



**UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**  
Unidad Cuajimalpa



---

---

---

# T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA**

Por:

M en C. Juan Antonio Velasco Trejo

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DE DDT Y SUS INTERMEDIARIOS EN SUELOS CONTAMINADOS MEDIANTE LA BIOESTIMULACIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS PARA PROPONER ESTRATEGIAS DE REMEDIACIÓN

Directora: Dra. Adela Irmene Ortiz López

Asesor: Dr. Sergio Revah Moiseev

Ciudad de México. Noviembre de 2017



Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Especialización del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental fue realizado del enero de 2014 al mes de marzo de 2017 en los laboratorios del DPT de la DCNI.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00002

Matricula: 2133805617

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DE DDT Y SUS INTERMEDIARIOS EN SUELOS CONTAMINADOS MEDIANTE LA BIOESTIMULACIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS NATIVAS PARA PROPONER ESTRATEGIAS DE REMEDIACIÓN.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 9 del mes de noviembre del año 2017 en la Unidad Cuajimalpa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. LUIS GILBERTO TORRES BUSTILLOS  
DRA. FLOR YUNUEN GARCIA BECERRA  
DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA  
DRA. MARCIA GUADALUPE MORALES IBARRIA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES E INGENIERIA

DE: JUAN ANTONIO VELASCO TREJO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



*Velasco Trejo J.*  
JUAN ANTONIO VELASCO TREJO  
ALUMNO

REVISÓ



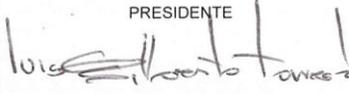
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CNI



DR. ALFONSO MAURICIO SALES CRUZ

PRESIDENTE



DR. LUIS GILBERTO TORRES BUSTILLOS

VOCAL



DRA. FLOR YUNUEN GARCIA BECERRA

VOCAL



DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA

SECRETARIA



DRA. MARCIA GUADALUPE MORALES IBARRIA

## DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día 09 del mes noviembre del año 2017, el que suscribe Juan Antonio Velasco Trejo alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente idónea comunicación de resultados intitulada: “ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DE DDT Y SUS INTERMEDIARIOS EN SUELOS CONTAMINADOS MEDIANTE LA BIOESTIMULACIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS PARA PROPONER ESTRATEGIAS DE REMEDIACIÓN ” realizada bajo la dirección de la Dra. Irmene Adela Ortiz López y cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso del la directora del trabajo como representante de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: [irmene@correo.cua.uam.mx](mailto:irmene@correo.cua.uam.mx)

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Juan Antonio Velasco Trejo

---

Nombre y firma del alumno

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, Juan Antonio Velasco Trejo, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

*Velasco Trejo J.*

Juan Antonio Velasco Trejo

---

Nombre y firma del alumno

## **DECLARACIÓN DE NO LUCRO:**

El que suscribe, Juan Antonio Velasco Trejo alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Juan Antonio Velasco Trejo.

*Velasco Trejo J.*

Juan Antonio Velasco Trejo

---

Nombre y firma del alumno

## RESUMEN

El DDT y sus intermediarios (DDX) son compuestos orgánicos clorados recalcitrantes, tóxicos y persistentes que están ampliamente distribuidos en el ambiente. En los suelos, la degradación del DDT puede ocurrir por procesos bióticos y abióticos. El conocimiento de los mecanismos de degradación, para inducir estos procesos, es de gran importancia para establecer las mejores estrategias de remediación de suelos contaminados.

En el presente trabajo se evaluó la técnica de bioestimulación mediante el uso de cosustratos orgánicos de estructura aromática y no aromática. El estudio se enfocó en identificar los mecanismos de degradación de los DDX. Los experimentos se llevaron a cabo con suelo contaminado obtenido de la exfábrica de plaguicidas "Tekchem" con y sin pretratamiento con hierro cero valente. Los tratamientos de bioestimulación se realizaron en condiciones aerobias y anóxicas utilizando 3g de suelo, relación suelo/agua de 1:1, pH 7, 30 °C y 100 rpm.

Los experimentos mostraron que la degradación de los DDX en el suelo ocurre a través de dos mecanismos: uno que causa la degradación de compuestos intermediarios (DDNS>DDD>DDE) y otro que induce la transformación del DDT a DDD. El primer mecanismo se presentó por la estimulación de microorganismos que oxidan tolueno (*Rhodococcus* y *Pseudomonas*) en condiciones aerobias; el segundo mecanismo se presentó por la estimulación de bacterias sulfato reductoras (*Desulfosporosinus auripigmenti*) que utilizan compuestos no aromáticos de fácil asimilación, como el glicerol, en condiciones anóxicas. En este caso, el proceso sulfidogénico produce la formación de mackinawita ( $Fe_{1+x}S$ ), que es el compuesto que genera la deshalogenación reductiva abiótica del DDT. El estudio demostró que el acoplamiento del mecanismo anóxico con glicerol para producir la transformación del DDT a DDD y el mecanismo aerobio con tolueno para degradar los compuestos intermediarios del DDT fue la mejor técnica de bioestimulación para eliminar DDX del suelo contaminado.

Asimismo, se demostró que el proceso sulfidogénico, que es el paso importante para generar mackinawita, se produce mediante el uso de diferentes cosustratos no aromáticos de fácil asimilación (ácido láctico, etanol y glucosa); así como materiales lignocelulósicos (bagazo de caña). Lo que demuestra que el mecanismo de degradación de DDX, en condiciones anóxicas, también puede ser inducido por subproductos agroindustriales.

La degradación de DDX en el suelo original (sin tratamiento con hierro) fue viable mediante los mecanismos descritos. Sin embargo, en este caso no se logró disminuir las altas concentraciones de DDX (principalmente DDT) por debajo de los límites máximos permisibles reportados por la EPA. Por consiguiente, queda demostrado que el suelo original requiere de un tratamiento fisicoquímico con HCV previo al empleo de técnica de bioestimulación.

En conclusión, este trabajo aporta evidencia sobre los mecanismos de degradación de los DDX que se en condiciones aerobias y anóxicas al utilizar cosustratos orgánicos de estructura aromática y no aromática. Los mecanismos descritos en este estudio son importantes para establecer las bases de la estrategia de remediación a gran escala del suelo contaminado con DDX de la exfábrica "Tekchem".

## ABSTRACT

DDT and its intermediates (DDX) are recalcitrant, toxic and persistent chlorinated organic compounds widely distributed in the environment. In soils, degradation of DDT can occur through biotic and abiotic processes. The knowledge of degradation mechanisms, to induce these processes, is of a great importance to establish the best soil remediation strategies.

In the present work, biostimulation technique was evaluated through the use of aromatic and non-aromatic cosubstrates. The study focused on mechanisms of degradation of DDX. The experiments were carried out with contaminated soil from exfactory of pesticide "Tekchem" with and without pretreatment with zero-valent iron. Biostimulation treatments were performed under aerobic and anoxic conditions using 3g of soil, soil/water ratio of 1:1, pH 7, 30 °C and 100 rpm.

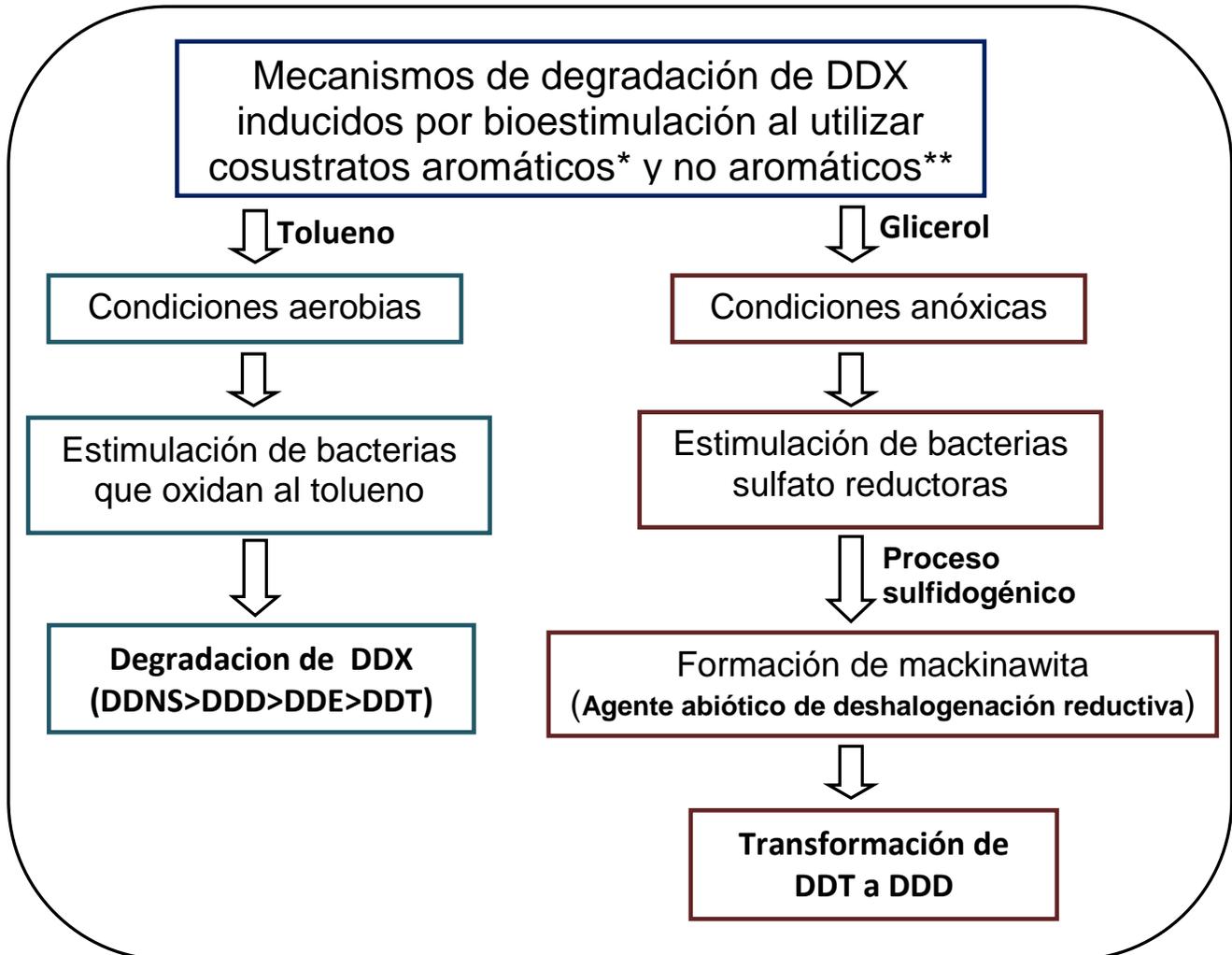
The experiments showed that degradation of DDX occurs through two mechanisms: one that causes the degradation of intermediate compounds (DDNS > DDD > DDE) and another that induce the transformation of DDT to DDD. The first mechanism was presented by the stimulation of microorganisms that oxidize toluene (*Rhodococcus* and *Pseudomonas*) under aerobic conditions; the second one was carried out by the stimulation of sulfate reducing bacteria (*Desulfosporosinus auripigmenti*) using non-aromatic compounds, such as glycerol, under anoxic conditions. In this case, the sulfidogenic process induced the formation of mackinawite ( $\text{Fe}_{1+x}\text{S}$ ), which produced an abiotic reductive dehalogenation of DDT. The coupled of the anoxic mechanism with glycerol to produce the transformation of DDT to DDD and the aerobic mechanism with toluene to degrade the intermediates of DDT was the best biostimulation technique to eliminate DDX from the contaminated soil.

This study also demonstrated that the sulfidogenic process, which is the important step to generate mackinawite, was produced by the use of different non-aromatic cosubstrates (lactic acid, ethanol and glucose); as well as lignocellulosic materials (cane bagasse). This shows that the degradation mechanism of DDX, under anoxic conditions, can be also induced by agroindustrial byproducts.

The degradation of DDX in the original soil (without zero valent iron treatment) was viable by the described mechanisms. However, in this case it was not possible to reduce the high concentrations of DDX (mainly DDT) below to the maximum permissible limits reported by the EPA. It demonstrated that the original soil requires a physicochemical treatment with HCV prior to the use of biostimulation technique.

In conclusion, this work provides evidence on the degradation mechanisms of DDX that are produced in aerobic and anoxic conditions when using aromatic and non-aromatic organic cosubstrates. The mechanisms described in this study are important for establishing the basis of the large-scale remediation strategy for soil contaminated with DDX from the exfactory "Tekchem".

# ESQUEMA RESUMEN DE LOS MECANISMOS DE DEGRADACIÓN PROPUESTOS



\*Tolueno y difenilmetano

\*\* Glicerol, glucosa, ácido láctico, etanol y bagazo de caña

## ETAPAS EXPERIMENTALES:

- 1) Identificación de los mecanismos de degradación de los DDX en el suelo pretratado con HCV.
  - 1.2) Evaluación de los mecanismos de forma acoplada (anóxica/aerobia).
  - 1.3) Evaluación del mecanismo de formación de mackinawita utilizando diferentes cosustratos (glucosa, ácido láctico, etanol y bagazo de caña) en condiciones anóxicas.
- 2) Evaluación de los mecanismos utilizando el suelo sin tratamiento de HCV (suelo original).

## Agradecimientos

- A la Dra. Irmene Ortiz y al Dr. Sergio Revah por todo su apoyo brindado y asesoría para la realización de este trabajo.
- Al Dr. Arturo Aburto Medina, Dra. Teresa Pi Puig y a la Dra. Gloria Trejo por todo su apoyo para poder realizar el trabajo.
- Al M. Gilmar Ayala Meneses por su valioso apoyo brindado en la estructura y redacción de la tesis.
- A mis compañeros del laboratorio de Bioprocesos de la UAM – Cuajimalpa (2014-2017) con quienes compartí un excelente tiempo de trabajo y amistad.
- A colegas del CENICA quienes estuvieron siempre solidarios durante esta travesía.
- A mi familia por todo el apoyo brindado.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por el apoyo financiero brindado. Número de beca 92139.
- Al Posgrado de Ciencias Naturales e Ingeniería.
- Al Centro de Sustentabilidad Ambiental y Remediación del Instituto Real de Tecnología de Melbourne.
- Al Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- Al Centro de Escritura y Argumentación CEA de la UAMC.
- A los miembros de mi Comité Tutorial, por todos sus comentarios que enriquecieron este trabajo.

## **Dedicatoria**

*A mi esposa María de la Cruz y mi hijo Diego Antonio*

*A mis padres Antonio Velasco Olivares † y Rebeca Trejo Nava*

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>ESQUEMA RESUMEN DE LOS MECANISMOS DE DEGRADACIÓN PROPUESTOS .....</b>	<b>9</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>23</b>
2.1. Plaguicidas organoclorados y DDT .....	23
2.1.1. Efectos del DDT en el medio ambiente y Convenio de Estocolmo.....	28
2.1.2. Sitios contaminados en México .....	32
2.2. Comportamiento ambiental del DDT .....	34
2.2.1. Procesos de transporte .....	34
2.2.2. Procesos de degradación.....	38
2.2.2.1. Ruta metabólica de degradación aerobia .....	44
2.2.2.2. Ruta metabólica de degradación anaerobia .....	46
<b>3. ESTADO DEL ARTE DE LA REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DDT .....</b>	<b>49</b>
3.1. Degradación por hierro cero valente .....	51
3.2. Degradación por desasimilación de hierro (III) .....	55
3.3. Degradación por bioestimulación .....	58
3.4. Planteamiento de la estrategia de remediación para el suelo contaminado del sitio “Tekchem” .....	61
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>64</b>
<b>5. HIPÓTESIS .....</b>	<b>65</b>
<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>65</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
7.1. Suelo original.....	67
7.2. Suelo pretratado con hierro cero valente.....	67
7.3. Medio mineral.....	68

7.4. Sistemas experimentales .....	68
7.5. Métodos analíticos .....	74
7.5.1. Extracción de DDT y sus intermediarios.....	74
7.5.2. Cuantificación de DDT y sus intermediarios.....	74
7.5.3. Cuantificación de dióxido de carbono.....	75
7.5.4. Cuantificación de tolueno .....	75
7.5.5. Extracción y cuantificación de hierro (II).....	76
7.5.6. Extracción y cuantificación de sulfato.....	76
7.5.7. Determinación cualitativa de sulfuro de hidrógeno.....	77
7.5.8. Extracción y cuantificación de ácidos grasos volátiles .....	77
7.5.9. Caracterización mineralógica del suelo.....	78
7.5.10. Identificación de microorganismos .....	78
7.5.11. Análisis estadístico.....	81
<b>8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN I. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA Y MICROBIANA DEL SUELO.....</b>	<b>83</b>
8.1 Caracterización fisicoquímica.....	83
8.2. Composición microbiana .....	86
<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN II. SUELO PRETRATADO CON HCV .....</b>	<b>90</b>
9.1. Bioestimulación en condiciones aerobias.....	90
9.1.1. Difenilmetano .....	90
9.1.2. Tolueno .....	93
9.1.3. Glicerol .....	98
9.1.4. Composición microbiana del suelo tratado con tolueno .....	101
9.1.5. Propuesta del mecanismo de degradación de DDX con el uso de tolueno en condiciones aerobias.....	102
9.1.6. Conclusiones parciales.....	104
9.2. Bioestimulación en condiciones anóxicas .....	105
9.2.1. Tolueno .....	105
9.2.2. Glicerol .....	108
9.2.3. Composición microbiana del suelo tratado con glicerol.....	114

9.2.4. Propuesta del mecanismo de degradación de DDX con el uso de glicerol en condiciones anóxicas .....	116
9.2.5. Conclusiones parciales.....	118
9.3. Sistema acoplado anóxico/aerobio.....	119
9.3.1. Conclusiones parciales.....	122
9.4. Empleo de ácido láctico, etanol, glucosa y bagazo de caña para fomentar la degradación del DDT por el mecanismo de formación de mackinawita. ....	122
9.4.1. Conclusiones parciales.....	130
<b>10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN III. SUELO ORIGINAL.....</b>	<b>132</b>
10.1. Degradación de DDX por el mecanismo de formación de mackinawita. ....	132
10.1.1. Glicerol .....	132
10.1.2. Bagazo de caña .....	133
10.2. Degradación de DDX por microorganismos que oxidan el tolueno en condiciones aerobias.....	136
10.3. Conclusiones parciales.....	138
<b>11. CONCLUSIONES .....</b>	<b>140</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>143</b>
<b>13. ANEXOS .....</b>	<b>158</b>
13.1. Anexo A. Figuras complementarias.....	158
13.2. Anexo B. Artículo publicado en revista arbitrada y participación en simposion del PCNI y congresos nacionales e internacionales.....	161
13.3. Anexo C. Constancia de primer lugar obtenido en el congreso de la SMBB 2015. ....	162
13.4. Constancia de mejor tesis de doctorado del PCNI de 2017 .....	163

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los plaguicidas organoclorados. ....	24
<b>Tabla 2.</b> Datos técnicos del DDT y sus principales intermediarios. ....	26
<b>Tabla 3.</b> Compuestos intermediarios del DDT. ....	28
<b>Tabla 4.</b> Plaguicidas organoclorados listados en el convenio de Estocolmo. ....	31
<b>Tabla 5.</b> Microorganismos identificados en las últimas dos décadas con capacidad para degradar DDT. ....	42
<b>Tabla 6.</b> Estrategias de remediación de suelos contaminados con DDT. ....	49
<b>Tabla 7.</b> Estudios de degradación de DDT con HCV y sistemas bimetálicos. ....	55
<b>Tabla 8.</b> Estudios de degradación de DDT por desasimilación de hierro (III). ....	56
<b>Tabla 9.</b> Caracterización del suelo. ....	67
<b>Tabla 10.</b> Caracterización del suelo pretratado con HCV. ....	84
<b>Tabla 11.</b> Balance de carbono del tratamiento con glicerol en condiciones anóxicas. ...	113
<b>Tabla 12.</b> Eficiencias de degradación de los tratamientos no acoplado y acoplado anóxico/aerobio. ....	119
<b>Tabla 13.</b> Consumo de sulfato y concentración de Fe(II) asociado a la formación de mackinawita al día 20 de tratamiento. ....	123
<b>Tabla 14.</b> Porcentajes de degradación de DDX y valores de hierro (II) registrados a 20 días del tratamiento del suelo original con glicerol. ....	132
<b>Tabla 15.</b> Porcentajes de degradación de DDX y valores de hierro (II) registrados a 20 días del tratamiento del suelo original con bagazo de caña. ....	134
<b>Tabla 16.</b> Porcentajes de degradación de DDX y valores de hierro (II) registrados a 20 días del tratamiento del suelo original con tolueno. ....	136

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química del p,p'-DDT. ....	25
<b>Figura 2.</b> Destino ambiental de los plaguicidas en el suelo). ....	37
<b>Figura 3.</b> Ruta de degradación aerobia del DDT. Fuente: University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database (UM-BBD, 2016). ....	45
<b>Figura 4.</b> Ruta de degradación anaerobia del DDT. Fuente: University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database (UM-BBD, 2016). ....	47
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de deshalogenación por oxidación del hierro cero valente. Deshalogenación primaria (A); secundaria (B) e indirecta (C). ....	52
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de degradación de DDT inducido por desasimilación del hierro (III), propuesto por Li y col. (2010). ....	57
<b>Figura 7.</b> Estrategia de remediación para el suelo contaminado del sitio “Tekchem” .....	62
<b>Figura 8.</b> Sistemas experimentales. ....	69
<b>Figura 9.</b> Esquema de los experimentos de bioestimulación. ....	72
<b>Figura 10.</b> Resultados del análisis de DRX. a) antes del tratamiento (suelo original) y b) después del tratamiento con hierro. A: anortita, J: jarosita, Gy: yeso, Q: Cuarzo, L: lepidocrocita, G: goethita. ....	85
<b>Figura 11.</b> Color del suelo. (a) antes del tratamiento (suelo original) y (b) después del tratamiento con HCV.....	86
<b>Figura 12.</b> Familia de bacterias identificadas en el (a) suelo original y (b) después del tratamiento con HCV.....	87
<b>Figura 13.</b> Porcentajes de degradación de los DDX a los  20,  30,  40 y  60 días de tratamiento. a) tratamiento con difenilmetano y b) control (sin cosustrato). ....	91
<b>Figura 14.</b> Producción de CO <sub>2</sub> . Control (  ) y difenilmetano (  ).. ....	92

<b>Figura 15.</b> Porcentajes de degradación de los DDX a los  20,  30,  40 y  60 días de tratamiento. a) tratamiento con tolueno y b) control (sin cosustrato).....	95
<b>Figura 16.</b> Registró de la adición y agotamiento de tolueno en condiciones aerobias durante los 60 días de tratamiento.....	96
<b>Figura 17.</b> Porcentajes de degradación de los DDX a los  20,  30,  40 y  60 días de tratamiento. a) tratamiento con glicerol y b) control sin cosustrato. ....	98
<b>Figura 18.</b> Producción de CO <sub>2</sub> . Control (◆), glicerol (●) y tolueno (▲)..	100
<b>Figura 19.</b> Familia (a) y especies (b) de bacterias identificadas en el suelo tratado con tolueno en condiciones aerobias.....	101
<b>Figura 20.</b> Mecanismo biótico de degradación de DDX inducida por bioestimulación. ..	103
<b>Figura 21.</b> Porcentajes de degradación de los DDX a los  20,  30,  40 y  60 días de tratamiento. a) tratamiento con glicerol y b) control sin cosustrato. ....	105
<b>Figura 22.</b> Registró de la adición y agotamiento de tolueno en condiciones anóxicas durante los 60 días de tratamiento.....	99
<b>Figura 23.</b> Porcentajes de degradación de los DDX a los  20,  30,  40 y  60 días de tratamiento. a) tratamiento con glicerol y b) control (sin cosustrato).....	108
<b>Figura 24.</b> Concentración de sulfato (□) y concentración de hierro (II) asociado a la formación de mackinawita (●). ....	110
<b>Figura 25.</b> Producción de CO <sub>2</sub> . Control (◆), glicerol, (●) y tolueno (▲). ....	112
<b>Figura 26.</b> Detección de mackinawita (Mk) por difracción de rayos X. ....	111
<b>Figura 27.</b> Formación y consumo de AGVs: acético (■); propiónico (◆) y butírico (○). .....	113
<b>Figura 28.</b> Familia (a) y especies (b) de bacterias identificadas en las muestras de suelo tratado con glicerol. ....	115
<b>Figura 29.</b> Mecanismo de deshalogenación reductiva del DDT inducida por la formación de mackinawita (Fe <sub>1+x</sub> S). ....	116

<b>Figura 30.</b> Registró de la adición y agotamiento de tolueno durante los 40 días del tratamiento acoplado. ....	121
<b>Figura 31.</b> Ruta metabólica de degradación de sustratos orgánicos de fácil asimilación por BSR .....	125
<b>Figura 32.</b> Producción de CO <sub>2</sub> registradas con diferentes fuentes de carbono en condiciones anóxicas. ....	127
<b>Figura 33.</b> Degradación de DDT y sus intermediarios mediante el uso de diferentes fuentes de carbono. ....	137
<b>Figura 34.</b> Degradación de DDT, DDE y DDD registrado en el suelo original durante el tratamiento con tolueno en condiciones aerobias. ....	137

## Índice de figuras anexas

<b>Figura A1.</b> Degradación de DDT, DDD y DDE y formación de DDNS mediante el tratamiento de HCV. Concentraciones de los DDX antes del tratamiento (▨) y después del tratamiento (▩).....	158
<b>Figura A2.</b> Curva de rarefacción. Suelo original (■), suelo pretratado HCV (●), suelo tratado con gliceol condiciones anóxicas (◇) y suelo tratado con tolueno condiciones aerobias (△).....	159
<b>Figura A3.</b> Número de copias de genes 16S rDNA. Suelo original ( A1), suelo pretratado HCV ( A2 ), y suelo tratado con tolueno condiciones aerobias ( B ) y suelo tratado con gliceol condiciones anóxicas ( C ).....	159
<b>Figura A4.</b> Phyla y género de bacterias identificados. Suelo original ( A1), suelo pretratado HCV ( A2 ), y suelo tratado con tolueno condiciones aerobias ( B ) y suelo tratado con gliceol condiciones anóxicas ( C ).....	16059

## I. INTRODUCCIÓN

El 1,1,1-tricloro-2,2'bis(*p*-clorofenil)etano (DDT) y sus compuestos intermediarios (llamado en conjunto DDX) son Compuestos Orgánicos Persistentes (COP) que se encuentran prohibidos o restringidos en 176 países signatarios del Convenio de Estocolmo. No obstante que el DDT se dejó de fabricar, comercializar y utilizar a partir de la entrada en vigor del Convenio de Estocolmo en 2004, hoy en día existen estudios que demuestran que los derivados de la transformación parcial de DDT se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. El principal destino ambiental del DDT es el suelo y es, por lo general, un reservorio de DDX por su alta recalcitrancia.

El impacto adverso sobre la salud humana y el medio ambiente, que causan los suelos contaminados con DDT y sus subproductos derivados, ha propiciado el desarrollo científico y tecnológico de tratamientos para eliminar los DDX de esta matriz ambiental. Sin embargo, a pesar del progreso a nivel mundial, aún existen diversas limitaciones económicas y normativas en países en vías de desarrollo para poder utilizar las tecnologías de remediación comerciales disponibles (desorción térmica, incineración, entre otros). En este contexto, en nuestro país existe la necesidad de desarrollar tecnologías de remediación de suelos contaminados con DDX que sean técnicamente viables, eficientes y de bajo costo. Uno de los sitios contaminados que requiere del desarrollo de este tipo de tratamientos de remediación es el predio industrial conocido como la exfábrica de fertilizantes y plaguicidas “*Tekchem*”, ubicada en Salamanca, Gto., lugar donde se fabricó el DDT de 1958 y hasta 1998. Actualmente, este predio está catalogado

como un sitio prioritario por la SEMARNAT, debido al alto riesgo de exposición a los residuos de plaguicidas que tiene la población aledaña. Por esta razón, el grupo de investigación considero importante realizar pruebas de remediación del suelo procedente del sitio mencionado.

En un trabajo previo a nivel laboratorio, usando este suelo contaminado, se demostró que es posible reducir las concentraciones de DDT, 1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)etano (DDD) y 1,1-dicloro-2,2-bis(*p*-clorofenil)eteno (DDE) utilizando un tratamiento fisicoquímico con hierro cero valente (HCV) (INE-UAM, 2013). Sin embargo, en el suelo tratado se registró la acumulación de un compuesto intermediario. Es decir, el tratamiento con HCV solamente transformó parcialmente el DDT, en tanto que concentraciones remanentes de DDT, DDE y DDD continuaron detectándose después del tratamiento.

Estos resultados demostraron la necesidad del uso de un tratamiento complementario para eliminar los residuos de DDT en el suelo pretratado con HCV. El tratamiento seleccionado para este propósito fue la tecnología de biorremediación conocida como *bioestimulación*.

La bioestimulación es un tratamiento que estimula el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos autóctonos del suelo para mejorar la biodegradación de los contaminantes. La bioestimulación se produce mediante el uso de donadores de electrones, aceptores de electrones, nutrientes, surfactantes o mezclas de ellos. El uso de donadores de electrones (cosustratos orgánicos) es la técnica de bioestimulación más utilizada para remediar suelos contaminados con DDT. Esto se debe al hecho de que la mayoría de los suelos contaminados tienen un déficit de materia orgánica que restringe el crecimiento y la actividad de

los microorganismos, además de que esta técnica fomenta el crecimiento de las poblaciones microbianas que están adaptadas para funcionar o sobrevivir en las condiciones ambientales del sitio.

Debido a lo anterior, la estrategia de bioestimulación seleccionada para este trabajo fue la suplementación de compuestos orgánicos. Los cosustratos orgánicos utilizados para fomentar la bioestimulación pueden ser compuestos estructuralmente similares o no a los compuestos a degradar. El uso particular de un cosustrato debe evaluarse en cada estudio de remediación, debido a que la técnica de bioestimulación no es un tratamiento que puede utilizarse de manera estándar en suelos contaminados. En este sentido, cabe mencionar, que la eficiencia de degradación de los DDX no depende sólo del tipo de cosustrato utilizado, sino también de diversas variables como las capacidades metabólicas intrínsecas de los microorganismos, las condiciones aerobias y anóxicas del sistema, las características del suelo, la biodisponibilidad del contaminante, entre otros.

El presente trabajo de investigación doctoral tuvo como objetivo evaluar la técnica de bioestimulación utilizando compuestos orgánicos aromáticos (difenimetano y tolueno) y no aromáticos (glicerol, ácido láctico, glucosa y etanol), para fomentar la degradación de los DDX en el suelo. La investigación se enfocó en determinar los mecanismos de degradación de los DDX en condiciones aerobias y anóxicas en un suelo previamente tratado con HCV. Los mecanismos descritos en este estudio son importantes para establecer las bases de la estrategia de remediación a gran escala del suelo contaminado con DDX de la exfábrica "Tekchem".

## **2. ANTECEDENTES**

## **2. ANTECEDENTES**

En este capítulo se presenta información general sobre los plaguicidas organoclorados con énfasis en el DDT (sección 2.1), además, se pondrá en contexto las causas de la problemática ambiental del DDT y su prohibición a nivel internacional (apartado 2.1.1). En el apartado 2.1.2, se presenta información sobre los sitios contaminados con plaguicidas organoclorados en nuestro país. Posteriormente, en la sección 2.2, se presenta el comportamiento ambiental del DDT.

### **2.1. Plaguicidas organoclorados y DDT**

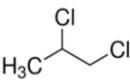
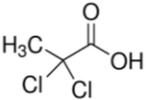
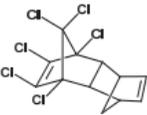
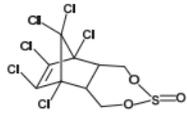
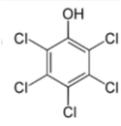
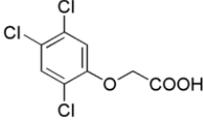
La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) define a un plaguicida como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos” (FAO/OMS, 2004).

Los plaguicidas pueden clasificarse de acuerdo con su composición química, al uso al que se destina, al organismo que controlan, al modo de acción, a su tiempo de persistencia en el ambiente y a su presentación comercial. Para fines de estudios ambientales, la clasificación más importante es la de su composición

química. Esto permite agrupar a los plaguicidas de acuerdo con su principal ingrediente activo. Esta clasificación incluye a los compuestos inorgánicos, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, triazinas (CICOPLAFEST, 2004; Greene y Pohanish, 2005). En este estudio nos enfocamos en los plaguicidas organoclorados, dado que el DDT y sus intermediarios fueron los compuestos detectados en el suelo de la exfábrica “Tekchem” y son los contaminantes objetivos del presente estudio.

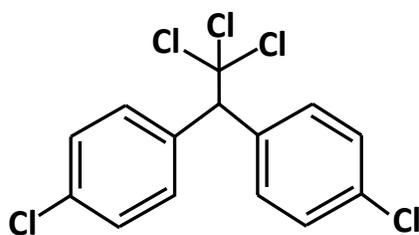
Los plaguicidas organoclorados son moléculas orgánicas con átomos de cloro en su estructura. Su número y la localización determinan la toxicidad y persistencia en el medio ambiente (Castelo-Grande y col., 2010). Los plaguicidas organoclorados son insecticidas, herbicidas, fungicidas y acaricidas, y se agrupan en tres categorías de acuerdo con su estructura molecular (Tabla 1).

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

Plaguicidas organoclorados	Ejemplos	Estructuras
<b>Alifáticos</b>	1, 2-dicloropropano, ácido 2,2- dicloropropanoico, ácido (Z)-2,3,5,5,5-pentacloro-4-oxopent-2-enoico, entre otros.	 1, 2-dicloropropano  Ácido 2,2- dicloropropanoico
<b>Alicíclicos</b>	Aldrín, dieldrín, endrín, clordano, endosulfan, heptacloro, lindano, entre otros.	 Aldrín  Endosulfan
<b>Aromáticos</b>	DDT, metoxiclor, pentaclorofenol, 2,4,5-triclorofenol hexaclorobenceno, entre otros.	 Pentaclorofenol  2,4,5-T

El DDT fue el plaguicida organoclorado más utilizado por su bajo costo de producción y gran efectividad contra la eliminación de plagas de cultivos agrícolas y de insectos vectores causantes de diversas enfermedades humanas y de animales (Castelo-Grande y col., 2010).

El DDT se sintetizó por primera vez en 1874 por el alemán Othmar Zeidler. No obstante, su acción como insecticida fue descubierta por el suizo Paul Herman Müller, en 1939, quien recibió el premio Nobel en Fisiología y Medicina, en 1948 (Greene y Pohanish, 2005). Por lo general, el reactivo grado técnico del DDT era una mezcla de *p,p'*-DDT (~85%) y de sus isómeros: *o,p'*-DDT en una cantidad de alrededor del 15% y de *o,o'*-DDT, en cantidad traza. Generalmente, cuando se hace alusión al DDT, se trata del *p,p'*-DDT que es el compuesto con actividad insecticida significativa (Caballero, 2001). La estructura molecular del DDT tiene una gran estabilidad química conferida por dos estructuras aromáticas y una alifática cloradas (Figura 1).



**Figura 1.** Estructura química del *p,p'*-DDT.

Numerosos estudios han demostrado que el DDT se transforma por reacciones químicas, fotoquímicas o biológicas en dos compuestos intermediarios primarios, conocidos como *p,p'*-DDE (1,1-dicloro-2,2'-bis(*p*-clorofenil)etileno) y *p,p'*-DDD (1,1-dicloro-2,2'-bis(*p*-clorofenil)etano) (ATSRD, 2002;). Por una parte, el *p,p'*-DDD (DDD) se genera cuando el DDT sufre un proceso de deshalogenación reductiva

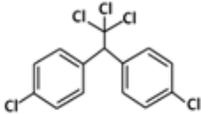
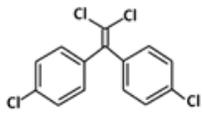
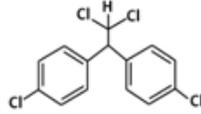
en condiciones anaerobias; el *p,p'*-DDE (DDE) se genera principalmente por dehidrohalogenación en condiciones aerobias (ATSRD, 2002).

Ambos compuestos intermediarios se han detectado en matrices ambientales (suelos, sedimentos, agua y aire) y en matrices biológicas (sangre, orina, tejidos grasos, plantas, frutas), como resultado de la transformación del DDT. Asimismo, la presencia de los residuos del DDD en el medio ambiente se debe a su uso comercial como insecticida en el control de plagas agrícolas. En cambio, el DDE no tuvo un uso comercial como insecticida, por lo que la presencia de residuos se debe esencialmente a la transformación del DDT (ATSRD, 2002).

La Tabla 2 muestra que los productos principales de degradación del DDT poseen características fisicoquímicas similares al compuesto parental. Estas características similares se debe a que durante la transformación del DDT a DDD o DDE se mantiene la estructura aromática de la molécula, que es la parte que le confiere gran estabilidad química a este tipo de compuestos (Greene y Pohanish, 2005).

**Tabla 2.** Datos técnicos del DDT y sus principales intermediarios.

<b>Características</b>	<b>p,p'-DDT</b>	<b>p,p'-DDE</b>	<b>p,p'-DDD</b>
<b>Sinónimos</b>	p,p'-DDT; 1,1,1-tricloro-2,2-bis( <i>p</i> -clorofenil)etano; 4,4' DDT	DDT dihidrocloro; Diclorodifenildicloroetileno; 1,1-dicloro-2,2-bis( <i>p</i> -clorofenil) etileno	1,1-bis(4-clorofenil)-2,2-dicloroetano; 1,1-dicloro-2,2-bis( <i>p</i> -clorofenil)etano; TDE
<b>Nombres comerciales</b>	Genitox, Anofex, Detoxan, Dicofano, Clorofenotano	No comercializado	DDD; Rotano; Dileno, TDE
<b>Fórmula química</b>	C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>5</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>4</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>4</sub>

<b>Estructura química</b>			
<b>Peso molecular</b>	354.49	318.03	320.05
<b>Color</b>	polvo blanco, cristales incoloros	blanco	Polvo blanco, cristales
<b>Estado físico</b>	sólido	sólido cristalino	sólido
<b>Punto de fusión</b>	108-109 °C(p,p'),	88.4-90°C	109- 110°C
<b>Punto de ebullición</b>	260°C	NR	193°C a 1 mmHg
<b>Densidad</b>	0.98-0.99 g/cm <sup>3</sup>	NR	1.385 g /m <sup>3</sup>
<b>Solubilidad en agua a 24°C</b>	Insoluble (max. 0.0034 mg/L)	0.12 mg/L	Insoluble (max.0.16mg/L)
<b>Olor</b>	inodoro, aromático ligero	inodoro	inodoro
<b>Presión de vapor (torr)</b>	5.5 X 10 <sup>-6</sup> a 20°C	6.5 X 10 <sup>-6</sup> a 20°C	1.02 X 10 <sup>-6</sup> a 30°C
<b>Coef. de adsorción de carbono orgánico-agua (K<sub>oc</sub>)</b>	2.4 X 10 <sup>5</sup>	4.4 X 10 <sup>6</sup>	7.8 X 10 <sup>6</sup>
<b>Constante de la Ley de Henry</b>	5.13 X 10 <sup>-4</sup> atm-m <sup>3</sup> /mol	6.8 X 10 <sup>-5</sup> atm-m <sup>3</sup> /mol	2.16 X 10 <sup>-5</sup> atm-m <sup>3</sup> /mol

Fuente: ATSRD, 2002. NR. No reportado

Por otra parte, se han reportado alrededor de 10 compuestos generados de la transformación posterior de los compuestos intermediarios primarios (DDD y DDE), que se presentan en la Tabla 3. Algunos de estos intermediarios se han detectado en suelos, agua, sedimentos, sangre, orina, leche materna, así como en órganos internos de animales y seres humanos (tejidos adiposos, hígado, riñones, entre otros) (Huckle y Millburn, 1990; ATSRD, 2002). Por ejemplo, dentro del cuerpo humano, el DDD se transforma con el paso del tiempo en ácido bis(p-

clorofenil)acético (DDA), el cual se elimina del cuerpo humano por medio de la leche materna y la orina (ATSRD, 2002; Ware y Whitacre, 2004).

**Tabla 3.** Compuestos intermediarios del DDT.

<b>Acrónimo</b>	<b>Nombre</b>
<b>DDD</b>	1,1-dichloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano
<b>DDE</b>	1,1-dichloro-2,2-bis(pp-clorofenil)eteno
<b>DDNS</b>	2,2 bis (p-clorofenil) etano
<b>DDMU</b>	1-chloro-2,2-bis(p-clorofenil)eteno
<b>DDMS</b>	1-chloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano
<b>DDNU</b>	2,2-bis(p-clorofenil)eteno
<b>DDM</b>	bis(p-clorofenil)metano
<b>DDA</b>	ácido bis(p-clorofenil)acético
<b>DBP</b>	Diclorobenzofenona

### **2.1.1. Efectos adversos del DDT en el medio ambiente y Convenio de Estocolmo**

El DDT está clasificado como un compuesto moderadamente tóxico clase II (valores de toxicidad aguda LD<sub>50</sub> de 113 a 800 mg/kg en ratas), el cual puede causar intoxicaciones agudas y crónicas en los seres humanos (ATSRD, 2002). El valor de la LD<sub>50</sub> es la concentración de una sustancia que al ser administrada por cualquier vía de ingreso, en un periodo determinado, produce la muerte del 50% de individuos de una población expuesta, la cual se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del individuo (miligramos por kilo, mg/kg) (ATSRD, 2002). Cuando el DDT ingresa al organismo, se acumula principalmente, en tejidos adiposos, sistema nervioso central, ganglios nerviosos y glándulas suprarrenales (ATSRD, 2002; Ware y Whitacre, 2004). Al ingresar el DDT al

organismo ejerce su acción neurotóxica y modifica la función normal de los canales de sodio de la membrana neuronal para generar alteraciones de la transmisión del impulso nervioso, produciendo la pérdida de coordinación y afectaciones en el sistema respiratorio hasta causar la muerte (Tordoir y Van Sittert, 1994). Otros efectos reportados causados por la exposición al DDT, son problemas inmunológicos, neurológicos, reproductivos, genotóxicos, de desarrollo y los carcinogénicos, entre otros. El grado de afectación de cada individuo depende de la dosis, la vía, el tiempo y la frecuencia de exposición, entre otros factores (ATSRD, 2002). La ingesta de alimentos contaminados con DDT es la principal causa de intoxicación crónica a nivel mundial, debido a que el DDT se biomagnifica en la cadena trófica. En cambio, las intoxicaciones agudas por DDT se presentan por inhalación y exposición dérmica directa a este compuesto.

Los compuestos intermediarios primarios del DDT, también, son compuestos causantes de efectos crónicos e intoxicaciones agudas. En general, la exposición crónica al DDE y DDD produce una amplia gama de consecuencias de tipo metabólicas, endocrinas, reproductivas y mutagénicas (Hodgson y Levi, 2001; Repetto, 2009). Actualmente, el DDD y DDE están clasificados como probables compuestos carcinogénicos en humanos por la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (EPA, por sus siglas en inglés) (ATSRD, 2002).

De estos dos compuestos intermediarios, sólo el DDD mantiene propiedades tóxicas e insecticida similares al DDT. Esto se debe a que los enlaces C-C de la parte alifática de la molécula del DDD tienen una forma tridimensional análoga al DDT (estructura tetraédrica para cada carbono); en cambio, el DDE, al tener un doble enlace entre sus carbonos, genera una estructura tridimensional distinta al

DDD y DDT, lo cual causa de la pérdida de su acción insecticida (ATSRD, 2002; Greene y Pohanish, 2005). No obstante, el doble enlace en la parte alifática de la estructura del DDE le confiere una mayor estabilidad química que el DDD y DDT: por lo que, el DDE es más persistente. Debido a esta característica, la concentración de DDE en tejido adiposo puede ser usada como biomarcador de la exposición a DDT (ATSRD, 2002). El DDE se ha identificado como disruptor endócrino con capacidad para afectar a la vida reproductiva y los procesos de desarrollo tanto de humanos como de animales. La mayor causa de estos efectos crónicos es la persistencia y la bioconcentración de este compuesto en los organismos vivos (Tordoir y Van Sittert, 1994; Ware y Whitacre, 2004).

Los numerosos estudios científicos realizados confirmaron que los plaguicidas organoclorados constituyen uno de los grupos de compuestos más peligrosos que se liberan al medio ambiente, debido a sus características de persistencia, toxicidad, acumulación y biomagnificación en la cadena trófica. En 1997, el Foro Intergubernamental sobre Seguridad Química (IFCS, por sus siglas en inglés) presentó sus recomendaciones para restringir, prohibir, reducir y eliminar el uso de 12 COP al Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). A partir de esta iniciativa, el 22 de mayo de 2001, se creó el Convenio de Estocolmo, con el objetivo de proteger la salud humana y el medio ambiente de estos 12 COPs (Romero y col., 2009; UNEP, 2011). El Convenio de Estocolmo entró en vigor el 17 de mayo de 2004. Hoy en día, 176 países han ratificado el convenio, entre ellos México. En un inicio, el Convenio de Estocolmo incluyó a 9 plaguicidas organoclorados y, además, otros 3 grupos de contaminantes orgánicos prioritarios, conocidos como la docena sucia. En 2009, se añadieron 5 plaguicidas

organoclorados más a la lista de los COPs (UNEP, 2001). En la Tabla 4, se muestran los 14 plaguicidas organoclorados que actualmente están listados en el Convenio de Estocolmo.

**Tabla 4.** Plaguicidas organoclorados listados en el convenio de Estocolmo.

<b>Plaguicida organoclorado</b>	<b>N° de CAS:</b>
Aldrina	309-00-2
Clordano	57-74-9
Dieldrina	60-57-1
Endrina	72-20-8
Heptacloro	76-44-8
Hexaclorobenceno	118-74-1
Mirex	2385-85-5
Toxafeno	8001-35-2
DDT	50-29-3
$\alpha$ -hexaclorociclohexano	319-84-6
$\beta$ -hexaclorociclohexano	319-85-7
Lindano	58-89-9
Pentaclorobenceno	608-93-5
Clordecona	143-50-0

Aunado al Convenio de Estocolmo, existen otros acuerdos y planes de acciones regionales para reducir y eliminar sustancias designadas como contaminantes prioritarios para ciertas regiones del mundo. Un ejemplo de estos acuerdos es la resolución n° 95-05, que establece medidas sobre el manejo adecuado de sustancias químicas en América del Norte. Esta resolución se estableció en el marco del Acuerdo de Cooperación Ambiental de América del Norte (ACAAN) entre los gobiernos de Canadá, EE.UU. y México (Cortinas, 2003). Dentro de este instrumento jurídico, se logró la creación de Planes de Acción Regional de América del Norte (PARAN) para eliminar el uso del DDT, clordano,

hexaclorobenceno, lindano, entre otros compuestos prioritarios para la región (Cortinas, 2003).

### **2.1.2. Sitios contaminados en México**

El DDT se utilizó por primera vez en nuestro país en 1945 y tuvo su principal aplicación en campañas sanitarias para la erradicación del paludismo (Caballero, 2001). Su uso extenso durante la década de los años cincuenta en campañas sanitarias, así como en actividades agrícolas y ganaderas, propició que en 1959, se iniciara la producción nacional de DDT (López-Carrillo y col., 1996). El ingrediente activo del DDT se fabricó en dos empresas: Diamond Shamrock de México y Montrose Mexicana. La razón social de esta última se modificó en 3 ocasiones: primero, en Fertilizantes Mexicanos (Fertimex, S.A.); después, en Velpol S.A. de C.V., y finalmente, en Tekchem, S.A. de C.V. Entre 1971 y 1984, Fertimex, S.A., única paraestatal de su tipo, cubrió el 73% de la demanda nacional de DDT (alrededor de 6 000 toneladas/año). Entre 1980 y 1990, el DDT fue comercializado por 23 empresas de la pequeña y mediana industria que cubrían el total de la demanda nacional (Caballero, 2001). La dependencia del DDT fue tal que México ocupó el sexto lugar mundial en el consumo de este plaguicida entre 1971 y 1993 (López-Carrillo y col., 1996). Para 1994, la producción y el consumo de DDT disminuyeron a 1 500 toneladas/año debido a la crisis económica que atravesaba el país; finalmente, en 2001, el DDT se dejó de fabricar y comercializar para cumplir con las medidas establecidas por el Convenio de Estocolmo, además la Secretaría de Salud prohibió el uso del DDT para fines agrícolas y restringió su uso en campañas sanitarias (Caballero, 2001).

A pesar de estas medidas, estudios recientes (Acosta-Ramírez y col., 2009; INE-UAM, 2010; Velasco y col., 2014) sobre el monitoreo de plaguicidas, realizados en diferentes Estados de la República Mexicana demuestran que aún existe presencia de residuos de DDT y sus intermediarios en matrices ambientales y biológicas, a pesar de que su uso se prohibió/restringió desde el año 2001.

Los estudios de monitoreo en suelos reportados en los últimos 10 años, revelan que los compuestos que se detectan con una mayor frecuencia son DDT, DDE,  $\beta$ -HCH y heptacloro (INE-UAM, 2010). Los resultados de los estudios muestran que los niveles de DDT en zonas agrícolas se encuentran por debajo de los límites máximos permisibles establecidos en la normatividad internacional para suelos agrícolas y urbanos (0.7 ppm, para Canadá; 1.9 ppm, para EE.UU.) (CCME, 2007; US-EPA, 2016). Sin embargo, el muestreo de suelos urbanos en comunidades con problema de salud pública por paludismo del estado de Chiapas mostró concentraciones de DDT de hasta 15 ppm. Es decir, muy por arriba de los límites máximos permisibles establecidos por la normatividad internacional (Acosta-Ramírez y col., 2009; Herrera-Portugal y y col., 2005). Esto indica que, muy probablemente, el mayor grado de contaminación por residuos de DDT se presenta principalmente en las zonas palúdicas de México.

En el 2010, se detectaron un total de 563 sitios contaminados en 26 estados de la República Mexicana, de los cuales, solo 45 sitios tienen una probable contaminación con plaguicidas (INE-UAM, 2010). De los 45 sitios listados, el 27% corresponde a tiraderos; el 22%, a bodegas de almacenamiento de plaguicidas; el 16%, a zonas agrícolas; el 13%, a predios industriales. Los estados con mayor número de sitios contaminados registrados son el Estado de México, Guanajuato,

Sinaloa y San Luis Potosí (INE-UAM, 2010). No obstante, estos resultados, cabe señalar que aún hace falta generar mayor información para establecer un diagnóstico nacional sobre la situación actual de la contaminación de suelos con DDT y otros plaguicidas.

La exfábrica de agroquímicos *Tekchem, S.A. de C.V.*, ubicada en Salamanca, Guanajuato, es uno de los sitios industriales más contaminados por residuos de DDT y otros plaguicidas, a nivel nacional (PNRSC, 2009). De 2001 al 2015, se realizó el retiro de residuos peligrosos (24 000 toneladas), trabajos de contención de la contaminación y el desmantelamiento de la fábrica (PNRSC, 2009). Sin embargo, en el predio industrial, aún quedan toneladas de suelos contaminados con residuos de DDT y otros plaguicidas que requieren medidas de remediación para eliminar o reducir los altos niveles en el sitio (concentraciones de DDT > 20 ppm) (INE-UAM, 2010).

## **2.2. Comportamiento ambiental del DDT**

### **2.2.1. Procesos de transporte**

Una vez que los plaguicidas son esparcidos en las zonas palúdicas o agrícolas, éstos se distribuyen en el ecosistema por medio de diversos procesos de transporte (Gavrilescu, 2005). El transporte ambiental de los plaguicidas involucra el intercambio de fases (sólido, líquido y gas) dentro de un medio determinado, así como su transferencia entre matrices ambientales (aire, suelo, agua, biota) (Gavrilescu, 2005). Entre los procesos de transporte se encuentran la sorción, la volatilización, la difusión-arrastre, la erosión, la lixiviación y la escorrentía (ATSDR, 2002; Gavrilescu, 2005). No obstante que los procesos de transporte son parte

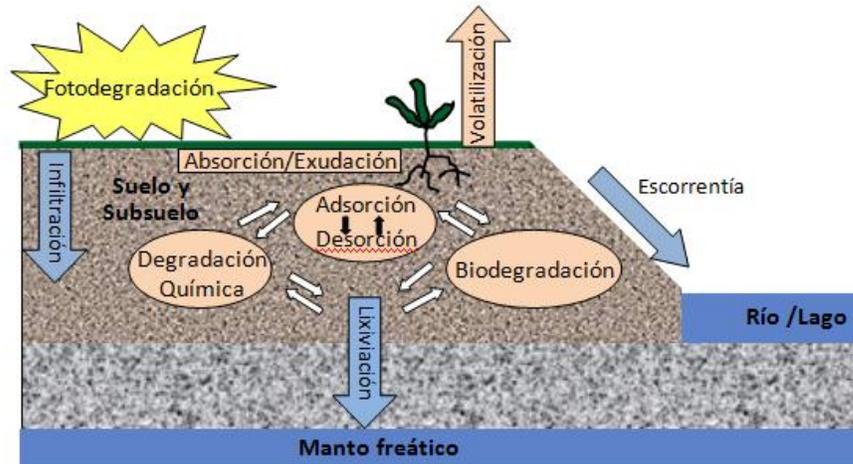
importante de la repartición de los plaguicidas en las diferentes matrices ambientales, la permanencia y acumulación del compuesto en un determinado medio dependen principalmente de las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de los plaguicidas, como la presión de vapor, la solubilidad, la constante de la Ley de Henry (H), el coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ) y el coeficiente de adsorción de carbono orgánico ( $K_{oc}$ ) (Gavrilescu, 2005; Seiber, 2001). Por consiguiente, los procesos de transporte y las propiedades fisicoquímicas son importantes para conocer el destino ambiental de un plaguicida. El destino ambiental de un contaminante involucra también los procesos de degradación, los cuales se mencionan más adelante en esta sección. A continuación, se describe el comportamiento del DDT en aire, agua, sedimentos y suelo:

- **Aire:** El DDT es un compuesto semivolátil o de volatilidad moderada (presión de vapor de  $5.5 \times 10^{-6}$  torr a  $20^{\circ}\text{C}$ ). Durante las campañas de fumigación, la presencia del DDT en el aire, se presentaba por las constantes aplicaciones vía aérea del plaguicida; posteriormente, su presencia en el aire se debió a procesos de transporte como volatilización y erosión (Xu y col., 2009; Zagury y col., 2002). La erosión es el proceso de transporte más importante debido a que el DDT se mantiene sorbido en las partículas del suelo. Las corrientes de aire mueven estas partículas por grandes distancias, hasta que estas son depositadas nuevamente en otros sitios por precipitación húmeda o seca (ATSDR, 2002).
- **Agua y sedimentos:** La baja solubilidad del DDT en agua ( $3.4 \mu\text{g/L}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ), indica que este compuesto no se acumula de forma importante en esta matriz

ambiental. La vía de ingreso en los sistemas acuáticos es a través de las partículas que son lavadas y arrastradas por los escurrimientos pluviales. Por lo general, los niveles de DDT en este sistema son amortiguados por procesos de sorción en sedimentos, plantas y animales acuáticos (Stephenson y col., 2002). La sorción del DDT en sedimentos es el principal mecanismo de amortiguamiento de los cuerpos de agua. Los sedimentos son considerados, al igual que el suelo, los principales reservorios de DDT. La afinidad del DDT y, en general, de todos los plaguicidas organoclorados en estas matrices ambientales, se debe al coeficiente de adsorción  $K_{oc}$ . Un alto valor de este coeficiente indica una fuerte sorción de los plaguicidas organoclorados en los suelos y sedimentos. (Stephenson y col., 2002).

■ **Suelos:** El DDT tiene una fuerte afinidad por los suelos al poseer un valor de  $K_{oc}$  mayor de 100 000 (ATSDR, 2002). La fuerte unión del DDT con el suelo impide que este sea liberado fácilmente de dicha matriz. Asimismo, el valor de la constante de Henry (H) del DDT ( $5.13 \times 10^{-4}$  atm·m<sup>3</sup>/mol) indica que este compuesto no se evapora fácilmente del suelo (Bollang y Liu, 1990; Greene y Pohanish, 2005), además debido a la baja solubilidad del DDT en agua tampoco es fácilmente percolado o lavado del suelo (Zagury y col., 2002). Por estas razones, una cantidad apreciable de DDT se acumula y permanece en el suelo por un tiempo prolongado (Zagury y col., 2002). La vida media del DDT en los suelos puede ser de 2 a 15 años (ATSDR, 2002; Xiaofei y col., 2008; Xu y col., 2009). El tiempo de permanencia del DDT en los suelos es función de los procesos de transporte y degradación; ambos procesos definen el destino

ambiental del DDT en el suelo (Figura 2). Los procesos de transporte implican la transferencia del contaminante de un medio a otro, mientras que los procesos de degradación (abiótico o biótico) generan un cambio en la estructura química del DDT que puede ser parcial (transformación) o total (mineralización) (Sudharshan y col., 2012).



**Figura 2.** Destino ambiental de los plaguicidas en el suelo (Adaptado de Arnold y Briggs, 1990).

Una vez que el suelo ha sido impactado ocasionalmente por una baja concentración de plaguicidas, éste puede ser retenido por el mismo suelo (proceso de sorción) o bien disminuir por procesos naturales como son la fotólisis, la hidrólisis, la biodegradación, la volatilidad y/o por el lavado del suelo debido a la presencia de corrientes de agua en épocas de lluvia. Sin embargo, cuando existe una contaminación recurrente, el suelo pierde su propiedad de amortiguamiento y hace que algunos procesos de atenuación natural lleguen a ser poco efectivos para disminuir la concentración del contaminante y, por consiguiente, sufre una contaminación. Esta consecuencia origina, en primera

instancia, infertilidad del suelo y, posteriormente, afectaciones a la vida silvestre y humana (Castelo-Grande y col., 2010; Gavrilesu, 2005).

### **2.2.2. Procesos de degradación**

Los procesos de degradación de los plaguicidas son de 2 tipos: abiótico o biótico. Por una parte, los procesos abióticos incluyen todas aquellas reacciones que no están catalizadas enzimáticamente (Sudharshan y col., 2012). Los procesos abióticos son catalizados, principalmente, por cationes polivalentes, óxidos e hidróxidos metálicos y sulfuros metálicos, entre otros (Sayles y col., 1997; Amir y Lee, 2011; Chiu y Reinhard, 1996). Por el contrario, los procesos bióticos incluyen todas aquellas reacciones que son catalizadas por enzimas en el interior o en el exterior de las células (Gavrilesu, 2005). El proceso de biodegradación de un plaguicida involucra al metabolismo directo o cometabolismo microbiano. El metabolismo directo se produce cuando el plaguicida es utilizado como fuente de carbono y energía por los microorganismos, mientras que el cometabolismo se presenta cuando el plaguicida se degrada en presencia obligada de una fuente de carbono y energía alterna. Un cosustrato puede incrementar la población de los microorganismos e inducir la activación de enzimas que participan en la degradación de un contaminante. Es decir, cuando dos sustratos son metabolizados simultáneamente, la degradación del compuesto que está presente a bajas concentraciones (contaminante) se mejora si el crecimiento de la biomasa con capacidad metabólica para degradarlo se incrementa por la presencia del otro sustrato de fácil asimilación (cosustrato); asimismo, un cosustrato puede promover las transformaciones cometabólicas que ocurren cuando la enzima de un

microorganismo que crece a partir de un sustrato "A" reconoce al compuesto "B" como sustrato (contaminante) y lo transforma (Bollang y Liu, 1990; Gavrilesco, 2005; Sudharshan y col., 2012). En este sentido, el uso de cosustratos es de gran importancia para fomentar la biodegradación de contaminantes recalcitrantes, como los plaguicidas.

Los procesos bióticos y abióticos involucran una serie de reacciones químicas y bioquímicas para llevar a cabo la degradación parcial o total del DDT (oxidación, deshalogenación, dehidrocloración, hidrólisis, hidroxilación y descarboxilación). De estas reacciones, al menos 3 son de gran importancia para iniciar el proceso de degradación: la oxidación, la deshalogenación reductiva (hidrogenólisis) y la dehidrocloración (ATSDR, 2002). A continuación se describen estas reacciones:

- **Oxidación:** La reacción de oxidación involucra la generación y uso de especies oxidantes. Los principales agentes oxidantes utilizados son el oxígeno y el ozono. La reacción de oxidación ocurre en forma biótica y abiótica.

**Biótica:** La reacción de oxidación del DDT se produce cuando el oxígeno molecular ( $O_2$ ) actúa como reactivo y aceptor final de electrones. La etapa clave es la ruptura del anillo aromático del DDT, la cual se genera por la incorporación de uno o dos átomos de oxígeno por vía enzimática (Foght y col., 2001).

**Abiótico:** La oxidación del DDT por procesos abióticos ocurre mediante el uso de sistemas avanzados de oxidación (fotocatalíticos, ozonización, plasma, entre otros) o por tratamientos de incineración a temperatura entre 850 y 1 200 °C (PNUMA, 2004).

- **Deshalogenación reductiva:** La deshalogenación reductiva es la reacción de degradación más importante del DDT en condiciones reductoras. En este proceso, el DDT se transforma principalmente a DDD en condiciones anóxicas como son suelos inundados, lodos y sedimentos. La transformación del DDT a DDD se produce por la remoción de un átomo de cloro y por la adición simultánea de un átomo de hidrógeno en la parte alifática de la molécula (ATSDR, 2002). Esta reacción ocurre en forma biótica y abiótica en presencia de un donador de electrones (Sudharshan y col., 2012).

**Biótica:** La deshalogenación reductiva del DDT es catalizada por coenzimas que contienen metales de transición (FAD, NADH, corrinoides, factor F430) y por lo general, los microorganismos utilizan un sustrato orgánico alterno como fuente de carbono y energía (lactato, glucosa, etanol, entre otros).

**Abiótica:** Uno de los procesos abióticos de deshalogenación reductiva más estudiados en los últimos 10 años es el uso del HCV, como donador de electrones, el cual se ha utilizado para tratar agua, sedimentos y suelos contaminados con DDT. En este caso, el HCV actúa como un donador de electrones.

- **Dehidrocloración:** La reacción de dehidrocloración del DDT a DDE se genera por procesos bióticos o abióticos. La transformación se produce, principalmente, en condiciones aerobias y en un menor grado en sistemas anóxicos (Thomas y col., 2008). La transformación del DDT a DDE procede por la remoción simultánea de un átomo de cloro y un átomo de hidrógeno de la parte alifática de la molécula para formar un doble enlace entre los átomos de carbono

(Thomas y col., 2008). La dehidrocloración del DDT a DDE se ha registrado, principalmente, en procesos abióticos de tipo fotoquímicos (Brown y col., 1986; Chu, 1999).

El avance y la tendencia del desarrollo científico y tecnológico para eliminar los residuos de DDT de matrices ambientales se han presentado principalmente en la aplicación de tratamientos biológicos (procesos bióticos), puesto que son tecnologías ambientalmente más seguras que las tecnologías térmicas y fisicoquímicas. En este sentido, numerosos estudios se han enfocado en la identificación de microorganismos con capacidades metabólicas para degradar DDT (Tabla 5). Entre la phyla de bacterias con la habilidad de degradar DDT en un rango de degradación del 15% al 100% se encuentran Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria (Mansouri y col., 2016). En tanto que las especies como *Chryseobacterium* sp. PYR2 (Qu y col., 2015), *Alcaligenes eutropha* A5 (Nadeau y col., 1994) y *Pseudomonas acidovorans* M3GY (Hay y Focht, 1998) han demostrado tener gran capacidad metabólica para mineralizar el DDT. Dentro de las especies de hongos con reportados para degradar DDT se encuentran algunos hongos micorrícicos arbusculares y basidiomicetos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Boletus edulis*, *Gomphidius viscidus*, *Gleophyllum trabeum*, *Laccaria bicolor*, *Leccinum scabrum* y *Phanerochaete cordyline* (Bumpus y Aust, 1987; Fernando y col., 1989; Aislabie y col., 1997). La biodegradación de DDT se produce a través de diferentes rutas metabólicas que se presentan en condiciones aerobias o anaerobias. En la Tabla 5 se enlistan algunos microorganismos identificados con la capacidad de metabolizar DDT. La mayoría de los

microorganismos (bacterias y hongos) aislados y caracterizados son aerobios mientras que los microorganismos anaerobios han sido poco reportados. Los microorganismos facultativos aislados de sistemas secuenciales o cíclicos anóxicos/aerobios también han sido reportados, aunque han sido los menos utilizados para degradar DDX.

**Tabla 5.** Microorganismos identificados en las ultimas dos décadas con capacidad para degradar DDT.

Tipo de metabolismo	Microorganismo identificado		Referencia
	Bacteria	Hongo	
Aerobio	<i>Ralstonia eutropha</i> strain A5		Hay y Focht, 2000
	<i>Serratia mercascens</i> DT-1P		Bidlan y col., 2002
	<i>Pseudomonas</i> sp.		Kamanavalli y Ninnekar, 2004
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Santacruz y col., 2005
	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>		Barragan-Huerta y col., 2007
	<i>Pseudomonas putida</i>		Barragan-Huerta y col., 2007; Gautam y Suresh, 2009
	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. wax		Wang y col., 2010
	<i>Sphingobacterium</i> sp D6		Fang y col., 2010
	<i>Bacillus cereus</i>		Mwangi y col., 2010
	<i>Alcaligenes</i> sp		Xie y col., 2011
	<i>Alcaligenes</i> sp. strain DG-5		Gao y col., 2011
	<i>Pseudoxanthomonas jiangsuensis</i> sp.		Wang y col., 2011
	<i>Azoarcus</i> sp.		Ortiz y col., 2013
<i>Pseudoxanthobacter liyangensis</i> sp. nov.		Liu y col., 2014	

	<i>Rhodococcus</i> sp. strain IITR03	Bajaj y col., 2014
	<i>Novosphingobium</i> <i>arabidopsis</i> sp. nov.	Lin y col., 2014
<b>Aerobio Cont.</b>	<i>Chryseobacterium</i> sp.PYRS	Qu y col., 2015
	<i>Stenotrophomonas</i> sp. DDT-1	Pan y col., 2016
	<i>Ochrobactrum</i> sp. DDT-2	Pan y col., 2017
	<i>Fusarium solani</i>	Mitra y col., 2001
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Purnomo y col., 2010
	<i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i>	Thomas y Gohil, 2011
	<i>Phlebia brevispora</i> TMIC34596	Xiao y col., 2011
	<i>Trametes versicolor</i>	Sari y col., 2013
	<i>Eubacterium limosum</i>	Yim y col., 2008
	<i>Shewanella</i> <i>decolorationis</i> S12	Li y col., 2010
<b>Anaerobio</b>	<i>Clostridium</i> sp.	Bao y col., 2012
	<i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i> HS01	Cao y col. 2012
<b>Facultativo</b>	<i>Alcaligenes</i> <i>denitrificans</i> ITRC-4	Ahuja y Kumar, 2003

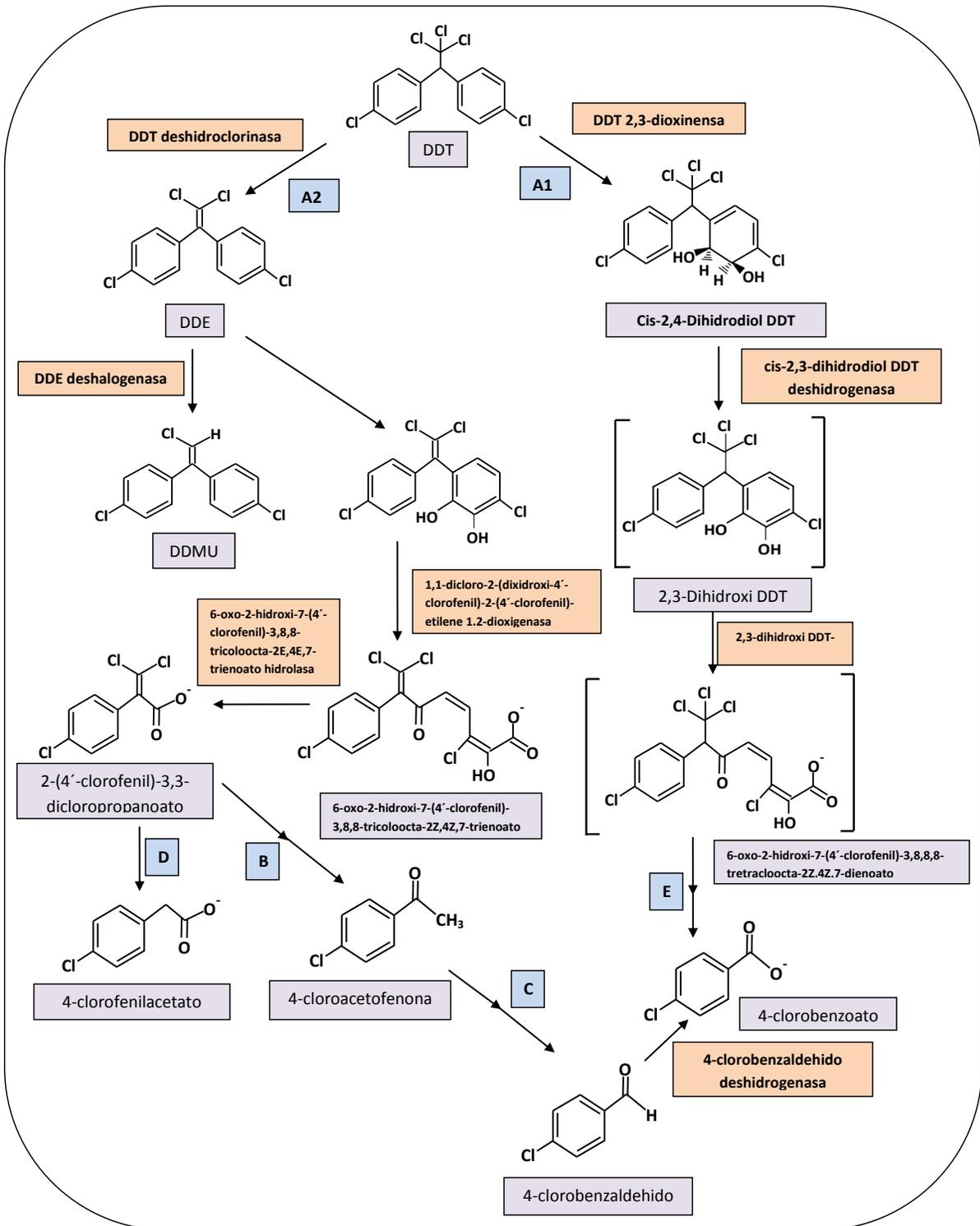
El conocimiento del metabolismo (aerobio y anaerobio) de los microorganismos es de gran utilidad para saber qué tipo de ruta metabólica llevan a cabo para degradar los contaminantes y de esta forma establecer las mejores condiciones del tratamiento biológico. A continuación se presentan las rutas metabólicas aerobia y anaerobia de degradación del DDT y las reacciones de oxidación, deshalogenación, dehidrocloración, hidrólisis, hidroxilación y descarboxilación que se producen en cada ruta metabólica.

### **2.2.2.1. Ruta metabólica de degradación aerobia**

En la ruta metabólica de degradación del DDT en condiciones aerobias se ha reportado la formación de DDE por dehidrocloración y la de compuestos tipo catecol por ruptura molecular del anillo aromático vía posición orto o meta. Las principales reacciones de degradación que se llevan a cabo en esta ruta metabólica son la oxidación, la hidroxilación y la descarboxilación (UM-BBD, 2016). La ruptura del anillo aromático por la reacción de oxidación es el primer paso para llevar a cabo la degradación del DDT y fue descrito por Nadeau y col. (1994). Estos autores atribuyeron la ruptura del anillo aromático a la actividad de las oxigenasas. Posteriormente, Hay y Focht (1998) demostraron que el DDE se degrada de forma similar al DDT, al sufrir la ruptura del anillo aromático por la inserción del oxígeno. Estos trabajos dieron la pauta para la construcción de la ruta metabólica de degradación del DDT en condiciones aerobias (Figura 3).

La ruta de degradación aerobia muestra que el DDT puede ser degradado inicialmente a compuestos del tipo catecol por ruptura del anillo aromático vía oxidación enzimática (Paso A1) hasta formar como producto final el 4-clorobenzoato. Además, la ruta propuesta muestra que el DDT, también, puede transformarse a DDE por dehidrohalogenación (Paso A2). Posteriormente, el DDE se transforma a DDMU por deshalogenación o puede ser transformado en 2-(4-clorofenil)-3,3-dicloropropenoato vía oxidación de uno de los anillos aromáticos. El 2-(4-clorofenil)-3,3-dicloropropenoato se transforma a 4-cloroacetofenona (paso B) y/o a 4-clorofenilacetato (Paso D). La transformación del 4-cloroacetofenona a 4-clorobenzaldehído se produce por descarboxilación del grupo metilo (paso C).

Finalmente, se produce la formación del 4-clorobenzoato por deshidrogenación del 4-clorobenzaldehido (Figura 3).

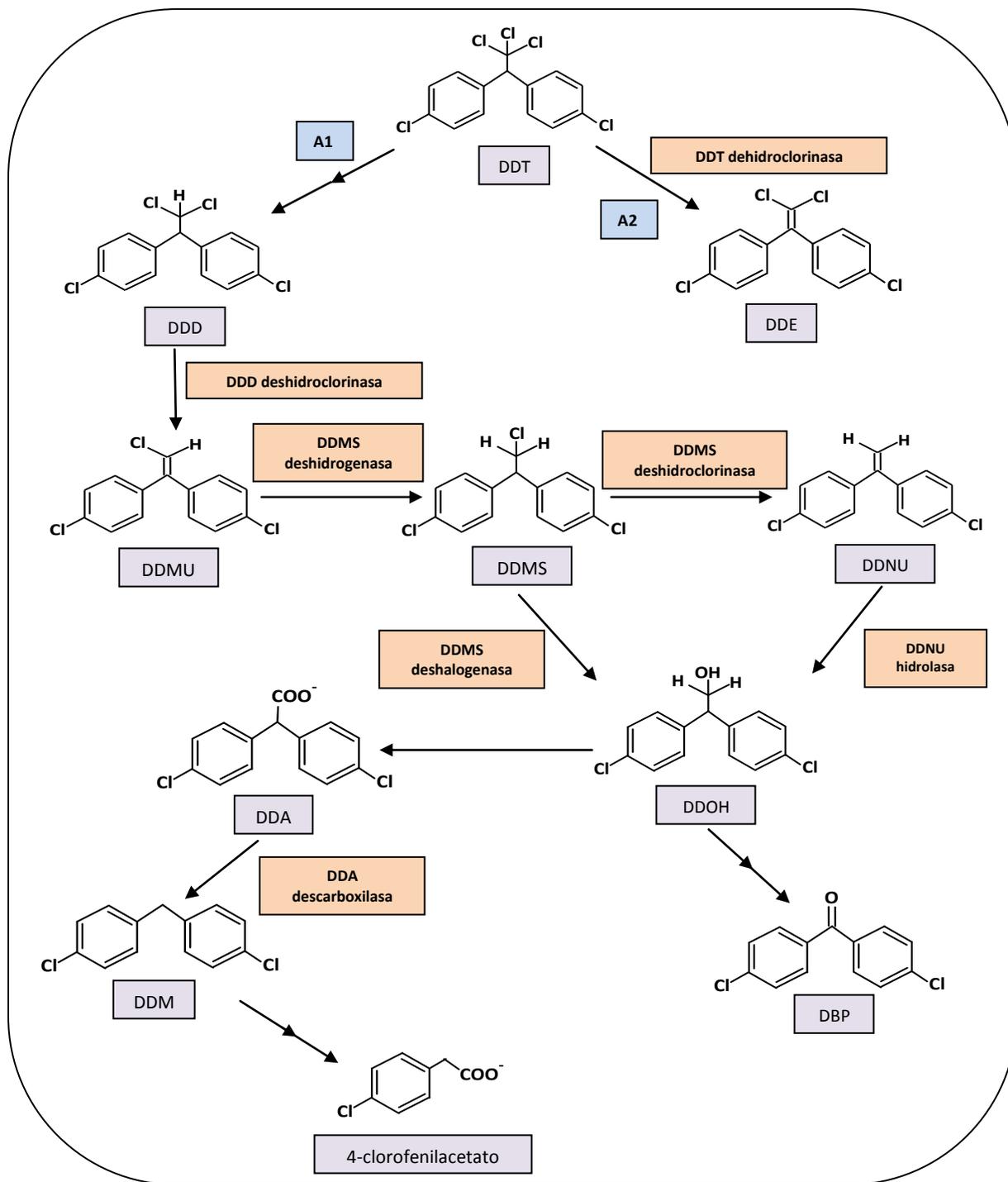


**Figura 3.** Ruta de degradación aerobia del DDT. Fuente: University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database (UM-BBD, 2016).

### **2.2.2.2. Ruta metabólica de degradación anaerobia**

Entre las principales reacciones que se mencionan en esta ruta de degradación se encuentran la deshalogenación reductiva, la dehidrohalogenación, la hidrólisis y la descarboxilación (UM-BBD, 2016). La ruta de degradación anaerobia (Figura 4) muestra que el DDT se transforma a DDD (Paso A1) mediante una reacción de deshalogenación reductiva en la parte alifática de su estructura. En esta reacción, un átomo de cloro es reemplazado por un átomo de hidrógeno y dos electrones (hidrogenólisis) (Holliger y Schumacher, 1994; Smidt y de Vos, 2004). Una vez formado el DDD, este se degrada a DDMU por dehidrocloración y, posteriormente, a DDMS vía dehidrogenación. El DDMS generado es a su vez transformado a DDNU por dehidrohalogenación y a DDOH vía deshalogenación e hidrólisis. El DDNU es hidrolizado hasta DDOH. El DDOH generado es subsecuentemente convertido en DBP por descarboxilación y oxidación (producto final) y a DDA por oxidación (producto intermediario). El DDA es transformado a DDM vía descarboxilación. Finalmente, el DDM es degradado vía oxidación de uno de sus anillos aromáticos a 4 clorofenilacetato (producto final).

La ruta metabólica de degradación anaerobia, muestra también que el DDT puede ser transformado a DDE por dehidrohalogenación (Paso A2), el cual se muestra en esta ruta como un producto final (Figura 4). Quensen y col. (1998) fueron los primeros en indicar que la transformación del DDE a DDMU es posible en condiciones anóxicas por deshalogenación reductiva. Estos autores señalaron que una vez formado el DDMU, este sigue la misma ruta de degradación propuesta en la Base de datos de Biocatálisis/Biodegradación de la Universidad de Minesota (UM-BBD, 2016) (Figura 4).



**Figura 4.** Ruta de degradación anaerobia del DDT. Fuente: University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database (UM-BBD, 2016).

### **3. ESTADO DEL ARTE**

### 3. ESTADO DEL ARTE DE LA REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DDT

En las últimas dos décadas se han evaluado diversos tratamientos de remediación de suelos contaminados con DDT a nivel laboratorio, piloto e industrial (Tabla 6). Estos tratamientos se agrupan en tres categorías: i) biológicos; ii) fisicoquímicos y iii) térmicos. Entre las técnicas de tratamiento más utilizadas para degradar DDT destacan las fisicoquímicas y las biológicas (Tabla 6). Estas tecnologías se han utilizado también de forma secuencial (tren de tratamiento) para eliminar los plaguicidas del suelo de una forma más efectiva (US-EPA, 2005).

**Tabla 6.** Estrategias de remediación de suelos contaminados con DDT.

Tecnología	Tipo de Tratamiento		
	Térmico	Fisico-químico	Biológico
<b>A. Escala industrial</b>			
1. Biorremediación DARAMEND®.			✓
2. Reducción química en fase gaseosa.		✓	
3. Desorción térmica <i>in situ</i> .	✓		
4. Deshalogenación mecano-química.		✓	
<b>B. Escala Piloto.</b>			
1. Biorremediación de suelos <i>in situ</i> .			✓
2. Fitorremediación.			✓
3. Tecnología <i>electron-solvated</i> .		✓	
4. Deshalogenación por alta temperatura (TDR-3R™).	✓		
5. Oxidación electroquímica (AEA Silver II™).		✓	
<b>C. Escala Laboratorio.</b>			
1. Degradación fotocatalítica y Fe (III).		✓	
2. Reacción de Fenton/Biorremediación.		✓	✓
3. Bioestimulación			✓
5. Tratamiento con hierro HCV (Iron Zero Valent)		✓	
6. Mecanismo de fotodeshalogenación para DDT en sistema UV/surfactante.		✓	
7. Desorción de DDT mediante lavado de suelo con surfactantes y cosolventes.		✓	

**Fuente:** McDowall y col., 2004; PNUMA, 2004; US-EPA, 2005.

La biorremediación es una técnica que utiliza las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar los contaminantes. La biorremediación ha generado gran expectativa para remediar suelos contaminados con plaguicidas. En los últimos 20 años, se ha creado un avance importante en el campo del desarrollo científico y tecnológico de la biorremediación. Hoy en día, se tiene una mayor información sobre las especies microbianas con capacidades catabólicas para degradar plaguicidas, las rutas metabólicas de degradación y las condiciones óptimas de tratamiento.

Los bajos costos de los tratamientos biológicos (50-100 USD/m<sup>3</sup>), aunado a la conservación de las propiedades y características de los suelos biorremediados, son unas de las principales ventajas que se tienen sobre algunos procesos fisicoquímicos (Volke y Velasco, 2003). La principal desventaja de los tratamientos biológicos es su aplicación que se ve limitada por los niveles inhibitorios en que se encuentran los contaminantes a tratar. Es decir, la afectación parcial o total de la actividad biológica de los microorganismos por la concentración del contaminante (US-EPA, 2005, Gavrilesco, 2005; Verma y col., 2014). Además, de que la optimización de los tratamientos biológicos para cada sitio contaminado representa un reto único, dado que los microorganismos deben contar con condiciones favorables para su crecimiento (temperatura, pH, humedad, nutrientes, contenido de materia orgánica y aceptores de electrones) (Gavrilesco, 2005). En cambio, la optimización de los procesos fisicoquímicos, por lo regular, sólo depende de las propiedades y características intrínsecas del suelo (US-EPA, 2005).

El desarrollo de tecnologías de remediación de suelos contaminados con plaguicidas (Tabla 6) demuestra la constante innovación de los métodos para remediar suelos contaminados tanto industriales, como urbanos y agrícolas.

A pesar de que se han desarrollado diferentes tratamientos de remediación de suelos contaminados con DDT, aún existe, en algunos casos, el desconocimiento de los mecanismos de degradación del DDT: principalmente, en el tratamiento de suelos, debido a que esta matriz ambiental es compleja y diferente en cada sitio. Es decir, las características químicas, las propiedades físicas y la ecología microbiana de los suelos difieren de un sitio a otro. Pese a estas diferencias, la degradación del DDT en suelos se ha logrado por procesos bióticos o abióticos (Cao y col., 2012; Castelo-Grande y col., 2010; Ghazali y col., 2010; Li y col., 2010; Verma y col., 2014).

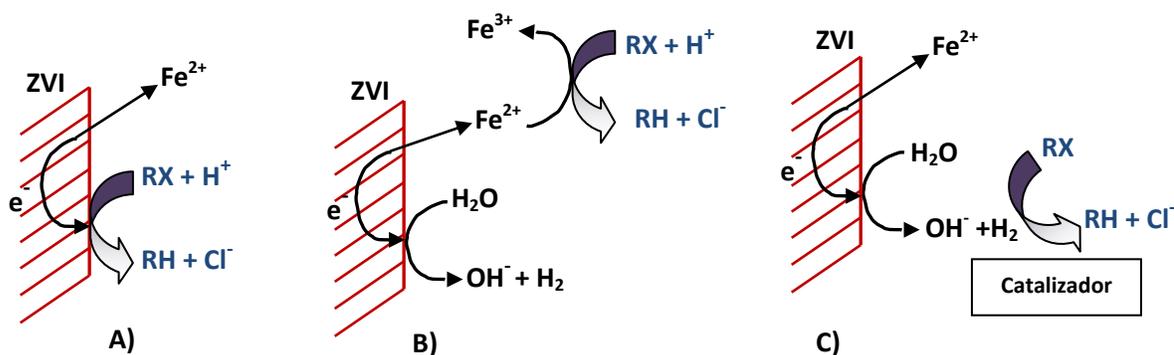
A continuación, se presenta el estado del arte de tres tecnologías de remediación de suelos consideradas relevantes para sustentar, argumentar, justificar y desarrollar el presente trabajo de investigación. Las tecnologías de remediación descritas en este apartado son la deshalogenación reductiva por HCV (sección 3.1), deshalogenación reductiva inducida por bacterias reductoras de hierro (sección 3.2) y bioestimulación (sección 3.3). Para finalizar en la sección 3.4 se muestra la estrategia de remediación planteada para el suelo contaminado del sitio “Tekchem”.

### **3.1. Degradación por hierro cero valente**

Numerosos estudios (Amir y Lee, 2011; Chiu y Reinhard, 1996; Sayles y col., 1997; You y col., 1996) han reportado la utilización de agentes reductores para

favorecer el proceso de deshalogenación reductiva en condiciones anaerobias: entre ellos destaca el uso del HCV. El HCV se ha reportado como un excelente donador de electrones y tiene la capacidad de reducir un amplio número de compuestos clorados como tetracloruro de carbono, tricloroetano, tricloroetileno, pentaclorofenol y percloroetileno, entre otros) (Junyapoon, 2005; Saha y Sinha, 2015). Además, se ha utilizado para tratar diversos plaguicidas organoclorados (DDT, Aloclor, metolaclor, atrazina, clorpirifus) en agua, suelos y sedimentos. La ventaja del uso del HCV sobre otros tratamientos fisicoquímicos reside, principalmente, en su alta efectividad y su bajo costo de implementación. Este tratamiento produce un bajo impacto ambiental debido a que el proceso genera oxihidroxidos de hierro (III), que tienen una baja solubilidad en agua (El-Temsah y col., 2016; Han y col., 2016; Junyapoon, 2005).

La deshalogenación reductiva por el hierro cero valente involucra la corrosión del metal para que este funcione como donador de electrones. Se han reportado 3 posibles mecanismos de deshalogenación reductiva (Figura 5) (Matheson y Tratnyek, 1994).



**Figura 5.** Mecanismo de deshalogenación por oxidación del hierro cero valente. Deshalogenación primaria (A), secundaria (B) e indirecta (C).

1. Deshalogenación primaria: Este mecanismo muestra que la reacción de deshalogenación de los plaguicidas se produce directamente sobre la superficie del HCV. En este caso, se genera la oxidación del Fe(0) a Fe (II) y la liberación de 2 electrones que producen la deshalogenación reductiva de los plaguicidas en presencia de un protón ( $H^+$ ) (Figura 5a). Además, el Fe(II) liberado de la superficie del HCV reacciona con  $OH^-$  para producir  $Fe(OH)_2$ . En presencia de oxígeno, el  $Fe(OH)_2$  se oxida a compuestos de hierro (III) poco solubles.

2. Deshalogenación secundaria: este mecanismo indica que la reacción de deshalogenación se produce por la oxidación del Fe(II) soluble. El Fe(II) es liberado de la superficie del HCV, cuando este es oxidado por una molécula de agua en medio ácido (Figura 5b). En este caso, la deshalogenación reductiva del plaguicida se produce por el acoplamiento de la oxidación del Fe(II) a Fe(III). El Fe(III) generado puede a su vez precipitar como oxihidróxidos de hierro (III) a pH mayores de 7 en condiciones ambientales.

3. Deshalogenación indirecta: este mecanismo indica que la reacción de deshalogenación se genera independientemente de la oxidación del HCV o del Fe(II). En este caso, la deshalogenación del plaguicida depende de la producción de hidrógeno, formado por la corrosión del hierro con el agua, y de la presencia de un catalizador (zinc, platino, paladio, entre otros) (Figura 5c). El hidrógeno adsorbido en la superficie del catalizador, produce la reacción de hidrogenación catalítica del plaguicida.

Los productos de oxidación del HCV son principalmente oxihidróxidos de hierro (III) (gohetita, lepidocrocita y magnetita). En condiciones atmosféricas, estos

productos tienden a precipitar y acumularse en los suelos o en los sedimentos en forma inocua, debido a su baja solubilidad y reactividad (Furukawa y col., 2002; Gunawardana y col., 2011; Keum y col., 2004).

Para el caso específico del DDT (Tabla 7), diversos estudios (Gautam y Suresh, 2006; Ghazali y col., 2010; Ukisu, 2008; Yang y col., 2010) han demostrado que la deshalogenación reductiva por efecto de la oxidación de HCV genera principalmente una transformación parcial del DDT, independientemente del mecanismo de deshalogenación que se lleve a cabo (primaria, secundaria o indirecta). La degradación completa de DDT sólo se ha reportado en sistemas bimetalicos (paladio/magnesio, níquel/aluminio) (Engelmann y col., 2001; Gautam y Suresh, 2006; Ukisu, 2008).

Los estudios mostrados en la Tabla 7, indican que el DDT se transforma principalmente en DDD durante el proceso de deshalogenación reductiva con HCV, aunque también se ha reportado la presencia de otros productos intermediarios como DDMU, DDNS, DDOH, DBH, DBP y DPE (Foght y col., 2001; Purnomo y col., 2011; Sayles y col., 1997). El HCV se ha utilizado en tamaños de micropartículas y nanopartículas para tratar matrices ambientales (agua, suelos y sedimentos). En los últimos años, el uso de nanopartículas de HCV se ha acrecentado, debido a que este tamaño de partícula favorece el proceso de deshalogenación reductiva del DDT por tener una mayor superficie de contacto. La cantidad de HCV empleada en estudios de suelos contaminados es del 2 al 20% (peso/peso), mientras que los tiempos de tratamiento reportados son de 2 a 40 días (Cao y col., 2010; Ghazali y col., 2010; Yang y col., 2010).

**Tabla 7.** Estudios de degradación de DDT con HCV y sistemas bimetálicos.

<b>Sistema metálico</b>	<b>Matriz evaluada</b>	<b>Producto de degradación</b>	<b>Referencia</b>
Micro Fe <sup>0</sup>	Agua	DDD, DDMU y DDOH	Sayles y col., 1997
Micro Fe <sup>0</sup>	Suelos	DDD	Satapanajaru y col., 2006
Micro Fe <sup>0</sup>	Sedimentos	DDD	Eggen y Majcherczyk, 2006
Micro Fe <sup>0</sup>	Suelos	DDD <sup>a</sup>	Yao y col., 2006
Micro Fe <sup>0</sup>	Agua	NI	Boussahel y col., 2007
Micro Fe <sup>0</sup>	Suelos	DDD	Yang y col, 2010
Micro Fe <sup>0</sup>	Suelos	NI	Cong y col., 2010
Micro Fe <sup>0</sup>	Suelos	DDD <sup>a</sup>	Ghazali y col., 2010
Micro y nano Fe <sup>0</sup>	Agua	DDD, DDMS y DDNS	Kang y col., 2016
Nano Fe <sup>0</sup>	Agua	DPE (difenil etano)	Poursaberi y col., 2014
Nano Fe <sup>0</sup>	Suelos	DDD	Singh y Bose , 2015
Nano Fe <sup>0</sup>	Suelos	DDE y DDD	El-Temsah y col., 2016
Nano Fe <sup>0</sup>	Suelos	DDD <sup>a</sup>	Han y col., 2016
Mg <sup>0</sup> -Pd	Agua-acetona	Degradación completa	Engelmann y col.,2001
Mg <sup>0</sup> -Zn, Mg <sup>0</sup> -Ni	Agua-acetona	DDNS	Gautam y Suresh, 2006

a. Acumulación inicial de DDD con posterior degradación a otros compuestos no especificados;  
NI. No identificado

### 3.2. Degradación por desasimilación de hierro (III)

Estudios recientes (Tabla 8) han demostrado que la reducción del Fe(III) a Fe(II) por bacterias reductoras de hierro (BRH) induce un proceso abiótico de deshalogenación reductiva del DDT (Figura 6). La desasimilación de óxidos de

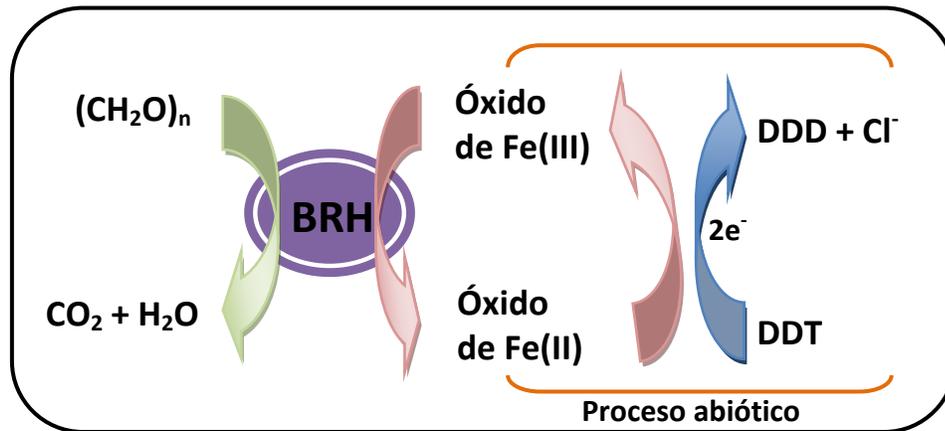
hierro (III), generada por la actividad de BRH, es un ejemplo clásico de lo que se conoce como respiración anaerobia y ha sido ampliamente documentada (Lovley, 1997; Lovley y col., 2004). Las BRH utilizan los compuestos de Fe(III) como aceptores de electrones en condiciones anóxicas, lo que origina la reducción del Fe(III) a Fe(II). Entre las BRH más estudiadas se encuentran las *Geobacter*, *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens*, *Desulfuromonas* y *Pyrobaculum* (Lovley, 1997; Lovley y col., 2004).

**Tabla 8.** Estudios de degradación de DDT por desasimilación de hierro (III).

Donador/aceptor de electrones	Bacteria reductora de hierro	Matriz evaluada	Productos de degradación	Referencia
Lactato de sodio / goethita ( $\alpha$ -FeOOH)	<i>Shewanella decolorationis</i> S12	Agua	DDD, DDMS y DBP	Li y col., 2010
Glucosa / Hierro (III) en solución	<i>Aeromonas hydrophila</i> HS01	Agua	DDD, DDMS, DDNS y DDOH	Cao y col., 2012
Lactato, glucosa / Minerales de hierro del suelo	<i>Sedimentibacter</i> , <i>Clostridium</i> y <i>Desulfuromonas</i>	Suelo	DDD, DDMS y DBP	Chen y col., 2012
Lactato de sodio / goethita ( $\alpha$ -FeOOH)	<i>Shewanella putrefaciens</i> 200	Agua	DDD, DDE y DDMU	Jin y col., 2015
Ác Láctico, Ác propiónico / goethita ( $\alpha$ -FeOOH)	Microorganismos naturales del suelo	Suelo	DDD, DDE y DDMU	Liu y col., 2016

El primer estudio donde se reportó el mecanismo de degradación del DDT por BRH fue el realizado por Li y col. (2010) (Figura 6). Este mecanismo demuestra que la deshalogenación reductiva del DDT se produce de forma abiótica inducida por la formación biogénica de Fe(II). En donde, el DDT sufre una reacción redox con Fe(II) (donador de electrones). El DDT se transforma en primera instancia a DDD y, posteriormente, a DDMS, DDOH y DBP (Li y col., 2010; Cao y col., 2012).

En estos casos, la deshalogenación reductiva del DDT es un proceso abiótico, debido a que el DDT no es en realidad un aceptor terminal de electrones en una vía bioenergética. El estudio realizado por Li y col. (2010) se efectuó en fase acuosa empleando óxido de hierro (III).



**Figura 6.** Mecanismo de degradación de DDT inducido por la desasimilación del hierro (III), propuesto por Li y col. (2010).

En el estudio realizado por Li y col. (2010), se señala que los óxidos de hierro (III), actúan como aceptores de electrones en la respiración anaerobia de las BRH y como mediador de electrones. En este último punto, estos autores mencionan que los óxidos de hierro (III) pueden actuar como catalizadores, cuando sobre su superficie existe un incremento de la densidad electrónica por efecto de la sorción de metales divalentes (Cu, Mg, Fe, entre otros). Este efecto causa que la superficie del mineral funcione como un agente mediador de electrones para que se produzca la deshalogenación reductiva del DDT.

Estudios posteriores contribuyeron a fundamentar el mecanismo de degradación de DDT inducido por desasimilación del Fe(III) (Tabla 8). Cao y col., 2012 estudiaron la degradación del DDT empleando HCV, BRH y antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS). El estudio demostró que el empleo de *Aeromonas hydrophila*

(BRH) incrementó la degradación de DDT en hasta en un 83% en comparación con el 67% al emplear solo HCV. En tanto que en el sistema HCV +BRH + AQDS se obtuvo la mayor degradación de DDT (94%). Estos autores mencionan que las BRH promovieron la remoción de la capa de óxidos de hierro (III) en las partículas de HCV, lo que generó una disminución de su pasivación; mientras que la AQDS incrementó la tasa de reducción de Fe (III) a Fe(II) dando como resultado un incremento en la transformación del DDT. Por su parte, Chen y col. (2012) evaluaron el mecanismo de degradación del DDT por BRH en dos diferentes suelos utilizando glucosa y lactato como fuente de carbono y energía y AQDS como mediador redox. Estos autores observaron que el uso de glucosa y lactato propició el aumento de poblaciones de bacterias reductoras de hierro en ambos suelos, generando un incremento en la tasa de degradación de DDT. La mayor degradación de DDT (99%) se registró en el sistema glucosa + AQDS.

Liu y col. (2016) evaluaron la degradación de DDT en suelos naturales (tipo acrisoles), empleando goethita ( $\alpha$ -FeOOH) como aceptor de electrones y ácidos grasos como fuente de carbono y energía (donador de electrones). Estos autores demostraron que el uso de goethita y AGVs como el ácido propiónico y ácido láctico, es una estrategia eficiente para mejorar la degradación de DDT en suelos de acuerdo al mecanismo reportado por Li y col. (2010) (Figura 6). La mayor degradación de DDT (92%) se registró en el sistema ácido propiónico + gohetita.

### **3.3. Degradación por bioestimulación**

El término "bioestimulación" implica la modificación del sistema a remediar con el objetivo de estimular la actividad de los microorganismos autóctonos. Esto puede

realizarse mediante la adición de nutrientes, aceptores de electrones, donadores de electrones u otros compuestos capaces de acelerar la velocidad de degradación de los contaminantes.

El objetivo principal de la bioestimulación es favorecer el crecimiento y la actividad de microorganismos con capacidades metabólicas para degradar los contaminantes objetivo. El empleo de donadores de electrones (cosustratos orgánicos) es una de las técnicas de bioestimulación más empleadas para este propósito. Diferentes cosustratos orgánicos con estructuras moleculares similares o no al DDT se han evaluado para lograr la su degradación (Verma y col., 2014). Los cosustratos evaluados se agrupan en dos categorías: i) compuestos aromáticos (difenilmetano, benzhidrol, 4-chlorobenzhydrol, bifenilo, 4-clorobifenilo, 1-difeniletano, tolueno, entre otros (Alexander, 1981; Nadeau y col., 1994; Park y col., 2003) y ii) compuestos no aromáticos (acetato, lactato, glicerol, peptona, extracto de levadura, triptona y soya (Aislabie, 1997; Bidlan y col., 2002; Foght y col., 2001). De los compuestos mencionados, el tolueno y el glicerol han sido reportados para mejorar la degradación del DDT en suelos contaminados (Bidlan y col., 2002; Ortiz y col., 2013), por lo que ambos compuestos fueron seleccionados para ser evaluados en el presente trabajo.

El tolueno en fase gaseosa se ha utilizado como cosustrato para favorecer la degradación de tricloroetileno por cometabolismo (McCarty y col., 1998). Dichos autores fueron los primeros en evaluar la inyección de pulsos de tolueno en suelos contaminados *in situ* a nivel de campo para degradar tricloroetileno. Por otra parte, el uso del tolueno como cosustrato para degradar DDT por bioestimulación en suelos, sólo se ha reportado en un estudio a nivel laboratorio (Ortiz y col., 2013).

En dicho estudio, desarrollado por el grupo de trabajo de la UAMC, se demostró que el uso de tolueno en fase gaseosa favorece la degradación de DDT, DDD y DDE en condiciones aerobias. El tolueno se adicionó en forma dosificada (1  $\mu$ L cada 7 días) a los sistemas experimentales que contenían 3g de suelo contaminado. La cantidad total de tolueno adicionado a los sistemas experimentales fue de 1.4 a 3.3 mgC/g<sub>suelo</sub>. En este estudio se evaluó un suelo contaminado con DDX procedente de una zona palúdica de Chiapas.

El glicerol también se ha reportado como un cosustrato adecuado para favorecer la completa degradación del DDT en suelos contaminados en condiciones aerobias al emplear microorganismos aclimatados (Bidlan y col., 2002; Golovleva y col., 1980). Quensen y col. (2001) reportaron la degradación de DDE en sedimentos, utilizando glicerol como cosustrato en sistemas experimentales en condiciones anóxicas. Sin embargo, estos autores no reportaron el mecanismo degradación.

No obstante y a pesar de que el tipo de cosustrato a utilizar es de gran importancia para lograr la degradación del DDT, existen otras variables que inciden en la eficiencia del proceso, como son la capacidad metabólica de los microorganismos, las condiciones redox, humedad, temperatura y el pH, entre otros factores (Bidlan y col., 2002; Ortiz y col., 2013). En este sentido, es importante mencionar que la viabilidad de la técnica de bioestimulación depende de diversas variables y no siempre puede ser aplicado con éxito en todos los sitios contaminados. Por esta razón, el tratamiento de bioestimulación debe ser evaluado en cada sitio contaminado. Este método de tratamiento puede realizarse tanto *in situ* como *ex situ*.

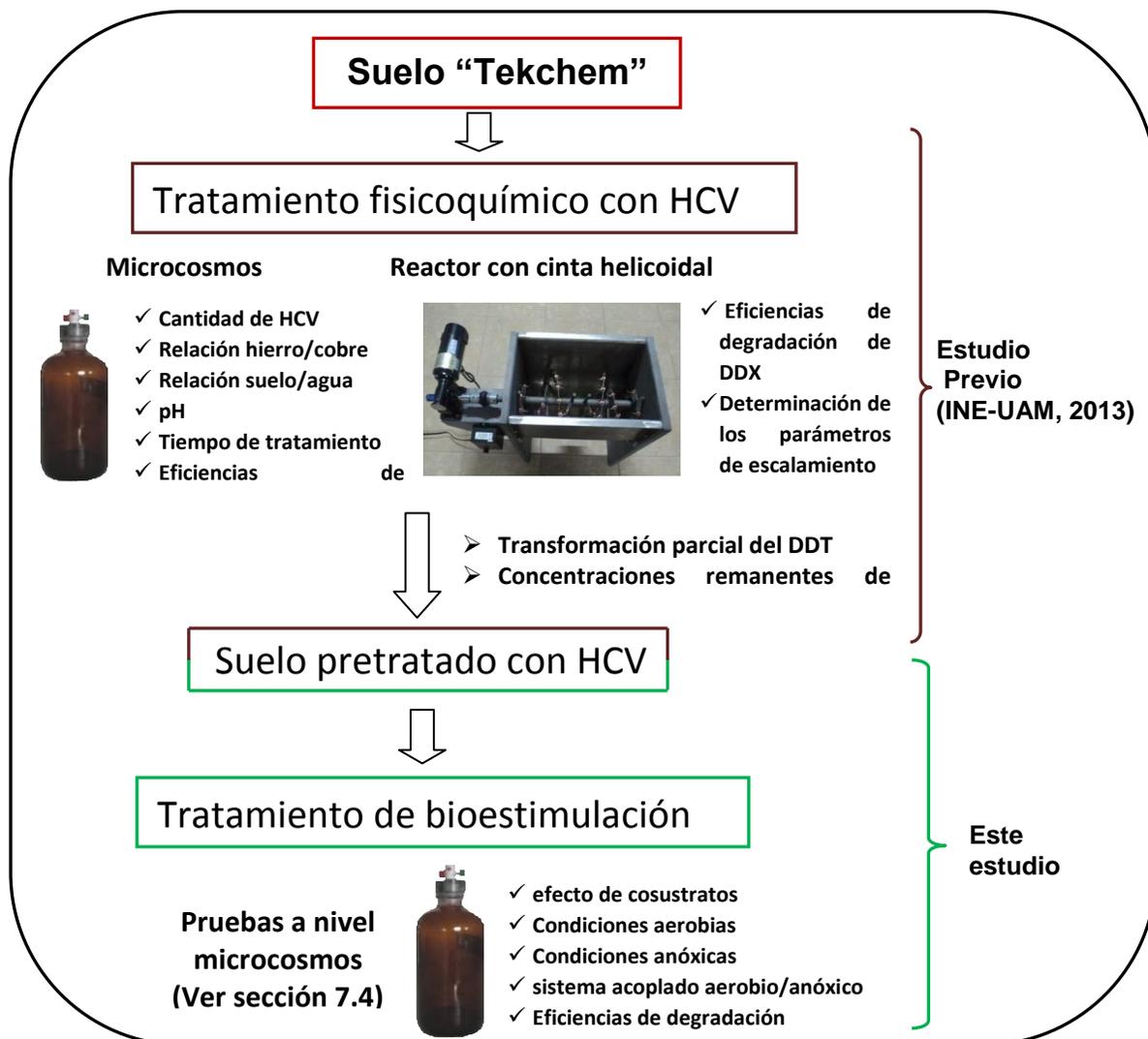
### **3.4. Planteamiento de la estrategia de remediación para el suelo contaminado del sitio “Tekchem”.**

La estrategia de remediación para el suelo contaminado del sitio “Tekchem” se planteó con base en las experiencias adquiridas por el grupo de trabajo y a la información científica actual sobre los avances que se han tenido con estas tecnologías a nivel internacional. La estrategia seleccionada se dividió en dos etapas (Figura 7): la primera etapa fue el uso de un tratamiento fisicoquímico con HCV reportado previamente (INE-UAM, 2013); la segunda etapa fue el uso de un tratamiento de bioestimulación de las poblaciones microbianas autóctonas del suelo. El desarrollo de la segunda etapa del proyecto es la parte donde se enfocó el presente trabajo de tesis.

En la primera etapa del proyecto, se demostró que el tratamiento con HCV fue efectivo, principalmente, para transformar el DDT a 2,2 bis(*p*-clorofenil) etano (DDNS) (INE-UAM, 2013). Este estudio inició con los experimentos a nivel microcosmos (3g de suelo), con la finalidad de definir los mejores parámetros del tratamiento (pH, cantidad de hierro, relación de hierro/cobre, relación suelo/agua y tiempos de tratamiento). Posteriormente, se evaluó el tratamiento a escala de banco (2 kg de suelo) para determinar la eficiencia de degradación de DDX a esta escala y establecer los criterios de escalamiento del proceso (Figura 7). Los resultados de este tratamiento, dieron la pauta para desarrollar la segunda etapa del proyecto: la evaluación de un tratamiento biológico (bioestimulación) para eliminar los compuestos intermediarios acumulados y el DDT remanente en el suelo pretratado con HCV. Para este propósito, se planteó utilizar diferentes cosustratos orgánicos para promover el tratamiento de bioestimulación. Este

tratamiento tiene la finalidad de incrementar el crecimiento y la actividad de los microorganismos autóctonos del suelo para promover la degradación de los contaminantes objetivos.

En este sentido, el presente trabajo de investigación doctoral es parte del desarrollo integral de una estrategia de remediación para el sitio “Tekchem” (Figura 7).



**Figura 7.** Estrategia de remediación para el suelo contaminado del sitio “Tekchem”.

**4. JUSTIFICACIÓN**

**5. HIPÓTESIS**

**6. OBJETIVOS**

## 4. JUSTIFICACIÓN

En México existen sitios contaminados con DDX como consecuencia de la producción, almacenamiento, uso y mala disposición final de estos compuestos. Uno de estos sitios es la exfábrica de plaguicidas y fertilizantes “*Tekchem*”. El análisis de muestras del suelo del sitio ha constatado concentraciones de DDX mayores a 20 ppm, es decir, niveles que pueden ocasionar problemas de salud pública y ambiental, de acuerdo con la normatividad internacional, por lo que el suelo requiere medidas de remediación.

A pesar de que existen tecnologías de remediación para suelos contaminados por plaguicidas, disponibles en el mercado internacional, éstas tienen una baja posibilidad de implementación en nuestro país, dado sus altos costos de inversión y operación. Por otra parte, en México, existe un limitado avance científico y tecnológico en materia de remediación de suelos contaminados con DDX.

De acuerdo con lo anterior, es importante contribuir con el desarrollo de estudios que permitan generar alternativas de tratamientos de remediación de sitios contaminados. El interés de este trabajo de tesis es establecer las bases de una estrategia de remediación para el sitio contaminado denominado “*Tekchem*”.

En este sentido, el presente estudio contribuirá al conocimiento de los mecanismos de degradación de los DDX involucrados, al evaluar el proceso de bioestimulación de los microorganismos nativos del suelo en condiciones aerobias y anóxicas, mediante el uso de un cosustrato. Además, se busca demostrar la importancia de emplear un tratamiento fisicoquímico y biológico acoplado para sanear el suelo.

## **5. HIPÓTESIS**

La estimulación de las capacidades metabólicas de los microorganismos autóctonos del suelo, mediante el uso de cosustratos orgánicos, favorecerá la degradación del DDT y sus intermediarios en condiciones aerobias y anóxicas.

## **6. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto del uso de diferentes cosustratos orgánicos sobre la degradación del DDT y sus intermediarios en condiciones aerobias y anóxicas, e identificar los mecanismos de degradación de los DDX.

### **Objetivos particulares**

- Realizar la caracterización fisicoquímica del suelo pretratado con HCV.
- Evaluar el efecto de los cosustratos orgánicos en la degradación de los DDX en condiciones aerobias y anóxicas, utilizando el suelo pretratado con HCV.
- Determinar la composición microbiana del suelo, antes y después de los tratamientos, mediante técnicas de biología molecular.
- Proponer los mecanismos de degradación de los DDX, en función de las capacidades metabólicas de los microorganismos autóctonos.
- Evaluar los mecanismos de degradación de los DDX utilizando el suelo original (sin tratamiento de HCV).

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Suelo original

La muestra de suelo, denominada original, fue colectada de la exfábrica de plaguicidas y fertilizantes “Tekchem”, en 2013. La muestra fue homogenizada y tamizada a un tamaño de partícula menor de 0.42 mm. La muestra de suelo contenía principalmente DDT, DDD y DDE en concentraciones de  $22.5 \pm 2.1$ ,  $3.36 \pm 0.3$  y  $3.14 \pm 0.4$  mg/kg<sub>suelo</sub>, respectivamente. Entre las principales características fisicoquímicas del suelo, destacan el valor de pH (pH ~4.45), la textura (franco arenoso), la concentración de sulfato ( $13.0 \pm 0.8$  mg/g<sub>suelo</sub>), la concentración de hierro ( $13.2 \pm 2.2$  mg/g<sub>suelo</sub>) y la cantidad de materia orgánica (0.13%). Otras características del suelo se presentan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Caracterización del suelo.

Parámetro	Valor	Elemento	Valor (mg/Kg <sub>suelo</sub> )
CE (dSm <sup>-1</sup> )	1.24	N	14.6
CIC [Cmol(+)Kg <sup>-1</sup> ]	16.2	P	161.43
CC (%)	18.6	K	918
Dap (tm <sup>-3</sup> )	1.12	Ca	4366
ARENA (%)	60.9	Mg	491
LIMO (%)	30.7	Zn	2.65
ARCILLA (%)	8.4	Mn	47.62
TEXTURA	Franco Arenoso		

Resultados del laboratorio central de suelos de la Universidad Autónoma Chapingo.

CE: Conductividad Eléctrica; CIC: Capacidad de intercambio catiónico.

CC: Contenido de humedad a capacidad de campo; Dap: Densidad aparente

### 7.2. Suelo pretratado con hierro cero valente

Se denomina suelo pretratado, al suelo que fue tratado con HCV para disminuir las concentraciones iniciales de DDT, DDD y DDE. El tratamiento fisicoquímico con

HCV se realizó a escala de banco en un reactor de 21 L provisto de una cinta helicoidal horizontal en lámina de acero inoxidable que contenía rondanas de cobre. El propósito del uso del cobre fue promover la corrosión galvánica del HCV en el sistema. La prueba se realizó con 2 kg de suelo (tamaño de partícula menor a 0.54 mm), 1.6 L de agua destilada y 10% (p/p) de HCV en polvo (tamaño de partícula de 45µm). El tiempo de tratamiento de la prueba fue de 4 días. Posteriormente, el suelo fue secado a temperatura ambiente por 8 días, tamizado y almacenado. Las concentraciones de los DDX (mg/kg<sub>suelo</sub>) después del tratamiento con HCV fueron de  $2.9 \pm 1.2$ , para el DDT;  $2.1 \pm 0.4$ , para el DDE y  $1.1 \pm 0.3$ , para el DDD (ver figura A1, anexo A).

### **7.3. Medio mineral**

Como medio mineral (MM) se utilizó un fertilizante comercial (Triple 17®, Nutrimentos Minerales de Hidalgo, México), con un contenido de 17% nitrógeno (N), 17% fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y 17% potasio (K<sub>2</sub>O). La cantidad utilizada de fertilizante fue de 0.6 g/L por cada sistema experimental evaluado.

### **7.4. Sistemas experimentales**

Los experimentos de bioestimulación se realizaron con diferentes cosustratos aromáticos (difenilmetano y tolueno), no aromáticos (glicerol, ácido láctico, glucosa, etanol) y bagazo de caña como un material lignocelulósico. El difenilmetano y tolueno fueron seleccionados para mejorar el crecimiento y actividad de microorganismos con capacidad metabólica para degradar compuestos aromáticos, entre ellos los DDX. El difenilmetano es un compuesto que se utiliza de forma frecuente, como cosustrato, para fomentar el

cometabolismo del DDT, dada su similitud estructural con el compuesto objetivo (Foght y col., 2001). En tanto, que el tolueno se ha reportado como cosustrato que puede mejorar el crecimiento y actividad de microorganismos nativos del suelo que tienen capacidad de metabolizar los DDX (Ortiz y col., 2013).

Los cosustratos no aromáticos (glicerol, ácido láctico, glucosa, etanol) se evaluaron para fomentar el posible crecimiento de bacterias reductoras de hierro, que producen la reducción del Fe(III) a Fe(II) e inducen la deshalogenación reductiva abiótica del DDT (Li y col., 2010). La propuesta de evaluar el bagazo de caña como cosustrato, en condiciones anóxicas, fue con la finalidad de utilizar un material que al hidrolizarse y fermentar genera compuestos reducidos (ej. AGVs) que pueden servir para favorecer el proceso de bioestimulación.

Los experimentos de bioestimulación, aerobios y anóxicos, se realizaron con 3 g de suelo, con una relación de suelo/agua 1:1, y con MM (0.6 g/L) en frascos ámbar de 240 mL cerrados herméticamente con válvulas mininert (Valco Instruments Co. EE.UU.) que permiten la obtención de muestras gaseosas (Figura 8).



**Figura 8.** Sistemas experimentales.

El pH del suelo se ajustó a un valor de 7 en cada sistema experimental con 40  $\mu\text{L}/\text{g}_{\text{suelo}}$  de una solución del 5% de NaOH. Las condiciones de incubación de todos los sistemas evaluados fueron de 30°C y 100 rpm. Los sistemas se purgaron con aire y nitrógeno para llevar a cabo los experimentos en condiciones aerobias y anóxicas, respectivamente. Los experimentos se desarrollaron durante 20, 30, 40 y 60 días. En cada tiempo de tratamiento se sacrificaron dos muestras de los controles (sin cosustrato) y dos muestras de los experimentos con cosustrato para cuantificar los DDX. Sistemas experimentales adicionales con y sin cosustrato fueron utilizados para determinar las concentraciones de sulfato, hierro y ácidos grasos volátiles en cada uno de sistemas tratados. Los experimentos se realizaron por duplicado.

En los sistemas experimentales en condiciones aerobias y anóxicas se evaluaron diferentes cosustratos orgánicos (difenilmetano, tolueno, glicerol, ácido láctico, glucosa, etanol y bagazo de caña). Con excepción del bagazo de caña (material no esterilizado), todos los demás cosustratos utilizados fueron grado analítico con pureza del 99%. El bagazo de caña se obtuvo del ingenio azucarero Emiliano Zapata, ubicado en Zacatepec, Morelos. El bagazo utilizado fue previamente secado y tamizado a un tamaño de partícula menor de 4.76 mm (tamiz No. 4).

La adición de tolueno en los sistemas experimentales se realizó en forma de pulsos discontinuos de 1  $\mu\text{L}$  ( $0.270 \text{ mgC}/\text{g}_{\text{suelo}}$ ), adicionados cada 7 días, durante 60 días en los tratamientos en condiciones aerobias. La concentración total de tolueno adicionado a los 60 días fue de  $\sim 2.4 \pm 0.1 \text{ mgC}/\text{g}_{\text{suelo}}$ . Para el caso, de los experimentos en condiciones anóxicas sólo se efectuaron dos adiciones de tolueno, debido a que en estos sistemas se registró un bajo consumo de este

sustrato a través del tiempo.

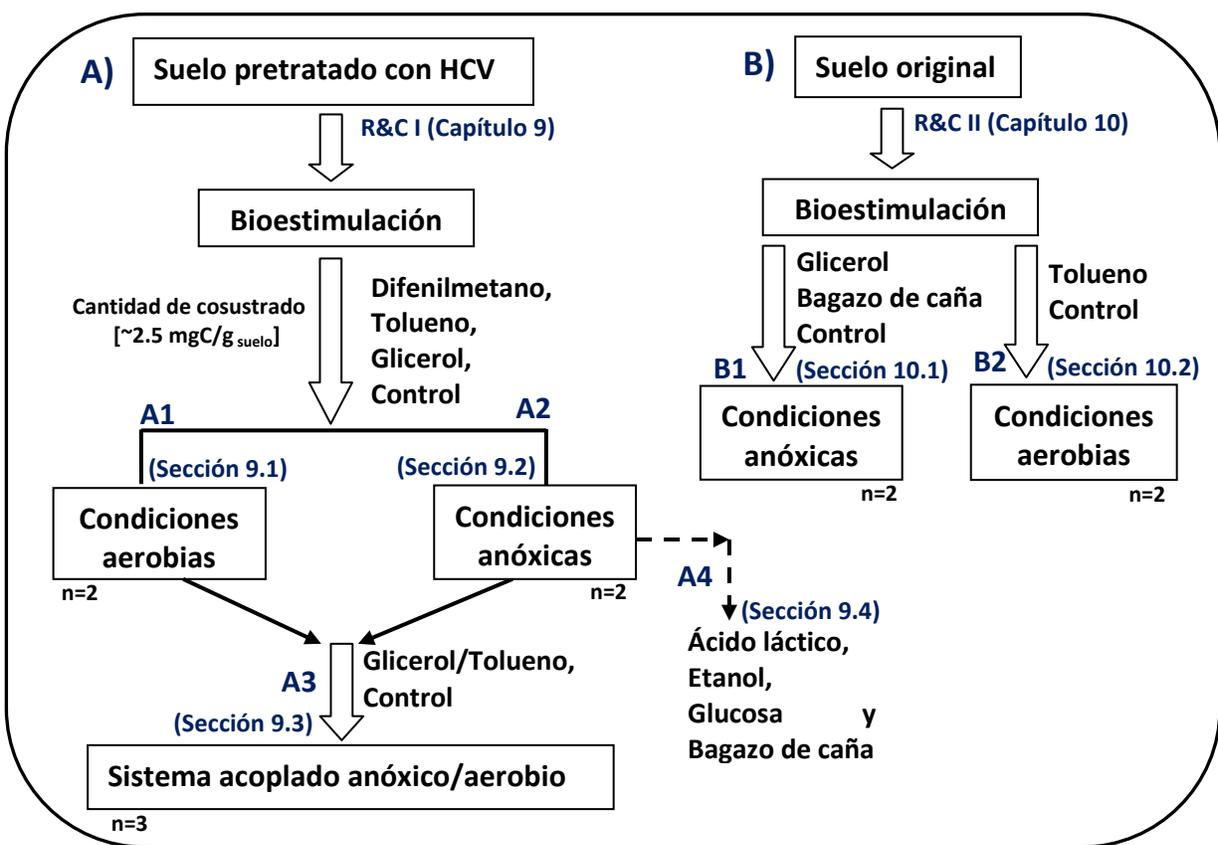
La adición de difenilmetano, glicerol, ácido láctico, glucosa y etanol en los sistemas experimentales se realizó en una sola dosis al inicio del tratamiento (tiempo cero). Cada cosustrato se evaluó por separado en condiciones aerobias o anóxicas. La cantidad adicionada de cosustrato fue de  $2.5 \pm 0.1$  mgC/g<sub>suelo</sub>. Con excepción del glicerol, todos los demás compuestos se adicionaron directamente a los sistemas experimentales. Para el caso del glicerol, este se mezcló con agua (0.3 mL) y, posteriormente, fue adicionado a los sistemas experimentales mediante una jeringa. La cantidad de bagazo de caña utilizado, fue de 2.5, 5 y 10% (peso/peso). Es decir, se adicionó 0.075, 0.15 y 0.3 g de bagazo por cada 3 g de suelo, respectivamente. El bagazo sólo se evaluó en condiciones anóxicas para soportar el crecimiento de bacterias sulfato reductoras.

Se usaron controles experimentales por duplicado para determinar la producción endógena de CO<sub>2</sub> y la degradación de los DDX atribuida a procesos bióticos o abióticos generados en el suelo sin el uso de cosustratos. Los controles (sin cosustrato) se evaluaron en las mismas condiciones que los sistemas con cosustrato.

La mineralización teórica en los sistemas experimentales se determinó restando al valor de la producción total de CO<sub>2</sub> el valor obtenido de la respiración endógena y considerando una mineralización completa los cosustratos.

En la Figura 9 se presenta, en forma de diagrama, los experimentos de bioestimulación realizados en este estudio, los cuales fueron divididos en dos etapas experimentales: A) con el suelo pretratado con HCV y B) con el suelo original (sin tratamiento con HCV). Los resultados y conclusiones (R&C) de los

experimentos A y B se muestran en los capítulos 9 y 10, respectivamente.



**Figura 9.** Esquema de los experimentos de bioestimulación establecidos para determinar las eficiencias y los mecanismos de degradación de DDX en condiciones aerobias y anóxicas en el suelo pretratado con hierro (fase experimental A) y en el suelo original (fase experimental B).

Los experimentos con el suelo pretratado con HCV (A) se dividieron en cuatro bloques: Los bloques experimentales A1 y A2, se realizaron con la finalidad de determinar los mecanismos de degradación de los DDX que se originan en condiciones aerobias y anóxicas, utilizando difenilmetano, tolueno y glicerol como cosustratos; A3, en este bloque experimental se realizó el acoplamiento de los mecanismos de degradación propuestos en el bloque A1 y A2, mediante un sistema anóxico/aerobio utilizando glicerol y tolueno, respectivamente. En este caso, se empleó primero glicerol ( $2.5 \pm 0.1 \text{ mgC/g}_{\text{suelo}}$ ) en condiciones anóxicas durante 20 días y, posteriormente, se utilizó tolueno (pulsos de  $0.270 \text{ mgC/g}_{\text{suelo}}$ ,

adicionado cada 7 días) durante 40 días en condiciones aerobias. Este experimento se realizó por triplicado; A4, en este bloque se evaluó solamente el mecanismo anóxico de degradación de DDX con cosustratos no aromáticos diferentes al glicerol, tales como ácido láctico, etanol, glucosa, así como un material lignocelulósico (bagazo de caña).

Los experimentos (B), se realizaron para determinar las eficiencias de degradación de los DDX que se consiguen, en el suelo original, al fomentar los mecanismos de degradación de DDX propuestos en la fase experimental A (suelo pretratado con HCV). Los experimentos con el suelo original se dividieron en dos bloques: B1, utilización del tolueno en condiciones aerobias; B2, uso del glicerol y bagazo de caña en condiciones anóxicas. Estos cosustratos y sus condiciones de tratamiento fueron seleccionados de acuerdo a las eficiencias de degradación registradas en la fase experimental A.

Los experimentos de degradación del DDT, empleando el suelo original, se realizaron en las mismas condiciones experimentales en las que se evaluó el tratamiento de bioestimulación con el suelo pretratado con HCV. Es importante resaltar que, en el suelo original, no hay presencia de DDNS, dado que este compuesto fue un subproducto de degradación generado en el suelo tratado con HCV.

Es importante mencionar que los experimentos con el suelo original se realizaron con el propósito de determinar la necesidad de hacer un pretratamiento fisicoquímico con HCV antes de realizar el proceso de bioestimulación.

## **7.5. Métodos analíticos**

### **7.5.1. Extracción de DDT y sus intermediarios**

La extracción de los residuos de DDT, DDD, DDE y DDNS del suelo se realizó por sonicación de acuerdo con el método 3550C (US-EPA, 2007a). La extracción de los DDX del suelo se realizó utilizando el contenido total del frasco (3g de suelo seco) y realizando 3 extracciones con 32 mL de n-hexano-acetona (1:1) cada una. La cantidad de solvente por muestra de suelo extraída fue de 96 mL. Los solventes utilizados fueron grado HPLC (Mallinckrodt, EE.UU.). El solvente de extracción de cada frasco se recuperó por filtración a través de un embudo con sulfato de sodio anhidro para eliminar cualquier resto de humedad y partículas de suelo. Las muestras se concentraron por rotaevaporación a 48°C, hasta obtener un volumen de 1 mL.

### **7.5.2. Cuantificación de DDT y sus intermediarios**

El análisis del DDT y sus intermediarios se realizó mediante un cromatógrafo gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) (Agilent Technologies, GC modelo 6890N y MSD modelo 5975B, EE.UU.) provisto de una columna capilar 5 MS (Agilent, EE.UU.), de acuerdo con el método US-EPA 8270D (US-EPA, 2007b). La temperatura del detector e inyector fueron de 250°C y 220 °C. La temperatura inicial de la columna fue de 90°C, la cual incrementó a 7°C/min hasta alcanzar la temperatura final de 250 °C. Como gas acarreador se utilizó helio de ultra alta pureza. El rango de escaneo del espectro de masas fue de 50 a 450 z/m a 70 eV. La identificación de los compuestos se realizó mediante la biblioteca NIST05 del equipo. La cuantificación del DDT, DDE y DDD se obtuvo

utilizando una curva de calibración de 7 puntos (1, 2, 5, 8, 10, 12, 15 ppm). El estándar comercial utilizado fue el US-112B (UltraScientific, EE.UU.). La curva de calibración se realizó por duplicado al inicio de cada uno de los bloques experimentales (ensayos con difenilmetano, tolueno, glicerol, glucosa y bagazo de caña). Posteriormente, un punto de la curva de calibración (10 ppm) se monitoreó por cada 15 muestras experimentales. La cantidad de muestra inyectada al equipo GC-MS fue de 1  $\mu$ L. La inyección de las muestras se realizó utilizando el automuestreador.

### **7.5.3. Cuantificación de dióxido de carbono**

La cuantificación de CO<sub>2</sub> se realizó con un cromatógrafo de gases (Gow Mac serie 550, EE.UU.) acoplado a un detector de conductividad térmica (TCD). La columna utilizada fue la CTR1 (Alltech, EE.UU.). Las condiciones de operación del equipo fueron 50°C, para el inyector; 115°C, para el inyector; 40°C, para la columna. Se utilizó helio como gas acarreador a un flujo de 60 mL/min. El volumen de inyección fue de 100  $\mu$ L. La inyección se realizó de forma manual. La producción de CO<sub>2</sub>, generada en los sistemas experimentales, se calculó restando la producción de CO<sub>2</sub> endógena generada en los controles.

### **7.5.4. Cuantificación de tolueno**

La cuantificación de tolueno se realizó mediante un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de flama (FID) (Agilent Technologies, modelo 5890, serie II, EE.UU.) y una columna HP624 (Agilent, EE.UU.). Los flujos de helio (gas acarreador), hidrógeno y aire fueron de 25, 40 y 250 mL/min. Las condiciones de temperaturas del equipo fueron 220°C, para el inyector; 120°C,

para el horno; 200°C, para el detector. El volumen de inyección de la muestra fue de 200 µL. La inyección se realizó de forma manual.

#### **7.5.5. Extracción y cuantificación de hierro (II)**

La extracción de Fe (II) se realizó tomando una alícuota de  $0.3 \pm 0.05$  g de suelo húmedo. La muestra se colectó en vasos precipitados previamente pesados. Posteriormente, se adicionó 5 mL de una solución de HCl 0.5 N y se dejó en agitación continua durante 1 hora. En seguida, se filtró el sobrenadante para realizar la determinación de la cantidad de Fe (II) soluble. El peso de la muestra del suelo seco fue determinado a partir del precipitado para reportar el resultado en peso seco. La cuantificación de Fe (II) se realizó mediante el método descrito por Sorensen (1982). Este método utiliza una solución de ferrozina (1 g/L) en ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2 etanosulfónico (HEPES, 50 mM). El Fe (II) soluble forma un complejo con la ferrozina que genera una coloración púrpura. La intensidad de la coloración es directamente proporcional a la concentración de Fe (II) y se mide por espectrofotometría. El procedimiento indica que 100 µL de la solución problema, previamente filtrada, se adicionan a 3 mL de la solución de ferrozina y se mezcla durante 1 minuto en un vórtex. Posteriormente, la solución se mide a una longitud de onda de 562 nm. Para realizar esta medición se utilizó el espectrofotómetro UV/VIS, Lambda 2 (Perkin Elmer, EE.UU.).

#### **7.5.6. Extracción y cuantificación de sulfato**

La extracción de sulfato se realizó utilizando  $2.7 \pm 0.05$  g de suelo seco y 50 mL de agua destilada a pH 7. La mezcla se dejó en agitación continua durante 1 hora. Posteriormente, una alícuota de la muestra (10 mL) se filtró y se guardó a 5°C

para su medición. La cuantificación de sulfato se realizó utilizando el método turbidimétrico reportado por la US-EPA (1986). Este método se basa en la formación de cristales de sulfato de bario en un medio ácido. La turbidez que genera el compuesto se mide por espectrofotometría a una longitud de onda de 420 nm.

#### **7.5.7. Determinación cualitativa de sulfuro de hidrógeno**

La determinación cualitativa de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) se realizó mediante tubos colorimétricos de detección de gases (Gastecs, EE.UU.) y una bomba de aspiración para tubos gastec (Gastecs GV-100, EE.UU.). El cambio de coloración de blanco a negro del reactivo de empaque del tubo, al aspirar 100 mL de muestra de gas, mostró la presencia del compuesto en el sistema.

#### **7.5.8. Extracción y cuantificación de ácidos grasos volátiles**

La extracción de los ácidos grasos volátiles (AGVs) se realizó utilizando 3 g de suelo seco (contenido total del frasco) y 10 mL de agua destilada a pH 5. La mezcla se dejó en agitación continua durante 1 hora. Después de este tiempo, se filtró una alícuota de 2 mL de la muestra y se guardó a 5°C para su posterior medición. La cuantificación de AGVs se realizó utilizando un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890, Series II, EE.UU.) equipado con un detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar AT-1000. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 130 y 200°C. La temperatura inicial del horno fue de 90°, la cual incrementó a una velocidad de 25°C/min hasta alcanzar una temperatura final de 200 °C. La inyección de las muestras (2  $\mu$ L) se realizó utilizando el automuestreador del equipo.

### **7.5.9. Caracterización mineralógica del suelo**

El análisis de los minerales del suelo se realizó por difracción de rayos X (DRX). El análisis se llevó a cabo en Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El equipo utilizado fue el EMPYREAN (PANalytical, Holanda). Las condiciones de operación fueron 45KV de energía de aceleración, 40 mA de corriente del filamento, radiación Cu-K $\alpha$ , y un barrido angular de 2 $\theta$  desde 10° hasta 70°. La identificación de los minerales se realizó utilizando un software Highscope plus (PANalytical) y la base de datos PDF-2 del Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD, por sus siglas en inglés). El análisis de DRX del suelo original y del suelo tratado con HCV se efectuó utilizando muestras secas, en tanto que, en el análisis de DRX de la muestra del suelo tratado con glicerol en condiciones anóxicas se utilizaron muestras húmedas previamente centrifugadas, con la finalidad de eliminar las fracciones cristalinas más abundantes de la muestra (ej. cuarzo) y, de esta forma medir las fracciones cristalinas más pequeñas. La muestra del suelo tratado con glicerol en condiciones anóxicas se conservó en viales purgados con nitrógeno previo a su análisis para evitar la oxidación de la muestra.

### **7.5.10. Identificación de microorganismos**

La identificación de los microorganismos se llevó a cabo realizando la extracción y cuantificación del ADN de los suelos control (suelo original y suelo pretratado con HCV) y de los suelos tratados por bioestimulación con tolueno y glicerol. Posteriormente, se realizó la secuenciación y el análisis del gen 16S rRNA de cada una de las muestras, así como su cuantificación por una reacción en cadena

de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR). Los análisis se efectuaron en el Centro de Sustentabilidad Ambiental y Remediación del Instituto Real de Tecnología de Melbourne, Australia.

**Extracción y cuantificación de ADN.** El ADN genómico total fue extraído de 0.25 g de las muestras de suelo utilizando un kit de extracción de ADN (MoBio Power Soil DNA). La extracción se realizó de acuerdo con el instructivo del fabricante (MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EE.UU.). El ADN se extrajo de las muestras de suelo no tratado con HCV (muestra A1), suelo tratado con HCV (muestra A2), suelo A2 tratado con tolueno en condiciones aerobias (muestra B) y suelo A2 tratado con glicerol en condiciones anóxicas (muestra C). El período de crecimiento de las poblaciones a identificar en las muestras tratadas con tolueno y glicerol (muestra B y C) fue de 40 días. De cada muestra (A1, A2, B y C) se realizaron tres extracciones de ADN. La concentración de ADN se cuantificó mediante el espectrofotómetro Qubit® 2,0 (Life Technologies, Carlsbad, CA). La integridad del ADN extraído fue verificado utilizando un Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Las concentraciones de ADN de las muestras de suelo fueron de alrededor de 8 ng/μL.

**Secuenciación y análisis.** El gen 16S rDNA fue utilizado para determinar las categorías taxonómicas de las bacterias. Las extracciones se sometieron a la preparación de la biblioteca mediante el uso de Illumina Nextera® XT Index Kit (Illumina, San Diego, CA). Los primers utilizados fueron los recomendados por el fabricante para analizar la región V3-V4 del gen 16S rDNA. Las muestras se analizaron mediante la plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA). Las

secuencias obtenidas se examinaron mediante la aplicación 16S metagenómica de Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) e Illumina Basespace (Caporaso y col., 2010). En el alineamiento y agrupamiento de las secuencias registradas se empleó el algoritmo UCLUST (QIIME) con un valor de corte de similitud de secuencia del 97%. La base de datos de Greengenes fue utilizada para identificar las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de una secuencia representativa de cada grupo. La riqueza de OTUs se determinó mediante el cálculo de las curvas de rarefacción para cada muestra de suelo. El número de lecturas de secuencias resultantes en cada una de las muestras fueron 62 031, para A1; 520 127, para A2; 612 200, para B; 1 264 130, para C. Los datos del análisis metagenómico fueron depositados en la base de datos MG-RAST con el número de identificación: 281489, 281490, 281491 y 281492. Las curvas de rarefacción alcanzaron un valor constante de 40 000 lecturas de secuencia en las 4 muestras, lo cual dio valores de 1 400 OTUs para las muestras no tratadas y alrededor de 900 OTUs para las muestras tratadas por bioestimulación (ver figura A2, anexo A).

**Cuantificación del gen 16S rDNA.** La cuantificación se realizó mediante la técnica de RT-qPCR. Las reacciones de RT-qPCR (25  $\mu$ L de volumen) se realizaron en un Rotor-Gene Q series (Qiagen). Cada reacción contenía Kapa Sybr Fast mastermix (10  $\mu$ L, KAPA), RNase-free sterile water (8.2  $\mu$ L), primers universales 341F (0.4  $\mu$ L, 10 pmol  $\mu$ L<sup>-1</sup>), 518R (0.4  $\mu$ L) y un molde de DNA (1  $\mu$ L). Las condiciones de amplificación fueron 10 min a 24°C, 15 min a 42 °C, 5 min a 95 °C y 5 min a 4 °C (Shahsavari y col., 2013). El número de copias de genes de 16S rDNA se calculó por la técnica de cuantificación absoluta utilizando una curva

estándar. La curva estándar se construyó mediante diluciones en serie (de hasta  $10^{-6}$ ) de productos purificados por PCR del gen 16S rDNA de *Rhodococcus erythropolis* (aislados de un suelo control) (Shahsavari y col., 2013). Los valores del ciclo umbral (CT, por sus siglas en inglés) de las diluciones en serie se graficaron contra el logaritmo del número de copias del gen inicial. El número de genes se expresaron como  $\log_{10}$  del número de copias de gen por g de suelo seco. Este análisis se realizó para determinar la cantidad total de bacterias en los suelos tratados con cosustratos y en los controles (sin cosustrato), lo cual está directamente relacionado con el número de copias del gen 16S rDNA.

#### **7.5.11. Análisis estadístico**

Se utilizó el programa Kaleida Graph 4.0 para realizar las gráficas reportadas. La determinación de las diferencias significativas entre los tratamientos se realizó por la prueba de t-Student mediante el programa Excel 2010. Este método estadístico se utilizó para comparar la diferencia entre las medias de dos grupos de tratamiento. El análisis de medias entre más de dos tratamientos se realizó por medio de la prueba de rangos múltiples de Duncan con el uso del programa estadístico SAS. El nivel de inferencia fue de 5 % para ambos tratamientos estadísticos.

# **8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN I. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIANA DEL SUELO**

## **8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN I. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIANA DEL SUELO**

En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica y de diversidad microbiana del suelo pretratado con HCV y su comparación con el suelo original y de esta manera establecer las características que influyen en el tratamiento de bioestimulación.

### **8.1 Caracterización fisicoquímica**

En la Tabla 10 se muestran las concentraciones del DDT y sus intermediarios, así como otros parámetros fisicoquímicos importantes del suelo pretratado con HCV. Los resultados muestran que los valores de DDT y DDE del suelo pretratado con HCV son mayores a los Límites Máximos Permisibles (LMP) establecidos para suelos de uso residencial o agrícolas en EE.UU. (1.9 mg/kg para DDT, 2.0 mg/kg para DDE y 2.3 mg/kg para DDD) (US-EPA, 2016); en tanto que el DDD está por debajo de este LMP. Para el DDNS, no existe un valor de LMP. El DDNS es un producto de degradación del DDT, que se formó y acumuló en el tratamiento de HCV. Es decir, este compuesto no existía en el suelo original. Por otra parte, la cantidad de HCV del 10% (peso/peso) adicionada al suelo original, para realizar el tratamiento fisicoquímico, incrementó sustancialmente la concentración de hierro total en el suelo. El contenido de hierro total del suelo original aumentó de  $13.2 \pm 2.2$  mg/g<sub>suelo</sub> a  $82.4 \pm 3.1$  mg/g<sub>suelo</sub> después del tratamiento con HCV. Las concentraciones de hierro (II) menores a 0.3 mg/g<sub>suelo</sub> registradas en el suelo pretratado con HCV (Tabla 10) indican que la mayor parte del hierro se encuentra como compuestos insolubles de hierro (III).

**Tabla 10.** Caracterización del suelo pretratado con HCV.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
DDT (> LMP)	2.9 ± 1.2 mg/kg	Sulfato	13.0 ± 0.8 g/kg
DDE (> LMP)	2.1 ± 0.4 mg/kg	pH	6.3 ± 0.2
DDD (< LMP)	1.1 ± 0.3 mg/kg	Arena	60.9%
DDNS (abundancia)*	52 x 10 <sup>6</sup>	Limo	30.7%
Hierro total	82.4 ± 3.1 g/kg	Arcilla	8.4%
Hierro (II)**	0.25 ± 0.03 mg/g	Materia orgánica	0.18%
Hierro (II)***	0.016 ± 0.02 mg/g		

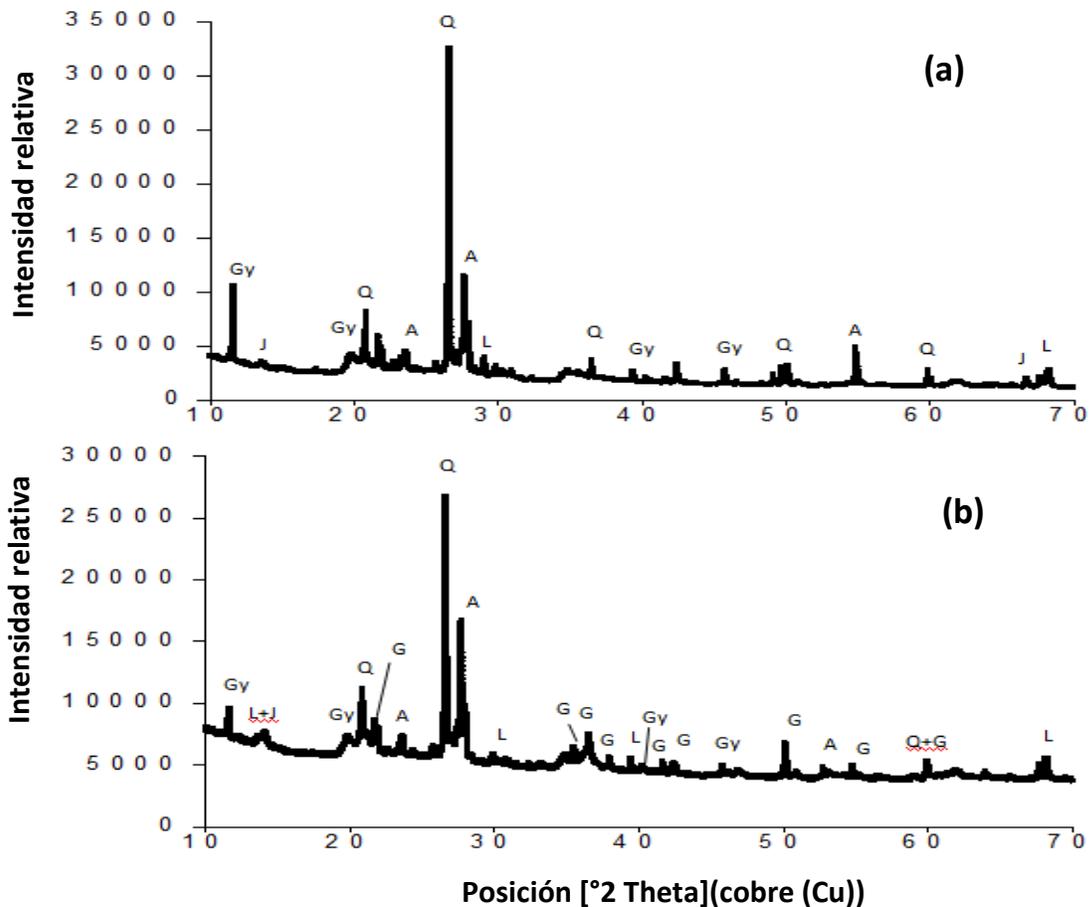
\*Valor reportado como abundancia debido a que no existe disponible un estándar comercial de DDNS.

\*\*Concentración de hierro (II) extraída con HCl al 0.5N, LMP: Límite máximo permisible.

\*\*\*Concentración de hierro (II) extraído en agua destilada.

El análisis de difracción de rayos X del suelo original y pretratado con HCV mostró la presencia de minerales de cuarzo (SiO<sub>2</sub>), anortita (CaAl<sub>2</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) y yeso (Ca(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O). La diferencia mineralógica principal entre estos suelos fue la presencia de compuestos de hierro (III) como goethita (α-FeOOH) y lepidocrocita (γ-FeOOH) en el suelo pretratado con HCV. El difractograma de ambos suelos se presenta en la Figura 10. El análisis de DRX mostró que en el suelo pretratado con HCV no existe presencia de minerales que contengan en su estructura una combinación de iones férricos y ferrosos como son magnetita, maghemita, hematitas, acaganeíta. Estos resultados indican que la mayor parte del HCV adicionado al suelo se oxidó a hierro (III) por el proceso de oxidación durante la deshalogenación reductiva de los DDX y por la presencia de oxígeno atmosférico en el reactor, debido a que el tratamiento fisicoquímico se elaboró en un sistema abierto. Morgan y Lahav. (2007) señalan que la formación de los compuestos de

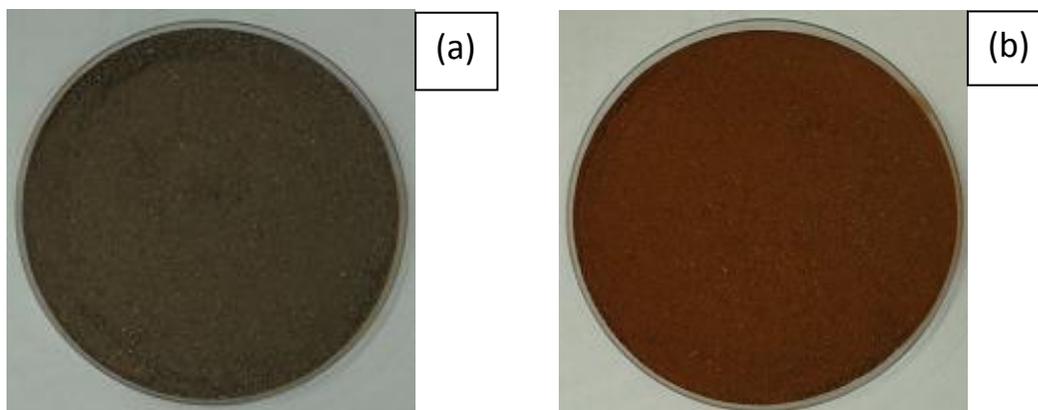
hierro (gohetita, magnetita, maghemita y hematita) depende de factores como la concentración de hierro, el pH, el oxígeno y la relación Fe(II):Fe(III).



**Figura 10.** Resultados del análisis de DRX. a) antes del tratamiento (suelo original) y b) después del tratamiento con hierro. A: anortita, J: jarosita, Gy: yeso, Q: Quarzo, L: lepidocrocita, G: goethita.

El análisis de DRX también mostró que el suelo contiene sulfato de calcio (yeso), que es muy probablemente la fuente del ion sulfato cuantificado ( $13.0 \pm 0.8$  g/kg<sub>suelo</sub>). Por otra parte, los valores de referencia de materia orgánica para suelos no volcánicos establecidos en la Norma Oficial Mexicana (valor muy bajo, menor a 0.5%; valor medio, entre 1.6 y 3.5%; valor muy alto, mayor a 6 (NOM-021-RECNAT-2000) (NOM, 2000)) indican que el suelo tiene una baja carga orgánica (Tabla 10). Este déficit de materia orgánica en el suelo, confirma la necesidad de

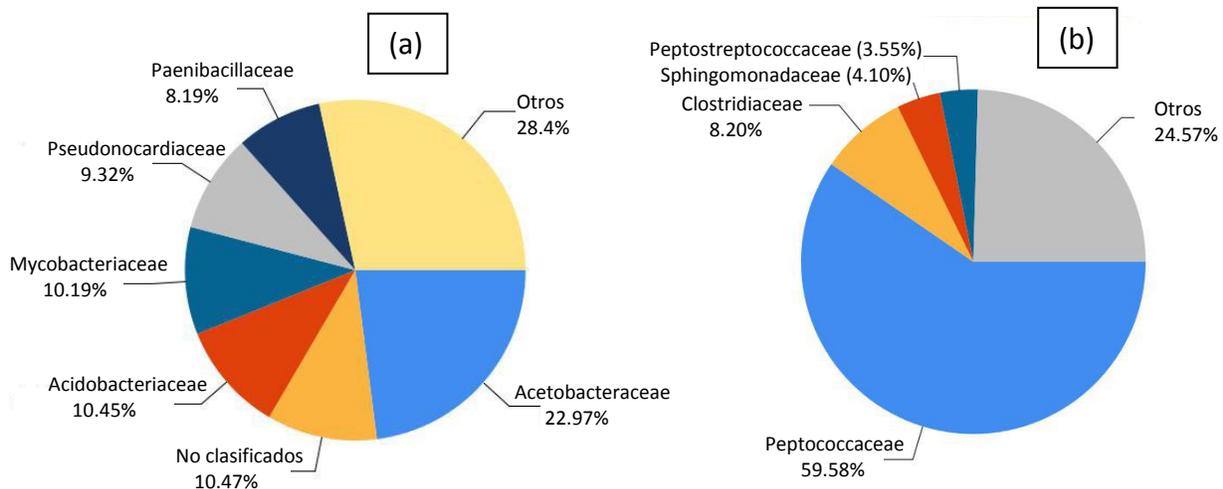
la adición de un cosustrato orgánico (fuente de carbono y energía) para fomentar el crecimiento y la actividad de las poblaciones microbianas autóctonas del suelo. El pH del suelo original se ajustó a un valor de pH 7, al inicio del tratamiento con HCV, con el propósito de favorecer el crecimiento de bacterias reductoras de hierro, dada su posible presencia en el suelo. Después del tratamiento con HCV se registró una disminución del pH ( $6.3 \pm 0.2$ ), lo cual puede ser resultado de la formación de oxihidróxidos de hierro (III) en suelo. La Figura 11 muestra el cambio de color que adquirió el suelo original después del tratamiento con HCV. El color rojizo del suelo tratado con HCV revela la presencia de goethita y lepidocrocita. Schwertmann y Taylor (1989) señalan que la goethita es el óxido de hierro que más frecuentemente se detecta en los suelos debido a que es uno de los compuestos de hierro más estables y de menor solubilidad.



**Figura 11.** Color del suelo. (a) antes del tratamiento (suelo original) y (b) después del tratamiento con HCV.

## 8.2. Composición microbiana

Las familias de bacterias identificadas en el suelo original (sin tratamiento de hierro) fueron Acetobacteraceae (22.9%), Acidobacteriaceae (10.4%), Mycobacteriaceae (10.1%), entre otros grupos menos abundantes (Figura 12).



**Figura 12.** Familia de bacterias identificadas en el (a) suelo original y (b) después del tratamiento con HCV.

Es importante señalar que el análisis metagenómico mostró otras 171 clasificaciones de familias de bacterias que representan un 28.4%. Solo un 10% no fueron clasificadas. La abundancia de las Acetobacteraceae (bacterias acétogenas) está asociada con el pH ácido (pH 4.45) registrado en el suelo original. Esto se debe a que la actividad óptima de las bacterias del ácido acético se ha reportado a pH ácidos y, por lo general, comprenden un grupo de bacilos gram negativos, móviles y aerobios (Kersters y col., 2006). Después de realizar el tratamiento con HCV, se registró un cambio importante en la composición microbiana (Figura 12). En la Figura A4 (Anexo A), se presenta información del phylum y el género de bacterias identificadas.

La familia Acetobacteraceae disminuyó a 2.4%. La familia predominante, en este caso, fue Peptococcaceae (59.6%), cuya especie preponderante fue *Desulfosporosinus auripigmenti* (27.6%). El porcentaje de otras familias bacterias identificadas se mantuvo en un 24.6%; valor similar al del suelo original. La familia de bacterias anaerobias Peptococcaceae (phylum Firmicutes, clase Clostridia)

tiene la capacidad de utilizar diferentes aceptores de electrones como sulfato, Fe (III) y nitratos, en condiciones anóxicas, y se ha aislado de forma frecuente en suelos contaminados con BTEX y con hidrocarburos clorados (Kunapuli y col., 2010). La presencia de estas bacterias anaerobias en el suelo, después del tratamiento con HCV, probablemente se debió a la prevalencia de zonas anóxicas en el suelo tratado, dado que se formó un lodo al mantener una relación de 2kg de suelo y 1.6L de agua. Es importante señalar que el HCV también reacciona con el oxígeno del aire, lo cual muy probablemente, produjo condiciones anóxicas en el suelo lodoso dentro del sistema. Estas condiciones se mantuvieron al menos 12 días (4 días de tiempo de tratamiento más 8 días de secado del lodo a temperatura ambiente (~20 °C)). Asimismo, cabe señalar que el pH del suelo original se ajustó a un valor de pH 7, al inicio del tratamiento con HCV, para propiciar el crecimiento de BRH en el suelo, el cual contenía un 0.18% de materia orgánica.

## **9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN II. BIOESTIMULACIÓN DEL SUELO PRETRATADO CON HCV**

## **9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN II. SUELO PRETRATADO**

En este capítulo se describen y se discuten los resultados de los experimentos del suelo pretratado con HCV: principal objetivo de esta tesis.

El capítulo se divide en cuatro secciones. En la sección 9.1, se muestran los resultados y la discusión del proceso de bioestimulación en condiciones aerobias, en donde, se evalúa el efecto del difenilmetano, tolueno y glicerol sobre la degradación de los DDX. En la sección 9.2, se muestran los resultados y la discusión del proceso de bioestimulación en condiciones anóxicas, en donde, se evalúa el efecto del tolueno y glicerol sobre la degradación de los DDX. En ambas secciones se muestran los resultados del análisis de biología molecular y los mecanismos propuestos de degradación de los DDX. En la sección 9.3, se presenta los resultados del sistema acoplado anóxico/aerobio con glicerol y tolueno, respectivamente. Después, en la sección 9.4, se presentan los resultados del efecto del uso del ácido láctico, etanol, glucosa y bagazo de caña como cosustratos para fomentar la actividad de BSR y la degradación del DDT por mackinawita (agente abiótico de deshalogenación reductiva).

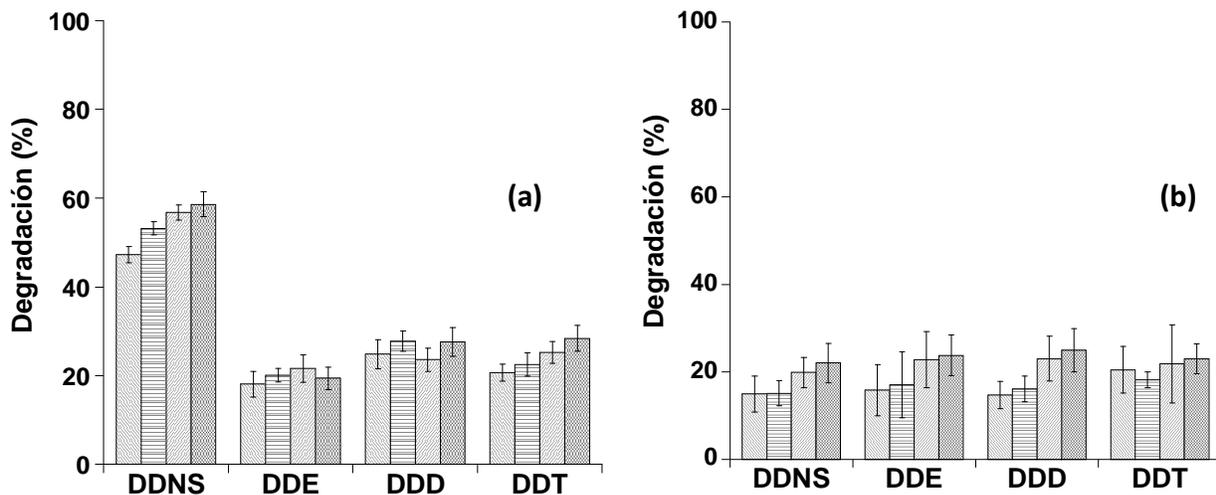
### **9.1. Bioestimulación en condiciones aerobias**

#### **9.1.1. Difenilmetano**

A partir del vigésimo día de tratamiento, se observó que el uso del difenilmetano como cosustrato favoreció la degradación de los DDX, en un mayor grado para el DDNS (Figura 13a). A los 60 días de tratamiento, los valores de degradación para el DDNS, DDE, DDD y DDT fueron de 2.66, 0.82, 1.14 y 1.25 veces mayores que los porcentajes obtenidos en los controles sin cosustrato ( $22.0 \pm 2.5$  para DDNS,

23.8 ± 3.7 para DDE, 25.0 ± 3.1 para DDD y 24.1 ± 3.4 para DDT). El DDNS fue el único compuesto que registró una mayor degradación con respecto a los controles (p<0.05). Esto se debe muy probablemente muy probablemente porque tiene una estructura química menos estable que el DDT, DDE y DDD.

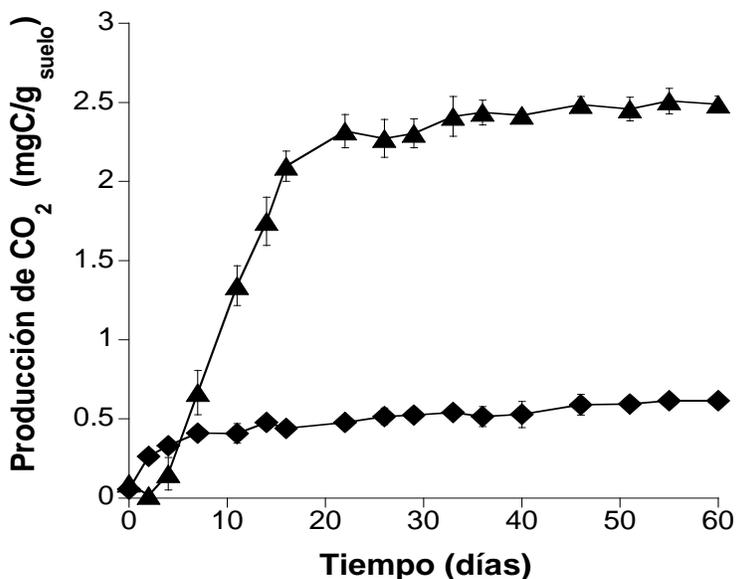
La degradación de los DDX registrada en los controles sin cosustrato (Figura 13b) se explica por posibles procesos abióticos y bióticos, generados en el suelo sin cosustrato por la presencia de HCV remanente, goethita y/o por la actividad metabólica de los microorganismos autóctonos del suelo. Amonette y col. (2000) indican que la presencia de Fe(II) adsorbido en goethita favorece la deshalogenación reductiva abiótica de compuestos clorados, por lo que no se descarta su posible influencia sobre la degradación de los DDX.



**Figura 13.** Porcentajes de degradación de los DDX a los 20, 30, 40 y 60 días de tratamiento. a) tratamiento con difenilmetano y b) control (sin cosustrato).

La Figura 14 muestra que los microorganismos del suelo tienen la habilidad de metabolizar el difenilmetano hasta CO<sub>2</sub>. Inicialmente, se presentó una fase de aclimatación de dos días. Del tercer al décimo octavo día, se registró una velocidad máxima de producción de CO<sub>2</sub> de 0.12 mgC/g suelo.día. Sin embargo,

esta producción disminuyó a un valor casi constante después del vigésimo tercer día de tratamiento.



**Figura 14.** Producción de CO<sub>2</sub>. Control ( ◆ ) y difenilmetano ( ▲ ). Los datos del tratamiento con difenilmetano son los corregidos restando el valor de la respiración endógena (control sin cosustrato).

La mineralización teórica de difenilmetano registrada a partir del vigésimo tercer día de tratamiento fue del 91%. El uso del difenilmetano como fuente de carbono y energía indica que este compuesto favoreció el crecimiento y la activación de poblaciones microbianas del suelo, con capacidad para degradarlo.

Pham y Sylvestre (2013) señalaron que el difenilmetano y el bifenil siguen una ruta catabólica de degradación similar, iniciada a partir de la ruptura del anillo aromático vía oxidación por dioxigenasas. Algunos estudios indican que las enzimas de la ruta catabólica del bifenil son muy versátiles y pueden degradar diferentes compuestos como bifenilos policlorados, 2,6-diclorobifenil, 2,4,4,-triclorobifenil, DDT, entre otros (L'Abbée y col., 2011; Pham y Sylvestre, 2013). Por su parte, L'Abbée y col. (2011) reportaron que bacterias como *Pandoraea*

*pnomenusa* B356 y *Burkholderia xenovorans* LB400 tienen la capacidad de metabolizar bifenilos no clorados. Asimismo, también determinaron que sólo algunas bacterias como *Pandoraea pnomenusa* B356 tienen la capacidad de utilizar bifenilos clorados y DDT como fuente de carbono y energía. La nula o baja posibilidad de contar con microorganismos capaces de asimilar directamente los compuestos recalcitrantes en un suelo contaminado ha propiciado que, en la mayoría de los estudios de biorremediación, se utilice la estrategia de bioestimulación.

El difenilmetano es un compuesto frecuentemente utilizado para estimular la degradación del DDT por la técnica de bioestimulación, debido a que tiene una estructura similar al DDT (L'Abbée y col., 2011; Pham y Sylvestre, 2013). Sin embargo, Ortiz y col. (2013) demostraron que es posible utilizar compuestos aromáticos de menor peso molecular, como el tolueno, para inducir la degradación del DDT. En este estudio, se mostró que la dosificación del cosustrato a través del tiempo incrementa la velocidad de degradación de DDT en suelos contaminados. La diferencia de la presión de vapor entre el tolueno (21.9 mm Hg a 25°C) y el difenilmetano (0.00821 mm Hg a 25°C) le proporciona una ventaja al tolueno, porque puede dosificarse mediante pulsos discontinuos en una corriente de aire para ser suministrado en el suelo o subsuelo de manera controlada (Ortiz y col., 2003).

### **9.1.2. Tolueno**

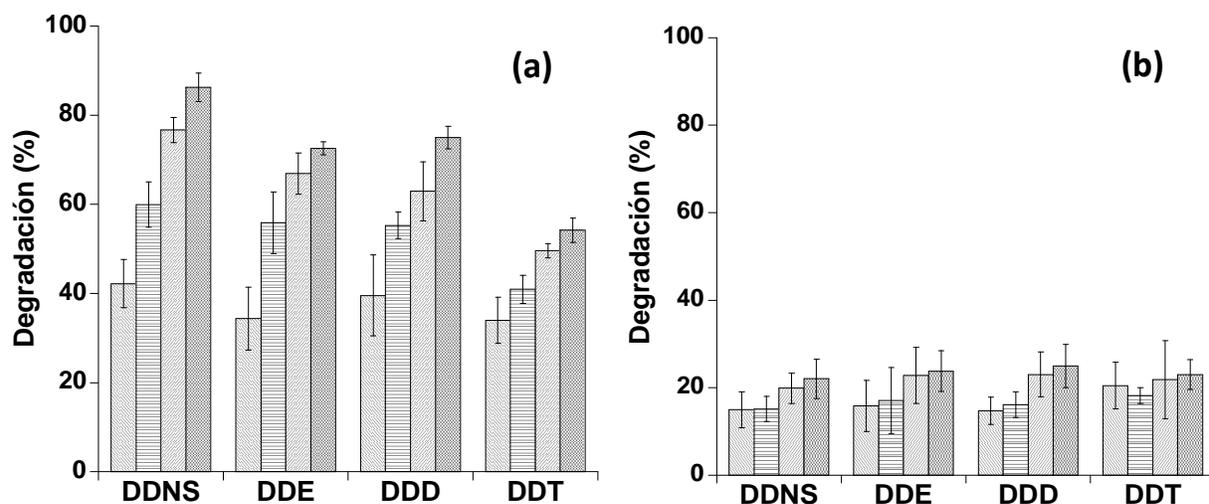
La degradación de los DDX mediante el uso del tolueno como cosustrato se muestra en la Figura 15. Los resultados demuestran que la adición de tolueno en

forma discontinua, durante los 60 días de tratamiento, favoreció significativamente ( $p < 0.05$ ) la degradación de los DDX en comparación con los controles. La mayor degradación se registró en los compuestos intermediarios en el siguiente orden DDNS > DDD > DDE; a su vez, el DDT registró la menor degradación. A los 60 días de tratamiento, los valores de degradación para el DDNS, DDE, DDD y DDT fueron 3.92, 3.15, 2.90 y 2.30 veces mayores que los porcentajes obtenidos en los controles ( $22.0 \pm 2.5$ , para el DDNS;  $25.0 \pm 3.1$ , para el DDD;  $23.8 \pm 3.7$ , para el DDE;  $24.1 \pm 3.4$ , para el DDT).

Al ser el DDNS el principal compuesto degradado, en el tratamiento con tolueno ( $86.3 \pm 3.2\%$ ) y en el tratamiento con difenilmetano ( $58.6 \pm 2.8\%$ ), se confirma que el DDNS es el compuesto más factible de degradar por los microorganismos del suelo. Esto muy propablemente se debe a que el DDNS es el compuesto menos recalcitrante, por contener una cantidad menor de cloros en su estructura, en comparación con el DDT, DDE y DDD.

En los tratamientos realizados con tolueno y difenilmetano no se registró la formación y acumulación de DDE o de ácido 4-clorobenzoico. Estos compuestos se han reportado como productos de degradación del DDT, por bioestimulación, en condiciones aerobias (Foght y col., 2001; Kamanavalli y Ninnekar, 2004). El resultado del presente estudio es consistente con un trabajo previo (Ortiz y col., 2013), donde tampoco se registró la acumulación de estos compuestos intermediarios en el suelo tratado por bioestimulación. En dicho estudio, se utilizó al tolueno como cosustrato para tratar un suelo contaminado con DDX, obtenido de una zona rural de Chiapas. El suelo contenía concentraciones iniciales de  $7.46 \pm 0.66$  mg/kg de DDT,  $3.31 \pm 0.04$  mg/kg de DDD y  $0.42 \pm 0.01$  mg/kg de DDE, por

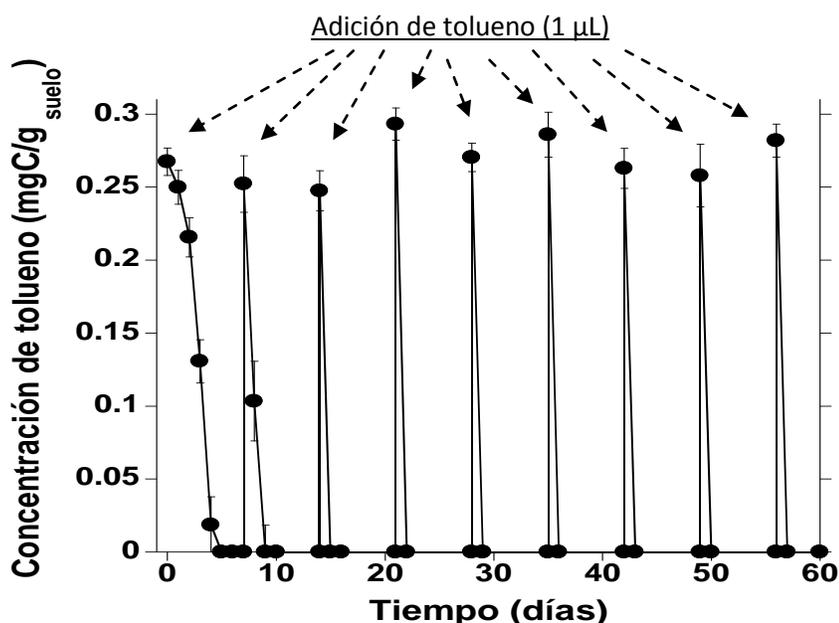
lo que no requirió de un pretratamiento con HCV. Los porcentajes de degradación obtenidos en el estudio mencionado fueron de 56.1, 85.2 y 100 para el DDT, DDD y DDE, respectivamente (Ortiz y col., 2013).



**Figura 15.** Porcentajes de degradación de los DDX a los 20, 30, 40 y 60 días de tratamiento. a) tratamiento con tolueno y b) control (sin cosustrato).

La Figura 16 muestra el seguimiento de adición y consumo de tolueno a través del tiempo. En la primera adición de tolueno se registró un bajo consumo durante los primeros 3 días. Sin embargo, al quinto día, el tolueno se agotó. En las subsecuentes adiciones, el consumo total de tolueno se registró en los primeros 2 días. En la sexta aplicación, efectuada al día 35, el consumo total de tolueno se registró en las primeras 8 horas, lo que equivale a una velocidad de consumo de  $0.040 \text{ mgC/g}_{\text{suelo}} \cdot \text{h}$ . Este hecho indica que las poblaciones microbianas presentes en el suelo requieren de un periodo de aclimatación de alrededor de 30 días para agotar en cuestión de horas la cantidad de tolueno adicionado, lo que demuestra un incremento en la población y/o en la actividad enzimática microbiana.

El comportamiento del consumo de tolueno a través del tiempo (Figura 16) demuestra que la dosificación realizada cada 7 días mantiene activos a los microorganismos del suelo. El consumo total de tolueno que se presenta en los primeros días, después de cada dosificación, permite mantener al sistema experimental sin la presencia del cosustrato, de forma discontinua. La ausencia del cosustrato en el sistema incrementa la posibilidad de que los DDX sean degradados. Al ser estos compuestos la única fuente de carbono y energía con la que cuentan la población microbiana activa al agotarse el tolueno.



**Figura 16.** Registro de la adición y agotamiento de tolueno en condiciones aerobias durante los 60 días de tratamiento.

La mayor degradación de los DDX obtenida en el tratamiento con tolueno (Figura 15a) en comparación con el tratamiento con difenilmetano (Figura 13a), posiblemente, se debe a la forma en que el cosustrato fue adicionado al sistema experimental. McCarty y col. (1998) mencionan que la adición del tolueno en forma de pulsos permite se reduzca la competencia entre el cosustrato y el

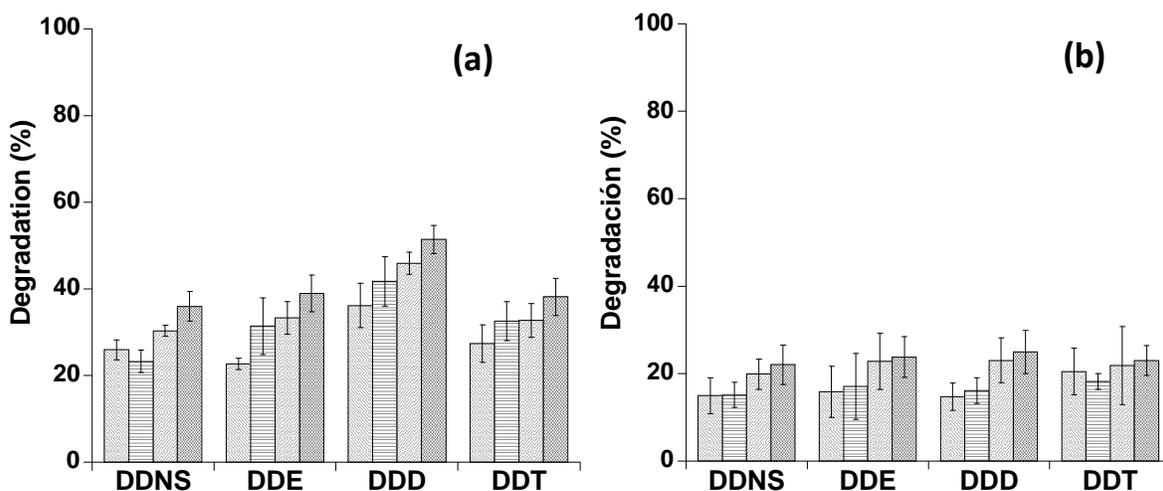
contaminante, cuando se produce un proceso cometabólico. Asimismo, señalan que el uso de cosustratos no dosificados puede generar un incremento de los miembros de la población microbiana nativa, de los cuales muchos de no tienen la habilidad de degradar el contaminante objetivo. En este sentido, el tolueno dosificado fue la mejor estrategia de tratamiento, tal como se reportó anteriormente por Ortiz y col., 2013.

Por otra parte, durante los 60 días del tratamiento con tolueno, se registró una producción acumulada de CO<sub>2</sub>, de 2.1 mgC/g<sub>suelo</sub>, que corresponde a un 88% de mineralización del cosustrato. Este resultado indica que los microorganismos del suelo pueden utilizar al tolueno como fuente de carbono y energía (ver Figura 18). Este hecho incide en el crecimiento y la actividad de poblaciones microbianas, que inducen una degradación de los DDX.

Algunos estudios (Nadeau, 1994; Kamanavalli y Ninnekar, 2004; L'Abbée y col., 2011) han reportado que ciertas bacterias (*A. eutrophus* A5, *Pseudomonas* sp, *P. pnomenusa* B356 BPDO) pueden iniciar la degradación del DDT a través de la ruptura del anillo aromático por bifeníl-2,3-dioxigenasas. Nadeau (1994) fue el primero en reportar la ruta metabólica de degradación del DDT, al utilizar bacterias del género *Pseudomonas*. La ruta metabólica inicia con la incorporación de dos moléculas de oxígeno al anillo bencénico, lo que provoca la apertura del anillo por medio de un intermediario dihidroxilado. En este sentido, es probable que la degradación de DDX en condiciones aerobias al utilizar tolueno y difenilmetano esta relacionada con la presencia de bacterias con actividad oxigenasa.

### 9.1.3. Glicerol

Los valores de degradación del DDNS, DDD, DDE y DDT registrados al utilizar glicerol en condiciones aerobias fueron 1.63, 2.10, 1.63 y 1.60 veces mayor ( $p < 0.05$ ) que los porcentajes registrados en los controles sin cosustrato (Figura 17). Sin embargo, las eficiencias de degradación obtenidas por el efecto del glicerol fueron significativamente menores ( $p < 0.05$ ) que los obtenidos en el tratamiento con tolueno (Figura 15a). Esto indica que el tolueno es un mejor cosustrato que el glicerol, debido a que mejora la eficiencia de degradación de los DDX en condiciones aerobias. Posiblemente, esto se debe a que el tolueno, al ser un compuesto de estructura aromática, induce que los microorganismos generen enzimas capaces de degradar a los DDX por rutas metabólicas similares a las que el tolueno es degradado; a diferencia del glicerol, cuya estructura química no es aromática.



**Figura 17.** Porcentajes de degradación de los DDX a los 20, 30, 40 y 60 días de tratamiento. a) tratamiento con glicerol y b) control sin cosustrato.

A pesar de que las estructuras químicas entre el tolueno y el glicerol son muy diferentes, este último se ha utilizado con éxito para mejorar la degradación

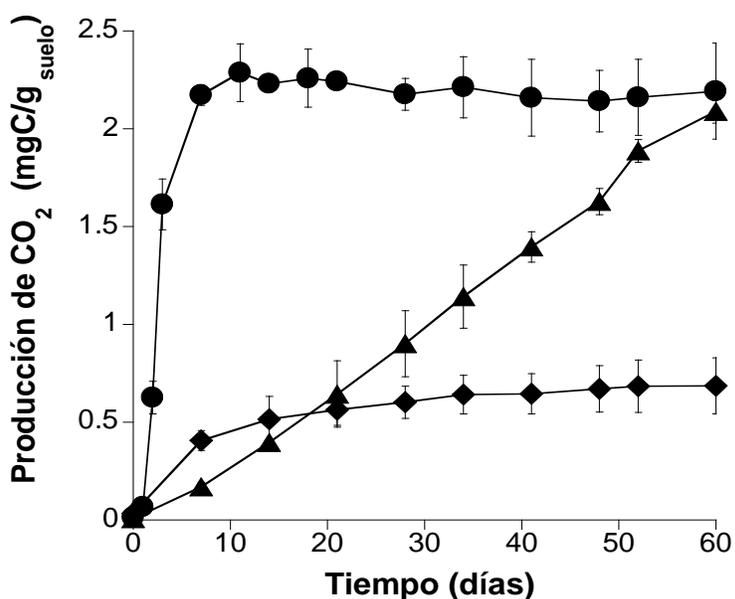
completa del DDT en condiciones aerobias (Golovleva y col., 1979; Blidan y Manonmani, 2002). Blidan y Manonmani, 2002 mencionan que compuestos como el glicerol, la peptona y el extracto de levadura pueden mejorar el crecimiento de microorganismos aislados, de suelos contaminados, con capacidad de degradar el DDT. Estos autores mencionan que esto es posible mediante la aclimatación de los microorganismos aislados a incrementos graduales de la concentración de DDT en presencia de un cosustrato.

Las menores eficiencias de degradación de los DDX obtenidas en el presente estudio al utilizar glicerol en condiciones aerobias; en comparación con los estudios donde han reportado la degradación completa de DDT (Golovleva y col., 1979; Blidan y Manonmani, 2002), muy probablemente se debe a que en el presente trabajo se evaluó el uso del glicerol como cosustrato utilizando los microorganismos autóctonos del suelo sin previo aislamiento y aclimatación.

Entre las bacterias aislada responsables de efectuar la degradación completa del DDT, previa aclimatación, se encuentran la *Pseudomonas aeruginosa* 640x y *Serratia marcescens* DT-1P (Golovleva y col., 1980; Blidan y Manonmani, 2002). Mal'tseva y Golovleva (1984) reportaron que las enzimas dehidrogenasas son las encargadas de llevar a cabo la degradación de los DDX. Estas enzimas generan cofactores redox que conducen a la deshalogenación de estos compuestos recalcitrantes.

En la Figura 18 se muestra la producción de CO<sub>2</sub> acumulada, en los tratamientos control, con glicerol y con tolueno. La producción de CO<sub>2</sub> demuestra que el glicerol fue utilizado como fuente de carbono y energía por los microorganismos del suelo. La velocidad máxima de producción (0.195 mgC/g<sub>suelo</sub>.dia) se registró durante los

primeros 10 días. Posteriormente, la concentración de  $\text{CO}_2$  se mantuvo en un valor de  $2.3 \text{ mgC/g}_{\text{suelo}}$ , lo que corresponde a una mineralización teórica del 92% del glicerol.

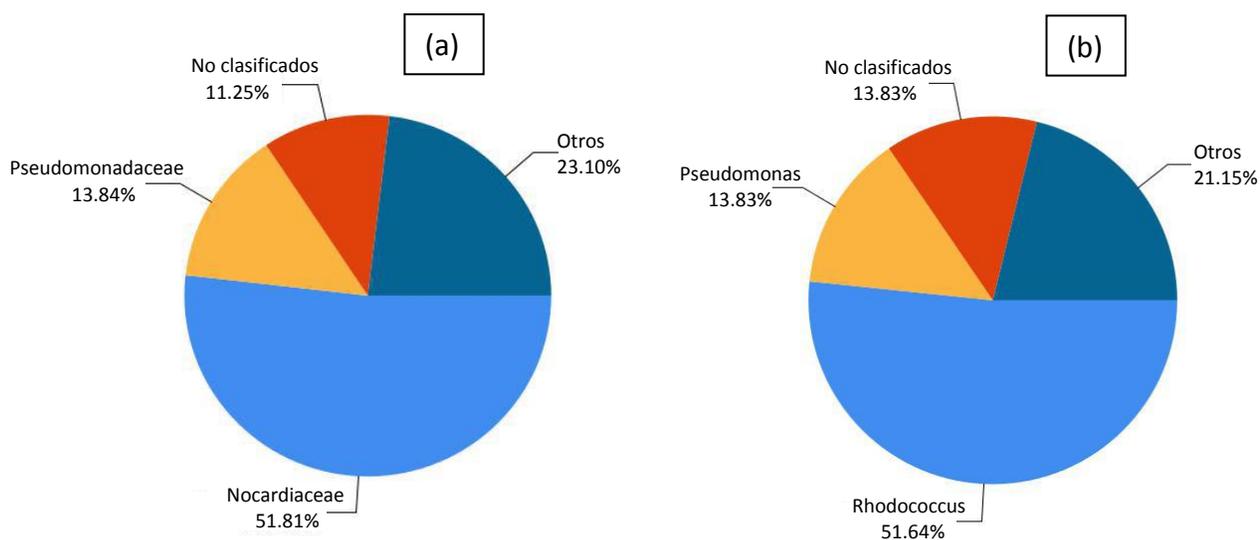


**Figura 18.** Producción de  $\text{CO}_2$ . Control (◆), glicerol (●) y tolueno (▲). Los datos de los tratamientos son los corregidos restando el valor del control.

La mineralización teórica del glicerol y del tolueno en condiciones aerobias demuestra que los microorganismos del suelo tienen diferentes capacidades metabólicas para degradar compuestos aromáticos y no aromáticos. La producción de  $\text{CO}_2$  (actividad microbiana) registrada en el suelo pretratado con HCV, al utilizar los diferentes cosustratos evaluados (glicerol, tolueno y difenilmetano), demuestra que los microorganismos del suelo no están inhibidos por la presencia de una alta concentración de hierro que tiene el suelo pretratado con HCV. Esto debe a que el hierro se encuentra de forma insoluble como compuestos de hierro (III).

#### 9.1.4. Composición microbiana del suelo tratado con tolueno

En este apartado se presenta el resultado del análisis metagenómico del suelo tratado con tolueno en condiciones aerobias. Este tratamiento fue seleccionado porque registró la mayor degradación de los DDX en comparación con el efecto del glicerol y difenilmetano. Los resultados del análisis metagenómico que se realizó después de 40 días de aclimatación a la adición de tolueno mostraron que el suelo tratado con este cosustrato estimuló el crecimiento de bacterias de las familias Nocardiaceae (51.8%) y Pseudomonadaceae (13.8%). De esta última familia, los géneros que se identificaron fueron *Rhodococcus* (52%) y *Pseudomonas* (14%) (Figura 19). En la Figura A4 (Anexo A), se presenta información del phylum y el género de bacterias del suelo tratado con tolueno.



**Figura 19.** Familia (a) y género (b) de bacterias identificadas en el suelo tratado con tolueno en condiciones aerobias.

Diversos estudios (de Carvalho y col., 2007; Karnachuk y col., 2015; Martíńková y col., 2009; Rehfuss y Urban, 2005) han reportado que bacterias del género *Rhodococcus* (gram positivas, aerobias) tienen capacidad para degradar una

amplia variedad de hidrocarburos aromáticos, así como compuestos alifáticos y aromáticos clorados por dioxigenasas y monooxigenasas. En cambio, las bacterias del género *Pseudomonas* (gram negativas, aerobias) también se han reportado como especies de gran versatilidad metabólica (Ryoo y col., 2000; Romanenko y col., 2005; Shim y col., 2001). Algunas especies como *P. xanthomarina* y *P. stutzeri* tienen enzimas tolueno/o-xileno monooxigenasas (ToMO) con la capacidad de degradar compuestos clorados como tetracloroetileno y pentaclorofenol (Romanenko y col., 2005; Shim y col., 2001).

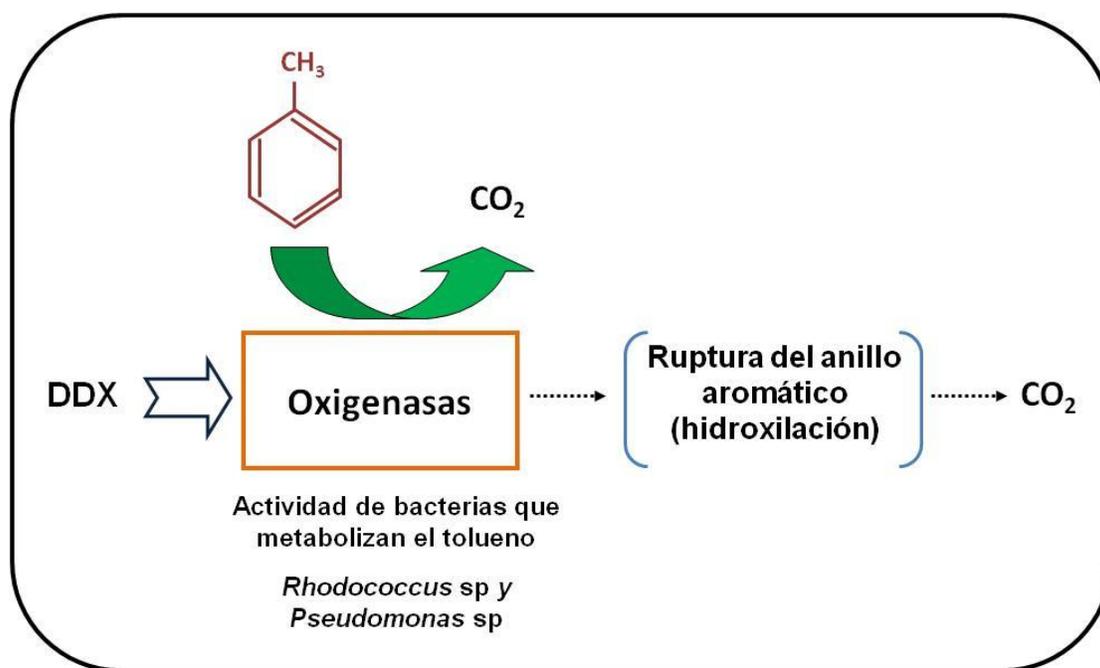
Lo anterior indica que los géneros de bacterias *Rhodococcus* y *Pseudomonas* identificadas están relacionadas con la degradación de tolueno y DDX. Los resultados sugieren que la producción de CO<sub>2</sub> registrada en el tratamiento con tolueno está relacionada con la presencia y actividad de enzimas oxigenasas capaces de inducir la degradación metabólica del tolueno y de los DDX. La figura A3 (anexo A) muestra que se presentó un incremento en la cantidad total de bacterias (número de copias de genes 16S rDNA) en el suelo tratado con tolueno en comparación con el suelo sin tratamiento por bioestimulación.

#### **9.1.5. Propuesta del mecanismo de degradación de DDX con el uso de tolueno en condiciones aerobias**

Algunos estudios (Kamanavalli y Ninnekar, 2004; Nadeau y col., 1994) han reportado que la degradación microbiana del DDT en condiciones aerobias inicia por la ruptura del anillo aromático vía oxidación, inducida por enzimas dioxigenasas. La degradación del DDT vía oxidación fue demostrada con bacterias del género *Alcaligenes eutrophus* A5 (Nadeau y col., 1994) y *Pseudomonas* sp.

(Kamanavalli y Ninnekar, 2004). Ambos estudios reportan el ácido 4-clorobenzoico como producto final de la degradación del DDT, debido a la incapacidad de las bacterias para mineralizar este compuesto. El paso limitante en la degradación del DDT es la ruptura del anillo aromático. Por tal razón, la mineralización del DDT es probable cuando se supera este paso limitante: esta probabilidad incrementa cuando se tiene un consorcio de bacterias (Aislabe, 1997).

En el presente estudio no se registró la acumulación del ácido 4-clorobenzoico, lo que supone que el DDT y sus intermediarios fueron mineralizados. En la Figura 20 se presenta un mecanismo de degradación de los DDX propuesto, de acuerdo con los resultados obtenidos en el tratamiento con tolueno en condiciones aerobias.



**Figura 20.** Mecanismo biótico de degradación de DDX inducida por bioestimulación. Mecanismo propuesto de acuerdo con los resultados obtenidos con tolueno

En este mecanismo se propone que la degradación de los DDX se presenta por la actividad de microorganismos que oxidan tolueno. Los géneros de bacterias identificados en el suelo tratado con tolueno (*Rhodococcus* sp. y *Pseudomonas*

sp.) han sido ampliamente reportados con la capacidad para degradar compuestos aromáticos por oxigenasas (Bajaj y col., 2014; Jong-Su y col., 2009; Kaschabek y col., 2002; Patrauchan y col., 2005; Sudharshan y col., 2012). Los resultados del análisis metagenómico sugieren que el tolueno soportó el crecimiento y la actividad enzimática de las bacterias identificadas. Esto permite suponer que estas bacterias son las responsables de llevar a cabo la degradación de los DDX en el suelo evaluado.

Por otra parte, es probable que la baja cantidad de hierro soluble en el suelo tratado produzca un efecto positivo sobre el crecimiento de las bacterias identificadas. El hierro en cantidades traza es un cofactor redox muy importante para las oxigenasas. Las oxigenasas terminales están conformadas por al menos un núcleo redox [2Fe-2S] tipo "Rieske" y un átomo de hierro no hemo responsable de la activación de oxígeno (Leahy y col., 2003; Notomista y col., 2003). De esta forma, el hierro desempeña un papel muy importante en el acoplamiento y activación del oxígeno para llevar a cabo la ruptura del anillo aromático (Franklin y col., 1981; Harayama y col., 1992; Leahy y col., 2003; Notomista y col., 2003). El potencial de óxido reducción de Fe(II)/Fe(III) hace al hierro extremadamente versátil cuando es incorporado como centro catalítico o transportador de electrones. Esto se debe a que el hierro tiende a cambiar con relativa facilidad de estado de oxidación (Harayama y col., 1992; Krewulak y Vogel, 2008).

#### **9.1.6. Conclusiones parciales**

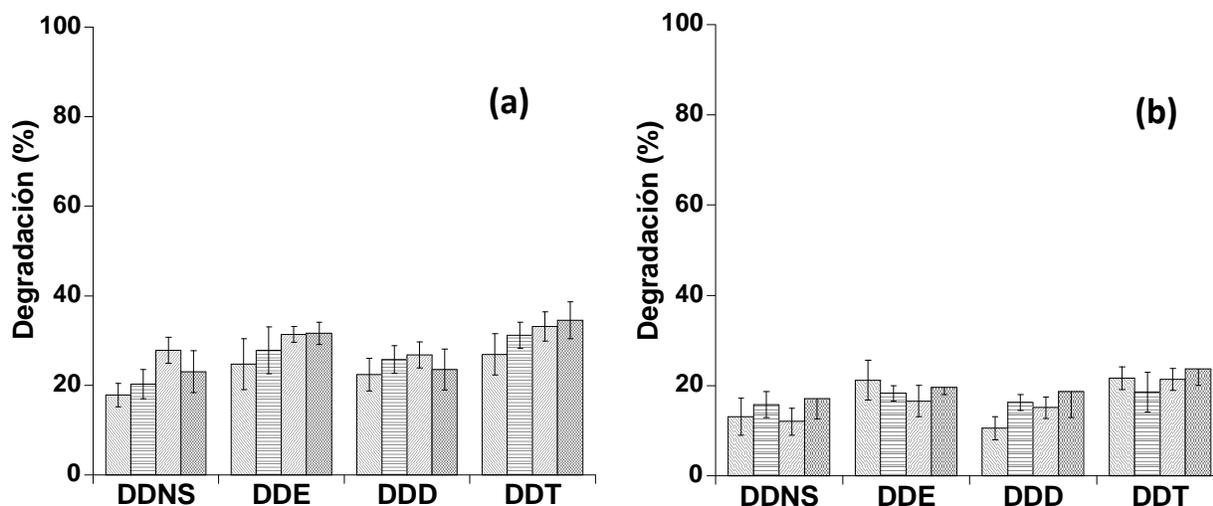
Al evaluar el efecto de los cosustratos en condiciones aerobias se observó que el tolueno incrementó la degradación de los DDX con respecto al uso de

difenilmetano y glicerol. Se encontró que los compuestos intermediarios (DDNS, DDD y DDE) tuvieron una mayor degradación que el DDT. Las bacterias predominantes identificadas en el suelo tratado con tolueno fueron del género *Rhodococcus* sp. y *Pseudomonas* sp., las cuales se han reportado con capacidad de degradar compuestos aromáticos por oxigenasas. En este sentido, el mecanismo de degradación propuesto señala que el tolueno bioestimula los microorganismos autóctonos con capacidad de metabolizar al tolueno e inducir una degradación sobre los DDX.

## 9.2. Bioestimulación en condiciones anóxicas

### 9.2.1. Tolueno

La Figura 21 muestra los porcentajes de las eficiencias de degradación del tratamiento con tolueno y el control (sin cosustrato) en condiciones anóxicas.

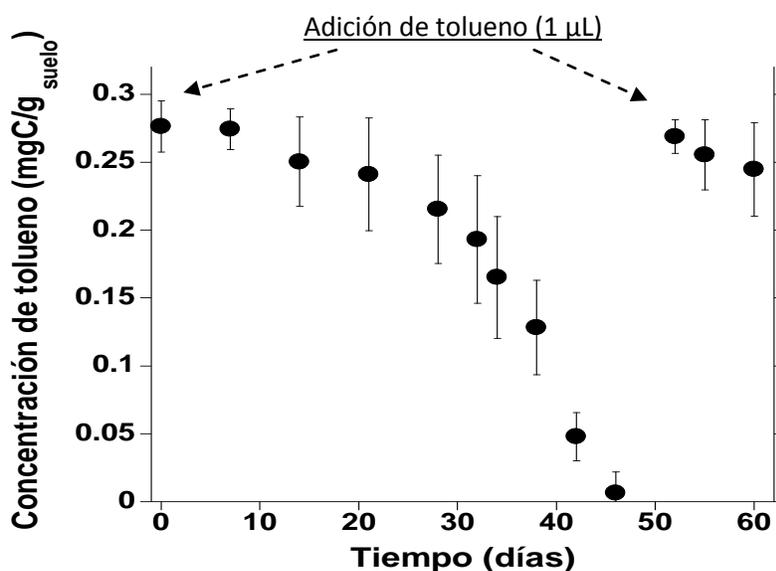


**Figura 21.** Porcentajes de degradación de los DDX a los 20, 30, 40 y 60 días de tratamiento. a) tratamiento con tolueno y b) control sin cosustrato.

La degradación del DDNS, DDE, DDD y DDT registrada a los 60 días de tratamiento fueron 1.35, 1.60, 1.31 y 1.46 veces mayores ( $p < 0.05$ ) que los

porcentajes obtenidos en los controles. Esto demuestra, también que el tolueno en condiciones anóxicas induce la degradación de los DDX. Sin embargo, estos valores son significativamente ( $p < 0.05$ ) menores que los alcanzados con este mismo cosustrato en condiciones aerobias (Figura 15).

La menor degradación de los DDX registrada en el sistema anóxico se atribuye al bajo consumo de tolueno ( $0.360 \text{ mgC/g}_{\text{suelo}}$ ) que se registró durante los 60 días de tratamiento. Esta reducción en el consumo del tolueno condujo a una baja producción de  $\text{CO}_2$  (Figura 25). La baja cantidad de tolueno metabolizado en el sistema anóxico se debe a que se registró una fase de adaptación de los microorganismos del suelo para degradar el tolueno de alrededor de 30 días. Posteriormente, el consumo de tolueno se incrementó alcanzando una tasa de  $0.012 \text{ mgC/g}_{\text{suelo.día}}$ .



**Figura 22.** Registro de la adición y agotamiento de tolueno en condiciones anóxicas durante los 60 días de tratamiento.

Estos resultados indican que, en condiciones anóxicas, los microorganismos autóctonos del suelo requieren de una etapa de adaptación para degradar el

tolueno. Algunos estudios indican que el periodo de adaptación de los microorganismos para metabolizar tolueno en condiciones anóxicas depende de la presencia y activación de la enzima bencilsuccinato sintetasa (Beller y col., 1992; Biegert y col., 1996; Qiao y Marsh, 2005; Riser-Roberts, 1998). Esta enzima es la responsable de la degradación del tolueno a través de la inserción del fumarato al grupo metilo de esta molécula. Posterior a este paso, se forma benzoyl-CoA, que es un intermediario central de la ruta de degradación anaerobia de compuestos aromáticos (Qiao y Marsh, 2005). La bencilsuccinato sintetasa se ha identificado en bacterias desnitrificantes, reductoras de hierro y sulfato reductoras (Biegert y col., 1996; Kunapuli y col., 2010; Qiao y Marsh, 2005). Riser-Roberts (1998) determinó que el tiempo de degradación del tolueno en condiciones anóxicas depende de la energía libre de reacción generada por el proceso de respiración anaerobia (desnitrificación, desasimilación de hierro, desasimilación de sulfato). Este autor señala que los periodos de degradación del tolueno pueden ser menores a 20 días en sistemas desnitrificantes o de desasimilación de hierro; entre 20 y 50 días, para sistemas desasimilación del sulfato; hasta de 1 año en sistemas metanogénicos.

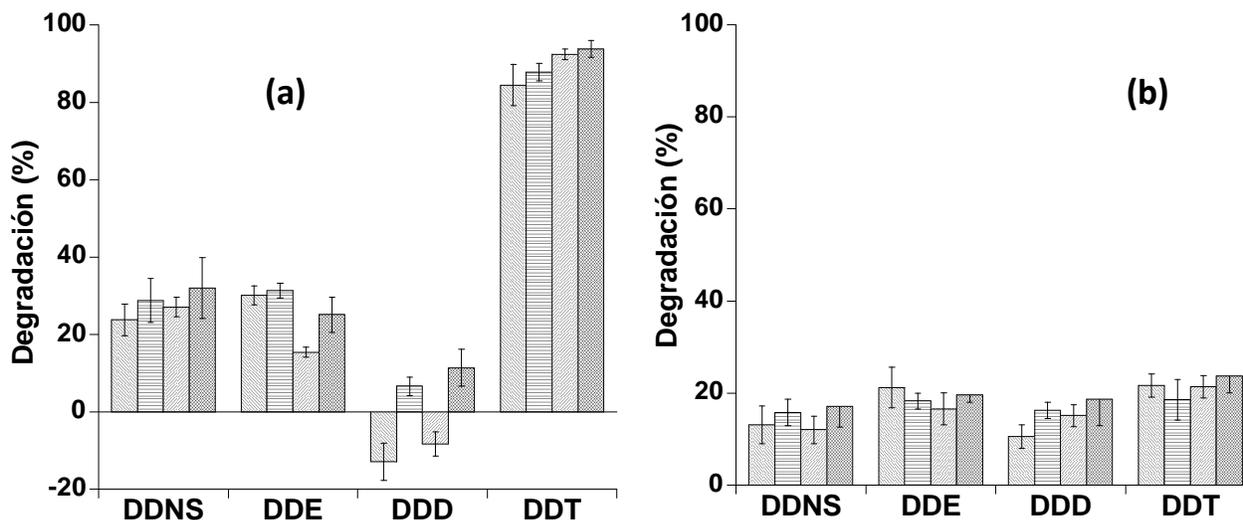
El contenido de hierro y sulfato en el suelo evaluado indica que el sistema anóxico no está limitado por la presencia de aceptores de electrones. En estos casos, los microorganismos pueden llevar a cabo el proceso de respiración anaerobia de desasimilación de hierro o de sulfato para producir energía. La adición del tolueno incrementa el contenido del donador de electrones, por lo que el sistema tampoco está limitado por este componente. Lo anterior indica que los microorganismos

autóctonos del suelo tienen una capacidad metabólica intrínseca limitada para degradar el tolueno y DDX en condiciones anóxicas.

El consumo de tolueno y la degradación de los DDX demuestran que los microorganismos autóctonos del suelo tienen mayor capacidad metabólica para degradar el tolueno y los DDX en condiciones aerobias que en condiciones anóxicas. Esto confirma que el proceso de degradación de DDX por bioestimulación se produce en mayor grado por la actividad de bacterias aerobias (*Rhodococcus* sp. y *Pseudomonas* sp.) con capacidad enzimática del tipo oxigenasas.

### 9.2.2. Glicerol

A partir del vigésimo día de tratamiento se registró una eficiencia de degradación de DDT de alrededor del 92% en los sistemas evaluados con glicerol en condiciones anóxicas (Figura 23).

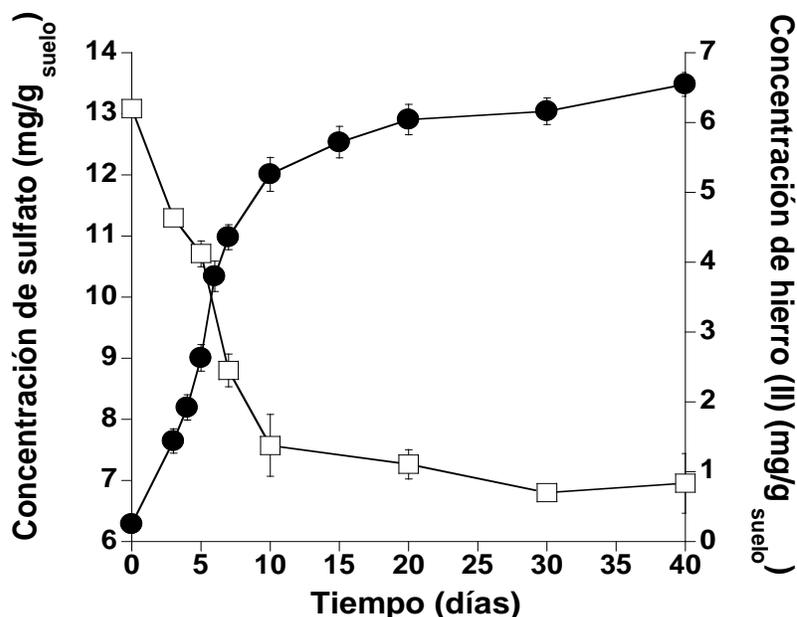


**Figura 23.** Porcentajes de degradación de los DDX a los 20, 30, 40 y 60 días de tratamiento. a) tratamiento con glicerol y b) control (sin cosustrato). Los valores negativos del DDD representan su acumulación en el sistema.

Las degradaciones registradas del DDT fueron 3.88 veces mayor ( $p < 0.05$ ) que los valores obtenidos en los controles sin cosustrato. Al día 20 y 40 de tratamiento se registró una acumulación de DDD en el sistema (Figura 23a). Al día 60 de tratamiento, los valores de degradación del DDNS, DDE y DDD fueron 1.82, 1.30 y 0.61 veces mayor que los controles.

Diversos estudios (Biegert y col., 1996; Foght y col., 2001; Li y col., 2010; McIntyre y Mills, 1974) han reportado la acumulación de DDD como resultado de la transformación de DDT en condiciones anóxicas. McIntyre y Mills (1974) reportan que el DDD se produce por la deshalogenación reductiva del DDT en condiciones anóxicas. Incluso, señalan que el DDD es el principal producto de degradación detectado en sistemas anóxicos como sedimentos o suelos inundados, ricos en materia orgánica. La formación y acumulación del DDD registrada en el suelo tratado con glicerol en condiciones anóxicas indica que el DDT sufrió un proceso de deshalogenación reductiva. Li y col. (2010) mencionan que, en condiciones anóxicas, el principal proceso de degradación del DDT en suelos que contienen minerales de hierro es la deshalogenación reductiva abiótica inducida por la actividad de bacterias reductoras de hierro (BRH) al producir la reducción del Fe (III) a Fe (II). Durante el tratamiento con glicerol en condiciones anóxicas se registraron 3 efectos: la disminución de la concentración del sulfato (Figura 24), la formación de sulfuro de hierro (reportado como hierro (II)) (Figura 24) y la producción de  $\text{CO}_2$  (Figura 25). Las concentraciones de estos parámetros registrados a los 40 días de tratamiento fueron de alrededor de 54%, 6.6  $\text{mg/g}_{\text{suelo}}$  y 1.4  $\text{mgC/g}_{\text{suelo}}$ , respectivamente. Durante el tratamiento, se observó un cambio de color del suelo: de rojizo a negro. Este cambio de coloración se registró a los 8

días de tratamiento y se debió a la formación de sulfuro de hierro en el sistema, generado por la producción biogénica de sulfuro y la presencia de hierro en el suelo.

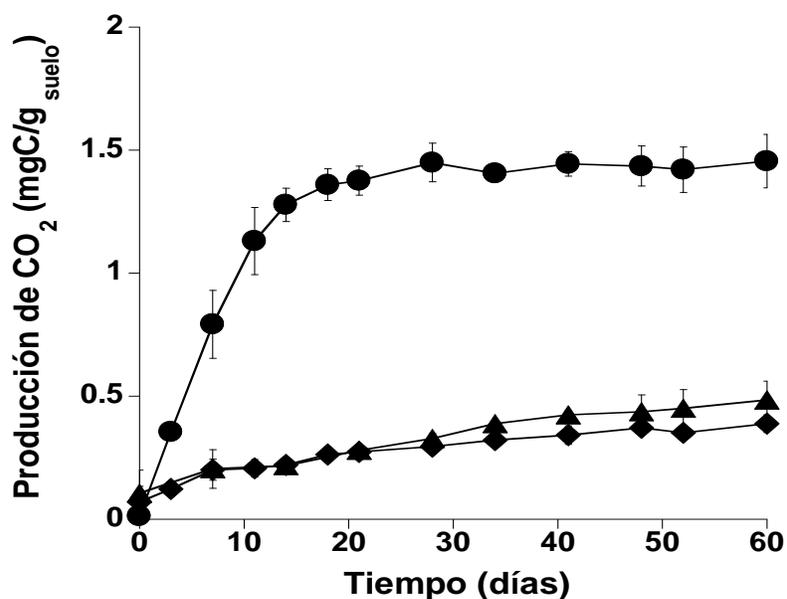


**Figura 24.** Concentración de sulfato ( □ ) y concentración de hierro (II) asociado a la formación de mackinawita ( ● ).

La Figura 25 muestra el patrón de la producción de  $\text{CO}_2$  en el sistema con glicerol en condiciones anóxicas. La máxima tasa de producción de  $\text{CO}_2$  ( $0.103 \text{ mgC/g}_{\text{suelo}} \cdot \text{día}$ ) se registró en los primeros 10 días; posteriormente, la velocidad de producción disminuyó. A partir del vigésimo día se registró una concentración constante de  $\text{CO}_2$  de  $1.4 \text{ mgC/g}_{\text{suelo}}$ , que corresponde a una mineralización teórica del glicerol del 56%. Este resultado indica que el glicerol sirvió como fuente de carbono y energía para soportar el crecimiento y la actividad de BSR en el suelo tratado en condiciones anóxicas.

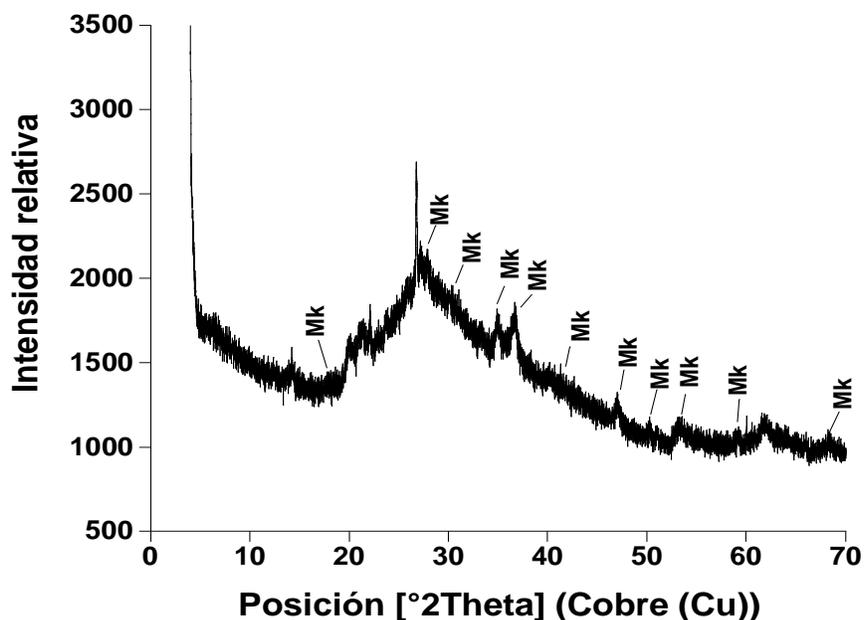
La actividad de BSR en el suelo tratado muestra que los microorganismos autóctonos del suelo utilizan como aceptor de electrones al sulfato, en lugar del hierro. Este resultado es diferente al reportado por Li y col. (2010), quienes

reportaron la actividad de BRH en condiciones anóxicas. La actividad de las BSR indica que estas bacterias fueron más competitivas que otros tipos de microorganismos anaerobios (BRH, metagenogénicas, entre otras) ante el sustrato de crecimiento.



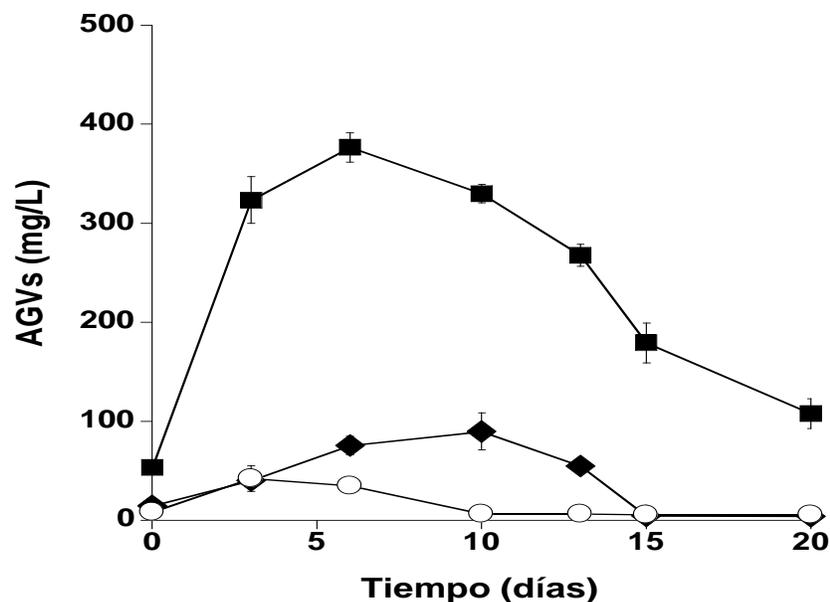
**Figura 25.** Producción de CO<sub>2</sub>. Control (◆), glicerol, (●) y tolueno (▲). Los datos de los tratamientos son los corregidos restando el valor del control.

Es importante señalar que, durante la disolución del sulfuro de hierro con HCl al 0.5N se detectó la presencia de sulfuro gaseoso. Además de que en todas las muestras analizadas por cromatografía de masas se identificó cualitativamente azufre elemental (S<sup>0</sup>). De hecho, se identificó monosulfuro de hierro tetragonal (mackinawita (Fe<sub>1+x</sub>S)) en el análisis de difracción de rayos X (Figura 26).



**Figura 26.** Detección de mackinawita (Mk) por difracción de rayos X.

Por otra parte, la Figura 27 muestra que en el sistema anóxico con glicerol hubo producción y acumulación de AGVs. Esto indica que el glicerol se oxida parcialmente a AGVs (productos intermediarios). El principal AGVs detectado fue el ácido acético (Figura 27). Los AGVs se acumularon durante los primeros 8 días de tratamiento; posteriormente, las concentraciones de AGVs disminuyeron. La disminución de las concentraciones de los AGVs a partir del octavo día, se debe muy probablemente a que estos compuestos fueron utilizados como fuente de carbono y energía, una vez que el glicerol se agotó en el sistema. Esto indica que tanto el glicerol como los AGVs son utilizados como sustratos de crecimiento por las BSR u otros microorganismos del suelo. El aumento del pH registrado a los 20 días del tratamiento ( $0.28 \pm 0.06$  unidades de pH) indica que la acumulación de AGVs no fue la suficiente para mantener o disminuir el valor del pH a la cual se ajustó inicialmente el suelo tratado ( $pH$  de  $7.0 \pm 0.1$ ).



**Figura 27.** Producción y consumo de AGVs: acético (■); propiónico (◆) y butírico (○).

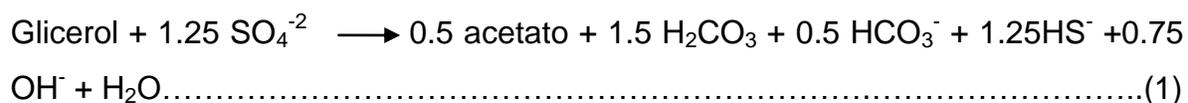
La Tabla 11 muestra el balance de carbono del tratamiento anóxico con glicerol, a diferentes tiempos de tratamiento. El balance se realizó utilizando los datos de producción de CO<sub>2</sub> y AGVs, asimismo, se consideró que el consumo total de glicerol ocurrió al décimo día de tratamiento. El balance demuestra que a partir de los 10 días de tratamiento, alrededor de un 70% del glicerol fue transformado a CO<sub>2</sub> y AGVs.

**Tabla 11.** Balance de sustratos carbonados: tratamiento con glicerol en condiciones anóxicas.

Tiempo	Inicio	3 días	6 días	10 días	15 días	20 días
<b>Balance*</b>	<b>mgC/g<sub>suelo</sub></b>					
<b>Bióxido de carbono</b>	0.0 ± 0.0	0.31 ± 0.03	0.84 ± 0.14	1.16 ± 0.13	1.36 ± 0.07	1.49 ± 0.06
<b>Á. acético</b>	0.07 ± 0.0	0.43 ± 0.03	0.50 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.14 ± 0.01
<b>Á. propiónico</b>	0.02 ± 0.0	0.07 ± 0.05	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.01 ± 0.0	0.01 ± 0.0
<b>Á. butírico</b>	0.02 ± 0.0	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.01 ± 0.0	0.01 ± 0.0	0.01 ± 0.0
<b>CARBONO TOTAL</b>	0.11	0.89	1.53	1.76	1.62	1.55

\*Cantidad de glicerol inicial (2.5 ± 0.1 mgC/g<sub>suelo</sub>).

Es probable que el carbono restante (alrededor del 30%), necesario para cerrar el balance, se encuentre en el sistema como carbonatos, compuestos orgánicos intermediarios diferentes a los AGV<sub>S</sub> (lactato, alcoholes, piruvato, entre otros) y biomasa. La formación de carbonatos es factible de acuerdo con las reacciones redox que se han reportado para el sulfato: con glicerol (1) y con acetato (2) (Bertolino y col., 2014):

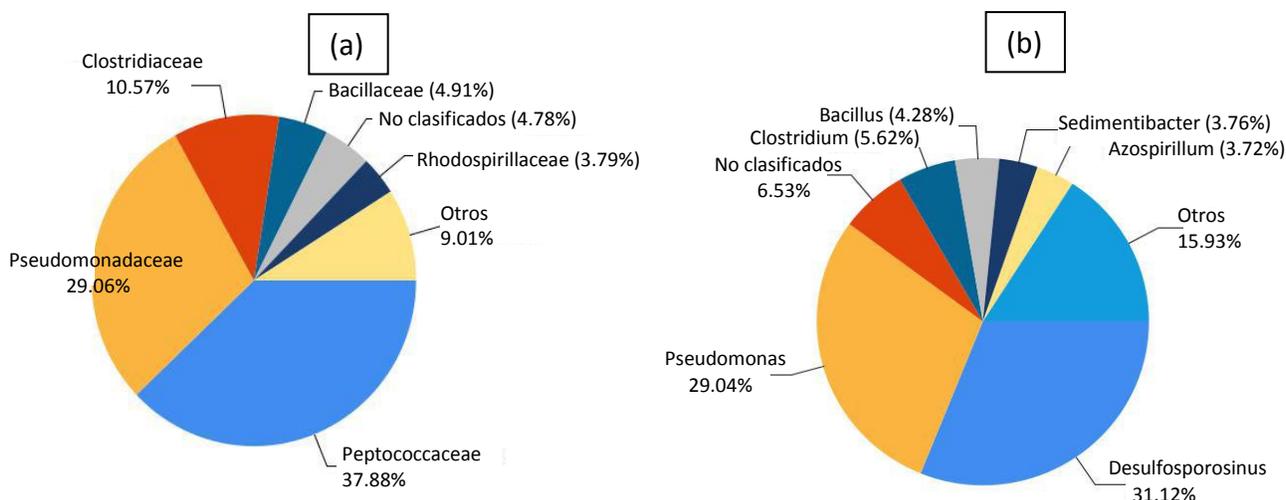


Es importante mencionar, que al día 20 de tratamiento se registró un aumento del pH del suelo de 7.0 a  $7.28 \pm 0.06$  unidades. Este incremento posiblemente está relacionado a la formación de carbonatos y bicarbonatos durante el tratamiento.

### 9.2.3. Composición microbiana del suelo tratado con glicerol

En este apartado se presenta el resultado del análisis metagenómico del suelo tratado con glicerol en condiciones anóxicas. Este tratamiento fue seleccionado porque registró la mayor degradación de DDX en comparación con el tolueno. Los resultados del análisis metagenómico mostraron que las familias predominantes de bacterias identificadas fueron *Peptococcaceae* (37.9%) y *Pseudomonadaceae* (29.1%). De estas familias de bacterias, solo *Peptococcaceae* alberga diversos tipos de BSR, principalmente del género *Desulfosporosinus*. Este género de bacterias se identificaron en un 31.1% (Figura 28). *Desulfosporosinus auripigmenti* fue la especie predominante en el suelo tratado con glicerol en condiciones anóxicas. En la Figura A4 (anexo A), se

presenta información del phylum y el género de bacterias del suelo tratado con glicerol.

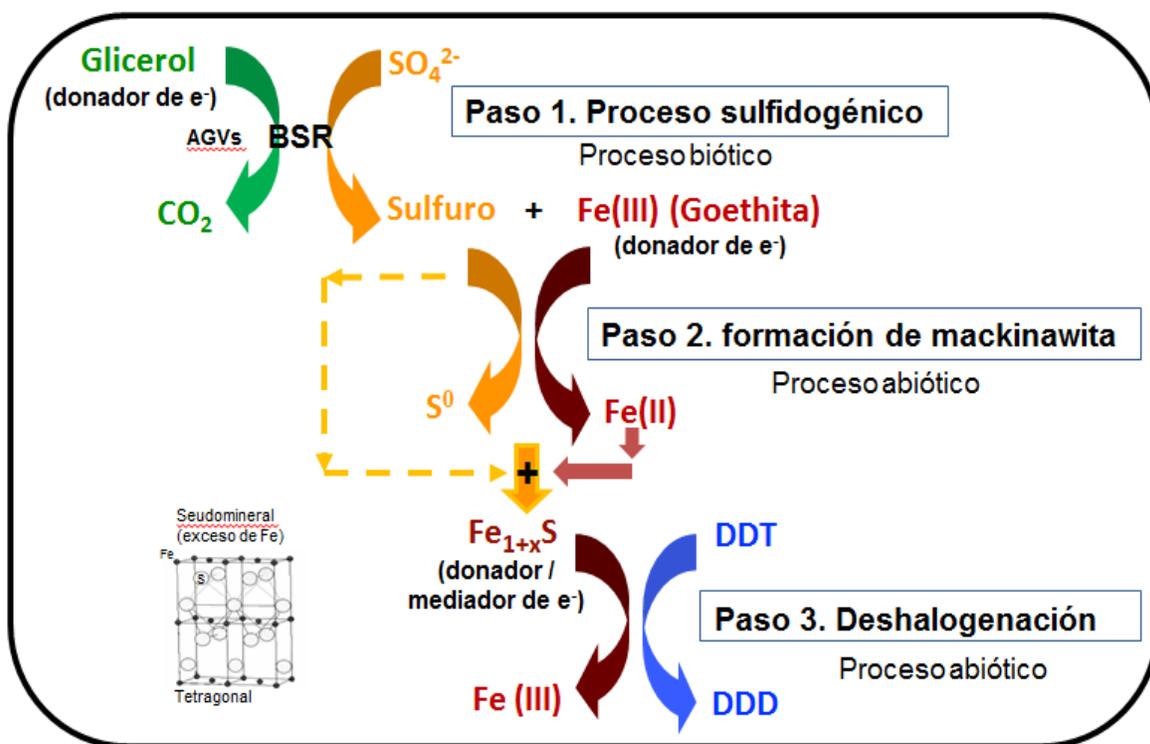


**Figura 28.** Familia (a) y género (b) de bacterias identificadas en las muestras de suelo tratado con glicerol.

La identificación de BSR en el suelo tratado confirma que estas bacterias son las responsables de la disminución de la concentración de sulfato en el suelo. La figura A3 (anexo A) muestra un incremento en la cantidad total de bacterias (número de copias de genes 16S rDNA) en el suelo tratado con glicerol en condiciones anóxicas con respecto al control. La mayoría de las especies de BSR son anaerobias estrictas (Postgate, 1984), sin embargo, también se ha reportado que algunas especies tienen mecanismos de defensa antioxidativos que les permite sobrevivir en condiciones de microaerofilia (bajas concentraciones de oxígeno) (Brioukhanov y col., 2010). Estas adaptaciones a permitido que las BSR se encuentren ampliamente distribuidas en ambientes tanto en sistemas acuáticos como terrestres, y cumplen un papel importante en la mineralización de la materia orgánica (Muyzer y Stams. 2008).

### 9.2.4. Propuesta del mecanismo de degradación de DDX con el uso de glicerol en condiciones anóxicas

La actividad de BSR, la formación de mackinawita y la acumulación del DDD, en el suelo tratado con glicerol en condiciones anóxicas, indican que la degradación del DDT ocurre a través de un mecanismo que involucra de tres procesos: 1) la reducción de sulfato, 2) la formación de mackinawita ( $\text{Fe}_{1+x}\text{S}$ ) y 3) la transformación abiótica del DDT a DDD (Figura 29).

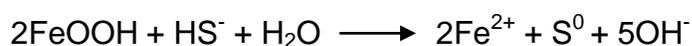


**Figura 29.** Mecanismo de degradación del DDT producido por la formación de mackinawita en condiciones anóxicas: Mecanismo propuesto de acuerdo con los resultados obtenidos durante el tratamiento con glicerol.

Diversos estudios han demostrado que la mackinawita es un compuesto que produce la deshalogenación reductiva abiótica de diversos hidrocarburos clorados (1,2-dicloroetano, tricloroetileno, tetracloroetileno) (Gong y col., 2016; He y col., 2010; Jeong y col., 2003 y 2007). Sin embargo, actualmente, existe escasa información de la degradación del DDT por la mackinawita formada en suelos por

la actividad de BSR. En el estudio realizado por Pirnie y col. (2006), se demostró que la presencia de sulfuro de hierro induce la degradación abiótica del DDT en un 56% en un sistema acuoso. No obstante, estos autores no especificaron qué tipo de sulfuro de hierro fue utilizado (amorfo, mackinawita, pirita, entre otros). Algunos estudios (He y col., 2010; Jeong y col., 2010; Rickard y Luther, 2007) indican que la deshalogenación reductiva abiótica de hidrocarburos clorados se produce porque la mackinawita tiene la propiedad de actuar como donador (agente reductor) o mediador (catalizador) de electrones. La mackinawita actúa como agente reductor cuando se oxida, en presencia de aire, a hierro (III) y a azufre elemental (Jeong y col., 2010).

La mackinawita se forma por la reacción entre el sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y el hierro (II). Esta reacción puede presentarse en el medio ambiente por medio de formación de sulfuro de hidrógeno que se produce por la actividad de BSR (proceso sulfidogénico) en condiciones anóxicas. El sulfuro biogénico en forma de ion hidrosulfuro (HS<sup>-</sup>) genera una reacción de reducción del Fe(III) a Fe(II). El hierro reducido, a su vez, reacciona con el sulfuro para formar sulfuros de hierro. El mecanismo propuesto (Figura 29) indica que el ion HS<sup>-</sup> reacciona inicialmente con la goethita (FeOOH) para formar Fe (II) y azufre elemental (S<sup>0</sup>), de acuerdo con la siguiente reacción (He y col., 2010):



Posteriormente, el Fe (II) reacciona con el sulfuro generado constantemente por las BSR para formar sulfuros de hierro ( $\text{Fe}^{2+} + \text{S}^{2-} \longrightarrow \text{FeS}$ ).

Diversos estudios (Neal y col., 2001; He y col., 2010) indican que, en la reacción del sulfuro y el hierro (II), se forma inicialmente sulfuro de hierro amorfo y,

posteriormente se genera la mackinawita, que es un monosulfuro de hierro tetragonal metaestable (pseudo mineral). Este compuesto es el precursor de otros sulfuros de hierro más estables como pirrotita, esmitita, greigita y pirita (He y col., 2010). La mackinawita es un compuesto con exceso de hierro ( $\text{Fe}_{1+x}\text{S}$  con  $0 < x < 0.07$ ). La desproporción entre estos dos elementos hace que este compuesto tenga propiedades eléctricas. Esta propiedad, es la responsable de que la mackinawita sea más reactiva que otros sulfuros de hierro; éstos actúan como donadores o mediadores de electrones durante el proceso de deshalogenación reductiva (He y col. 2010). Jeong y col. (2007) demostraron que el Fe(II) disuelto u otros metales divalentes actúan como donadores de electrones al interactuar sobre la superficie de la mackinawita.

#### **9.2.5. Conclusiones parciales**

En condiciones anóxicas, el uso del glicerol como cosustrato tiene un efecto positivo sobre la degradación del DDT a partir del día 20 de tratamiento (eficiencias de degradación de alrededor del 90%). La acumulación de DDD en el sistema indica que el DDT sufrió un proceso de deshalogenación reductiva. La actividad de BSR (*Desulfosporosinus auripigmenti*) y la identificación de mackinawita en el sistema anóxico con glicerol revelan que la degradación del DDT fue generada por un proceso de abiótico deshalogenación reductiva inducido por mackinawita. En suma, se identificó que el mecanismo de degradación de DDX ocurre a través de un proceso que involucra tres pasos: i) la desasimilación del sulfato, ii) la formación de mackinawita y iii) la transformación del DDT a DDD por  $\text{Fe}_{1+x}\text{S}$ .

### 9.3. Sistema acoplado anóxico/aerobio

De acuerdo con los resultados anteriores, se producen dos mecanismos de degradación de los DDX en el suelo tratado: uno se produce al utilizar tolueno en condiciones aerobias (Figura 20) y el otro se produce al utilizar glicerol en condiciones anóxicas (Figura 29). Estos resultados muestran que para eliminar de forma efectiva al DDT y a sus compuestos intermediarios se requiere de la implementación de un tratamiento acoplado: anóxico con glicerol para transformar el DDT en DDD (proceso inducido por la formación de mackinawita) y aerobio con tolueno para degradar los compuestos intermediarios del DDT (proceso inducido por microorganismos que degradan el tolueno). Es decir, en primera instancia llevar a cabo la transformación del DDT a DDD por deshalogenación reductiva y, subsecuentemente, fomentar la ruptura del anillo aromático de los compuestos intermediarios. La Tabla 12 muestra las eficiencias de degradación de los DDXs en el tratamiento acoplado anóxico/aerobio y no acoplado.

**Tabla 12.** Eficiencias de degradación de los tratamientos no acoplado y acoplado anóxico/aerobio.

Tratamientos	Porcentajes de degradación			
	DDT	DDNS	DDE	DDD
<b>Anóxico no acoplado (60 días) - Glicerol</b>	93.8 ± 2.2 (b)	32.0 ± 7.7 (e)	25.2 ± 4.3 (e)	11.4 ± 4.8 (f)
<b>Aerobio no acoplado (60 días) - Tolueno</b>	54.2 ± 2.7 (d)	86.3 ± 3.2 (b)	72.6 ± 1.5 (c)	74.9 ± 2.5 (c)
<b>Anóxico/Aerobio* (20/40 días) acoplado</b>	100 (a)	93.4 ± 5.2 (b)	70.7 ± 5.6 (c)	55.1 ± 3.1 (d)

\*20 días de tratamiento anóxico con glicerol y 40 días de tratamiento aerobio con tolueno. Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (prueba de intervalos múltiples de Duncan).

La prueba de rangos múltiples de Duncan indica que, en el caso del DDT, los tres tratamientos son significativamente diferentes, obteniéndose la mayor degradación en el tratamiento acoplado. Para el DDNS y DDE se observó que entre el tratamiento acoplado y no acoplado con tolueno no existe una diferencia significativa. En tanto, que los tres tratamientos mostraron diferencias para el DDD (Tabla 12).

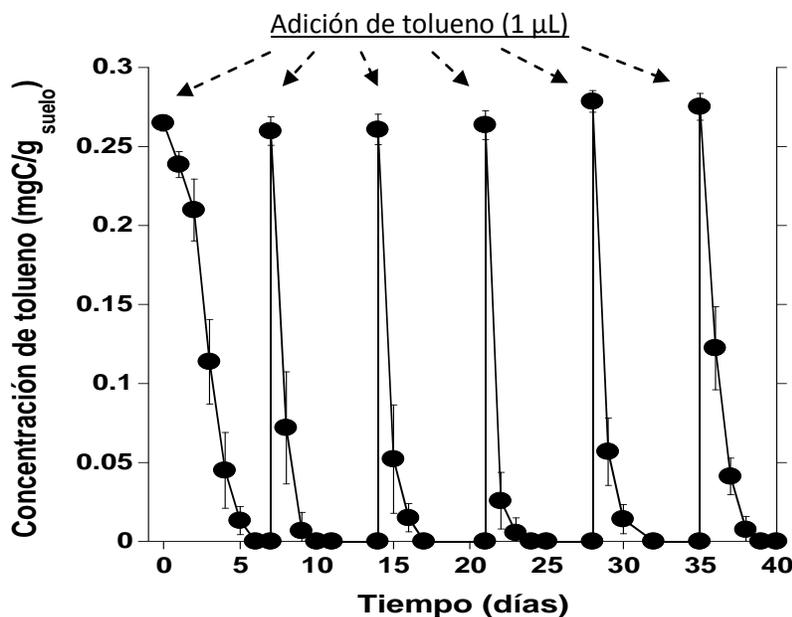
La degradación completa del DDT y del 93.4% para el DDNS demuestra que el tratamiento acoplado anóxico/aerobio es la mejor estrategia de bioestimulación, en comparación con los sistemas no acoplados, debido a que involucra los dos tipos de mecanismos de degradación antes mencionados. Esto demuestra que el tratamiento acoplado mejora la degradación de los DDX al pasar de condiciones anóxicas con glicerol a aerobias con tolueno (Tabla 12).

En el tratamiento acoplado se registraron cambios geoquímicos en el suelo durante la etapa del tratamiento en condiciones anóxica y aerobia. A los 20 días del tratamiento anóxico con glicerol se registró una remoción de 59.2% de sulfato con respecto a su valor antes del tratamiento (valor inicial: 13 mg/g<sub>suelo</sub>), un incremento del nivel de Fe (II) de hasta el 30 veces su valor inicial ( $0.23 \pm 0.02$  mg/g<sub>suelo</sub>) y un incremento de pH  $7.0 \pm 0.1$  a  $7.25 \pm 0.05$ . El cambio de estos parámetros, corresponde a la actividad de BSR que provocan un proceso sulfidogénico en el suelo tratado.

Al pasar de condiciones anóxicas a aerobias a partir del día 20, para realizar el tratamiento acoplado con tolueno, los valores de los parámetros mencionados registraron un nuevo cambio. A los 40 días del tratamiento aerobio acoplado, se registró una concentración de sulfato de  $13 \pm 0.2$  mg/g<sub>suelo</sub>, niveles de hierro (II) de

$0.25 \pm 0.05$  mg/g<sub>suelo</sub> y pH de  $5.63 \pm 0.3$ . Esto indica que el sulfato y hierro (II) retornaron a los valores iniciales que tenía el suelo antes del tratamiento. El pH fue el único parámetro que no retornó a su valor inicial ( $7.0 \pm 0.1$ ). El incremento de la concentración de sulfato y la disminución del pH obedece a una posible actividad de bacterias sulfooxidantes; mientras que la disminución de la concentración del hierro (II), se produce por la re-oxidación de la mackinawita causada por la presencia de oxígeno en el sistema (condiciones aerobias).

La Figura 30 muestra el seguimiento del consumo de tolueno durante la etapa aerobia del tratamiento acoplado. El patrón del consumo de tolueno durante los 40 días del tratamiento, demuestra que las variaciones de pH, sulfato y hierro (II) producidas en la etapa anóxica con glicerol no fueron factores limitantes para la actividad de las bacterias aerobias que degradan los DDX.



**Figura 30.** Concentración de tolueno durante los 40 días del tratamiento acoplado.

Hay que resaltar que al pasar de condiciones anóxicas a aerobias, se inhibe el proceso sulfidogénico, por la presencia de oxígeno en el sistema. Esto se explica

debido a que la mayoría de las BSR son anaerobias estrictas y sólo algunas especies tienen baja tolerancia al oxígeno (Muyzer y Stams, 2008).

### **9.3.1. Conclusiones parciales**

El sistema acoplado anóxico/aerobio inducido en condiciones anóxicas con glicerol y en condiciones aerobias con tolueno mostró ser la estrategia más eficiente para eliminar DDX del suelo contaminado. En este caso, se registró la degradación completa del DDT, del DDNS con un  $93.4 \pm 5.2$  %, del DDE ( $70.7 \pm 5.6$  %) y del DDD con un  $55.1 \pm 3.1$ %. El sistema acoplado evidenció que el suelo sufre cambios geoquímicos (pH, concentración de sulfato y hierro (II)) en ambas etapas del tratamiento acoplado. También se demostró que los cambios geoquímicos generados por el proceso sulfidogénico en condiciones anóxicas no afectan el proceso posterior de degradación de los DDX evaluado en condiciones aerobias.

### **9.4. Empleo de ácido láctico, etanol, glucosa y bagazo de caña para fomentar la degradación del DDT por el mecanismo de formación de mackinawita.**

En esta sección se describen los resultados de las pruebas de cuatro diferentes cosustratos (ácido láctico, etanol, glucosa y bagazo de caña), utilizados para inducir el mecanismo de degradación del DDT por mackinawita en condiciones anóxicas. El objetivo de este ensayo fue determinar la capacidad de las BSR para utilizar diferentes fuentes de carbono y energía (donadores de electrones), y de esta forma fomentar el proceso sulfidogénico e inducir la formación de mackinawita para producir la deshalogenación reductiva abiótica del DDT de acuerdo con el mecanismo propuesto al utilizar glicerol en condiciones anóxicas

(Figura 29). La cantidad de cosustrato utilizado en cada tratamiento fue de  $2.5 \pm 0.1$  mgC/g<sub>suelo</sub>, excepto el bagazo de caña, cuya concentración inicial fue del 2.5, 5 y 10% (peso/peso). Los experimentos se realizaron en las mismas condiciones de pH 7, 30 °C, 100 rpm y 20 días de tratamiento) en las que se evaluó el glicerol. La Tabla 13 muestra que el empleo de diferentes cosustratos produce un consumo de sulfato y la formación de sulfuro de hierro (reportada como hierro (II)) en los suelos en condiciones anóxicas.

**Tabla 13.** Consumo de sulfato y concentración de Fe(II) asociado a la formación de mackinawita al día 20 de tratamiento.

Tratamientos	Consumo de sulfato (%)	Concentración de Fe (II) (mg/g <sub>suelo</sub> )*
Glicerol	$42.4 \pm 1.8$	$6.2 \pm 0.3$
Ácido láctico	$43.3 \pm 0.8$	$6.0 \pm 0.2$
Etanol	$34.5 \pm 1.1$	$4.8 \pm 0.2$
Glucosa	$52.1 \pm 1.5$	$6.6 \pm 0.3$
Bagazo 2.5%	$33.2 \pm 2.1$	$5.5 \pm 0.3$
Bagazo 5%	$62.4 \pm 1.2$	$7.3 \pm 0.5$
Bagazo 10%	$85.4 \pm 1.4$	$8.5 \pm 0.3$

\*Hierro (II) asociado a la formación de mackinawita.

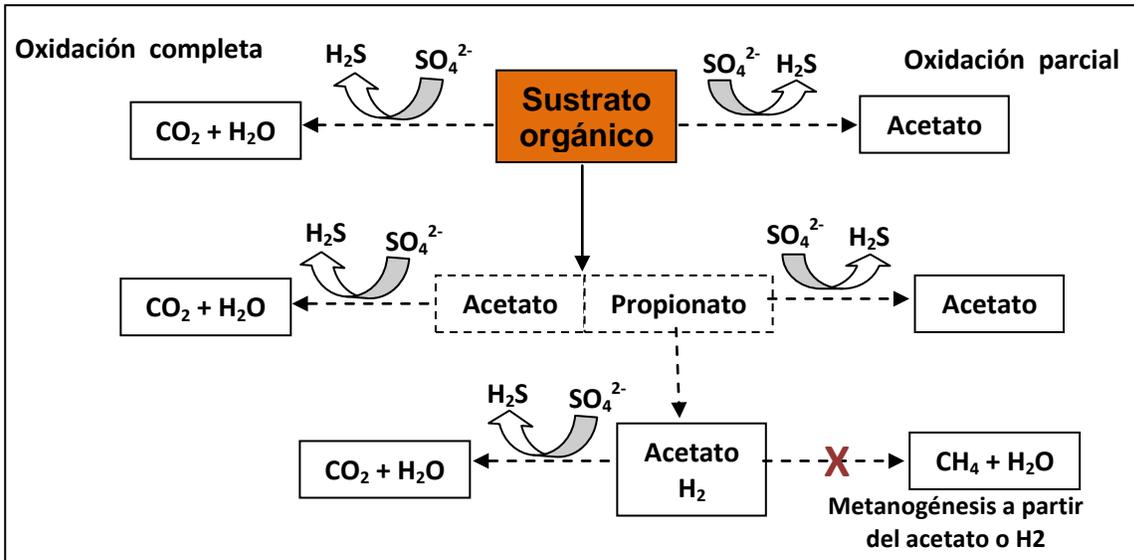
Estos resultados indican que las BSR presentes en el suelo pretratado con hierro tienen la habilidad de utilizar diferentes cosustratos orgánicos de fácil asimilación, así como materiales lignocelulósicos como bagazo de caña para generar el proceso sulfidogénico y la formación de mackinawita, que son los dos primeros pasos del mecanismo de degradación del DDT propuesto (Figura 29, sección 9.2.4). El consumo de sulfato en los ensayos con glicerol, ácido láctico, etanol, glucosa y bagazo del 2.5% se encontraron en un rango de 33 a 52% (Tabla 13).

Los valores del consumo de sulfato para el bagazo de caña al 5 y 10% fueron superiores a este rango. El mayor consumo de sulfato (85.4%) se registró en el tratamiento con bagazo al 10%.

La menor formación de hierro (II) se registró en el tratamiento con etanol, en tanto que la mayor cantidad fue para el tratamiento con bagazo de caña al 10%. En el tratamiento con bagazo de caña, se distingue que, a mayor cantidad de materia orgánica, se presenta un mayor consumo de sulfato (producción biogénica de sulfuro) y, por lo tanto, una mayor formación de mackinawita (reportado como hierro (II)), en comparación con los tratamientos con glicerol, ácido láctico, etanol y glucosa que contenían la misma cantidad de carbono cada uno. Las diferencias registradas de consumo de sulfato y producción de mackinawita (Tabla 13) muy posiblemente se deben a la versatilidad de las BSR de llevar a cabo la oxidación parcial o total del cosustrato. En la oxidación parcial se pueden generar diferentes productos intermediarios; algunos de los cuales se acumulan en el sistema, lo cual desfavorece que se produzca la transferencia directa de electrones para generar la oxidación completa del cosustrato y un mayor rendimiento de sulfuro biogénico.

La Figura 31 muestra todas las rutas metabólicas de oxidación de sustratos orgánicos por BSR. Esta figura indica que las BSR tienen diferentes capacidades para degradar un sustrato orgánico. Las BSR se clasifican en géneros (*Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfobacula*, entre otros) que producen una oxidación parcial de los sustratos orgánicos, es decir, generan compuestos intermediarios como los AGVs y en géneros (*Desulfonema*, *Desulfobacter*, *Desulfosarcina*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*,

*Desulforhabdus*, entre otros) que oxidan completamente los sustratos orgánicos (mineralización) (Muyzer y Stams, 2008).



**Figura 31.** Ruta metabólica de degradación de sustratos orgánicos de fácil asimilación por BSR (modificado de Bertolino y col., 2012).

Es importante señalar que en los tratamientos con los diferentes cosustratos (glicerol, ácido láctico, etanol, glucosa y bagazo de caña) en condiciones anóxicas no se registró en ninguno de los casos la producción de metano, por lo que se descarta el proceso metanogénico a partir de acetato o  $\text{H}_2$  en el sistema, como lo fue propuesto por Bertolino y col., 2012 (Figura 31). Esto indica que en el presente trabajo la inhibición de la producción de metanosa debió, muy probablemente, a un efecto de competencia por los sustratos entre las BSR y las bacterias metanogénicas.

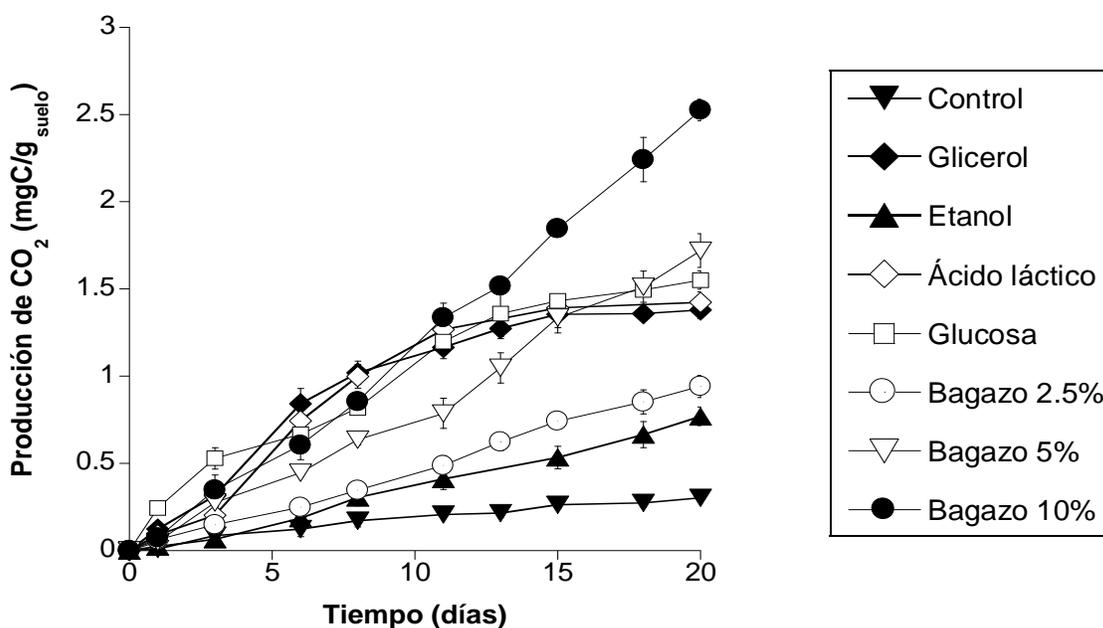
Muyzer y Stams (2008) señalan que las BSR tienen un papel importante en la mineralización de la materia orgánica presente en sistemas anóxicos. Incluso, diversos estudios (Goorissen et. al., 2003 y Rabus, et. al., 2000; Muyzer y Stams, 2008) indican que las BSR pueden utilizar diversos compuestos orgánicos de fácil

asimilación como fuente de carbono y energía: lactato, etanol, acetato, glicerol, glucosa y fructosa. En años recientes se ha demostrado que las BSR crecen a expensas de la degradación de polisacáridos como la celulosa y el almidón (Muyzer y Stams, 2008). En estos casos, el crecimiento y actividad de las BSR dependen de los procesos metabólicos de otros microorganismos para degradar los polisacáridos a compuestos reducidos (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido láctico, xilosa, etanol e hidrógeno) que son utilizados como fuente de carbono y energía en la respiración anaerobia de las BSR.

La Figura 32 muestra que el patrón de producción de CO<sub>2</sub> a partir de ácido láctico y glucosa fue muy similar al registrado en el tratamiento con glicerol. En estos tratamientos, la máxima velocidad de producción de CO<sub>2</sub> (alrededor de 0.11 mgC/g<sub>suelo</sub>.día) se registró en los primeros 10 días. La producción de CO<sub>2</sub> en el tratamiento con etanol no mostró el mismo patrón que los tratamientos anteriores, además de que se registró una menor velocidad de producción de CO<sub>2</sub> (0.04 mgC/g<sub>suelo</sub>.día). Los valores de mineralización teórica calculados al día 20 de tratamiento fueron del 54% para el ácido láctico, 59% para la glucosa y 27% para el etanol. Estos resultados una posible oxidación parcial del etanol en condiciones anóxicas.

En los tratamientos con bagazo al 2.5, 5 y 10%, se observa que la formación de CO<sub>2</sub> incrementa constantemente durante los 20 días de tratamiento. Las tasas de producción de CO<sub>2</sub> en estos casos fueron de 0.047, 0.084 y 0.129 mgC/g<sub>suelo</sub>.día, respectivamente. Al vigésimo día de tratamiento se alcanzó una máxima concentración de CO<sub>2</sub> (mgC/g<sub>suelo</sub>) de 0.94 para el 2.5% de bagazo, 1.72 para el 5% de bagazo y 2.53 para el 10% de bagazo. Los patrones de producción de CO<sub>2</sub>

registrados durante los 20 días de tratamiento con bagazo (Figura 32) muestran que los microorganismos del suelo tienen la capacidad de metabolizar los materiales lignocelulósicos del bagazo de caña para producir compuestos orgánicos de más fácil asimilación para las BSR y de esta forma inducir el proceso sulfidogénico. Esto indica también que a mayor cantidad de bagazo de caña se produce una mayor formación de compuestos orgánicos de fácil asimilación y, por lo tanto, una mayor producción de CO<sub>2</sub>.

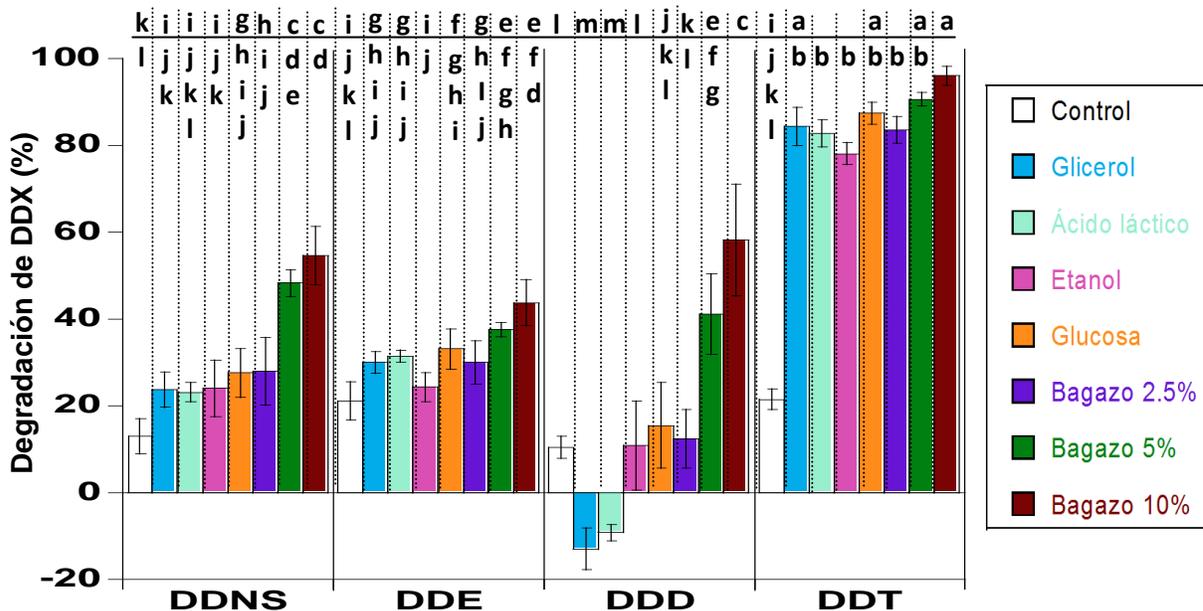


**Figura 32.** Producción de CO<sub>2</sub> a partir de diferentes fuentes de carbono en condiciones anóxicas. Los datos de los tratamientos son los corregidos restando el valor del control.

El análisis del contenido total de carbono soluble en agua (azúcares residuales solubles) realizado al bagazo de caña mostró que este residuo agroindustrial tiene una baja cantidad de carbono soluble ( $3.4 \pm 0.2$  mgC/g<sub>bagazo</sub>), que representa una carga de carbono (mgC/g<sub>bagazo</sub>) de 0.08 para el 2.5% de bagazo, 0.17 para el 5% de bagazo y 0.34 para el 10% de bagazo. Esto demuestra que en cada experimento con bagazo de caña se tuvo una baja cantidad de carbono disponible

como azúcares solubles, por lo que la producción de CO<sub>2</sub> en estos sistemas se debió principalmente a la degradación del bagazo de caña.

En la Figura 33 se muestra el efecto de los cosustratos evaluados sobre la degradación de los DDX a 20 días de tratamiento. Los porcentajes de degradación de DDNS y DDT de todos los cosustratos evaluados fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) a los valores obtenidos en el control sin cosustrato. Sin embargo entre algunos tratamientos no existen diferencias significativas, como el caso del DDT, en el tratamiento con glicerol, glucosa y bagazo 5% (letras “a y b”) (Figura 33). La prueba de rangos múltiples de Duncan indica que la mayor degradación se observó, para el DDT, en el tratamiento con bagazo al 10% (letra “a”), en tanto que, el DDD, también registró la mayor diferencia significativa del grupo de tratamiento (letra “c”), seguido del DDNS (letras “c y d”) y del DDE (letras e, f y d).



**Figura 33.** Degradación de DDT y sus intermediarios mediante el uso de diferentes fuentes de carbono; tiempo de tratamiento 20 días. El valor negativo del DDD representa su acumulación en el sistema. Los valores con diferentes letras son significativamente diferentes (prueba de intervalos múltiples de Duncan).

Los valores de la Tabla 13 y Figura 33, muestran que las más alta eficiencia de degradación de los DDX se observó en el tratamiento donde se registró la mayor concentración de Fe(II) ( $8.5 \pm 0.3 \text{ mg/g}_{\text{suelo}}$ ): tratamiento con bagazo al 10% (Figura 33 y Tabla 13). Este resultado confirma que la formación de mackinawita está relacionada con la degradación del DDT vía deshalogenación reductiva abiótica, que es el tercer paso del mecanismo propuesto en este trabajo (Figura 29, sección 9.2.4). En todos los tratamientos evaluados, se observó un cambio de color del suelo debido a la formación de mackinawita ( $\text{Fe}_{1+x}\text{S}$ ), entre el octavo y el décimo día de tratamiento.

El incremento significativo en la degradación de los compuestos intermediarios (DDNS, DDE y DDD) registrado en los tratamientos con bagazo de caña al 5% y 10% (Figura 33), se debe muy probablemente a la actividad de los microorganismos del suelo que producen la degradación de los compuestos lignocelulósicos del bagazo de caña. Estos resultados obtenidos con el uso de bagazo de caña al 5 y 10% son importantes debido a que existen escasos estudios de bioestimulación que indiquen que la degradación de los DDX se produce en condiciones anóxicas al utilizar residuos agroindustriales. Numerosos estudios han demostrado que en condiciones aerobias, los residuos agroindustriales (café, maíz, aceite de palma, entre otros) mejoran la degradación de los DDX (Barragán-Huerta y col., 2007; Lilia y col., 2013; Sari y col., 2013). En la mayoría de estos estudios, los microorganismos responsables de la degradación de los DDX son hongos de la pudrición blanca (HPB). La degradación de los DDX por estos hongos se produce por enzimas no específicas (lacasa, manganeso-peroxidasa y lignina-peroxidasa), que están implicadas en la

degradación de la celulosa y lignina (Leving y col., 2004; Pointing, 2001; Ruiz-Aguilar y col., 2002).

El interés por el uso del bagazo de caña para degradar DDX se debe principalmente a que este tipo de material tiene un bajo costo porque es un subproducto generado de la industria azucarera. En este sentido, su uso como cosustrato disminuye los costos de los insumos requeridos para realizar el tratamiento de suelos contaminados por la técnica de bioestimulación. Además, el uso del bagazo de caña puede servir para mejorar las propiedades del suelo como son la porosidad, la humedad, la textura y la relación carbono/nitrógeno.

#### **9.4.1. Conclusiones parciales**

Los géneros de BSR del suelo (identificadas como *Desulfosporosinus*) tienen la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono y energía (glicerol, ácido láctico, etanol, glucosa y bagazo de caña) para generar el proceso sulfidogénico en condiciones anóxicas. Esto demuestra que el mecanismo de degradación del DDT propuesto en condiciones anóxicas puede ser iniciado por diversos compuestos orgánicos. De estos cosustratos evaluados, el bagazo de caña al 10% mostró generar la mayor degradación de los DDX, lo que se relaciona con la alta concentración de mackinawita registrada en este tratamiento (hasta 8.5 mg Fe(II)/g<sub>suelo</sub>), mientras que las degradaciones de los compuestos intermediarios muy probablemente está vinculada con el proceso metabólico de los microorganismos del suelo que producen la degradación del bagazo de caña.

## **10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN III. BIOESTIMULACIÓN DEL SUELO ORIGINAL (SIN TRATAMIENTO DE HIERRO)**

## 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN III. SUELO ORIGINAL

Este capítulo se divide en dos secciones (10.1 y 10.2). En la primera sección se muestra los resultados de degradación de los DDX obtenidos de la formación de mackinawita, en condiciones anóxicas, utilizando glicerol y bagazo de caña. En la segunda sección se muestra los resultados de la actividad de los microorganismos del suelo que oxidan tolueno en condiciones aerobias.

### 10.1. Degradación de DDX por el mecanismo de formación de mackinawita.

#### 10.1.1. Glicerol

En la Tabla 14, se presentan los valores de degradación de los DDX al día 20 de tratamiento. El tratamiento con glicerol favoreció, como se esperaba, la transformación del DDT a DDD. El DDD se acumuló alrededor de 8.1 veces el valor del control sin cosustrato, en tanto que las degradaciones del DDT y DDE fueron de 12 y 4.7 veces mayor que los valores del control (Tabla 14).

**Tabla 14.** Porcentajes de degradación de DDX y valores de hierro (II) registrados a 20 días del tratamiento del suelo original con glicerol.

Tratamiento	DDT (%)	DDD (%)	DDE (%)	Fe (II) (mg/g <sub>suelo</sub> )**
Control	2.3 ± 0.9	2.9 ± 1.2	2.8 ± 3.1	0.062 ± 0.02
Anóxico				
Glicerol	27.6 ± 2.1	-23.5 ± 8.3*	13.1 ± 1.8	2.4 ± 0.3

\*Los valores negativos del DDD representan su acumulación en el sistema.

\*\*Concentración de hierro (II) extraída con HCl al 0.5N

Al día 20 de tratamiento se registró un consumo de sulfato del  $40.6 \pm 0.4\%$  y una producción de  $\text{CO}_2$  de  $1.1 \pm 0.2 \text{ mgC/g}_{\text{suelo}}$ . La formación de sulfuro de hierro

(reportado como Fe (II)) fue de 2.4 mg/g<sub>suelo</sub>. Asimismo, el suelo tratado registró un cambio de coloración de gris a negro por la formación de mackinawita. Esta evidencia demuestra que, en el suelo original, el DDT se degrada por deshalogenación reductiva abiótica inducida por la formación de mackinawita. Lo que indica que el suelo original contiene una cantidad suficiente de oxihidróxidos de hierro (III) disponibles para propiciar la formación de Fe<sub>1+x</sub>S de acuerdo con el mecanismo propuesto (Figura 29, apartado 9.2.4). El análisis de DRX mostró que el suelo original no contiene goethita (Figura 10, sección 8.1), por lo que es posible el hierro se encuentre en forma amorfa. La formación de minerales de hierro en los suelos depende de diversos factores como la concentración de hierro, el pH, el oxígeno y la relación Fe(III):Fe(II) (Morgan y Lahav, 2007).

La formación de la mackinawita en el suelo original indica que se activó el proceso sulfidogénico, es decir, se propició el crecimiento y la actividad de las BSR al emplear glicerol en condiciones anóxicas. Esto a pesar de que el análisis metagenómico mostró que las familias de bacterias predominantes en este suelo fueron diferentes a las BSR como *Acetobacteraceae*, *Mycobacteriaceae*, *Acidobacteriaceae* y *Paenibacillaceae*, entre otros (Figura 12, sección 8.2). Esto demuestra que las BSR compiten de forma eficiente por el sustrato de crecimiento debido muy probablemente a que el contenido de sulfato (aceptor de electrones) en el suelo evaluado favorece su crecimiento y actividad en condiciones anóxicas.

### **10.1.2. Bagazo de caña**

El bagazo de caña al 5% y 10% fueron evaluados en el suelo original. En la Tabla 15 se presentan los valores de degradación del DDT y sus intermediarios

obtenidos con bagazo en condiciones anóxicas a 20 días de tratamiento. Los valores de degradación del DDT para el tratamiento con bagazo del 5 y 10% fueron 23.5 y 29.7 veces superiores al valor del control sin cosustrato. De hecho, los valores de degradación del DDT registrados con bagazo fueron mayores que el tratamiento con glicerol (Tabla 14).

**Tabla 15.** Porcentajes de degradación de DDX y valores de hierro (II) registrados a 20 días del tratamiento del suelo original con bagazo de caña.

Tratamiento	DDT (%)	DDD (%)	DDE (%)	Fe (II) (mg/g <sub>suelo</sub> )**
Control	2.3 ± 0.9	2.9 ± 1.2	2.8 ± 3.1	0.062 ± 0.02
Anóxico				
Bagazo 5%	54.2 ± 14.6	-52.3 ± 22.4*	11.2 ± 4.2	3.3 ± 0.2
Bagazo 10%	68.4 ± 11.8	-48.6 ± 23.8*	16.2 ± 5.0	3.8 ± 0.3

Además, se observó una menor degradación del DDE de 4.0 y 7.2 veces superior al valor del control (Tabla 15). En este caso, solamente el tratamiento con bagazo al 10% registró una mayor degradación de DDE que el uso del glicerol. Ambos tratamientos con bagazo registraron una acumulación importante del DDD (17 veces el valor del control sin cosustrato) (Tabla 15). La acumulación de DDD en los tratamientos (glicerol y bagazo) revela que la velocidad de transformación del DDT a DDD es mayor que la velocidad de degradación del DDD. Por lo que es de esperarse que a mayor transformación de DDT exista una mayor acumulación de DDD. La presencia de DDD en el sistema confirma que el DDT se degradó vía deshalogenación reductiva (principal proceso de formación de DDD). En este tratamiento con bagazo al 10%, nuevamente se observó que la mayor eficiencia de degradación del DDT obtenida está relacionada con la mayor concentración de

mackinawita registrada en el sistema (Tabla 15). Este hecho indica que la degradación de DDT fue inducida por presencia de mackinawita. Es importante señalar que las concentraciones de mackinawita obtenidas en el suelo original fueron menores que las alcanzadas en el suelo pretratado con HCV. Para el bagazo de caña al 10%, los valores de Fe(II) fueron 2.2 menores que los valores registrados en el suelo pretratado con HCV. Cabe mencionar que, en los sistemas evaluados (suelo pretratado con HCV y suelo original), no se registró la formación y acumulación de DDNS, lo que demuestra que la energía de activación para generar la transformación del DDD a DDNS fue menor que la del tratamiento fisicoquímico con HCV. En este sentido, se puede concluir que el tratamiento de bioestimulación en condiciones anóxicas no promueve la formación de DDNS en el sistema, a pesar de que se produce un proceso de deshalogenación reductiva abiótica.

Las velocidades de formación de CO<sub>2</sub> generado por el proceso sulfidogénico para el bagazo al 5 y 10% fueron de 0.077 y 0.126 mgC/g<sub>suelo</sub>·día; en tanto que la máxima producción de CO<sub>2</sub> registrada al día 20 de tratamiento fue de 1.6 y 2.47 mgC/g<sub>suelo</sub>, respectivamente. El patrón de producción de CO<sub>2</sub> fue muy similar al obtenido para el suelo pretratado con HCV (Figura 32, sección 9.4). Esto indica que la concentración inicial de DDT en el suelo original no afecta la actividad de las BSR.

## 10.2. Degradación de DDX por microorganismos que oxidan el tolueno en condiciones aerobias

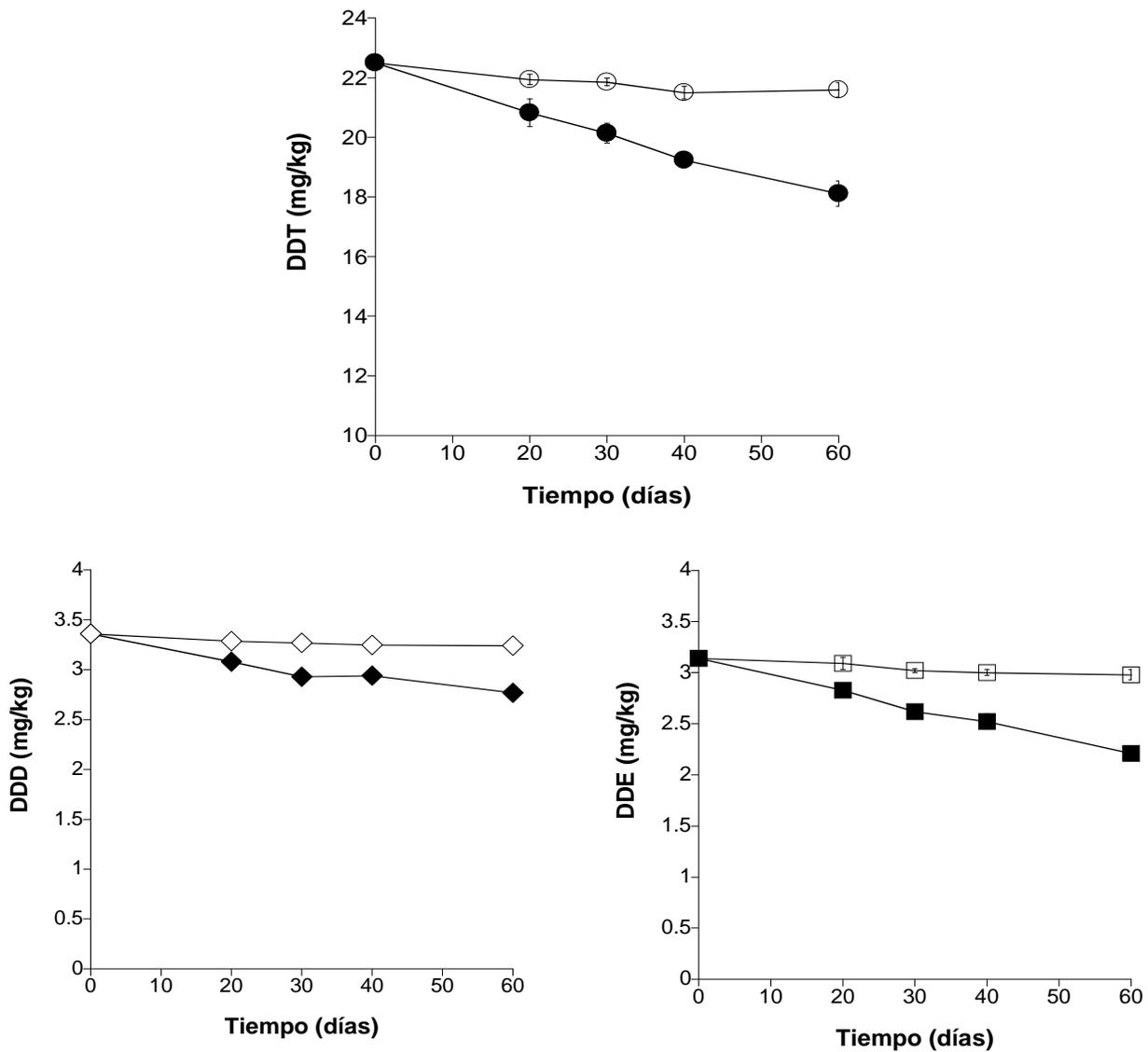
La Tabla 16 muestra las eficiencias de degradación del DDT, DDE y DDD. La degradación del DDT, DDD y DDE fueron 3.0, 3.8 y 6.1 veces mayores con respecto a los valores registrados en el control al día 20 de tratamiento. Esto indica que el tolueno favoreció la degradación de los DDX y, confirma que la concentración inicial del DDT en el suelo original no inhibe la actividad microbiana. El patrón de consumo de tolueno fue equivalente al registrado en los experimentos con el suelo pretratado con HCV. La cantidad de tolueno adicionado (1  $\mu\text{L}$ ) fue consumido completamente en los primeros tres días después de su adición al sistema experimental (cada 7 días).

**Tabla 16.** Porcentajes de degradación de DDX y valores de hierro (II) registrados a 20 días del tratamiento del suelo original con tolueno.

Tratamiento	DDT (%)	DDD (%)	DDE (%)	Fe (II) ( $\text{mg/g}_{\text{suelo}}$ )**
Control	$2.5 \pm 1.1$	$2.2 \pm 2.7$	$1.6 \pm 2.8$	$0.037 \pm 0.01$
Aerobio Tolueno	$7.5 \pm 2.9$	$8.4 \pm 2.2$	$9.8 \pm 2.5$	$0.035 \pm 0.01$

En la Figura 34 se muestra la tendencia de degradación de los DDX durante 60 días de tratamiento. Las concentraciones del DDT ( $20.8 \pm 1.43$  ppm), el DDD ( $3.08 \pm 0.05$  ppm) y el DDE ( $2.83 \pm 0.06$ ) registradas al día 60 muestran que el tratamiento de bioestimulación con tolueno requiere de un mayor tiempo para disminuir las concentraciones de los DDX por debajo de niveles que no

representen un riesgo para la salud humana o al medio ambiente de acuerdo a los LMP reportados en EE.UU.



**Figura 34.** Degradación de DDT, DDE y DDD registrado en el suelo original durante el tratamiento en condiciones aerobias. Control (símbolos blancos), Tolueno (símbolos negros).

Para el caso del DDT, la degradación alcanzada en el tratamiento con tolueno a los 60 días fue 3.5 veces menor que el valor obtenido en el tratamiento con bagazo al 10% en condiciones anóxicas a los 20 días (Tabla 15). Esta diferencia

hace notar que el tratamiento de bioestimulación con bagazo en condiciones anóxicas es más efectivo para degradar DDT que el tratamiento con tolueno en condiciones aerobias. Esto muy probablemente se debe a que el proceso de ruptura del anillo aromático de los DDX, que ocurre al utilizar tolueno en condiciones aerobias, requiere una mayor energía de activación en comparación al proceso de deshalogenación reductiva abiótico generado por la mackinawita en condiciones anóxicas.

Las degradaciones alcanzadas en los tratamientos de bioestimulación con el suelo original no fueron suficientes para obtener concentraciones de DDX iguales o menores a los límites máximos permisibles. Lo que demuestra que el suelo original requiere de un tratamiento fisicoquímico previo al tratamiento de bioestimulación.

### **10.3. Conclusiones parciales**

La evaluación de la técnica de bioestimulación en el suelo original mostró que es posible inducir la degradación de los DDX. Sin embargo, las eficiencias de degradación obtenidas a los tiempos establecidos de tratamiento de 20 y 60 días no fueron suficientes para disminuir las altas concentraciones iniciales de DDX (principalmente de DDT) a valores iguales o menores a los límites máximos permisibles establecidos como referencia: 1.9 mg/kg para DDT, 2.3 mg/kg para DDD y 2.0 mg/kg para DDE. Estos resultados demuestran que el suelo original requiere de un pretratamiento fisicoquímico antes de realizar el proceso de bioestimulación para poder eliminar los DDX en tiempos de tratamiento menores a 70 días.

## **11. CONCLUSIONES**

## 11. CONCLUSIONES

1. Este estudio demuestra que el proceso de bioestimulación mediante el uso de cosustratos orgánicos induce diferentes mecanismos de degradación de los DDX. Estos mecanismos están asociados, principalmente, del tipo de cosustrato, de los microorganismos presentes en el suelo y de la disponibilidad de oxígeno en el sistema.

2. Los mecanismos de degradación de DDX identificados fueron el producido por los microorganismos que oxidan tolueno en condiciones aerobias, y el generado por la formación de mackinawita (agente abiótico de deshalogenación reductiva) en condiciones anóxicas, al utilizar glicerol, ácido láctico, etanol, glucosa y bagazo de caña.

3. Las bacterias predominantes identificadas en el suelo tratado con tolueno en condiciones aerobias (*Rhodococcus* sp. y *Pseudomonas* sp.), así como las identificadas en el suelo tratado con glicerol en condiciones anóxicas (*Desulfosporosinus auripigmenti*), soportan los mecanismos de degradación propuestos en este estudio. Esto debido a que las primeras tienen actividad oxigenasa, mientras que las segundas son BSR que producen el sulfuro biogénico necesario para formar mackinawita en el sistema.

4. El tratamiento de bioestimulación acoplado anóxico/aerobio de degradación de DDX del suelo pretratado con HCV mostró ser la estrategia más eficiente para eliminar este tipo de compuestos recalcitrantes. Esto debido a que en condiciones anóxicas utilizando glicerol se promueve la degradación completa del DDT por

deshalogenación reductiva abiótica generada por la formación de mackinawita, en tanto que al utilizar tolueno en condiciones aerobias se produce, principalmente, la degradación de compuestos intermediarios del DDT por la actividad de bacterias que oxidan tolueno. .

5. Las BSR del suelo mostraron tener la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono y energía (glicerol, ácido láctico, etanol, glucosa y bagazo de caña) para activar el mecanismo de degradación del DDT por mackinawita. La mayor degradación de DDX se obtuvo con 10% de bagazo de caña.

6. La técnica de bioestimulación en el suelo original (sin tratamiento de HCV) mostró que, para disminuir las concentraciones de DDX a niveles iguales o menores a los LMP de referencia mediante los mecanismos evaluados a tiempos de tratamiento de 20 y 60 días, se requiere de un pretratamiento fisicoquímico con HCV antes de realizar el proceso de bioestimulación.

7. Los mecanismos reportados en este trabajo son herramientas importantes para establecer un tratamiento de remediación para el suelo contaminado de la exfábrica de plaguicidas “*Tekchem*”. Sin embargo, el estudio aún requiere de experimentos a nivel piloto para conocer los datos relativos a los costos y al desempeño a gran escala.

## **12. BIBLIOGRAFÍA**

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Aburto-Medina, A., & Ball, A. S. (2015). Microorganisms involved in anaerobic benzene degradation. *Annals of microbiology*, 65(3), 1201-1213.

Acosta-Ramírez, D. S., Calva-Rodríguez, L., Rodríguez-Vázquez, R. 2009. Concentración de DDT y su metabolito DDE en suelo intradomiciliario en dos comunidades de la zona costera de Chiapas. XII congreso de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. Del 21 al 26 de Junio de 2009, Acapulco, Guerrero.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR (2002). Toxicological profile for DDT, DDD and DDE. US Department of Health and Services, Atlanta. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/TP.asp?id=81&tid=20>

Ahuja, R., Kumar, A. (2003). Metabolism of DDT [1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] by *Alcaligenes denitrificans* ITRC-4 Under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Current Microbiology*, 46, 65-69.

Aislabie, J. M., Richards, N. K., & Boul, H. L. (1997). Microbial degradation of DDT and its residues—a review. *New Zealand journal of agricultural research*, 40(2), 269-282.

Albert L. A., “Panorama de los plaguicidas en México”, 2007, 7° Congreso de Actualización en Toxicología Clínica, pp. 359-378.

Alexander M. (1981). Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*. 211, 132-138.

Amir, A., & Lee, W. (2011). Enhanced reductive dechlorination of tetrachloroethene by nano-sized zero valent iron with vitamin B12. *Chemical engineering journal*, 170(2-3), 2011, 492-497.

Amonette, J.E., Workman, D.J., Kennedy, D.W., Fruchter, J.S., Gorby, Y.A. (2000). Dechlorination of carbon tetrachloride by Fe (II) associated with goethite. *Environmental science and technology*, 34, 4606-4613.

Arnold, D.J., & Briggs, G.G. (1990). Fate of pesticides in soil: predictive and practical aspects. In: Progress in pesticides biochemistry and toxicology. Hutson, D.H., Roberts, T.R. (Eds.), Vol. 7, John Wiley & Sons, New York, pp. 101-122.

Bajaj, A., Mayilraj, S., Mudiam, M. K. R., Patel, D. K., & Manickam, N. (2014). Isolation and functional analysis of a glycolipid producing *Rhodococcus* sp. strain IITR03 with potential for degradation of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT). *Bioresource technology*, 167, 398-406.

Barr, D.P., & Aust, S.D. (1994). Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental science and technology*, 28, 79A–87A.

Barragán-Huerta, B.E., Costa, C., Peralta, J., Barrera, J., Esparza, F., & Rodríguez R. (2007). Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of

the porous structure of green vean coffee. *International Biodeterioration Biodegradation*, 59, 239-244.

Barragán-Huerta, B. E., & Rodríguez-Vázquez, R. (2010). Green bean coffee as nutrient source for pesticide degrading-bacteria. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. *Microbiology boock series*, 2, 1322-1327.

Barton, L. L., Tomei-Torres, F. A., Xu, H., & Zocco, T. (2015). Metabolism of metals and metalloids by the sulfate-reducing bacteria. In: *Bacteria-Metal Interactions*. Springer International Publishing, pp. 57-83

Beller, H. R., Grbić-Galić, D., & Reinhard, M. (1992). Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. *Applied and environmental microbiology*, 58(3), 786-793.

Bertolino, S. M., Rodrigues, I. C., Guerra-Sá, R., Aquino, S. F., & Leão, V. A. (2012). Implications of volatile fatty acid profile on the metabolic pathway during continuous sulfate reduction. *Journal of environmental management*, 103, 15-23.

Bidlan, R., & Manonmani, H. K. (2002). Aerobic degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT-1P. *Process biochemistry*, 38(1), 49-56.

Biegert, T., Fuchs, G., & Heider, J. (1996). Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromática* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *European journal of biochemistry*, 238(3), 661-668.

Bollang, J., & Liu, S. (1990). Biological Transformation Processes of Pesticides. In: Cheng, H. (Ed.), *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling*. Madison, Wisconsin, USA. Soil Science Society of America, pp.169-211.

Brioukhanov, A., Pieulle, L., Dolla, A. (2010). Antioxidative defense systems of anaerobic sulfate-reducing microorganisms, in *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Mendez-Vilas, A., Ed, Badajoz: Formatex Research Center, 2010, vol. 1, pp. 148–159.

Brown, M. A., Ruzo, L. O., & Casida, J. E. (1986). Photochemical conversion of a dicofol impurity,  $\alpha$ -chloro-DDT, to DDE. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 37(1), 791-796.

Bumpus, J. A., & Aust, S. D. (1987). Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental microbiology*, 53, 2001-2008.

Butler, E. C., & Hayes, K. F. (2000). Kinetics of the transformation of halogenated aliphatic compounds by iron sulfide. *Environmental science & technology*, 34(3), 422-429.

Caballero, R. M. (2001). Informe regional para México y Centroamérica. Instituto de Salud; Ambiente y trabajo S.C. Diagnóstico situacional del uso de DDT y el control de la malaria.

Disponible en: <http://www3.cec.org/islandora/es/item/1755-diagnostico-situacional-del-uso-de-ddt-y-el-control-de-la-malaria-es.pdf>

Cao, F., Li, F. B., Liu, T. X., Huang, D. Y., Wu, C. Y., Feng, C. H., & Li, X. M. (2010). Effect of *Aeromonas hydrophila* on Reductive Dechlorination of DDTs by Zero-Valent Iron. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(23), 12366-12372.

Cao, F., Liu, T. X., Wu, C. Y., Li, F. B., Li, X. M., Yu, H. Y., ... & Chen, M. J. (2012). Enhanced biotransformation of DDTs by an iron-and humic-reducing bacteria *Aeromonas hydrophila* HS01 upon addition of goethite and anthraquinone-2, 6-disulphonic disodium salt (AQDS). *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(45), 11238-11244.

Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Huttley, G. A. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335-336.

Castelo-Grande, T., Augusto, P. A., Monteiro, P., Estevez, A. M., & Barbosa, D. (2010). Remediation of soils contaminated with pesticides: a review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 90, 438-467.

Chapman, R.A., & Harris, C.R. (1990). Enhanced degradation of insecticides in soil: Factors influencing the development and effects of enhanced microbial activity. In: Racke, K.D., & Coats, J.R. (Eds.), *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 82–96.

Chen, M., Cao, F., Li, F., Liu, C., Tong, H., Wu, W., & Hu, M. (2013). Anaerobic transformation of DDT related to iron (III) reduction and microbial community structure in paddy soils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(9), 2224-2233.

Chiu P.C., & Reinhard, M. (1996) Transformation of carbon tetrachloride by reduced vitamin B<sub>12</sub> in aqueous cysteine solution. *Environmental science & technology*, 30, 1882-1889.

CICOPLAFEST (2004). *Catalogo Oficial de Plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control de Proceso y Uso de plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas*. SAGARPA, SEDESOL, México, D. F. 481 pp.

Corona-Cruz, A., Gold-Bouchot, G., Gutierrez-Rojas, M., Monroy-Hermosillo, O., & Favela, E. (1999). Anaerobic–aerobic biodegradation of DDT (dichlorodiphenyl trichloroethane) in soils. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 63(2), 219-225.

Cortinas, C. (2003). *Los Contaminantes Orgánicos Persistentes. Una visión regional*. México, Cámara de Diputados. LVIII Legislatura. 320 pp.

De Carvalho, C. C., Fatal, V., Alves, S. S., & Da Fonseca, M. M. R. (2007). Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells to high concentrations of toluene. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(6), 1423-1430.

Eggen, T., & Majcherczyk, A. (2006). Effects of zero-valent iron (Fe<sup>0</sup>) and temperature on the transformation of DDT and its metabolites in lake sediment. *Chemosphere*, 62, 1116–1125.

Fang, H., Dong, B., Yan, H., Tang, F., & Yu, Y. (2010). Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil. *Journal of hazardous materials*, 184(1), 281-289.

Fernando, T.; Aust, S. D.; & Bumpus, J. A. (1989). Effects of culture parameters on DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane) biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere*, 19, 1387-1398.

Foght, J., April, T., Biggar, K., & Aislabie, J. (2001). Bioremediation of DDT-contaminated soils: a review. *Bioremediation journal*, 5(3), 225-246.

Fritsche, W., & Hofrichter, M. (2008). *Aerobic Degradation by Microorganisms in Biotechnology Set, Second Edition*. Rehm, H.-J., & Reed G. (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp 146–155.

Furukawa, Y., Kim, J.-W., Watkins, J., & Wilkin, R. T. (2002). Formation of ferrihydrite and associated iron corrosion products in permeable reactive barriers of zero-valent iron. *Environmental science & technology*, 36, 5469-5475.

Gao, B., Leu, W., Jia, W.B., Jia, L.J., Xu, L., Xie, J. (2011). Isolation and characterization of an *Alcaligenes* sp. Strain DG-5 capable of degrading DDTs under aerobic conditions. *Journal Environmental Science Health Part B*, 46, 257-263.

Gautam, S. K., & Suresh, S. (2006). Dechlorination of DDT, DDD and DDE in soil (slurry) phase using magnesium/palladium system. *Colloid interface science*, 304, 144–151.

Gautam, S. K., & Suresh, S. (2009). Biodegradation of 1, 1-diphenylethylene and 1, 1-diphenylethane by *Pseudomonas putida* PaW 736. *Current Science*, 96(9), 1247.

Gavrilescu, M. (2005). Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in life science*, 5(6), 497–526.

Ghazali, M., McBean, E., Shen, H., & Dastous, P-A. (2010). Impact of iron concentration and pH on zero-valent iron dechlorination of DDT for brownfields. *Remediation journal*. 20, 97-107.

Chu, W. (1999). Photodechlorination mechanism of DDT in a UV/surfactant system. *Environmental science & technology*, 33(3), 421-425.

Gibson, D. T., & Parales, R. E. (2000). Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, 11(3), 236-243.

Gohil, H., Ogram, A., & Thomas, J. (2014). Stimulation of anaerobic biodegradation of DDT and its metabolites in a muck soil: laboratory microcosm and mesocosm studies. *Biodegradation*, 25(5), 633-642.

Golovleva, L. A., Zyakun, A. M., Baskunov, B. P., Pertsova, R. N., & Skryabin, G. K. (1979). Degradation of DDT and its analogs by *Pseudomonas aeruginosa* 640x. *Biology bulletin of the academy of sciences of the USSR*, 7(2), 143-151.

Gong, Y., Tang, J., & Zhao, D. (2016). Application of iron sulfide particles for groundwater and soil remediation: a review. *Water research*, 89, 309-320.

Greene, S., & Pohanish, R. (2005). *Sitting's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals*. Norwich, N.Y. USA. William Andrew Inc. 1189 p.

Gunawardana, B., Singhal, N., & Swedlund, P. (2011). Degradation of chlorinated phenols by zero valent iron and bimetallics of iron- A review. *Environmental engineering research*, 16, 187-203.

Han, Y., Shi, N., Wang, H., Pan, X., Fang, H., & Yu, Y. (2016). Nanoscale zerovalent iron-mediated degradation of DDT in soil. *Environmental science and pollution research*, 23(7), 6253-6263.

Harayama, S., & Timmis, K.N. (1992). Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In: *Metal Ions in Biological Systems*. Sigel, H. & Sigel, A. (Eds.), New York: Marcell Dekker, Inc., pp. 99-156.

Hay, A. G., & Focht, D. D. (1998). Cometabolism of 1,1-Dichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl)Ethylene by *Pseudomonas acidovorans* M3GY Grown on Biphenyl. *Microbiology*, 64, 2141–2146.

Hay, A.G., & Focht, D.D. (2000). Transformation of 1,1-dichloro-2, 2-(4-chlorophenyl) ethane (DDD) by *Ralstonia eutropha* strain A5. *FEMS microbiology ecology*, 31, 249–253.

He, Y., Su, C., Wilson, J., Wilkin, R., Adair, C., Lee, T., ... & Ferrey, M. (2009). Identification and characterization methods for reactive minerals responsible for natural attenuation of chlorinated organic compounds in ground water. US EPA, Office of Research and Development, National Risk Management Research Laboratory, Ada, Oklahoma, EPA, 600 p.

Hodgson, E., & Levi, P. (2001). *Metabolism of Pesticides*. In: Krieger, Robert (Ed.), *Handbook of Pesticide Toxicology*. USA, San Diego, Academic Press, 531-562 p.

Holliger, C., & W. Schumacher. (1994). Reductive dehalogenation as a respiratory process. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66, 239–246.

Huckle, K., & Millburn, P. (1990). Metabolism, Bioconcentration and Toxicity of Pesticides in Fish. In: Hutson, D., & Roberts T. (Eds.), *Environmental Fate of Pesticides*. Chichester, England. John Wiley and Sons Ltd, pp. 176- 243.

Jeong, H. Y., & Hayes, K. F. (2003). Impact of transition metals on reductive dechlorination rate of hexachloroethane by mackinawite. *Environmental science & technology*, 37(20), 4650-4655.

INE-UAM. (2010). Estudio sobre alternativas tecnológicas para la remediación de suelos contaminados con plaguicidas. Informe interno INE. 76 p.

INE-UAM. (2013). Evaluación a nivel semipiloto de un proceso por corrosión galvánica de hierro cero valente para el tratamiento de suelos contaminados con plaguicidas. Informe interno INE. 42 p.

- Jeong, H. Y., & Hayes, K. F. (2007). Reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene by mackinawite (FeS) in the presence of metals: reaction rates. *Environmental science & technology*, 41(18), 6390-6396.
- Jeong, H. Y., Han, Y. S., Park, S. W., & Hayes, K. F. (2010). Aerobic oxidation of mackinawite (FeS) and its environmental implication for arsenic mobilization. *Geochimica et cosmochimica acta*, 74(11), 3182-3198.
- Jin, X., Wang, F., Gu, C., Yang, X., Kengara, F. O., Bian, Y., ... & Jiang, X. (2015). The interactive biotic and abiotic processes of DDT transformation under dissimilatory iron-reducing conditions. *Chemosphere*, 138, 18-24.
- Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., & El Ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. Biodegradation-life of science. InTech, Rijeka, 289-320.
- Junyapoon, S. (2005). Use of zero-valent iron for waste water treatment. *KMITL science and technology journal*, 5, 587-595.
- Kamanavalli, C. M., & Ninnekar, H. Z. (2004). Biodegradation of DDT by a Pseudomonas species. *Current microbiology*, 48(1), 10-13.
- Kang, S., Liu, S., Wang, H., & Cai, W. (2016). Enhanced degradation performances of plate-like micro/nanostructured zero valent iron to DDT. *Journal of hazardous materials*, 307, 145-153.
- Karnachuk, O. V., Kurganskaya, I. A., Avakyan, M. R., Frank, Y. A., Ikkert, O. P., Filenko, R. A., ... & Pimenov, N. V. (2015). An acidophilic Desulfosporosinus isolated from the oxidized mining wastes in the Transbaikal area. *Microbiology*, 84(5), 677-686.
- Kaschabek, S. R., Kuhn, B., Müller, D., Schmidt, E., & Reineke, W. (2002). Degradation of aromatics and chloroaromatics by Pseudomonas sp. Strain B13: purification and characterization of 3-oxoadipate:succinyl-coenzyme A (CoA) transferase and 3-oxoadipyl-CoA thiolase. *Journal of bacteriology*, 184(1), 207-215.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., & Swings, J. (2006). The family acetobacteraceae: the genera acetobacter, acidomonas, asaia, gluconacetobacter, gluconobacter, and kozakia. In *The prokaryotes* (pp. 163-200). Springer New York.
- Keum, Y-S.; & Li, Q. X. (2004). Reduction of nitroaromatic pesticides with zerovalent iron. *Chemosphere*, 54, 255-263.
- Krewulak, K.D., & Vogel, H.J. (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 1781-1804.
- Kunapuli, U., Jahn, M. K., Lueders, T., Geyer, R., Heipieper, H. J., & Meckenstock, R. U. (2010). Desulfitobacterium aromaticivorans sp. nov. and Geobacter toluenoxydans sp. nov., iron-reducing bacteria capable of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(3), 686-695.

- L'Abbée, J. B., Tu, Y., Barriault, D., & Sylvestre, M. (2011). Insight into the metabolism of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by biphenyl dioxygenases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 516(1), 35-44.
- Leahy, J.G., Batchelor, P.J., & Morcomb, S.M. (2003). Evolution of the soluble diiron monooxygenases. *FEMS Microbiology reviews*, 27, 449-479.
- Levin, L., Papinutti, F., & Forchiasin, F. (2004). Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresources technology*, 94, 169-176.
- Li, F. B., Li, X. M., Zhou, S. G., Zhuang, L., Cao, F., Huang, D. Y., ... & Feng, C. H. (2010). Enhanced reductive dechlorination of DDT in an anaerobic system of dissimilatory iron-reducing bacteria and iron oxide. *Environmental pollution*, 158(5), 1733-1740.
- Lilia, C. M., Téllez C., Sánchez, N., & Cortés-Espinosa, D.V. (2013). Effect of the addition of different agroindustrial waste on microbial growth for DDT degradation in agricultural soil. XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 23 al 28 de Junio, Cancún, México.
- Lin, S.Y., Hameed, A., Liu, Y.C., Hsu, Y.H., Lai, W.A., Huang, H.I., and Young, C.C. (2014). *Novosphingobium arabidopsis* sp. nov., a DDT resistant bacterium isolated from the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 64(2): 594-598.
- Liu, C. Y., Cade-Menun, B. J., Xu, X. H., & Fan, J. L. (2016). Electron Donor Substances and Iron Oxides Stimulate Anaerobic Dechlorination of DDT in a Slurry System with Hydragric Acrisols. *Journal of environmental quality*, 45(1), 331-340.
- Liu, X.M., Chen, K., Meng, C., Zhang, C., Zhu, J.C., Huang, X., Li, S.P., and Jiang, J.D. (2014). *Pseudoxanthobacter liyangensis* sp. nov., isolated from dichlorodiphenyl trichloroethane contaminated soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 64: 3390-3394.
- López-Carrillo, L., Torres-Arreola, L., Torres-Sánchez, L., Espinosa-Torres, F., Jiménez, C., Cebrián, M., Waliszewski, S., & Saldade, O. (1996). Is DDT use a public health problem in Mexico?. *Environmental Health Perspectives*, 104(6), 584.
- Lovley, D. R., Holmes, D. E., & Nevin, K. P. (2004). Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction. *Advances in microbial physiology*, 49, 219-286.
- Lovley, D.R. (1997). Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiology reviews*, 20, 305–315.
- Mal'tseva, O. V., & Golovleva, L. A. (1984). Role of additional substrates in DDT degradation by cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mikrobiologija*, 54(2), 222-226.

Mansouri, A., Cregut, M., Abbes, C., Durand, M. J., Landoulsi, A., & Thouand, G. (2016). The Environmental Issues of DDT Pollution and Bioremediation: a Multidisciplinary Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-31.

Martínez-Salinas, R. I., Díaz-Barriga, F., Batres-Esquivel, L. E., & Pérez-Maldonado, I. N. (2011). Assessment of the levels of DDT and its metabolites in soil and dust samples from Chiapas, Mexico. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 86(1), 33-37.

Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J., & Křen, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment international*, 35(1), 162-177.

Mason, J.R., & Cammack, R. (1992). The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annual review of microbiology*, 46, 277-305.

Matheson, L.J., & Tratnyek, P.G. (1994). Reductive Dehalogenation of Chlorinated Methanes by Iron Metal. *Environmental science & technology*, 28, 2045-2053.

McDowall, R., Boyle, C., & Graham, B. (2004). Review of emerging, innovative technologies for the destruction and decontamination of POPs and the identification of promising technologies for use in developing countries. Final – GF/8000-02-02-2205. Auckland, New Zealand. 138 p. Disponible en: [http://www.basel.int/techmatters/review\\_pop\\_feb04.pdf](http://www.basel.int/techmatters/review_pop_feb04.pdf)

McIntyre A.D., & Mills C.F. (1974). Ecological Toxicology Research Effects of Heavy Metal and Organohalogen Compounds. Plenum Press, N.Y. London.

Mitra, J., Mukherjee, P.K., Kale, S.P., Murthy, N.B.K. (2001). Bioremediation of DDT in soil by genetically improved fungus *Fusarium solani*. *Biodegradation*, 12, 235-245.

Mohn W.W., & Tiedje, J.M. (1992). Microbial reductive dehalogenation. *Microbiology reviews*, 56, 482–507.

Morgan, B., & Lahav, O. (2007). The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe (II) oxidation by O<sub>2</sub> in aqueous solution—basic principles and a simple heuristic description. *Chemosphere*, 68(11), 2080-2084.

Muyzer, G., & Stams, A. J. (2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature reviews microbiology*, 6(6), 441-454.

Mwangi, K., Boga, H.I., Muigai, A., Kiiyukia, C., Tsanuo, M.K. (2010). Degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by bacterial isolate from cultivated and uncultivated soil. *African J Microbiology Research*, 4, 185-196.

Nadeau, L. J., Menn, F. M., Breen, A., & Sayler, G. S. (1994). Aerobic degradation of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Applied and environmental microbiology*, 60(1), 51-55.

Neal, A. L., Techkarnjanaruk, S., Dohnalkova, A., McCreedy, D., Peyton, B. M., & Geesey, G. G. (2001). Iron sulfides and sulfur species produced at hematite surfaces in the presence of sulfate-reducing bacteria. *Geochimica et cosmochimica acta*, 65(2), 223-235.

Norma oficial mexicana, NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad salinidad y clasificación de suelos. 85 p. Disponible en:  
[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=717582&fecha=31/12/2002](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=717582&fecha=31/12/2002)

Notomista, E., Lahm, A., Di Donato, A., & Tramontano, A. (2003). Evolution of bacterial and archaeal multicomponent monooxygenases. *Journal of molecular evolution*, 56(4), 435-445.

Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y Alimentación (FAO) y Organización Mundial de la Salud (OMS). 2004. Manual Sobre la Elaboración y Empleo de las Especificaciones de la FAO y de la OMS para Plaguicidas. Roma, Italia. FAO/OMS. 242 p.

Ortiz, I., Auria, R., Sigoillot, J.-C., & Revah, S. (2003). Enhancing phenanthrene biomineralization in a polluted soil using gaseous toluene as a cosubstrate. *Environmental science & technology*, 37, 805-810.

Ortiz, I., Velasco, A., Le Borgne, S., & Revah, S. (2013). Biodegradation of DDT by stimulation of indigenous microbial populations in soil with cosubstrates. *Biodegradation*, 24(2), 215-225.

Pan, X., Lin, D., Zheng, Y., Zhang, Q., Yin, Y., Cai, L., Fang, H., & Yu, Y. (2016). Biodegradation of DDT by *Stenotrophomonas* sp. DDT-1: characterization and genome functional analysis. *Scientific Reports*, 6, 21332.

Pan, X., Xu, T., Xu, H., Fang, H., & Yu, Y. (2017). Characterization and genome functional analysis of the DDT-degrading bacterium *Ochrobactrum* sp. DDT-2. *Science of the Total Environment*, 592, 593-599.

Park J.-H., Feng Y., Ji P., Voice T. C., & Boyd A. (2003). Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. *Applied and environmental microbiology*, 69, 3288-3298.

Patrauchan, M. A., Florizone, C., Dosanjh, M., Mohn, W. W., Davies, J., & Eltis, L. D. (2005). Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: redundancies and convergence. *Journal of bacteriology*, 187(12), 4050-4063.

Pham, T. T. M., & Sylvestre, M. (2013). Has the bacterial biphenyl catabolic pathway evolved primarily to degrade biphenyl? The diphenylmethane case. *Journal of bacteriology*, 195(16), 3563-3574.

Pirnie, E. F., Talley, J. W., & Hundal, L. S. (2006). Abiotic transformation of DDT in aqueous solutions. *Chemosphere*, 65(9), 1576-1582.

PNRSC (2009). Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados. DGGIMAR/SEMARNAT. Disponible en:  
[http://ecologia.guanajuato.gob.mx/eventos/foro2009/files/memorias2009/25112009/08\\_ProgramaNacionalRemediacionSitiosContaminadosSEMARNAT.pdf](http://ecologia.guanajuato.gob.mx/eventos/foro2009/files/memorias2009/25112009/08_ProgramaNacionalRemediacionSitiosContaminadosSEMARNAT.pdf)

PNUMA (2004). Review of emerging, innovative technologies for the destruction and decontamination of POPs and the identification of promising technologies for use in

developing countries. The Scientific and Technical Advisory Panel of the GEF. United Nations Environment Programme. 135 p. Disponible en: [http://www.basel.int/techmatters/review\\_pop\\_feb04.pdf](http://www.basel.int/techmatters/review_pop_feb04.pdf)

Pointing S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57:20–33.

Postgate, J. R. (1984). *The sulfate reducing bacteria*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge. 202 p.

Purnomo, A.S., Mori, T., Kamei, I., Nishii, T., Kondo, R. (2010). Application of mushroom waste medium from *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of DDT-contaminated soil. *Biodegradation*, 64, 397-402.

Purnomo, A. S., Mori, T., Kamei, I., & Kondo, R. (2011). Basic studies and applications on bioremediation of DDT: a review. *International biodeterioration & biodegradation*, 65(7), 921-930.

Qiao, C., & Marsh, E. N. G. (2005). Mechanism of benzylsuccinate synthase: Stereochemistry of toluene addition to fumarate and maleate. *Journal of the american chemical society*, 127(24), 8608-8609.

Quensen, J. F., Mueller, S. A., Jain, M. K., & Tiedje, J. M. (1998). Reductive dechlorination of DDE to DDMU in marine sediment microcosms. *Science*, 280(5364), 722-724.

Quensen, J. F., Tiedje, J. M., Jain, M. K., & Mueller, S. A. (2001). Factors controlling the rate of DDE dechlorination to DDMU in Palos Verdes margin sediments under anaerobic conditions. *Environmental science & technology*, 35(2), 286-291.

Qu, J., Xu, Y., Ai, G. M., Liu, Y., & Liu, Z. P. (2015). Novel *Chryseobacterium* sp. PYR2 degrades various organochlorine pesticides (OCPs) and achieves enhancing removal and complete degradation of DDT in highly contaminated soil. *Journal of environmental management*, 161, 350-357.

Raghunandan, K., Mchunu, S., Kumar, A., Kumar, K. S., Govender, A., Permaul, K., & Singh, S. (2014). Biodegradation of glycerol using bacterial isolates from soil under aerobic conditions. *Journal of environmental science and health, part A*, 49(1), 85-92.

Rehfuss, M., & Urban, J. (2005). *Rhodococcus phenolicus* sp. nov., a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources. *Systematic and applied microbiology*, 28(8), 695-701.

Reddy C.A. (1995). The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr Opin Biotechnol.* 6:320–8.

Repetto, M. (2009). *Toxicología Fundamental*. 4ª Edición. Madrid, España. Díaz de Santos. 587 p.

Rickard, D., & Luther, G. W. (2007). Chemistry of iron sulfides. *Chemical reviews*, 107(2), 514-562.

Riser-Roberts, E. (1998). Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes. CRC press. 576 p.

Romanenko, L. A., Uchino, M., Falsen, E., Lysenko, A. M., Zhukova, N. V., & Mikhailov, V. V. (2005). *Pseudomonas xanthomarina* sp. nov., a novel bacterium isolated from marine ascidian. *The Journal of general and applied microbiology*, 51(2), 65-71.

Romero T. T, Cortinas N.C. y Gutiérrez. A. V.J. (2009). Diagnóstico nacional de los contaminantes orgánicos persistentes en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-Instituto Nacional de Ecología. 344 p. Disponible en <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/download/608.pdf>

Ruiz-Aguilar G., Fernández-Sánchez J.M., Rodríguez-Vázquez R. & Poggi-Varaldo H.M. (2002). Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from contaminated soil. *Advances in Environmental Research*. 6(4): 559-568.

Ryoo, D., Shim, H., Canada, K., Barbieri, P., & Wood, T. K. (2000). Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-o-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Nature biotechnology*, 18(7), 775-778.

Saha, A. K., & Sinha, A. (2015). Current trend on application of Zero-Valent Iron (ZVI) for dehalogenation of Organo Chlorine Pesticides. *Discovery*, 40(183), 167-174.

Santacruz, G., Bandala, E. R., & Torres, L. G. (2005). Chlorinated pesticides (2,4-D and DDT) biodegradation at high concentrations using immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of environmental science and health, part B.*, 40, 571–583.

Sari, A. A., Tachibana, S., & Limin, S. G. (2013). Enhancement of ligninolytic activity of *Trametes versicolor* U97 pre-grown in agricultural residues to degrade DDT in soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(7), 1-9.

Sayles, G. D., You, G., Wang, M., & Kupferle, M. J. (1997). DDT, DDD, and DDE dechlorination by zero-valent iron. *Environmental science & technology*, 31(12), 3448-3454.

Schwertmann, U., & Taylor, R. M. (1989). Iron oxides. Minerals in soil environments, (mineralsinsoile), 379-438.

Seiber, J. 2001. Environmental Transport and Fate. In: Krieger, R: Handbook of Pesticide Toxicology. USA, San Diego, Academic Press, pp 643-648.

Seo, J. S., Keum, Y. S., & Li, Q. X. (2009). Bacterial degradation of aromatic compounds. *International journal of environmental research and public health*, 6(1), 278-309.

Shahsavari, E., Adetutu, E. M., Anderson, P. A., & Ball, A. S. (2013). Plant residues—A low cost, effective bioremediation treatment for petrogenic hydrocarbon-contaminated soil. *Science of the total environment*, 443, 766-774.

Shim, H., Ryoo, D., Barbieri, P., & Wood, T. (2001). Aerobic degradation of mixtures of tetrachloroethylene, trichloroethylene, dichloroethylenes, and vinyl chloride by toluene-o-

xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(1-2), 265-269.

Smidt, H., & de Vos W.M. (2004). Anaerobic microbial dehalogenation. *Annual review of microbiology*, 58:43–73.

Sørensen, J. (1982). Reduction of ferric iron in anaerobic, marine sediment and interaction with reduction of nitrate and sulfate. *Applied and environmental microbiology*, 43(2), 319-324.

Spring, S., & Rosenzweig, F. (2006). The genera *Desulfitobacterium* and *Desulfosporosinus*:taxonomy. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*, Springer, New York, pp. 771–786.

Stephenson, G., Kuperman, R., Linder, G., & Visser, S. (2002). Toxicity Test for Assessing Contaminated Soils and Ground Water. In: Sunahara, G., Renoux, A., Thellen, C., Gaudet, C. & Pilon, A. (Eds.), *Environmental Analysis of Contaminated Sites*. New York. USA. John Wiley and Sons Ltd, pp. 25-44.

Sudharshan, S., Naidu, R., Mallavarapu, M., & Bolan, N. (2012). DDT remediation in contaminated soils: a review of recent studies. *Biodegradation*, 23(6), 851-863.

Thomas, J.E., Gohil, H. (2011). Microcosm studies on the degradation of o,p-DDT and p,p-DDT, DDE and DDD in a muck soil. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 27, 619-625.

Thomas, J.E., Ou, L.-T., & Al-Agely, A. (2008). DDE remediation and degradation. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, Springer New York, 2008, pp. 55-69.

Tordoir, W. F., & van Sittert, N. J. (1994). Organochlorines. *Toxicology*, 91(1), 51-57.

U.S. Environmental Protection Agency USEPA (1986). Sulfate (turbidimetric), Method 9038, Washington, DC.

U.S. Environmental Protection Agency USEPA (2007a). Ultrasonic Extraction, Method 3550C, Washington, DC.

U.S. Environmental Protection Agency USEPA (2007b). Semivolatile Organic Compounds, Method 8270D, Washington, DC.

Ukisu, Y. (2008). Complete dechlorination of DDT and its metabolites in an alcohol mixture using NaOH and Pd/C catalyst. *Journal of hazardous materials*, 152, 287-292.

UM-BBD.University of Minnesota Biocatalytic and biodegradation pathways database. (2016). Microbial biocatalytic reactions and biodegradation pathways. Biocatalysis/biodegradation database. Disponible en: <http://eawag-bbd.ethz.ch/servlets/pageservlet?ptype=allpathways>

United Nation Environmental Program (UNEP). 2001. Stockholm convention on persistent organic pollutants. Disponible en: <http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/TextoftheConvention/tabid/2232/Default.aspx>

United Nation Environmental Program (UNEP). 2011. The new POPs under the Stockholm Convention. Disponible en: <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>

USA-EPA. (2010). Reference guide to non-combustion technologies for remediation of persistent organic pollutants in stock piles and soil. U. S. E. P. Agency, ed., Second Edition. National Service Centre for Environmental Publications, Cincinnati, OH, 103 p.

USA-EPA (2016). Regional Screening Level (RSL). 2016. Disponible en: <https://www.epa.gov/risk/regional-screening-levels-rsls-generic-tables-may-2016>

Vaillancourt, F.H., Bolin, J.T., & Eltis, L.D. (2004). Ring-cleavage dioxygenases. In *Pseudomonas*. Vol. 3. Ramos, J.L. (Ed.), New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 359-395.

Verma, J. P., Jaiswal, D. K., & Sagar, R. (2014). Pesticide relevance and their microbial degradation: a-state-of-art. *Reviews in environmental science and biotechnology*, 13(4), 429-466.

Velasco, A., Hernández, S., Ramírez, M., & Ortiz, I. (2014). Detection of residual organochlorine and organophosphorus pesticides in agricultural soil in Rio Verde region of San Luis Potosi, Mexico. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 49(7), 498-504.

Volke Sepúlveda, T., & Velasco, J. A. (2003). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT. ISBN 968-817-557-9. 64 p.

Wang, G.L, Zhang, J., Wang, L., Liang, B., Chenk, K., Li, S., Jiang, J. (2010). Co-metabolism of DDT by the newly isolated bacterium, *Pseudoxanthomonas* sp. wax. *Brazilian Journal Microbiology*, 41, 431-438.

Wang, G.L., Bi, M., Liang, B., Jiang, J.D., Li, S.P. (2011). *Pseudoxanthomonas jiangsuensis* sp. Nov., a DDTdegrading bacterium isolated from a long term DDT polluted site. *Current Microbiology*, 62, 1760-1766.

Ware, G., & Whitacre, D. (2004). The Pesticide Book. 6<sup>a</sup> Edición. Willoughby, Ohio, USA. Meister Media Worldwide. 496 p.

Xiao, P., Mori, T., Kamei, I., Kondo, R. (2011). A novel metabolic pathway for biodegradation of DDT by the white rot fungi, *Phlebia lindtneri* and *Phlebia brevispora*. *Biodegradation*, 22, 859-867.

Xiaofei, W., Dianzhong, W., Xiaofei, Q., & Xu, X. (2008). Residues of organochlorine pesticides in surface soils from college school yards in Beijing, China. *Journal of environmental sciences*, 20, 1090–1096.

Xie, H., Shu, L., Xu, Q., Wang, J., Liu, W., Jiang, J., Meng, Y. (2011). Isolation and degradation ability of the DDT-degrading bacterial strain KK. *Environment Earth Science*, 62, 93-99.

Xu, W., Nanqi, R., Hong, Q., Wanli, M., & Yifan, L. (2009). levels, distributions, and source identification of organochlorine pesticides in the topsoils in northeastern China. *Journal of environmental sciences*, 21, 1386–1392.

Yang, S.C., Lei, M. Chen, T.B., Li, X.Y., Liang, Q., & Ma, C. (2010). Application of zerovalent iron (Fe<sup>0</sup>) to enhance degradation of HCHs and DDX in soil from a former organochlorine pesticides manufacturing plant. *Chemosphere*, 79 (7), 727-732.

You, G., Sayles, G.D., Kupferle, M.J., Kim, I.S., & Bishop, P.L. (1996). Anaerobic DDT biotransformation: enhancement by application of surfactants and low oxidation reduction potential. *Chemosphere*, 32, 2269-2284.

Yim, Y.J., Seo, J., Kang, S.I., Ahn, J.H., Hur, H.G. (2008). Reductive dechlorination of methoxychlor and DDT by human intestinal bacterium *Eubacterium limosum* under anaerobic conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 406–411.

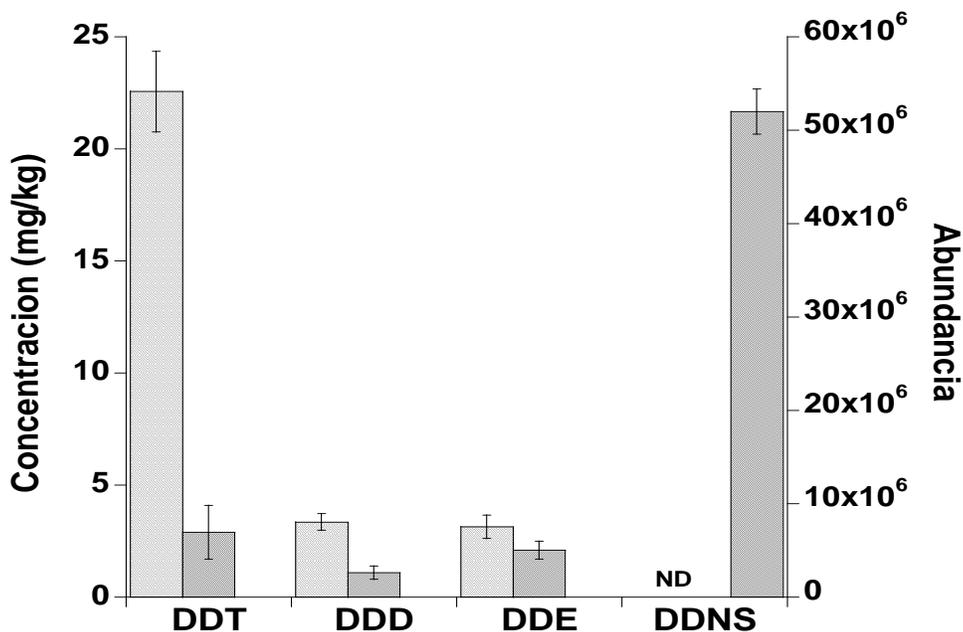
Zagury, G., Dudal, Y., Bureau, J., Bastien, C., & Chasse, R. (2002). Sample Handling and Preparation for Estimation of Mobility, Bioavailability and Toxicity of Contaminants in Soils. In: Sunahara, G., Renoux, A., Thellen, C., Gaudet, C., & Pilon, A. (Eds.), *Environmental Analysis of Contaminated Sites*. New York. USA. John Wiley and Sons Ltd, pp. 9-23.

Zitko, V. (2003). Chlorinated Pesticides: Aldrin, DDT, Endrin, Dieldrin, Mirex. In: Fiedler, H. (Ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3, Part O, Persistent Organic Pollutants*. NB, E5B 1A1, Canada, pp 47-84.

## **13. ANEXOS**

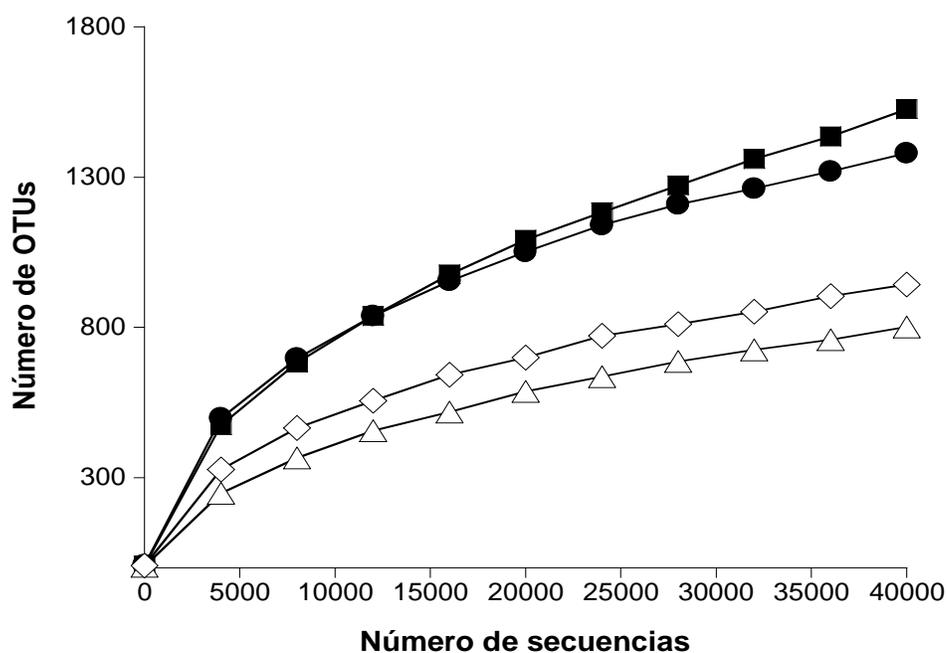
## 13. ANEXOS

### 13.1. Anexo A. Figuras complementarias

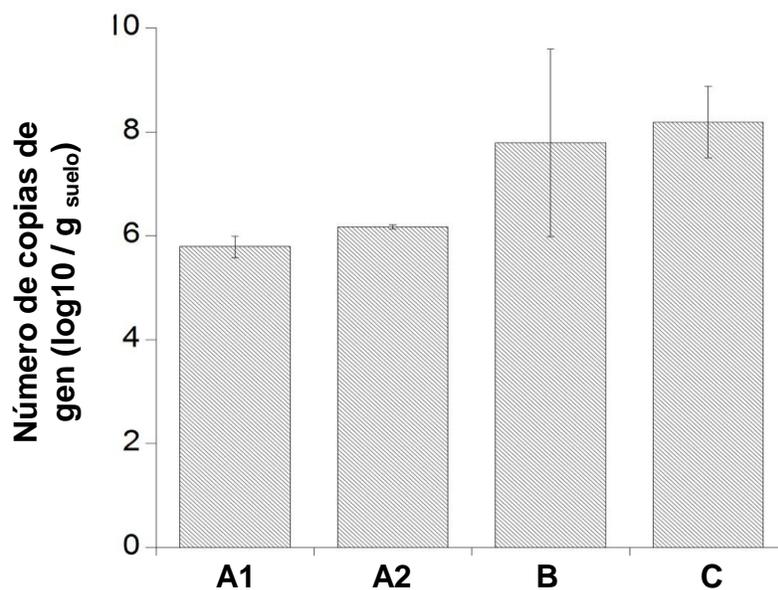


**Figura A1.** Degradación de DDT, DDD y DDE y formación de DDNS mediante el tratamiento de HCV. Concentraciones de los DDX antes del tratamiento (▨) y después del tratamiento (▩).

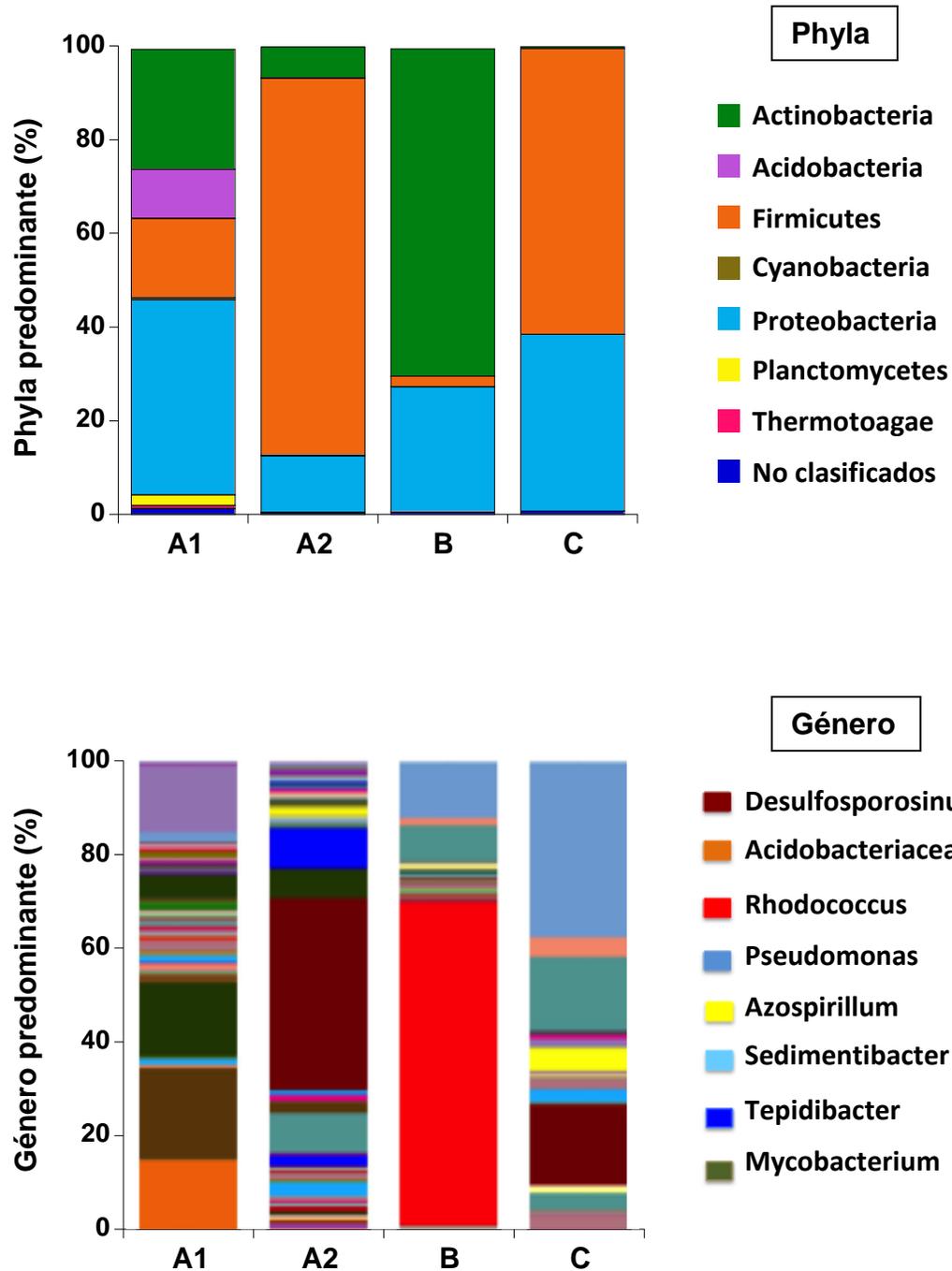
**NOTA:** Las eficiencias de degradación registradas en el tratamiento con HCV fueron del  $87.3 \pm 5.9$  %, para el DDT;  $67.6 \pm 3.7$  %, para el DDD;  $33.5 \pm 2.8$  %, para el DDE. Después de los 4 días de tratamiento con HCV, el suelo registró una acumulación del 1,1-bis(4-clorofenil)etano, que es un producto intermediario de la degradación del DDT (Figura A1).



**Figura A2.** Curva de rarefacción. Suelo original ( ■ ), suelo pretratado HCV ( ● ), suelo tratado con glicerol condiciones anóxicas ( ◇ ) y suelo tratado con tolueno condiciones aerobias ( △ ).



**Figura A3.** Número de copias de genes 16S rDNA. Suelo original ( A1 ), suelo pretratado HCV ( A2 ), y suelo tratado con tolueno condiciones aerobias ( B ) y suelo tratado con glicerol condiciones anóxicas ( C ).



**Figura A4.** Phyla y género de bacterias identificados. Suelo original (A1), suelo pretratado HCV (A2), y suelo tratado con tolueno condiciones aerobias (B) y suelo tratado con glicerol condiciones anóxicas (C).

## 13.2. Anexo B. Artículo publicado en revista arbitrada y participación en simposio del PCNI y congresos nacionales e internacionales.

### Artículo:

Antonio Velasco, Arturo Aburto-Medina, Esmaeil Shahsavari, Sergio Revah, Irmene Ortiz. 2017. Degradation mechanisms of DDX induced by the addition of toluene and glycerol as cosubstrates in a zero-valent iron pretreated soil. **JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS**. 321: 681–689.

### Simposio interno PCNI y congresos nacionales e internacionales:

- Antonio Velasco, Sergio Revah e Irmene Ortíz. 2014. Degradación de DDT y sus intermediarios por bioestimulación como tratamiento secundario al uso de Hierro Cero Valente en suelos. CARTEL. **I Simposio del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería**. UAMC. Ciudad de México. Del 29 y 30 de Mayo de 2014.
- Antonio Velasco, Sergio Revah e Irmene Ortíz. 2015. Mecanismos de degradación del DDT en suelo empleando tolueno y glicerol como cosustratos bajo condiciones aerobias y anóxicas. ORAL. **II Simposio del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería**. UAMC. Ciudad de México. Del 19 al 20 de Octubre, 2015.
- Antonio Velasco, Sergio Revah e Irmene Ortíz. 2015. Deshalogenación reductiva de DDT y sus intermediarios en suelos. CARTEL. **XVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C.** Guadalajara, Jalisco. Del 21 al 26 de Junio de 2015.
- Antonio Velasco, Arturo Aburto, Sergio Revah and Irmene Ortiz. 2016. Tratamiento secuencial Abiótico-biótico inducido por cosustratos para degradar DDT en suelos. ORAL. **III Simposio del Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería**. UAMC. Ciudad de México. Del 04 al 05 de Septiembre, 2016.
- Antonio Velasco, Arturo Aburto-Medina, Sergio Revah, Irmene Ortiz. 2016. Abiotic-biotic sequential treatment for degradation of DDT in soil induced by cosubstrates. ORAL. **10th Conference of International Society of Environmental Biotechnology**. Barcenola, España. Del 31 de mayo al 03 de junio de 2016.
- Antonio Velasco, Arturo Aburto-Medina, Sergio Revah, Irmene Ortiz. 2017. Importancia del Mecanismo de Degradación del DDT en suelo: uso del bagazo de caña como cosustrato. CARTEL. **XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.** Puerto Vallarta, Jalisco, México. Del 25 al 30 de Junio de 2017.

**13.3. Anexo C.** Constancia de primer lugar obtenido en el congreso de la SMBB 2015.



## 13.4. Constancia de mejor tesis de doctorado del PCNI de 2017.

