de las familias químicas de los organoclorados y organofosforados.

Un estudio encontró que la bacteria *Acinetobacter jhonsoii* MA19 aislada de suelos contaminados con malatión (plaguicida organofosforado) puede degradarlo en agua, por la adición de succinato de sodio y acetato de sodio como co-sustratos. Cerca del 100 % de la cantidad inicial del malatión pudo ser degradado en 84 horas (Xie *et al.*, 2009).

Kong, et al., reportan la biodegradación de endosulfán (plaguicida organoclorado) por la bacteria *Alcaligenes faecalis* JBW4 aislada de lodos activos. Los porcentajes de degradación encontrados para el  $\alpha$ -endosulfan son de 87.5 % y de 83.9 % para el  $\beta$ -endosulfán, partiendo de una concentración inicial de 100 mg L<sup>-1</sup> del plaguicida y con cinco días de incubación (Kong *et al.*, 2013).

En otro estudio, se utilizó un consorcio de cepas aisladas de suelo para degradar una mezcla de clorpirifos, monocrotofos (plaguicidas organofosforados) y endosulfan (plaguicida organoclorado). Las concentraciones de las que se partieron fueron de 300 mg L<sup>-1</sup> para el clorpirifos y 1000 mg L<sup>-1</sup> para el monocrotofos y endosulfan. El consorcio degradó completamente los plaguicidas dentro de las 24 horas de incubación (Abraham *et al.*, 2014).

En cuanto al plaguicida metamidofos, en la tabla 11 se hace una comparación de los porcentajes de degradación en tres estudios en los que se emplearon microorganismos aislados de suelos contaminados con el plaguicida (Wang, Li y Xu, 2009), (Zhao, Bao y Liu, 2010) y (Ramu y Seetharaman, 2014).

**Tabla 11. Estudios de biodegradación del plaguicida metamidofos**

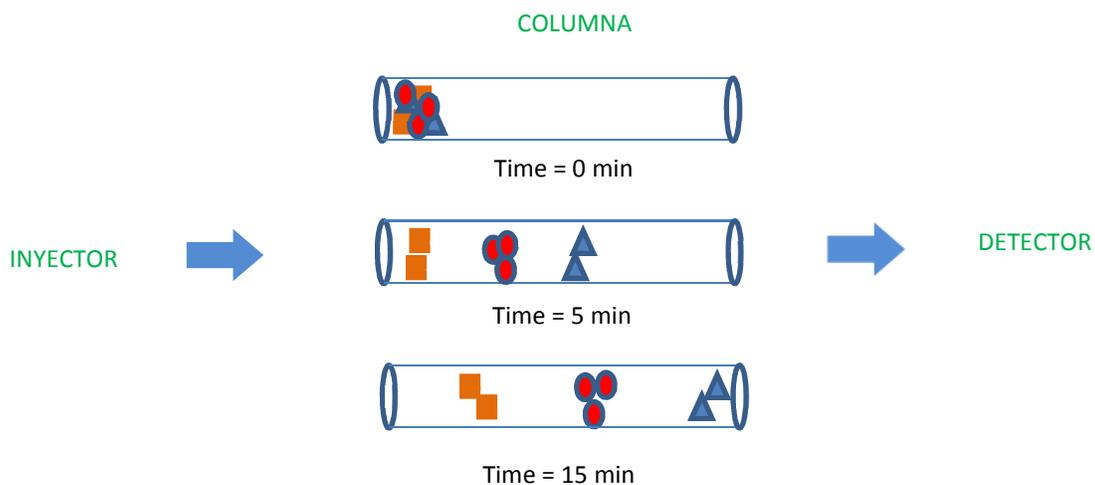
**Fuente: Elaboración propia con base en (Wang, Li y Xu, 2009; Zhao, Bao y Liu, 2010; y Ramu y Seetharaman, 2014)**

Año	Autor	Microorganismo	Concentración mg L <sup>-1</sup>	Porcentaje de degradación	Tiempo de degradación
2010	Wang <i>et al.</i>	<i>Hyphomicrobium</i> sp. MAP-1	1 000	100 %	36 horas
2010	Zhao, Bao y Liu	<i>Penicillium oxalicum</i> ZHJ6	1	60 % 100 %	4 días 12 días
2014	Ramu y Seetharaman	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Is-6	50	100 %	96 horas

## 1.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía es el proceso por el cual los componentes de una mezcla pueden ser separados. El principio se basa en la concentración en equilibrio de los compuestos de interés, entre dos fases inmiscibles. Una fase es llamada la fase estacionaria porque esta inmobilizada dentro de una columna o fijada en un soporte, mientras que la segunda llamada fase móvil, es forzada a pasar a través de la primera. (Rouessac y Rouessac, 2007).

La separación de mezclas es por interacción diferencial de sus componentes entre la fase estacionaria (líquido o sólido) y la fase móvil (líquido o gas). La fase móvil se encargará de eluir la muestra a través del sistema cromatográfico. La fase estacionaria va a interactuar con la muestra para separar los diferentes componentes, adsorbiendo la muestra de diferentes maneras según afinidad o tamaño (figura 4).



#### **Figura 4. Separación de mezclas en cromatografía**

Por la fase móvil, la cromatografía se clasifica en cromatografía de gases (fase móvil: gas) y cromatografía de líquidos (fase móvil: líquido). El campo de aplicación de la cromatografía de líquidos es mucho más amplio que la de gases porque aproximadamente el 85 % de los compuestos conocidos no son lo suficientemente volátiles o estables como para ser separados por cromatografía de gases (Gary, 2009).

##### **1.2.1. Mecanismos de sorción en HPLC**

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR por sus siglas en español o HPLC en inglés) utiliza cuatro mecanismos de sorción para la separación de los analitos de interés:

###### **1.2.1.1. Adsorción**

Este mecanismo es característico de la cromatografía de líquidos en fase normal. La fase estacionaria es más polar que la fase móvil, regularmente elaborada a partir de polímeros inorgánicos con áreas superficiales muy grandes como óxidos de silicio o de aluminio hidratados. La especie se adhiere a través del doble efecto de fisisorción y quimisorción (Rubinson y Rubinson, 2001).

###### **1.2.1.2. Partición o reparto**

Mecanismo propio de la cromatografía líquida en fase reversa. La fase estacionaria es menos polar que la móvil, y está formada por grupos no polares (-CH<sub>3</sub>, -C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> y -C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>) unidos un soporte de sílice. Los grupos orgánicos le confieren el carácter hidrófobo a la fase estacionaria, incrementándose la no polaridad con el número de átomos de carbono del grupo (Rubinson y Rubinson, 2001).

###### **1.2.1.3. Intercambio iónico**

En esta técnica, la fase móvil es una solución que contiene especies iónicas en la forma de una solución amortiguadora, mientras que la fase estacionaria sólida tiene una superficie compuesta de sitios iónicos. Estas fases permiten el intercambio de su contra ion móvil con iones de la misma carga presentes en la muestra (Skoog, Holler y Crouch, 2008).

#### **1.2.1.4. Exclusión molecular**

Para este tipo, la fase estacionaria es un material que contiene poros cuyas dimensiones son seleccionados en función del tamaño de la especie a separar. Las moléculas de la muestra con un tamaño mayor al del poro no pueden atravesarlo, por lo que se movilizan entre los espacios de las partículas individuales del material. Las moléculas más pequeñas si pasaran a través de los poros, En consecuencia las especies se eluirán por tamaño molecular decreciente (Gary, 2009).

### **1.2.2. Instrumentación en un HPLC**

Un cromatógrafo de líquidos de alta resolución se compone de varias unidades especializadas que se pueden encontrar como entidades separadas o integradas. Estos módulos son:

#### **1.2.2.1. Bomba**

Todos los sistemas de HPLC incluyen al menos una bomba para forzar la fase móvil a través de la columna. Así, en el sistema se pueden generar presiones de hasta 6000 psi dependiendo de la tasa de flujo impuesta sobre la fase móvil, su viscosidad y el tamaño de las partículas de la fase estacionaria (Skoog, Holler y Crouch, 2008).

#### **1.2.2.2. Inyector**

En HPLC, la inyección de un volumen preciso de muestra en la cabeza de la columna debe hacerse lo más rápido posible para evitar la más mínima perturbación al régimen dinámico de la fase móvil cuyo flujo debe ser estable desde columna al detector. Esto se hace mediante una válvula especial de alta presión, ya sea manual o automatizado (Rouessac y Rouessac, 2007).

### 1.2.2.3. Columnas

La columna es un tubo recto de acero inoxidable que mide entre 5 y 25 cm de longitud, el diámetro interno tiene de 3 a 5 mm, y los tamaños de partículas de los rellenos más comunes son de 3 a 5  $\mu\text{m}$ . La fase estacionaria se mantiene en la columna entre dos discos porosos situados en cada uno de los extremos (Gary, 2009; Skoog, Holler y Crouch, 2008).

### 1.2.2.4. Detectores

El detector independientemente de su naturaleza, debe reunir un número de propiedades fundamentales, debe dar para cada compuesto de interés una respuesta que es proporcional al flujo de masa instantáneo. Esta respuesta tiene que ser lineal, sensible, que filtre la mayoría ruido del fondo y ser estable a lo largo del tiempo. Los detectores más empleados en HPLC son los UV-Visible, de fluorescencia, índice de refracción y de espectrometría de masas (Rouessac y Rouessac, 2007; Skoog, Holler y Crouch, 2008).

## 1.3. Validación de métodos

La validación de métodos es el proceso mediante el cual se establecen las características del desempeño y las limitaciones de un método de medición analítico; se identifican las influencias que pudiera cambiar esas características y su extensión. Es el proceso por el cual se verifica que un método es adecuado para un propósito específico (Centro Nacional de Metrología, 2013).

El objetivo de la validar un método es probar la aptitud de los métodos, así como la capacidad del laboratorio, y se apoya en parámetros de desempeño de acuerdo al método de análisis.

La validación de los métodos debe de realizarse en los siguientes casos:

- a. Un método nuevo desarrollado.
- b. Un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo.

- c. Cuando el control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo.
- d. Un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación.
- e. Para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, entre un método nuevo y uno de referencia.
- f. Cambio de instalaciones (Pérez y Trejo, 2005).

La prueba de desempeño será aprobatoria cuando los resultados de los parámetros involucrados se encuentren dentro de las especificaciones de los requisitos. La validación completa del método para los ensayos que involucren mediciones analíticas, incluye:

- a. Porcentaje de Recuperación o error relativo.
- b. Límite de detección.
- c. Límite de cuantificación.
- d. Intervalo lineal y de trabajo.
- e. Reproducibilidad.
- f. Repetibilidad.
- g. Sesgo o error.
- h. Incertidumbre.
- i. Sensibilidad.
- j. Selectividad.
- k. Robustez (Centro Nacional de Metrología, 2013).

A continuación, se definen los requisitos de validación del método.

### **1.3.1. Selectividad**

Es la capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz de muestra, bajo las condiciones de prueba establecidas (SENASICA, 2015).

### **1.3.2. Límite de detección**

Es la concentración más baja del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba. Cuando se realizan mediciones a niveles bajos del analito, es importante saber cuál es la concentración más baja del analito o el valor de su propiedad relacionada, que puede detectarse por el método (Centro Nacional de Metrología, 2013).

### **1.3.3. Límite de cuantificación o cantidad mínima cuantificable**

Es la menor concentración de analito que puede determinarse con una repetibilidad y exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas de la prueba. Normalmente el límite de cuantificación forma parte del estudio para determinar el intervalo de trabajo (Pérez y Trejo, 2005).

### **1.3.4. Linealidad**

La linealidad define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito. Para cualquier método cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito o los valores de la propiedad relacionada, sobre los cuales el método puede aplicarse. En el extremo inferior los factores limitantes son los valores del límite de detección y/o cuantificación. En el extremo superior del intervalo de concentración, las limitaciones serán impuestas por varios efectos que dependen del sistema de respuesta del instrumento (SENASICA, 2015; Centro Nacional de Metrología, 2013).

### **1.3.5. Precisión**

Es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento analítico se aplica repetidamente a diferentes alícuotas o porciones de una mezcla homogénea. Usualmente se expresa en términos del intervalo de confianza o incertidumbre (Centro Nacional de Metrología, 2013; Pérez y Trejo, 2005).

Las medidas más comunes de precisión son la repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad es la precisión más pequeña, dará una idea de la clase de variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un equipo en un período corto de tiempo. La reproducibilidad es la variabilidad esperada cuando se modifican alguno de los factores anteriormente mencionados (Centro Nacional de Metrología, 2013). La precisión se determina por lo general en términos de desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación).

#### **1.3.6. Sensibilidad**

Es el cambio de respuesta de un instrumento de medición que corresponde a un cambio de la concentración del analito (Pérez y Trejo, 2005).

#### **1.3.7. Robustez**

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal. En las pruebas de robustez se aplican variaciones deliberadas al método y se estudia el efecto resultante en el desempeño, con ello es posible identificar las variables que tienen un efecto más significativo para que posteriormente sean controladas (Pérez y Trejo, 2005).

#### **1.3.8. Recuperación**

Es la cantidad del analito recuperada en la porción de la muestra o muestra adicionada cuando esta es conducida a través del método analítico completo, y que permite evaluar la eficiencia de la extracción, proceso de preparación e interferencias que puedan existir al aplicarlo. Se expresa en términos de porcentaje (Centro Nacional de Metrología, 2013).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La principal actividad económica en los municipios de Tenancingo, Coatepec Harinas, Zumpahuacán y Villa Guerrero en el Estado de México, es la floricultura. Derivado de esta actividad, el uso indiscriminado y sin control de plaguicidas impacta de forma negativa en la población y ambiente de la zona. El metamidofos es un plaguicida organofosforado identificado por su uso en los cultivos de flores ornamentales en Villa Guerrero. Este compuesto presenta una alta toxicidad para humanos y mamíferos,

como consecuencia, se presentan efectos crónicos y agudos en los organismos, incluso a concentraciones bajas.

A pesar de que estudios en laboratorio indican que no es persistente en suelo en condiciones aerobias, si lo puede ser en medios anaerobios acuáticos, por lo que dada su alta solubilidad en agua y bajo coeficiente de carbono orgánico, podría alcanzar los mantos freáticos, contaminando fuentes de agua potable. Adicionalmente, la aplicación constante del insecticida junto con otros organofosforados, no permiten la degradación natural en un tiempo relativamente corto, con lo cual se acumula en el suelo incrementando el riesgo de intoxicación en organismos no blanco.

Por lo anterior, el metamidofos fue seleccionado para aplicar una metodología de biodegradación, empleando un consorcio de bacterias aisladas de suelo florícola en el que se aplica el plaguicida para el control de insectos. Las bacterias al ser extraídas de este medio, ya están condicionadas a sobrevivir en presencia del metamidofos, o bien algunas de ellas ya modificaron su metabolismo para utilizarlo como fuente de energía. Es importante en el estudio evaluar la degradación del plaguicida frente a variables como pH, temperatura y concentración, para valorar cuales serían las condiciones ideales para una mayor actividad microbiana.

Por otro lado, los suelos suelen ser heterogéneos, contienen una mezcla compleja de componentes orgánicos y minerales, cada uno con diferentes afinidades para interactuar con los plaguicidas. Así que los constituyentes del suelo, son los principales factores que definen los procesos de adsorción y transporte de los plaguicidas.

Constituyentes del suelo como óxidos de hierro, la materia orgánica, y arcilla son posibles sitios de adsorción de los plaguicidas. Los metales pueden formar complejos con el ácido fúlvico, lo cual puede favorecer la adsorción de estos compuestos. El transporte de plaguicidas a través del suelo depende de varias interacciones complejas

que involucran factores como el pH, concentración de las especies, contenido mineral, contenido de materia orgánica y las características texturales del suelo.

La biodegradación de los plaguicidas también está estrechamente relacionadas con las propiedades del suelo, ya que estas definen la disponibilidad de los plaguicidas para ser utilizados por los microorganismos. Además, la actividad microbiana está condicionada a que se mantengan ciertas condiciones como pH, temperatura, humedad y la presencia de ciertos nutrientes. Los metales, que pueden estar presentes en el suelo de forma natural o ingresar por acciones antropogénicas como el uso de fertilizantes, tienen también un efecto directo sobre la actividad microbiana, mientras que algunos son indispensables para que las bacterias efectúen su metabolismo, otros en ciertas concentraciones pueden ser tóxicos e inhibir su crecimiento.

Por lo razones mencionadas, es trascendental conocer las características fisicoquímicas del suelo, las cuales nos permitirán comprender y relacionar los procesos de degradación, adsorción y transporte del metamidofos en el tipo de terreno en el que se aplica. Además, si se analizan dichas características en suelos que no han sido cultivados, que se han dejado de cultivar y que se están cultivando, podemos evaluar posibles cambios en sus propiedades fisicoquímicas por el uso constante de plaguicidas y otros agroquímicos.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS

La capacidad de degradación del plaguicida metamidofos por un consorcio bacteriano aislado de un suelo florícola contaminado con el plaguicida, depende de condiciones de pH, temperatura y concentración del metamidofos.

### OBJETIVOS

## Objetivo general

Evaluar la capacidad de degradación del plaguicida metamidofos por un consorcio bacteriano aislado de un suelo florícola contaminado por el uso continuo de organofosforados.

## Objetivos específicos

- a)** Caracterizar físicoquímicamente el suelo florícola con base a la NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece la clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.
- b)** Validar el método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación del plaguicida metamidofos.
- c)** Determinar la concentración del plaguicida metamidofos por cromatografía de líquidos de alta resolución en las muestras de suelo florícola.
- d)** Aislar cepas bacterianas de las muestras de suelo florícola que sean capaces de degradar al metamidofos, empleando un medio mineral enriquecido con el plaguicida.
- e)** Estimar el porcentaje degradación del metamidofos por las cepas bacterianas en consorcio, bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y concentración del plaguicida.
- f)** Identificar taxonómicamente a nivel de género las bacterias del consorcio bacteriano aislado, empleando técnicas de biología molecular (PCR y secuenciación de genes).

## METODOLOGÍA

### 2.1. Zona de estudio y muestreo

#### 2.1.1. Zona de estudio

El muestreo de suelo florícola se realizó en un vivero cerrado tipo multitúnel ubicado en la localidad de San Mateo Coapexco, Villa Guerrero, Estado de México. El área es una zona aproximada de 2 hectáreas, en la cual se ha utilizado el plaguicida de estudio para mantener cultivos de *Gerbera jamesonii*. Las coordenadas geográficas del sitio de muestreo son: Latitud: 18° 58' 13" N y Longitud: 99° 40' 46" W. En la figura 5 se muestra la localización de los puntos de muestreo. El punto 1 corresponde a un área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor, 2, 3, y 4 son

áreas que han dejaron de cultivarse por un año y el punto 5 es el actualmente está en uso para cultivo.



**Figura 5. Vista área del sitio de muestreo. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo.**

### **2.1.2. Muestreo**

Existen varios procedimientos para definir la colecta de la muestra de suelo, siendo muy representativo y práctico el muestreo en zig zag, por lo tanto, es el seleccionado para el proyecto. Este procedimiento inicia por un lado del terreno, escogiendo al azar el punto de partida para definir el plano que cubra homogéneamente la zona de estudio. El muestreo se efectuó con base en la norma NOM-021-SEMARNAT-2000.

Las muestras simples se tomaron de un peso aproximado de 1.5 Kg a una profundidad de 20 cm. Las muestras compuestas se conformaron a partir de 7 simples utilizando el método por cuarteo (SEMARNAT, 2002), quedando un peso final de 1.5 kg.

Las muestras fueron transportadas con hielo en bolsas de plástico. En el laboratorio se tomaron submuestras para las mediciones en las que no tiene que secar el suelo (pH, conductividad, humedad y concentración de metamidofos). Para el resto de los parámetros, se secó sobre charolas de papel aluminio, a temperatura ambiente y a la sombra. Se molió, eliminando primero los materiales gruesos como piedras y ramas. El suelo molido se hizo pasar por un tamiz con aberturas de 2 mm de diámetro (malla 10) de acero inoxidable. Las muestras se conservaron como lo indica la tabla 12.

**Tabla 12. Condiciones de conservación de las muestras de suelo para los diferentes parámetros de análisis**

**Fuente: (Health Canada, 2008; EPA Method 1699, 2007)**

Análisis	Cantidad de muestra	Recipiente	Temperatura de preservación	Tiempo de conservación para análisis
pH y conductividad	500 g	Polietileno	0-6 °C	30 días

Carbono Nitrógeno	10 g	Polietileno	0-6 °C Temperatura ambiente	28 días Indefinido - seco
Plaguicidas	100 g	Vidrio de boca ancha con sello de teflón	-10 °C	14 días
Microbiológicos	100 g	Bolsa o frascos estériles	4 °C	24 horas
Metales	100 g	Polietileno	Temperatura ambiente	6 meses

## 2.2. Caracterización de suelo

Las determinaciones analíticas para caracterizar el suelo que se consideraron en este estudio son las siguientes:

- a. Análisis textural y densidad aparente
- b. Área superficial y tamaño de poro
- c. pH
- d. Conductividad eléctrica
- e. Contenido de humedad
- f. Análisis elemental
- g. Carbono orgánico, materia orgánica y relación C/N
- h. Nitrógeno total y amoniacal
- i. Determinación de Cu, Pb, Ni, Cr, Cd, Fe y Zn por Absorción atómica
- j. Cuantificación del plaguicida metamidofos

### 2.2.1. Análisis textural y densidad aparente

Estos parámetros fueron realizados por el laboratorio de suelos del Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX). El análisis de textura se realizó por el método de Bouyoucos y la densidad aparente se determinó por el método de la probeta. En la tabla 13 se muestra la clasificación de los suelos por los valores de densidad aparente.

**Tabla 13. Clasificación de suelo por densidad aparente**

**Fuente: (SEMARNAT, 2002)**

Tipos de suelos	g mL <sup>-1</sup>
Orgánicos y volcánicos	Menor de 1.00
Minerales	
Arcillosos	1.0 1.19
Francosos	1.20 1.32
Arenosos	Mayor a 1.32

### 2.2.2. Área superficial y tamaño de poro

La muestra se desgasificó a 150 °C por 3 horas, se pesaron 0.4558 g de suelo y se analizó a -196.15 °C con nitrógeno para obtener la isoterma de adsorción. El área superficial se determinó con el método de BET, y con el modelo de BJH el área de poro, volumen de poro y radio promedio de poro. Para el análisis, se empleó un medidor de área superficial y volumen de poro BELSORP MAX, así como un desgasificador para el pretratamiento de la muestra BELPREP-vacII, ambos de BEL JAPAN.

### 2.2.3. pH

La medición de pH se realizó en una proporción suelo agua de 1:2, para ello se pesaron 10 g de suelo y se adicionaron 20 mL de agua desionizada. Se agitó cada 5 minutos durante media hora, se dejó en reposo durante 15 min. Se agitó nuevamente y se determinaron los valores de pH (SEMARNAT, 2002). El equipo de medición es un ORION STAR A329 de Thermo Scientific. Para la clasificación del suelo en cuanto a su valor de pH se presenta la tabla siguiente:

**Tabla 14. Clasificación de suelo por pH**

**Fuente: (SEMARNAT, 2002)**

Clasificación pH	pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 - 6.5
Neutro	6.6 - 7.3
Medianamente alcalino	7.4 - 8.5
Fuertemente alcalino	> 8.5

#### 2.2.4. Conductividad eléctrica

Se midió la conductividad del extracto acuoso de saturación, que se prepara a partir de una pasta saturada de suelo con agua desionizada y se filtra al vacío (SEMARNAT, 2002). La medición se realizó es un ORION STAR A329 de Thermo Scientific. En la tabla 15 se muestra la clasificación de los suelos por los valores de conductividad.

**Tabla 15. Clasificación de suelo por conductividad**

**Fuente: (SEMARNAT, 2002)**

CE dS m <sup>-1</sup> a 25°C	Efectos
< 1.0	Efectos despreciables de la salinidad
1.1 - 2.0	Muy ligeramente salino
2.1 - 4.0	Moderadamente salino
4.1 - 8.0	Suelo salino
8.1 - 16.0	Fuertemente salino
> 16.0	Muy fuertemente salino

### 2.2.5. Contenido de humedad

El método se basa en la medición o determinación de la cantidad de agua expresada en gramos que contiene una muestra de suelo. La determinación de la masa de agua se realizó a 105°C en una termobalanza MA 100 de Sartorius.

### 2.2.6. Análisis elemental

Se determinó la concentración de nitrógeno y carbono total por microanálisis, utilizando un analizador elemental Flash 2000 con detector de conductividad Térmica (TCD) de Thermo Electron. Como estándar para la curva de calibración se emplea metionina de Thermo Fischer Scientific. De las muestras de suelo se pesaron de 2 a 3 mg, el resultado se reporta en porciento.

### 2.2.7. Carbono orgánico, materia orgánica y relación C/N

La determinación de materia orgánica se realizó por el método de Walley y Black. Se pesaron entre 0.05 y 0.1 g de muestra de suelo, y se les adicionó 5 mL de  $K_2Cr_2O_7$  1N, 10 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, se dejó reposar por 30 minutos. Se añadió 70 mL de agua destilada y 3 mL de  $H_3PO_4$  concentrado. Se adicionaron 0.5 mL de indicador difenilamida y se tituló con  $FeSO_4$  0.5 N hasta vire a color verde claro. El % de carbono orgánico que se obtiene por esta metodología se multiplica por el factor de Van Benmelen (1.724) para calcular el % de materia orgánica (SEMARNAT, 2002). Los valores de referencia para clasificar la concentración de la materia orgánica en los suelos minerales y volcánicos se presentan en la tabla 16.

La relación de C/N se determinó con el porciento de carbono orgánico calculado a partir del método Walley y Black y el porciento de nitrógeno total que se obtiene con el análisis elemental.

**Tabla 16. Clasificación de suelo por materia orgánica**

**Fuente: (SEMARNAT, 2002)**

Clase	Materia orgánica (%)	Suelos no volcánicos
-------	----------------------	----------------------

Suelos volcánicos		
Muy bajo	< 4.0	< 0.5
Bajo	4.1 - 6.0	0.6 - 1.5
Medio	6.1 - 10.9	1.6 - 3.5
Alto	11.0 - 16.0	3.6 - 6.0
Muy Alto	> 16.1	> 6.0

### 2.2.8. Nitrógeno total y amoniacal

Para la cuantificación de nitrógeno total, se pesaron 0.3 g de muestra de suelo y se digirieron con 100 mL del reactivo de digestión (134 g de  $K_2SO_4$ , 7.3 g de  $CuSO_4$  anhidro y 134 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, aforado a 1 L) hasta reducción de volumen de 25 a 30 mL. Se agregaron 300 mL de agua y 50 mL de solución hidróxido-tiosulfato de sodio (500 g de NaOH y 25 g de  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  en 1 L). Posteriormente se destiló, colectando en 50 mL de disolución indicadora preparada con 20 g de  $H_3BO_3$  y 10 mL de mezcla de indicadores (200 mg de rojo de metilo en 100 mL de etanol y 100 mg de azul de metileno en 50 mL de etanol). El destilado se tituló con  $H_2SO_4$  0.02 N.

Para el nitrógeno amoniacal, se pesaron 0.3 g de muestra de suelo y se siguió el proceso de destilación. Los resultados en ambos análisis se reportan como  $mg\ kg^{-1}$ .

### 2.2.9. Cuantificación de metales

Los metales se cuantificaron por absorción atómica en un espectrofotómetro de Absorción Atómica iCE 3000 series de Thermo Fischer Scientific, previa digestión de las muestras de suelo en un horno de microondas MARSX de la marca CEM. El método de digestión empleado se basa en las notas de aplicación para digestión ácida de suelos del horno de microondas MARS. La técnica se divide en dos etapas; para la primera etapa, se pesaron 0.3 g de muestra y se adicionaron 6 mL de agua desionizada, 3 mL de  $HNO_3$ , 2.4 mL de HCl y 0.6 mL de HF; la rampa de calentamiento fue de 200 °C por 30 min, con mantenimiento de 200 °C por 20 min. En la segunda etapa se adicionaron 3 mL de  $H_3BO_3$ , con una rampa de calentamiento a 180 °C por 10 minutos y mantenimiento a 180 °C por 10 min.

Los estándares de metales son High Purity de concentraciones de 100 µg mL<sup>-1</sup> (manganeso, cromo y níquel, pureza: 99.995 %; hierro, pureza: 99.99 %; plomo y cadmio pureza: 99.999 %; zinc, pureza: 99.9999 %; cobre, pureza: 99.9995 %) a partir de los cuales se prepararon las soluciones de diferentes concentraciones para cada una de las curvas de calibración. Los ácidos para la digestión de metales son INSTRA de J.T.Baker.

En la tabla 17 se muestran los valores de referencia para metales en suelo.

**Tabla 17. Valores de referencia para metales en suelo**

**Fuente: (SEMARNAT, 2002)**

Metal	Fe	Cu	Zn	Mn	Cd	Pb	Ni
				mg kg <sup>-1</sup>			
Deficiente	< 2.5	< 0.2	< 0.5	< 1.0	---	---	---
Marginal	2.5 – 4.5	---	0.5 – 1.0	---	---	---	---
Adecuado	> 4.5	> 0.2	> 1.0	> 1.0	---	---	---
Normal	---	---	---	---	0.35	35	50
Peligroso	---	---	---	---	3 - 5	100 - 300	100

Los metales ingresan al suelo de forma natural, su presencia y concentración en este va a depender de la roca de origen. En la tabla 18 se indican que metales se encuentran en los minerales y la roca que los originan.

**Tabla 18. Metales constituyentes de las rocas y minerales**

**Fuente: (Moreno, et al., 2002)**

Mineral	Roca	Metales constituyentes
Olivina	Rocas ígneas	Mn, Co, Ni, Cu, Zn
Anortita	Rocas metamórficas	Mn, Cu, Sr
Augita	Ultrabásicas y rocas básicas volcánicas	Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Pb
Hornblenda	Por lo general, rocas ígneas y metamórficas	Mn, Co, Ni, Cu, Zn

Albita	Rocas ígneas intermedias	Cu
Biotita	Rocas ígneas y metamórficas	Mn, Co, Ni, Cu, Zn
Ortoclasa	Rocas ígneas ácidas	Cu, Sr
Moscovita	Granitos, esquitos y cristales	Cu, Sr
Magnetita	Rocas ígneas y metamórficas	Cr, Co, Ni, Zn

Fuentes antropogénicas de metales en el área son los propios fertilizantes que pueden contener:  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  y al hierro en forma de quelatos.

### 2.2.10. Cuantificación de metamidofos

Se desarrolló el método analítico para la cuantificación de metamidofos en HPLC. Para ello, en primera instancia, se comprobó la identidad del estándar de metamidofos (PESTANAL™ de Sigma-Aldrich con una pureza de 99.1%, lote: BCBT1513) por espectrometría de infrarrojo. El equipo es un espectrofotómetro de infrarrojo 640-IR de Agilent Technologies con ATR (Reflexión Total Atenuada). Posteriormente, se hicieron barridos por espectrometría de UV-Vis de una solución de metamidofos en agua, para determinar la longitud de onda máxima a la cual absorbe. El equipo empleado es un espectrofotómetro de UV-Vis Evolution Array de Thermo Scientific.

#### 2.2.10.1 Extracción del metamidofos del suelo.

Se pesaron 20 g de la muestra de suelo y se adicionaron 25 mL de hexano/acetona (1:1, v/v), la rampa de calentamiento es de 10 min a 110°C, con mantenimiento de 10 min, las muestras extraídas y filtradas se concentraron en rotavapor a 35°C y 40 rpm. La extracción del plaguicida del suelo fue en un horno de microondas MARSX modelo 907600, de la marca CEM. Los solventes para la extracción y cuantificación utilizados fueron grado cromatográfico de la marca Fermont.

Se realizó una prueba para determinar el porcentaje de recobro del metamidofos en la extracción, para ello se prepararon muestras de suelo del punto 1 (área de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor). Se enriquecieron 20 g de suelo con 2 mL de una solución de 1000 mg L<sup>-1</sup> del plaguicida, para tener una concentración final de

100 mg Kg<sup>-1</sup>. Se dejaron en contacto por 1 hora antes de la digestión. Se determinó el % de recuperación y el CV de 6 muestras enriquecidas.

### **2.2.10.2 Evaluación del método**

La cuantificación del metamidofos se realizó en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters equipado con Detector 2487 dual, Bomba 1515 de flujo isocrático, automuestreador 717 plus. Se utilizó una columna Eclipse XDB-C18 Agilent (4.6 mm X 250 mm, tamaño de partícula de 5 µm y tamaño de poro 80 Å). Se determinó la adecuabilidad del sistema y se evaluó el método por medio de los siguientes parámetros: linealidad del sistema, linealidad del método, exactitud y repetibilidad. La metodología fue conforme a la guía para validación de métodos analíticos de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, 1996) y la guía de validación de métodos analíticos, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. (CNQFB, 2002).

#### **a. Adecuabilidad del sistema**

Para evaluar la adecuabilidad del sistema se inyectó por quintuplicado una concentración de 500 mg L<sup>-1</sup> de metamidofos. Se determinó el CV para las 5 inyecciones, así como el factor de capacidad (K'), factor de coe (T) y el número de platos teóricos (N). En este caso no aplica la resolución.

#### **b. Linealidad del método**

Para la linealidad del sistema se prepararon por triplicado 6 niveles de concentración conocida de metamidofos (100, 200, 400, 600, 800 y 1000 mg L<sup>-1</sup>), por triplicado. Se reporta la relación entre la concentración vs la respuesta analítica a partir de b<sub>1</sub>, b<sub>0</sub> y R<sup>2</sup>.

#### **c. Límite de detección y Límite de cuantificación**

Se calculó el Límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ) del método, empleando las ecuaciones 1 y 2, con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen. Para ello se prepararon 4 concentraciones más

bajas en relación a la menor concentración probada para la linealidad del sistema (5, 10, 20 y 50 mg L<sup>-1</sup>).

$$\text{Ecuación 1.....LD} = (3.3 * S_{bo}) / b_1$$

$$\text{Ecuación 2.....LQ} = (10 * S_{bo}) / b_1$$

En dónde:

$b_1$  = Pendiente

$S_{bo}$  = Desviación estándar de la ordenada al origen

#### **d. Linealidad del método**

Para la linealidad del método se seleccionaron 5 niveles de concentración (150, 300, 500, 700 y 900 mg L<sup>-1</sup>), y se prepararon por triplicado. Se analizan bajo las mismas condiciones y se determinó la concentración del analito. Por mínimos cuadrados se obtuvieron los valores de  $b_1$ ,  $b_0$  y  $R^2$  de la cantidad adicionada vs cantidad cuantificada. Adicionalmente se calculó el porcentaje de recobro de cada muestra, y con base en este se obtuvo el promedio, S y CV.

#### **e. Precisión**

La precisión se determinó con la repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad se evaluó analizando por sextuplicado 5 soluciones de metamidofos preparadas a diferente concentración (150, 300, 500, 700 y 900 mg L<sup>-1</sup>). El criterio de aceptación es que el CV de los seis resultados para cada solución no sea mayor al 2% (CNQFB, 2002). La reproducibilidad se estudió por medio de una ANOVA comparando los resultados de las mismas soluciones pero analizadas en días diferentes.

### **2.3. Aislamiento, identificación del consorcio bacteriano y estudios de biodegradación**

#### **2.3.1. Aislamiento de consorcio bacteriano**

Las bacterias con capacidad de crecimiento en presencia del plaguicida metamidofos se aislaron a partir del suelo en estudio, basándose en la metodología descrita por

Ramu y Seetharaman (2014). Para ello se adicionaron 2 g de la muestra de suelo en 50 mL de medio mineral (6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 g de  $\text{NaCl}$  y 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$  en 1 L de agua destilada, se ajustó a  $\text{pH } 7.2 \pm 0.2$ . Se esterilizó a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Por último, se adicionaron 2 mL 1 M de  $\text{MgSO}_4$  y 0,1 mL 1 M de  $\text{CaCl}_2$ ) enriquecido con  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de metamidofos, se incubaron a temperatura ambiente por 7 días con agitación helicoidal. Posteriormente, se resembró una alícuota de 2 mL en una porción fresca de medio mineral, incrementando la concentración de metamidofos a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  para la total adaptación de los microorganismos a altas concentraciones del plaguicida. Se incubó nuevamente a las mismas condiciones. Las concentraciones para el aislamiento se eligieron con base a las reportadas en el estudio realizado en la misma zona por Velázquez en el 2017 (tabla 9).

Después de los 7 días de incubación para obtener cultivos puros, se resembró por estría en una placa de agar mineral con metamidofos a  $200 \text{ mg L}^{-1}$ . Se realizó tinción de Gram para corroborar que se tenían cultivos puros.

## **2.3.2. Identificación del consorcio bacteriano**

### **2.3.2.1. Identificación por PCR.**

La identificación se realizó con el análisis de secuencia del gen 16S rRNA (ácido ribonucleico ribosomal). Se amplificó el DNA (ácido desoxirribonucleico) por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) empleando los primers universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3').

La preparación del master mix para PCR fue con la siguiente composición:  $0.1 \mu\text{L}$  de Taq polimerasa,  $0.2 \mu\text{L}$  de cada primer diluidos 1:10,  $3 \mu\text{L}$  de buffer que contiene los dinucleótidos (dNTPs) y  $\text{MgCl}_2$ ,  $11.5 \mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Se tomó una porción de un cultivo puro y se mezcló con  $15 \mu\text{L}$  de la solución master mix. La PCR se efectuó con el siguiente perfil: Desnaturalización del DNA a  $95^\circ\text{C}$  por 1 minuto, 30

ciclos a 95°C por 1 minuto, alineación de los primers a 58 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 2 minutos. El último ciclo incluye una extensión por 5 minutos a 72°C.

Concluida la PCR, se analizó el DNA por electroforesis, para ello se empleó gel de agarosa al 1.5 %. Los pozos se cargaron con una mezcla de 1 µL del colorante Gel red y 5 µL de la muestra. Una vez ya comprobado que se tenía DNA se procedió a la secuenciación para la identificación de las bacterias.

### **2.3.2.2. Imágenes por Microscopía Electrónica de Barrido.**

Las bacterias se prepararon siguiendo la metodología descrita a continuación:

Cultivos puros y recientes se fijaron con formaldehído al 2% por 48 horas, después se centrifugó y lavó con solución salina en dos ocasiones. Los especímenes se deshidrataron con cambios graduales de etanol desnaturalizado (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 %) dejando en contacto con el alcohol 10 minutos. Con la concentración de etanol al 100% se efectuaron tres cambios. Finalmente, se realizó el secado a punto crítico con CO<sub>2</sub> de las muestras y el montaje en el portamuestras para recubrirlas con oro. Se observaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) Hitachi Modelo SU1510 a 10 kV y alto vacío.

### **2.3.3. Estudios de Biodegradación del metamidofos**

Las pruebas de biodegradación del plaguicida se realizaron en medio mineral al cual se adicionó el metamidofos como única fuente de carbono. Se estudiaron diferentes valores de pH, ajustando el medio mineral con HCl o NaOH a 4, 5, 6, 7 y 8. También, se evaluó la temperatura incubando a 20, 25, 30 y 35 °C. Finalmente se examinó el efecto de la concentración del plaguicida y una fuente adicional de carbono (Dextrosa). En el estudio fueron incluidos controles del plaguicida, los cuales no fueron inoculados con el consorcio bacteriano.

#### **2.3.3.1. Preparación del inóculo**

Se resembró por estría en una placa de agar TSA (agar tripticaseína) cada una de las cepas e incubaron a 35 ± 1 °C de 18 a 24 horas, para tener un cultivo fresco.

Se preparó una suspensión bacteriana ajustando a 0.6 unidades de absorbancia a 660 nm, empleando tubos de solución salina al 0.85 %.

### **2.3.3.2. Pruebas de biodegradación**

Se adicionó una alícuota de 1 mL de la suspensión del consorcio bacteriano a 70 mL de medio mineral ajustado al valor de pH deseado (4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0) y con una concentración de 200 mgL<sup>-1</sup> del plaguicida u otra concentración de prueba (100, 400, 600, 800 y 1000 mg L<sup>-1</sup>). Se incubó a la temperatura en estudio (20, 25, 30 y 35 °C) y se determinó la concentración de metamidofos residual por cromatografía de líquidos de alta resolución. Para todas las pruebas de degradación se analizó a la par un blanco, el cual se sometió a las mismas condiciones. El blanco se preparó con el medio mineral enriquecido con el metamidofos, pero sin adicionar la suspensión bacteriana.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. Caracterización de suelo**

#### **3.1.1. Análisis textural y densidad aparente**

El análisis textural del suelo reporta 50 % arena (partículas > 0.05 y < 2 mm), 32 % limo (partículas > 0.002 y < 0.05 mm), y 18 % arcilla (partículas < 0.002 mm); mediante el uso del triángulo de textura de la USDA, se determinó la clasificación textural del suelo como del tipo franco (USDA, 1995). Este tipo de suelo es el ideal para la mayoría de los cultivos, ya que contiene la proporción apropiada de arena, limo y arcilla para permitir la filtración y retención en forma equilibrada del agua y nutrientes, y que estos estén disponibles para facilitar el desarrollo de las plantas.

El valor de densidad aparente de  $0.96 \text{ g cm}^{-3}$  clasifica al suelo de la zona muestreada como del tipo orgánico y volcánico (tabla 11). La densidad aparente del suelo es la relación de la masa de sólidos y el volumen total. Este último incluye el volumen de los sólidos y el volumen ocupado por el espacio poroso. Valores altos en la densidad aparente indican que el suelo está compactado, esta condición impide el crecimiento de las raíces de las plantas y tiene un efecto negativo en la permeabilidad del agua. Por el contrario, valores bajos en la densidad aparente incrementarían la filtración del agua, dificultando la retención y por lo tanto su accesibilidad para las plantas. Valores de densidad aparente  $< 1.4 \text{ g cm}^{-3}$  se consideran adecuados para favorecer el cultivo en los suelos del tipo franco (Soil Survey Staff, 2014).

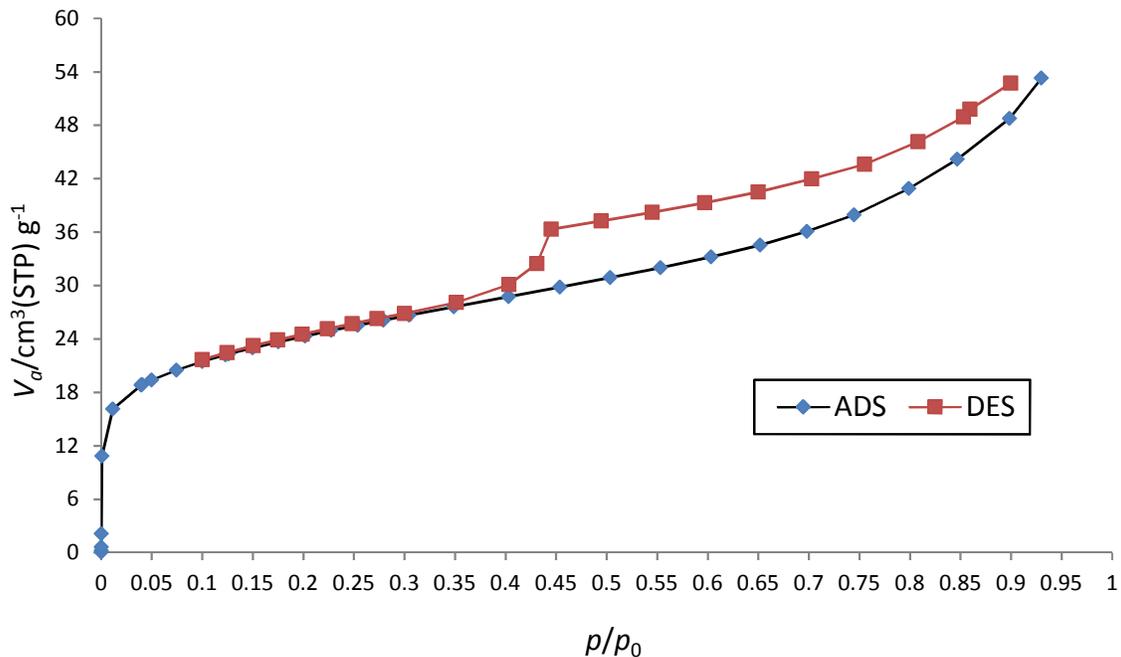
### 3.1.2. Área superficial y tamaño de poro

La isoterma en el análisis de área y volumen de poro es del tipo IV, que es característica de mesoporos (figura 6). La histéresis corresponde al tipo H3, típica de sólidos que consisten en agregados o aglomerados de partículas que forman poros del tipo rendija no uniformes. Los poros en forma de rendija se encuentran comúnmente en las arcillas (Leofanti *et al.*, 1998). En el BET-PLOT (figura 7), el área superficial de  $79.74 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  y el diámetro promedio de poro de  $4.13 \text{ nm}$ , se determinaron en el intervalo de presión relativa de 0.05 a 0.35 (usualmente en estos valores se tiene una buena linealidad, en nuestro caso el coeficiente de correlación fue de 0.9985). El valor de promedio de poro confirma la presencia de mesoporos (2 a 50 nm), ya pronosticados anteriormente por el tipo de isoterma. Con el modelo de BJH para mesoporos, se calculó un área de poro de  $41.44 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , que corresponde a un poco más de la mitad del área superficial total. Con el mismo modelo, se determinó un volumen de poro de  $0.058 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  y un radio promedio de poro de  $1.21 \text{ nm}$ .

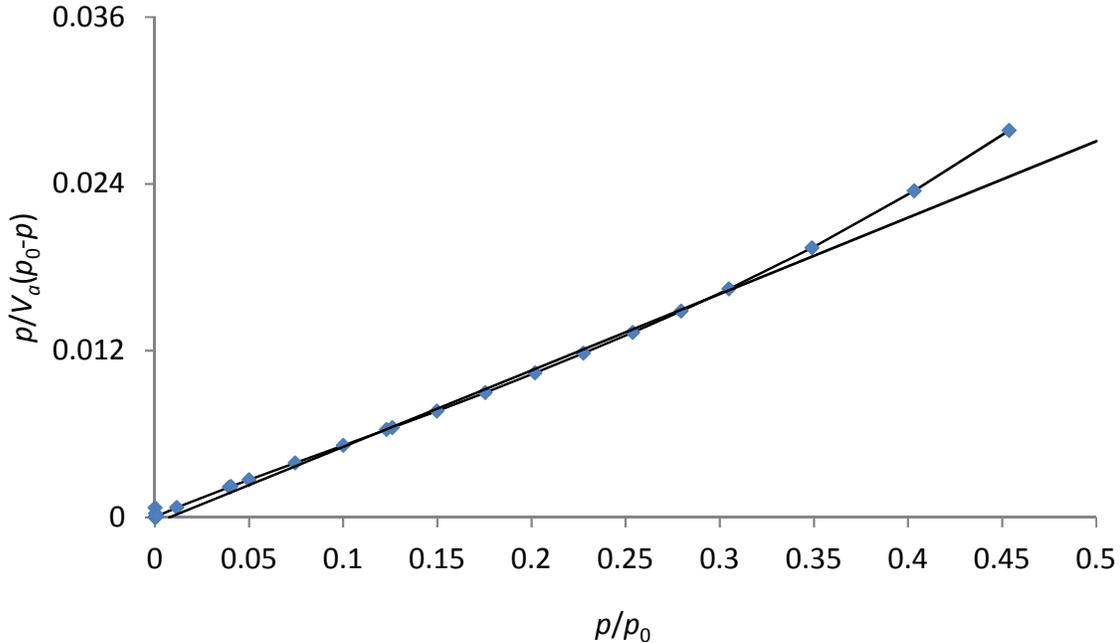
El tipo de poro junto con el área superficial, la textura y densidad aparente son determinantes en la capacidad del suelo para la retención y permeabilidad de los compuestos orgánicos e inorgánicos. La presencia de arena en el suelo permitiría el movimiento del metamidofos en el suelo, al igual que el limo, partículas por los que el plaguicida no tiene mucha afinidad, (Crisanto *et al.*, 1994). Las únicas partículas a las

cuales el plaguicida podría adsorberse serían las de arcilla. La adsorción se incrementaría un poco por los mesoporos a los que el plaguicida se asociaría por el tamaño de la molécula.

El área superficial específica y el volumen de poro al ser pequeñas, tampoco favorecerían la retención del metamidofos. Por lo tanto, las características del suelo permiten más la permeabilidad del plaguicida que su adsorción. La adsorción es un factor determinante para que el metamidofos esté disponible y pueda ser utilizado por las bacterias.



**Figura 6. Isotherma Adsorción/desorción de suelo**  
 $p$  = Presión absoluta,  $p_0$  = Presión de saturación /  $p_0$  = Presión relativa,  
 STP = Estado estándar (T= 273.15 K y 101.3 kPa) y  
 $V_a$  = Cantidad específica adsorbida expresada en volumen de gas



**Figura 7. BET-Plot de suelo**  
 $p/p_0$  = Presión relativa,  $p$  = Presión absoluta,  $p_0$  = Presión de saturación y  
 $V_a$  = Cantidad específica adsorbida expresada en volumen de gas

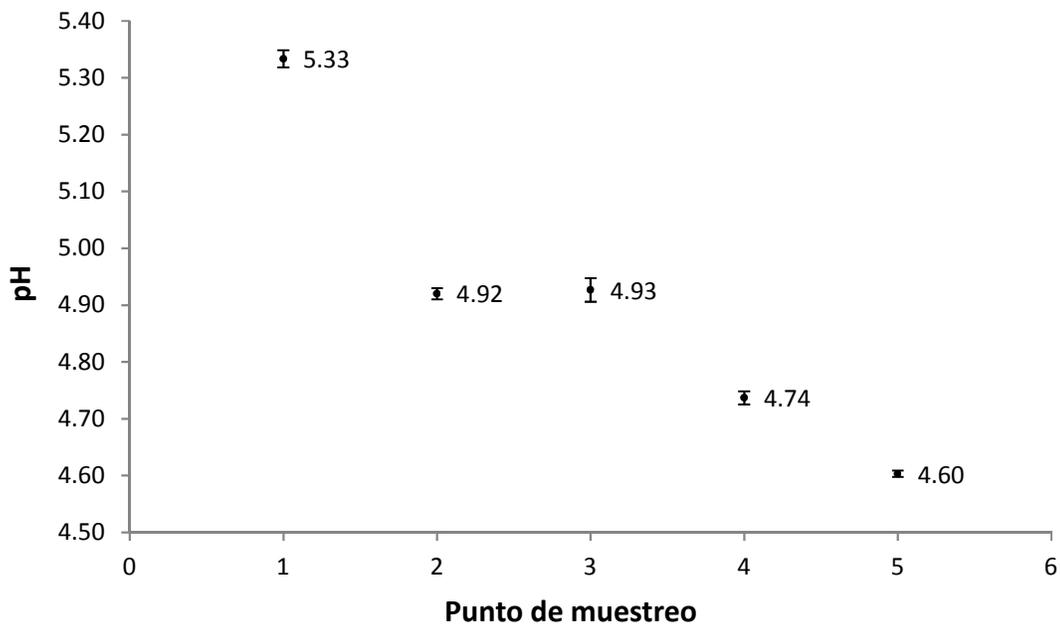
### 3.1.3. Medición de pH

El análisis estadístico ANOVA con un  $p \leq 0.05$  muestra diferencias significativas entre los valores de pH en los puntos de suelo muestreados (figura 8). El punto en el que actualmente se está cultivando es el que tiene el pH más ácido (4.60), clasificándose este, junto con los suelos que se han dejado de cultivar por un año como fuertemente ácidos (tabla 14). La superficie de suelo que aún no se cultiva se cataloga como moderadamente ácido. Los valores de pH de los suelos que han reposado indican valores más altos que el de suelo que está en uso, seguramente debido a que se suspendió la aplicación de agroquímicos.

En el caso del vivero en estudio, el aumento de la acidez en las áreas ya cultivadas y en uso, se debe posiblemente al uso frecuente de fertilizantes, sobre todo, fertilizantes que contienen amonio, que al nitrificarse para formar nitratos liberan iones  $H^+$  incrementando con ello la acidez del suelo (Wang, Li y Xu, 2009). Se reporta que la

adición en suelos de sulfato de amonio, tiene un efecto depresivo en el pH (Pereira, Abramof y Costa, 1980) y que pH ácidos a su vez tienen efectos negativos en la nitrificación.

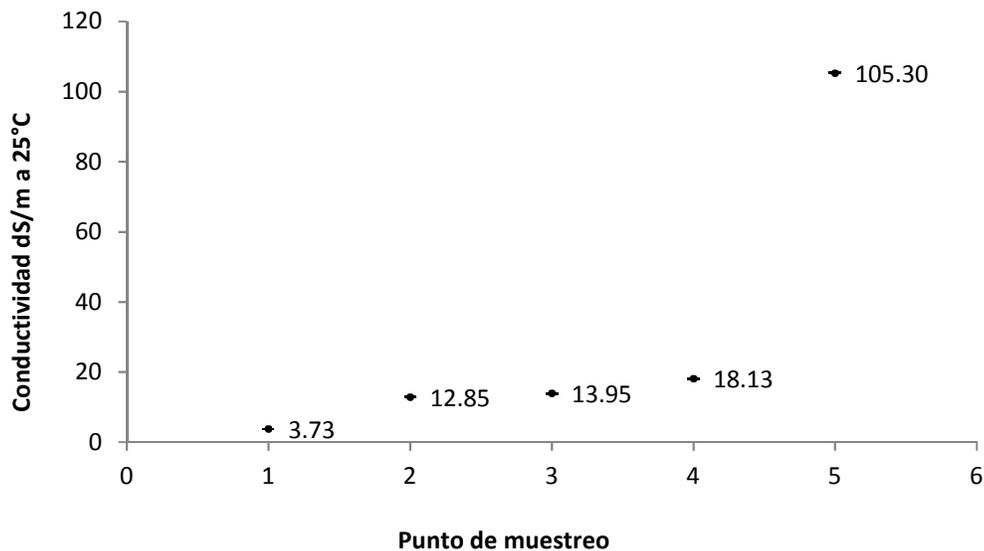
El pH influye en la disponibilidad de nutrientes. Un suelo con un valor de pH inferior a 5.0, suele tener niveles bajos de nitrógeno, fósforo, calcio y magnesio, y niveles más altos de aluminio, hierro y boro. Por el otro contrario, en un pH alcalino, los niveles que suelen estar bajos son los de hierro, manganeso, cobre, zinc y boro (USDA, 1995). En nuestro caso las secciones de suelo ya cultivadas y que están en uso podrían estar presentando problemas de disponibilidad de nutrientes por la acidez. El intervalo de pH ideal para la mayoría de los cultivos es de 6.5-7.5, pero también son aceptables valores de 5.5 a 6.5 para muchos cultivos. Para las flores *Gerbera* que se cultivan en el vivero, el rango óptimo para su desarrollo es en un pH de 5.0 a 6.0 (Corral *et al.*, 2013). El terreno de la zona de forma natural tiene el pH adecuado para este tipo de cultivos, no así los terrenos que están o han sido explotados.



**Figura 8. pH en puntos de muestreo. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo.**

### 3.1.4. Medición de conductividad eléctrica

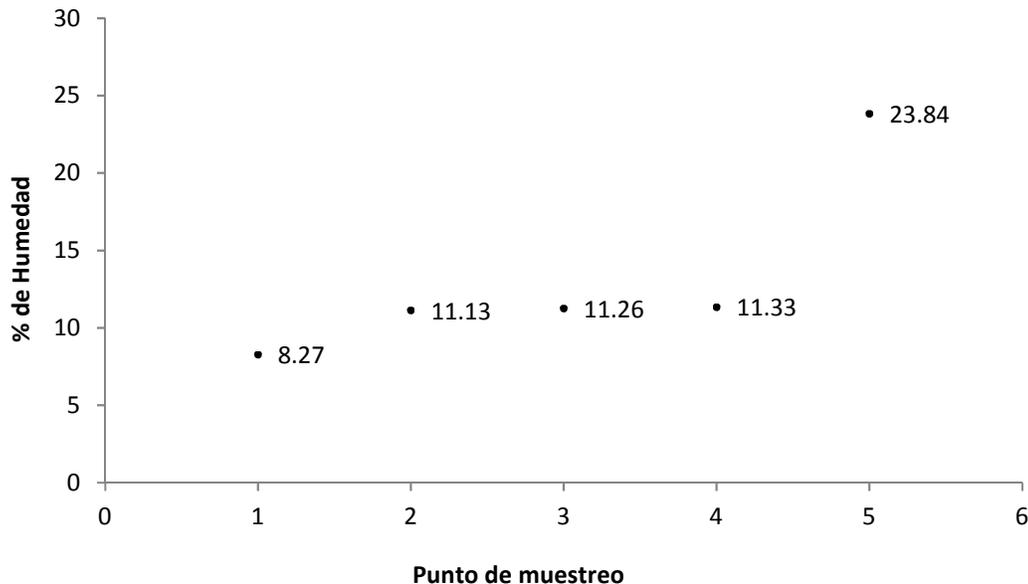
En cuanto a la conductividad, se midió en un extracto de saturación de la muestra de suelo. Al igual que para pH, el análisis estadístico ANOVA con un  $p \leq 0.05$ , muestra diferencias significativas entre los valores en los puntos de suelo muestreados. El área que se está cultivando presenta un valor de conductividad más alto que el de la región que no se ha cultivado (105.30 y 3.73  $\text{dS m}^{-1}$  respectivamente, prácticamente 28 veces más), de forma similar, los puntos que ya han sido cultivados y que están en reposo tienen valores más altos que el no cultivado (figura 9). El suelo cambia de moderadamente salino a muy fuertemente salino por el uso de los agroquímicos (tabla 15). Esta situación puede afectar el rendimiento de los cultivos, ya que para la mayoría de las plantas las condiciones ideales son  $< 1 \text{ dS m}^{-1}$ . Para la *Gerbera* la conductividad eléctrica no debe ser superior a los 2.2-2.7  $\text{dS m}^{-1}$  (Corral *et al.*, 2013). Principalmente sodio, magnesio, calcio, cloruros y sulfatos pueden interferir con la absorción de agua por las plantas, también crean un desequilibrio de nutrientes (Soil Survey Staff, 2014). Por otro lado, se reporta que la salinidad en los suelos disminuye la mineralización del nitrógeno y aumenta la pérdida de  $\text{N-NH}_4$  (Gandhi y Paliwal 1976).



**Figura 9. Conductividad en puntos de muestreo. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo**

### 3.1.5. Contenido de humedad

El suelo no sembrado es el que presenta el porcentaje de humedad más bajo (8.27 %), seguido por los valores de los suelos que han dejado de cultivarse, los cuales tienen valores similares. Como es de esperarse, el suelo que se está cultivando tiene un valor alto de humedad (23.84 %) resultado de la irrigación continua de los sembradíos.



**Figura 10. % de humedad en puntos de muestreo. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo**

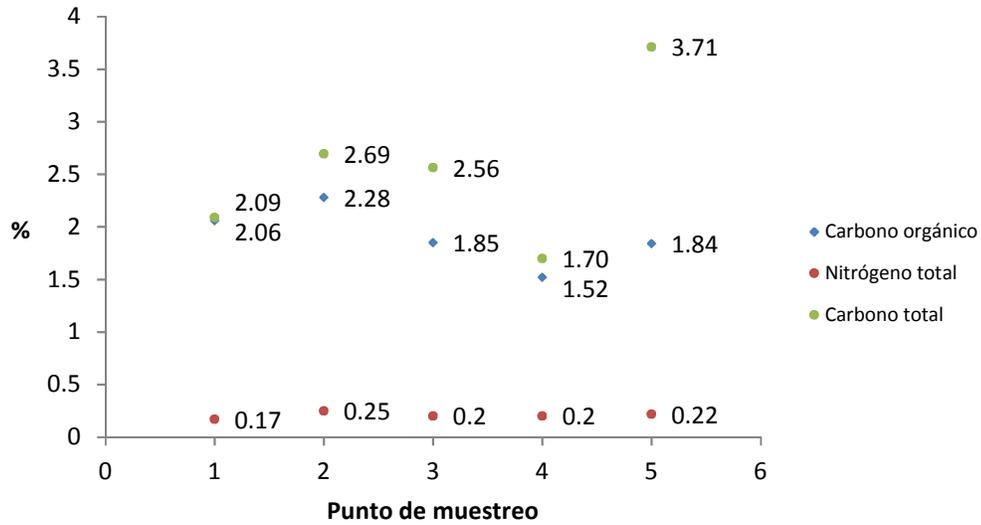
### 3.1.6. Carbono, nitrógeno, materia orgánica y relación C/N

Se calculó la cantidad de nitrógeno y carbono total (por análisis elemental), carbono orgánico (con el método de Walkley y Black), los valores de carbono total revelan más variación entre los puntos de muestreo, no así los de nitrógeno total que parece más constantes. Además, se observa que hay una tendencia de estos últimos a incrementarse en las zonas que se han cultivado y la que se está cultivando (Figura 11).

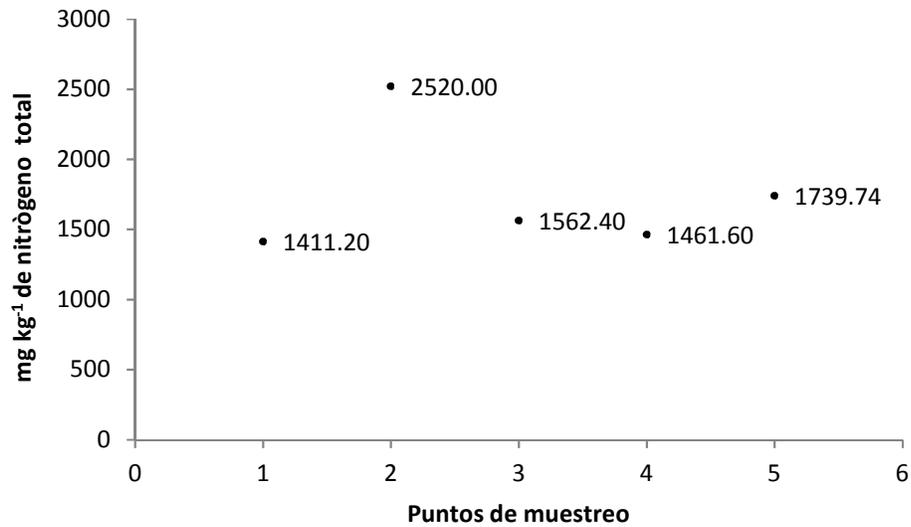
Cornfield (1959), reporta que los residuos orgánicos nitrogenados se acumulan en mayor medida en suelos ácidos que en los que tienen un pH más alto. Esto se comprobó midiendo el nitrógeno total (figura 12) y amoniacal (figura 13) por el método de Kjeldahl, sólo en el punto que nunca se ha cultivado y en el que actualmente se

siembra se encontró amoniacal (que es parte del nitrógeno inorgánico), en los tres puntos que ya no se trabajan no se detectó (puntos de muestreo 2, 3 y 4). La hipótesis es que en el suelo no cultivado se está llevando a cabo el proceso normal de nitrificación de la materia orgánica, por ello el nitrógeno está presente en forma orgánica e inorgánica. Sin embargo, en los suelos que ya no se cultivan, la ausencia de nitrógeno amoniacal se debe a la alteración de la nitrificación por la acidez del suelo. Pereira y colaboradores (1980) explican que la disminución de la nitrificación en suelos ácidos, se debe a que pH bajos pueden inhibir la actividad de las bacterias nitrificantes. Además, se suma el efecto de la salinidad, que como refieren Gandhi y Paliwal incrementa la pérdida de  $N-NH_4$ . Finalmente, en el suelo que se cultiva, los valores más altos de nitrógeno amoniacal se atribuyen al uso constante de fertilizantes que contienen al elemento como sales.

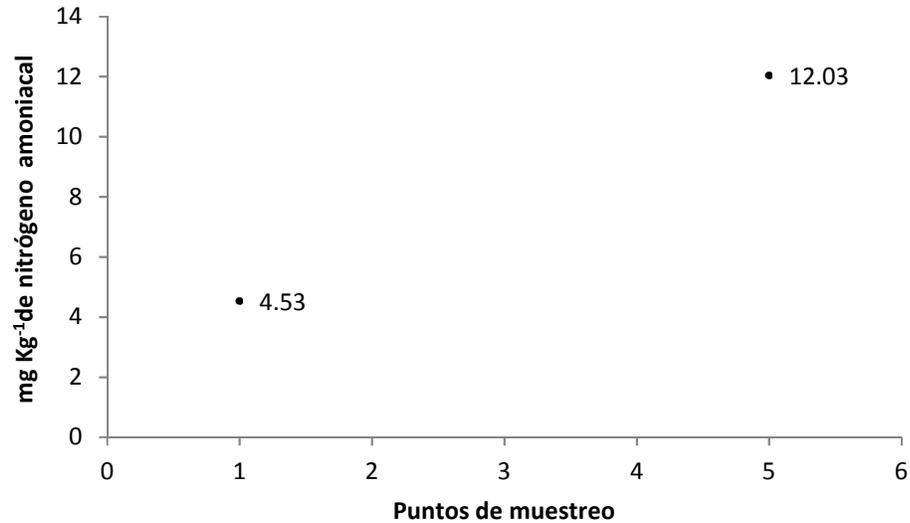
Por otra parte, el punto que está en uso para el cultivo de flores, muestra una gran diferencia entre la cantidad de carbono total y el carbono orgánico, esta diferencia también se incrementa entre los dos carbonos en los otros tres puntos que han dejado de cultivarse, lo que nos hace suponer que el carbono inorgánico se está elevando. Los suelos salinos contienen carbonatos (O' Flynn *et al.*, 2018), los suelos explotados en nuestro estudio son salinos y el punto 5 que tiene una conductividad mayor, también es el que tiene una cantidad más grande de carbono inorgánico, esto corrobora lo citado por los autores, que adicionalmente mencionan que la salinidad de los suelos incrementa la mineralización del carbono orgánico. Mientras tanto, en el área que no ha sido cultivada, esta diferencia es mínima, por lo que se hace notar que la mayor cantidad del carbono es orgánico.



**Figura 11. Carbono orgánico, carbono y nitrógeno total en puntos de muestreo. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo**



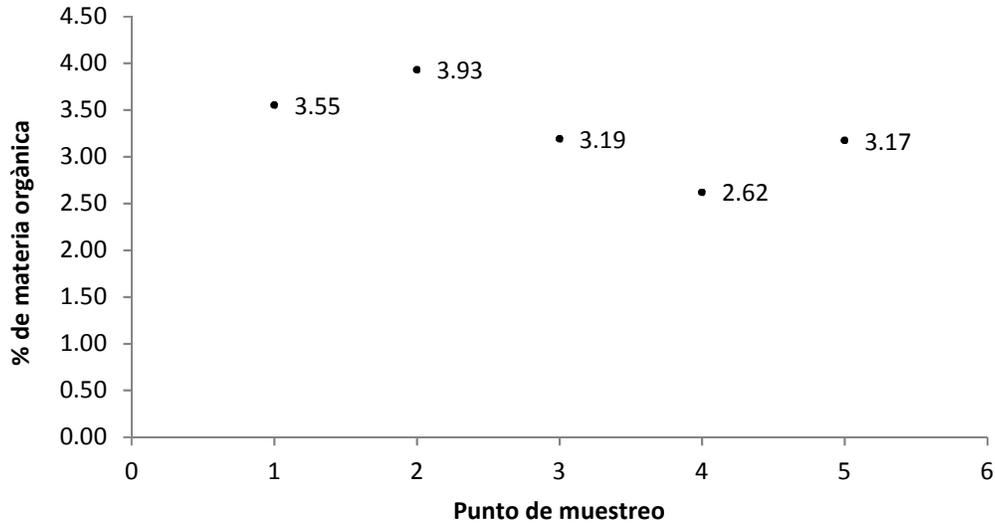
**Figura 12. Nitrógeno total en mg kg<sup>-1</sup> método Kjeldahl. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo**



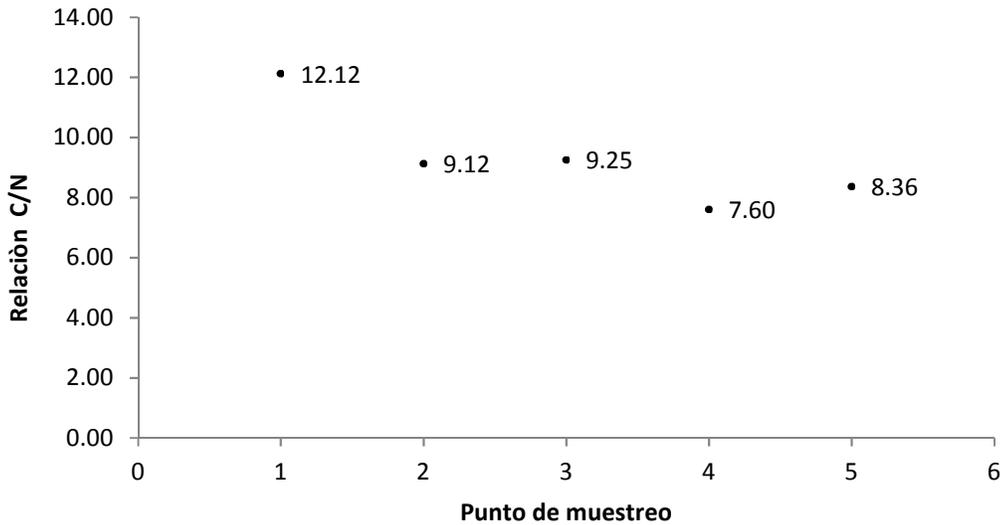
**Figura 13. Nitrógeno amoniacal en mg kg<sup>-1</sup> método Kjeldahl. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor y punto 5: actualmente en uso para cultivo**

Se observa una ligera tendencia a la disminución en los valores de materia orgánica y relación C/N, en el área que está en uso y los puntos que han dejado de trabajarse (con excepción del punto 2 en materia orgánica), comparados con el suelo no cultivado (figuras 14 y 15). En suelos salinos se espera que la materia orgánica decaiga, debido a que la producción de los cultivos se reduce. En cuanto a la relación C/N, las proporciones en suelos no cultivados son generalmente más altas que en suelos cultivados. Los datos de materia orgánica se calcularon con el producto del carbono orgánico y el factor de Van Benmelen, que se basa en la suposición de que la materia orgánica contiene un 58 % de carbono (SEMARNAT, 2002).

La materia orgánica mejora las propiedades del suelo, favoreciendo la infiltración de agua, la granulación, reduce la densidad aparente, pero aumenta la porosidad y el agua disponible. Además, de que es fuente de elementos indispensables para el desarrollo de las plantas como el nitrógeno, fósforo y azufre (USDA, 1995).



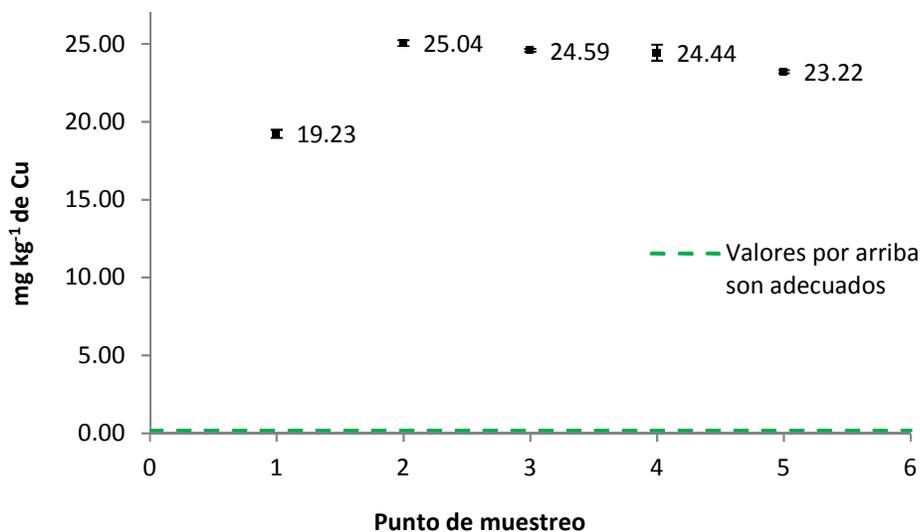
**Figura 14. Materia orgánica.** Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo



**Figura 15. Relación C/N.** Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo

### 3.1.7. Concentración de metales

Los valores de los elementos cobre, zinc, hierro y manganeso se encuentran dentro de especificación (Tabla 17). El análisis estadístico ANOVA con un  $p \leq 0.05$ , muestra diferencias significativas entre los puntos de muestreo en los metales Cu, Zn y Mn, no así para Fe. Se puede notar en este estudio que el manganeso no muestra una tendencia de incremento o disminución por el uso de agroquímicos. Sin embargo, el cobre tiende a elevarse en los suelos cultivados, y el zinc a disminuir ligeramente. Para los metales pesados cadmio, níquel, plomo y cromo (figuras 15-18) sólo en el níquel no se encontraron diferencias significativas. El Cd se encuentra para la mayoría de los puntos de muestreo (a excepción del 3) en valores que se consideran ya peligrosos (SEMARNAT, 2002), pero esto se puede notar que ya es una condición propia del suelo de la región, pues el suelo que no ha sido cultivado tiene cantidades similares a los que ya han sido cultivados. Por último, Cr se encontró en todas las muestras, con valores que van de 72.36 a 96.50 mg L<sup>-1</sup> y con diferencias significativas.



**Figura 16. Cobre en puntos de muestreo. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo**

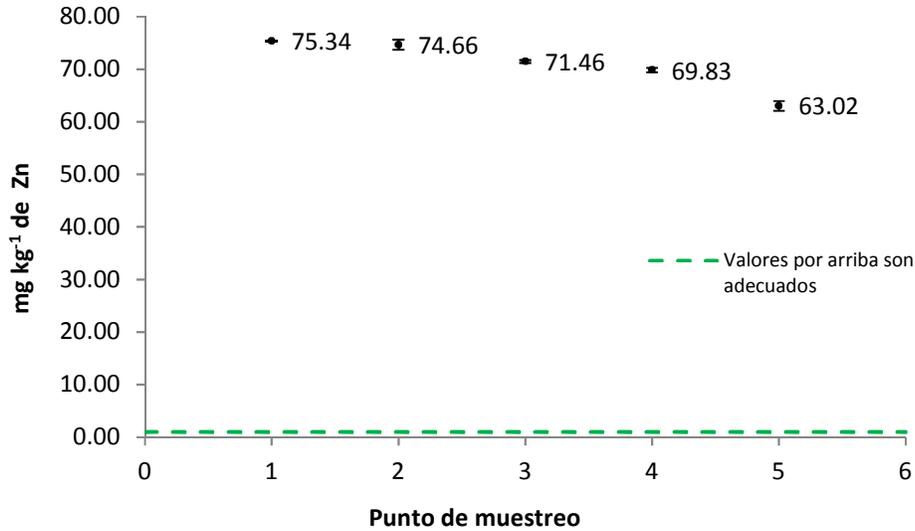


Figura 17. Zinc en puntos de muestreo. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo

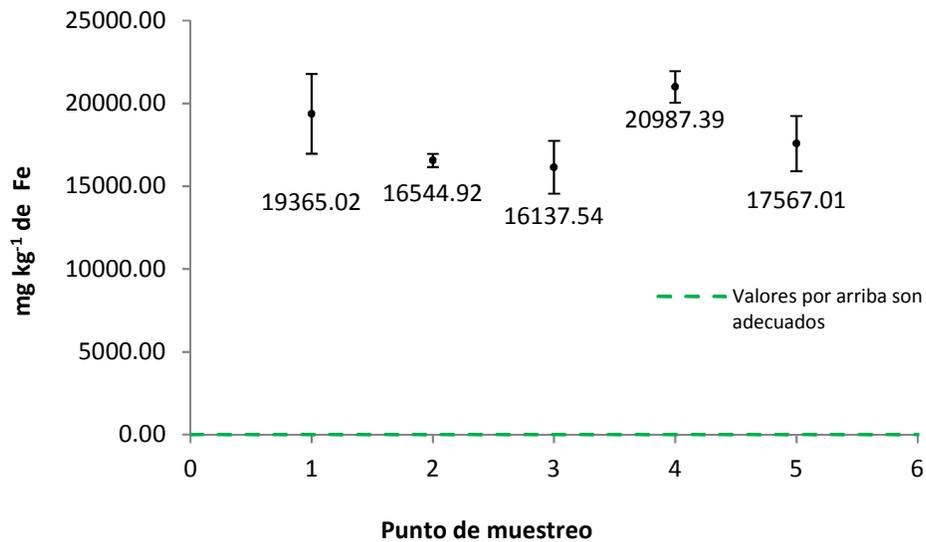


Figura 18. Hierro en puntos de muestreo Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo

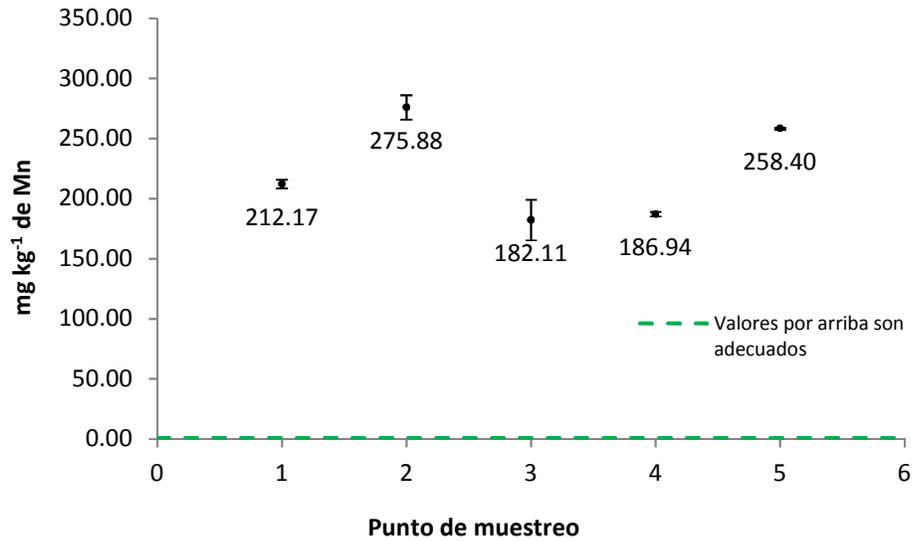


Figura 19. Manganeso en puntos de muestreo. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo

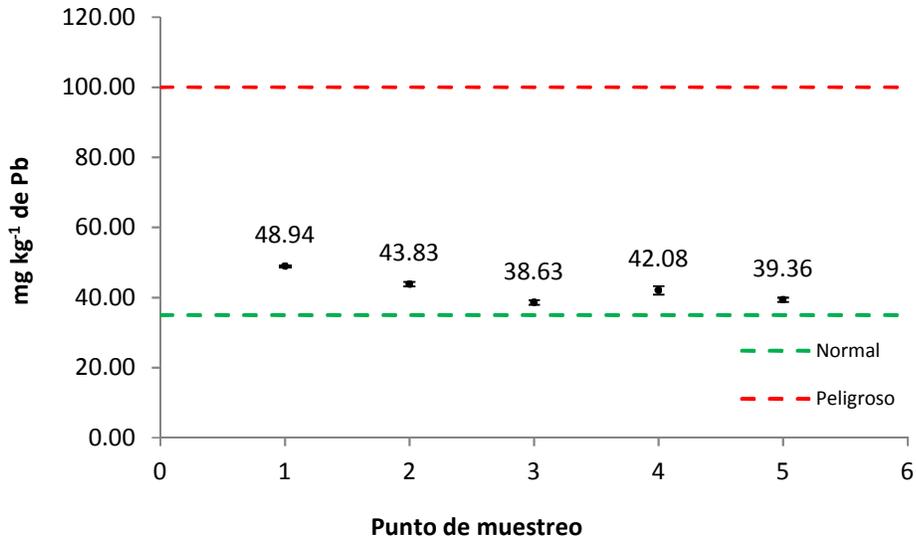


Figura 20. Plomo en puntos de muestreo. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo

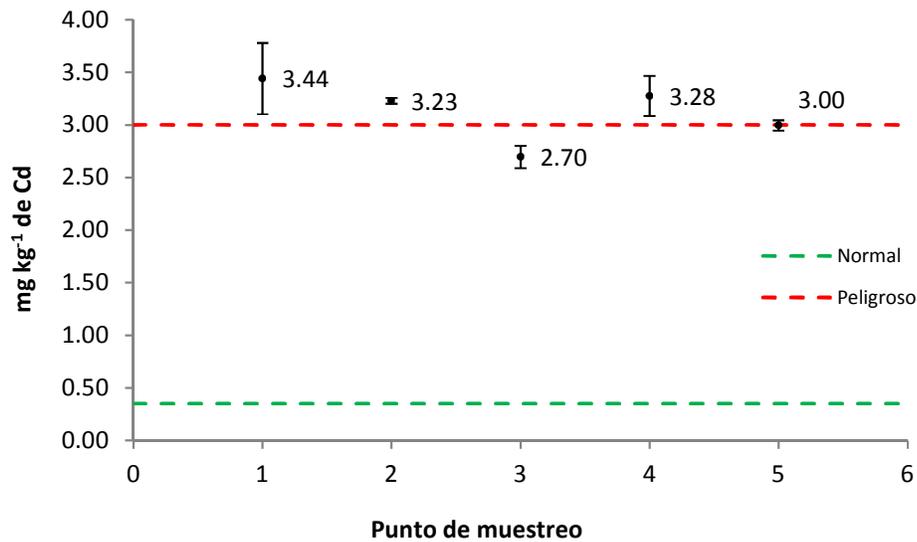


Figura 21. Cadmio en puntos de muestreo. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo

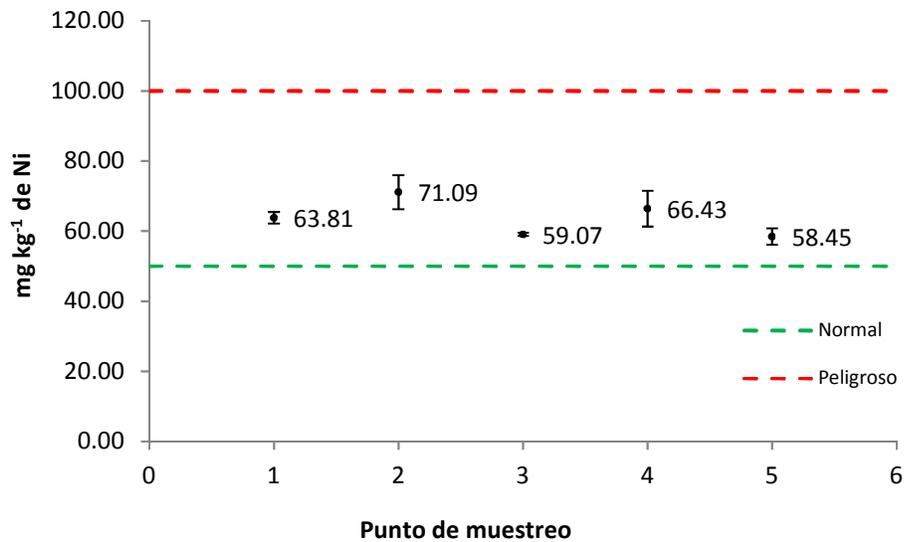
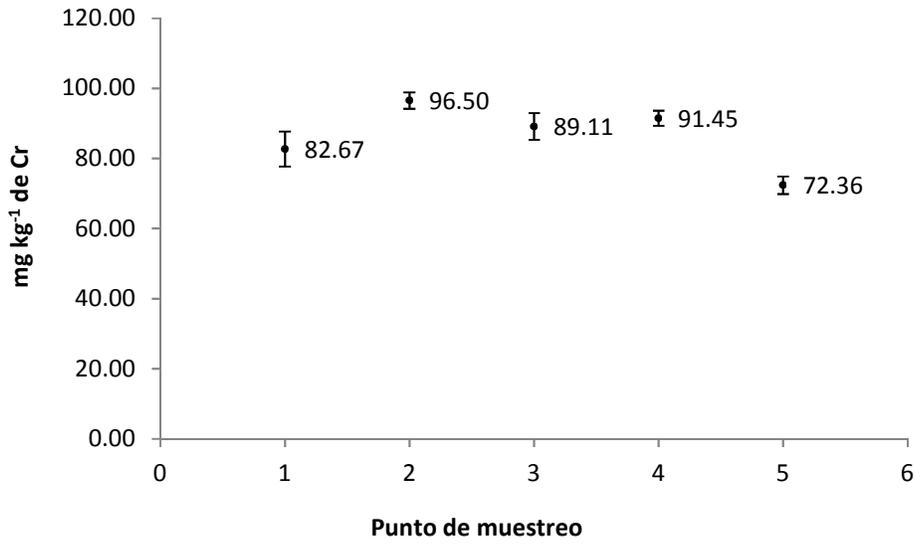


Figura 22. Níquel en puntos de muestreo. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo



**Figura 23. Cromo en puntos de muestreo. Punto 1: área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor; puntos 2, 3, y 4: áreas que han dejado de cultivarse por un año y punto 5: actualmente en uso para cultivo**

En la tabla 19 se resumen las características fisicoquímicas del suelo.

**Tabla 19. Características fisicoquímicas en los puntos de suelo**

Parámetro	Punto de muestreo				
	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5
pH	5.33	4.92	4.93	4.74	4.60
Conductividad	3.73	12.85	13.95	18.13	105.30
% Humedad	8.27	11.13	11.26	11.33	23.84
% Carbono total	2.09	2.69	2.56	1.70	3.71
% Carbono orgánico	2.06	2.28	1.85	1.52	1.84
% Nitrógeno total	0.17	0.25	0.20	0.20	0.22
*Nitrógeno total	1411.20	2520.00	1562.40	1461.60	1739.74
*Nitrógeno amoniacal	4.53	ND	ND	ND	12.03
% Materia orgánica	3.55	3.93	3.19	2.62	3.17
Cobre	19.23	25.04	24.59	24.44	23.22
Zinc	75.34	74.66	71.46	69.83	63.02
Hierro	19365.02	16544.92	16137.54	20987.39	17567.01
Manganeso	212.17	275.88	182.11	186.94	258.40
Plomo	48.94	43.83	38.63	42.03	39.36
Cadmio	3.44	3.23	2.70	3.28	3.00
Níquel	63.81	71.09	59.07	66.43	58.45
Cromo	82.67	96.50	89.11	91.45	72.36

**Punto 1:** área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor

**Puntos 2, 3 y 4:** áreas que han dejado de cultivarse por un año

**Punto 5:** actualmente en uso para cultivo

**Metales en unidades de mg Kg<sup>-1</sup>**

**Conductividad en unidades de dS m<sup>-1</sup> a 25 °C**

**\*Nitrógeno por método Kjeldahl en mg Kg<sup>-1</sup>**

### 3.1.8. Determinación de metamidofos

#### 3.1.8.1. Desarrollo del método analítico

Se caracterizó el estándar de metamidofos por infrarrojo medio con ATR. En la figura 24 se muestra el espectro de absorción del estándar que se obtuvo experimentalmente en este estudio y en la figura 25 el espectro reportado por Fleming, Villagrán y Koch en el 2013.

En los espectros de absorción de infrarrojo se observan dos conjuntos de bandas destacadas de  $3500 - 2800 \text{ cm}^{-1}$  y de  $400 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ . Este perfil vibracional es característico de los compuestos organofosforados debido a que el grupo P-O-R da bandas dentro de la región  $1088 - 920 \text{ cm}^{-1}$ . La frecuencia de estiramiento de P=O en los compuestos  $X_3P$  varía principalmente por la suma de los efectos de los tres sustituyentes. Los valores de P para los grupos sustituyentes  $\text{OCH}_3$ ,  $\text{NH}_2$  y  $\text{SCH}_3$ , permite asignarle una frecuencia para P=O de  $1200 \text{ cm}^{-1}$  aproximadamente (Fleming, Villagrán y Koch, 2013).

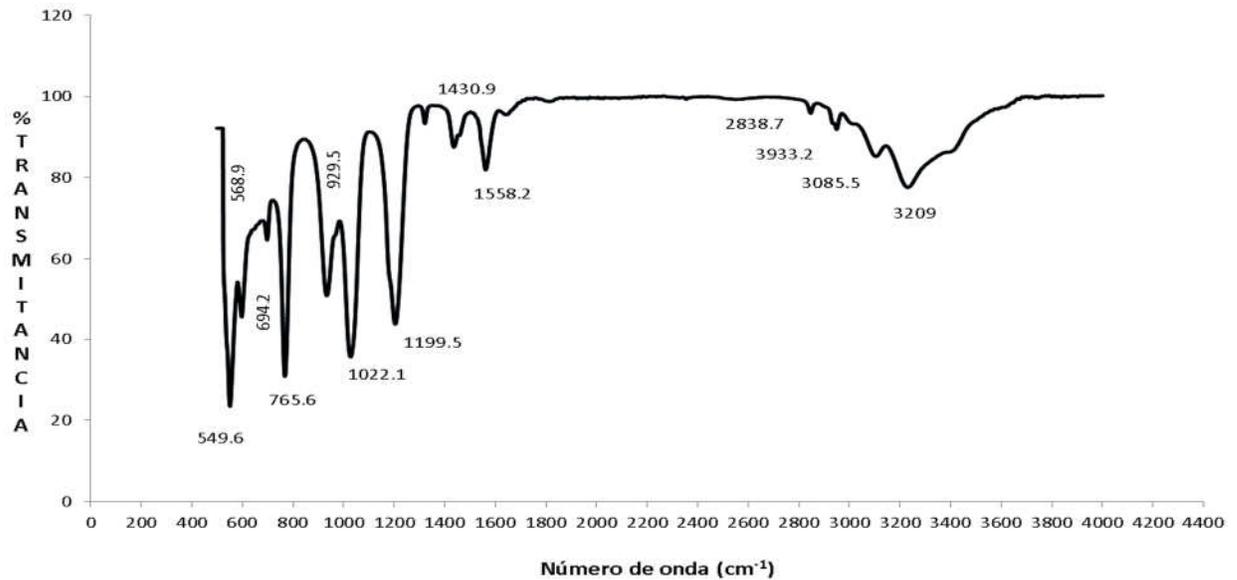


Figura 24. Espectro de absorción de metamidofos obtenido experimentalmente en el proyecto, en el infrarrojo medio con ATR

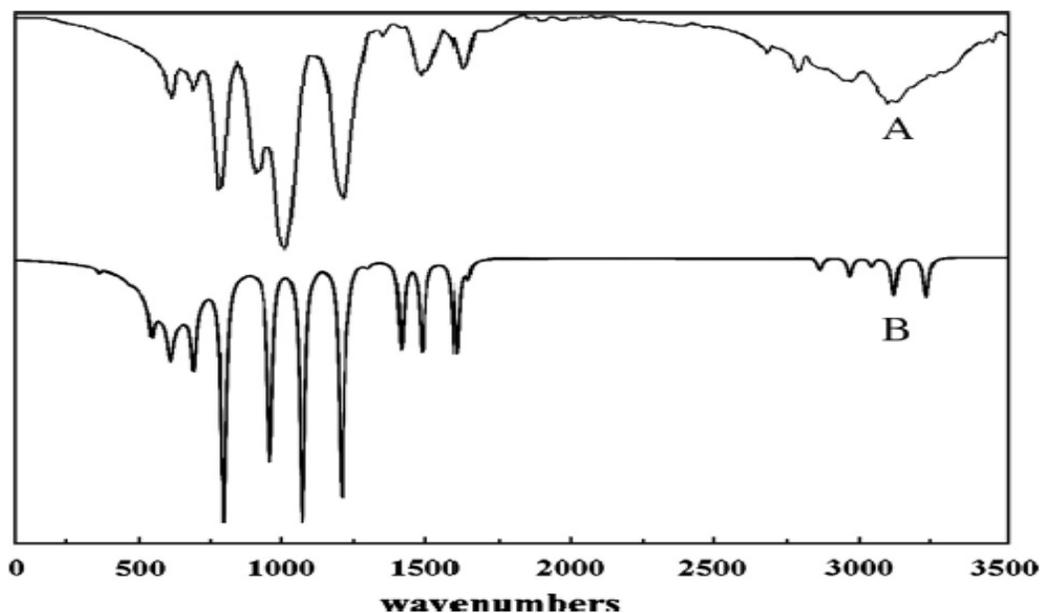


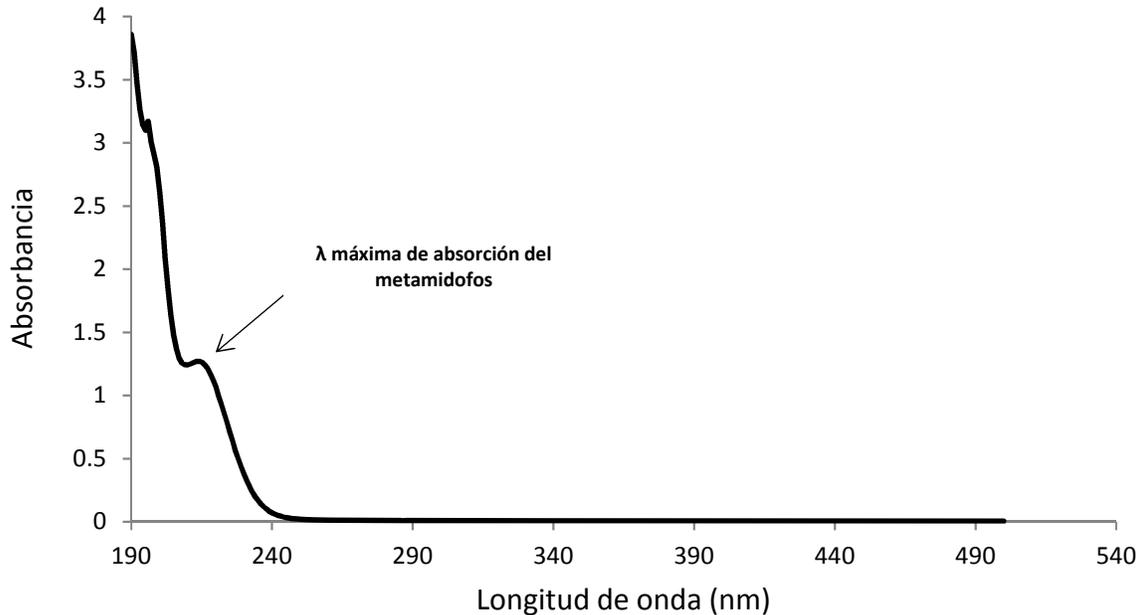
Figura 25. Espectro de absorción en el infrarrojo medio de metamidofos según Fleming, Villagrán, y Koch (2013)  
A. Experimental, B. Teórico

En la tabla 20 se resumen las bandas que se observan en el espectro de absorción del estándar del metamidofos y las vibraciones que las originan.

Tabla 20. Bandas del metamidofos por espectrofotometría de infrarrojo  
Fuente: (Fleming, Villagrán, y Koch, 2013)

Número de onda	Asignación
3209	NH <sub>2</sub> Estiramiento en el plano
3085.5	CH <sub>3</sub> Estiramiento fuera del plano
2933.2	CH <sub>3</sub> Estiramiento simétrico
2838.7	CH <sub>3</sub> Estiramiento simétrico
1558.2	NH <sub>2</sub> Tijereteo
1430.9	CH <sub>3</sub> Flexión en el plano
1199.5	CH <sub>3</sub> Balanceo fuera del plano
1022.1	CH <sub>3</sub> Balanceo en el plano
929.5	vCO <sub>3</sub> 83% + vO <sub>3</sub> P 15%
765.6	vO <sub>3</sub> P 65% + vCO <sub>3</sub> 28%
694.2	vPN 67% +NH <sub>2</sub> vibración 28%
568.9	NH <sub>2</sub> giro 58% + vPN 30%
549.6	tCH <sub>3</sub> 87%

El espectro de absorción por espectrofotometría de UV-VIS que resulta del barrido del estándar metamidofos a una concentración de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  se muestra en la figura 26.



**Figura 26. Espectro de absorción UV-Vis de metamidofos en agua**

La longitud de onda de absorción máxima se encuentra entre 210 y 218 nm, para determinar con más exactitud el valor, se comprobó la absorbancia de la solución de metamidofos en un intervalo de 210 a 222 nm. Los resultados se reportan en la tabla 21, encontrándose que la longitud de onda máxima a la cual absorbe el metamidofos es de 214 nm. Posteriormente, esta longitud de onda máxima se utilizó en la cuantificación del plaguicida por HPLC con el detector de espectrofotometría UV-Vis.

**Tabla 21. Absorbancia del metamidofos a diferentes longitudes de onda**

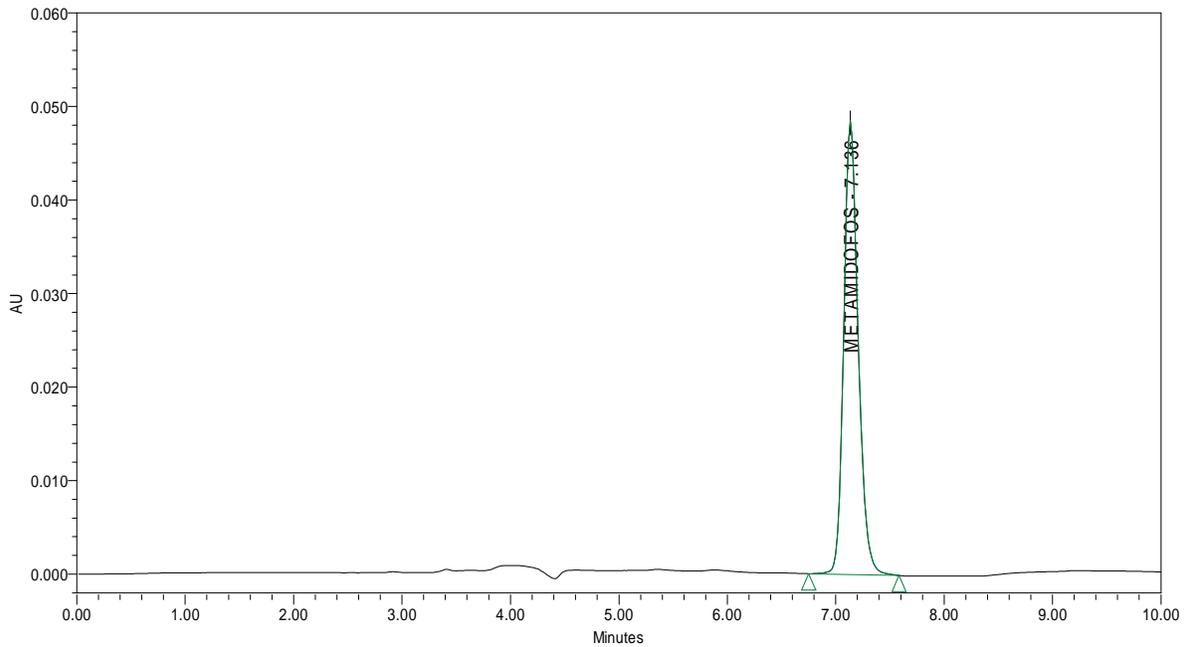
Longitud de onda ( $\lambda$ ) nm	Absorbancia Lectura 1 AU	Absorbancia Lectura 2 AU	Promedio AU
210	1.2776	1.2774	1.2775
211	1.2809	1.2816	1.2812
212	1.2878	1.2888	1.2883
213	1.2946	1.2953	1.2949
214	1.2948	1.2959	1.2953
215	1.2876	1.2866	1.2871
216	1.2689	1.2691	1.2690
217	1.2385	1.2389	1.2387
218	1.1985	1.1991	1.1988
219	1.1480	1.1483	1.1481
220	1.0890	1.0896	1.0893
221	1.0246	1.0250	1.0248
222	0.9542	0.9546	1.9088

Se evaluó la adecuabilidad del sistema para la cuantificación del metamidofos. Las condiciones cromatográficas: fueron: fase móvil metanol/agua (20:80 v/v), velocidad de flujo de  $0.6 \text{ mL m}^{-1}$ , volumen de inyección  $10 \mu\text{L}$ , longitud de onda de detección de  $214 \text{ nm}$  y concentración del plaguicida de  $500 \text{ mg L}^{-1}$ . Los resultados se muestran en la tabla 22.

**Tabla 22. Resultados de adecuabilidad del sistema**

Replica	Área	Tiempo de Retención	Factor de capacidad ( $K'$ )	Factor de coleo (T)	Número de platos teóricos (N)
1	393550	7.144	1.550	1.168	11964
2	389756	7.136	1.550	1.172	12040
3	404068	7.156	1.556	1.177	12162
4	397457	7.058	1.521	1.176	12804
5	402247	7.167	1.560	1.155	11430
Promedio	397415.60	7.132	1.547	1.169	12080
S	5941.60				
CV	1.49				

Con las mejores condiciones cromatográficas que se encontraron para la cuantificación de metamidofos en HPLC, el pico del metamidofos aparece en el cromatograma en un tiempo de retención aproximado de 7.0 minutos (figura 27).



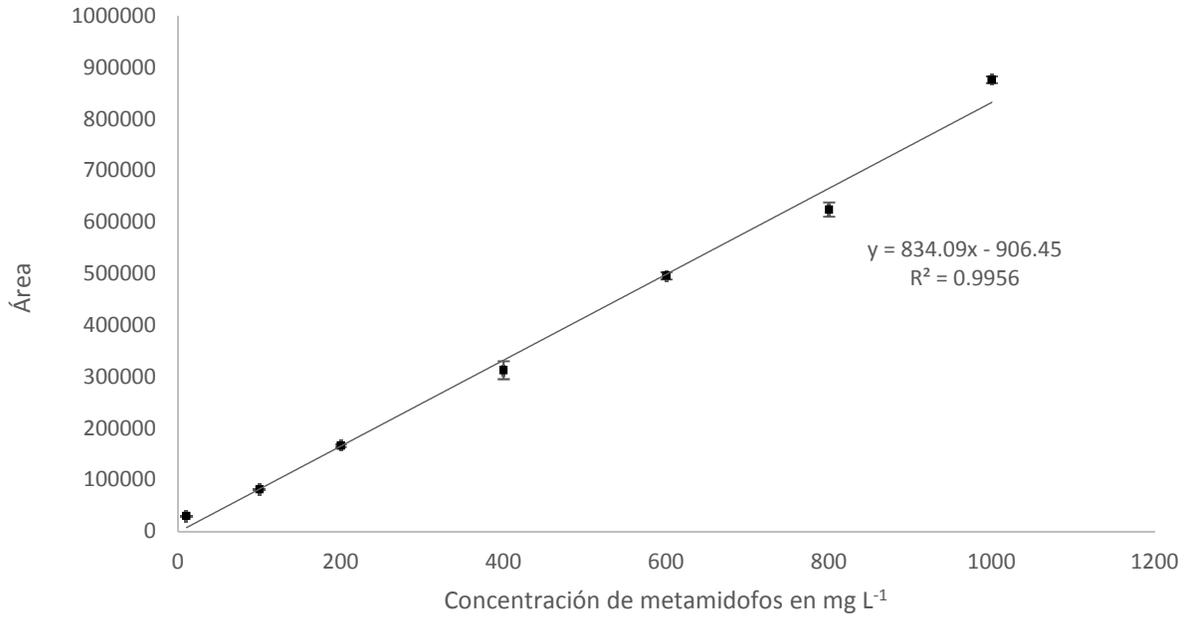
**Figura 27. Cromatograma de metamidofos en HPLC a una concentración de 500 mg L<sup>-1</sup>. Condiciones cromatográficas: fase móvil metanol/agua (20:80 v/v), velocidad de flujo de 0.6 mL m<sup>-1</sup>, volumen de inyección 10 µL y longitud de onda de detección de 214 nm**

Los datos de la validación se indican del inciso a al d.

**a. Linealidad del sistema**

**Tabla 23. Resultados de linealidad del sistema**

Concentración Metamidofos mg L <sup>-1</sup>	Área Replica 1	Área Replica 2	Área Replica 3	Área Promedio	b <sub>1</sub>	b <sub>0</sub>	R <sup>2</sup>
100	98625	103459	97381	99821.66	818.7	15068	0.996
200	179601	182809	180204	180003			
400	349030	349809	334567	344469			
600	500574	510785	508437	506599			
800	634239	651843	641156	642413			
1000	869656	845692	847263	854204			



**Figura 28. Linealidad del sistema**

**b. Límite de detección y cuantificación**

**Tabla 24. Resultados de límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)**

Concentración Metamidofos mg/L	Área Replica 1	Área Replica 2	Área Replica 3	Área Promedio	b <sub>1</sub>	b <sub>0</sub>	R <sup>2</sup>
5	5347	5453	5586	5462	1036.4	-235.58	0.998
10	10151	10123	10027	10100			
20	20073	20078	19117	19756			
50	51283	51717	52497	51832			

Los límites de detección y cuantificación para el método calculados a partir de la anterior curva de calibración fueron de 0.53 mg L<sup>-1</sup> y 1.43 mg L<sup>-1</sup> respectivamente.

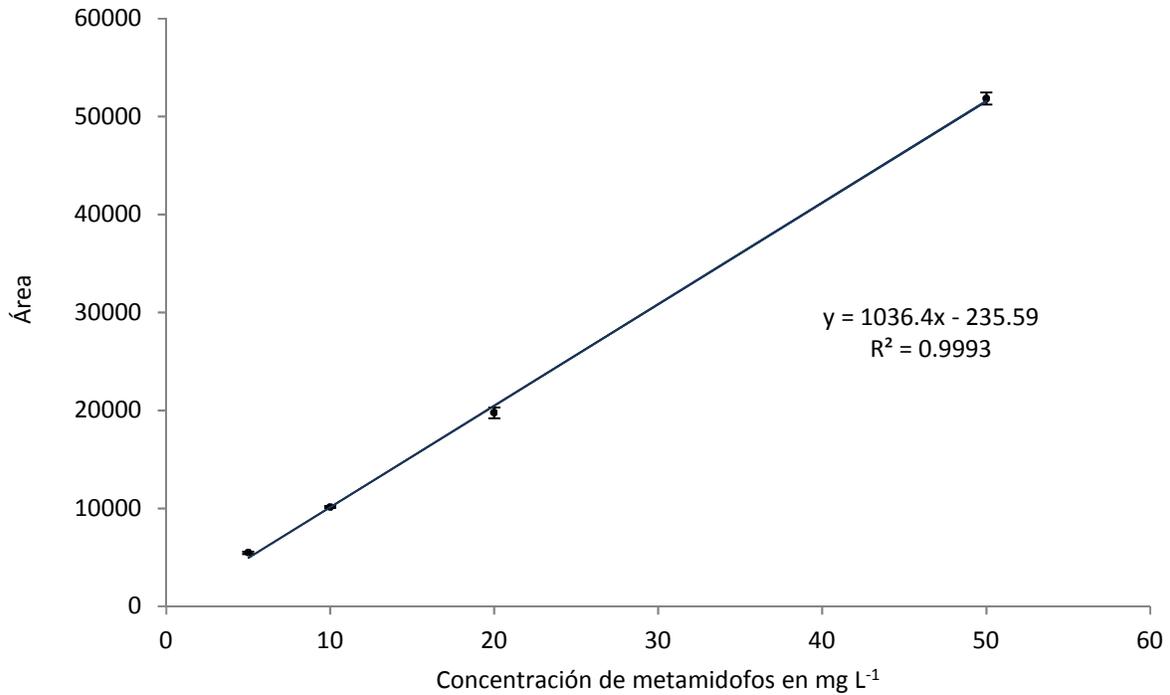
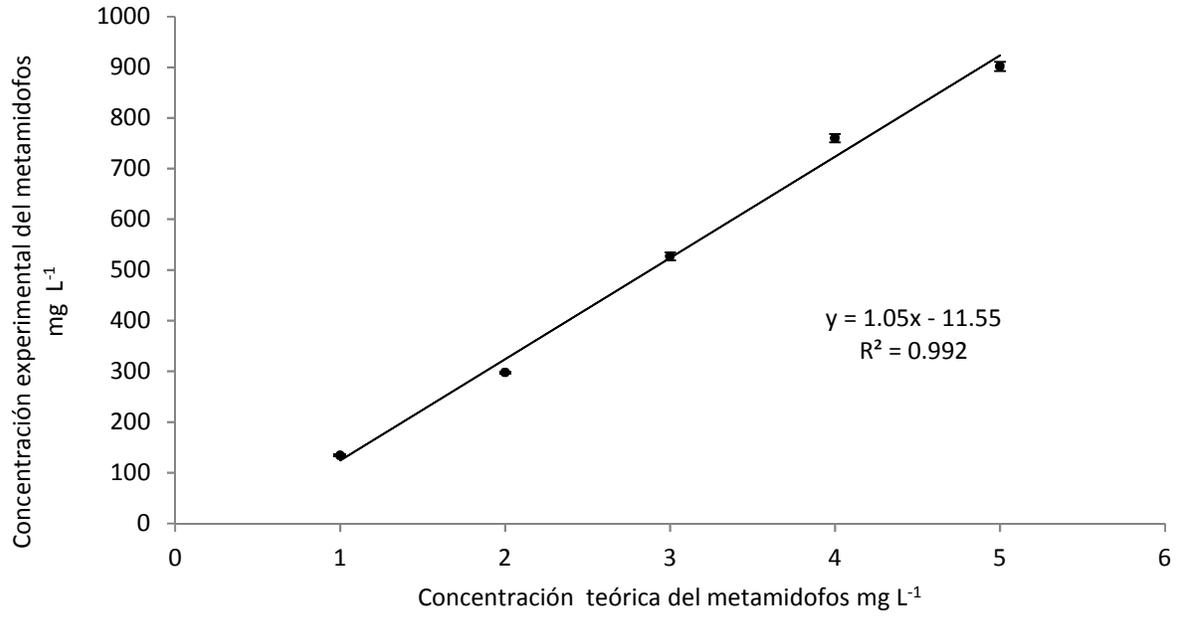


Figura 29. Curva de calibración para Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)

c. Linealidad del método

Tabla 25. Resultados de linealidad del método

Concentración metamidofos mg L <sup>-1</sup>	Área	Concentración recuperada	% Recobro	Promedio % recobro	CV	b <sub>1</sub>	b <sub>0</sub>	R <sup>2</sup>
150	127841	134.23	89.49	89.22	1.33	1.05	-11.55	0.992
	125636	131.88	87.92					
	128903	135.36	90.24					
300	279973	296.33	98.78	99.21	0.42			
	282346	298.86	99.62					
	281224	308.32	102.77					
500	488278	518.28	103.66	105.36	1.47			
	498151	528.80	105.76					
	502411	533.34	106.67					
700	710357	754.91	107.84	108.56	1.07			
	710992	755.58	107.94					
	723847	769.28	109.90					
900	843832	897.13	99.68	100.20	1.02			
	842601	895.81	99.53					
	858119	912.35	101.37					



**Figura 30. Linealidad del método**

d. Precisión

Tabla 26. Resultados de repetibilidad día 1

Concentración metamidofos mg L <sup>-1</sup>	Área	Concentración recuperada	% Recobro	Promedio % Recobro	CV
150	129824	142.67	95.11	92.74	1.35
	124731	137.25	91.50		
	126045	138.65	92.43		
	125802	138.39	92.26		
	126792	139.44	92.96		
	125681	138.26	92.17		
300	243259	263.48	87.83	86.08	1.33
	240617	260.67	86.89		
	238824	258.76	86.25		
	237019	256.84	85.61		
	235475	255.19	85.06		
	234860	254.54	84.85		
500	407379	438.28	87.66	87.02	1.72
	401010	431.50	86.30		
	394462	424.52	84.90		
	400010	430.43	86.09		
	411094	442.24	88.45		
	412287	443.51	88.70		
700	587559	630.18	90.03	90.46	1.63
	582104	624.37	89.20		
	578741	620.79	88.68		
	593570	636.58	90.94		
	605410	649.19	92.74		
	594943	638.05	91.15		
900	743590	796.36	88.48	89.10	0.99
	741212	793.83	88.20		
	751488	804.78	88.68		
	755585	809.14	90.94		
	758632	812.38	92.74		
	742074	794.75	91.15		

**Tabla 27. Resultados de repetibilidad día 2**

Concentración metamidofos mg L <sup>-1</sup>	Área	Concentración recuperada	% Recobro	Promedio % recobro	CV
150	162904	127.56	85.04	83.44	1.06
	159853	124.81	83.21		
	159128	124.16	82.77		
	159739	124.71	83.14		
	158941	123.99	82.66		
	160916	125.77	83.85		
300	312131	262.22	87.41	87.83	1.76
	311818	261.94	87.31		
	319882	269.21	89.74		
	318817	268.25	89.42		
	319882	262.75	87.58		
	305880	256.58	85.53		
500	541198	468.92	93.78	97.27	1.96
	562031	487.72	97.54		
	571532	496.29	99.26		
	566609	491.85	98.37		
	557511	483.64	96.73		
	564119	489.61	97.92		
700	797287	700.01	100.00	99.27	1.61
	774730	679.65	97.09		
	807195	708.95	101.28		
	801152	703.50	100.50		
	787825	691.47	98.78		
	781530	685.79	97.97		
900	995523	878.89	97.65	96.94	0.73
	984324	868.78	96.53		
	984577	869.01	96.56		
	991950	875.67	97.30		
	995583	878.94	97.66		
	978419	863.46	95.94		

En la tabla 28, se resumen los resultados de la evaluación del método para la cuantificación de metamidofos, los cuales cumplen con los criterios de aceptación establecidos en las referencias mencionadas.

**Tabla 28. Evaluación del método para la cuantificación de metamidofos**

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO		VALOR CALCULADO	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
Adecuabilidad del sistema	Factor de coleo (T)	1.169	$T < 2$
	Número de platos teóricos (N)	12 080	---
	Coefficiente de variación	1.49	$CV \leq 2$
Linealidad del sistema	Coefficiente de determinación	0.9986	$R^2 \geq 0.98$
LD Y LQ	Límite de detección	$0.53 \text{ mg L}^{-1}$	---
	Límite de cuantificación	$1.43 \text{ mg L}^{-1}$	---
Linealidad del método	Coefficiente de determinación	0.992	$R^2 \geq 0.98$
	Coefficiente de variación	0.42-1.33	$CV \leq 2$
Repetibilidad	Coefficiente de variación	0.99-1.72	$CV \leq 2$
Reproducibilidad	ANOVA	150 mg/L- 0.55	$F < 6.61$
		300 mg/L- 1.97	$p \leq 0.05$
		500 mg/L- 1.04	
		700 mg/L- 1.00	
		900 mg/L- 0.64	
Exactitud	% Recobro	83.44 - 99.27 %	---

Los porcentajes de recobro de la extracción del metamidofos por horno de microondas siguiendo la metodología descrita en el punto 2.2.10.1. se muestran en la tabla 29. Los porcentajes de recuperación son altos, seguramente debido a la solubilidad del plaguicida y a su escasa adsorción en el suelo en la hora de contacto.

**Tabla 29. Evaluación del método para la extracción de metamidofos**

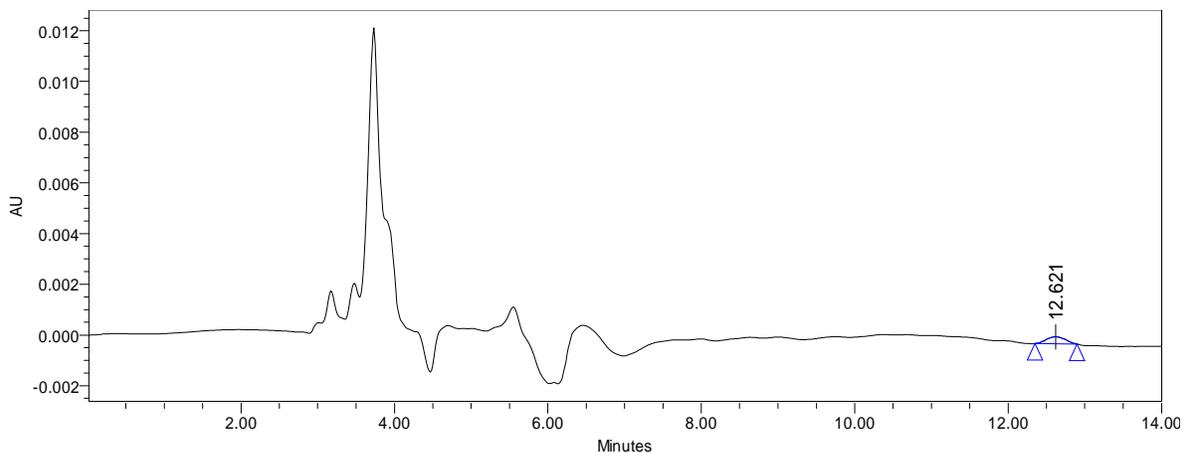
No. De muestra	Concentración de metamidofos mg Kg <sup>-1</sup>	Recobro %	CV %
Blanco	No detectado	0	
1	126.62	104.66	11.15
2	141.11	116.44	
3	121.84	100.67	
4	131.57	108.64	
5	102.92	84.99	
6	112.19	92.49	

### 3.1.8.2. Resultados de análisis de metamidofos en suelo

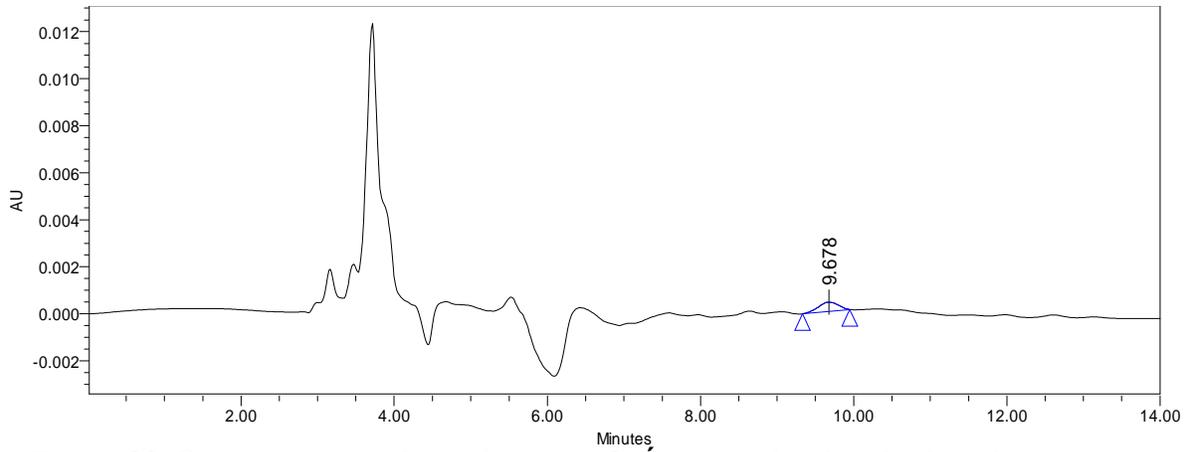
No se detectó el plaguicida metamidofos en los puntos de suelo que han dejado de trabajarse y en el que no se ha cultivado; con de los límites de detección del método analítico desarrollado. No obstante, en los cromatogramas de los puntos de muestreo 3 y 4 se observan picos que pudieran corresponder a otros plaguicidas organofosforados que se utilizan también en la zona, o bien productos de degradación de los mismos. Sólo en la muestra de suelo de la región que actualmente se cultiva, se encontró en una concentración de  $80 \pm 11$  mg Kg<sup>-1</sup>, valor que está por arriba de la DL<sub>50</sub> dérmica para varias especies (50 -110 mg Kg<sup>-1</sup>) (Wang *et al.*, 2008). La carga del metamidofos que se está aplicando en el terreno es aproximadamente 288 mg m<sup>-2</sup> cada 7 días, con un máximo de 3 aplicaciones por temporada, alternado con otros organofosforados como el dimetoato, diclorvos y clorpirifos. Por otro lado, la ausencia del metamidofos en las secciones que ya no se trabajan es lo esperado, pues se reporta que el plaguicida tiene un tiempo de vida media en suelos en condiciones aerobias de 5 días y en condiciones anaerobias es > 41 días (Wang *et al.*, 2008) así

que en los suelos que ya no se han cultivado por un año, el metamidofos probablemente ya ha sido degradado.

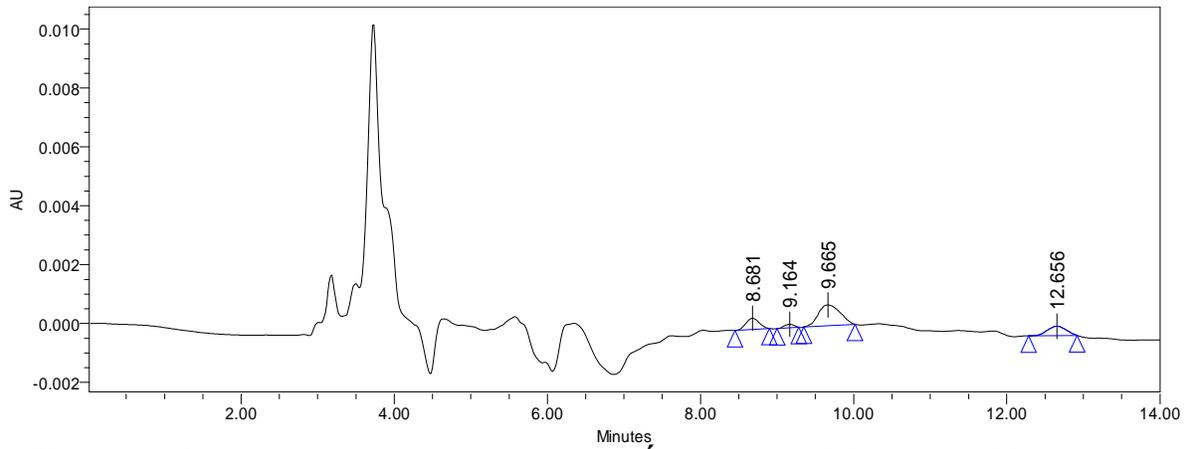
El pH ácido en el suelo de la región muestreada (4.60 -5.33), tendría un efecto negativo en la adsorción del metamidofos en el suelo, de acuerdo al estudio realizado por Koleli y colaboradores, en el que encontraron que al incrementarse el valor de pH, es mayor la adsorción del plaguicida, obteniéndose hasta el 100% en pH alcalino (Koleli *et al.*, 2007). Al volverse más ácido el suelo por la aplicación frecuente de plaguicidas y fertilizantes, podría estar favoreciendo la migración del plaguicida a capas más profundas. Además, Crisanto y colaboradores (1994) reportan que la materia orgánica tiene una correlación positiva en la adsorción de plaguicidas hidrofóbicos, no así en los hidrofílicos, grupo al que pertenece el metamidofos con un Log  $K_{ow}$  de -0.65 a 25 °C (Kumar *et al.*, 2015). Por lo anterior, se reforzaría la lixiviación del plaguicida, incrementada por la irrigación constante de los cultivos y la solubilidad del metamidofos en agua ( $> 2000 \text{ g L}^{-1}$ ) (Wang *et al.*, 2010). Así, es probable que a mayor profundidad del suelo, la concentración del plaguicida sea mayor. En las figuras (31-35) se muestran los cromatogramas correspondientes a la cuantificación del metamidofos en los diferentes puntos de muestreo.



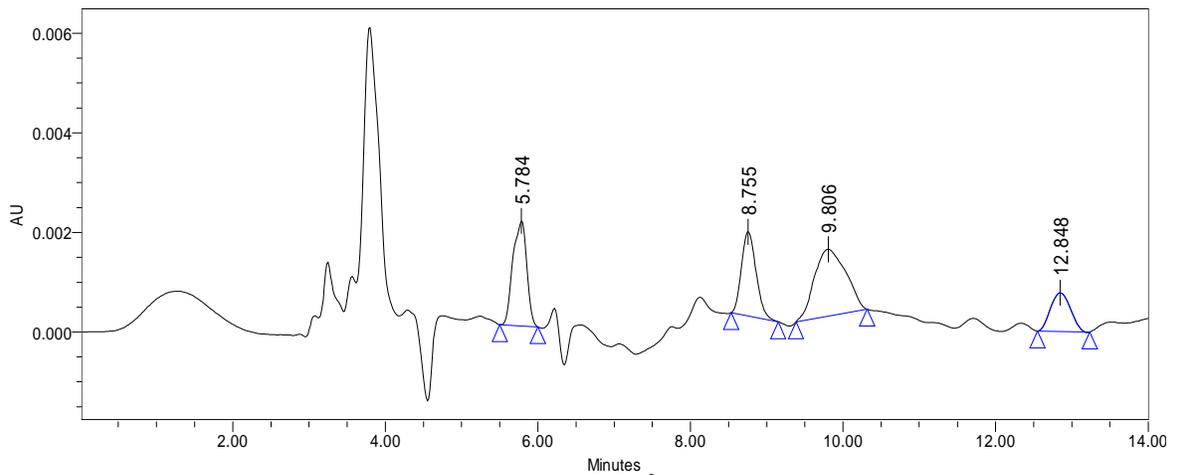
**Figura 31. Cromatograma de suelo punto 1. Área despejada de terreno que no ha sido utilizada para la siembra de flor.**



**Figura 32. Cromatograma de suelo punto 2. Área que ha dejado de cultivarse por un año.**



**Figura 33. Cromatograma de suelo punto 3. Área que ha dejado de cultivarse por un año.**



**Figura 34. Cromatograma de suelo punto 4. Área que ha dejado de cultivarse por un año.**

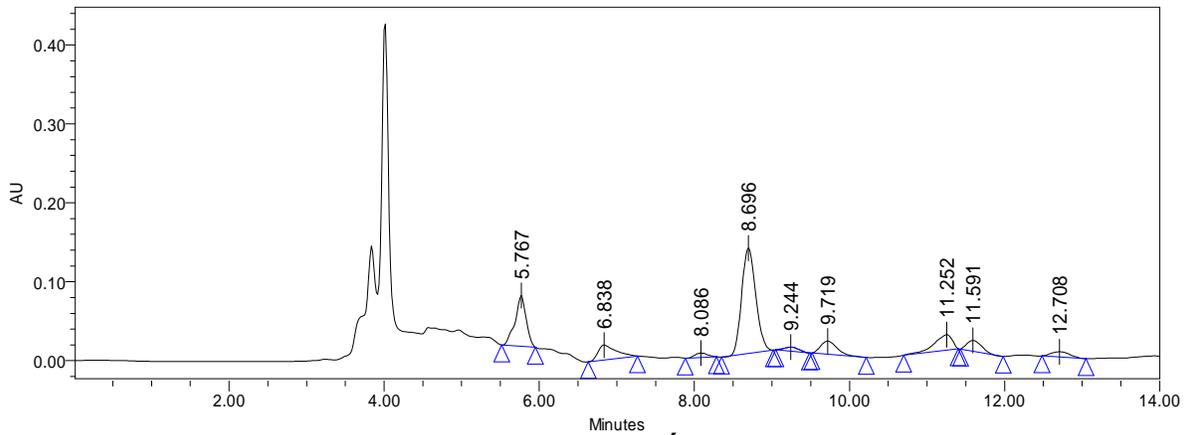


Figura 35. Cromatograma de suelo punto 5. Área empleada para el cultivo de flor

### 3.2. Identificación del consorcio bacteriano y pruebas de biodegradación

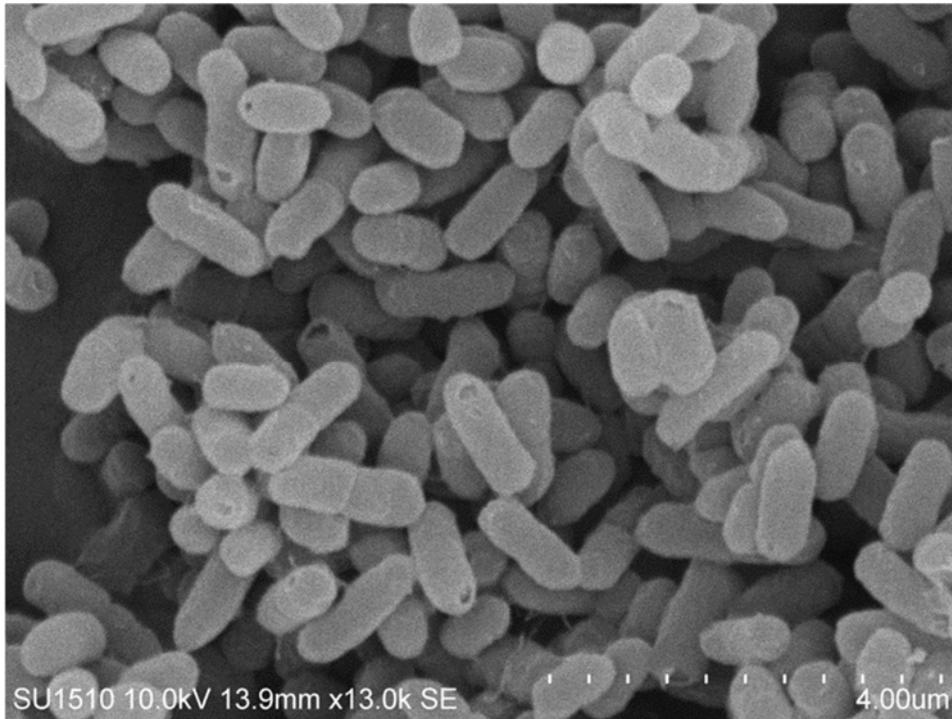
#### 3.2.1. Identificación de cepas bacterianas

Se aislaron 5 cepas capaces de crecer en una concentración de metamidofos de 200 mg L<sup>-1</sup>. Se les realizó tinción de Gram para conocer su morfología microscópica, así como las pruebas de catalasa y oxidasa. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

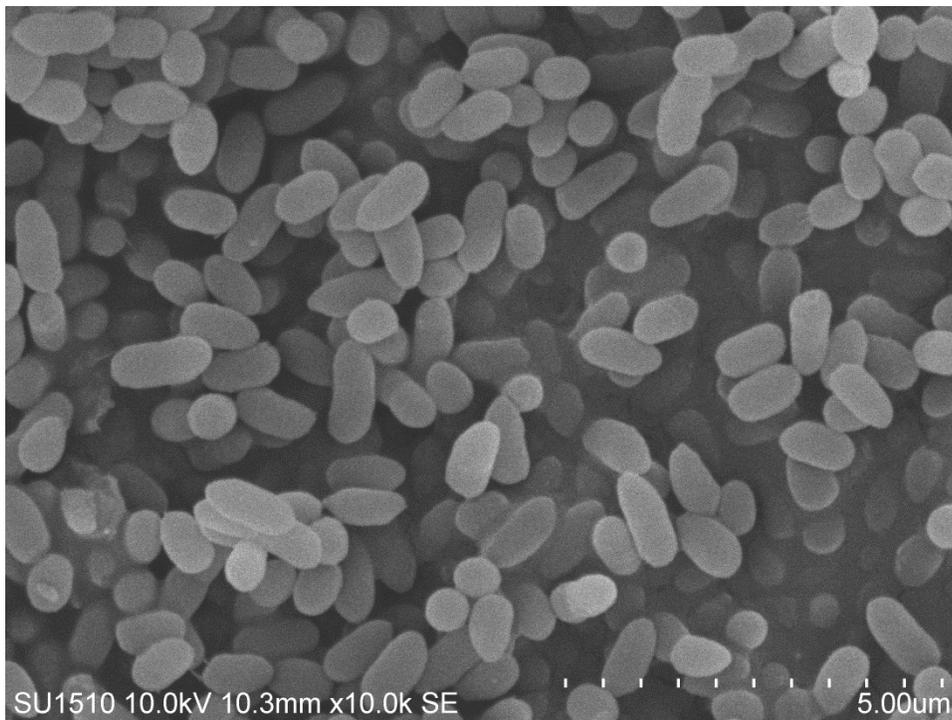
Tabla 30. Resultados de tinción de Gram, catalasa y oxidasa en las cepas aisladas

Cepa	Gram	Catalasa	Oxidasa
A	Bacilos G(-)	Positivo	Negativo
B	Bacilos G(-)	Positivo	Positivo
C	Bacilos G(-)	Positivo	Positivo
D	Bacilos G(-)	Positivo	Positivo
E	Bacilos G(-)	Positivo	Positivo

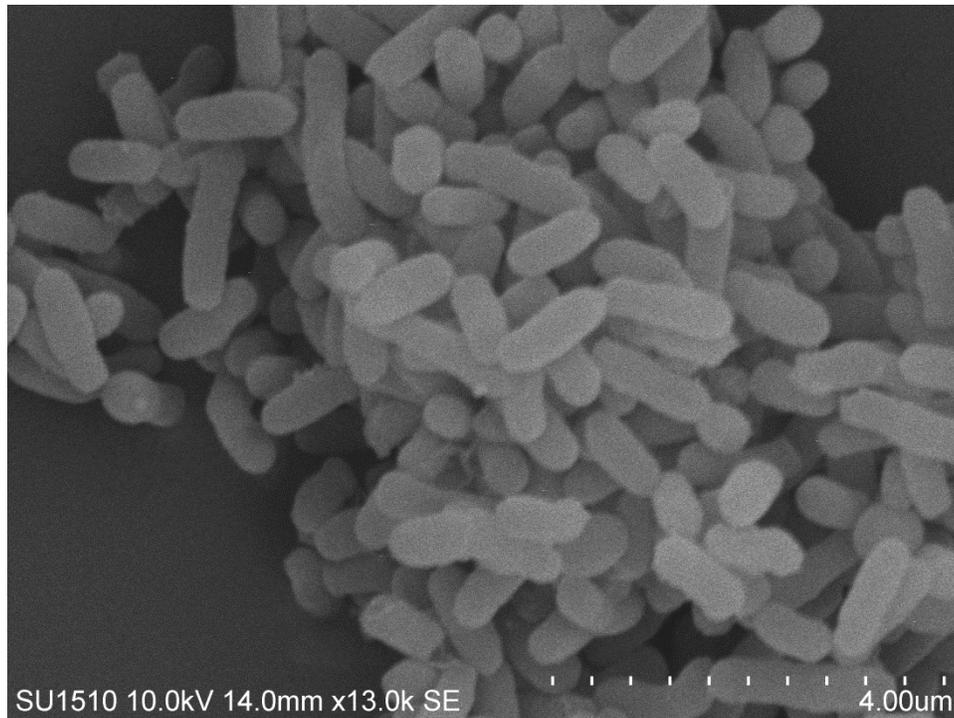
De las imágenes obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido se confirma que las bacterias son bacilos. Se determinó el promedio de las dimensiones de las bacterias empleando el software Image-Pro Analyzer 7.0.



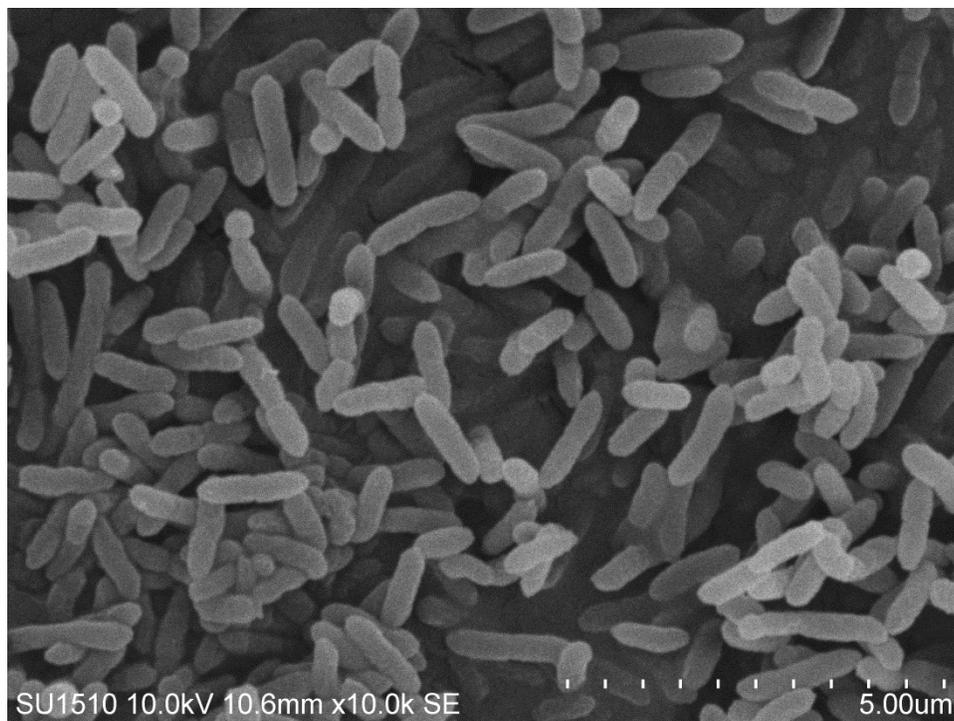
**Figura 36. Imagen SEM de cepa A. Medida promedio de la bacteria  $1.366 \pm 0.019 \times 0.514 \pm 0.005 \mu\text{m}$**



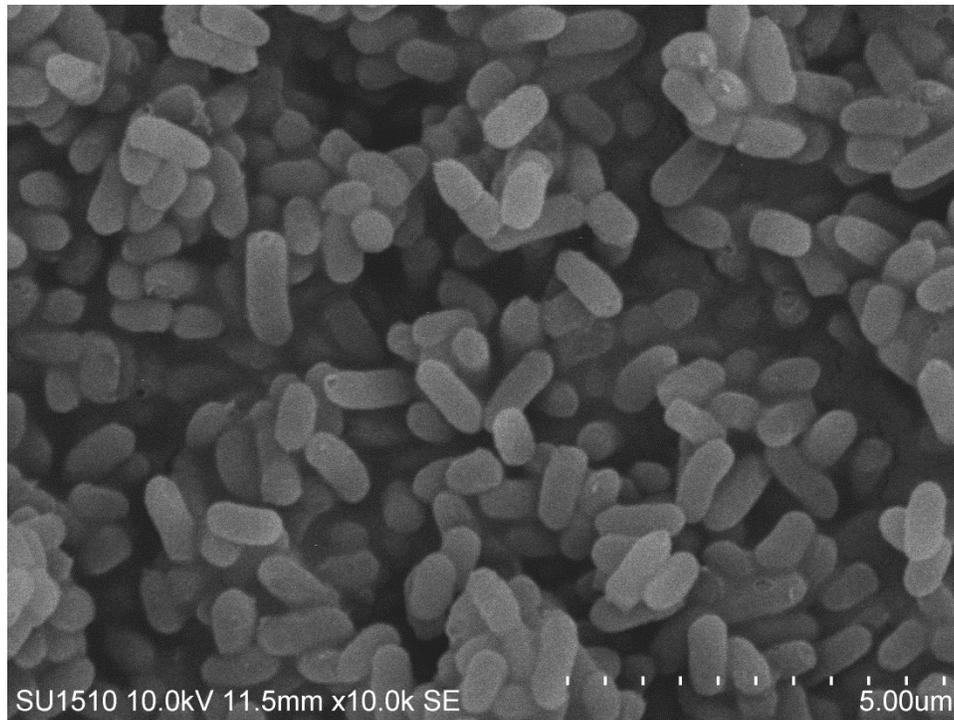
**Figura 37. Imagen SEM de cepa B. Medida promedio de la bacteria  $1.349 \pm 0.039 \times 0.569 \pm 0.007 \mu\text{m}$**



**Figura 38. Imagen SEM de cepa C. Medida promedio de la bacteria  $1.373 \pm 0.121 \times 0.450 \pm 0.027 \mu\text{m}$**



**Figura 39. Imagen SEM de cepa D. Medida promedio de la bacteria  $1.253 \pm 0.054 \times 0.363 \pm 0.013 \mu\text{m}$**



**Figura 40. Imagen SEM de cepa E. Medida promedio de la bacteria  $1.167 \pm 0.076 \times 0.526 \pm 0.058 \mu\text{m}$**

La secuenciación de DNA fue analizada en el programa MEGA-X y consultadas en la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Los resultados de identificación del género de las bacterias se indican en la tabla 31.

**Tabla 31. Identificación del consorcio bacteriano**

Cepa	Identificación	Porcentaje de identidad
A	<i>Enterobacter asburiae</i>	100.00 %
B	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99.81 %
C	<i>Shinella kummerowlae</i>	98.00 %
D	<i>Pseudochromobactrum assaccharolyticum</i>	99.80 %
E	<i>Brevundimonas naejangsanensis</i>	100.00 %

El género *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos distribuidos abundantemente en el ambiente, tienen un metabolismo diverso y son capaces de degradar compuestos complejos como hidrocarburos, cloro y nitro-orgánicos, poliuretanos y plaguicidas; por

lo que son ampliamente utilizados en procesos de biorremediación (Luczkiewicz *et al.*, 2015), (Hung *et al.*, 2016), (Stamps *et al.*, 2018). Bacterias pertenecientes a este grupo han sido ya reportadas en otras investigaciones como degradadoras del metamidofos (Ramu y Seetharaman, 2014), (Pinjari *et al.*, 2012), debido a la actividad de las enzimas hidrolíticas que secretan. El género *Brevundimonas* antes estaba clasificado como *Pseudomonas*, dado que presentan características similares. Estas bacterias también poseen actividad de hidrolasa organofosforada, lo que les permite degradar a los compuestos organofosforados (Parthasarathy *et al.*, 2016).

Bacterias pertenecientes al género *Shinella* han sido aisladas de suelo contaminado para degradar 1H-1,2,4-triazol (TZ), un compuesto empleado para la síntesis de plaguicidas (Wu *et al.*, 2016) y de lodos activos para degradar la nicotina (Qiu *et al.*, 2016). Mientras que, en otro estudio, se reporta a una bacteria del género *Pseudochrobactrum* como capaz de mineralizar la molécula del fenol (Mao, Yu y Xin, 2015). Por último, el género *Klebsiella* son bacilos Gram negativos que frecuentemente se pueden encontrar en el ambiente sobre todo en suelos ya que son fijadoras de nitrógeno. Xu y colaboradores en un estudio de biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, trabajaron con una bacteria perteneciente a este grupo que demostró tener un alto potencial de degradación para los compuestos (Xu, *et al.*, 2019), también tiene la capacidad de degradar fármacos como la tetraciclina (Shao *et al.*, 2018) o el diclofenaco (Stylianou *et al.*, 2018).

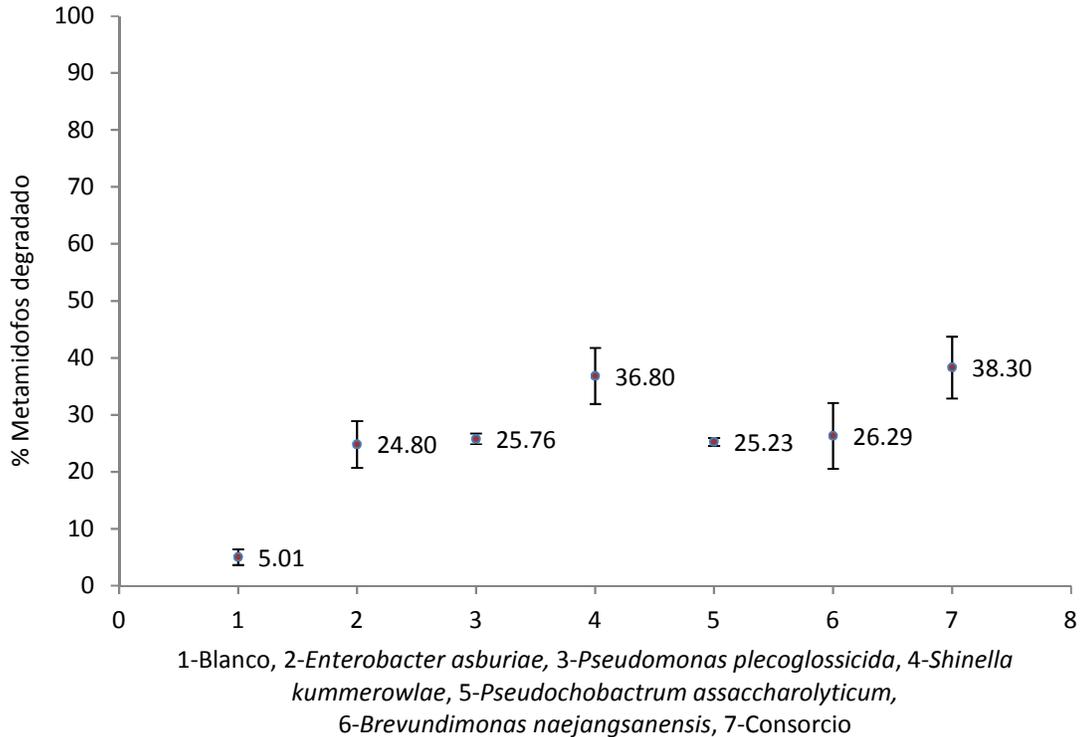
Con excepción del género *Pseudomonas*, el resto no ha sido reportado como degradadores del plaguicida metamidofos.

### 3.2.2. Pruebas de biodegradación

Los porcentajes de degradación del metamidofos que se obtuvieron en las pruebas con las cinco cepas de forma independiente y en consorcio (preparado con las cepas en la misma proporción) se muestran en la figura 41. Para la primer prueba se utilizaron las siguientes condiciones: 10 días de exposición, a 30 °C, con un valor de pH del medio mineral igual a 7.0, y una concentración inicial del metamidofos de 200 mg L. El

análisis estadístico ANOVA con un  $p \leq 0.05$  indica que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de degradación que se obtienen cuando las cepas se inoculan por separado o en consorcio. Sin embargo, se observa que el género *Shinella* tiene el porcentaje de degradación mayor (36.80 %) comparado con las otras cepas (cuyos porcentajes entre ellas son similares, entre 24.80 y 26.29 %). En consorcio hay un aumento en el valor promedio de la degradación (38.30 %), y este es parecido al del género *Shinella*.

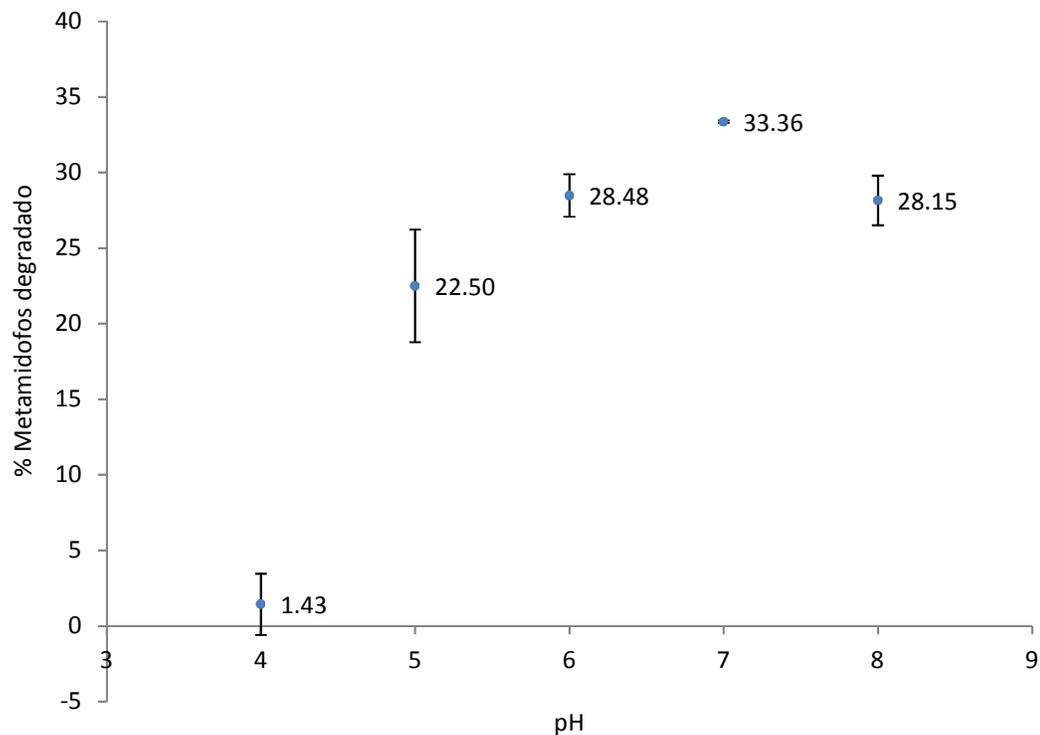
Es importante mencionar que en los gráficos, al porcentaje de degradación de la prueba, ya se le resta el % promedio degradado del metamidofos en el blanco.



**Figura 41. Degradación del metamidofos por las cepas de manera independiente y en consorcio, en 10 días de estudio**

Por otro lado, se analizó en consorcio, el efecto del pH manteniendo la temperatura de 30 °C (figura 42). Se consideraron los valores de pH de 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0, que es un intervalo en el que el metamidofos permanece estable. El análisis estadístico

ANOVA con un  $p < 0.05$  muestra que hay diferencias significativas entre los porcentajes de degradación del metamidofos. Asimismo se observa que hay una mayor degradación a pH de 7.0, aunque el plaguicida puede ser degradado por las cepas a valores de pH de 5.0, 6.0 y 8.0, no así a un valor de pH de 4.0. Esto último, representaría una agravante adicional de la alteración fisicoquímica del suelo por el uso de los agroquímicos, pues la tendencia según este estudio, es el aumento de la acidez en los terrenos cultivados (valor de pH igual a 4.60), que inhibe a su vez la actividad bacteriana, lo que afectaría no sólo la mineralización de elementos indispensables como el carbono y nitrógeno, sino también habría una disminución en la degradación del propio metamidofos.



**Figura 42. Degradación del metamidofos por el consorcio bacteriano a diferentes valores de pH y temperatura de 30 °C, en 10 días de estudio**

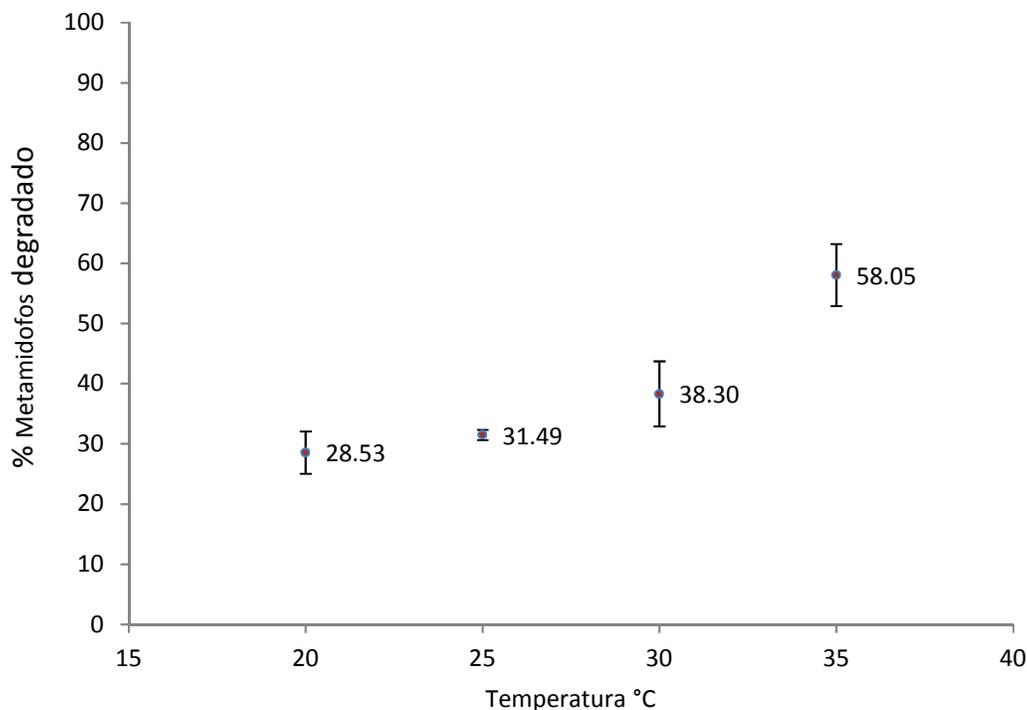
En la tabla 32 se indican los porcentajes de degradación del metamidofos en los blancos de pH, a temperatura de 30 °C.

**Tabla 32. Porcentaje de degradación del metamidofos en los blancos de pH**

Blanco	% de Metamidofos degradado	Desviación estándar
pH 4	2.02	1.17
pH 5	4.57	1.25
pH 6	5.16	0.53
pH 7	5.01	1.39
pH 8	5.10	0.98

Además, se evaluaron tres temperaturas adicionales a los 30 °C (20, 25 y 35 °C), que es un intervalo de temperatura en los que pueden crecer las bacterias mesofílicas (figura 43). Los resultados indican que a mayor temperatura, aumenta el porcentaje de degradación. Siendo que a 35 °C, el porcentaje degradado de metamidofos es de 58.05% vs el 38.30% a 30 °C. El ANOVA con un  $p \leq 0.05$  demuestra que hay diferencias significativas en los porcentajes de degradación. No obstante, el consorcio bacteriano es capaz de degradar al plaguicida en las cuatro temperaturas estudiadas.

Con la temperatura media anual de 18.6 °C en el sitio de muestreo (Velázquez, 2017), la degradación del metamidofos sería similar a la degradación con la temperatura de 20 °C (28.53 %), la cual en el estudio fue la más baja, ya que las bacterias no están en la temperatura óptima para favorecer la degradación del plaguicida.



**Figura 43. Degradación del metamidofos por el consorcio bacteriano a diferentes temperaturas y pH 7.0, en 10 días de estudio**

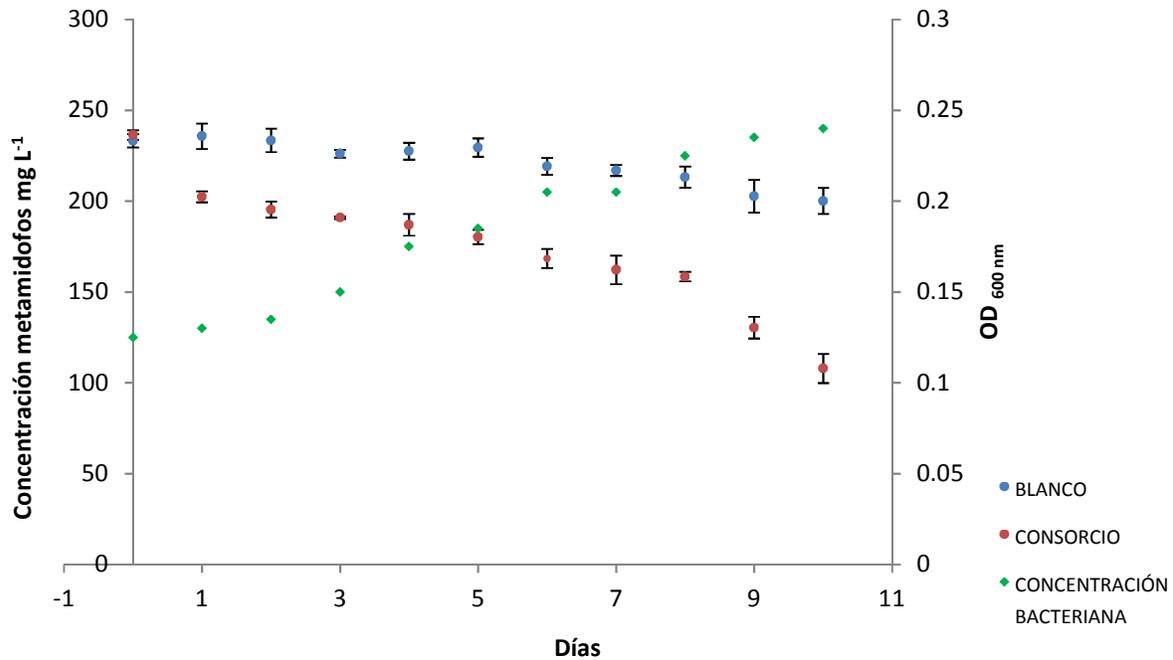
En la tabla 33 se indican los porcentajes de degradación del metamidofos en los blancos de Temperatura a pH 7.0.

**Tabla 33. Porcentaje de degradación del metamidofos en los blancos de temperatura**

Blanco	% de Metamidofos degradado	Desviación estándar
20 °C	4.17	1.70
25 °C	5.94	0.28
30 °C	5.01	1.39
35 °C	4.97	1.38

Con las mejores condiciones de degradación (pH 7.0 y temperatura de 35 °C) se monitoreó como decrece la concentración del metamidofos a través de 10 días de incubación, con el consorcio bacteriano (figura 44). De una concentración inicial de 236.41 mgL<sup>-1</sup> de metamidofos, la concentración residual fue de 107.91 mg L<sup>-1</sup>, por lo que se degrado el 45.64 % del plaguicida. Los porcentajes bajos de degradación pueden deberse, aparte de la toxicidad del compuesto, al número de átomos de carbono que contiene la molécula, que sería limitante para el crecimiento bacteriano.

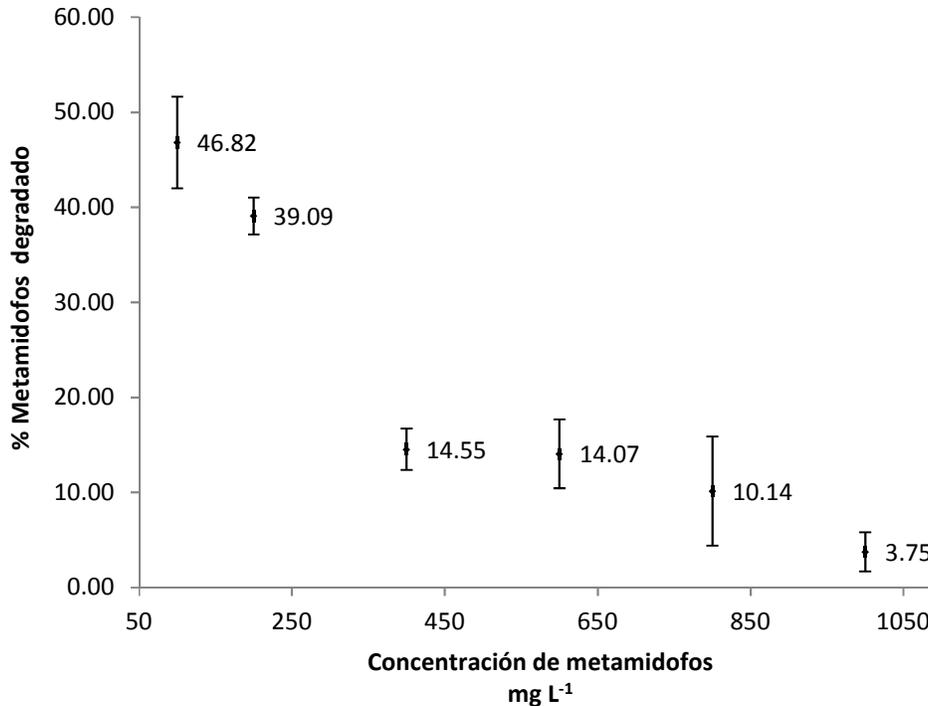
El radio molar de C:N:S:P en una mol de metamidofos es 2:1:1:1, es decir que, nitrógeno, azufre y fósforo, elementos indispensables para la actividad microbiana también estarían limitados si se utilizara al plaguicida como única fuente de estos elementos. Sin embargo, el medio mineral empleado en el estudio contiene sales que son fuentes adicionales de nitrógeno, azufre y fósforo, pero la única fuente de carbono la proporciona el plaguicida.



**Figura 44. Degradación del metamidofos por el consorcio bacteriano vs tiempo**

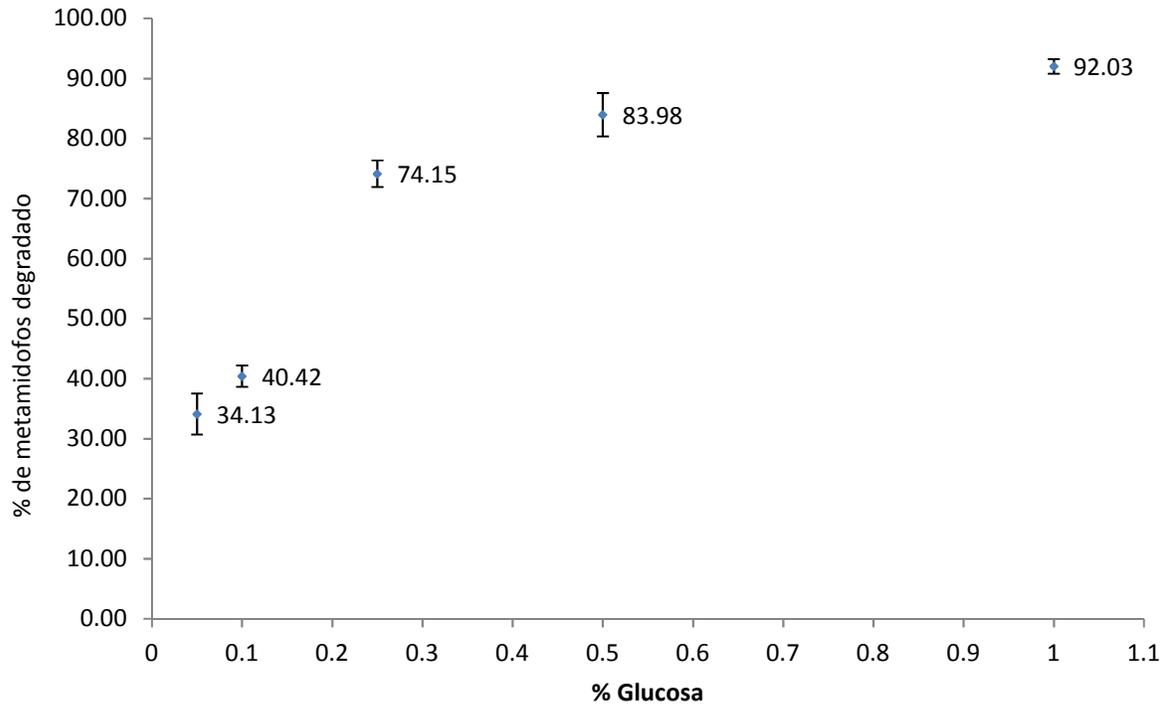
Se estudió también la degradación del metamidofos a diferentes concentraciones (100, 200, 400, 600, 800 y 1000 mg L<sup>-1</sup>). El porcentaje de degradación disminuye conforme aumenta la concentración del plaguicida, y se observan porcentajes similares de degradación a 400, 600 y 800 mg L<sup>-1</sup>. A 1000 mg L<sup>-1</sup> apenas se degrada en un 3.75 %, por lo que esta concentración del metamidofos ya es tóxica para las bacterias e inhibe su crecimiento (figura 45).

En el gráfico, para el cálculo del porcentaje de degradación para cada concentración de metamidofos, se considera la concentración final del blanco sometido a las mismas condiciones, pero preparado sin el inóculo del consorcio bacteriano.



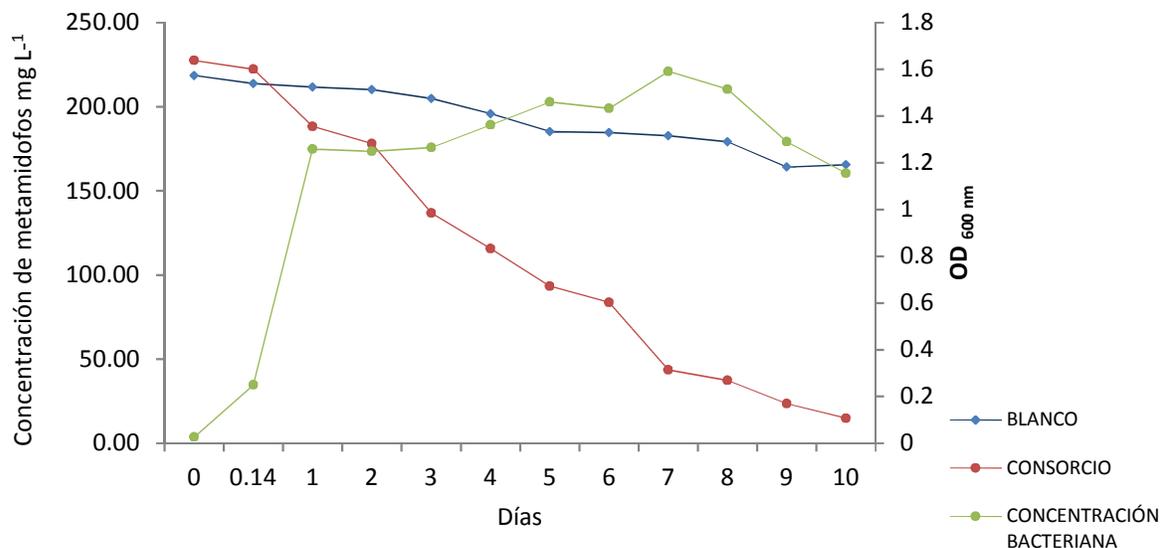
**Figura 45. Degradación del metamidofos por el consorcio bacteriano a diferentes concentraciones, en diez días de estudio**

Finalmente, se experimentó con una fuente adicional de carbono. Para ello se empleó dextrosa a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 y 1 %, aparte del metamidofos a 200 mg L<sup>-1</sup> (figura 46). Los porcentajes de degradación aumentan a mayor concentración de dextrosa, llegando a 92.03 % en diez días de prueba. Los resultados anteriores, comprueban la hipótesis de que cuando se utiliza al plaguicida como única fuente de carbono, la limitante para el crecimiento bacteriano es el número de átomos de este elemento en la molécula, pues en el mismo tiempo de incubación se degrada casi el total del metamidofos con dextrosa al 1%. Siendo esta concentración de dextrosa la óptima del intervalo estudiado. En la figura, para el cálculo del porcentaje de degradación para cada concentración de glucosa con el metamidofos, se considera la concentración final del blanco sometido a las mismas condiciones, pero preparado sin el inóculo del consorcio bacteriano.



**Figura 46. Degradación del metamidofos por el consorcio bacteriano con dextrosa como fuente adicional de carbono, en 10 días de estudio**

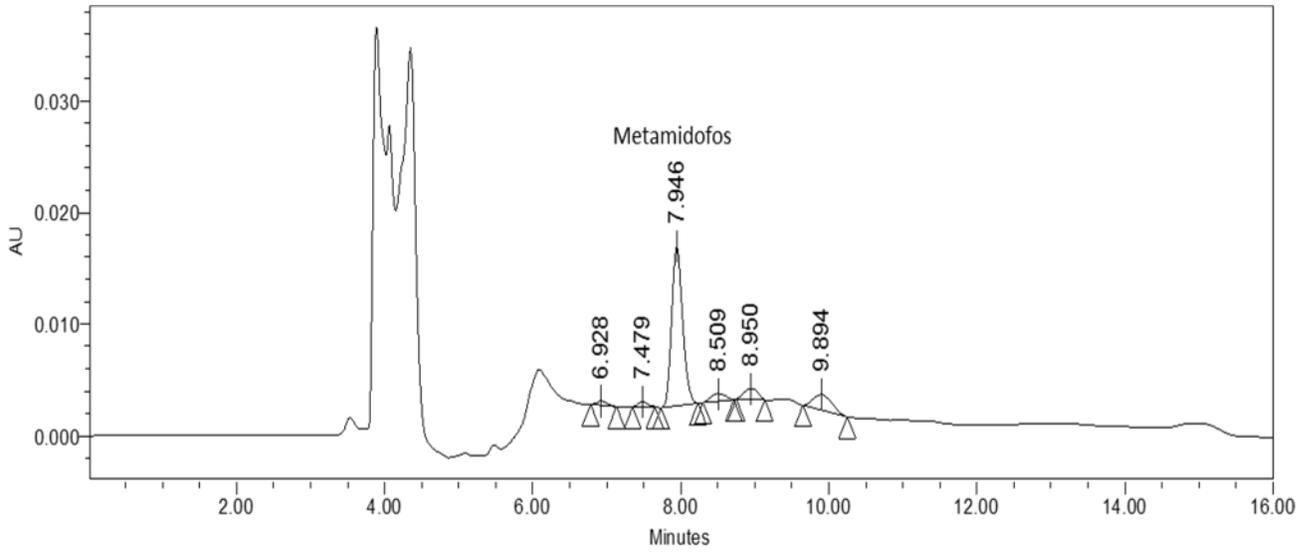
En la figura 47 se muestra la degradación del metamidofos vs tiempo, también se incluye la densidad óptica a 600 nm que indica el crecimiento bacteriano a lo largo de la prueba. En el gráfico se observa como aumenta la densidad óptica a medida que baja la concentración del plaguicida. Sin embargo, el máximo de la densidad óptica no es a las 24 o 48 horas como normalmente se espera. La explicación es que el metamidofos por su toxicidad pudiera estar restringiendo el crecimiento bacteriano, y sólo una vez que se ha degradado una proporción del compuesto, las bacterias pueden desarrollarse completamente.



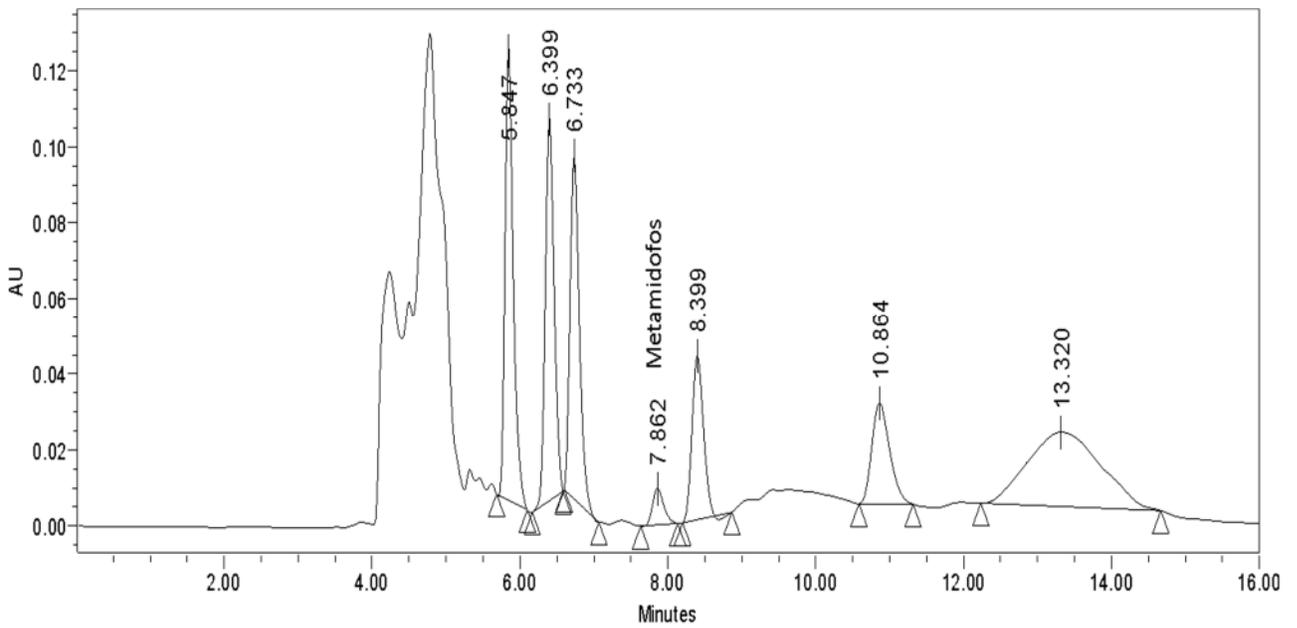
**Figura 47. Degradación de metamidafos vs tiempo con dextrosa como fuente adicional de carbono, en 10 días de estudio**

Al comparar los resultados con investigaciones previas como la de Wang y colaboradores del 2010 (tabla 11), en que reportan un porcentaje del 100 % de degradación de una concentración de 1000 mg L<sup>-1</sup> de metamidofos con la bacteria *Hyphomicrobium* sp. MAP-1 en 36 horas, empleando metanol al 0.5 % como fuente adicional de carbono; o la de Ramu y Seetharaman del 2014, en que la *Pseudomonas aeruginosa* Is-6 degrada al 100 % en 96 horas, 50 mg L<sup>-1</sup> del plaguicida sin otra fuente de carbono. Los porcentajes de este estudio son bajos, sin embargo, no despreciables cuando se añade dextrosa, si consideramos la alta toxicidad del metamidofos y que este se degrada en un 92.03 % en 10 días.

En el cromatograma de 10 días de estudio, cuando se emplea al plaguicida como única fuente de carbono (figura 48), se pueden distinguir 5 productos de degradación del metamidofos. Para poder definir qué productos se están formando, sería necesario un análisis de espectrometría de masas.



**Figura 48. Cromatograma en 10 días de estudio de biodegradación del metamidofos como única fuente de carbono,**



**Figura 49. Cromatograma en 10 días de estudio de biodegradación del metamidofos con dextrosa como fuente adicional de carbono,**

Wang y colaboradores (2010) plantean una ruta de biodegradación del metamidofos, con una bacteria del género *Hyphomicrobium*, en medio mineral a 30 °C y pH 7.0. En la propuesta, en primer lugar se rompe el enlace P-N para formar O,S-dimetil hidrógeno tiofosfato y NH<sub>3</sub>. Posteriormente el O,S-dimetil hidrógeno tiofosfato es hidrolizado en el enlace P-O, liberando -OCH<sub>3</sub> y S-metil dihidrógeno tiofosfato, o bien, el enlace que puede romperse es el de P-S para generar -SCH<sub>3</sub> y formar metil dihidrógeno fosfato. Por último el S-metil dihidrógeno tiofosfato o el metil dihidrógeno fosfato se convierten en ácido fosfórico. Por otro lado, en la figura 49 se ilustra la ruta de degradación del metamidofos en suelo reportada por Pinjari y colaboradores (2012).

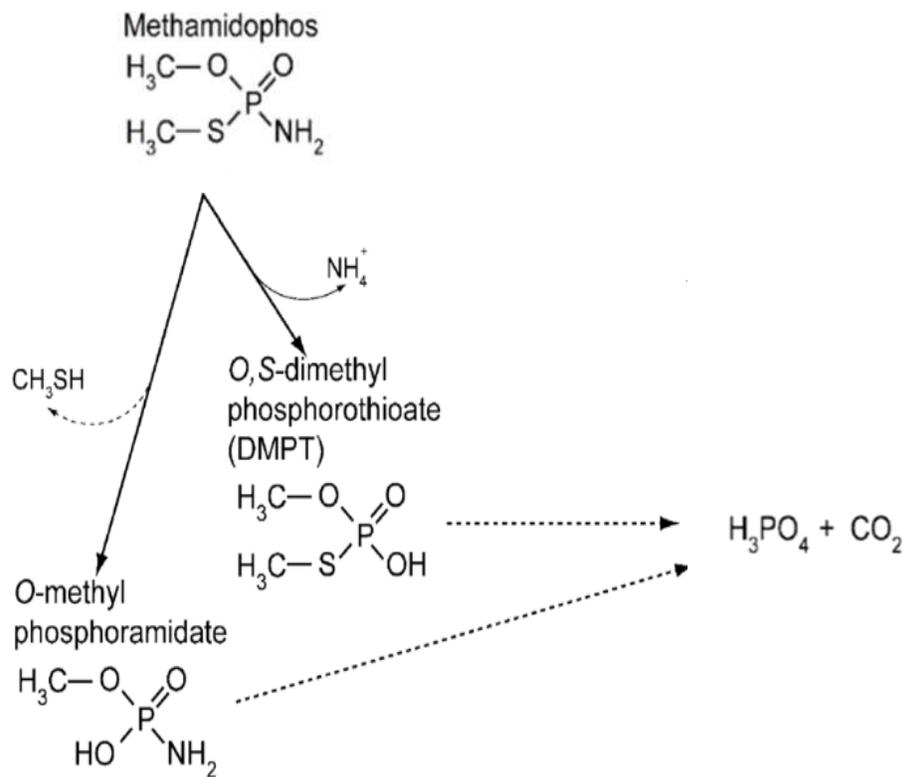


Figura 49. Ruta de biodegradación del metamidofos

Fuente: (Pinjari *et al.*, 2012)

En los estudios, las mejores condiciones para la degradación del metamidofos con el consorcio bacteriano fueron a pH 7.0 y temperatura de 35° C, alcanzándose un porcentaje máximo de degradación de 58.05% a una concentración de 200 mg L<sup>-1</sup> y en diez días de prueba. Sin embargo, las bacterias pueden utilizar al metamidofos como sustrato en un intervalo de pH de 5 a 8, y temperatura de 20 a 35 °C. Así también son capaces de actuar sobre concentraciones de 100 a 800 mg L<sup>-1</sup>, pero no a 1000 mg L<sup>-1</sup>, pues esta concentración ya es tóxica e inhibe al 100 % su crecimiento. Además, al emplear la dextrosa como fuente adicional de carbono, casi se degradó por completo el plaguicida, llegando a transformar el 92.03%, esto es debido a que se activa el crecimiento bacteriano que está limitado por el número de átomos de carbono en la molécula del metamidofos.

Las bacterias aisladas fueron identificadas como *Enterobacter asburiae*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Shinella kummerowlae*, *Pseudochrobactrum assaccharolyticum* y *Brevundimonas naejangsanensis*. La bacteria que tuvo un mejor desempeño en la degradación del metamidofos fue *Shinella kummerowlae* con un porcentaje de degradación 36.80 % vs el de las otras bacterias que fue de 24.80 a 26.29 %.

En cuanto a la concentración del metamidofos en el suelo, sólo se encontró en la zona que se está cultivando, (80 ± 11 mg L<sup>-1</sup>). En los suelos en los que ha dejado de aplicarse por un año ya no se detectó, debido a que superó el tiempo de vida media del plaguicida en el suelo.

Así mismo, se pudo apreciar cambios en algunas de las propiedades del suelo por el uso frecuente de plaguicidas organofosforados y otros agroquímicos. Son notables las modificaciones sobre todo en los parámetros de pH, conductividad, carbono total, orgánico e inorgánico, nitrógeno amoniacal, cobre y zinc. Las alteraciones del estado natural del suelo por la aplicación de los agroquímicos también estarían afectando la degradación del metamidofos, al disminuir la biodisponibilidad del plaguicida, reducir

la actividad metabólica de los microorganismos, o bien, crearían condiciones adversas para su desarrollo.

## REFERENCIAS

1. Abraham, J., Silambarasan, S. y Logeswari, P. (2014). Simultaneous degradation of organophosphorus and organochlorine pesticides by bacterial consortium. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. doi: 10.1016/j.jtice.2014.06.014.
2. Arellano, O. y Rendón, J. (2016). La huella de los plaguicidas en México. Green Peace. [http://www.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/Graficos/2016/comidasana/Plaguicidas\\_en\\_agua\\_ok\\_EM.pdf](http://www.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/Graficos/2016/comidasana/Plaguicidas_en_agua_ok_EM.pdf).
3. Centro Nacional de Metrología (2013). Guía técnica de trazabilidad metrológica e incertidumbre de medida en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)
4. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. (2002). Guía de validación de métodos analíticos.
5. Cornfield, A. H. (1959). Mineralisation, during incubation, of the organic nitrogen compounds in soils as related to soil pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(1), 27–28. doi:10.1002/jsfa.2740100104
6. Corral, J. A. R., Garcia, G. M., Acuña, I. J. G., López, H. E. F., Ojeda, G. R., Trejo, C. O., et al. (2013). Requerimientos agroecológicos de cultivos.
7. Crisanto, T., Sanchez-Martin, M. J., & Arienzo, M. (1994). Mobility of pesticides in soils. Influence of soil properties and pesticide structure. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 45(1–2), 97–104. doi:10.1080/02772249409358073.
8. ICH Expert Working Group. (1996). ICH Harmonised Tripartite Guideline. Stability Testing: Photostability testing of new drug substances and products Q1B, (November), 1–8. doi:10.1136/bmj.333.7574.873-a
9. Diaz, J. D. y Lopez, M. A. (1999). Voluntary ingestion of organophosphate insecticide by a young farmer. *Journal of emergency nursing: JEN: official publication of the Emergency Department Nurses Association*, 25(4), 266–268. doi: 10.1016/s0099-1767(99)70051-6.
10. El Valle, 2 de mayo 2017, <http://elvalle.com.mx/uso-de-agroquimicos-sin-control-cobra-vidas-en-campos-floricolas-mexiquenses>. Análisis temporal del riesgo por malformaciones congénitas atribuibles al uso de plaguicidas en el corredor florícola del

Estado de México.

11. EPA Method 1699 (2007). Method 1699: pesticides in water, soil, sediment, biosolids, and tissue by HRGC/HRMS. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC, USA, pp. 1–96. doi: EPA-821-R-08-001.
12. FAO (2014) Food and Agriculture Organization, the international code of conduct on pesticide management.
13. FAOSTAT (2018). [www.fao.org/faostat/es](http://www.fao.org/faostat/es)
14. Fleming, G. D., Villagrán, J. y Koch, R. (2013). IR, Raman and SERS spectral analysis and DFT calculations on the Herbicide O, S-Dimethyl phosphoramidothioate, metamidophos. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 114, 120–128. doi: 10.1016/j.saa.2013.05.012.
15. Gandhi, A.P. y Paliwal, K.V. (1976). Mineralization and gaseous losses of nitrogen from urea and ammonium sulphate in salt-affected soils. *Plant and Soil*, 45 (1), 247-245 <https://doi.org/10.1007/BF00011146>..
16. Garner, F. y Jones, K. (2014). Biological monitoring for exposure to methamidophos: A human oral dosing study. *Toxicology Letters*, 231(2), 277–281. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.10.008.
17. Gary, D.C. (2009). *Química Analítica*, sexta edición, Mc Graw Hill, México
18. González, B., Hernández, A. f., Rodríguez, M., Gómez, I., Aguilar, C., López, I., Parrón, T. y Lasacaña, M. (2015). Pre- and postnatal exposures to pesticides and neurodevelopmental effects in children living in agricultural communities from South-Eastern Spain. *Environment International*, 85, 229-237. doi: 10.1016/j.envint.2015.09.019.
19. Health Canada (2008) *Guidance Manual for Environmental Site Characterisation in Support of Human Health Risk Assessment Volume II. Checklists, Environments*.
20. Hernández, V. E., Gómez, A. M., Romero, C. A., Santana, J. M., Mastachi, L. C. y Martínez V.H., 2017, Análisis temporal del riesgo por malformaciones congénitas atribuibles al uso de plaguicidas en el corredor florícola del Estado de México, *Ciencia Ergo Sum*, vol. 24, núm. 3, Universidad Autónoma del Estado de México.
21. Hung, C. S., Zingarelli, S., Nadeau, L. J., Biffinger, J. C. Drake, C. A., Crouch, A. L., Barlow, D., Russell, J. N. y Crookes-Goodson W. J. (2016). Carbon Catabolite Repression and Impranil Polyurethane Degradation in *Pseudomonas protegens* Strain

- Pf5. Applied and Environmental Microbiology, 82(20), 6080-6090. doi:10.1128/aem.01448-16.
22. Hung, D. Q., Wohlers, J. y Thiemann, W. (2002). The mineralisation of methamidophos using ionised AN air water treatment pilot system and ultraviolet irradiation. Water Research, 36(12), 2959–2966. doi: 10.1016/S0043-1354(01)00524-3.
23. Khuzwayo, Z. y Chirwa, E. M. N. (2017). Analysis of catalyst photo-oxidation selectivity in the degradation of polyorganochlorinated pollutants in batch systems using UV and UV/TiO<sub>2</sub>. South African Journal of Chemical Engineering, 23, 17–25. doi: 10.1016/j.sajce.2016.12.002.
24. Koleli, N., Demir, A., Arslan, H. y Kantar C. (2007). Sorption behavior of methamidophos in a heterogeneous alluvial soil profile. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 301(1–3), 94–99. doi: 10.1016/j.colsurfa.2006.12.028.
25. Kong, L., Zhu, S. Zhu, L., Xie, H., Su, K., Yan, T., Wang, J., Wang, F. y Sun, F.(2013) Biodegradation of organochlorine pesticide endosulfan by bacterial strain *Alcaligenes faecalis* JBW4. Journal of Environmental Sciences, 25(11) 2257-2264. doi: 10.1016/S1001-0742(12)60288-5.
26. Kumar, V., Upadhyay, N., Kumar, V., & Sharma, S. (2015). A review on sample preparation and chromatographic determination of acephate and methamidophos in different samples. Arabian Journal of Chemistry, 8(5), 624–631. doi: 10.1016/j.arabjc.2014.12.007.
27. Morales, J. M. (2010), Tesis: Movilidad de un plaguicida organoclorado en un tiradero de residuos sólidos municipales en Los Altos Ayahualulco, Veracruz. Instituto politécnico nacional escuela superior de ingeniería y arquitectura
28. Mao, Z., Yu,C., y Xin, L. (2015). Enhancement of Phenol Biodegradation by *Pseudochrobactrum* sp. through Ultraviolet-Induced Mutation. International Journal of Molecular Sciences, 16(12), 7320-7333. doi:10.3390/ijms16047320.
29. Moreno, J. L., Garcia, C., Hernández, M. T. y Polo, A. (2002). Metales Pesados y Sus Implicaciones En La Calidad Del Suelo. Ciencia y Medio Ambiente., 125–38. <http://digital.csic.es/handle/10261/111812>.
30. Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., & Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. Catalysis Today, 41(1–3), pp. 207–219. doi: 10.1016/S0920-

5861(98)00050-9.

31. Luczkiewicz, A., Kotlarska, E., Artichowicz, W., Tarasewicz, K. y Fudala-Ksiazek, S. (2015). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19823-19834. doi:10.1007/s11356-015-5098-y.
32. Ramírez, J. A. y Lasacaña (2001). Plaguicidas : clasificación , uso , toxicología y medición de la exposición, 4(2), 67–75.
33. Rifai, A., Sophie, B., Farouk, J., and Guy, B. (2013). Structures and Dissociation Mechanisms of Protonated and Electron Ionized Methamidophos. *International Journal of Mass Spectrometry* 339–340: 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2013.02.003>.
34. O' Flynn, C. J., Fenton, O., Wall, D., Brennan, R. B., McLaughlin, M. J., & Healy, M. G (2018). Influence of soil phosphorus status, texture, pH and metal content on the efficacy of amendments to pig slurry in reducing phosphorus losses. *Soil Use and Management*, 34(1), 1–8. doi: 10.1111/sum.12391.
35. Obiols, J. (1999). NTP 512: Plaguicidas organofosforados (I): aspectos generales y toxicocinética. Instituto Nacional de Seguridad e higiene en el trabajo (I): Aspectos generales y toxicocinética. España.  
[http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp\\_512.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp_512.pdf).
36. Oliva, M., Silva, G. y Rodríguez, J. C. (2005). Nota Técnica: Estudio exploratorio de los problemas de salud humana derivados del uso de plaguicidas en Bella Vista , Estado de México , México. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 71–80.
37. Parthasarathy, S., Azam, S., Lakshman S. A., Narasimha, R. V., Gudla R., Paraptla, H., Yakkala, H., Vemuri, S. G. y Siddavattam D. (2016). Genome-guided insights reveal organophosphate-degrading *Breundimonas diminuta* as *Sphingopyxis wildii* and define its versatile metabolic capabilities and environmental adaptations. *Genome Biology and Evolution*, evw275. doi: 10.1093/gbe/evw275.
38. Pereira, J. R., Abramof, L. and Costa, O. A., Araújo, J. R, Possídio E.L. y Mello, F. A. F. (1980) efeito da adicao de uréia e sulfato de amonio sobre o ph e nitrificacao em um solo ácido. doi:10.1016/B978-1-4831-9677-0.50005-0
39. Pérez, J. A. G. y Trejo, F. E. M. (2005). *Métodos Analíticos Adecuados a Su Propósito*, Centro Nacional de Metrología.

- [http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/119370/mod\\_resource/content/1/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf](http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/119370/mod_resource/content/1/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf).
40. Qiu, J., Yang, Y., Zhang, J., Wang, H., Ma, Y., He, J. y Lu, Z. (2016). The complete Genome Sequence of the Nicotine-Degrading Bacterium *Shinela sp. HZN7*. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.01348.
  41. Ramu, S. y Seetharaman, B. (2014). Biodegradation of acephate and methamidophos by a soil bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain Is-6. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 49(1), 23–34. doi: 10.1080/03601234.2013.836868.
  42. Rifai, A., Bourcier, S., Jaber, F. y Bouchoux G. (2013). 'Structures and dissociation mechanisms of protonated and electron ionized methamidophos. *International Journal of Mass Spectrometry*, 39–340, 7–15. doi: 10.1016/j.ijms.2013.02.003.
  43. Rouessac, F. y Rouessac, A. (2007). *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*, Segunda edición, Wiley, Francia.
  44. Rubinson, K. A. y Rubinson J. F. (2001). *Análisis Instrumental*. Primera edición, Prentice Hall, España.
  45. Sánchez Martín, M. J. y Sánchez Camazano, M. (2006). Los plaguicidas. adsorción y evolución en el suelo. *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología*, 9–40. <http://digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf>.
  46. SENASICA, 2015, *Guía de validación de métodos para el análisis de residuos de plaguicidas en productos vegetales*.
  47. SEMARNAT (2002). Norma Oficial Mexicana Nom-021-Semarnat-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. 'Diario Oficial de la Federación, 85.
  48. Shao, S., Hu, Y., Cheng, C., Cheng, J. y Chen, Y. (2018). Simultaneous degradation of tetracycline and denitrification by a novel bacterium, *Klebsiella sp. SQY5*. *Chemosphere*, 209, 35-43. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.093.
  49. Shi, X., Zhang, R., Zhang, Q. y Wang, W. (2016). Mechanism and kinetic properties of OH-initiated atmospheric oxidation degradation of methamidophos in the presence of O<sub>2</sub>/NO. *Chemical Physics Letters*, 651, 261–267. doi: 10.1016/j.cplett.2016.03.036.
  50. Singh, A. K. (1986). Kinetic analysis of acetylcholinesterase inhibition by combinations of acephate and methamidophos. *Toxicology*, 42(2–3), pp. 143–156. doi:

- 10.1016/0300-483X(86)90005-3.
51. Skoog, D. A., Holler F. J. y Crouch S. R. (2008). Sexta edición. CENGAGE Learning. México.
52. Soil Survey Staff (2014). Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual. Soil Survey Investigations (Report No. 51, Version 2.0), 487. doi: 10.13140/RG.2.1.3803.8889
53. Stamps. B. W., Zingarelli, S., Hung, C. S., Drake, C. A., Varaljay, V. A., Stevenson, B. S. y Crookes-Goodsoon, W. J. (2018). Finisshed Genome Sequence of a Poyurethane-Degrading *Pseusomonas* Isolate. Genome Announcements, 6(9). doi:10.1128/genomea.00084-18.
54. Stylianou, K., Hapeshi, E., Vasquez, M. I., Fatta-Kassinou, D. y Vyrides, I. (2018). Diclofenac biodegradation by newly isolated Klebsiella sp. KSC: Microbial Intermediates and ecotoxocological assessmente. Journal of Enviromental Chemical Engineering, 6(2), 3242-3248. doi:10.1016/j.jece.2018.04.052.
55. Terrazas, O. B. (2013). La floricultura, actividad con gran potencial en Edomex. Boletín de prensa. SAGARPA.
56. Timperley, C. M. (2014). Best Synthetic Methods: Organophosphorus (V) Chemistry, Best Synthetic Methods: Organophosphorus (V) Chemistry. doi: 10.1016/C2011-0-04165-0.
57. USDA (1995) 'Soil Survey Laboratory Information Manual', Methods, (45). doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
58. Velázquez, A. (2013). Tesis: Determinación de áreas de cultivo florícola vulnerables a la migración de plaguicidas organofosforados y carbámicos usando un modelo de lixiviación. Universidad Autónoma del Estado de México.
59. Velázquez, A. (2017). Tesis: Evaluación del uso , aplicación y transporte de plaguicidas comúnmente empleados en suelos de cultivo florícola en Villa Guerrero, Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México.
60. Wang, L., Wen, Y., Guo, X., Wang, G., Li, S., & Jiang, J. (2010). Degradation of methamidophos by *Hyphomicrobium* species MAP-1 and the biochemical degradation pathway. Biodegradation, 21(4), 513–523. doi: 10.1007/s10532-009-9320-9.
61. Wang, M. C., Liu, Y. H., Wang, Q., Gong, M., Hua, X. M. y Pang, Y. J. (2008). Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. Soil Biology and Biochemistry, 40(3), 778–788. doi:

- 10.1016/j.soilbio.2007.10.012.
62. Wang, N., Li, J. Y. and Xu, R. K. (2009). Use of agricultural by-products to study the pH effects in an acid tea garden soil. *Soil Use and Management*. 25(2), 128–132. doi: 10.1111/j.1475-2743.2009.00203.x.
63. WHO (2002). Guidelines to Classification 2000-2002. [http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazard/en/](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard/en/).  
Wu, H., Shen, J., Wu, R., Sun, X., Li, J., Han, W., y Wang, L. (2016). Biodegradation mechanism of 1H-1,2,4-triazole by a nely isoleted strain *Shinella sp.* NJUST26. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep29675.
64. Xie, S., Liu, J., Li, L., y Qiao, C.(2009). Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii MA19* and optimization of cometabolism substrates. *Journal of Environmental Sciences*. doi: 10.1016/S1001-0742(09)60014-0.
65. Xu, X., Zhou, H., Chen, X., Wang, B., Jin, Z. y Ji, F. (2019). Biodegradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons by immobilized *Klebsiella sp.* in soil washing effluent *Chemosphere*, 223, 140-147. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.196.
66. Yu, Y., and Qi-Xing, Z. (2005). Adsorption Characteristics of Pesticides Methamidophos and Glyphosate by Two Soils. *Chemosphere* 58 (6): 811–16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.064>.
67. Zhang, L., Fei, Y., Mingming, S., Qi, L., and Zhong Y. Z. (2009). Investigation of the Degradation Behaviour of Methamidophos under Microwave Irradiation. *Desalination* 247 (1–3): 396–402. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.12.037>.
68. Zhao, R., Bao, H., y Liu, Y. (2010). Isolation and Characterization of *Penicillium oxalicum ZHJ6* for Biodegradation of Methamidophos. *Agricultural Sciences in China*.9(5), 695-703. doi: 10.1016/S1671-2927(09)60145-0.

## A.1. Carta de envío de artículo

09-Jul-2019

Dear Professor Maribel Albiter López:

A manuscript titled Characterization of floriculture soil contaminated by the frequent use of organophosphorus pesticides and quantification of pesticide methamidophos (GEAC-2019-0385) has been submitted by Professor Maribel Albiter López to International Journal of Environmental Analytical Chemistry.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, has automatically created a user account for you.

The site URL and your USER ID for your account is as follows:

SITE URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/geac>

USER ID: valbiter10@outlook.com

[https://mc.manuscriptcentral.com/geac?URL\\_MASK=7f1ea345531a4fbdbcbd8b6a4f8a62ca](https://mc.manuscriptcentral.com/geac?URL_MASK=7f1ea345531a4fbdbcbd8b6a4f8a62ca)

Please note that your password is case-sensitive.

When logged into the site you will be able to check the status of papers you have authored/co-authored. Please do log in to <https://mc.manuscriptcentral.com/geac> to update your account information, and to change your password to one of your choice.

Thank you for your participation.

Sincerely,

International Journal of Environmental Analytical Chemistry Editorial Office



**Characterization of floriculture soil contaminated by the frequent use of organophosphorus pesticides and quantification of pesticide methamidophos**

Journal:	<i>International Journal of Environmental Analytical Chemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Albiter López, Maribel; Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química Ramírez García, Jorge; Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química Balderas Hernández, Patricia; Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química Pavón Romero, Sergio; Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química
Keywords:	pesticides, methamidophos, soil, HPLC, metals, pH, conductivity, surface area

SCHOLARONE™  
Manuscripts

URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/geac>

**A.2. Manuscrito enviado**

## **Characterization of floriculture soil contaminated by the frequent use of organophosphorus pesticides and quantification of pesticide methamidophos**

Maribel Verónica Albiter López, J.J.-Ramírez-García\*, Patricia Balderas Hernández, Sergio H. Pavón Romero.

*Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Química. Paseo Colón esquina paseo Tollocan S/N, Colonia Residencial Colón, C.P.50180. Toluca, Estado de México. Tel/Fax:+52 (722) 2173890, Ext.113. E-mail: valbiter10@outlook.com, jjramirezg@uaemex.mx, shpavonr@uaemex.mx*

### **Abstract**

In this study an analysis of floriculture soil is made in Villa Guerrero, State of Mexico, to evaluate which parameters are modified by the constant use of organophosphorus pesticides and other agrochemicals, also was determined the concentration of methamidophos, an organophosphate pesticide widely used in the area for insect control. The sampling was carried out in cultivated and not cultivated soil at a depth of 20 cm. The parameters analyzed were: texture, bulk density, surface area, pore size, pH, conductivity, carbon, organic matter, nitrogen, C/N ratio and metals. The surface area and pore size were determined by the Brunauer, Emmett and Teller (BET) method, metals by atomic absorption spectrometry (AAS) and methamidophos concentration by high performance liquid chromatography (HPLC). The rest of the measurements were made based on NOM-021-SEMARNAT-2000. The soil was classified as loam of organic and volcanic type with the texture and the apparent density. In addition, with the BET a surface area of  $79.74 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  and pores with an average diameter of 4.13 nm was determined. The results of the other parameters of the soil that is currently being cultivated with respect to the one that has not been sown, were contrasted, it was found that the conductivity increases (3.73 to  $105.30 \text{ dS m}^{-1}$ ), total nitrogen (0.17 to 0.22%), carbon total (2.09 to 3.71%), Cu (19.23 to  $23.22 \text{ mg kg}^{-1}$ ); and decreases the

pH (5.33 to 4.60 pH units), the organic carbon (2.06 to 1.84%), Zn (75.34 to 63.02 mg kg<sup>-1</sup>) and the C/ N ratio (12.12 to 8.36). The pesticide methamidophos was found only in soil grown at a concentration of 80 ± 11 mg Kg<sup>-1</sup>. The results show that the values are modified in most of the parameters evaluated by the frequent use of agrochemicals.

Keywords: pH, conductivity, metals, pesticides, methamidophos, soil, HPLC, carbon, nitrogen, surface area, bulk density, porosity.

## 1. Introduction

The growing demand for food due to the increase in population and high-quality standards imposed on agricultural products, make the use of pesticides and fertilizers indispensable to ensure the production of crops [1]. On the other hand, pesticides also allow the control of organisms that spread diseases that affect humans and livestock. The benefit of pesticides in these fields is indisputable. However, the cost of indiscriminate use of these highly toxic and non-specific compounds is the accumulation, deterioration and contamination of the environment, placing the survival of different species at risk and compromising human health [2,3].

When applying a pesticide, it will be distributed in different degrees in biota, water, soil and air [3]. The distribution in each of the different systems of the environment will depend on the physicochemical characteristics of the compound and the substrate. Therefore, these physicochemical characteristics also define the persistence of the pesticide in the environment. The result of persistence is the contamination of water sources, biomagnification, the loss of biodiversity and the quality of the soil. By the mechanism of adsorption, pesticide molecules can be retained by the colloids present in the soil, organic matter and clay [4].

The floricultural zone of the State of Mexico produces most of the cut flower that is distributed in the country. Even, from the local entity, this type of products is exported to international markets. The most commonly used pesticides in the area are those derived from organophosphorus compounds and carbamates.

Methamidophos (O, S-dimethylphosphamidothioate) is a pesticide with a broad spectrum of activity as an insecticide-acaricide, used in large quantities throughout the world to control insects and mites in ornamental plants, citrus fruits, and other intensive agricultural crops [5], is a systemic pesticide, classified by WHO as Ib (highly dangerous), with an oral LD<sub>50</sub> of 30 mg kg<sup>-1</sup> [6] and a 130 mg kg<sup>-1</sup> dermal route in rats [7]. It has high mobility in soil because it is hydrophilic [8]. Although methamidophos is already banned or restricted in some countries, it is still widely applied in the floricultural zone of Mexico and in other regions of the world [9], because it is cheap and effective.

The extensive use of pesticides and other agrochemicals in crops modify the physicochemical characteristics of the soil in which they are deposited. This study shows the differences in some physicochemical parameters of soils of a greenhouse in use for the cultivation of flowers, in which organophosphates are used to control insect pests; with respect to adjacent areas of the nursery that have already stopped being exploited and a cleared area of land that has not yet been cultivated.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Reagents**

For the quantification of methamidophos the PESTANAL™ standard was used from Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland) with a purity of 99.1%, lot: BCBT1513. The solvents for the extraction and quantification of methamidophos are chromatographic grades of the Fermont brand (Monterrey, Nuevo León, Mexico). The standards for the calibration of the potentiometer and conductimeter come from the National Center of Metrology (CENAM) (Querétaro, Querétaro, Mexico).

The metal standards are High Purity (Charleston, SC, USA) of concentrations of 100 µg mL<sup>-1</sup> (manganese, chromium and nickel, purity: 99.995%, iron, purity: 99.99%, lead and cadmium purity: 99.999%; purity: 99.9999%; copper, purity: 99.9995%) from which solutions of different concentrations were prepared for each of the calibration curves. The acids for the digestion of metals are INSTRA from J.T. Baker (Center Valley, PA, USA).

The standard for the elemental analyzer is methionine from Thermo Fischer Scientific (Cambridge, United Kingdom).

The rest of the reagents used in the different analytical techniques are analytical grade. The deionized water was obtained from a Milli-Q water purification equipment from Millipore (Darmstadt, Germany).

## **2.2. Instrumentation**

The quantification of methamidophos was performed in the Waters high resolution liquid chromatograph (Milford, MA, USA) equipped with dual 2487 detector, 1515 isocratic flow pump, 717 plus autosampler. An Agilent XDB-C18 Eclipse column (4.6 mm X 250 mm, particle size 5  $\mu\text{m}$  and pore size 80 Å) was used. The extraction of the pesticide methamidophos in soil and the digestion for metals was in a MARSX microwave oven model 907600, from the CEM brand (Matthews, NC, USA). The metals were quantified in an Atomic Absorption Spectrophotometer iCE 3000 series from Thermo Fischer Scientific (Cambridge, United Kingdom). The elemental analysis was carried out in a Flash 2000 with Thermoelectric conductivity detector (TCD) from Thermo Electron (Rodano, Milan, Italy). For the surface area analysis, a BELSORP MAX surface area and pore volume meter was used, as well as the degasser for the pretreatment of the BELPREP-vacII sample, both from BEL JAPAN (Osaka, Japan).

The pH and conductivity were measured in an ORION STAR A329 from Thermo Scientific (Chelmsford, MA, USA).

## **2.3. Methods**

### **2.3.1. Study zone**

Samples were taken from a flower nursery located in the town of San Mateo Coapexco in Villa Guerrero, State of Mexico. The geographical coordinates of the sampling site are: Latitude: 18 ° 58 '13' 'N, Longitude: 99 ° 40' 46 " W. Point 1 corresponds to a cleared area of land that has not been used for planting flower, 2, 3, and 4 are areas that have stopped growing for a year and point 5 is currently in use for cultivation (figure 1). The type of sampling selected was systematic zig zag [10]. Samples were taken at a depth of 20 cm, with 7 simple samples, from which the sample composed by quartering was formed.

### 2.3.2. *Soil characterization*

#### 2.3.2.1. *Textural analysis and apparent density*

The texture analysis was performed by the Bouyoucos method. 40 g of sample were weighed, to which were added 100 mL of water and 100 mL of dispersing solution (50 g of sodium hexametaphosphate ( $\text{NaPO}_3$ )<sub>6</sub> in 1 L of deionized water). It was transferred to a test tube of 1 L and adjusted with deionized water. Readings were taken with the Bouyoucos hydrometer to calculate the% of silt, clay and sand [11].

The apparent density was determined by the test tube method. 100 g of soil were weighed and placed little by little into a 100 mL test tube, with small strokes to fill the spaces. The volume occupied by the soil was measured, and the bulk density was calculated with the mass value [12].

#### 2.3.2.2. *Surface area and pore size*

The sample was degassed at 150 ° C for 3 hours, 0.4558 grams of soil was weighed and analyzed at 77 K with nitrogen to obtain the adsorption isotherm. The surface area was determined with the BET method, and with the Barreto, Joyner and Halenda (BJH) model the pore area, pore volume and average pore radius.

#### 2.3.2.3. *pH*

The pH measurement was carried out in a soil water ratio of 1: 2, for which 10 g of soil were weighed and 20 mL of deionized water were added. It was stirred every 5 minutes for half an hour, left to rest for 15 min. It was stirred again and the pH values were determined [10].

#### 2.3.2.4. *Conductivity*

The conductivity of the aqueous saturation extract, which is prepared from a paste saturated with soil with deionized water and filtered under vacuum, was measured [10].

#### 2.3.2.5. *Organic carbon, organic matter and C/N ratio*

The determination of organic matter was carried out by the Walley and Black method. Weight between 0.05 and 0.1 g of soil sample, and add 5 mL of 1 N  $K_2Cr_2O_7$ , 10 mL of concentrated  $H_2SO_4$ , let it rest for 30 minutes. 70 mL of distilled water and 3 mL of concentrated  $H_3PO_4$  were added. 0.5 mL of diphenylamide indicator was added and it was titrated with 0.5 N  $FeSO_4$  until it turned light green. The % of organic carbon obtained by this methodology is multiplied by the Van Benmelen factor (1,724) to calculate the % of organic matter [10]. The C/N ratio was determined with the values of organic carbon and total nitrogen.

#### 2.3.2.6. *Total and ammoniacal nitrogen by Kjeldahl method*

For the quantification of total nitrogen, 0.3 g of soil sample were weighed and digested with 100 mL of the digestion reagent (134 g of  $K_2SO_4$ , 7.3 g of anhydrous  $CuSO_4$  and 134 mL of concentrated  $H_2SO_4$ , in 1 L) until reduced of volume of 25 to 30 mL. 300 mL of water and 50 mL of sodium hydroxide thiosulfate solution (500 g of NaOH and 25 g of  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  in 1 L) were added. Subsequently, it was distilled, collecting in 50 mL of indicator solution, prepared with 20 g of  $H_3BO_3$  and 10 mL of indicator mixture (200 mg of methyl red in 100 mL of  $CH_3CH_2OH$  and 100 mg of methylene blue in 50 mL of  $CH_3CH_2OH$ ). The distillate was titrated with  $H_2SO_4$  0.02 N.

For the ammoniacal nitrogen, likewise, 0.3 g of soil sample was weighed, but only the distillation process was followed. The results in both analyzes are reported as  $\text{mg kg}^{-1}$ .

#### 2.3.2.7. *Total carbon and total nitrogen*

The concentration of nitrogen and total carbon is determined by microanalysis, using an elemental analyzer. Methionine is used as the standard for the calibration curve. From the soil samples were weighed from 2 to 3 mg, the result is reported in %.

#### 2.3.2.8. *Quantification of metals*

The metals were quantified by atomic absorption, after digestion of the soil samples in a MARSX microwave oven. The digestion method is divided into two stages. Weighed 0.3 g of sample and added 6 mL of deionized water, 3 mL of  $\text{HNO}_3$ , 2.4 mL of  $\text{HCl}$  and 0.6 mL of  $\text{HF}$ . The heating ramp was  $200^\circ\text{C}$  for 30 min, with maintenance of  $200^\circ\text{C}$  for 20 min. In the second stage 3 mL of  $\text{H}_3\text{BO}_3$  were added, with a heating ramp at  $180^\circ\text{C}$  for 10 minutes and maintenance at  $180^\circ\text{C}$  for 10 min.

#### 2.3.2.9. *Quantification of methamidophos*

The analytical method for the quantification of methamidophos in HPLC was developed. The best chromatographic conditions that were found are the following: methanol/water mobile phase (20:80, v/v), flow rate of  $0.6\text{ mL min}^{-1}$ , injection volume of  $10\ \mu\text{L}$  and detection wavelength of 214 nm. The suitability and linearity of the system, linearity of the method, accuracy and repeatability were evaluated. For the extraction, 20 g of the soil sample were weighed and 25 mL of hexane/acetone (1:1, v/v) were added, the heating ramp is 10 min at  $110^\circ\text{C}$ , with 10 min maintenance, the samples extracted and filtered were concentrated in a rotavapor at  $35^\circ\text{C}$  and 40 rpm.

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. Textural analysis and bulk density**

The soil textural analysis reports 52% sand (particles > 0.05 and < 2 mm), 32% silt (particles > 0.002 and < 0.05 mm), and 18% clay (particles < 0.002 mm); by using the texture triangle of the USDA, soil textural classification is determined as the loam type [13]. This type of soil is ideal for most crops, since it contains the appropriate proportion of sand, silt and clay to allow the filtration and retention in a balanced way of water and nutrients, and that these are available to facilitate the development of the plants.

The apparent density value of  $0.96 \text{ g cm}^{-3}$  classifies the soil of the sampled area as organic and volcanic type [10]. The apparent density of the soil is the ratio of the mass of solids to the total volume. The latter includes the volume of solids and the volume occupied by the porous space. High values in the apparent density indicate that the soil is compacted, this condition prevents the growth of the roots of the plants and has a negative effect on the permeability of the water. On the contrary, low values in the apparent density would increase the filtration of the water, hindering the retention and therefore its accessibility for the plants. Values of apparent density  $< 1.4 \text{ g cm}^{-3}$  are considered adequate to favor cultivation in loam-type soils [14].

### **3.2. Surface area and pore size**

The isotherm in the analysis of pore area and volume is of type IV, which is characteristic of mesopores (figure 2). The hysteresis corresponds to type H3, typical of solids that consist of aggregates or agglomerates of particles that form pores of the non-uniform slit type. Slit-shaped pores are commonly found in clays [15]. In the BET-PLOT (Figure 3), the surface area of  $79.74 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  and the average pore diameter of 4.13 nm were determined in the relative pressure range of 0.05 to 0.35. The average pore value confirms the presence of mesopores (2 to 50 nm), previously predicted by the type of isotherm. The type of pore along with the texture and bulk density are determinants in the capacity of the soil for water retention and permeability. The macropores allow the mobility of gases and water, in them the retention is low. On the contrary, in the micropores retention is increased, but the movement of gases and water decreases. Mesopores offer a more adequate proportion between these two properties, so that water, nutrients and gases are accessible to the roots of plants.

With the BJH model for mesopores, a pore area of  $41.44 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  was calculated, which corresponds to a little more than half of the total surface area. With the same model, a pore volume of  $0.058 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  and an average pore radius of 1.21 nm was determined.

### ***pH measurement***

The ANOVA with  $\alpha = 0.05$  shows significant differences between the pH values at the soil points sampled (figure 4). The point that is currently being cultivated is that which has the most acidic pH, this being classified, together with the soils that have been left to grow for a year as strongly acidic. The soil surface that is not yet cultivated is classified as moderately acidic [10]. The pH values of the soils that have settled indicate lower values than the soil that is in use, probably due to the suspension of the application of agrochemicals.

In the case of the flower nursery under study, the increase of acidity in the areas already cultivated and in use, is possibly due to the frequent use of fertilizers, specially, fertilizers containing ammonium that when nitrified to form nitrates release  $\text{H}^+$  ions, thereby increasing the acidity of the soil [16]. It is reported that the addition of ammonium sulfate in soils has a depressing effect on pH [17] and that pH acids in turn have negative effects on nitrification [18].

The pH influences the availability of nutrients. A soil with a pH value lower than 5.0, usually has low levels of nitrogen, phosphorus, calcium and magnesium, and higher levels of aluminum, iron and boron. On the other hand, at an alkaline pH, the levels that are usually low are iron, manganese, copper, zinc and boron [19]. In our case the soil sections already cultivated, and which are in use could be presenting nutrient availability problems due to the acidity. The ideal pH range for most crops is 6.5-7.5, but values of 5.5 to 6.5 are also acceptable for many crops. The ground of the area naturally has the right pH for this type of crops, not so the land that is or has been exploited.

### **3.3. *Conductivity measurement***

Concerning the conductivity, it was measured in a saturation extract of the soil sample. As for pH, the ANOVA with  $\alpha = 0.05$ , shows significant differences between the values at the soil points sampled. The area being cultivated has a higher conductivity value with respect to the region that has not been cultivated; similarly, the points that have already been cultivated and that are at rest have higher values than the non-cultivated ones (figure 5). The soil changes from moderately saline to very strongly saline due to the use of agrochemicals [10]. This situation can affect the yield of the crops, since for most plants the ideal conditions are  $<1 \text{ dS m}^{-1}$ . Mainly sodium, magnesium, calcium, chlorides and sulphates can interfere with the absorption of water by plants, they also create a nutrient imbalance [14]. On the other hand, it is reported that salinity in soils decreases nitrogen mineralization and increases the loss of  $\text{N-NH}_4$  [20].

### **3.4. Carbon, nitrogen and C/N ratio**

The amount of nitrogen and total carbon was calculated (by elemental analysis), organic carbon (with the Walkley and Black method), the carbon values reveal more variation among the sampling points, but not the total nitrogen that seems more constant. In addition, it is observed that there is a tendency of the latter to increase in the zones that have been stopped cultivating and the one that is being cultivated (Figure 6).

Cornfield (1959) reports that nitrogenous organic waste accumulates to a greater extent acid soils than in those with a higher pH. This was checked by measuring the total nitrogen (Figure 7) and ammonia (Figure 8) by the Kjeldahl method, only at the point that has never been cultivated and where it is currently planted was ammonia (which is part of the inorganic nitrogen), the three points that are no longer worked (sampling points 2, 3 and 4) were not detected. The hypothesis is that in the non-cultivated soil the normal nitrification process of organic matter is being carried out, therefore the nitrogen is present in organic and inorganic form. However, in soils that are no longer cultivated, the absence of ammonia nitrogen is due to the alteration of nitrification due to the acidity of the soil. Pereira et al (1980) explain that the decrease in nitrification in acid soils is due to the fact that low pH can inhibit the activity of

nitrifying bacteria. In addition, the effect of salinity is added, as Gandhi and Paliwal refer to increases the loss of  $N-NH_4$ .

Finally, in the soil that is grown, the highest values of ammoniacal nitrogen are attributed to the constant use of fertilizers that contain the element as salts.

On the other hand, the point that is in use for the cultivation of flowers, shows a great difference between the amount of total carbon and organic carbon, this difference also increases between the two carbons in the other three points that have stopped cultivating, which makes us suppose that the inorganic is rising. Saline soils contain carbonates [22], the soils exploited in our study are saline and point 5 that has a higher conductivity, it is also the one that has a larger amount of inorganic carbon, this corroborates what was cited by the authors, additionally they mention that the salinity of soils increases the mineralization of organic carbon. Meanwhile, in the area that has not been cultivated, this difference is minimal, so it is noted that the largest amount of carbon is organic.

There is a slight tendency to decrease in the values of organic matter and C/ N ratio, in the area that is in use and the points that have stopped working (except for point 2 in organic matter), compared with the soil not cultivated (figures 9 and 10). In saline soils it is expected that the organic matter decays, because the production of the crops is reduced. As for the C/N ratio, the proportions in uncultivated soils are generally higher than in cultivated soils. The organic matter data were calculated with the organic carbon product and the Van Benmelen factor, which is based on assumption that organic matter contains 58% carbon [10].

The organic matter improves the properties of the soil, favoring the infiltration of water, the granulation, reduces the bulk density, but increases the porosity and the available water. In addition, it is a source of essential elements for the development of plants such as nitrogen, phosphorus and sulfur [19].

### **3.5. Metal Concentration**

The values of the elements copper, zinc, iron and manganese are within the specification (figures 11-14). The ANOVA with  $\alpha = 0.05$ , shows significant differences between the sampling points in the metals Cu, Zn and Mn, not so for Fe. It can be noted in this study, that copper tends to rise in cultivated soils, and the zinc to decrease slightly; On the contrary, manganese does not show a tendency of increase or decrease due to the use of agrochemicals. For the heavy metals cadmium, nickel, lead and chromium (Figures 15-18), only in the nickel no significant differences were found. The Cd for most of the sampling points (except for 3) is in values that are considered already dangerous, but this can be noticed that it is already a condition of the soil of the region, since the soil that has not been cultivated It has quantities similar to those that have already been cultivated. Finally, Cr was found in all the samples, with values ranging from 72.36 to 96.50 mg L<sup>-1</sup> and with significant differences.

### **3.6. Concentration of methamidophos**

#### *3.6.1. Analytical method*

With the best chromatographic conditions that were found for the quantification of methamidophos in HPLC (mobile phase methanol/water in a ratio of 20:80 v/v, flow rate of 0.6 mL minute<sup>-1</sup>, injection volume 10  $\mu$ L and length of detection wave of 214 nm) the peak of methamidophos appears in the chromatogram at a retention time of approximately 7.0 minutes (Figure 19).

The performance capacity of the analytical method for the quantification of the pesticide methamidophos was evaluated based on the guide for validation of analytical methods of the International Conference on Harmonization (ICH) [23]. The results are shown in table 1.

#### *3.6.2. Results of analysis of methamidophos in soil*

The pesticide methamidophos was not detected in soil points that have not been worked and in which it has not been cultivated. Only in the soil sample of the region that is currently cultivated, was it found at a concentration of  $80 \pm 11$  mg Kg<sup>-1</sup>, a value that is above the dermal LD<sub>50</sub>. The concentration of methamidophos in the land that is

being exploited is explained, because every third day the pesticides are applied in the flower nursery, since after this time, it has been observed that the insects begin to infest the crops again, that is to say they have already developed resistance to the formulations used. This represents a serious problem, since higher doses of the compounds to control the insects are required, and with this the deposition of them and their effects in the ecosystem is increased. On the other hand, the absence of methamidophos in the sections that are no longer working is expected, since it is reported that the pesticide has a half-life in soils under anaerobic conditions of 5 days and in aerobic conditions it is > 41 days [24], so in soils that are no longer grown for a year, methamidophos has already been degraded.

The acidic pH in the soil of the sampled region (4.60 -5.33), would have a negative effect on the adsorption of methamidophos according to the study carried out by Koleli and collaborators, in which they found that when the pH value was increased, the sorption of the pesticide, obtaining sorption of 100% in alkaline pH [25] As the soil becomes more acidic due to the frequent application of pesticides and fertilizers, it could be favoring the migration of the pesticide to deeper layers. In addition, Crisanto et al (1994) report that organic matter has a positive correlation in the absorption of hydrophobic pesticides, but not in hydrophilic, a group to which methamidophos belongs with a  $K_{ow}$  of -0.65 at 25 °C [27]. Therefore, the leaching of the pesticide, increased by the constant irrigation of the crops and the solubility of the methamidophos in water ( $> 2000 \text{ g L}^{-1}$ ) would be reinforced. [28]. Thus, it is likely that the deeper the soil, the higher the pesticide concentration.

#### **4. Conclusions**

The physicochemical characteristics of the uncultivated soil such as specific density, texture, porosity and pH corroborate that it is of the ideal type to favor the development of plants. These soil conditions, coupled with the climate of the region and its hydrography, make the area excellent for growing ornamental flowers and fruits.

However, in this study, changes in some of their properties could be observed due to the frequent use of organophosphorus pesticides and other agrochemicals, which are used in crops that are of the continuous type. The modifications are notable, especially in the parameters of pH, conductivity, total carbon, organic and inorganic, ammoniacal nitrogen, copper and zinc. The decrease in soil acidity and the increase in conductivity have implications for nitrogen and carbon mineralization, since an increase in inorganic carbon could be observed (although this was not measured directly) and a decrease in nitrogen ammoniacal, which could no longer be detected in soils that have stopped growing. The highest values of ammoniacal nitrogen in the zone that is currently planted in contrast to the unexploited soil can be explained by the use of fertilizers such as ammonium salts.

The micronutrients Cu, Mn, Fe and Zn are in adequate levels, in terms of heavy metals Pb and Ni are also in normal values, not so the Cd that is above the limit that is considered dangerous. The pesticide methamidophos was found only in the area being cultivated, in the soils where it has stopped being applied for a year it was not detected.

With the results of the present study, it cannot be affirmed that the changes in some of their properties are due exclusively to the extensive use of organophosphorus pesticides, because at the same time, fertilizers are applied to improve yields in the production of ornamental flowers. However, if it is considerable that these modifications lead to the loss of the suitability of the soil for the healthy development of the crops, so that after being exploited the areas for approximately 5 years, they are abandoned. It is important to mention that, at least in the parameters of pH and conductivity, the samples taken from soils that have already stopped cultivating, reveal a clear tendency to be returning to the natural values of the soil, but the time in which it is reached Initial conditions is another factor to study in the future.

### **Acknowledgment**

The authors thank the National Council of Science and Technology (CONACYT) for funding through "Projects of scientific development to solve national problems" with the key 215997.

### **Declaration of interests**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **References**

- [1] F. Ahmad, S. Iqbal, S. Anwar, M. Afzal, E. Islam, T. Mustafa and Q.M. Khan, *Journal of Hazardous Materials*, 237-238, 110 (2012). doi:10.1016/j.jhazmat.2012.08.006
- [2] N. Alvarenga, W. G. Birolli, M. H. R. Seleglim, and A. L. M. Porto, *Chemosphere*, 117, 47 (2014). doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.05.069.
- [3] E. Morillo and J. Villaverde, *Sci Total Environ* (2017). <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.020>
- [4] G. Odukkathil and N. Vasudevan, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12, 421 (2013). doi:10.1007/s11157-013-9320-4
- [5] D. Q. Hung, J. Wohlers, and W. Thiemann, *Water Research*, 36, 2959 (2002). doi:10.1016/S0043-1354(01)00524-3
- [6] WHO, *Guidelines to Classification 2000-2002*, 1–58 (2002). [http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazard/en/](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard/en/)
- [7] S. Ramu and B. Seetharaman, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 49, 23 (2014) doi:10.1080/03601234.2013.836868 .
- [8] V. Kumar, N. Upadhyay, V. Kumar, and S. Sharma, *Arabian Journal of Chemistry*, 8, 624, (2015). doi:10.1016/j.arabjc.2014.12.007
- [9] W. Ahmad, H. Li, M. M. Hassan, W. Jingjing, M. Zareef, S. Liu, P. Wang, A. Viswadevarayalu, Q. Chen, *Microchemical Journal*, 146, 872 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.009>
- [10] SEMARNAT, "Norma Oficial Mexicana Nom-021-Semarnat-2000, Que establece

las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis, (2002).

[11] M. Sandoval Estrada, J. Dörner Fernández, O. Seguel Seguel, J. Cuevas Becerra, and D. Rivera Salazar, Métodos de análisis físico de suelos, Publicaciones Departamento de Suelos y Recursos Naturales, 5, 80 (2012).

[12] M. Andrades, A. Moliner, and A. Masaguer, Prácticas de edafología: métodos didácticos para análisis de suelos," Universidad de Rioja, 79 (2015).

[13] USDA, "Soil Survey Laboratory Information Manual, Methods, no. 45, (1995).

[14] Soil Survey Staff, "Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual," *Soil Survey Investigations*, no. Report No. 51, Version 2.0, (2014).

[15] G. Leofanti, M. Padovan, G. Tozzola, and B. Venturelli, *Catalysis Today*, 41, 207, (1998). doi:10.1016/S0920-5861(98)00050-9

[16] N. Wang, J. Y. Li, and R. K. Xu, *Soil Use and Management*, 25, 128, (2009). doi:10.1111/j.1475-2743.2009.00203.x

[17] J. R. Pereira, L. Abramof, and O. A. Costa, *An. Esc. Super. Agric. Luiz de Queiroz*, 37, 1980. <http://dx.doi.org/10.1590/S0071-12761980000100001>

[18] X. G. Li, Z. Rengel, E. Mapfumo, and Bhupinderpal-Singh, *Plant and Soil*, 290, 269, (2007). doi:10.1007/s11104-006-9158-4

[19] S. Survey and M. Introduction, "Soil Survey Manual Introduction," *Public Law*, vol. 72, no. 6, 1966.

[20] A. P. Gandhi and K. V. Paliwal, *Plant and soil*, 45(1), 1976. <https://www.jstor.org/stable/42947014>

[21] A. H. Cornfield, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10, 27, (1959) doi:10.1002/jsfa.2740100104

[22] C. J. O' Flynn, O. Fenton, D. Wall, R. B. Brennan, M. J. McLaughlin, and M. G. Healy, *Soil Use and Management*, 34, 1, (2018). doi:10.1111/sum.12391

[23] ICH Expert Working Group. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Stability Testing: Photostability testing of new drug substances and products Q1B, (1996). doi:10.1136/bmj.333.7574.873-a

- [24] M. C. Wang, Y. H. Liu, Q. Wang, M. Gong, X. M. Hua and Y. J. Pang, *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 778, (2008). doi:10.1016/j.soilbio.2007.10.012
- [25] N. Koleli, A. Demir, H. Arslan, and C. Kantar, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 301, 94, (2007). doi: 10.1016/j.colsurfa.2006.12.028.
- [26] T. Crisanto, M. J. Sanchez-Martin, and M. Arienzo, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 45, 97, (1994). doi:10.1080/02772249409358073.
- [27] V. Kumar, N. Upadhyay, V. Kumar and S. Sharma, *Arabian Journal of Chemistry*, 8, 624, (2015). doi:10.1016/j.arabjc.2014.12.007.
- [28] L. Wang, Y. Wen, X. Guo, G. Wang, S. Li, and J. Jiang, *Biodegradation*, 21, 513, (2010). doi:10.1007/s105.

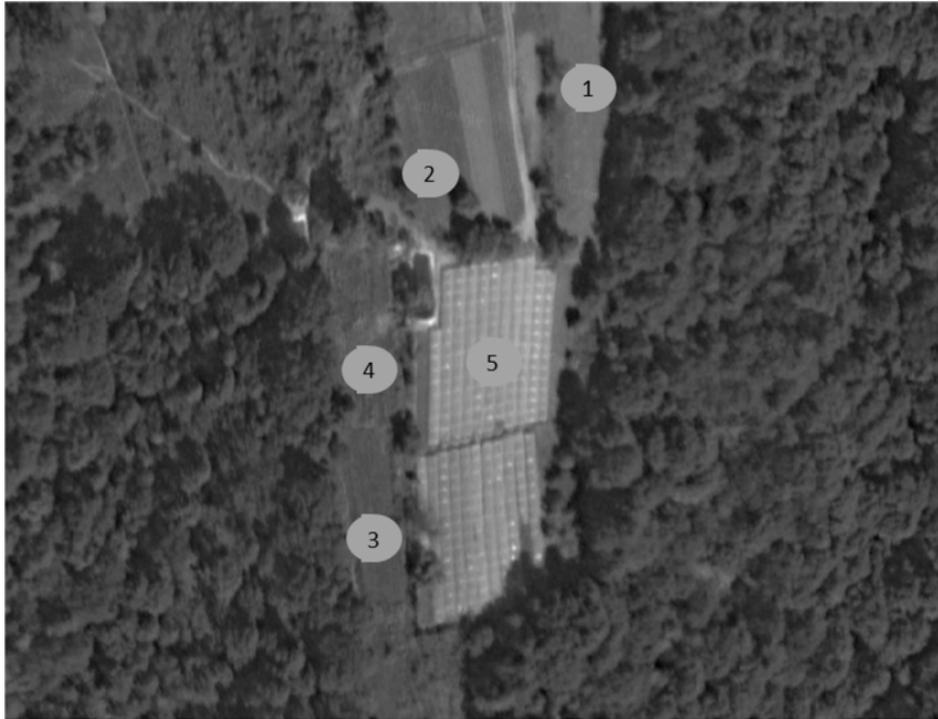


Figure 1. View area of the sampling site. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

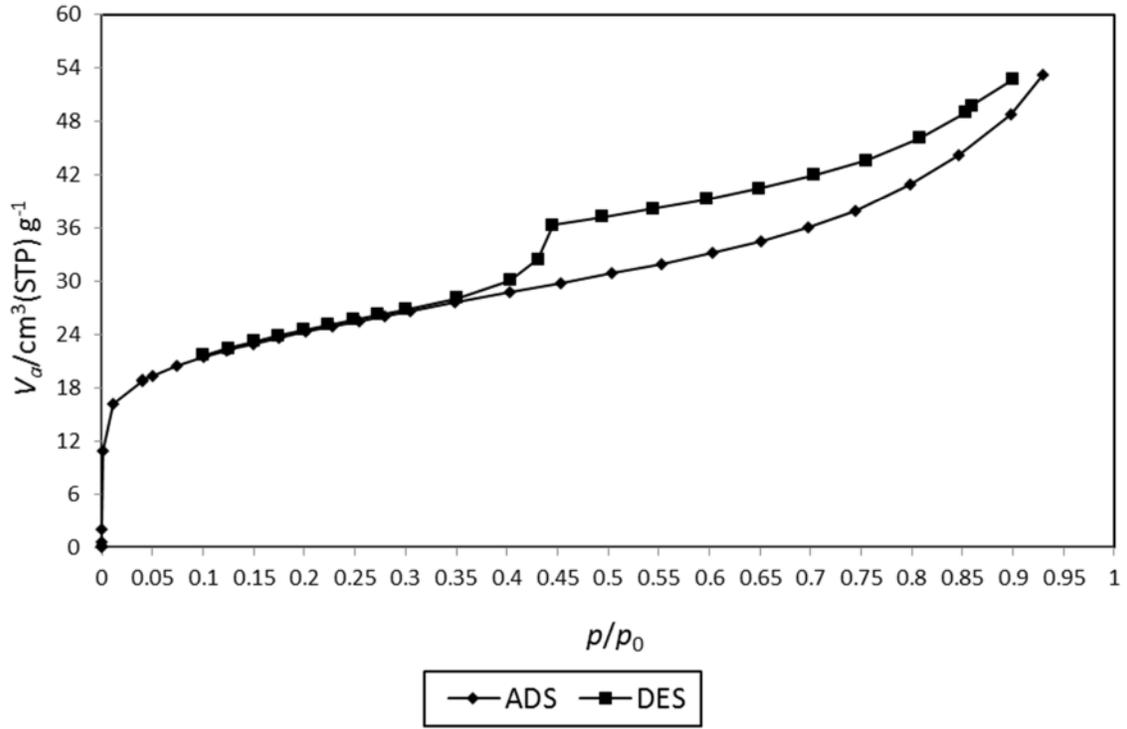


Figure 2. Isotherm Adsorption / desorption of soil

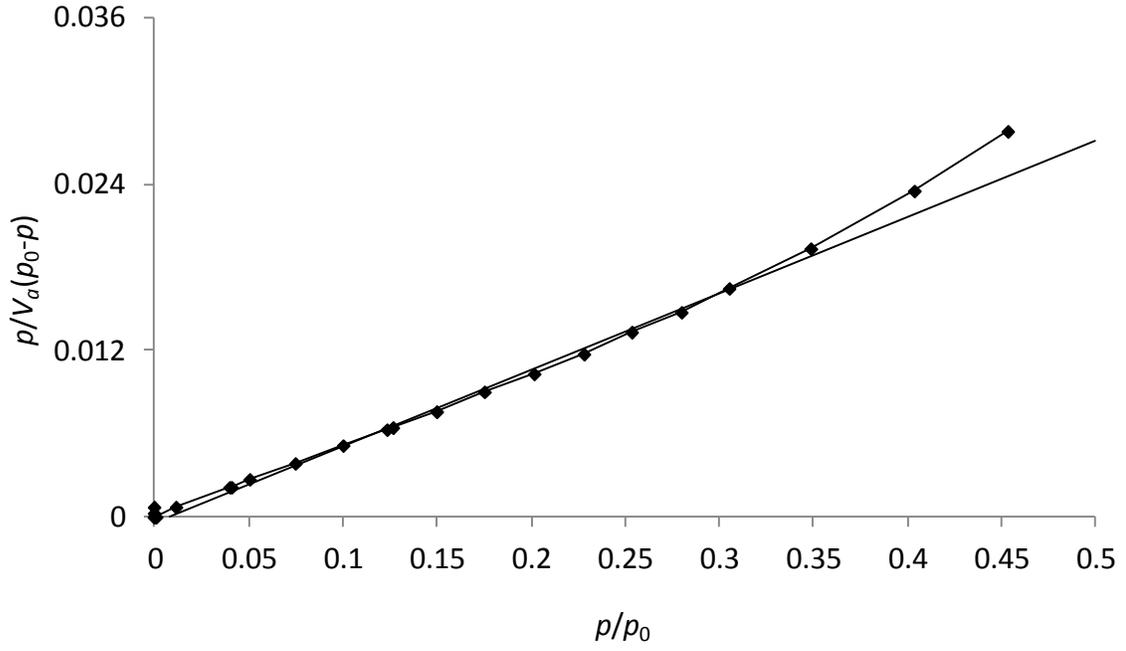


Figure 3. BET-Plot of soil

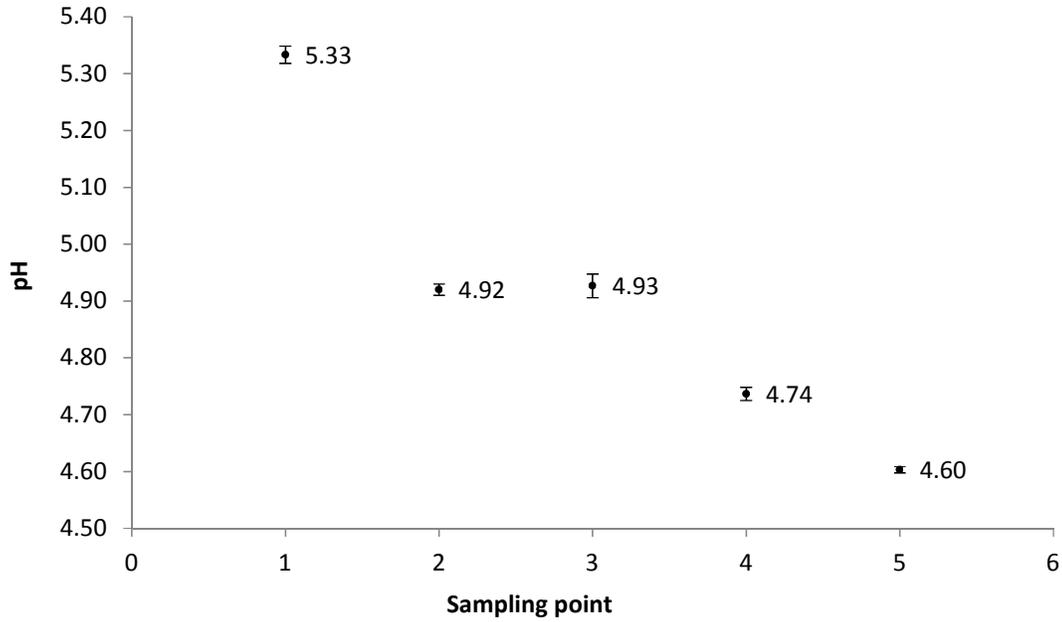


Figure 4. pH at sampling points. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

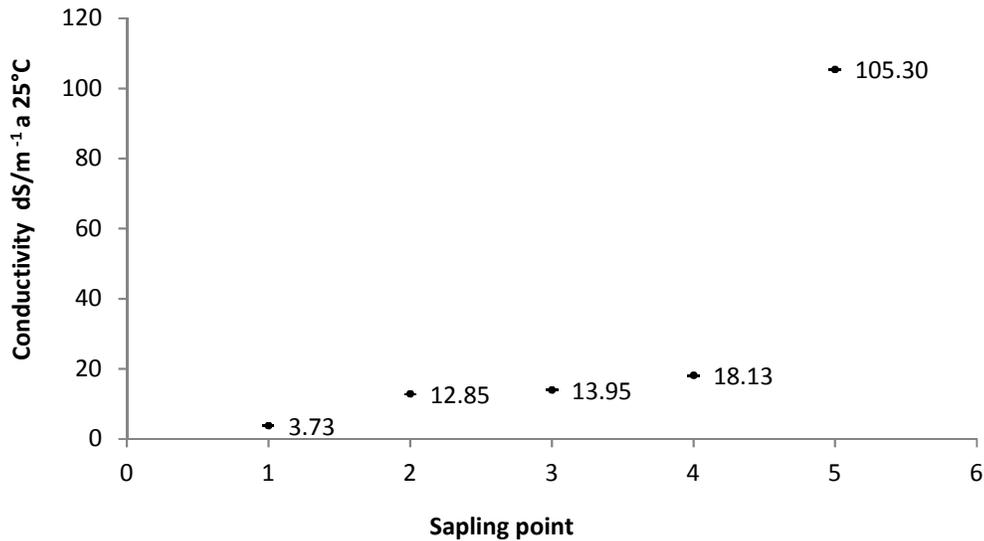


Figure 5. Conductivity at sampling points. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

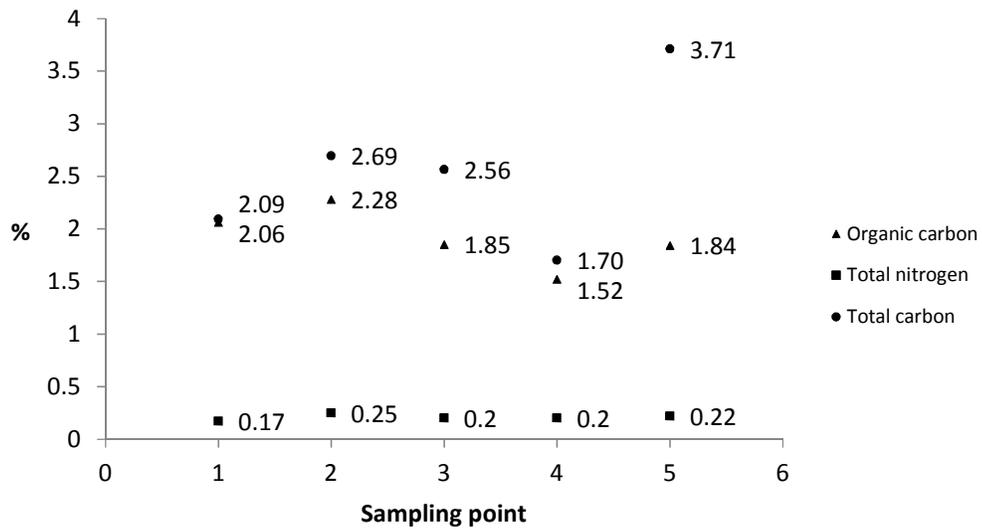


Figure 6. Organic carbon, carbon and total nitrogen at sampling points. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

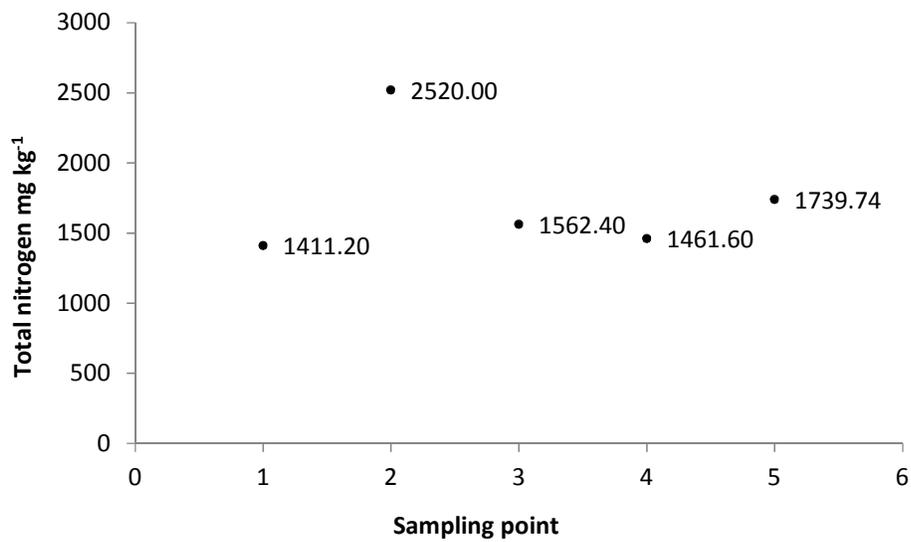


Figure 7. Total nitrogen in mg Kg<sup>-1</sup> Kjeldahl method. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

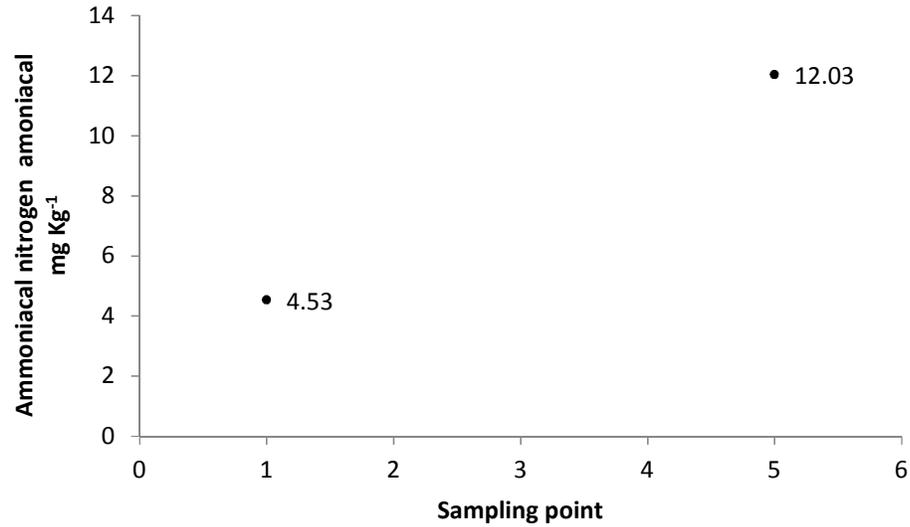


Figure 8. Ammoniacal nitrogen in mg kg<sup>-1</sup> Kjeldahl method. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

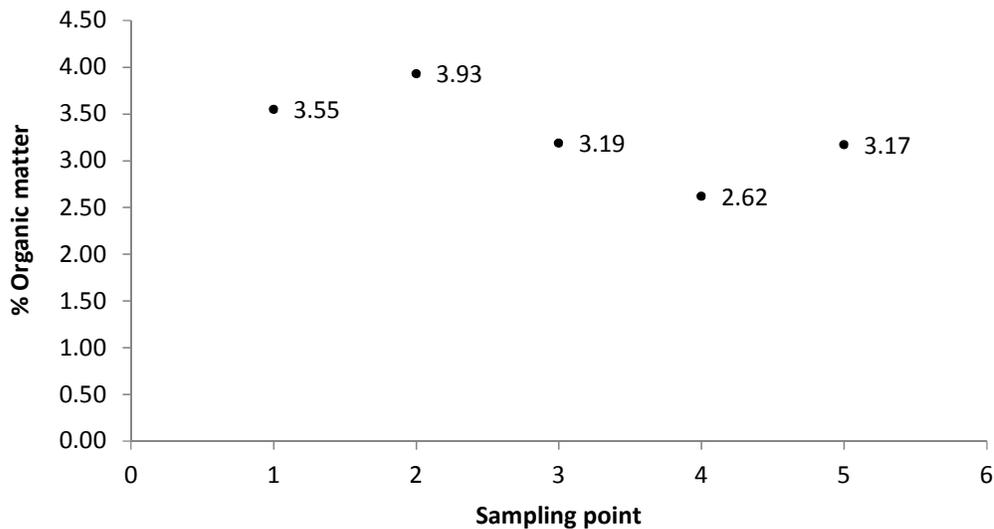


Figure 9. Organic matter. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

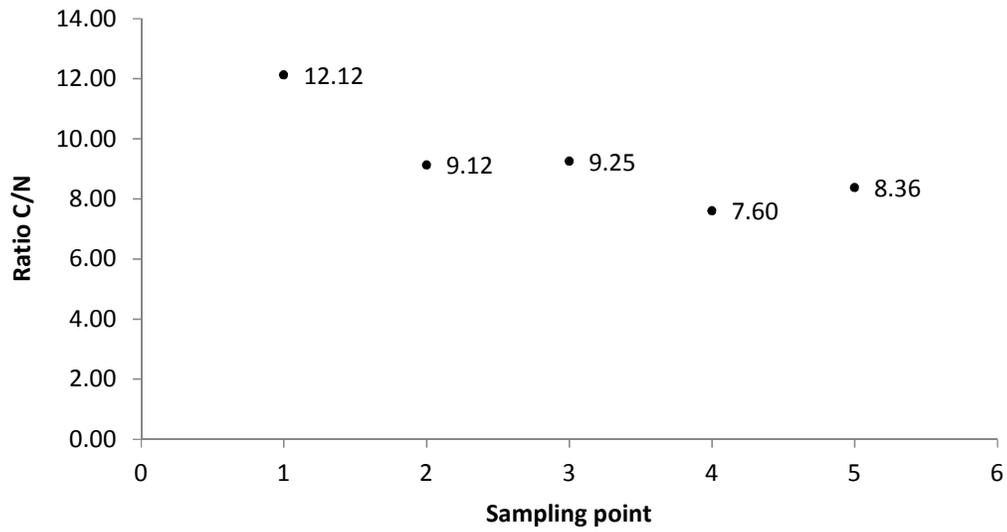


Figure 10. C/N ratio. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

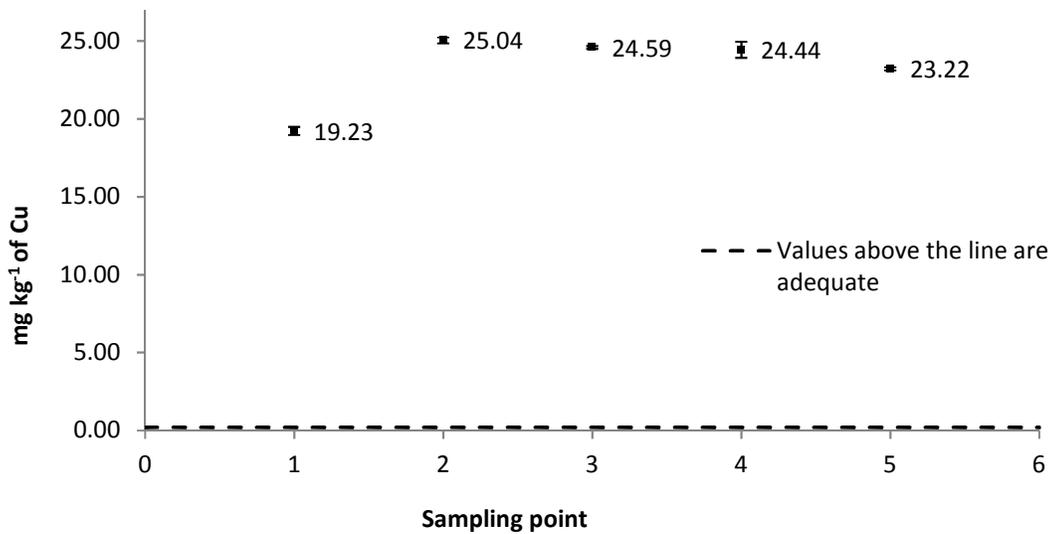


Figure 11. Copper at sampling points. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

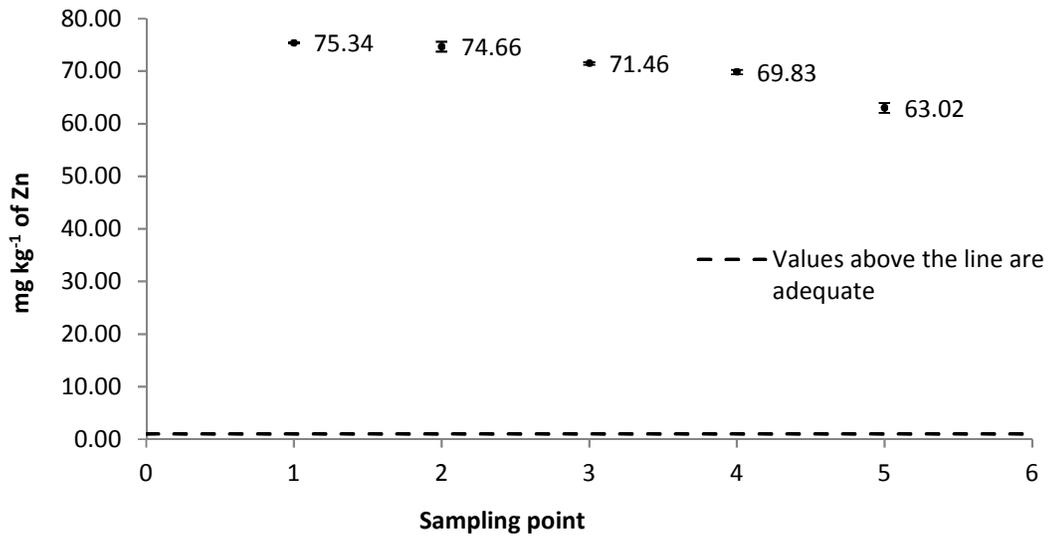


Figure 12. Zinc in sampling points. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

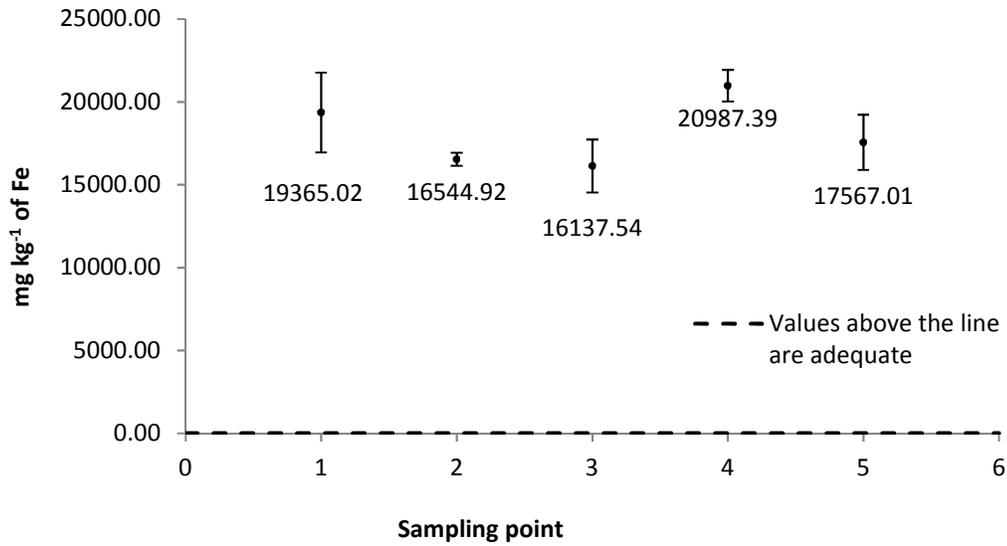


Figure 13. Iron in sampling points Point 1: cleared area of land that has not been used for planting flowers; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

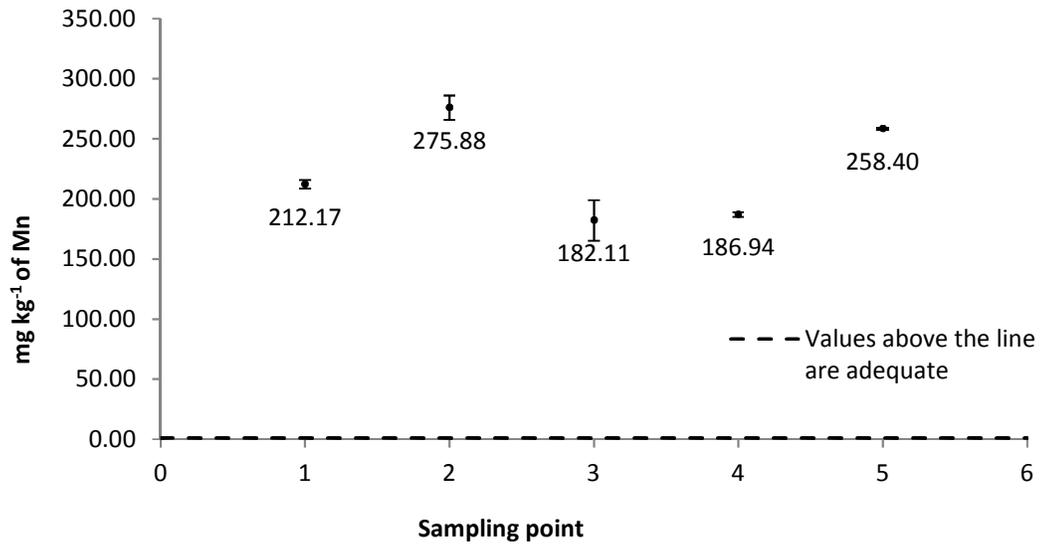


Figure 14. Manganese in sampling points. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

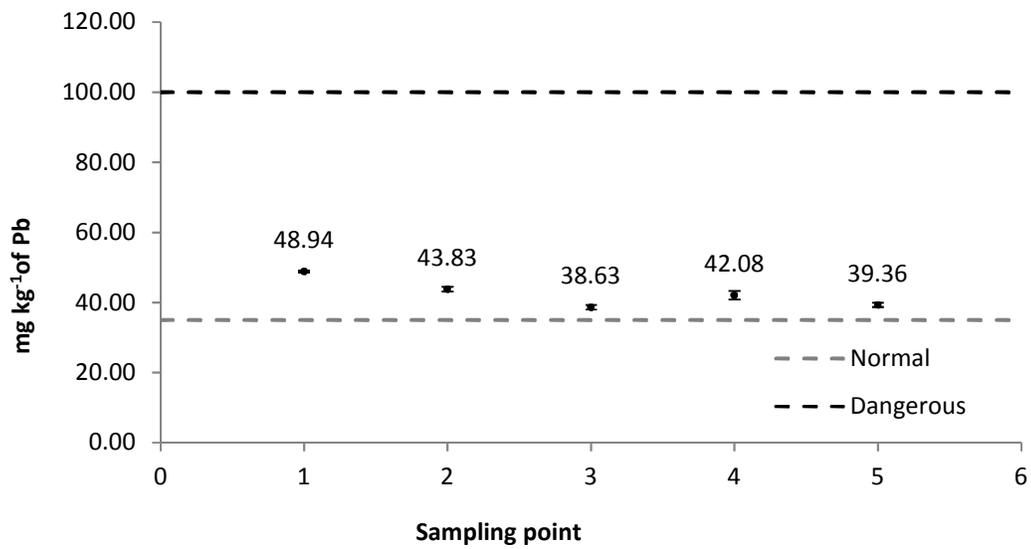


Figure 15. Lead in sampling points. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

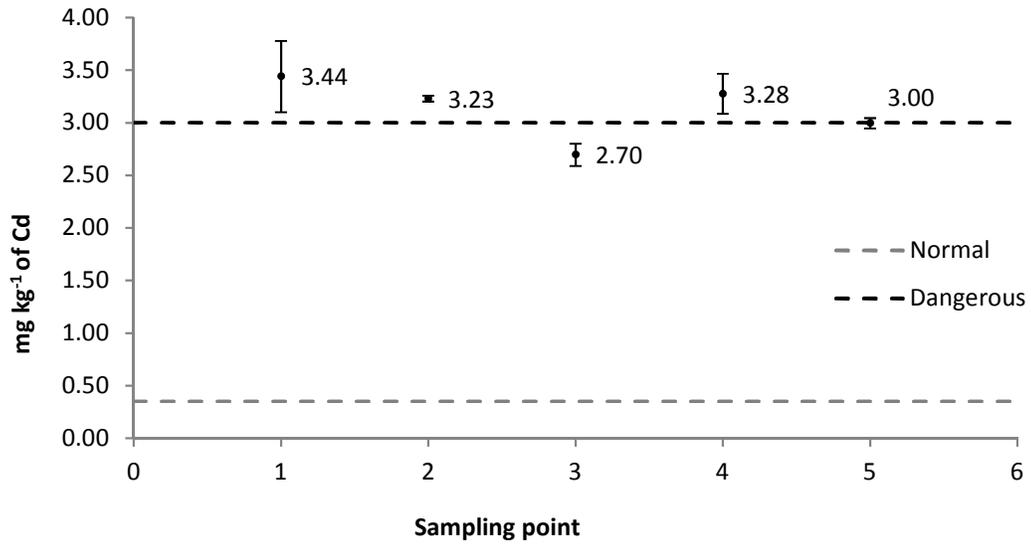


Figure 16. Cadmium at sampling points. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

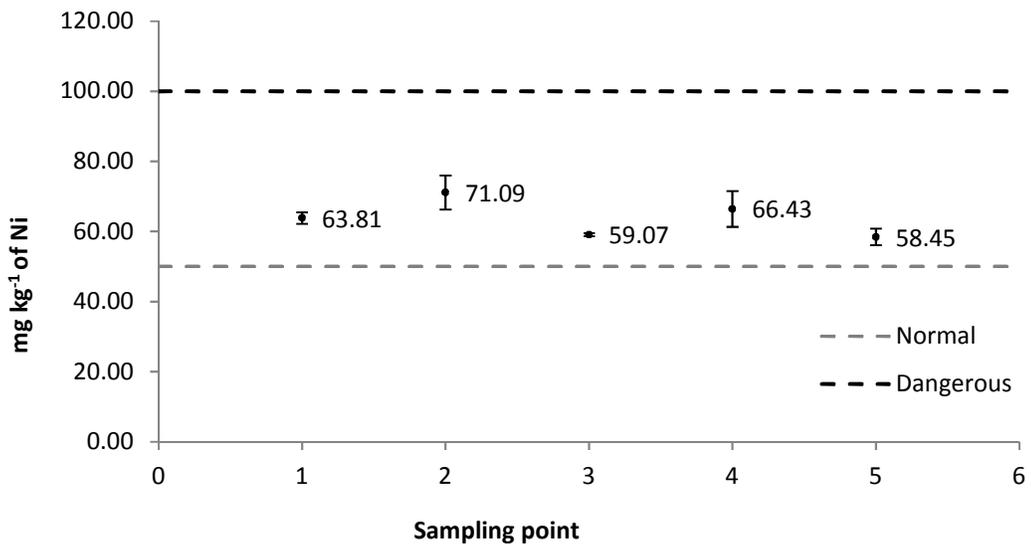


Figure 17. Nickel in sampling points. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

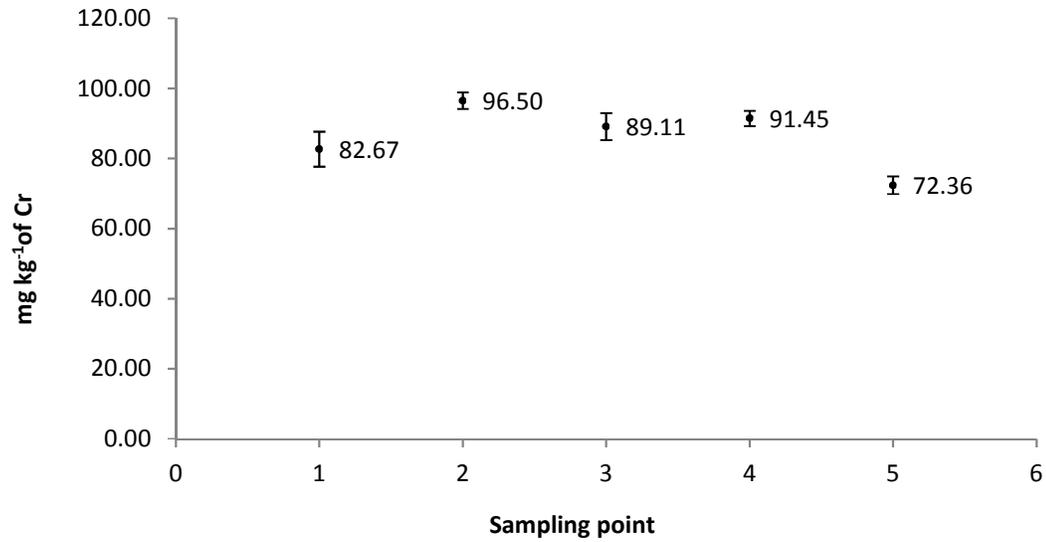


Figure 18. Chromium at sampling points. Point 1: cleared area of land that has not been used for flower planting; points 2, 3, and 4: areas that have stopped growing for a year and point 5: currently in use for cultivation.

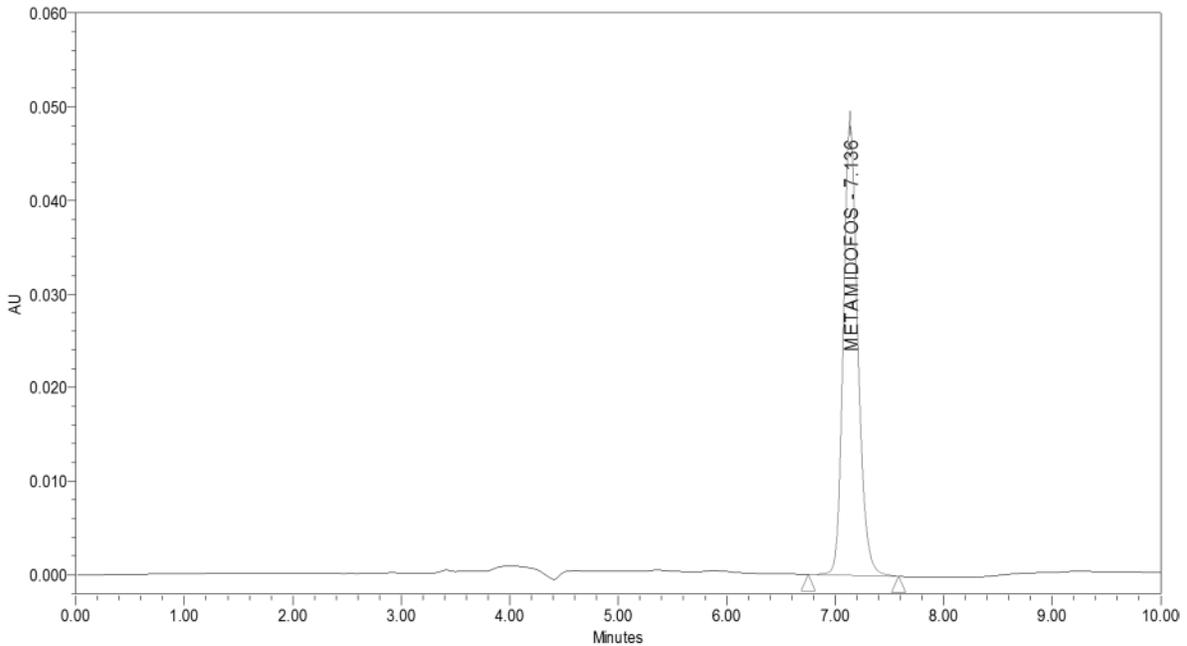


Figure 19. Chromatogram of methamidophos in HPLC at a concentration of 500 mg L<sup>-1</sup>. Chromatographic conditions: methanol/water mobile phase (20:80 v/v), flow rate of 0.6 mL, minute<sup>-1</sup>, injection volume, 10 µL, and detection wavelength of 214 nm.

Table 1. Evaluation of the method for the quantification of methamidophos

<b>PERFORMANCE PARAMETER</b>		<b>VALUE</b>	<b>ACCEPTANCE</b>
		<b>CALCULATED</b>	<b>REQUIREMENTS</b>
<b>System suitability</b>	Coleus Factor (T)	1.169	$T < 2$
	Number of theoretical plates (N)	12 080	---
	Coefficient of variation	1,49	$CV \leq 2$
<b>Linearity System</b>	Coefficient of Determination	0.9986	$r^2 \geq 0.98$
<b>LD Y LQ</b>	Detection Limit	0,53 mg L <sup>-1</sup>	---
	Quantification Limit	1.43 mg L <sup>-1</sup>	---
<b>Linearity Method</b>	Coefficient of Determination	0.992	$r^2 \geq 0.98$
	Coefficient of Variation	0.42-1.33	$CV \leq 2$
<b>Repeatability</b>	Coefficient of Variation	0.99-1.72	$CV \leq 2$
<b>Reproducibility</b>	ANOVA	150 mg/L- 0.55	$F < 6.61$ $\alpha=0.05$
		300 mg/L- 1.97	
		500 mg/L- 1.04	
		700 mg/L- 1.00	

---

900 mg/L-  
0.64

<b>Accuracy</b>	% Recovery	83.44 - 99.27 %	---
-----------------	------------	--------------------	-----

---