UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
Región Poza Rica - Tuxpan

Maestría en Ciencias del Ambiente

TRABAJO DE INTERVENCION

“Degradación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en un suelo utilizando *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia*”

P R E S E N T A

I.S.C. José Leonardo Hernández Castellanos

Director

Dr. Leandro Chaires Martínez

Co- Director

Dr. Rodrigo Cuervo González

Tuxpan Veracruz diciembre, 2018

Tuxpan de Rodríguez Cano, Veracruz, a 18 de Octubre de 2018.

Dr. José Luis Alanís Méndez
Coordinador de la Maestría en Ciencias del Ambiente

El presente trabajo de investigación titulado "Degradación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en un suelo utilizando *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia*", realizado por el Ing. José Leonardo Hernández Castellanos, bajo la dirección del Dr. Leandro Chaires Martínez y consejo particular del Dr. Rodrigo Cuervo González, ha sido revisado y aprobado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

Dr. Leandro Chaires Martínez

Director

Dr. Rodrigo Cuervo González

Codirector

Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

Revisión del Trabajo de Intervención del alumno: ING. **José Leonardo Hernández Castellanos**

JURADO EXAMINADOR

NOMBRE	FECHA	DICTAMEN	FIRMA
Francisco Limón Salvador	03 - Dic - 2018	Aprobado	
Rosa Idalia Hernández Herrera	13 - Dic - 2018	Aprobado	
Pablo San Martín del Angel	13 - Dic - 2018	Aprobado	

En la presente revisión se acordó que el Trabajo de Intervención denominado "**Degradación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en un suelo utilizando *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia***" que presenta el sustentante para obtener el Grado de Maestro, está terminado por lo que puede proceder a su inmediata impresión.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por permitir superarme mediante los posgrados de calidad.

Al Dr. Leandro Chaires Martínez, Dr. Rodrigo Cuervo González y al Dr. Juan Manuel Pech Canché por guiarme y asesorarme en todas las etapas del proyecto.

A mi comisión revisora integrada por la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera, Dr. Pablo San Martín del Ángel, al Mtro. Francisco Limón Salvador por su compromiso invaluable y tiempo para formar nuevos profesionistas.

Al M.C. Raúl Enrique Contreras Bermúdez y la I.Q. Andrea Barrientos Ortega por su confianza y apoyo en el uso del equipo de cromatografía HPLC.

Al M.C. Nancy Deyanira Hernández Castellanos y el Mtro. Pascual Hernández Bautista por su ayuda en los análisis estadísticos.

Al M.B. Alejandro Cruz Hernández y la I.A. Nathaly Rivera Espinoza por su apoyo en laboratorio.

RESUMEN

La creciente contaminación del suelo provocada por el uso de plaguicidas, ha generado la implementación de estrategias de limpieza y recuperación de suelos afectados por los contaminantes. En el presente trabajo se evaluó el proceso de biorremediación utilizando la levadura *Candida tropicalis* y la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* en suelos contaminados con plaguicidas organoclorados y organofosforados. Se llevaron a cabo 3 tratamientos; el primero utilizando *C. tropicalis*, el segundo *S. maltophilia* y el tercero un consorcio de *C. tropicalis/S. maltophilia*. Al inicio de los tratamientos la concentración de los plaguicidas fue de 130 mg/Kg en 10 g de suelo, posteriormente a los 30 días del experimento, se obtuvieron valores de degradación superiores al 50 %. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control. El valor más alto de degradación utilizando *C. tropicalis* fue de 98.32 % en malatión, seguido de 81.01% en lindano y 74.23 % en clorpirifos. Para *S. maltophilia* el valor más alto de degradación fue de 63.23 % en metil paratión, en el consorcio *C. tropicalis*/*S. maltophilia* el valor más alto de degradación fue de 87.05 % en aldrín. El presente trabajo evidencia que la levadura *Candida tropicalis* es capaz de degradar algunos plaguicidas organofosforados y organoclorados, por lo tanto, puede ser empleada en la remediación de suelos contaminados con plaguicidas.

Palabras clave: Biorremediación, *Candida tropicalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, plaguicidas, contaminación, degradación.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS 2
RESUMEN..... 3
1. INTRODUCCIÓN..... 1
2. ANTECEDENTES..... 4
2.1 Plaguicidas 4
2.2 Degradación de plaguicidas organofosforados y organoclorados por microorganismos 10
2.2.1 Degradación de plaguicidas organofosforados por *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia* 11
3. OBJETIVOS..... 13
3.1 Objetivo general..... 13
3.2 Objetivos específicos..... 13
4. MATERIALES Y MÉTODOS..... 14
4.1 Diseño experimental 14
4.2 Material biológico..... 15
4.3 Crecimiento celular 15
4.4 Medios de obtención de suelos 15
4.5 Aplicación de *C. tropicalis* y *S. maltophilia* en suelo 16
4.6 Extracción del plaguicida 16
4.7 Análisis de las muestras en HPLC..... 16
4.8 Análisis estadísticos 17
5. RESULTADOS 18
5.1 Aplicación en suelo..... 18
6. DISCUSIÓN..... 24
6.1 Degradación de malatión..... 24
6.2 Degradación de clorpirifos..... 25
6.3 Degradación de metil paratión..... 25
6.4 Degradación de aldrín 25
6.5 Degradación de lindano..... 26
7. CONCLUSIONES 28

8. APLICACIÓN PRÁCTICA 29
9. BIBLIOGRAFÍA 30
ANEXOS 39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Degradación de malatión con diferentes cepas. Control inicial (CTRL 1), control 30 días (CTRL 2), *Candida tropicalis* 98.32 %(C.T.), *Stenotrophomonas maltophilia* 98.23 %(S.M.), *C. tropicalis/S. maltophilia* 95.6 %(C.T./S.M.). Letras no iguales indican diferencias significativas. Tiempo de tratamiento: 30 días. 19

Figura 2. Degradación de clorpirifos con diferentes cepas. Control inicial (CTRL 1), control 30 días (CTRL 2), *Candida tropicalis* 74.23 %(C.T.), *Stenotrophomonas maltophilia* 72.44 %(S.M.), *C. tropicalis/S. maltophilia* 62.19 %(C.T./S.M.). Letras no iguales indican diferencias significativas. Tiempo de tratamiento: 30 días. 20

Figura 3. Degradación de metil paratión con diferentes cepas. Control inicial (CTRL1), control 30 días (CTRL 2), *Candida tropicalis* 49.78 %(C.T.), *Stenotrophomonas maltophilia* 63.23 %(S.M.), *C. tropicalis/S. maltophilia* 52.58 %(C.T./S.M.). Letras no iguales indican diferencias significativas. Tiempo de tratamiento: 30 días. 21

Figura 4. Degradación de aldrín con diferentes cepas. Control (CTRL 1), control 30 días (CTRL 2), *Candida tropicalis* 55.79 %(C.T.), *Stenotrophomonas maltophilia* 80.17 %(S.M.), *C. tropicalis/S. maltophilia* 87.05 %(C.T./S.M.). Letras no iguales indican diferencias significativas. Tiempo de tratamiento: 30 días. 22

Figura 5. Degradación de lindano con diferentes cepas. Control (CTRL 1), control 30 días (CTRL 2), *Candida tropicalis* 81.01 %(C.T.), *Stenotrophomonas maltophilia* 75.85 %(S.M.), *C. tropicalis/S. maltophilia* 78.34 %(C.T./S.M.). Letras no iguales indican diferencias significativas. Tiempo de tratamiento: 30 días. 23

1. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas se han utilizado durante décadas para asegurar la demanda de alimentos y productos agrícolas a nivel mundial. De igual manera, se han usado para controlar vectores de enfermedades que afectan la salud humana. Sin embargo, con el aumento de la resistencia de las plagas a dichos productos en muchas regiones se emplean de forma indiscriminada y con ello se ha alterado el equilibrio ecológico afectándose muchos organismos de las cadenas tróficas de los ecosistemas, incluyendo el hombre. Se han detectado residuos de plaguicidas en alimentos, aguas, suelos, organismos acuáticos y fluidos biológicos (Ahmed, 2001) y se calcula que actualmente se consume más de medio kilo de plaguicidas por persona (Barr y Needham, 2002).

En México se emplean aproximadamente 72,000 toneladas de plaguicidas de los cuales la mayoría son altamente tóxicos y persistentes en el ambiente (INEGI, 2013). El estado de Veracruz ocupa el tercer lugar nacional en el uso de plaguicidas en la agricultura o para usos sanitarios y junto con Sinaloa, Chiapas, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California y Tamaulipas consumen alrededor del 70% de los plaguicidas (Albert, 2005).

Los plaguicidas utilizados en México se encuentran en el grupo de los organoclorados y organofosforados. Los organoclorados son estables y persistentes en el ambiente, tienden a acumularse en los tejidos grasos y son bioacumulables en las cadenas tróficas. El clorpirifos es catalogado como un compuesto tóxico para la fauna terrestre y acuática, y para las personas, puede almacenarse en el suelo desde cinco días hasta veinte años dependiendo de su concentración, el tipo de suelo y las condiciones ambientales existentes (Mesa *et al*., 2005). En el caso del metil paratión y el malatión tienen efectos similares al clorpirifos (CICOPLAFEST, 2004).

Se ha detectado presencia de plaguicidas organoclorados en suelos y granos de trigo, al ser persistentes en el ambiente, son fácilmente movibles en suelos agrícolas, convirtiéndose en una fuente de contaminación para los consumidores (Waliszewski *et al.,* 2003).

La biodegradación, utilizando microorganismos o enzimas activas para desintoxicar y degradar plaguicidas organoclorados y organofosforados han recibido atención como un aprovechamiento eficiente y costeable para la limpieza de ecosistemas contaminados (Chen *et al,* 2014). Se ha estudiado la biodegradación de muchos plaguicidas mediante el uso de microorganismos en cultivos líquidos, por ejemplo, en un estudio reciente *Candida tropicalis* demostró tener la capacidad de degradar en medio líquido los plaguicidas Clorpirifos etil y el fenoxiacético 2,4-D (Fosados, 2016). Sin embargo, falta investigar la capacidad de este microorganismo en

sistemas más complejos, como el suelo. Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo determinar la capacidad de los microorganismos de degradar plaguicidas organofosforados y organoclorados en un suelo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plaguicidas

Se define como plaguicida a “cualquier sustancia o mezcla de sustancias con ingredientes químicos o biológicos destinados a repeler, destruir o controlar cualquier plaga o a regular el crecimiento de las plantas” (FAO, 2014). Una vez aplicados, los plaguicidas se depositan en el suelo y a través de procesos naturales se dispersan en el ambiente. La concentración de plaguicidas se incrementa a medida que se asciende en la pirámide alimenticia debido al fenómeno de bioacumulación (Ortíz *et al.,* 2013, Del Puerto Rodríguez *et al.,* 2014).

De acuerdo a su composición química los plaguicidas se dividen en orgánicos, inorgánicos y biológicos. Los pesticidas orgánicos se dividen en organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides (Cuadro 1) (Ortíz *et al.,* 2013).

Los plaguicidas organofosforados presentan baja persistencia en el ambiente, una vez absorbidos y distribuidos en el organismo, se metabolizan y se excretan rápidamente, sin embargo desarrollan un alto nivel de toxicidad afectando el sistema nervioso central, la mortalidad por intoxicaciones agudas por organofosforados va del 3 al 20% (Fernández *et al.,* 2010).

Cuadro 1. Clasificación de los plaguicidas orgánicos.

COMPOSICIÓN QUÍMICA	CARACTERÍSTICAS	MECANISMO DE ACCIÓN	EJEMPLOS
ORGANOCLORADOS	Orgánicos con cloro en la molécula estructura cíclica liposolubles acumulativos en el organismo persistentes en el ambiente	Estos actúan por interferencia o inhibición de la enzima atpasa que regula los iones de ca++ de la membrana celular impidiendo así el rápido retorno al estado de equilibrio de la membrana nerviosa.	Endrin, dieldrín, aldrín, lindano, hexaelorociclohexano, heptacloro, diclorodifeniltricloroetano (ddt), metoxicloro, clordano, toxafeno.
ORGANOFOSFORADOS	En su mayoría son ésteres, amidas u otros derivados simples de los ácidos fosfóricos o tiofosfóricos, la mayoría se utilizan como insecticidas de contacto, insecticidas sistemáticos en la protección de las plantas	Actúan como inhibidores de la colinesterasa presentándose como sustitutos de la acetil colina, y a ello se debe su acción tóxica	dimetión, paradión, metilparatión, fentión, diazinón, diclorvós, fenitrition, triclorfón, dimetoato, malatión, clorpirifos
CARBAMATOS	Derivado del ácido carbámico que está estrechamente emparentado con la urea; se caracterizan porque pequeñas modificaciones en su estructura hacen que el producto sea activo contra unas especies de insectos y sobre otras no	Su acción es similar al de los organofosforados, ya que inhibe la acción de la enzima **colinesterasa** que se encuentra en la planta motora	aldicarb, carbofurán, carbámico, metomil, propoxur, carbariloa, carbofuran, dimetilán, promicide.
PIRETROIDES	Insecticidas de origen vegetal, principalmente extraídas del crisantemo (C*hrysanteman cinaerefolium)*	Actúa sobre el sistema nervioso central, produciendo hiperexitación y parálisis con pérdida de coordinación, convulsiones, postración y muerte	Resmetrina, bioresmetrina, aletrina, deltametrina, cipermetrina, permetrina, fenvaletato.

En México los plaguicidas organofosforados más utilizados son el clorpirifos, malatión y metil paratión, en el caso de los organoclorados son el lindano, aldrín y clordano. El plaguicida clorpirifos reduce la diversidad y abundancia en ecosistemas acuáticos, es extremadamente tóxico para peces, organismos marinos y estuarinos (camarones y cangrejos), la toxicidad de éste compuesto se incrementa al aumentar la temperatura. En las aves la severidad de sus efectos

tóxicos varía de moderada a extremadamente alta, tales efectos adversos son: debilidad en las alas, temblores, parálisis, diarrea, letargo, disminución del número y peso de huevos, pérdida de peso en crías. En el hombre se absorbe por la piel, pulmones y tracto intestino y se distribuye rápidamente al torrente sanguíneo, se ha demostrado que es antiandrogénico, induce alteraciones en la tiroides, glándulas suprarrenales, por lo que reduce los niveles séricos de las hormonas. Los niños expuestos a niveles altos de clorpirifos son más propensos a experimentar un índice de desarrollo psicomotor, problemas de atención y problemas generalizados de desarrollo (Rauh *et al*., 2006; Fortenberry *et al.,* 2012).

El malatión se usa para matar insectos en cosechas agrícolas, productos almacenados, jardines domésticos y campos de golf. Debido a que el malatión puede ser perjudicial para el ser humano, la EPA sugiere a los trabajadores esperar 12 horas después de la aplicación para entrar al terreno, dependiendo de la concentración, varía hasta 6 días después de aplicarlo y puede ser transportado por viento, neblina o lluvia a áreas lejos donde se usó (Martínez y Gómez, 2007).

El metil paratión está aprobado para usarlo en cosechas, puede ser dispersado por efecto del viento, lluvia o neblina. Puede entrar en el cuerpo humano por consumo de alimentos o beber agua que lo contenga, al bañarse o nadar con agua contaminada, al contacto con plantas o suelos rociados recientemente. Una

vez expuesto, es absorbido rápidamente y pasa a la sangre, posteriormente al hígado y al cerebro. El hígado transforma cierta cantidad de metil paratión en metil paraoxón, sustancia química más perjudicial. El metil paratión interfiere con el normal funcionamiento del sistema nervioso y cerebro, las exposiciones breves a niveles altos pueden causar mareo, confusión, dolores de cabeza, opresión del pecho, vómitos, diarrea, pérdida de conocimiento y muerte. En el caso de los plaguicidas organofosforados como el clorpirifos etil, malatión y paratión, se les responsabiliza por la mayoría de intoxicaciones severas en vertebrados (Fernández, 2004).

Los plaguicidas organoclorados son un grupo importante de contaminantes ambientales, son sustancias liposolubles que atraviesan la barrera hematoencefálica y se distinguen por su neurotoxicidad, se incluyen dentro del grupo de compuestos orgánicos persistentes; debido a la resistencia de degradación biológica, química y liposolubilidad hacen que se bioacumulen y biomagnifiquen a través de la cadena trófica. Los plaguicidas organoclorados se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente, y su presencia es habitual en los tejidos de los seres humanos (Lakind *et al.,* 2001).

Estos plaguicidas incluyen DDT, aldrina, dieldrina, heptacloro, clordano, lindano, endrina, mirex, hexacloruro y toxafeno. A pesar de la prohibición y restricción del uso de estos plaguicidas en los países desarrollados durante los años 1970 y 1980, algunos países en desarrollo todavía los usan para fines agrícolas y

públicos debido al bajo costo y la versatilidad en el control de varios insectos en cosechas como maíz y algodón (Tanabe *et al.,* 1994).

El aldrín es un insecticida organoclorado que es extremadamente persistente en el ambiente y puede acumularse en organismos, como en pescados o mariscos, en tubérculos y productos lácteos. Durante los años 1970 a 1980 se ha utilizado como un insecticida del suelo para controlar gusanos de la raíz, escarabajos y termitas en cultivos de maíz y algodón (Ejobi *et al.,* 1996). Debido a la preocupación del daño al ambiente y a la salud pública, la EPA prohibió el uso de aldrín en 1974, excepto para controlar terminas, sin embargo, en 1987 la EPA prohibió cualquier uso del adrín. La luz solar y las bacterias transforman aldrín en dieldrín, por ello, es fácil encontrar dieldrín en el ambiente. Las plantas incorporan y almacenan aldrín y dieldrín del suelo y se degrada muy lentamente. Los niveles residuales de dieldrín en suelos aún representan un problema ambiental significativo, debido a que pueden ser absorbidos por productos agrícolas como las plantas cucurbitáceas (Hashimoto, 2005).

El lindano es una sustancia química sintética, es utilizado como plaguicida en frutas, plantaciones forestales y hortalizas. Es un sólido blanco que puede evaporarse al aire, es incoloro y tiene un olor a moho. Se encuentra también en medicamentos (lociones, cremas, shampoos) para tratar escabiasis (Rojo *et al.,* 2011). Una vez aplicado en el suelo, las partículas pueden ser removidas por el aire o lluvia largas distancias y son persistentes en el ambiente. El lindano puede acumularse en el tejido graso de peces y puede entrar al cuerpo humano por

consumo de alimentos contaminados, por inhalación de aire con partículas del plaguicida o por contacto directo a través de la piel. Algunas de las personas que han tenido contacto directo en dosis altas del plaguicida han sufrido alteraciones de sangre, mareo, dolores de cabeza y en el caso de varones, disminución del recuento espermático (Avivar *et al.,* 2009).

La degradación de lindano se produce por decloraciones y deshidroalcoración hasta formar monoclorobencenos y benceno; el benceno se convierte en dióxido de carbono (Krishna *et al.,* 2008) (Figura 10). Se ha informado que los organismos *Clostridium sphenoides*, *Pseudomonas sp*., *Sphingomonas paucimobilis* y *Pandoraea sp* pueden degradar lindano (Senoo *et al.,* 1989, Nagasawua *et al.,* 1993).

El lindano es estable a la hidrólisis con pH de 5-7, sin embargo, en valores superiores tiene un comportamiento inestable (Siddique *et al.,* 2002), el aumento de la temperatura influye en la degradación de lindano en los suelos (Samuel *et al.,* 1990).

Ante esta problemática, surgen investigaciones para minimizar el uso indiscriminado de plaguicidas; así como investigaciones dirigidas a la restauración de los ecosistemas que han sufrido las consecuencias del uso excesivo de estos compuestos.

Debido a los efectos de bioacumulación en la cadena trófica, persistencia y toxicidad junto con el problema de salud pública que representan los plaguicidas antes mencionados, se han desarrollado tecnologías para la recuperación de los sistemas impactados, como la biorremediación, la cual debido a la capacidad metabólica de algunos microorganismos como las bacterias y levaduras contribuyen a la depuración de suelos, agua y aire; degradan los contaminantes a CO_2 y agua, disminuyendo los efectos causados por la contaminación (Trejo y Sepúlveda, 2003).

2.2 Degradación de plaguicidas organofosforados y organoclorados por microorganismos

Los microorganismos son capaces de mineralizar plaguicidas completa o parcialmente, ya sea utilizándolos como fuente de carbono (biodegradación) o por cometabolismo en donde la degradación ocurre por la acción de enzimas extracelulares. Cabe mencionar que la actividad de los microorganismos está fuertemente influenciada por la temperatura, la humedad, el pH y los nutrientes del suelo, así como la población de microorganismos y la naturaleza química del plaguicida (Muller K., 2007).

Se han realizado estudios de degradación de plaguicidas organofosforados como metil paratión, paraxon metilo, diazinon, paratión y clorpirifos, con bacterias como *Stenotrophomonas spp, Nostoc muscorum, Bacillus subtilis, Streptomyces spp,*

Azotobacter chroococcum y Corynebacterium humireducens, Pseudomonas fluorescens, Alcaligenes denitrificans (Rama y Ligy 2008; Botero *et al.,* 2012; Cuozzo *et al.,* 2012; El-Helow *et al.,* 2013; Wael *et al.,* 2014; Briz-López 2014; Deng *et al.,* 2015) y hongos como *Cladosporium cladospoioides* y *Mucor ramanianus, Aspergillus niger Gliocladium sp.* y *Candida tropicalis.* (Rozo y Caredenal, 2013; Liu *et al.*, 2014; Fosados, 2016).

2.2.1 Degradación de plaguicidas organofosforados por *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia*

La levadura *Candida tropicalis* desarrolla colonias de color blanco crema o blanco grisáceo mate, de superficie lisa, cremosa y resistente. La morfología microscópica hace referencia a células globosas sin cápsula (3.05.5 x 4.09.0 µm). Cuando se reproduce en medios de cultivo líquidos, por lo general forma una película delgada en la cual puede tener atrapadas burbujas de gas. Las pseudohifas de *C. tropicalis* portan blastosporas simples en racimos, en el aislamiento inicial algunas cepas producen clamido conidios. Estos difieren un poco de los de *C. albicans*, y no suelen tener célula de sostén. La producción de estos conidios cesa en el subcultivo, mientras que en *C. albicans* es una característica constante (Rippon, 1988; Llanos, 2015).

Los estudios con *C. tropicalis* se han enfocado a la biorremediación de hidrocarburos del diésel y la remoción de metales pesados. Sin embargo un

estudio reciente demuestra la capacidad de *C. tropicalis* de crecer en un medio líquido con altas concentraciones de un plaguicida organofosforado como es el clorpirifos etil y un fenoxiacético como el 2,4D y degradar clorpirifos (Fosados, 2016). No obstante, se desconoce su comportamiento en sistemas más complejos como el suelo, o el proceso de biorremediación adecuado usando ésta levadura en condiciones de campo.

Stenotrophomonas maltophilia es un bacilo aerobio, no fermentativo, pequeño y fino, Gram-negativo, de metabolismo oxidativo que se desarrolla rápidamente en medios de cultivo comunes (Schaumann, 2003). Las colonias son rugosas de 3 a 5 mm de diámetro y olor característico a amoniaco. *S. maltophilia* actualmente se encuentra en estudio para el desarrollo de bioplaguicidas, es capaz de degradar compuestos xenobióticos como tolueno, etilbenzeno, tolueno y xileno (Lee *et al*, 2002), hidrocarburos HAPs de alto peso molecular, por lo tanto, posee un potencial uso en biorremediación de suelos.

Por lo anterior expuesto, el presente trabajo se enfocó en determinar la capacidad de *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia* de biorremediar suelos contaminados por clorpirifos, malatión, metil paratión, aldrín y lindano.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Establecer un proceso de biorremediación de suelos contaminados por plaguicidas organofosforados (malatión, clorpirifos y metil paratión) y organoclorados (aldrín y lindano) utilizando *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia.*

3.2 Objetivos específicos

- Generación de suelos contaminados con plaguicidas organofosforados (clorpirifos, malatión y metil paratión) y organoclorados (aldrín y lindano).

- Determinar la degradación de los plaguicidas organofosforados y organoclorados utilizando *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia* mediante cromatografía HPLC.

- Identificar el mejor tratamiento para la degradación de los plaguicidas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño experimental

Se establecieron tres tratamientos de biorremediación (1. *C. tropicalis*; 2. *S. maltophilia* y 3. Consorcio *C. tropicalis*/*S. maltophilia*) con dos controles para verificar la degradación intrínseca y tres réplicas cada uno; en muestras de suelos contaminados con los siguientes plaguicidas: malatión, clorpirifos, metil paratión, aldrín y lindano. Los tratamientos se inocularon con las cepas en mención en cantidades de 10 mL y 5:5 v/v mL del consorcio, cada tercer día en 10 gramos de suelo contaminado durante 30 días naturales, excepto en los controles (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diseño experimental de los plaguicidas degradados (malatión, clorpirifos, metil paratión, aldrín, lindano). CTRL 1: Control inicial; CONTROL 2: Control a 30 días.

Repetición	Control (CTRL 1)	Control (CTRL 2)	*Candida tropicalis* (C.T.)	*Stenotrophomonas maltophilia* (S.M.)	Consorcio C.T./S.M.
1	0 mL	0 mL	10 mL	10 mL	5/5 mL
2	0 mL	0 mL	10 mL	10 mL	5/5 mL
3	0 mL	0 mL	10 mL	10 mL	5/5 mL

4.2 Material biológico

Se trabajó con la levadura *C. tropicalis* y la bacteria *S. maltophilia*, las cuales fueron aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos por el grupo de investigación del Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache. Ambas cepas se mantuvieron en refrigeración a 4° C en medio de peptona/glucosa (Chaires-Martínez *et al.,* 2015).

4.3 Crecimiento celular

Para reactivar el crecimiento de *C. tropicalis*, la levadura se inoculó en 200 ml de medio de peptona y dextrosa. En el caso de *S. maltophilia*, la cepa se inoculó en 200 mL de medio de peptona y fructuosa. Previamente los 2 matraces de 500 mL fueron esterilizados en una autoclave, con tapón de algodón estéril y papel aluminio, a una presión de 15 psi y a una temperatura de 121° C durante un tiempo de 15 minutos. Los matraces inoculados se introdujeron en una incubadora marca Shaking modelo 211DS a 120 r.p.m. y 30° C durante 24 horas (Chaires-Martínez *et al.,* 2015).

4.4 Medios de obtención de suelos

El suelo fue esterilizado en autoclave, en vasos de precipitado de 500 mL a una presión de 15 psi y una temperatura de 121° C durante 20 minutos con tapón de papel estéril y papel aluminio, posteriormente se contaminó con 130 mg/kg de plaguicidas organofosforados y organoclorados (clorpirifos, malatión, metil

paratión, aldrín, lindano), los cuales fueron homogeneizados manualmente en un vaso de precipitado de 100 mL, posteriormente se depositaron individualmente en platos de laboratorio.

4.5 Aplicación de *C. tropicalis* y *S. maltophilia* en suelo

Se inocularon 10 ml del cultivo de *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia* en los suelos obtenidos para los diferentes tratamientos excepto en los blancos, con una periodicidad de cada tercer día durante 30 días.

4.6 Extracción del plaguicida

Una vez terminado el período de tratamiento, el suelo se vertió en matraces de 125 ml, se agregaron 20 ml de hexano y se introdujeron en la incubadora a 25° C y 120 r.p.m. por un período de 24 horas, posteriormente los matraces fueron sometidos a calor a 80° C en una estufa eléctrica para evaporar el hexano. Terminado este proceso, se añadió 15 ml de acetonitrilo grado HPLC para absorber el plaguicida y se filtraron por medio de acrodisc de nylon para jeringa de 22µm, la muestra final se almacenó en viales de vidrio para su posterior análisis en cromatografía HPLC.

4.7 Análisis de las muestras en HPLC

Se utilizó el cromatógrafo HPLC marca Varian, modelo 325 LC Detector y lámpara de deuterio, con una columna pursuit 5 c-18 (150 x 4.6 mm), fase móvil de

acetonitrilo/agua (90:10, v/v 600 ml) a un flujo de 1 ml por minuto. Primeramente se purgó el sistema con la fase móvil para eliminar el aire por 40 min, posteriormente se inyectó el estándar de los plaguicidas para conocer el tiempo de retención, acto seguido, se tomó una muestra de 20µl del vial y analizó con un tiempo de retención de 10 min. La primer muestra inyectada fue el blanco, después los tratamiento con las diferentes cepas y sus respectivas replicas, como resultado final obtuvimos el cromatograma, donde se observaron los tiempos de retención y picos de los plaguicidas antes del tratamiento (controles) y después de la aplicación de las cepas.

4.8 Análisis estadísticos

Se verificó el nivel de significancia estadística, las medias y la desviación estándar de los tratamientos y sus réplicas. Así mismo, se analizaron los resultados con la prueba de normalidad Shapiro – Wilk, para verificar la distribución normal y se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y pruebas pos hoc (Tukey) mediante el uso del programa estadístico R versión 3.1.2 (2014-10-31) -- "Pumpkin Helmet" Copyright (C) 2014 The R Foundation for Statistical Computing Platform: i386-w64-mingw32/i386 (32-bit); los resultados que no tuvieron distribución normal se analizaron con la prueba Kruskal- Wallis.

5. RESULTADOS

5.1 Aplicación en suelo

Se midió la capacidad de las cepas en la degradación de plaguicidas organofosforados y organoclorados, la concentración inicial de los plaguicidas en los suelos es de 130 mg/Kg. Al aplicar las cepas los resultados indican valores de degradación superiores al 50 %. Para malatión la concentración final es de 2.184 mg/Kg (C.T.), 2.301 mg/Kg (S.M.) y 5.72 mg/Kg (C.T./S.M.). El tratamiento uno tuvo mayor porcentaje de degradación con respecto al control, dichos valores mostraron diferencias estadísticas significativas, con un valor de significancia de p= 0.002849; se observa que no hubo degradación intrínseca entre los controles (CTRL 1, CTRL 2) (Figura 1).

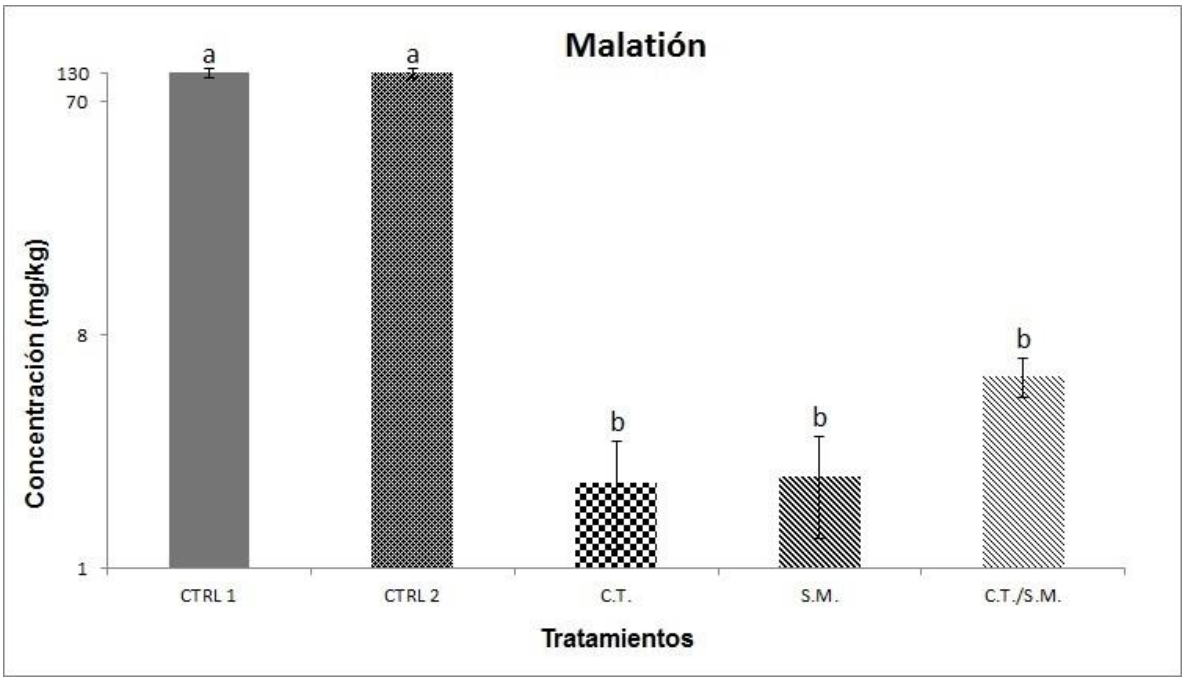


Figura 1. Degradación de malatión con diferentes cepas. Control inicial (CTRL 1), control 30 días (CTRL 2), *Candida tropicalis* 98.32 %(C.T.), *Stenotrophomonas maltophilia* 98.23 %(S.M.), *C. tropicalis/S. maltophilia* 95.6 %(C.T./S.M.). Letras no iguales indican diferencias significativas. Tiempo de tratamiento: 30 días.

En el caso de clorpirifos la concentración final es de 33.5 mg/Kg (C.T.) 35.82 mg/Kg (S.M.) y 49.15 mg/Kg (C.T./S.M.). El tratamiento uno tuvo mayor porcentaje de degradación con respecto al control, se observaron diferencias estadísticas significativas, valor de significancia de p= 0.0004933; se observa que no hubo degradación intrínseca entre los controles (CTRL 1, CTRL 2) (Figura 2).

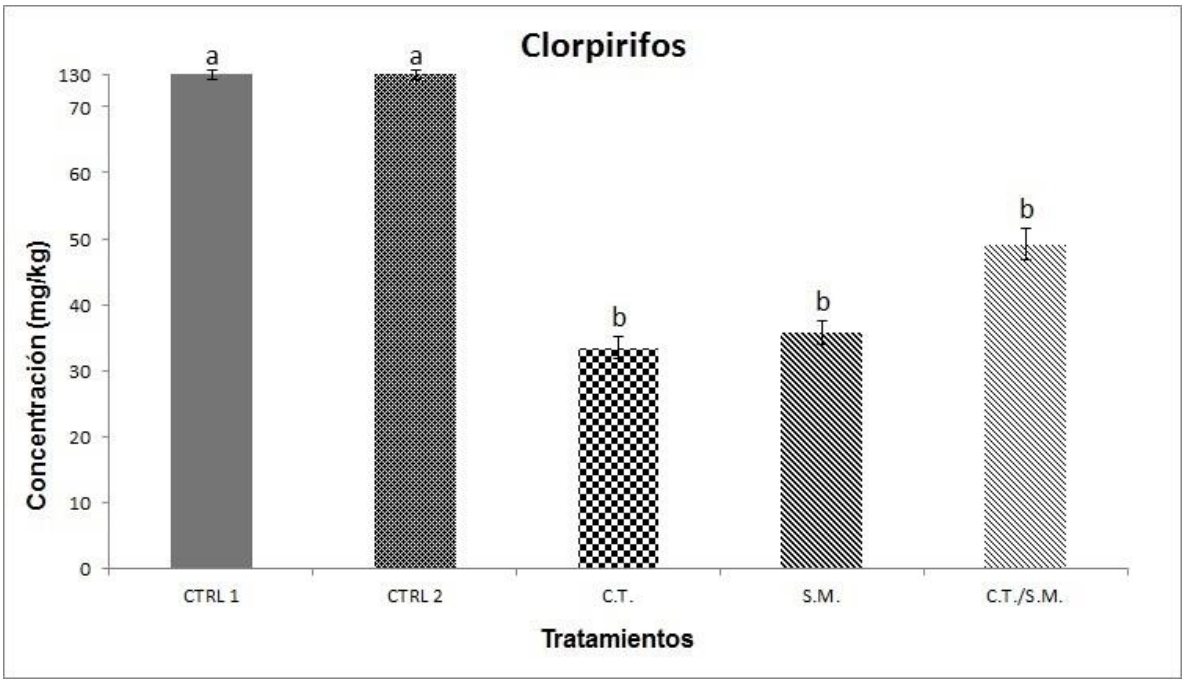


Figura 2. Degradación de clorpirifos con diferentes cepas. Control inicial (CTRL 1), control 30 días (CTRL 2), *Candida tropicalis* 74.23 %(C.T.), *Stenotrophomonas maltophilia* 72.44 %(S.M.), *C. tropicalis/S. maltophilia* 62.19 %(C.T./S.M.). Letras no iguales indican diferencias significativas. Tiempo de tratamiento: 30 días.

Para metil paratión, la concentración final es de 65.28 mg/Kg (C.T.), 47.81 mg/Kg (S.M.) y 61.65 mg/Kg (C.T./S.M.). El tratamiento 2 tuvo mayor porcentaje de degradación con respecto al control, se observaron diferencias estadísticas significativas, valor de significancia de p= 0.0007343; se observa que no hubo degradación intrínseca entre los controles (CTRL 1, CTRL 2) (Figura 3).

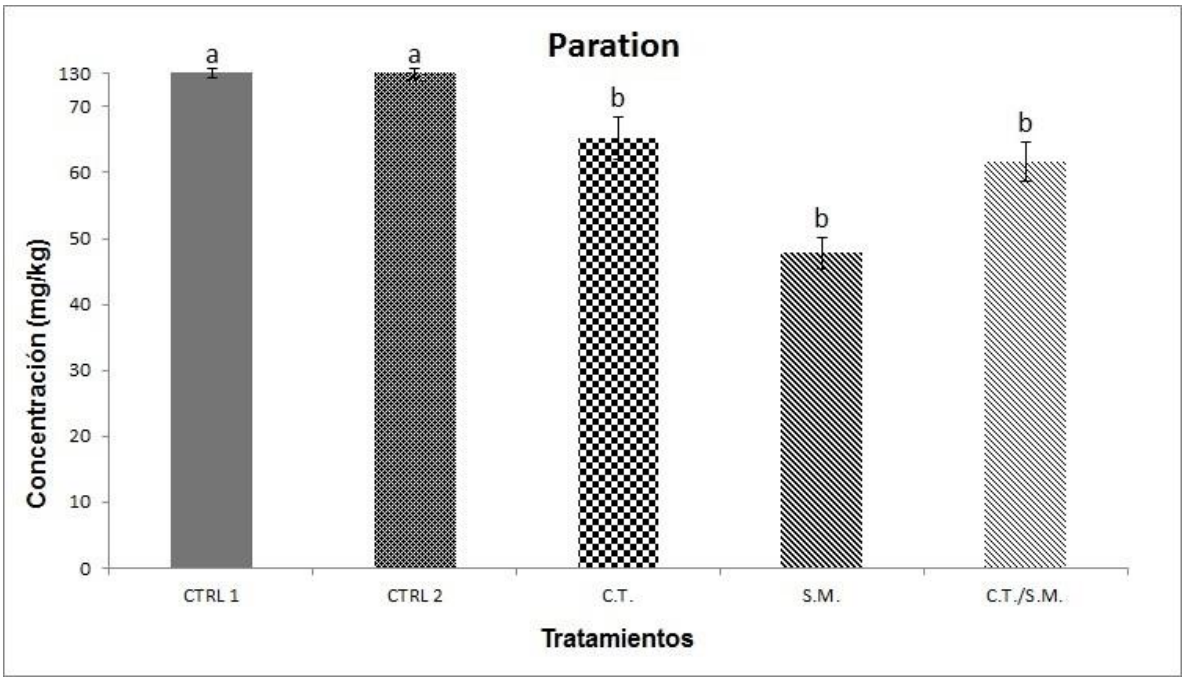


Figura 3. Degradación de metil paratión con diferentes cepas. Control inicial (CTRL1), control 30 días (CTRL 2), *Candida tropicalis* 49.78 %(C.T.), *Stenotrophomonas maltophilia* 63.23 %(S.M.), *C. tropicalis/S. maltophilia* 52.58 %(C.T./S.M.). Letras no iguales indican diferencias significativas. Tiempo de tratamiento: 30 días.

Al aplicar las cepas en el suelo contaminado con aldrín la concentración final es de 57.48 mg/Kg (C.T.), 25.78 mg/Kg (S.M.) y 16.83 mg/Kg (C.T./S.M.). El tratamiento tres tuvo mayor porcentaje de degradación con respecto al control, dichos valores mostraron diferencias estadísticas significativas, con un valor de significancia de p= 2.04e-05; se observa que no hubo degradación intrínseca entre los controles (CTRL 1, CTRL 2) (Figura 4).

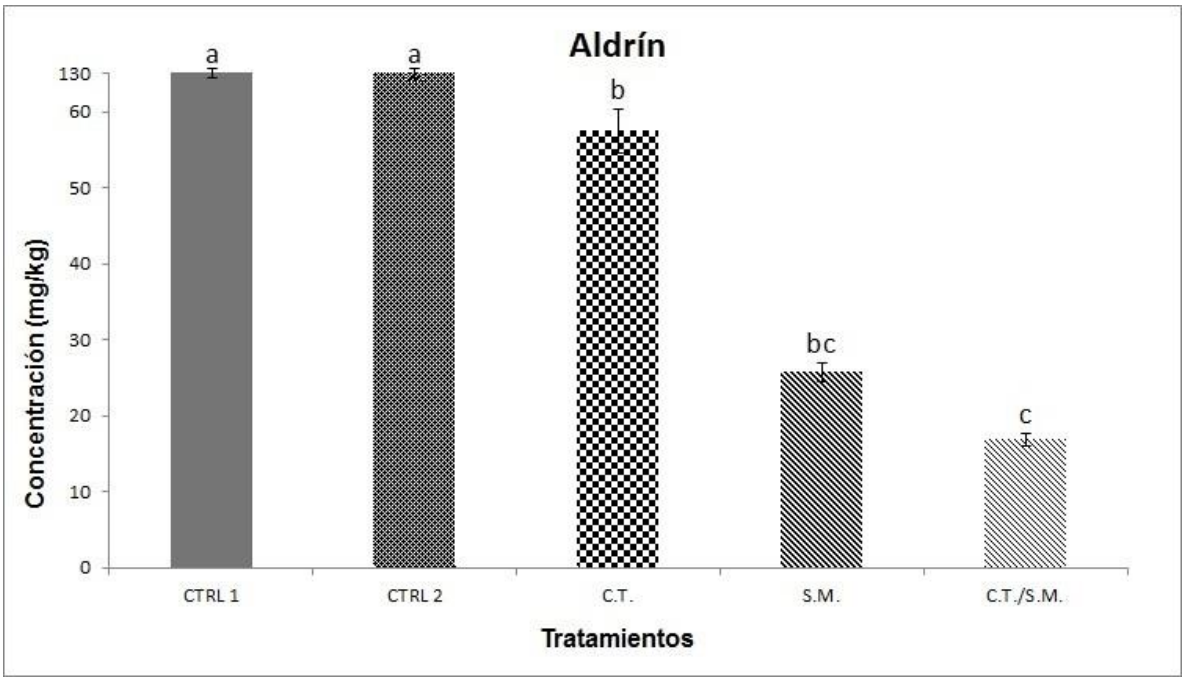


Figura 4. Degradación de aldrín con diferentes cepas. Control (CTRL 1), control 30 días (CTRL 2), *Candida tropicalis* 55.79 %(C.T.), *Stenotrophomonas maltophilia* 80.17 %(S.M.), *C. tropicalis/S. maltophilia* 87.05 %(C.T./S.M.). Letras no iguales indican diferencias significativas. Tiempo de tratamiento: 30 días.

La concentración final de lindano después del tratamiento es de 24.68 mg/Kg (C.T.), 31.39 mg/Kg (S.M.) y 28.16 mg/Kg (C.T./S.M.). El tratamiento uno tuvo mayor porcentaje de degradación con respecto al control, los valores mostraron diferencias estadísticas significativas, valor de significancia de p= 0.0003249; se observa que no hubo degradación intrínseca entre los controles (CTRL 1, CTRL 2) (Figura 5).

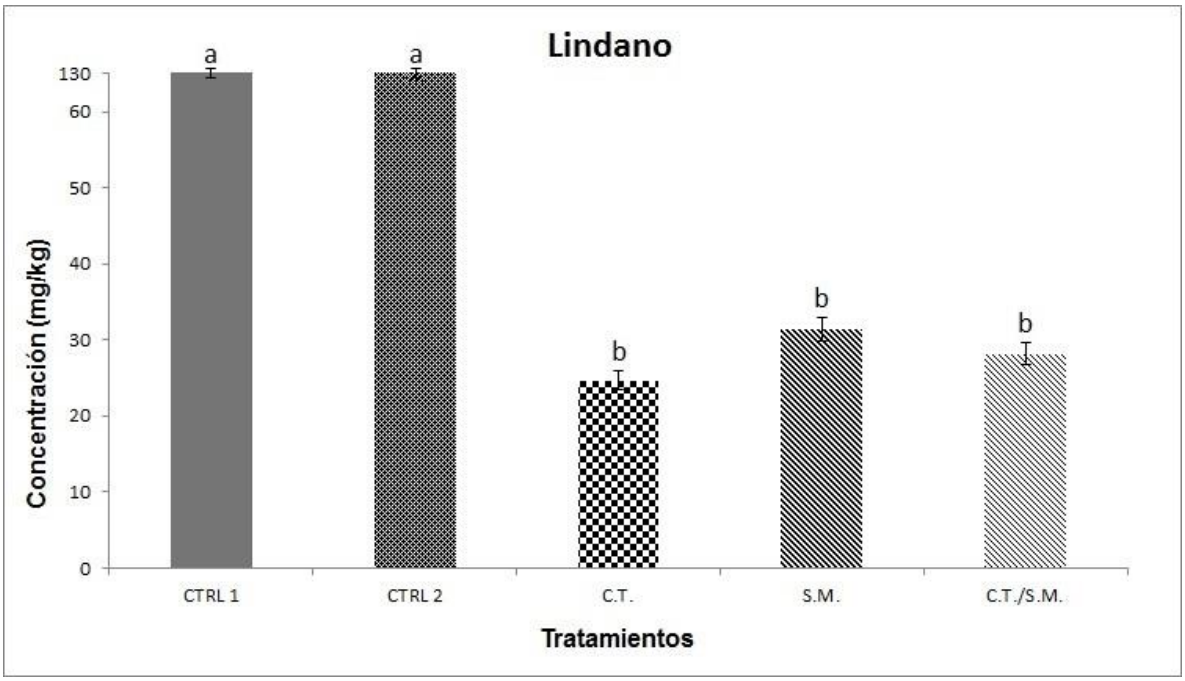


Figura 5. Degradación de lindano con diferentes cepas. Control (CTRL 1), control 30 días (CTRL 2), *Candida tropicalis* 81.01 %(C.T.), *Stenotrophomonas maltophilia* 75.85 %(S.M.), *C. tropicalis/S. maltophilia* 78.34 %(C.T./S.M.). Letras no iguales indican diferencias significativas. Tiempo de tratamiento: 30 días.

6. DISCUSIÓN

Para mitigar el daño que los plaguicidas causan al ambiente y a la salud, se han desarrollado estrategias para la remediación de los sitios contaminados. Una de las técnicas más aplicadas es el uso de microorganismos, que usan a los plaguicidas como fuente de carbono y donadores de electrones, dando como resultado la degradación de dicho contaminante (Nuvia *et al.,* 2013). En el presente estudio se demostró que las cepas *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia* son capaces de degradar plaguicidas organofosforados y organoclorados.

6.1 Degradación de malatión

En el caso de malatión se alcanzó el 98 % de degradación usando la cepa *S. maltophilia*. Dicho porcentaje es superior al reportado por Upegui *et al.* (2011), quien demostró la degradación del 85 % de malatión en matrices del suelo, usando un tratamiento de cinco días, pero menor al reportado por por Deng *et al.* (2015), quien indicó la degradación del 100 % de malatión en medio líquido, utilizando especies del género *Stenotrophomonas*, sin embargo, es de notar que utilizó una concentración de plaguicida 61 % menor que el presente trabajo, además, que el medio líquido permite un mayor acceso al plaguicida, por lo que se puede concluir que los tratamientos con matrices de suelos de la presente investigación se obtienen mejores resultados que los reportados anteriormente.

6.2 Degradación de clorpirifos

Para clorpirifos, los tratamientos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control, lo que indica que ambas cepas presentan la misma actividad metabólica ante la presencia de clorpirifos. Se observa que *C. tropicalis* tuvo mayor degradación del plaguicida, lo cual concuerda con estudios que afirman que los hongos son importantes para el ciclo biogeoquímico y son responsables de degradar materiales peligrosos (Yan *et al.,* 2012). En términos de economía, el tratamiento con *C. tropicalis* es de mayor viabilidad.

6.3 Degradación de metil paratión

Los resultados de los tratamientos de degradación de metil paratión mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control; el mayor porcentaje de degradación fue con la cepa *S. maltophilia*. De acuerdo con estudios sobre el mecanismo de degradación de *S. maltophilia* se concluye que dicho resultado puede deberse a que las hidrolasas producidas por la bacteria tienen preferencia por el metil paratión como sustrato principal (Zhongil *et al.,* 2001).

6.4 Degradación de aldrín

En la degradación de aldrín, el análisis estadístico muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a los controles. Así mismo se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos y se observa que el consorcio *C. tropicalis*/*S. maltophilia* tuvo mayor degradación del plaguicida (87.05 %), en comparación con las cepas por separado. Éste comportamiento sinérgico

concuerda con lo reportado en la degradación de diésel con el mismo consorcio (Hernández, 2015). Por otro lado, Bandala *et al.* (2006), reportó degradación de aldrín en valores superiores al 90 %, la diferencia se debe a la adición de carbono vegetal activado en el medio líquido.

6.5 Degradación de lindano

En los suelos contaminados con lindano, los resultados indican degradación del 81.01 % para el tratamiento con *C. tropicalis*, sin embargo, no hubo diferencias significativas con respecto al tratamiento con *S. maltophilia* y el consorcio, pero sí respecto al control ($p < 0.05$). Los resultados difieren a lo reportado por Anupama *et al.* (2010), que obtuvo degradación del 65.7 %; ésta diferencia puede deberse a la cantidad de muestra (500 g) y concentración del plaguicida (10mg), sin embargo, en remediación *ex situ*, obtuvo 97.4 % de degradación. Varios factores bióticos y abióticos pueden estar involucrados, debido a que el período de tratamiento fue en época de invierno.

El presente trabajo es el primero en reportar el uso de una levadura unicelular del género Candida en degradación de plaguicidas. Así mismo, se reporta por primera vez la degradación de plaguicidas en una matriz del suelo aplicando la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* en concentraciones hasta 5 veces más que las reportadas en literatura.

Futuras investigaciones podrían contemplar el estudio de las enzimas que participan en la degradación de los plaguicidas con la aplicación de *C. tropicalis* y

S. maltophilia así como los productos de degradación por cromatografía HPLC/acoplado a masas, con el objetivo de identificar los metabolitos generados en la degradación.

7. CONCLUSIONES

Los suelos contaminados con los plaguicidas organofosforados son los que presentan mayor persistencia del contaminante (aldrín y lindano).

El plaguicida organofosforado que presentó mayor degradación fue malatión con el 98.32 % con el tratamiento de *C. tropicalis*. Para el caso de los organoclorados, el plaguicida aldrín presentó degradación del 87.05 % con el tratamiento del consorcio *C.tropicalis/S. maltophilia*.

El mejor tratamiento para la degradación de los plaguicidas malatión, clorpirifos y lindano es con la cepa *C.tropicalis*; para el caso de metil paratión es recomendable utilizar la cepa *S. maltophilia*, en aldrín es conveniente usar el consorcio *C. tropicalis/S. maltophilia*.

La presencia de productos xenobióticos al comienzo del crecimiento de *S. maltophilia* provoca efectos negativos, se recomienda que el inóculo de la cepa sea de edad adulta.

8. APLICACIÓN PRÁCTICA

El trabajo contribuye al establecimiento de estrategias para remediación de suelos contaminados con plaguicidas organoclorados y organofosforados, a su vez, amplía el conocimiento de la aplicación de microorganismos unicelulares en la degradación de plaguicidas, por lo tanto, es factible su uso en suelos afectados por el uso indiscriminado de plaguicidas.

- Los resultados demuestran que *C. tropicalis* y *S. maltophilia* son capaces de degradar plaguicidas organofosforados y organoclorados, proporcionando las bases para el tratamiento de suelos contaminados.
- Al aplicar la metodología del presente trabajo, se puede escalar a planta piloto para tratamiento de mayores cantidades de suelos contaminados.
- La implementación de una pila de ladrillo y acabado aparente con capacidad de 205 cm3 para depósito de los suelos contaminados, con sistema de homogenización de polines ayudará para el tratamiento de 100 kg de suelo.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abo-Amer, A. 2007. Involvement of cromosomally-encoded genes in malathion utilization by *Pseudomonas aeruginosa* AA112, Acta Microbiol Immunol Hungarica, **54:** 216-77.

Ahmed, F. 2001. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks, Trac Trends in Analytical Chemistry, **20(11):** 649-661.

Albert, L. 2005. Panorama de los plaguicidas en México, Séptimo Congreso de Actualización en Toxicología Clínica. Tepic, Nayarit 1 y 2 de septiembre, 2005. 17.

Anupama, K. y Sangeeta, P. 2010. *Ex situ and in situ* biodegradation of lindane by *Azotobacter chroococcum*, Journal of Environmental Science and Health Part B, **45:** 58-66.

Avivar, O., Durán, S., Molina, A., Castilla, A., Olea, S. y Fernández C. 2009. La exposición a plaguicidas se asocia con la disminución del recuento espermático, Revista del Laboratorio Clínico, **3(1):** 4-11.

Bandala, E., Octaviano, J., Pastrana, P. y Torres, L. 2006. Removal of Aldrin, Dieldrin, Heptaclor and Heptaclor Epoxide Using Activated Carbon and/or *Pseudomonas flourescens* Free Cell Cultures, Journal of Environmental Science and Health Part B, **41:** 553-569

Barr, D. y Needham, L. 2002. Analytical methods for biological monitoring of exposures to pesticides: a review. Journal of Chromatography Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, **778(12):**5-29.

Bidleman, T., Jantunen, L., Hung, H., Ma, H., Stern, G., Rosenberg, B., Racine, J. 2015. Annual cycles of organochlorine pesticide enantiomers in Artic air suggest changing sources and pathways, Atmos. Chem. Phys, **15:** 1411-1420.

Chia, V., Li, Y., Quraishi, S., Graubard, B., Figueroa, J., Weber, J., Chanock, S., Rubertone, M., Erickson, R., McGlynn, K. 2010. Effect modification of endocrine disruptors and testicular germ cell tumour risk by hormone-metabolizing genes, International Journal of Andrology, **33:** 588-596.

Chen S, Chang C, Deng Y, An S y Dong YH. Fenpropathrin biodegradation pathway in Bacillus sp. DG02 and its potentials for bioremediation of pyrethroidcontaminated soils. J Agric Food Chem **62:**2147-2157.

CICOPLAFEST. 2004. Catálogo oficial de plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. SEMARNAP, SECOFI, SAGAR y SSA, México D.F

Daniela Cruz-Sánchez, Cinthya Fosados-Osorio, Viridiana Trejo-del Ángel, Elías Zavala-San Agustín, Nora Mora-Pérez, Janet Reyes-Reyes, Sergio Reyes-Reyes, Ariana Roblero-Reyes, Edgar Reyes-Hernández, Leandro Chaires-Martínez. 2015.

Aislamiento y caracterización de *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia* de suelos contaminados con hidrocarburos. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 21-26 Junio del 2015. Guadalajara, Jalisco. México.

Del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., y Palacio Estrada, D. E. 2014, Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud, Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, **52(3):** 372-387.

Deng, S., Chen, Y., Wang, T., Shi, X., Wu, X., Ma, X., Li, R., Hua, X., Tang, Li, X. 2015. Rapid biodegradation of organophosphorus pesticides by Stenotrophomona sp. G1, J. Hazard. Mater, **297:** 17-24.

DOF, 2004. Diario Oficial de la Federación. Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y certificados de exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos. Publicado el 28 de Diciembre de 2004.

Dubey, K., D. y Fulekar, M., M. 2012. Chlorpyrifos bioremediation in Pennisetum rhizosphere by a novel potential degrader Stenotrophomonas maltophilia MHF ENV20, World J Microbiol Biotechnol, **28:** 1715-1725.

Fernández, A. D. G., Mancipe, G. L. C. y Fernández, A. D. C. 2010. Intoxicación por organofosforados. Rev. Med, **18(1):** 84-92.

Fernández, B.L. 2004. Evaluación de plaguicidas organoclorados en el sistema lacustre de Metztitlán, Hidalgo. Tesis de Maestría, UAM, México.

Fortenberry, G., Hu, H., Turyk, M., Barr, D. y Meeker, J. 2012. Association between urinary 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol, a metabolite of chlorpyrifos and chlorpyrifos-methil, and serum T4 and TSH in NHANES 1999-2002, Science of the Total Environment, **424(2012):** 351-355.

Fosados, O. 2016. Biorremediación de pesticidas por *Candida tropicalis* y *Stenotrophomonas maltophilia*, Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico Superior de Alamo Temapache, Xoyotitla, Alamo Temapache, Veracruz, México.

INEGI, 2013. Encuesta mensual de la industria manufacturera EMIM., Revisado 2013.

Geed, S., Kureel, M., Giri, B., Singh, R., Rai, B. 2016. Performance evaluation of Malathion biodegradation in batch continuous packed bed bioreactor (PBBR), Bioresource technology, bite(17396).

Hashimoto, Y. 2005. Dieldrín residue in the soil and cucumber from agricultural field in Tokyo. J. Pestic. Sci **30:** 397-402.

Jie Liu, Yue He, Shaohua Chen, Ying Xiao, Meiying Hu y Guohua Zhong. 2014. Development of a FreezeDried Fungal Wettable Powder Preparation Able to Biodegrade Chlorpyrifos on Vegetables. Plos one. **9(7):**e103558.

Krishna, K. y Philip, L. 2008. Biodegradation of lindane, methyl parathion and carbofuran by various enriched bactarial isolates, Journal of Environmental Science and Health Part B, **43:** 157-171.

LaKind JS, Berlin CM, Naiman DQ. 2001. Infant exposure to chemicals in breast milk in the Unites States: what we need to learn from a breast milk monitoring program. Environ Health Perspect. **109:**75-78.

Lakshmi, CV., Kumar, M., Khanna, S. 2008. Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil, Int Biodeterior Biodegrad, **62:**204–209.

Lee EY, Jun, YS, Cho KS y Ryu HW. 2002. Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. J Air Waste Manag Assoc, National Subsurface Environmental Research Laboratory, Ewha Womans University, Seoul, Korea, **52(4):** 400-406.

Li, X., Yang, L., Jans, U., Melcer, M.E., Zhang, P., 2007. Lack of enantioselective microbial degradation of chlordane in long island sound sediment, Environ. Sci. Technol. **41:** 1635-1640.

Liang, W., Wang, Z., Li, H., Wu, P., Hu, J., *et al.* 2005. Purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase from *Aspergillus niger* ZD11, J. Agric Food Chem, **53:** 7415-7420.

Llanos, P.H.P.C. 2015. Determinación de la capacidad del extracto de *Dysphania ambrosioides* sobre especies del género *Candida* causante de infección. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana.

Martínez, V.C. y Gómez, A.S. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. **23(4):** 185-200.

Muller K., M. G. 2007. A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil. Agr Ecosyst Environ, 120 pp.

Nagasawa, K., Kikuchi, R., Nagata, Y., Takagi, M. y Matsuo, M. 1993. Aerobic mineralization of gamma-HCH by *Pseudomonas paucimobilis* UT 26, Chemosphere, **26(09):** 1719-1728.

Nuvia, L., Sánchez, E. y Ortiz, M. 2013. Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, **4(1):** 1-21.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Roma: FAO, 2014. 56 pp.

Ortíz, I., Avila-Chávez, M. y Torres, L. 2013. Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, **4(1):** 1-21.

Rauh, V., Garfinkel, R., Perera, F., Andrews, H., Hoepner, L., Barr, D., Whitehead, R., Tang, D. y Whyatt R. 2006. Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children, Pediatrics, **118(6):** 1845-1859.

Rippon, J. 1988. Infecciones oportunistas. Levaduras: Candidiasis y levaduras patógenas, Tratado de Micología Médica, 574628.

Rojo, PMP., Espinosa, RY., Santos, GS., Berghezan, SA., Sánchez, GS., Cantarero, VMP. 2011. Brote epidémico de escabiasis en población marroquí en el CEDT de Illescas (Toledo). Rev. Pediatr Aten Primaria. **20:**e60.

Rozo, J. y Caredenal, L. 2013. Microorganismos, enzimas, plásmidos y genes involucrados en la degradación de plaguicidas metilcarbamatos, Revista Internacional de Contaminación Ambiental, **29:** 105-119.

Samuel, T. y Pillai, K. 1990. Effect of temperatura and sunlight exposure on the fate of soil-applied [14C]-gamma-hexachlorocyclohexane, Arch. Environ. Cont. Toxicol, **19(12):** 214-220.

Schaumann, R. 2003. *Stenotrophomonas maltophilia* un importante patógeno bacteriano. Instituto de Microbiología Médica y Epidemiología de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Leipzing, Leipzing, Alemania.

Senoo, K. y Wada, H. 1989. Isolation and identification of an aerobic γ -HCH decomposing bacterium from soil, Soil Sci. Plant Nutr, **35(01):** 79-87.

Siddique, T., Okaka, B. y Frankenberger, W. 2002. Temperature and pH effects on biodegradation of hexachlorocyclohexane isomers in water and soil slurry, J. Agric. Food Chem, **50(18):** 5070-5076.

Singh, B., Kaur, J., Singh, K. 2013. Microbial degradation of an organophosphate pesticide, malathion, Critical Reviews in Microbiology, **09(13):** 1-9.

Tanabe, H. Iwata, R. Tasukawa, 1994. Sci. Total Environ **154:** 163.

Trejo, J. y Sepúlveda, T. 2003. El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México, Gaceta Ecológica, **(66)**:41-53.

Upegui, S., Peñuela, G., Botero, L. 2011. Efecto del enriquecimiento con nutrientes en la degradación de clorpirifos, malatión y metil paratión, Revista Ingenierías Universidad de Medellín, **05(11):** 43-49.

William, L., Champion, Jr., James, L., Wayne, A., DiMarco, J., Matabe, A. y Prickett, K. 2004. Liquid chromatographic separation of the enantiomers of *trans*-chlordane, *cis*-chlordane, heptachlor, heptachlor epoxide and α-hexachlorocyclohexane with application to small-scale preparative separation, Journal of Chromatography A, **1024:** 55-62.

Williams, A. 1996. Opportunities of chiral agrochemicals, Pest Sci, **46:** 3-9.

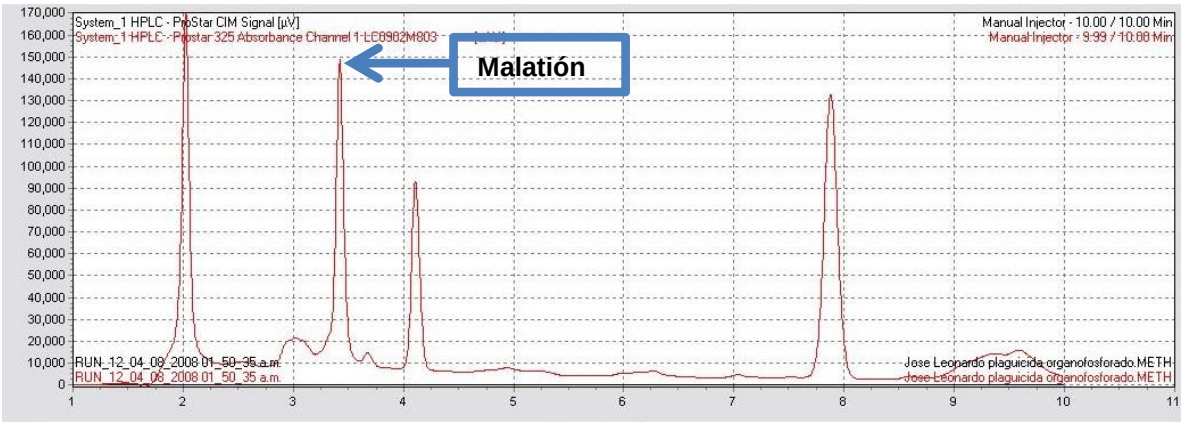
Yan, G., Shaohua, C., Meiying, H., Qiongbo, H., Jianjun, L., Yanan, L. 2012. Purification and Characterization of a Novel Chlorpyrifos Hydrolase from *Cladosporium cladosporioides* Hu-01, PLoS ONE, **07(06):** 1-8.

Yang, C., Liu, N., Guo, XM., Quiao, CL. 2006. Cloning of mpd gene from chlorpyrifos degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil, FEMS Microbiol Lett, **265:**118–125.

Zhongli, C., Shunpeng, L., y Guoping, F. 2001. Isolation of methyl parathion-degrading straing M6 and cloning of the methyl parathion hydrolase gene, Appl. Envioron. Microbiol, **67:** 4922-4925.

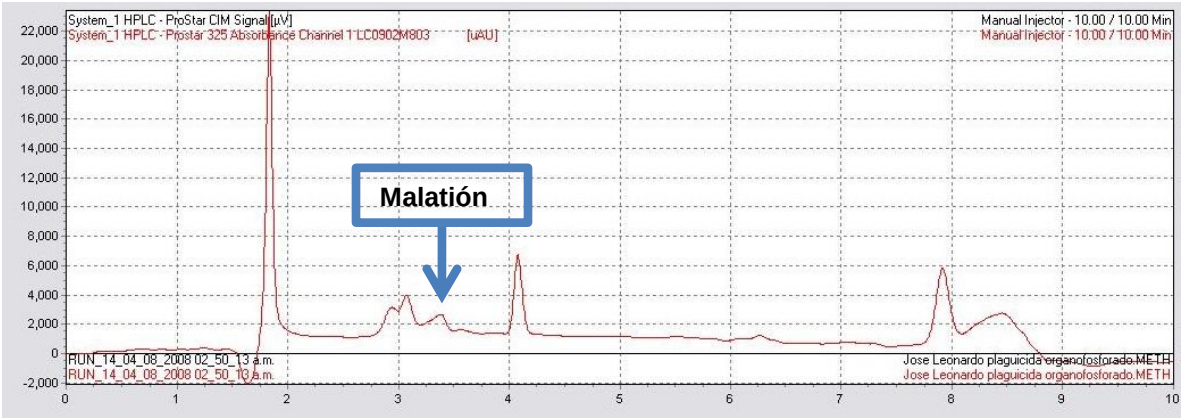
ANEXOS

Anexo A.- Cromatograma del control malatión



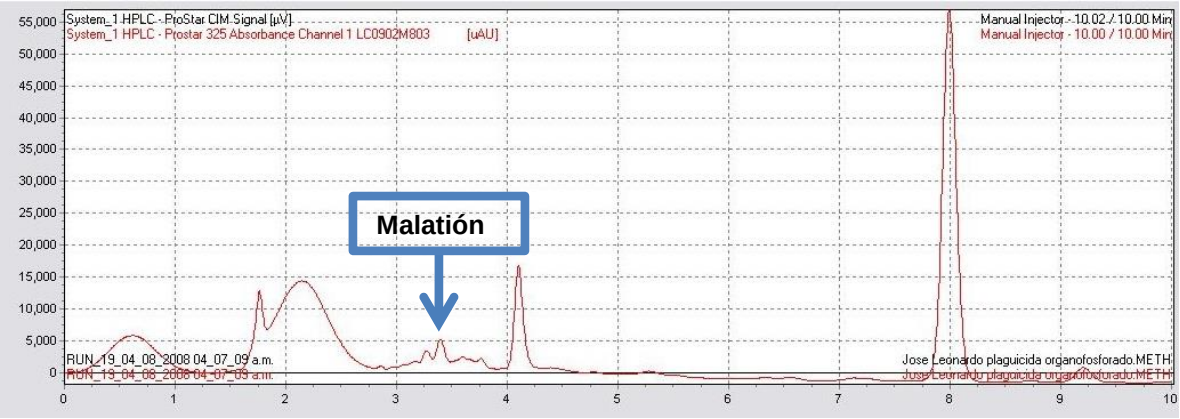
Descripción: Se observa el cromatograma del suelo contaminado con malatión.

Anexo B.- Cromatograma del tratamiento con *Candida tropicalis*



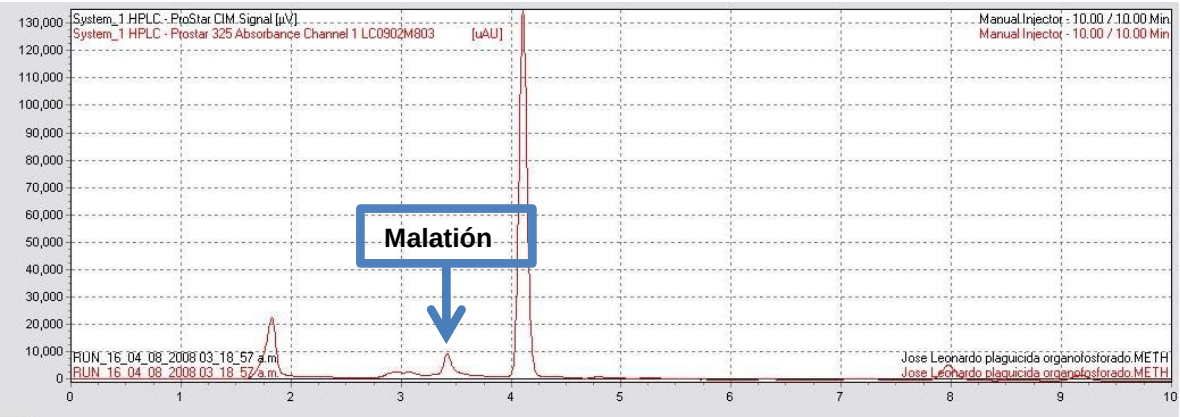
Descripción: Se observa el cromatograma del suelo contaminado con malatión después del tratamiento con *Candida tropicalis* demostrando su capacidad biorremediadora.

Anexo C.- Cromatograma del tratamiento con *Stenotrophomonas maltophilia*



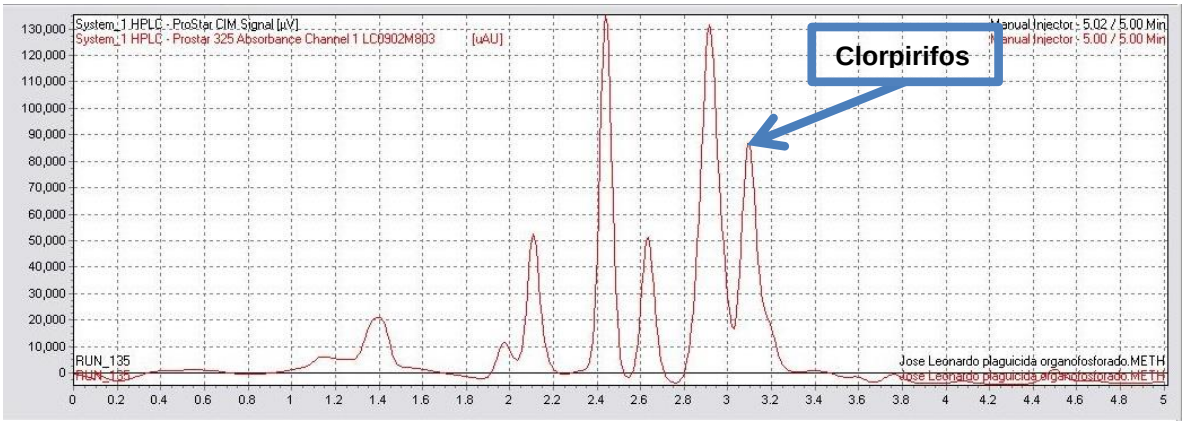
Descripción: Se observa el cromatograma del suelo contaminado con malatión después del tratamiento con *Stenotrophomonas maltophilia*, demostrando su capacidad biorremediadora.

Anexo D.- Cromatograma del tratamiento con *C. tropicalis/S. maltophilia*



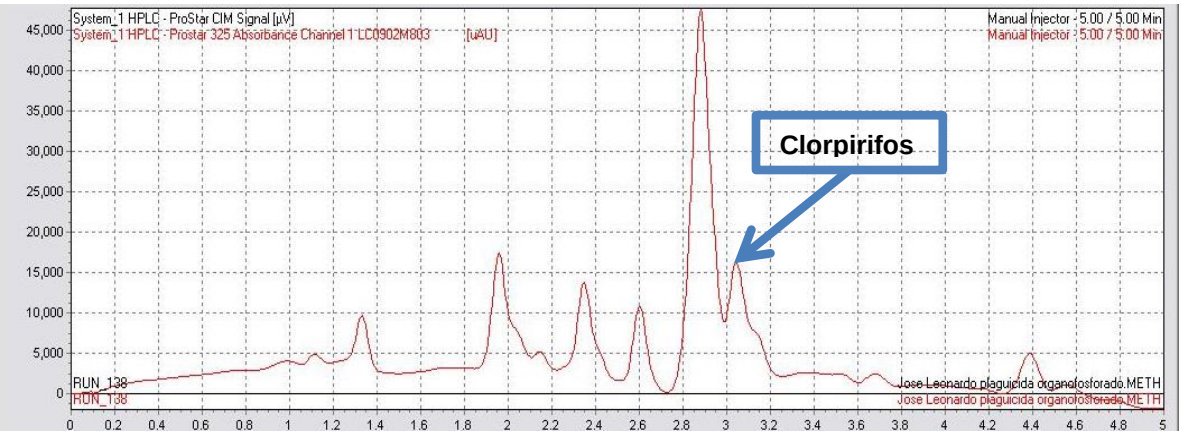
Descripción: Se observa el cromatograma del suelo contaminado con malatión después del tratamiento con el consorcio *C. tropicalis/S. maltophilia*, demostrando su capacidad biorremediadora.

Anexo E.- Cromatograma del control de clorpirifos



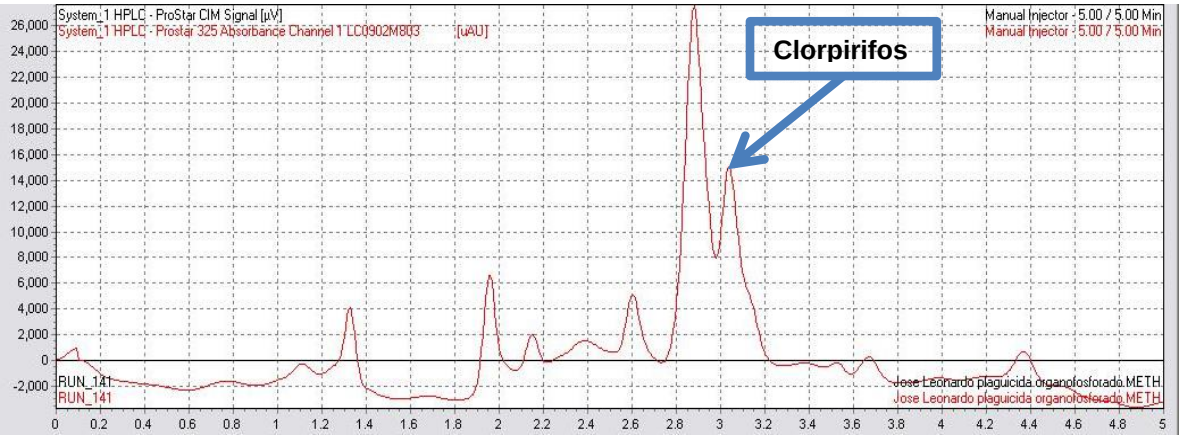
Descripción: Se observa el cromatograma del suelo contaminado con clorpirifos

Anexo F.- Cromatograma del tratamiento con *Candida tropicalis*



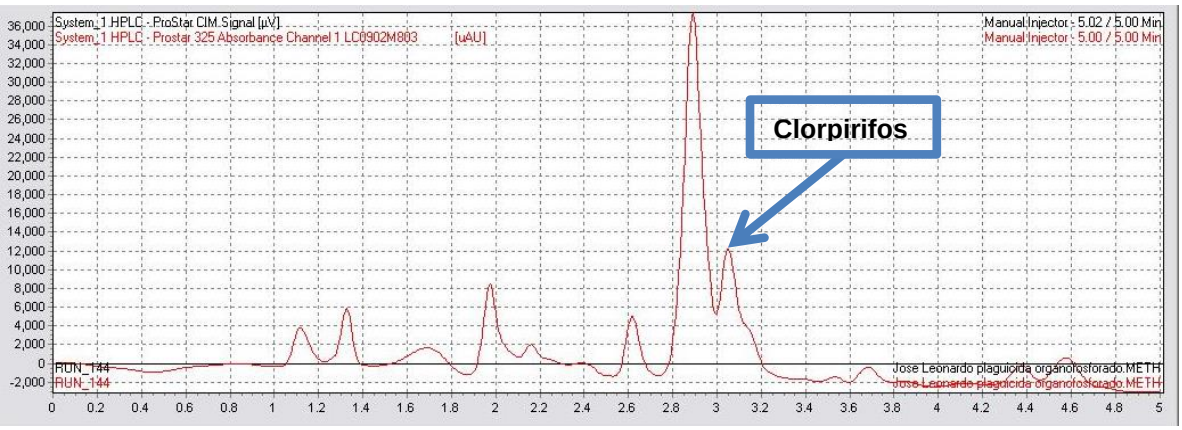
Descripción: Se observa el cromatograma del suelo contaminado con clorpirifos después del tratamiento con *Candida tropicalis*, demostrando su capacidad biorremediadora.

Anexo G.- Cromatograma del tratamiento con *Stenotrophomonas maltophilia*



Descripción: Se observa el cromatograma del suelo contaminado con clorpirifos después del tratamiento con *Stenotrophomonas maltophilia*, demostrando su capacidad biorremediadora.

Anexo H.- Cromatograma del tratamiento con *C. tropicalis/S. maltophilia*

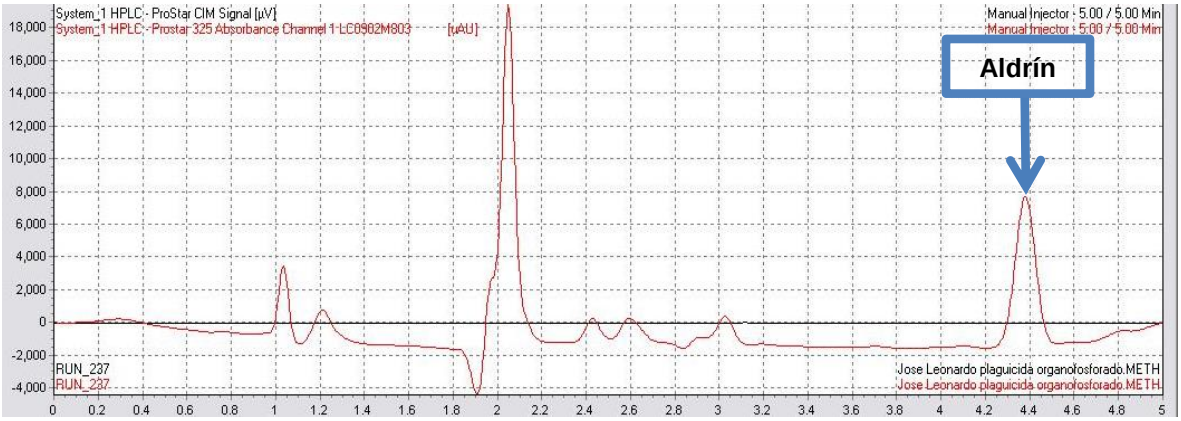


Descripción: Se observa el cromatograma del suelo contaminado con clorpirifos después del tratamiento con el consorcio *C. tropicalis/S. maltophilia*, demostrando su capacidad biorremediadora.

Anexo I.- Cromatograma del control de aldrín

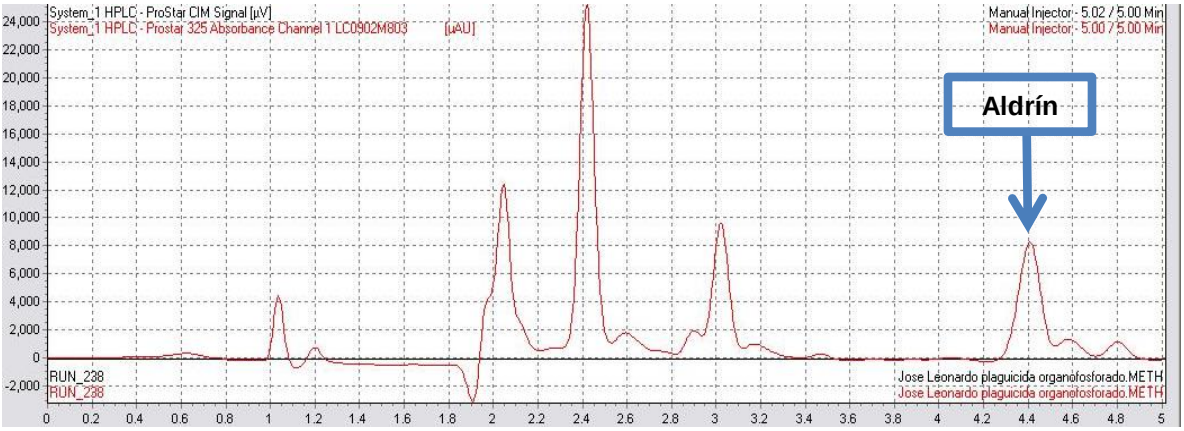
Descripción: Se observa el cromatograma del suelo contaminado con aldrín

Anexo J.- Cromatograma del tratamiento con *Candida tropicalis*



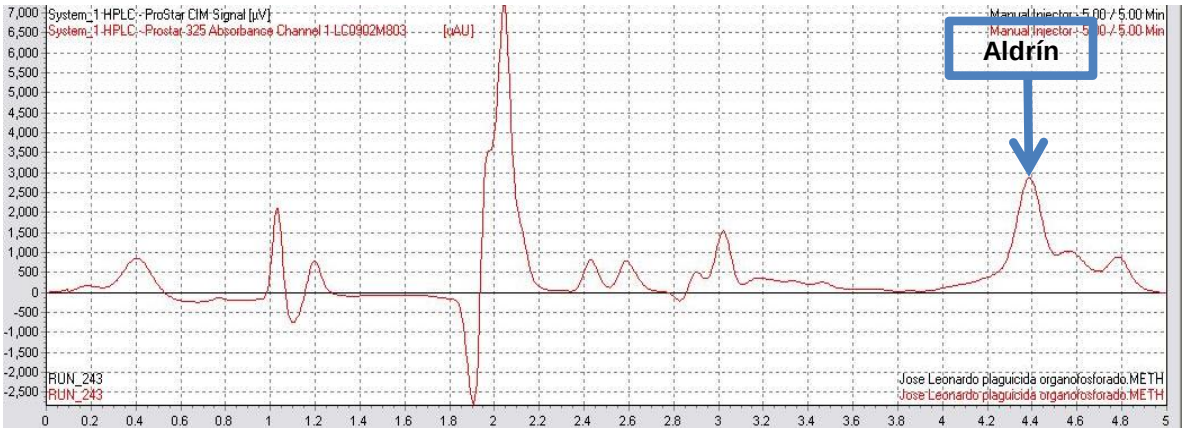
Descripción: Se observa el cromatograma del suelo contaminado con aldrín después del tratamiento con *Candida tropicalis*, demostrando su capacidad biorremediadora.

Anexo K.- Cromatograma del tratamiento con *Stenotrophomonas maltophilia*



Descripción: Se observa el cromatograma del suelo contaminado con aldrín después del tratamiento con *Stenotrophomonas maltophilia*, demostrando su capacidad biorremediadora.

Anexo L.- Cromatograma del tratamiento con *C. tropicalis/S. maltophilia*



Descripción: Se observa el cromatograma del suelo contaminado con aldrín después del tratamiento con el consorcio *C. tropicalis/S. maltophilia*, demostrando su capacidad biorremediadora.