



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

***CAMPUS* MONTECILLO**

POSGRADO EN EDAFOLOGÍA

**Transformación genética de
bacterias para degradar plaguicidas
organofosforados**

DAVID ANTONIO MORENO MEDINA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe David Antonio Moreno Medina,

Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Julián Delgadillo Martínez, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

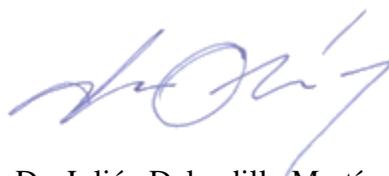
Transformación genética de bacterias para degradar plaguicidas organofosforados y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 2 marzo de 2017.



David Antonio Moreno Medina

Firma



Dr. Julián Delgadillo Martínez

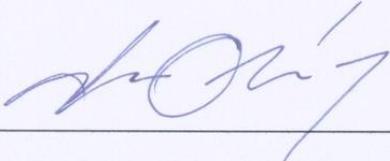
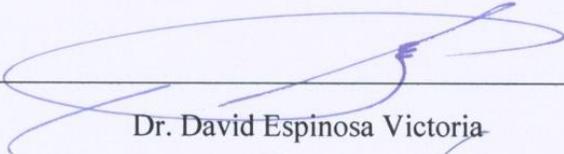
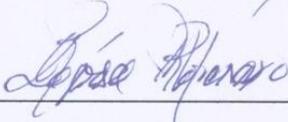
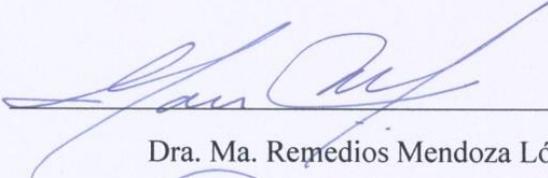
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: “**Transformación genética de bacterias para degradar plaguicidas organofosforados**”, realizado por el alumno **David Antonio Moreno Medina**, bajo la Dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 _____
	Dr. Julián Delgadillo Martínez
ASESOR	 _____
	Dr. David Espinosa Victoria
ASESOR	 _____
	Dra. Rosa Ma. López Romero
ASESOR	 _____
	Dra. Ma. Remedios Mendoza López
ASESOR	 _____
	Dr. Oscar García Barradas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Marzo de 2017.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE BACTERIAS PARA DEGRADAR PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

David Antonio Moreno Medina, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

En este documento se presentan los resultados de trabajos de investigación relacionada con la contaminación por plaguicidas organofosforados, especialmente, clorpirifos; la cual generan problemas ambientales y de salud pública. En el primer capítulo se presenta una revisión sobre los plaguicidas como contaminantes, haciendo énfasis en los organofosforados e incluido en estos, el clorpirifos. Se considera además los tratamientos biológicos de limpieza y su estrategia biotecnológica para la degradación de contaminantes. Se hace hincapié en el uso de bacterias y los genes involucrados en la capacidad de degradación. En el capítulo dos se presenta los resultados del aislamiento de cepas bacterianas capaces de crecer en suelos contaminados con organofosforados. Se utilizó clorpirifos como plaguicida modelo con base en la problemática asociada a este. De cuatro cepas seleccionadas, los resultados de la secuenciación del gen 16S RNAr indican que una es *Pseudomonas putida*, dos cepas *P. oryzihabitans* y otra *Serratia grimesii* (T354287, KT354288, KT354289, KT354290, en Genebank respectivamente). El mayor crecimiento en 50 mg L⁻¹ de clorpirifos lo presentaron las cepas *P. putida* DAMM30 y *S. grimesii* DAMM47. Esta última cepa también mostró la mayor actividad nitrogenasa reduciendo 30.1 nmol h⁻¹ mL⁻¹ de C₂H₄. El tercer capítulo muestra la evaluación de la capacidad de remoción de clorpirifos con estas cepas. Los resultados indican que *P. putida* DAMM30 y *P. oryzihabitans* DAMM37 removieron cerca del 70% de clorpirifos, la cepa *P. oryzihabitans* DAMM46 42% del plaguicida. *S. grimesii* DAMM47 tuvo el mas bajo porcentaje de remoción, 23.28% a las 96 h. En el capítulo cuatro se reporta lo relacionado a la presencia de algunos genes responsables de la degradación de clorpirifos en las cepas. Se observó la presencia del gen *gox* en *S. grimesii* DAMM47, *opd* en *P. putida* DAMM30, y *mpd* en *P. putida* DAMM30 y *S. grimesii* DAMM47. Además, el gen que degrada paratión metílico y otros organofosforados (*mpd*) se encontró en *P. oryzihabitans* DAMM46. El gen *cehA* no se encontró en las cepas. Finalmente, en el último capítulo se obtuvieron clones de *E. coli* transformadas con el gen *mpd* usando diferentes vectores PGEM-T y pMP92. Este gen codifica para una hidrolasa degradadora de organofosforados (MPH), la cual es responsable de la degradación de clorpirifos.

Palabras clave: biorremediación, suelos contaminados, genes, remoción.

GENETICALLY MODIFIED BACTERIA FOR DEGRADE ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES

David Antonio Moreno Medina, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2017.

ABSTRACT

This writing show research results related to organophosphate pesticides pollution, specifically, by chlorpyrifos; wich generate environmental and public-health problems. First chapter presented a review of organophosphates pesticides as pollutants, focally chlorpyrifos. Biological treatments for their degradation are also considered. The use of bacteria and genes involved in the ability to degradation is emphasized. Chapter two show the results of the isolating bacterial strains capable of growing in contaminated soils with organophosphates. Chlorpyrifos was used as pesticide model considering the problems associated with it. Four strains were selected. The results of 16S RNAr gene sequencing indicate that one is *Pseudomonas putida*, two strains *P. oryzihabitans* and another *Serratia grimesii* (T354287, KT354288, KT354289, KT354290, access code Genebank respectively). The highest growth in 50 mg L⁻¹ of chlorpyrifos was presented by *P. putida* DAMM30 and *S. grimesii* DAMM47. The latter also shows the higher nitrogenase activity by reducing 30.1 nmol h⁻¹ mL⁻¹ of C₂H₄. The third chapter shows the evaluation of chlorpyrifos removal capacity with these strains. At 96 h, the results indicate that *P. putida* DAMM30 and *P. oryzihabitans* DAMM37 removed about 70% of chlorpyrifos, the strain *P. oryzihabitans* DAMM46 42%. *S. grimesii* DAMM47 had the lowest removal percentage, 23.28%. Chapter four reports the presence of some genes responsible for the degradation of chlorpyrifos in the selected strains. The presence of the *gox* gene was observed in *S. grimesii* DAMM47, *opd* in *P. putida* DAMM30, and *mpd* in *P. putida* DAMM30 and *S. grimesii* DAMM47. In addition, the gene that is degraded for methyl and other organophosphates (*mpd*) was found in *P. oryzihabitans* DAMM46. The *cehA* gene was not found in the strains. Finally, in the last chapter, *E. coli* was transformed with the *mpd* gene were obtained using the PGEM-T and pMP92 vectors. This gene is traduced to organophosphate degrading hydrolase (MPH), which is responsible for the degradation of chlorpyrifos.

Key words: bioremediation, polluted soils, genes, remotion.

...sólo entonces, la sabiduría vendrá a tu corazón

y el conocimiento te endulzará la vida,

el consejo te guardará,

te preservará la inteligencia.

Prov. 2:10-11

Con todo mi amor...

A mi amada madre **Doña Adolfa Medina Toledano** y mi querido padre **Don Antonio Moreno Campos**. Porque nunca me dejan, siempre me apoyan, interceden por mí en todo momento. La oración del justo puede mucho.

A mi esposita maravillosa y fiel compañera **Alma Delia Castañeda Anrubio**. Porque siempre confiaste en mí brindándome tu amor y apoyo incondicional. Me haces feliz.

Te amo.

A **mi pequeño discípulo** quien viene en camino. Porque tu presencia y tu llegada me llena de alegría.

A mis hermosas hermanas y fieles consejeras **Magui, Rosi, Elvi** y también a mis hermanos **Aure, Robe**. Porque siempre me apoyan y son parte de mí.

A ustedes **Doña Delia** y **Doña Leo**, también mi familia.

Al resto de mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **Dios**, mi amigo, mi padre, mi guía y mi ayuda fiel. Alleluyah.

A toda **mi familia** por estar siempre conmigo incondicionalmente

Al **CONACyT**, y a cada persona de mi hermoso país **México**, por el apoyo económico para la realización de este proyecto doctoral.

Al **Colegio de Postgraduados** por brindarme la oportunidad de formar parte de él.

Al **Dr. Julián Delgadillo**, quien tuvo confianza en mí y siempre tuvo algo nuevo por enseñar, por su gran paciencia, disposición, pericia y atinadas observaciones. Mi jefe, mi amigo.

Al **Dr. David Espinosa**, quien con su gran sencillez y enorme experiencia, engrandeció y fortaleció mis antes frágiles conocimientos. Me llena de satisfacción haberlo conocido.

A **Dra. Rosa Ma., Dra. Ma. Remedios** y **Dr. Oscar** por brindarme sus observaciones, ayuda, apoyo y disposición en los momentos precisos. Gracias por abrirme sus puertas en sus laboratorios.

A **Elo, Nacho, Busrha, Anamari, Miguel A., Kary, Rachel, Jenny, Salva, Scarlett** por su gran aporte a mi experiencia y por permitirme entrar a mi pequeña gran segunda casa en Sevilla, tan lejos, pero tan cerca. A mis amigos durante este caminar, por su compañía, por su amistad, por su ayuda y por todos esos momentos compartidos. Gracias **George, Daniel, Azareel, Lucio, Gil, Tukuch, Chava, Leo, Almita, Sam, Lois, Arthur, Alex, Lilis, Verito, Ariadna, Victor, Herendira, Luz, Eslit. Paty, Albert.** A mis amigos consejeros **Dr. Ronald, Dr. Alex, Dr. Almaraz, Dr. Jesús, Dra. Obdulia, Dra. Libia, Dra. Castorena. M.C. Patricio.** También a mis amigos trabajadores **Chayito, Remedios, Dianita, Manuel, Viviano, Mtro. Jaime**, gracias por su apoyo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
1.1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y PLAGUICIDAS.....	3
1.2. LOS PLAGUICIDAS EN EL SUELO.....	8
1.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS PLAGUICIDAS	9
1.3.1. Plaguicidas organofosforados	9
1.4. CLORPIRIFOS	11
1.4.1. Situación.....	11
1.4.2. Características fisicoquímicas	14
1.4.3. Efectos del clorpirifos	15
1.4.4. Estrategias de remoción	20
1.5. BACTERIAS QUE DEGRADAN CLORPIRIFOS.....	23
1.6. GENES RELACIONADOS CON LA DEGRADACIÓN DE CLORPIRIFOS	25
1.7. REFERENCIAS	29
CAPÍTULO II. AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON CLORPIRIFOS	36
2.1. OBJETIVO.....	36
2.2. HIPÓTESIS.....	37
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.3.1. Aislamiento	37
2.3.2. Fijación de nitrógeno.....	38
2.3.3. Identificación molecular.....	38
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
2.4.1. Aislamiento y selección de cepas.....	39
2.4.2. Fijación de nitrógeno.....	46
2.4.3. Identificación molecular.....	48
2.5. CONCLUSIONES	49
2.6. REFERENCIAS	50
CAPÍTULO III. REMOCIÓN DE CLORPIRIFOS POR CEPAS BACTERIANAS	53
3.1. OBJETIVO.....	53

3.2. HIPÓTESIS.....	53
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	54
3.3.1. Ensayo de remoción de clorpirifos.....	54
3.3.2. Extracción y cuantificación de clorpirifos.....	54
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
3.5. CONCLUSIONES	58
3.6. REFERENCIAS.....	58
CAPÍTULO IV. GENES MICROBIANOS DEGRADADORES DE PLAGUICIDAS	
ORGANOFOSFORADOS PRESENTES EN SUELOS CONTAMINADOS	61
4.1. OBJETIVO.....	61
4.2. HIPÓTESIS.....	61
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS	62
4.3.1. Búsqueda de genes	62
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
4.4.1. Genes presentes en cepas aisladas.....	63
4.5. CONCLUSIONES	66
4.6. REFERENCIA	66
CAPÍTULO V. CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES DE LA DEGRADACIÓN DE	
CLORPIRIFOS EN BACTERIAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE	68
5.1. OBJETIVO.....	68
5.2. HIPÓTESIS.....	68
5.3. MATERIALES Y MÉTODOS	69
5.3.1. Activación de cepas.....	69
5.3.2. Extracción de ADN	70
5.3.3. Diseño de primers degenerados.....	70
5.3.4. Reacciones de PCR	70
5.3.5. Electroforesis en gel de agarosa	71
5.3.6. Vectores utilizados	71
5.3.7. Transformación de <i>E. coli</i> DH5a	72
5.4.1. Extracción de DNA	73
5.4.2. Clonación en PGEM-T	76
5.4.3. Clonación en pMP92	78

5.5. CONCLUSIONES	81
5.6. REFERENCIAS	81
ANEXOS	83

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1.1. Clasificación de plaguicidas	10
Cuadro 2.1. Actividad nitrogenasa en cepas bacterianas seleccionadas en medio Rennie.	48
Cuadro 4.1. Cebadores usados para la amplificación y búsqueda de genes en cepas aisladas	62
Cuadro 5.1A. Medio de sales minerales	69
Cuadro 5.1B. Solución de elementos traza usados en el medio de sales minerales.....	69
Cuadro 5.2. Gradientes de temperaturas para la PCR de mpd en <i>P. oryzae</i> DAMM46.	73
Cuadro 5.3. Condiciones de bioensayo de tolerancia de clonas en clorpirifos	75
Cuadro 5.4. Condiciones para la digestión con EcoRI.	76

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1.1. Composición del área agrícola mundial	4
Figura 1.2. Índice neto de producción agrícola	4
Figura 1.3. Composición del área agrícola en México.....	5
Figura 1.4. Uso mundial de plaguicidas en tierras de cultivo y los cultivos permanentes.....	5
Figura 1.5. Países con mayores importaciones de plaguicidas	6
Figura 1.6. Uso de plaguicidas en México.	6
Figura 1.7. Estructura del clorpirifos.	14
Figura 1.8. Ruta de degradación de clorpirifos	25
Figura 1.9. Análisis de taxa inferido mediante Máxima Parsimonia.	28
Figura 2.1. Crecimiento bacteriano en presencia de clorpirifos.....	40
Figura 2.2. Crecimiento de cepa DAMM30 con incremento en fuente de nitrógeno y carbono.. ...	42
Figura 2.3. Crecimiento de cepa DAMM37 con incremento en fuente de nitrógeno y carbono.	43
Figura 2.4. Crecimiento de cepa DAMM46 con incremento en fuente de nitrógeno y carbono.. ...	44

Figura 2.5. Crecimiento de cepa DAMM47 con incremento en fuente de nitrógeno y carbono.	44
Figura 2.6. Cinética de crecimiento en medio de sales minerales con 50 mg L ⁻¹ de clorpirifos	46
Figura 2.7. Análisis de taxa inferido usando máxima parsimonia.	49
Figura 3.1. Cinética de degradación de clorpirifos por cepas aisladas.....	56
Figura 3.2. Cromatograma de degradación de clorpirifos por <i>P. putida</i> DAMM30.....	56
Figura 4.1. Marcadores de peso molecular utilizados.....	63
Figura 4.2. Fragmentos amplificados en las cepas aisladas	64
Figura 4.3. Fragmentos purificados de las cepas aisladas.....	65
Figura 4.4A. Fragmentos purificados y amplificados de las cepas aisladas	65
Figura 4.4B. Gen <i>mpd</i> en las cepas aisladas	66
Figura 5.1. Vectores durante la transformación de <i>E. coli</i> y <i>P. oryzihabitans</i> DAMM46.....	72
Figura 5.2. DNA genómico y DNA plasmídico en <i>P. oryzihabitans</i> DAMM46.....	73
Figura 5.3. Reacción de PCR a diferentes temperaturas de alineamiento.....	74
Figura 5.4. DNAp y fragmentos de DNAg purificados.	74
Figura 5.5. Crecimiento de clonas de <i>E. coli</i> con y sin PTZ57R/T en LB y clorpirifos.	75
Figura 5.6. Digestión con EcoRI.....	77
Figura 5.7. Obtencion de clonas positivas de <i>E. coli</i> PGEM-T- <i>mpd</i>	77
Figura 5.8. Gel de agarosa 1.5%. Digestión de <i>mpd</i> con EcoRI.	78
Figura 5.9. Gel de agarosa.....	79
Figura 5.10. Alineamiento múltiple con CLUSTALW.....	80
Figura 5.11. Crecimiento de cepas de <i>E. coli</i> silvestre vs transformada con pMP92- <i>mpd</i>	80

INTRODUCCIÓN

La degradación ambiental es provocada por contaminantes que ingresan al ambiente, dentro de los cuales destacan los plaguicidas, debido a la variedad de usos que han recibido en la agricultura, la salud pública, la industria, la ganadería, entre otros. La US-EPA (2011) estima que tan solo en el año 2007 se consumieron a nivel mundial 2.36 millones de toneladas de ingrediente activo de plaguicidas en la agricultura. En México el consumo de plaguicidas aumentó 400% en los últimos 30 años (de 14000 a 60000 t) y al parecer la demanda seguirá aumentando debido a la estrecha relación del rendimiento de cosechas con el uso de estos agroquímicos (Ortiz-Hernández *et al.*, 2001). El impacto de los plaguicidas se puede abordar desde dos puntos de vista. El ambiental, que se da cuando estos se introducen en las cadenas tróficas y el de salud pública, originado por la exposición directa o indirecta con los compuestos químicos.

Los plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias que se destinan a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga. Se pueden clasificar con base en diferentes criterios, uno de ellos es por su estructura química y se dividen en organoclorados, organofosforados, carbamatos, etc...El grupo de los organofosforados (OF) es el más importante debido a la cantidad de uso (34%) y a su nivel de toxicidad. Los OF son derivados del ácido fosfórico, tienen efectos a corto plazo, son altamente tóxicos y potentemente inhibidores de la acetilcolinesterasa. Su constante aplicación produce un aumento de su concentración en suelos, por lo que su degradación se ve disminuida, así como la fertilidad de los campos de cultivo, incrementándose el riesgo de contaminación ambiental y la infiltración de contaminantes a cuerpos de agua superficiales y subterráneos (CICOPLAFEST, 2004).

Para mitigar el problema de contaminación por OF existen tratamientos en los que intervienen procesos físicos, químicos y biológicos orientados a detoxificar o degradar al plaguicida. El tratamiento biológico, utiliza sistemas vivos o sus partes (células completas o enzimas aisladas), los cuales catalizan reacciones químicas sobre estos xenobióticos hasta llevarlos a compuestos más sencillos y menos tóxicos. El aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de degradar este tipo de compuestos y el conocimiento de la

estrategia metabólica que utilizan posibilita contar con herramientas para restaurar ambientes contaminados (biorremediación) y tratar los residuos para su disposición final.

CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

RESUMEN

La contaminación ambiental ha generado problemas en diferentes nichos ecológicos. Los contaminantes son una serie de compuestos xenobióticos y tóxicos que perjudican a los sistemas ambientales. En este capítulo se presenta una revisión sobre los plaguicidas como contaminantes del suelo, agua y aire. Se hace un énfasis en los organofosforados, específicamente en el clorpirifos, sus efectos y métodos para su remoción. Considerando además los tratamientos biológicos y su estrategia biotecnológica para su degradación. Se hace hincapié en el uso de bacterias y los genes involucrados en la capacidad de degradación.

1.1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y PLAGUICIDAS

Las actividades agrícolas, pecuarias, forestales e industriales desempeñan un papel importante para la alimentación de los seres humanos. Los datos de la FAO (2016) estiman que gran parte de la superficie de nuestro planeta está ocupada por praderas y pastizales permanentes. Sólo un poco está destinada a la actividad agrícola con cultivos permanentes, pese a la disponibilidad de tierras arables (Figura 1.1). Sin embargo, el índice de producción agrícola va en aumento. Los continentes de África y Asia tienen el mayor índice, América por su parte, en recientes años ha superado a Oceanía (Figura 1.2). Esto posiblemente sea a causa del incremento en la superficie o en el rendimiento de los cultivos.

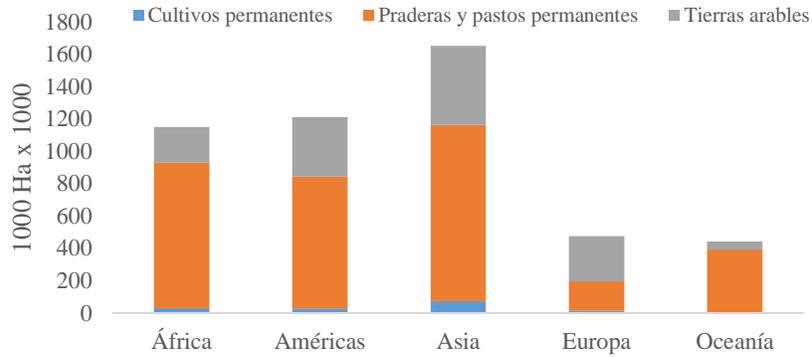


Figura 1.1. Composición del área agrícola mundial 2000-2013 (FAO, 2016).

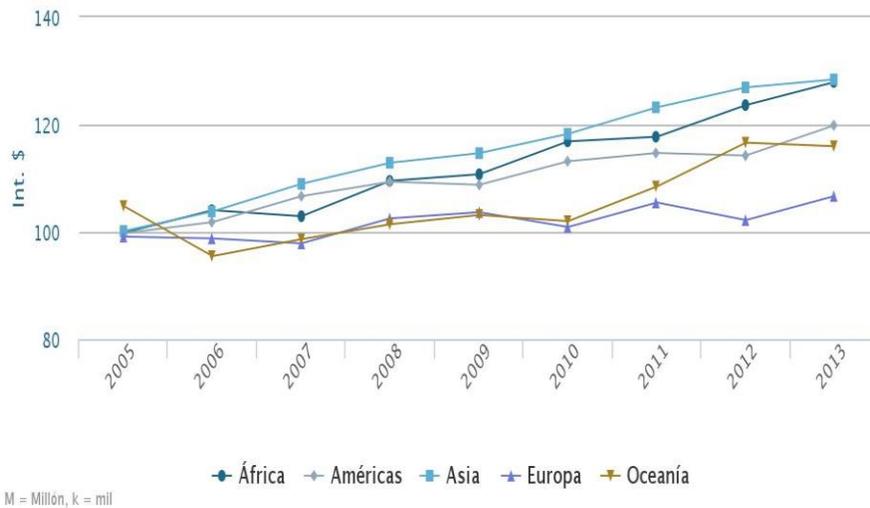


Figura 1.2. Índice neto de producción agrícola 2005-2013 (FAO, 2016)

En México, la superficie arable y la destinada a los cultivos permanentes representa una alta superficie con potencial para producir alimentos (Figura 1.3), sustentando así, parte de la alimentación de los mexicanos. Esto cobra importancia, ya que la agricultura representa un sector de área de trabajo para muchas personas. Considerando además que el 73.3% población es rural y el resto urbana (FAO, 2016). La mayor parte de esta población rural destina gran parte de sus actividades a la agricultura. Es decir, está relacionada directa o indirectamente con este tipo de actividades y todo lo relacionado a ellas.

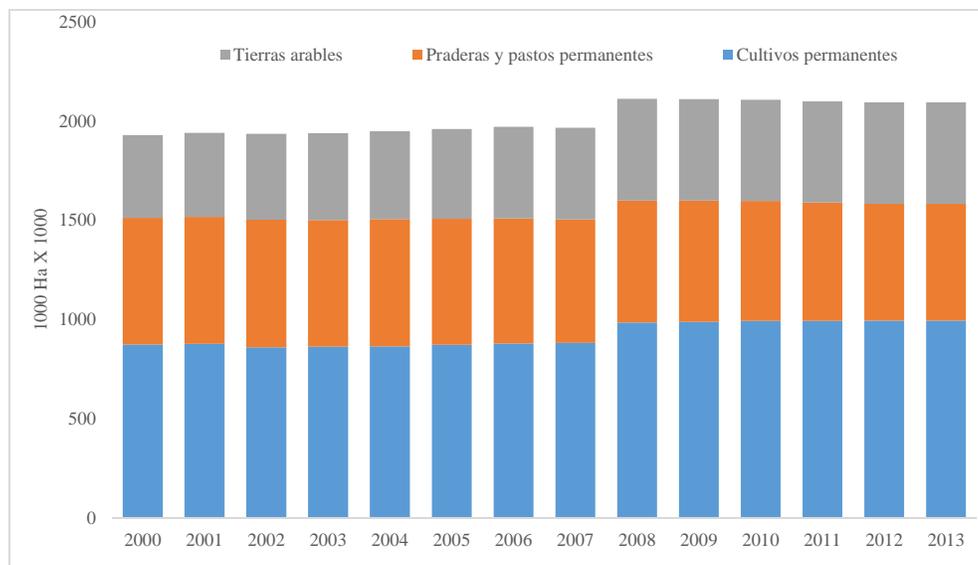


Figura 1.3. Composición del área agrícola en México, años 2000 a 2013 (FAO, 2016).

Los rendimientos agrícolas se han incrementado gracias a la implementación de nuevas tecnologías, de maquinaria y equipo, mejores fertilizantes, personal capacitado, uso de variedades mejoradas, solo por mencionar algunos factores. Pero algo que es necesario recalcar es el uso de plaguicidas para el control de plagas, el cual ha favorecido en gran manera e incrementado la producción de muchos cultivos agrícolas. China, algunos países de Europa, Estados Unidos, Chile, y Centroamérica son algunos de los países que mayormente usan estos compuestos químicos. México no es la excepción (Figura 1.4).



Figura 1.4. Uso mundial de plaguicidas en tierras de cultivo y los cultivos permanentes ($1,000 \text{ t ha}^{-1}$), años 2000 a 2010 (FAO, 2016).

Los países que mayormente comercializan estos compuestos se muestran en la Figura 1.5, resaltando Tailandia, Reino Unido, Canadá y Estados Unidos. Países de Centroamérica como Guatemala u Honduras importan estos compuestos en su mayoría, debido a la falta de producción dentro de su territorio. Por su parte, México, hasta el 2012, se usaron aproximadamente 80 mil toneladas de ingrediente activo de plaguicidas, contemplando insecticidas y herbicidas. En la Figura 1.6 se puede observar una disminución considerable del uso de fungicidas y bactericidas.

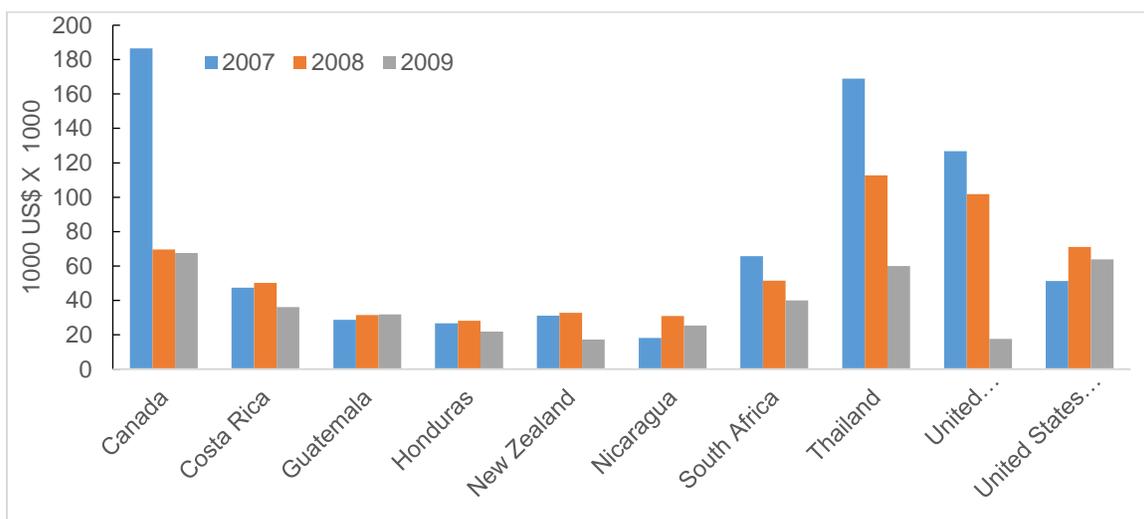


Figura 1.5. Países con mayores importaciones de plaguicidas (FAO, 2016).

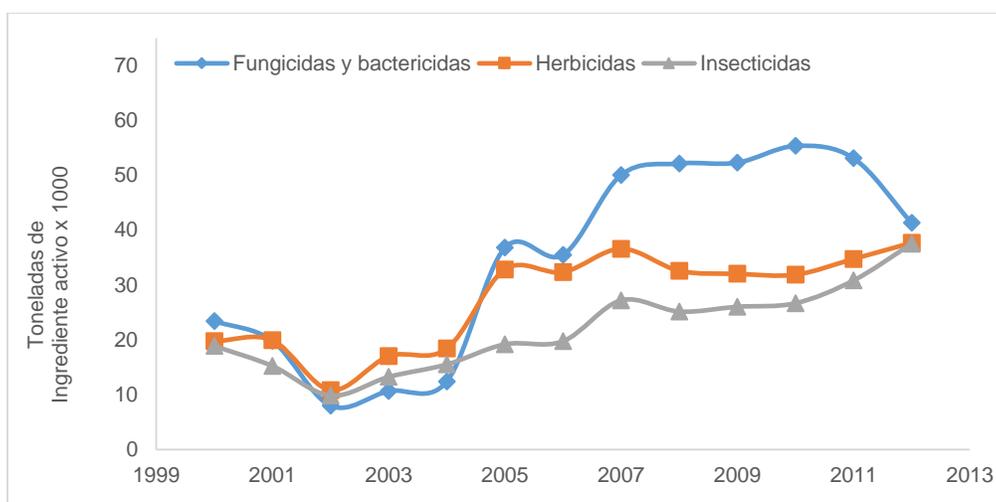


Figura 1.6. Uso de plaguicidas en México. Los datos son expresados en productos formulados (FAO, 2016).

Para el 2012, la FAO reporta que México importó plaguicidas de otros países con valor de más de 545 mdd, mientras que hubo exportaciones por 269 mdd. Las cifras expresan la importancia de la actividad agrícola en México y también del uso de estos compuestos como insumos. Este consumo ubica a México dentro de los primeros lugares en toda América Latina. Los datos históricos señalan que la demanda va en aumento.

Este nivel de uso es alarmante, ya que trae consigo problemas de salud para las personas implicadas directa e indirectamente con estos agroquímicos. La principal forma de contaminación es por la aplicación directa a los cultivos agrícolas; además, por derrames accidentales durante su transporte y fabricación, así como residuos provenientes de estanques donde el ganado es tratado para el control de ectoparásitos (US-EPA, 2011).

Adicionalmente, se considera que la falta de equipo de seguridad y de los conocimientos técnicos del manejo de plaguicidas, la elaboración de mezclas, las soluciones diluidas generadas por el consumidor y envases que no son confinados adecuadamente; son entre otras, las principales razones del aumento de residuos de plaguicidas (Yáñez-Ocampo *et al.*, 2009). Los efectos de los impactos de los plaguicidas pueden analizarse desde dos diferentes puntos de vista el ambiental y el de la salud pública.

El primero se da cuando los plaguicidas se introducen a las cadenas tróficas, por ejemplo: a) produciendo una alteración en la disminución de las poblaciones de fitoplancton y zooplancton (indicadores de la contaminación del agua), produciendo efectos carcinógenos, neurotóxicos, así como sobre la fertilidad y viabilidad (en invertebrados, en peces, anfibios, insectos y mamíferos) de sus descendientes; b) la presencia de plaguicidas en el ambiente han provocado la resistencia de organismos considerados como plagas, así como de vectores de enfermedades (v. g. malaria, dengue y Chagas), y por el contrario otras poblaciones de insectos benéficos se ven disminuidas (v. g. polinizadores); c) se alteran los ciclos biogeoquímicos por la disminución de la macro y microbiota; d) por lixiviación de los plaguicidas se contaminan los cuerpos de agua; e) los plaguicidas pueden quedar adsorbidos cuando interactúan con partículas del suelo cargadas positiva o negativamente, de esta manera se incrementa su persistencia en el ambiente (4 a 26 semanas).

Desde el punto de vista de la salud pública el impacto de los plaguicidas es principalmente por intoxicaciones agudas (sobre todo en la población ocupacionalmente expuesta) o por exposición indirecta de la población en general (a través del aire, el agua y los alimentos contaminados con residuos de plaguicidas). En México, de enero a septiembre el SINTOX (2006) menciona que se reportaron 315 casos de intoxicación por plaguicidas (413 productos involucrados), dentro de los cuales el 25% fueron OF, el 14% carbamatos y otros el resto. El 44% se presentan con productos de tipo urbano y el 56% con productos de tipo agrícola, siendo las intoxicaciones de tipo accidental las que prevalecen con 59%.

1.2.LOS PLAGUICIDAS EN EL SUELO

El uso indiscriminado de agroquímicos en las actividades agropecuarias es una de las más importantes causas de la pérdida de la fertilidad de los suelos, de su capacidad biodegradadora y otras funciones en los ciclos biogeoquímicos. Las prácticas inadecuadas en el uso y manejo de plaguicidas, constituyen una de las más importantes formas de contaminación, que impactan no sólo los suelos de las áreas en donde se aplican, sino que llegan a través de los ríos hasta las zonas costeras afectando a las especies marinas. La aplicación de plaguicidas genera además, conflictos sociales por el elevado número de trabajadores agrícolas intoxicados, con un alto índice de mortalidad, así como también por los potenciales efectos sobre la salud de las comunidades vecinas (Lichtinger *et al.*, 2001).

El destino de un plaguicida en el ambiente depende de la retención, transformación y procesos de transporte, así como la interacción de esos procesos. Cuando los plaguicidas se aplican, llegan al suelo acumulándose y afectando sus propiedades físicas y químicas, por diversas maneras, por emanación del aire, por acción de la lluvia, así como por diferentes fenómenos de transporte, volatilización, convección y difusión. Algunos otros factores relacionados con el suelo, que influyen en el comportamiento y en su destino son la humedad, el pH, la temperatura, la capacidad de absorción y el porcentaje de materia orgánica; y los dependientes del plaguicida en este caso su naturaleza química y su estabilidad ante la degradación química, microbiológica y fotodegradativa.

Los plaguicidas aplicados constantemente a suelos agrícolas, los envases contenedores y los productos caducos, generan residuos líquidos y sólidos que contaminan suelos y cuerpos de agua, afectando a las cadenas tróficas y al hombre mismo. Ante esta situación, es importante generar alternativas para el tratamiento de residuos de estos xenobióticos o para la limpieza de sitios contaminados.

1.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS PLAGUICIDAS

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación 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, 2003).

El término plaguicida incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte.

1.3.1. Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas se pueden clasificar de acuerdo con diferentes criterios. Las clasificaciones más comunes son: de acuerdo a su concentración, por el organismo que controlan, por su modo de acción, por su toxicología, en función del uso al que se destinan y de acuerdo a su composición química. Por su composición química se clasifican como se muestra en el Cuadro 1.1.

Los compuestos organofosforados (OF) son los plaguicidas más utilizados después de que se prohibió el uso de plaguicidas organoclorados (Cortina-Puig *et al.*, 2010).

Cuadro 1.1. Clasificación de plaguicidas (CICOPLAFEST, 2004).

GRUPO	COMPOSICIÓN	EJEMPLOS
Organoclorados	Átomos de carbono, cloro, hidrógeno y en ocasiones oxígeno. Carecen de sitios intramoleculares activos. Son apolares y lipofílicos, muy estables en el ambiente.	Se dividen en tres grupos: a) relativos al DDT; b) relativos al benceno: lindano y BCH, y c) cloro dienos: clordano, endosulfán y endrin.
Organofosforados	Derivados del ácido fosfórico. Poseen un átomo central de fósforo en la molécula.	Se dividen en tres grupos: a) alifáticos: forato, dimetoato b) cíclicos: paratión metílico. c) heterocíclicos: diazinón.
Carbamatos	Estructura química basada en un átomo alcaloide de la planta <i>Physistigma venenosum</i> .	a) derivados de ésteres carbamatos: carbaryl b) derivados del ácido tiocarbámico: methomyl c) carbamatos: propoxur.
Tiocarbamatos	Difieren de los carbamatos en su estructura molecular en que contienen un grupo -S- en su composición.	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb.
Piretroides	Compuestos sintéticos similares a las piretrinas (alcaloides obtenidos de los pétalos de <i>Chysanthemum cinerariefolium</i>).	Cipermetrina, fenvalerato, permetrina, aletrina, tetrametrina.
Organoazufrados	Poseen un azufre como átomo central en su molécula. Tóxicos a ácaros y de baja toxicidad a insectos.	Porpartige.
Dinitrofenoles	Se reconocen por la presencia de dos grupos nitro (-NO ₂) unidos a un anillo fenólico.	Trifluralina.
Compuestos inorgánicos	Carecen de carbono en su composición.	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco.
Compuestos de origen botánico	Productos derivados directamente de vegetales que no se sintetizan químicamente.	Rotenona, nicotina, aceite de canola
Biológicos	Virus, microorganismos derivados de su metabolismo.	<i>Bacillus thuringensis</i> , <i>Ascovirus</i> , <i>Metharrizium</i>
Organoestañicos	Presencia de un estaño como átomo central de la molécula.	Azocyclotin, cyhexatin, dowco, plictrán.
De composición diversa	De cobre, derivados de triazinas, de la urea, de cloronitrofenólicos, del ácido fenoxiacético, bupiridilos, ácidos tricloroacéticos, etc.	Diuron, fluometuron, thidiazuron, atrazina, dinocap, silbes, talimidias.

La investigación de los compuestos orgánicos del fósforo se inició con Lassaigne en 1820 quien preparó ésteres fosfóricos (época de la Segunda guerra mundial), sin embargo las propiedades insecticidas fueron descubiertas hasta 1937 por Schrader. En general los plaguicidas OF son derivados del ácido fosfórico, donde dos de los OH de la molécula son sustituidos por radicales metoxi o etoxi y el tercer OH presenta sustituyentes de tipo aromático o alifático (Fest y Schmidt, 1983).

Los compuestos OF actúan inhibiendo la actividad de la acetilcolinesterasa, mediante la inhibición enzimática competitiva e irreversible, su mecanismo de acción se basa en la fosforilación de la enzima en las terminaciones nerviosas. El átomo central de fósforo de estos compuestos OF tiene una deficiencia de electrones y esta configuración favorece la atracción hacia el sitio esteárico de la acetilcolinesterasa que posee un excedente de electrones. El fósforo forma un enlace covalente con el grupo nucleofílico de la enzima. La inhibición de la acetilcolinesterasa provoca acumulación de la acetilcolina en la unión sináptica y la interrupción de la transmisión normal de los impulsos nerviosos (Jeyaratnam y Maroni, 1994).

1.3. CLORPIRIFOS

1.4.1. Situación

El clorpirifos (*O,O*-dietil-*O*-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato) es un organofosforado clorinado de amplio espectro utilizado como insecticida, nematicida y acaricida para el control de plagas en diversos cultivos. Es un compuesto degradable, sin embargo, a pesar de su alta toxicidad, se está utilizando cada vez más en todo el mundo desde su introducción en 1965. Actualmente, el clorpirifos está registrado en la mayor parte de los países del mundo. Aunque su uso se ha restringido en ciertas aplicaciones en varios países, los productores pueden encontrarlo fácilmente en el mercado. Su bajo precio y fácil acceso hacen que los productores elijan clorpirifos sobre otros plaguicidas (Panuwet *et al.*, 2009; Lu, 2011; Muñoz-Quezada *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2012; Phung *et al.*, 2012).

En 1997 la US-EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos), en conjunto con los fabricantes del producto, diseñaron políticas destinadas a reducir la exposición en el hogar, especialmente en los niños. Se acordó eliminar los concentrados de clorpirifos que requieren ser mezclados, limitar el uso para consumo en el hogar sólo a los productos que vienen listos para ser usados, y prohibir su uso en áreas no apropiadas (juguetes, cortinas y muebles) (Barron y Woodburn, 1995).

En diciembre del 2014, la EPA finalmente aceptó los datos científicos que demostraban una correlación entre la exposición al clorpirifos y el daño cerebral en los menores, incluyendo un menor cociente intelectual, retrasos de desarrollo y pérdida de memoria. Por 15 años, la EPA ha estado permitiendo niveles de exposición mucho mayores que los niveles considerados dañinos para los niños. El reporte que la EPA presentó a la corte menciona el daño a los trabajadores como una razón más para establecer la prohibición. Según las investigaciones de la misma EPA, se ha descubierto que el clorpirifos causa daño cerebral en los niños e intoxica a los trabajadores y las personas que se encuentren cerca (Jordan-Bloch, 2015).

En un anuncio dado por la EPA, menciona que: “este organismo tiene la intención de otorgar la Petición para ser publicada en el Registro Federal a más tardar el 15 de abril del 2016, la cual es una norma propuesta de acuerdo a *21U.S.C.sección 346a(d)(4)(A)(ii)* para revocar todas las tolerancias de clorpirifos que respondan a las preocupaciones que se tienen sobre la calidad del agua en cuencas pequeñas de todo el país”. Al retirar todas las tolerancias de clorpirifos, la EPA estaría prohibiendo todos los usos de clorpirifos en la producción de alimentos.

En Europa, La Red de Alerta de la Junta de Andalucía informo en su página web que la Comisión Europea solicitó a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) la revisión de los valores toxicológicos del clorpirifos. Las conclusiones de la EFSA se publicaron en abril de 2014 y en el Comité Permanente de Legislación de marzo de 2015 tomó nota de los nuevos valores de referencia. Dicha revisión ha supuesto la reducción de los límites máximos de residuos (LMR) en varios productos hasta el límite de detección

analítica. Los productos afectados son: manzana, pera, melocotón, uva de mesa, alcachofa, tomate, pimiento, frambuesa, patata, melón, sandía y coles. En la práctica, esta reducción de los LMR provoca que no sea posible mantener un uso seguro de la sustancia activa en dichos cultivos de cara al cumplimiento de los niveles máximos permitidos. Se prevé que los nuevos cambios se sometan a votación en el Comité Permanente de la UE en septiembre de 2015 y que los nuevos LMR estén publicados entre diciembre 2015 y febrero 2016 (AgrodiarioHuelva, 2015).

Por ese motivo, en España, en julio del 2015 el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) aprobó la retirada de los formulados a base de clorpirifos en los usos anteriormente especificados. No obstante, se advierte que el clorpirifos sigue siendo una sustancia activa permitida en la UE y que aún existen productos fitosanitarios autorizados en España para el control de determinadas plagas en otros cultivos. Por el momento no se modifican las autorizaciones de productos formulados como granulados o las existentes para otros cultivos (como es el caso de los cítricos, plátanos, uvas y cereales). Cabe resaltar que en España solo hay 11 registros de uso comercial de clorpirifos (MAGRAMA, 2016).

En América latina el escenario no es alentador. Por ejemplo, en Chile desde los años 80s se ha utilizado el clorpirifos en productos hortofrutícolas. Considerando la reducción del límite permisible realizada por la EPA, se esperaba que se pusiera en marcha en Chile durante el año 2002. Este hecho no ocurre hasta hoy (Junod *et al.*, 2009). En México el clorpirifos está incluido dentro de la lista de insecticidas permitidos (No CAS 2921-88-2 y 5598-13-0) por la CICOPRAFEST (INE, 2016). De acuerdo con la COFEPRIS (2012) se tenían aproximadamente 136 registros de formulaciones autorizadas para productos con clorpirifos, cuya vigencia de uso era indeterminada. Había algunas excepciones, por ejemplo la formulación de Clorpirifos etil-Permetrina (registro número RSCO-MEZC-1105-303-009-039 de la empresa VELSIMEX, S.A. de C.V.) tenía una vigencia de uso hasta el 30 de mayo de 2016.

Cabe mencionar que en formulaciones también se usa Clorpirifos junto con Piretrina y Butóxido de piperonil. Sin embargo, actualmente solo menciona 56 registros, su vigencia en su mayoría no es indeterminada (COFEPRIS, 2016). Pareciera que el escenario no es tan grave, no obstante, aún se comercializa en muchas regiones del país. Inclusive se puede importar y exportar libremente (Aduanas-México, 2016).

1.4.2. Características fisicoquímicas

Tiene múltiples nombres comerciales, algunos de ellos son: Lorsban, Dursban, Suscon Green, Empire, Whitmire PT270, Chlorpyrifos-ethyl, Detmol UA, Dowco 179, Eradex, Paqean, Piridane, Scout, Stipend, Tricel, etc. El clorpirifos se registró por primera vez para su uso en los Estados Unidos en 1965 por Dow Chemical Company para el control de plagas. Está formulado y comercializado como líquido, gel, granular, soluble, emulsionable y concentrados, material microencapsulado, gránulos, tabletas, materiales impregnados, cebos, polvos humectables, polvos, y formulaciones listas para usar.

Debido a su estructura (Figura 1.7) y propiedades fisicoquímicas el clorpirifos persiste por período relativamente largo (presión de vapor: 3.35×10^{-3} Pa a 25 °C; punto de ebullición: 41.5–42.5 °C; solubilidad en agua: 0.0014 g L^{-1} a 25 °C; constante de Henry: $0.478 \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$; coeficiente de sorción en suelo K_{oc} : 360–31000; vida media: 7-120 días). Debido a su naturaleza no polar, el clorpirifos tiene baja solubilidad en agua y un alto coeficiente de partición en disolventes orgánicos. Su estabilidad hidrolítica disminuye con el aumento de pH. Tiene una relativamente baja volatilización y su degradación bajo condiciones aeróbicas también hacen que sea más persistentes en el ambiente (NFMS, 2008).

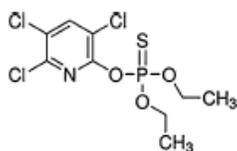


Figura 1.7. Estructura del clorpirifos.

En 2007 se reportó como uno de los plaguicidas organofosforados más utilizados en los Estados Unidos, con un estimado de 7-9 millones de libras aplicadas (Grube *et al.*, 2011). De acuerdo a la revisión del mercado de China, se espera un crecimiento anual del 10% de la demanda mundial de clorpirifos, y en 2015, esta será superior a 20 mil toneladas (AgroNews, 2013). No obstante, a pesar del retiro de productos a base de clorpirifos debido a preocupaciones de toxicidad y daño al medio ambiente (Dow AgroSciences, 2013), su producción y consumo aumentan drásticamente cada año.

La adsorción tiende a reducir la movilidad del clorpirifos aumentando su persistencia en el suelo mediante la reducción de su disponibilidad a las fuerzas de degradación. El clorpirifos se adsorbe en las partículas del suelo (con un coeficiente de adsorción del suelo K_{oc} mayor a 3000), en la materia orgánica, minerales de arcilla y sedimentos. El grado de adsorción del suelo es mayor en suelos orgánicos que arenosos. La vida media del clorpirifos en el suelo varía, desde unos pocos días hasta 4 años, dependiendo de la tasa de aplicación, el tipo de ecosistema, los microorganismos del suelo, y las condiciones climáticas (Gebremariam *et al.*, 2012).

1.4.3. Efectos del clorpirifos

El clorpirifos es un insecticida no sistémico, que es eficaz contra una amplia gama de plagas de insectos de cultivos económicamente importantes. Entra en el cuerpo de insectos por contacto e ingestión, y también se absorbe a través del intestino, la piel y membranas. De manera general, afecta el sistema nervioso de los insectos mediante la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa por la fosforilación, tanto en la sinapsis de las neuronas y en el plasma. Como resultado, la acetilcolina se acumula en la sinapsis neuronal que causa la muerte del insecto objetivo.

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor en muchas sinapsis (colinérgicas) del sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático) y en las conexiones neuromusculares (placas motoras). Los receptores de ACh pueden ser de varios tipos: muscarínicos (se bloquean con muscarina), nicotínicos (se bloquean con nicotina). Concretamente actúan en

algunas sinapsis del sistema nervioso central y en las inervaciones del músculo esquelético (receptores muscarínicos); igualmente en las del músculo liso, corazón y glándulas endocrinas del sistema autonómico (Chamber y Levi, 1992).

La acetilcolinesterasa (esterasa tipo B, con un resto de SER en el centro activo), enzima presente en la terminación postsináptica, hidroliza rápidamente a la ACh, lo que conlleva la repolarización de la membrana o de la placa basal (en las conexiones neuromusculares) y las prepara para la llegada de un nuevo impulso. Así pues, la función normal de la ACh depende de su rápida hidrólisis por la acetilcolinesterasa, que permite la brevedad y unidad de los impulsos propagados sincrónicamente. El ácido acético liberado pasa a sangre, mientras que la colina es recuperada por las neuronas para la síntesis de nuevas moléculas de neurotransmisor (Cedillo, 1996).

Al igual que en los vertebrados inferiores, en todos vertebrados superiores el clorpirifos también se dirigen principalmente a la actividad acetilcolinesterasa (AChE) (Reiss *et al.*, 2012). La edad y el sexo relacionados con las diferencias en sensibilidad a clorpirifos pueden variar tanto cuantitativa como cualitativamente con las condiciones de exposición, dosis y frecuencia de la exposición.

En humanos, el clorpirifos ha sido reportado como antiandrogénico y estrogénico. Induce alteraciones en la tiroides y otras glándulas, reduciendo así los niveles séricos de hormonas respectivos. Los niños expuestos a altos niveles de clorpirifos son significativamente más propensos a experimentar retrasos en el índice de desarrollo psicomotor y del índice de desarrollo mental, problemas de atención, déficit de atención o hiperactividad, y problemas generalizados de trastorno del desarrollo (Rauh *et al.*, 2006). La carcinogenicidad del clorpirifos no se ha confirmado en humanos; sin embargo, hay varios estudios epidemiológicos que indican un aumento en el riesgo de varios tipos de cáncer en personas aplicadores de plaguicidas, especialmente colorectal, de próstata, de mama, linfoma, hematopoyéticas, leucemia y cánceres cerebrales. Hay evidencia de inmunotoxicidad, incluyendo los efectos sobre los linfocitos, timocitos, células T, factor de necrosis tumoral, y la autoinmunidad (John y Shaik, 2015).

Además, la exposición a clorpirifos está asociada con problemas reproductivos, tales como el peso al nacer y problemas de longitud, daño del ADN en el esperma y disminución de espermatozoides, concentración y motilidad del esperma, fluidos cervical, sangre del cordón, meconio, y la leche materna. Sin embargo, la evaluación final de la toxicidad y de los efectos del comportamiento debidos a clorpirifos requieren evaluaciones a largo plazo durante períodos de desarrollo y edad discretos (John y Shaik, 2015). Las dosis subtóxicas del clorpirifos son capaces de afectar el desarrollo del cerebro mediante inhibición de la mitosis, inducción de apoptosis, y alteración de la actividad neuronal. Su capacidad de toxicidad reproductiva es evidente considerando la actividad fetotóxica y los efectos teratogénicos. El clorpirifos actúa como una potente neurotoxina del desarrollo y también como un disruptor endocrino (Flaskos, 2012).

En México, hay varios casos de intoxicación y problemas de salud causados por plaguicidas. Castillo-Cadena *et al.* (2013), estudiaron algunas alteraciones en biomarcadores de inmunotoxicidad en floricultores (productores, vendedores y personas no expuestas) que tienen relación con mezclas de plaguicidas, incluyendo el clorpirifos. Sus resultados indicaron que los linfocitos T se redujeron en los productores, el índice mitótico también. Sus resultados establecieron un efecto inmunotóxico por la exposición a plaguicidas. En animales, se ha demostrado que las exposiciones agudas y crónicas dan como resultado genotoxicidad y mutagenicidad en ratones (Ojha *et al.*, 2013). Es considerado de moderadamente a extremadamente tóxico para las aves, aunque no hay estudios de toxicidad en reptiles (Watts, 2012).

Los estudios que existen muestran un grado importante de bioacumulación de clorpirifos en varias especies. Dow Chemical Company ha informado un valor de 5,100 en peces, lo cual excede el umbral de 5,000. Se ha medido clorpirifos en peces del Ártico, y esas mediciones indican un potencial de bioacumulación (Watts, 2012). Viswanath *et al* (2010) describieron clorpirifos como uno de los más potentes compuestos anti-androgénicos (junto al endosulfan y piperofos), de entre los 9 probados. El clorpirifos disminuye en forma importante la biosíntesis de testosterona en las células de ratas Leydig; reduce la expresión

de enzimas claves esteroidegénicas (citocromo P450_{sc}, 2B-HSD, y 17B-HSD) y la expresión reguladora aguda de la proteína esteroidegénica (StAR), y además restringe el receptor de la hormona luteinizante que estimula la producción de cAMP (adenosin monofosfato cíclico).

También se ha observado que el clorpirifos causa alteración endocrina en peces. A 5-15 ppb generó una baja de niveles de suero cortisol, estradiol y testosterona, sin que cambiaran los índices gonado-somáticos en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Oruc, 2010). Los estudios realizados en mejillones de mar *Mytilus galloprovincialis* mostraron una compleja interacción entre clorpirifos y estradiol 17β en el tracto digestivo (Canesi *et al.*, 2011).

Bernabó *et al.* (2011) expusieron renacuajos de *Rana dalmatina* a dosis de 0.025 mg L⁻¹ o 0.05 mgL⁻¹ de clorpirifos (ambas dosis son ecológicamente relevantes). A un mes de metamorfosis el 20% a 25% de los expuestos a clorpirifos fueron clasificados como “intersexuales” debido a la presencia de ovocitos testiculares (en comparación con la no existencia de estos en el grupo control).

La exposición a concentraciones subletales de clorpirifos ha causado los siguientes efectos en especies de la fauna de agua dulce y marina: ataxia, maduración tardía, daños al crecimiento y la reproducción, malformaciones, y disminución de las poblaciones (NMFS, 2008). El clorpirifos es genotóxico en *Channa punctatus*, causa inducción del micronúcleo y daño al ADN, además de estrés oxidante *Channa punctatus* (Ali *et al.*, 2008). Puede afectar el sistema inmunológico en peces causando una reducción en linfocitos, dependiendo de la dosis (Harford *et al.*, 2005), expresión alterada de citoquinas en el Salmón de Chinook (Eder *et al.*, 2008), daño al bazo en la carpa común (Wang *et al.*, 2011), y actividad fagocítica en tilapia del Nilo (Girón-Pérez *et al.*, 2006).

Es embriotóxico para el crustáceo *Daphnia magna* en concentraciones ambientales: exposición crónica a 0.1 µg L⁻¹ causó malformaciones en el 20% de los embriones (Palma *et al.*, 2009). Es también neurotóxico para el desarrollo en peces: la exposición durante los primeros 5 días posteriores a la fertilización generó como resultado daño en el aprendizaje

en pez zebra y disminución en los niveles de dopamina que permanecieron en la edad adulta (Eddins *et al.*, 2010).

Un estudio encontró que los niveles de clorpirifos eliminaron la función del olfato en salmónidos, cuando examinaron la neurotoxicidad subletal registrando potencial de olores recordados desde el epitelio sensor y la parte anterior del cerebro usando dos olores naturales (ácido taurocólico o *L*-serina). El clorpirifos disminuyó la extensión de las respuestas epiteliales y bulbares a ambos olores, en dependencia de la concentración de estos. La concentración de clorpirifos de referencia de $0.72 \mu\text{g L}^{-1}$ mostró un 20% de pérdida de la función del sentido de olfato (Watts, 2012).

En plantas, el clorpirifos muestra evidencia de toxicidad genética a nivel celular: Dimitrov y Gadeva (1997) mostraron aumento de la frecuencia de micronúcleos en células de raíz de *Crepis capillaris* L., debido a molestias parciales que llevan a una anafase en la distribución de cromosomas, como resultado de la exposición a la formulación Dursban de clorpirifos. Los autores también se refieren a estudios que muestran un aumento de la frecuencia de aberraciones de cromosoma luego de la exposición a Dursban en habas (*Vicia faba*) (Amer y Farah, 1983) y cebada (Kaur y Grover, 1985).

Una sola aplicación puede no tener ningún impacto a largo plazo en la salud o al medio ambiente, pero en la práctica, los plaguicidas se aplican de manera continua propiciando su acumulación en el ambiente. Esto a su vez ha dado lugar a la contaminación de una amplia gama de nichos ambientales, en última instancia, representando amenazas a la sostenibilidad de los suelos agrícolas (Johnsen *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002; Hua *et al.*, 2009). El grado de toxicidad es mayor para los productos de su degradación tales como clorpirifos oxon, 3,5,6-tricloro-piridinol, y el metabolito secundario 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) que son más peligrosos que el compuesto original.

El contenido de humedad del suelo y el pH juegan un papel importante, y la disipación es predominante en altos contenido de humedad (Wang *et al.*, 2013) y la alcalinidad (Singh *et al.*, 2003). En la sombra se reduce la fotodegradación (Chai *et al.*, 2009), y por lo tanto, la

persistencia es mayor en condiciones de oscuridad. Se han reportado niveles medibles de clorpirifos en el aire (Hill, 2006; Mills y Kegley, 2006). La vida media de degradación de clorpirifos en el aire debido a la fotólisis es 6.34 h y por volatilización es de 72 h (Lyman *et al.*, 1990).

1.4.4. Estrategias de remoción

Existen distintos tratamientos para detoxificar, y de manera general para degradar al plaguicida. Dentro de los principales están los tratamientos fisicoquímicos y el tratamiento biológico. La primera solución ante la contaminación por clorpirifos consiste en evitar y reducir su uso, pero es necesario considerar otras alternativas disponibles, incluyendo prácticas culturales, técnicas mecánicas, control biológico y el uso de otros productos químicos de menor toxicidad. Para el tratamiento de aguas, sedimentos y suelos contaminados con plaguicidas ya se han reportado muchas tecnologías físico-químicas. A continuación se mencionaran algunos ejemplos de procesos utilizados.

Primeramente esta la fotodegradación, en la cual se incide luz UV (254 nm) en las superficies de suelo. Se desarrollan tres procesos fotoquímicos simultáneos: hidrólisis, dechloración y oxidación. Los productos de oxidación y dehalogenación se someten a fotólisis para formar cloropiridinoles y ácido *O,O*-dietilfosforotioico los cuales son inestables y más rápidamente hidrolizables sin acumularse en el suelo (Kralj *et al.*, 2007).

Dentro de los métodos químicos, la ozonización es considerada como el más prometedor, ya que se produce una reacción relativamente rápida del ozono con el clorpirifos. El ozono promueve la oxidación en el enlace tiofosforil del clorpirifos y del metil-clorpirifos (Ohashi *et al.*, 1993).

Otros métodos de oxidación química incluyen cloro (Cl), dióxido de cloro (ClO₂), permanganato de potasio (KMnO₄), y peróxido de hidrógeno (H₂O₂); los cuales se pueden utilizar, pero no son suficientemente eficaces para degradar productos químicos orgánicos sintéticos tales como plaguicidas (Ikehata y El-Din, 2006).

Las combinaciones de oxidantes químicos (v.g. O_3 y H_2O_2) con sales metálicas (v.g. TiO_2) y con irradiación ultravioleta (UV-Vis) muestran mejores resultados. Por ejemplo, el reactivo de Fenton (H_2O_2/Fe^{2+}) es eficaz en la degradación y mineralización de clorpirifos (Ikehata y El-Din, 2006). Estos enfoques fisicoquímicos fueron referidos colectivamente como *Procesos de oxidación avanzada* (POA). La mayoría de los POA utilizan una combinación de agentes oxidantes fuertes (v.g. radicales hidroxilo, ozono, flúor, oxígeno atómico, peróxido de hidrógeno, radical perhidróxilo, permanganato, ácido hipobromoso, ácido hipocloroso y dióxido de cloro) con catalizadores (v.g. iones de metales de transición) e irradiación (v.g. ultravioleta, visible).

La combinación de la radiación UV y peróxido de hidrógeno ha demostrado ser un método simple y eficaz que puede mineralizar totalmente el clorpirifos en agua (Ikehata y El-Din, 2006). El 93% de degradación de clorpirifos se alcanzó en 20 min con H_2O_2 , partiendo de una concentración inicial de 450 mg L^{-1} (0.16 mg de clorpirifos degradado por mg de H_2O_2 consumido) (Femia *et al.*, 2013).

La degradación oxidativa de clorpirifos por efectos individuales y combinados de irradiación ultrasónica y ozono (US/ O_3) mostró tener un efecto sinérgico que redujo significativamente la toxicidad del clorpirifos, con aumento de la producción de cloruro, nitrato y sulfato. Sin embargo, se observó una disminución de pH (7.46 - 4.49) durante los puntos del proceso de degradación, tendiendo hacia la liberación de HCl (Pengphol *et al.*, 2012).

La degradación fotocatalítica (con TiO_2) del clorpirifos en fase acuosa en presencia de luz UV artificial y la luz solar fue reportada por Verma y Dixit (2012). Sugieren que el tratamiento bajo condiciones solares naturales dará mejores resultados en comparación con tratamiento con UV. También se ha demostrado que hay degradación fotocatalítica del clorpirifos en suspensiones acuosas bajo luz solar utilizando nanocristales de ZnO (Kanmoni *et al.*, 2012).

La irradiación Gamma tiene el potencial para degradar el clorpirifos y puede utilizarse en combinación con el método convencional de luz solar para limpiar muestras ambientales contaminadas (Hossain *et al.*, 2013). Se ha observado una reacción de hidrólisis de pseudo-primer orden (descomposición) dependiente de la dosis de clorpirifos con rayos Gamma ^{60}Co en solución acuosa a nivel laboratorio. Los resultados muestran un 100% de degradación de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ a una dosis absorbida de 575 Gy (Ismail *et al.*, 2013).

La degradación de clorpirifos por una combinación de hemoglobina inmovilizada y peróxido de hidrógeno generado *in situ* se reportó por Tang *et al.* (2011). Este sistema electroquímico-enzima en condiciones óptimas podría degradar más del 98% de clorpirifos. Este es un sistema con baja potencia y alta eficiencia y, por tanto es sugerido como una posible alternativa para las enzimas naturales utilizadas para tratamiento de aguas residuales contaminadas con clorpirifos.

Sin embargo, estos tratamientos presentan algunas limitaciones: aunque la hidrólisis puede afectar al ingrediente activo, por lo general no influye en los disolventes orgánicos utilizados en la formulación, por lo que sigue siendo necesario eliminar el disolvente orgánico restante de modo inocuo; el tratamiento químico es difícil y peligroso. El uso de sustancias químicas o procedimientos inadecuados puede dar lugar a reacciones violentas o subproductos sumamente tóxicos; el tratamiento químico produce por lo general un volumen mayor de desechos menos tóxicos, los cuales deben ser también eliminados. Además, estos métodos suelen ser costosos y conducir a la contaminación del medio con otros contaminantes tóxicos productos de las reacciones químicas.

Afortunadamente, hay métodos biológicos que evitan este tipo de problemas. La degradación biótica es un proceso común para la eliminación de los contaminantes orgánicos. Varias especies de bacterias y hongos tienen la capacidad considerable para poder metabolizar clorpirifos en el suelo y medios líquidos. Los microorganismos pueden degradar el clorpirifos ya sea metabólicamente (John *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2004) o co-metabólicamente (Anwar *et al.*, 2009). El primero se refiere a la mineralización por uso directo como fuente de carbono y energía, mientras que el co-metabolismo es el

metabolismo incidental en el que el compuesto se transforma sin ningún beneficio para el microorganismo.

El tratamiento biológico de plaguicidas involucra la utilización de sistemas biológicos o sus productos (células completas o enzimas aisladas), los cuales catalizan reacciones químicas, sobre estos compuestos hasta llevarlos a compuestos más sencillos y menos tóxicos. El aislamiento y caracterización de microorganismos que puedan degradar este tipo de compuestos, proporciona la posibilidad de contar con herramientas para restaurar ambientes contaminados y tratar los residuos para su disposición final (Yáñez-Ocampo, 2009).

1.5. BACTERIAS QUE DEGRADAN CLORPIRIFOS

La biodegradación con bacterias aisladas de sitios expuestos a estos xenobióticos, es una alternativa valiosa. Sin embargo, estas bacterias pueden ser patógenas, de ahí la importancia de identificarlas para utilizarlas de manera segura o bien emplear estrategias moleculares para su aprovechamiento en el tratamiento de residuos de plaguicidas o en la restauración de sitios contaminados. Se han reportado numerosos microorganismos con capacidad de modificar la estructura de algunos plaguicidas (Singh y Walker, 2006).

Durante un proceso de tratamiento biológico de contaminantes, es imprescindible tener bajo control ciertas condiciones abióticas, mediante el monitoreo y supervisión constante, con ayuda de equipos que permitan cuantificar la actividad degradadora o bien la concentración del contaminante, para de este modo evaluar y establecer modificaciones al proceso si es que lo requiere.

El fundamento bioquímico de la biorremediación es que en la cadena transportadora de electrones de las células se van a producir una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo objetivo es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico que es externo a la célula y que actúa como donador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula degrada y consume dicha sustancia. Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración

microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio (Maroto y Rogel, 2002).

Existen diversas tecnologías para biorremediar ambientes contaminados y pueden ser *in situ* o *ex situ*. A continuación se mencionan cada una de ellas (Velasco-Trejo, 2002):

- Bioaugmentación: adición de microorganismos nativos al sitio contaminado.
- Bioestimulación: adición de nutrientes para estimular la actividad microbiana.
- Bioventeo (ventilación forzada): introducción de aire por medio del suelo para estimular el crecimiento de microorganismos aerobios.
- Composteo (biopilas): formación de pilas con el material contaminado, aplicando aire.
- Biocultivo: tratamiento en fase sólida en sitios confinados para retener los lixiviados que se forman.
- Biosorción: empleo de microorganismos con la finalidad de absorber metales.

Los factores que hay que tomar en cuenta para la biorremediación son la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno, el contenido de humedad (50% a 80%), el pH (6.5 - 7.5), la temperatura del suelo (20-25 °C), adsorción y desorción del plaguicida en las partículas y tamaño de las partículas del suelo.

Los plaguicidas presentes en el ambiente, pueden sufrir diferentes procesos de transformación abiótica o bien por acción de la actividad degradadora de los microorganismos (Figura 1.8). Para los plaguicidas que poseen estructuras aromáticas, bajo condiciones aeróbicas son transformados por mono y dioxigenasas, produciendo como metabolitos, derivados dihidroxilados. Bajo condiciones anaeróbicas, la transformación sigue rutas reductoras que lo dirigen a perder su aromaticidad antes de que el anillo se rompa. Posterior al rompimiento del anillo aromático se da la deshalogenación de los compuestos aromáticos. Sin embargo, algunas bacterias pueden deshalogenar directamente a los compuestos aromáticos.

Se conocen tres clases de reacciones de deshalogenación en compuestos aromáticos (Commandeur y Parsons, 1994):

- Oxidativa: el halógeno se separa del anillo durante la oxigenación.
- Hidrolítica: el halógeno es remplazado por un grupo hidroxilo (puede ocurrir en condiciones aerobias).
- Reductiva: el halógeno es remplazado por el hidrógeno (ocurre solo en condiciones sulfato-reductoras y metanogénicas).

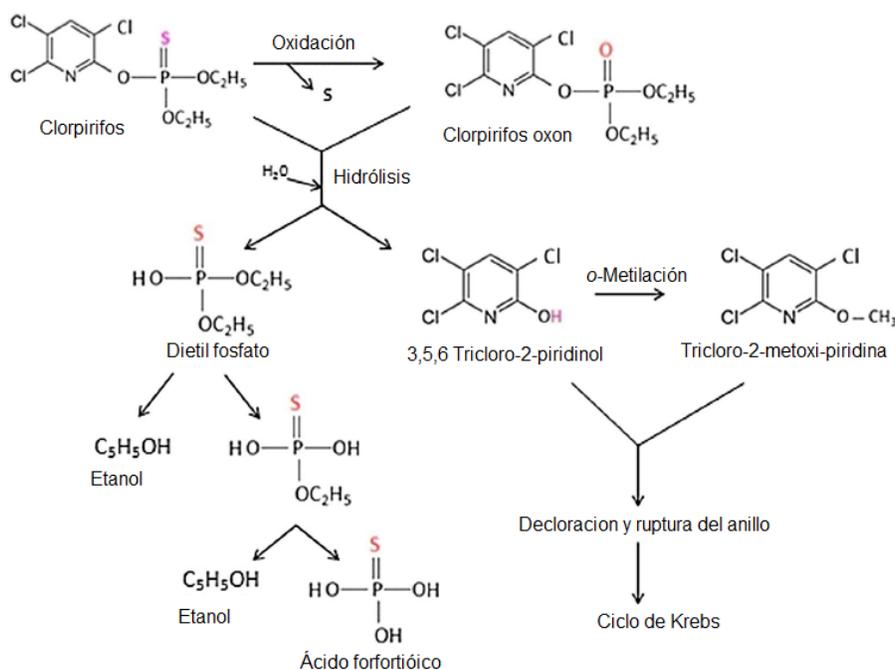


Figura 1.8. Ruta de degradación de clorpirifos (John y Shaik, 2015)

1.6. GENES RELACIONADOS CON LA DEGRADACIÓN DE CLORPIRIFOS

Son diversos biocatalizadores los responsables de la degradación de plaguicidas organofosforados. Por ejemplo, a partir de cepas silvestres identificadas como *Pseudomonas diminuta* y *Flavobacterium* ATCC 27551 se aisló una hidrolasa de organofosforados, la cual se inmovilizó y utilizó en reactores para la detoxificación de plaguicidas organofosforados. Así mismo, se han inmovilizado las células completas sobre alginato de sodio obteniendo una mayor eficiencia en la remoción respecto a las células cultivadas en medio líquido (Chen y Mulchandani, 1998).

La degradación enzimática de OF ha sido objeto de estudio durante los últimos diez años. La enzima fosfotriesterasa (FTE) aislada de microorganismos del suelo que posee la capacidad de hidrolizar plaguicidas organofosforados ha sido empleada tanto en células nativas como recombinantes, en cultivos en suspensión como inmovilizada en reactores para la detoxificación de residuos de OF. Desafortunadamente la inmovilización de esta enzima por adsorción física o unión covalente ha mostrado una significativa reducción en su actividad y estabilidad debido a su sensibilidad a los cambios de pH y temperatura. Las aplicaciones prácticas para la degradación enzimática a gran escala está limitada por el alto costo de purificación de la enzima (Richins *et al.*, 2000).

La detoxificación de insecticidas organofosforados fueron los primeros en ser demostrados por ingeniería genética. El gen que codifica para la enzima organofosforohidrolasa (OPH), se aisló de *P. diminuta* y *Flavobacterium* ATCC 27551. La expresión del gen OPH en *E. coli* recombinada degradó una variedad de OF y solamente fue posible una alta expresión usando el promotor *lac* de *E. coli* (Chen y Mulchandani, 1998).

El proceso de biodegradación de plaguicidas que ocurre en los organismos es una serie de reacciones complejas que implica tres fases, cada una llevada a cabo por diferentes enzimas. La fase I implica procesos de oxidación, reducción, o hidrólisis, el compuesto se solubiliza en agua y aumenta su biodisponibilidad. La oxigenación en el metabolismo se manifiesta por enzimas oxidativas, incluyendo citocromo P₄₅₀, peroxidasas, y polifenol oxidasas. Durante fase II o conjugación, los plaguicidas o sus metabolitos se conjugan con un azúcar, aminoácido, o glutatión. De esta manera, los productos formados tienen con una mayor solubilidad en agua y una toxicidad reducida en comparación con el compuesto original, además pueden ser almacenados en los orgánulos celulares. El glutatión S-transferasa es la principal enzima responsable de la fase II que cataliza el ataque nucleofílico del átomo de azufre de GSH por el centro electrofílico del sustrato. La última fase consiste en la conversión de los metabolitos de la fase II en conjugados secundarios no tóxicos (Jhon y Shaike, 2015).

Las enzimas que hidrolizan organofosforados se conocen como dialquil aril fosfatasa/hidrolasa de organofosforados/fosfotriesterasa. Algunos microorganismos que degradan a clorpirifos son capaces de producir cualquiera de estas enzimas: hidrolasa de organofosforados (OPH), fosfotriesterasa (FTE) metil paratión hidrolasa (MPH), y la ácido orgánico de fósforo anhidrasa (OPAA). Estas enzimas difieren en su secuencia proteica, su estructura 3D, y su mecanismo catalítico, pero comparten varias características en común. Todas estas enzimas son hidrolasas dependiente de metal, contienen un sitio activo hidrofóbico con tres uniones discretos para dar acomodar a los grupos éster del sustrato (clorpirifos). La activación del centro de fósforo del sustrato se da mediante una interacción directa entre el fosforil oxígeno y un metal divalente en el sitio activo (Bigley y Raushel, 2013).

La hidrolasa de organofosforados microbiana rompe de manera efectiva el P-O en el enlace fosfotriéster, el P-S en fosfodiésteres, P-N o P-F de los organofosforados (Ang *et al.*, 2005). Las dos primeras formas son el caso de clorpirifos y producen los dos metabolitos principales: 3,5,6-tricloro-2-piridinol y dietilfosfato (Singh y Walker, 2006; Singh *et al.*, 2004). Algunos otros metabolitos como el desetil-clorpirifos, clorpirifos-oxon, desetil-clorpirifos-oxon y 3,5,6-tricloro-2-metil pirimidina también se producen durante la degradación en cantidades muy pequeñas. El clorpirifos-oxon, la forma oxidada de clorpirifos, se hidroliza adicionalmente ya sea enzimáticamente o espontáneamente para formar dietilfosfato y 3,5,6-tricloro-2-piridinol. El 3,5,6-tricloro-2-piridinol puede ser aún más degradado a 3,5,6-tricloro-2-metoxi-piridina y dióxido de carbono (Racke, 1993).

En la Figura 1.9 se observa a manera de ilustración que los genes con mayor énfasis en las investigaciones recientes son el *opd* presente en especies de géneros como *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Sphingomonas* y el gen *mph* en *Stenotrophomonas*. Considerando los párrafos anteriores y el análisis filogenético es importante mencionar que el género *Pseudomonas* presenta genes como el *opd*, *mpd* y *pepA* por lo cual puede considerarse muy versátil para su uso en biorremediación. Los géneros *Burkholderia* y *Flavobacterium* toman importancia por la presencia de genes de degradación de OF al igual que algunas cepas de *E. coli*.

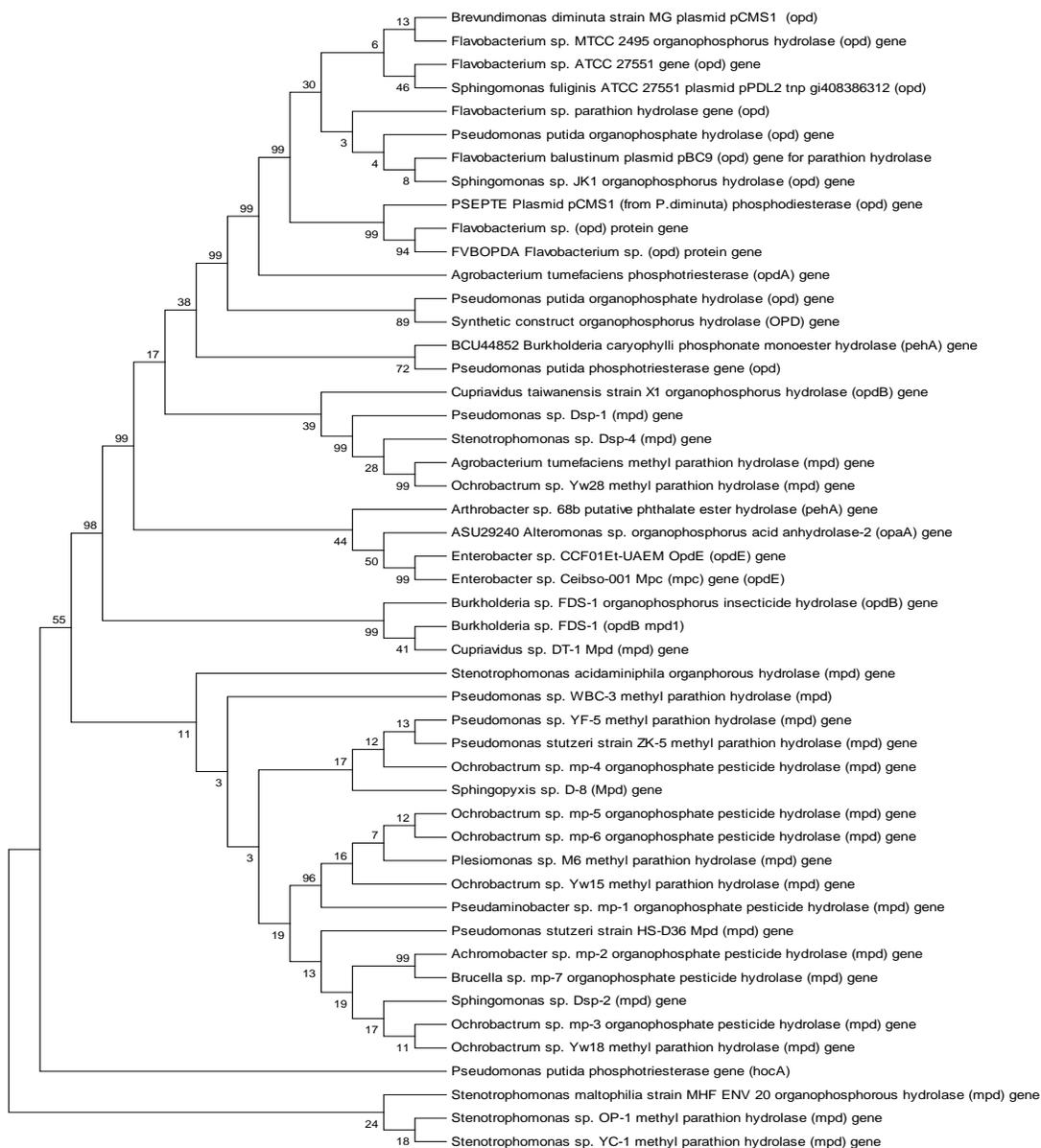


Figura 1.9. Análisis de taxa inferido mediante Máxima Parsimonia. El porcentaje de árboles replica en los cuales se asociaron los taxa en el test bootstrap (500 réplicas) se muestra en las ramas.

Para el caso del clorpirifos, Yang *et al.* (2006) aislaron una cepa de *Stenotrophomonas* con capacidad de degradar CP e incrementaron su capacidad de metabolizarlo al insertar el gen *mpd* de *Plesiomonas* sp.M6. Li *et al.* (2007) también aislaron una *Sphingomonas* sp. Dsp-2 e indicaron que el gen *mpd* es el responsable de la alta degradación de CP (100 mg L⁻¹).

Recientemente, Barman *et al.* (2014) reportan que el gen *ophB*, que codifica para una proteína involucrada en la hidrólisis de CP, se encuentra en una bacteria endofítica *Pseudomonas* sp. BF1-3, también clonaron y expresaron este gen en *E. coli* DH5 α que degradó hasta el 97% de CP (100 mg L⁻¹) en nueve días.

1.7. REFERENCIAS

- Aduanas-México. (2016). Información de la Fracción: 29333904. Fosforotioato O,O-Dietil O-3,5,6-tricloro-2- piridilo (Clorpirifos). Disponible en línea: http://www.aduanas-mexico.com.mx/cgi-bin/ctarnet/ctarnet.exe/creahtml?num_frac=29333904&TF_cca=&jusuario=CLAA
- AgrodiarioHuelva. (2015). Se reducen los límites para poder utilizar el clorpirifos en la producción de frambuesa. Disponible en línea: <http://agrodiariohuelva.es/2015/07/20/se-reducen-los-limites-para-poder-utilizar-el-clorpirifos-en-la-produccion-de-frambuesa/>
- AgroNews (2013) 2012 China's Major Pesticides Varieties Tracking—chlorpyrifos. Disponible en línea: <http://newsagropagescom/News/NewsDetail%e2%80%94948993htm>
- Ali D., Nagpure N.S., Kumar S., Kumar R., Kushwaha B. (2008). Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell electrophoresis. *Chemosphere* 7:1823-31.
- Amer S.M. and Farah O.R. (1983). Cytological effects of pesticides. XII. Effects of the phosphorothioate insecticide dursban on the mitosis of *Vicia faba*. *Cytologia* 48:27-33.
- Ang E.L., Zhao H. and Obbard J.P. (2005). Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. *Enzyme Microb Tech.* 37(5):487-496.
- Anwar S., Liaquat F., Khan Q.M., Khalid Z.M., Iqbal S. (2009). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *J Hazard Mater* 168(1):400-405.
- Barman D.N., Haque M.A., Islam S.M.A., Yun H.D., Kim M.K. (2014). Cloning and expression of *ophB* gene encoding organophosphorus hydrolase from endophytic *Pseudomonas* sp. BF1-3 degrades organophosphorus pesticide chlorpyrifos. *Ecotoxicol Environ Saf.* 108:135-141.
- Barron M. and Woodburn K. (1995). *Ecotoxicology of Chlorpyrifos, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* 144.
- Bernabò I., Gallo L., Sperone E., Triperi S., Brunelli E. (2011). Survival, development, and gonadal differentiation in *Raba dalmatina* chronically exposed to chlorpyrifos. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 315:324-27.
- Bigley A.N. and Raushel F.M. (2013). Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. *Biochim Biophys Acta.* 1834(1):443-453.

- Canesi L., Negri A., Barmo C., Banni M., Gallo G., Viarengo A., Dondero F. (2011). The organophosphate chlorpyrifos interferes with the responses of 17 β -estradiol in the digestive gland of marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. PLoS ONE 6(5):-19803.
- Castillo-Cadena J., González-Mercado A.N., Hernández-Caballero N., Ramírez-San E.J., Álvarez-González I. and Madrigal-Bujaidar E. (2013). Immunotoxic damage in floriculturists exposed to pesticide mixtures. Journal of Environmental Science and Health, Part B: 48, 33-39
- Cedillo L. (1996). Plaguicidas y salud ocupacional. En: La situación ambiental en México. Rivero O. y Rodríguez G., (Edts.). Programa Universitario del Medio Ambiente. 518-521 pp.
- Chai L.K., Mohd-Tahir N., Bruun Hansen H.C.. (2009) Dissipation of acephate, chlorpyrifos, cypermethrin and their metabolites in a humid-tropical vegetable production system. Pest Manag Sci. 65(2):189-196.
- Chamber J. y Levi P. (1992). Organophosphates: Chemistry, fate and effects. Academic Press. USA. 443 pp.
- Chen W. and Mulchandani A. (1998). The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. Trends Biotechnol. 16(2):71-6.
- Comision Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Toxicas (CICOPLAFEST). (2004). Catálogo oficial de plaguicidas. SARH, SEDESOL, SS Y SECOFI. México.
- Comisión Nacional para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). (2012). Disponible en línea: <http://www.cofepris.gob.mx/as/documents/registrosanitariomedicamentos/regplag.pdf>
- Comisión Nacional para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). (2016). Disponible en línea <http://189.254.115.250/Resoluciones/Consultas/ConWebRegPlaguicida.asp>
- Commandeur L. and Parsons J. (1994). Biodegradation of halogenated aromatic compounds. En Ratledge, C. (Ed.). Biochemistry of microbial degradation. Kluwer Academic Publisher. Netherlands. 423-446 pp.
- Cortina-Puig M., Istamboulie G., Marty J-L., Noguier T. (2010). Analysis of pesticide mixtures using intelligent biosensors. INTECH. DOI: 10.5772/7154
- Dimitrov B. and Gadeva P. (1997). Genotoxicity studies on the insecticide dursban in root meristem cells of *Crepis capillaris* L. Environ Exper Bot 37:199-209.
- Dow AgroSciences (2013). Re Organophosphate and Carbamate Reassessment (APP201045) Submission 102675 Appendix A Chlorpyrifos Environmental Protection Authority, Wellington. Disponible en línea: http://www.epa.govt.nz/search-databases/HSNO%20Application%20Register%20Documents/APP201045_Submission%20102675%20Appendix%20A%20Chlorpyrifos.pdf.

- Eddins D., Cerutti D., Williams P., Linney E., Levin E.D. (2009). Developmental chlorpyrifos causes behavioral and neurochemical defects in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 32(2):99-108
- Eder KJ, Clifford MA, Hedrick RP, Kohler H-R, Werner I. (2008). Expression of immune-regulatory genes in juvenile Chinook salmon following exposure to pesticides and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol* 25:508-16.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2003). Código Internacional de Conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Disponible en línea: <http://www.fao.org/docrep/006/Y4544S/y4544s02.htm#bm2.1>
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación -Statistics Division (2016). Pesticides. Disponible en línea: <http://faostat.fao.org/>
- Femia J., Mariani M., Salazar C., Tiscornia I. (2013). Photodegradation of chlorpyrifos in water by UV/H₂O₂ treatment: toxicity evaluation. *Water Sci Technol* 68(10):2279-2286.
- Fest Ch. and Schmidt K. (1983). Organophosphorus insecticides. En: *Chemistry of Pesticides*. Büchel K. (Ed.). Wiley Interscience, USA. 48-110 pp.
- Flaskos J. (2012). The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: a direct role for the oxon metabolites. *Toxicol Lett* 209(1):86-93
- Gebremariam S.Y., Beutel M.W., Yonge D.R., Flury M., Harsh J.B. (2012). Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, pp 123-175. doi:10.1007/978-1-4614-1463-6_3
- Girón-Pérez M.I., Barcelos-García R., Vidal-Chávez Z.G., Romero-Bañuelos C.A., Robledo-Marengo M.L. (2006). Effect of chlorpyrifos on the hematology and phagocytic activity of Nile tilapia cells (*Oreochromis niloticus*). *Toxicol Mech Methods* 16(9):495-9.
- Grube A., Donaldson D., Kiely T., Wu L. (2011). Pesticides industry sales and usage. US EPA, Washington, DC.
- Harford A.J., O-Halloran K., Wright P.F.A. (2005). The effects of in vitro pesticide exposures on the phagocytic function of four native Australian freshwater fish. *Aquatic Toxicol* 75:330-42.
- Hill B.R. (2006). Drift Catcher reveals unacceptable levels of chlorpyrifos in air. *Community action, Pesticide News* 73. Disponible en línea: <http://www.pan-uk.org/pestnews/Issue/pn73/pn73p12.pdf>.
- Hossain M.S., Fakhruddin A.N.M., Chowdhury M.A.Z., Alam M.K. (2013). Degradation of chlorpyrifos, an organophosphorus insecticide in aqueous solution with gamma irradiation and natural sunlight. *J Environ Chem Eng* 1(3):270-274.

- Hua F., Yunlong Y.U., Xiaoqiang C.H.U., Xiuguo W., Xiaoe Y., Jingquan Y.U. (2009). Degradation of chlorpyrifos in laboratory soil and its impact on soil microbial functional diversity. *J Environ Sci* 21(3):380-386.
- Ikehata K., El-Din M.G. (2006). Aqueous pesticide degradation by hydrogen peroxide/ultraviolet irradiation and fenton-type advanced oxidation processes: a review. *J Environ Eng Sci* 5(2):81-135.
- Instituto Nacional de Ecología (INE). (2016). Fichas técnicas de los insecticidas incluidos en el catálogo CICOPLAFEST 2004. Disponible en línea: <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/busquedas.html>
- Ismail M., Khan H.M., Sayed M., Cooper W.J. (2013). Advanced oxidation for the treatment of chlorpyrifos in aqueous solution. *Chemosphere* 93(4):645-651.
- Jeyaratnam L. and Marioni M. (1994). *Toxicology 2ª Edición*. Ediciones Panamericanas. México pp 17, 91.
- John E.M., Rebello S., Jisha M.S. (2014). Chlorpyrifos degradation using bacterial consortium obtained from soil. *Int J Environ Eng-IJEE* 1(4):91-94
- John E.M. and Shaik J.M. (2015). Chlorpyrifos: pollution and remediation, review. *Environ Chem Lett* 13:269-291.
- Johnsen K., Jacobsen C.S., Torsvik V., Sorensen J. (2001). Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils—a review. *Biol Fert Soils* 33(6):443–453.
- Jordan-Bloch C. (2015). After years of ignoring calls to ban dangerous pesticide, EPA begins to act on chlorpyrifos. *Earthjustice*. Disponible en línea: <http://earthjustice.org/news/press/2015/after-years-of-ignoring-calls-to-ban-dangerous-pesticide-epa-begins-to-act-on-chlorpyrifos>
- Junod J., Zagal E., Sandoval M., Venegas A., Campos J., Radrihan R., Barra R. y Vidal G. (2009). Variabilidad asociada a la determinación de residuos de clorpirifos al ser aplicado en un huerto de manzanos. *J. Soil. Sci. Plant Nutr.* 9(3): 176-189
- Kanmoni V.G.G., Daniel S., Raj G.A.G. (2012). Photocatalytic degradation of chlorpyrifos in aqueous suspensions using nanocrystals of ZnO and TiO₂. *React Kinet Mech* 106(2):325-339.
- Kaur P., Grover I.S. (1985). Cytological effects of some organophosphorous pesticides. I. Mitotic effects. *Cytologia* 50:187-97.
- Kralj M.B., Franko M., Treb P. (2007). Photodegradation of organophosphorus insecticides investigations of products and their toxicity using gas chromatography-mass spectrometry and AChE-thermal lens spectrometric bioassay. *Chemosphere* 67(1):99-107.
- Li X., He J., Li S. (2007). Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the mpd gene. *Res Microbiol* 158(2):143-149.

- Lichtinger W. V., Arriaga B. R. E., Bolaños-Cacho R. J. A. (2001). Bases de la política para la prevención de la contaminación del suelo y su remediación. SEMARNAT. México, D.F. pp. 5-65.
- Lu J.L. (2011). Farmers' exposure to pesticides and pesticide residues in soils and crops grown in Benguet Philippines. *Philipp J Crop Sci* 36(3):19-7
- Lu P., Li Q, Liu H., Feng Z., Yan X., Hong Q., Li S. (2013). Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1. *Bioresour Technol* 127:337-342. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.116
- Lyman W.J., Reehl W.F., Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of chemical property estimation methods: environmental behavior of organic compounds. American Chemical Society, Washington, DC.
- Maroto M.E.A. y Rogel J.M.Q. (2002). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Geocisa. División de Protección ambiental de suelos*. 297-305.
- Mills K., Kegley S.E. (2006). Air monitoring for chlorpyrifos in Lindsay, California, June–July 2004 and July–August 2005 Pesticide Action Network, San Francisco.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). (2016). Registro de productos fitosanitarios. Disponible en línea: <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro/productos/forexi.asp?e=0&susActiva=178>
- Munoz-Quezada MT et al (2012) Predictors of exposure to organophosphate pesticides in schoolchildren in the Province of Talca Chile. *Environ Int* 47:28-36.
- Murphy M. W., Sanderson W. T., Birch M. E., Liang F., Sanyang E., Cante M., Cook T. M., and Murphy S. C. (2012). Type and toxicity of pesticides sold for community vector control use in the Gambia. *Epidemiol Res Int*. doi:10.1155/2012/387603
- NFMS, National Marine Fisheries Service Endangered Species. (2008). Act Section 7. Consultation, Biological Opinion, Environmental Protection Agency, Registration of Pesticides Containing Chlorpyrifos, Diazinon, and Malathion. Disponible en línea: http://www.nmfs.noaa.gov/pr/pdfs/pesticide_bioppdf
- Ohashi N., Tsuchiya Y., Sasano H., Hamada A. (1993). Screening on reactivity of organic pesticides with ozone in water and their 288 *Environ Chem Lett* 13:269-291
- Ojha A., Yaduvanshi S.K., Pant S.C., Lomash V., Srivastava N. (2013). Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by three commonly used organophosphate pesticides individually and in mixture, in rat tissues. *Environ Toxicol* 28(10):543-552.

- Oruc E.O. (2010). Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pest Biochem Physiol* 96(3):160-166.
- Palma P., Palma V.L., Fernandes R.M., Soares A., Barbosa I.R. (2008). Acute toxicity of atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, relative to their concentrations in surface waters from the Alentejo region of Portugal. *Bull Environ Contam Toxicol* 81(5):485-489.
- Panuwet P., Prapamontol T., Chantara S., Barr D.B. (2009). Urinary pesticide metabolites in school students from northern Thailand. *Int J Hyg Environ Health* 212(3):288-297.
- Pengphol S., Uthabuttra J., Arquero O-A., Nomura N., Whangchai K. (2012). Oxidative degradation and detoxification of chlorpyrifos by ultrasonic and ozone treatments. *J Agric Sci* 4(8):164.
- Phung D.T., Connell D., Miller G., Chu C. (2012). Probabilistic assessment of chlorpyrifos exposure to rice farmers in Viet Nam. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 22(4):417-423.
- Racke K.D. (1993). Environmental fate of chlorpyrifos. *Rev Environl ContamToxicol* 131:1-150.
- Rauh V.A., Garfinkel R., Perera F.P., Andrews H.F., Hoepner L., Barr D.B., Whitehead R., Tang D., Whyatt R.W. (2006). Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics* 118(6):1845-1859.
- Reiss R., Neal B., Lamb J.C., Juberg D.R. (2012). Acetylcholinesterase inhibition dose-response modeling for chlorpyrifos and chlorpyrifos- oxon. *Regul Toxicol Pharm* 63(1):124
- Richins R.D. Mulchandani A. and Chen W. (2000). Expression, immobilization and enzymatic characterization of cellulase-binding domain-organophosphorus hydrolase fusion enzyme. *Biotech. Bioeng.* 69: 591-596.
- Servicio de Información Toxicológica (SINTOX) (2006). Intoxicaciones por agroquímicos en México reportadas por la Secretaría de Salud. Boletín informativo.
- Singh B. and Walker A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* (30):428-471.
- Singh B.K., Walker A., Morgan J.A.W., Wright D.J. (2003). Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol* 69(9):5198-5206.
- Singh B.K., Walker A., Morgan J.A.W., Wright D.J. (2004). Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Appl Environ Microbiol* 70(8):4855-4863.
- Tang T., Dong J., Ai S., Qiu Y., Han R. (2011). Electro-enzymatic degradation of chlorpyrifos by immobilized hemoglobin. *J HazardMater* 188(1):92-97.

- US-EPA (Environment Protection Agency, USA). (2011). Disponible en línea: <http://www.epa.gov/opp00001/pestsales>.
- Velasco-Trejo J.A. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología pp 61.
- Verma A. and Dixit D. (2012). Photocatalytic degradability of insecticide chlorpyrifos over UV irradiated titanium dioxide in aqueous phase. *Int J Environ Sci* 3(2):743-755.
- Viswanath G., Chatterjee S., Dabral S., Nanguneri S.R., Divya G., Roy P. (2010). Anti-androgenic endocrine disrupting activities of chlorpyrifos and piperophos. *J Steroid Biochem Mol* 120(1):22-29.
- Wang L., Jiao W., Jiang X., Liang Y. (2013). Abiotic control on the dissipation of chlorpyrifos spiked in an udic ferrisol at a lower dosage. *Chem Ecol* 29(8):724-732.
- Wang X., Xing H., Li X., Xu S., Wang X. (2011). Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of IL-1 and IFN- γ 2b in immune organs of common carp. *Fish Shellfish Immunol* 31(1):126-33.
- Watts M. (2012). Chlorpyrifos as a possible global POP Pesticide Action Network North America, Oakland, CA. Disponible en línea: http://www.panna.org/sites/default/files/Chlorpyrifos_as_POP_final.pdf
- Yang C., Liu N., Guo X., Qiao C. (2006). Cloning of mpd gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *FEMS Microbiol Lett* 265(1):118-125.
- Yañez-Ocampo G., Sánchez-Salinas E., Jiménez-Tobón G. A., Penninckx M. and Ortiz-Hernández M. L. (2009). Removal of two organophosphate pesticides by a bacterial consortium immobilized in alginate or tezontle. *J Hazard Mater.* 168 (2-3):1554-61.

CAPÍTULO II. AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON CLORPIRIFOS

RESUMEN

En el ambiente existe una amplia biodiversidad de organismos realizando algún tipo de actividad o participando en algún ciclo biogeoquímico. Los ambientes contaminados con plaguicidas no son la excepción, en ellos podemos encontrar diversos microorganismos capaces de adaptarse ante estas condiciones. En este ensayo se aislaron cepas bacterianas capaces de crecer en suelos de cultivos de crisantemo contaminados con organofosforados. Se utilizó clorpirifos como plaguicida modelo con base en la problemática asociada a este. El aislamiento se realizó considerando medios ricos en nutrientes, mínimos y selectivos. Se determinó la fijación de nitrógeno de las cepas y su identificación molecular. Se seleccionaron cuatro cepas con potencial de biorremediar sitios contaminados. Los resultados de la secuenciación del gen 16SRNAr indican que estas cepas pertenecen a *Pseudomonas putida*, dos a *P. oryzae* y *Serratia grimesii* (códigos de acceso en Genbank KT354287, KT354288, KT354289, KT354290, respectivamente). El mayor crecimiento en 50 mg L⁻¹ de clorpirifos lo presentaron las cepas *Pseudomonas putida* DAMM30 y *Serratia grimesii* DAMM47. El máximo se presentó a las 72 h (9.2x10⁹ UFC mL⁻¹) y 48 (6.7x10⁸ UFC mL⁻¹) h, para la cepa *Serratia grimesii* DAMM47 cultivada con y sin plaguicida, respectivamente. *Serratia grimesii* DAMM47 también mostró la mayor actividad nitrogenasa reduciendo 30.1 nmol h⁻¹ mL⁻¹ de C₂H₄. Es importante encontrar géneros bacterianos con múltiples funciones dentro del suelo. Más aún si estos favorecen su fertilidad fijando nitrógeno a tasas considerables y además de realizar la degradación de compuestos tóxicos.

2.1. OBJETIVO

Caracterizar e identificar cepas bacterianas capaces de crecer en presencia de clorpirifos.

2.2. HIPÓTESIS

Existen cepas con capacidad de tolerar altas concentraciones de plaguicidas favoreciendo su biodegradación.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Aislamiento

El muestreo se realizó en dos diferentes suelos (S_1 y S_2) en la zona de Texcoco, Estado de México. El S_1 fue de invernadero con historial amplio de aplicación de plaguicidas, principalmente organofosforados, para el control de plagas y enfermedades relacionadas con la floricultura. El S_2 tiene además un historial de aplicación de bromuro de metilo. Una vez realizado el muestreo, se hicieron pruebas de crecimiento de los microorganismos en medios sólidos: agar nutritivo, modificado de Rennie (1981) y de sales minerales (MSM, pH 7.00 ± 0.05 ; composición por L: 0.82 g K_2HPO_4 , 0.19 g KH_2PO_4 , 0.20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.00 g KNO_3 y 0.99 g $(NH_4)_2SO_4$. Además se agregaron 2 mL de una solución de micronutrientes: 2.8 g L^{-1} H_3BO_3 , 2.55 g L^{-1} $MnSO_4$, H_2O , 0.20 g L^{-1} $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2.43 g L^{-1} $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ y 0.25 g L^{-1} $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Moreno-Medina, 2014); con y sin extracto de levadura como fuente alterna de carbono. En estos medios de cultivo se incrementó progresivamente la concentración del plaguicida clorpirifos [*O,O*-dietil-*O*-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato] grado técnico desde cero hasta 350 mg L^{-1} .

Después, para incrementar la superficie de contacto se procedió al crecimiento de cepas seleccionadas en medios líquidos, conteniendo 100 mg L^{-1} de clorpirifos (y 200 mg L^{-1} con caldo nutritivo) y 0.5 g L^{-1} de extracto de levadura. Se inocularon 8.0×10^8 UFC mL^{-1} (de acuerdo a escala de McFarland) y se incubó a 28 °C, con agitación orbital por 48 h. Posteriormente se confirmó el crecimiento de estas cuatro cepas incrementando gradualmente la fuente de nitrógeno (0% a 0.08% de KNO_3) y la fuente alterna de carbono (0% a 1.6% de $C_6H_{12}O_6$). Esto se realizó por densidad óptica a 600 nm en microplacas (Biotek, Synergy 2).

Finalmente se inoculó (9.0×10^9 UFC mL⁻¹) cada cepa y se evaluó su crecimiento (por densidad óptica a 600 nm y por conteo de colonias) cada 24 h, hasta las 96 h en MSM con clorpirifos (50 mg L⁻¹) y tomando alternamente muestras para cuantificar la degradación del plaguicida. Las determinaciones de densidad óptica se realizaron en un espectrofotómetro (HP 8553 UV-Vis) con arreglo de diodos.

2.3.2. Fijación de nitrógeno

Se determinó la actividad de la enzima nitrogenasa mediante la prueba de reducción de acetileno (ARA) , para verificar la capacidad de fijar nitrógeno de cada cepa, al crecer en presencia de clorpirifos. Las cepas se cultivaron en medio de Rennie sólido y semisólido sellados herméticamente, una vez transcurridas 48 h de crecimiento, el aire se intercambió por etileno y se incubó 2 h. Posteriormente la determinación del etileno y acetileno (inyección de 0.5 mL) se realizó en un Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 series II, columna poraplot Q (25 m, 0.32 mm), con un detector FID. Las temperaturas del detector, el inyector y del horno fueron 150 °C, 100 °C y 50 °C, respectivamente. Las determinaciones se realizaron en una corrida isotérmica.

Los análisis estadísticos se realizaron en SAS 9.0, con base en un diseño completamente al azar con tres repeticiones y comparación de medias por Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Para el caso de los valores de fijación de nitrógeno se realizó una comparación de medias por LSD de Fisher.

2.3.3. Identificación molecular

Cada cepa seleccionada se cultivó en caldo nutritivo a 28 °C con agitación orbital durante 48 h. Posteriormente se procedió a extraer su ADN (ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ of Zymo Research) y amplificar el gen 16S rRNA. Los primers usados para la reacción de PCR fueron 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT). El programa para la amplificación fue: 1)

desnaturalización a 95 °C por 1 min, 2) 30 ciclos de desnaturalización (95 °C por 60 s), alineamiento (50 °C por 60 s) y extensión (72 °C por 30 s), 3) 5 min de extensión final a 72 °C.

La secuenciación de los fragmentos se desarrolló usando un Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer, la reacción de secuenciación se hizo BigDye Terminator kit (Applied Biosystem 3.0), y se usaron los primers U514 (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG) y 800R (5'-CTACCAGGGTATCTAAT). El análisis filogenético de las cepas seleccionadas se obtuvo usando el software MEGA 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) obteniendo un árbol con máxima parsimonia. Las secuencias obtenidas de las cepas se subieron al banco de genes (GenBank) del National Center of Biotechnology Information (NCBI).

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Aislamiento y selección de cepas

Los plaguicidas afectan el equilibrio y la biodiversidad de los suelos. Algunos organofosforados estimulan el crecimiento de bacterias endémicas del suelo, pero otros disminuyen la concentración de bacterias nitrificantes afectando directamente la fertilidad del suelo (Kalia y Gosal, 2011; Lo, 2010). Por su parte, el clorpirifos (CP) es un plaguicida de amplio espectro usado en la agricultura, y de acuerdo con la RAP-AL (2012) hay suficiente evidencia de que CP es persistente, tiene el potencial para transporte ambiental de largo alcance y causa efectos adversos tanto al ambiente como a la salud humana.

Debido a ello la importancia de contar con la exploración de bacterias degradadoras de este compuesto. Primeramente con los medios sólidos, fuente alterna de carbono y CP (10 mg L⁻¹) se seleccionaron solo 12 cepas del S₁, y 12 del S₂. Posteriormente con 350 mg L⁻¹ de CP, solo se seleccionaron dos cepas del S₁ (DAMM5 y DAMM6), y siete del S₂ por su crecimiento en estas condiciones (Figura 2.1).

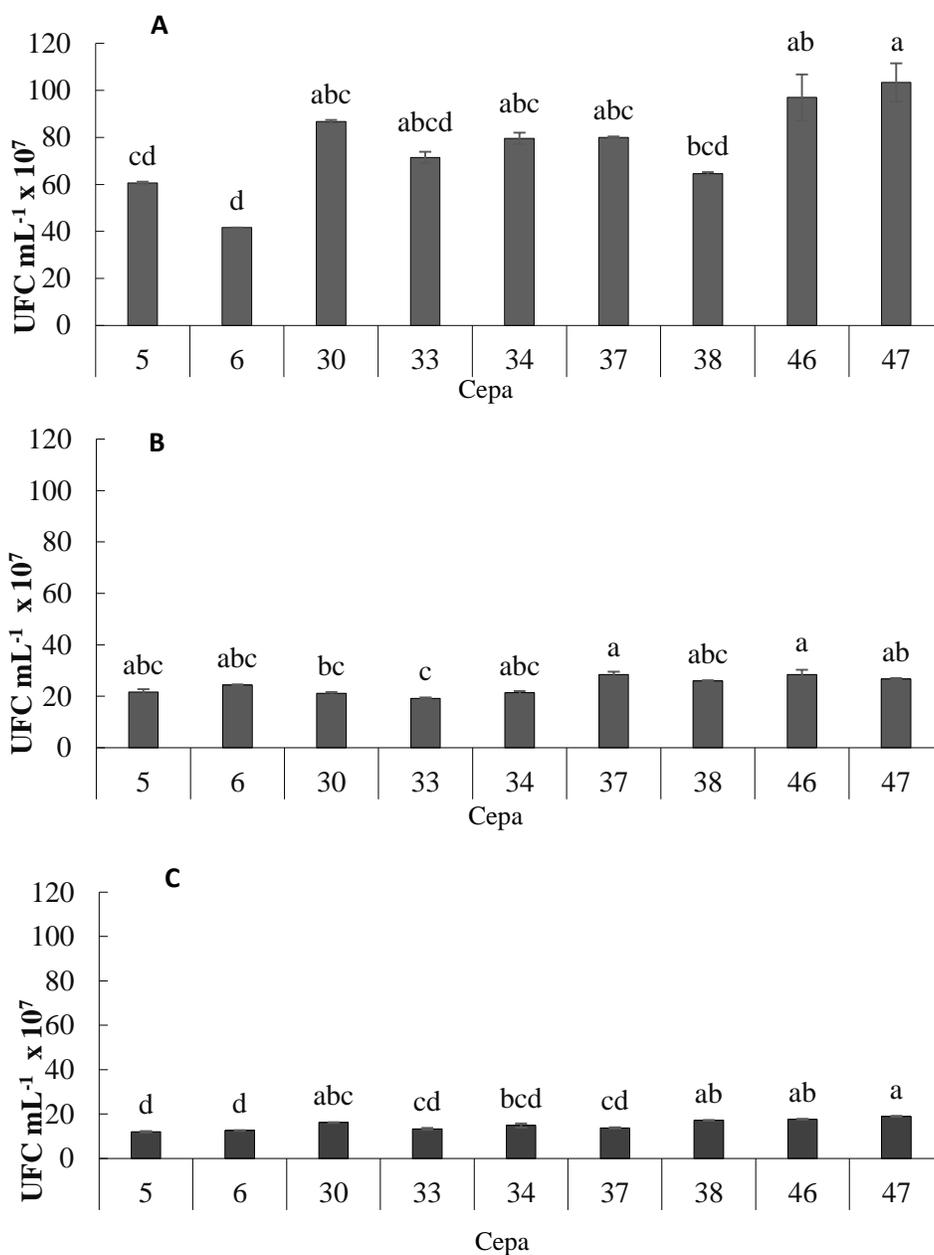


Figura 2.1. Crecimiento bacteriano en presencia de clorpirifos, 100 mg L⁻¹. **A:** en caldo nutritivo, **B:** en medio combinado de carbono, **C:** en medio de sales minerales. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas (P <0.05).

En la Figura 2.1A se muestra el crecimiento de las cepas en un medio rico en nutrientes, se observa que DAMM30, DAMM34, DAMM37, DAMM46 y DAMM47 muestran los mayores valores a pesar de están sometidas a estrés por presencia de CP. Por otro lado, el medio de Rennie (1981) es un medio específico para organismos fijadores de nitrógeno, en

este medio, las cepas DAMM37, DAMM46 y DAMM47 crecieron más que las otras seis cepas (Figura 2.1B). Es posible que estas cepas fijen nitrógeno y sean de vida libre.

También, en la Figura 2.1C se muestra el crecimiento que tuvieron las cepas en un medio mínimo (MSM), y agregando CP y una fuente alterna de carbono como co-sustrato. En este medio las DAMM30, DAMM38, DAMM36 y DAMM47 mostraron el mayor crecimiento. El cuestionamiento del bromuro de metilo, principal fumigante de productos agrícolas a nivel mundial, ha obligado a la búsqueda de alternativas, para evitar la contaminación atmosférica mediante la descomposición química del bromuro de metilo, su reciclaje y el uso de filtros de absorción.

Las cepas con mayor crecimiento fueron las presentes en el S₂, en el cual se aplicó bromuro de metilo. Este compuesto aunque no es tan tóxico para la mayoría de los insectos como algunos otros plaguicidas causa un daño enorme a la capa de ozono. Según De Lucca *et al.* (2006) el bromuro de metilo no tiene efectos residuales prolongados sobre las bacterias del suelo, no así sobre los hongos. Incluso, una vez aplicado promueve el crecimiento bacteriano. Esto indica que propicia la adaptación de microorganismos ante estas condiciones de estrés. Debido a ello, se encontró una mayor diversidad adaptada a estas condiciones en el S₂.

De esta manera, se seleccionaron las cepas DAMM30, DAMM37, DAMM46 y DAMM47 por presentar características deseables para utilizar al CP como fuente de carbono y fijar nitrógeno. Li *et al.* (2008) reportaron siete cepas bacterianas degradadoras de hasta 100 mg L⁻¹ de CP aisladas en MSM, el género *Pseudomonas* fue el que mayor estuvo representado. Cabe resaltar que el muestreo lo realizaron de suelos contaminados con historial de aplicación de CP durante dos años. También, Ning *et al.* (2010) realizaron aislamiento de seis cepas degradadoras de dicloros en un ambiente modificado con 400 mg L⁻¹ de plaguicida. Reportaron por primera vez que los géneros *Acidovorax* y *Chryseobacterium* pueden degradar organofosforados.

Después de la selección de cepas se evaluó el crecimiento de DAMM30, DAMM37, DAMM46 y DAMM47, incrementando gradualmente la fuente de nitrógeno y la fuente de carbono como se muestra en las **Figuras 2.2 a 2.5**. En la **Figura 2.2** se observa el crecimiento de la cepa DAMM30 resaltando que en MSM la fuente de nitrógeno alterna no afecta su crecimiento, inclusive, la glucosa como co-sustrato en este medio mínimo no es relevante en su crecimiento. No obstante, en MCC el nitrógeno agregado al medio es indispensable ya que según Rennie (1981) la disponibilidad de nitrógeno determina un factor de selección para ciertos microorganismos. Así, se observa que el extracto de levadura (MCC+EL) posee compuestos nitrogenados que hacen que no afecte severamente el crecimiento. Por su parte, en incremento en la fuente de carbono no es significativo, a excepción del crecimiento en MCC, ya que a partir de 0.04% se favorece el crecimiento.

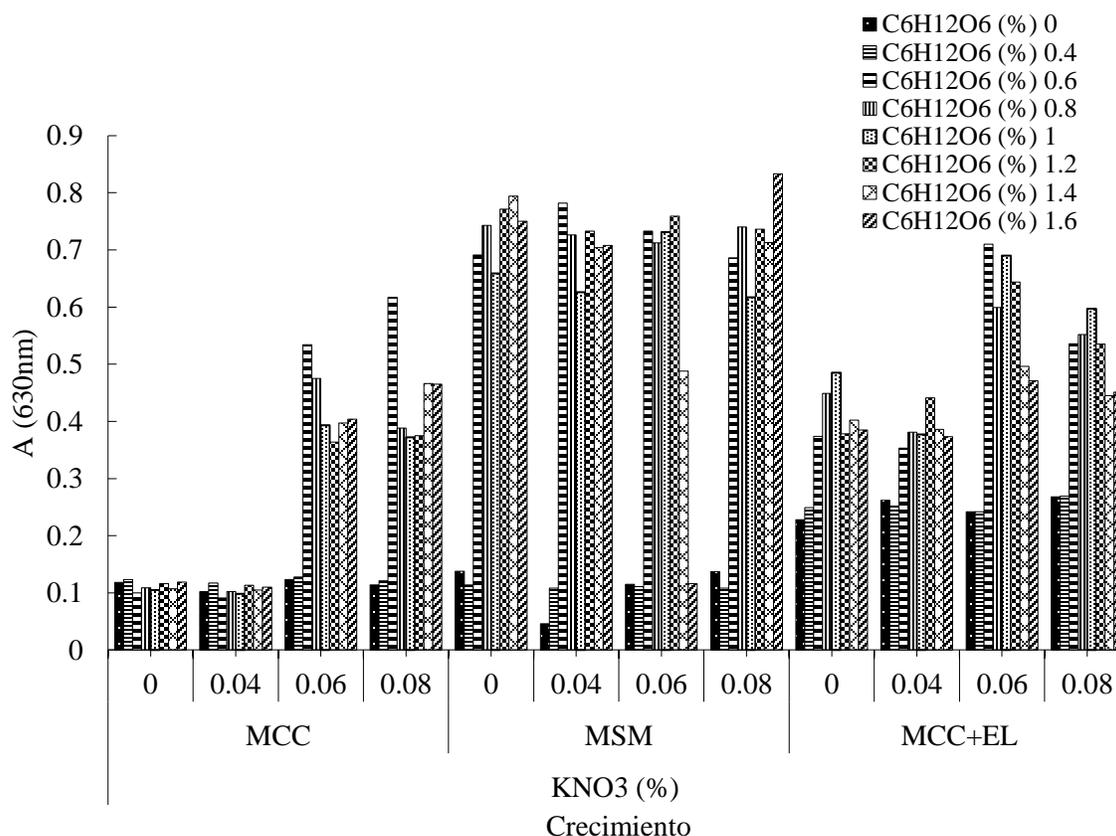


Figura 2.2. Crecimiento de cepa DAMM30 con incremento en fuente de nitrógeno y carbono. MCC: medio modificado de Rennie, MSM: medio de sales minerales, EL: extracto de levadura.

La cepa DAMM37 (Figura 2.3) se comportó diferente a DAMM30, se observa mejor crecimiento en MCC, es posible que pertenezca a un género bacteriano para fijar nitrógeno (ya que crece independientemente si hay o no fuente de nitrógeno en el medio) en la que la fuente de carbono no es importante. A su vez, las cepas DAMM46 y DAMM47 (Figura 2.4 y Figura 2.5) presentan un comportamiento parecido en su aprovechamiento de carbono y nitrógeno en estos medios. Cabe resaltar que el incremento en la fuente de nitrógeno para la cepa DAMM47, aparentemente favorece su crecimiento. De esta manera, se puede inferir que las cepas fijan nitrógeno y además son capaces de crecer en presencia del plaguicida.

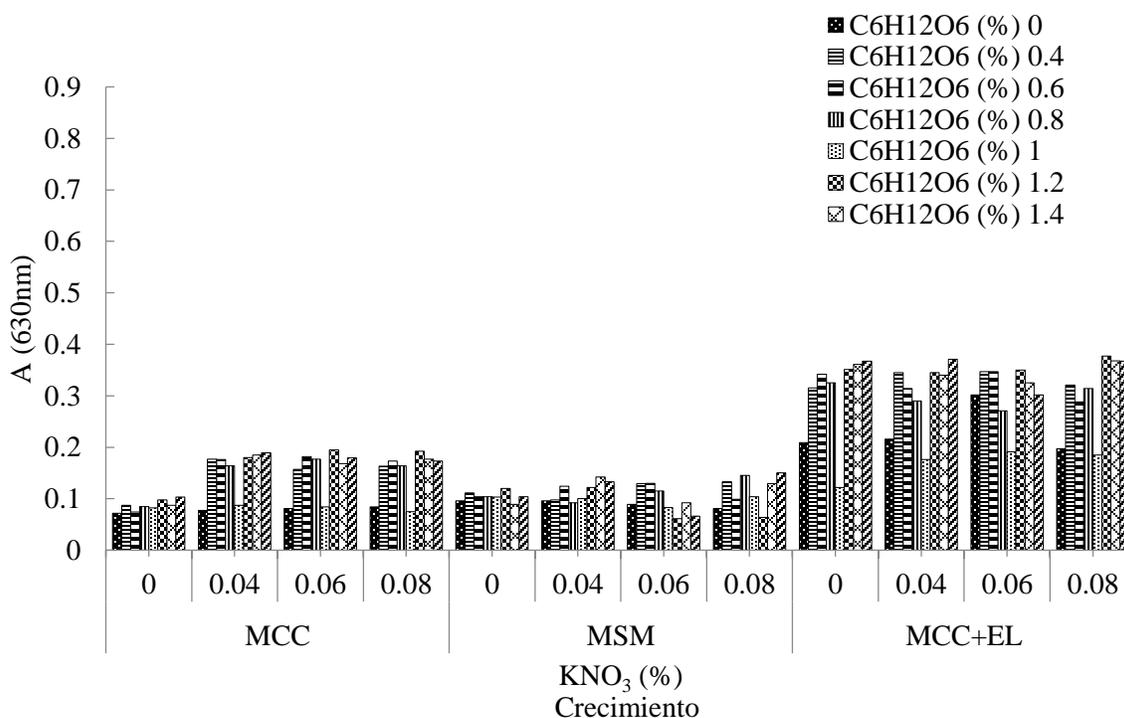


Figura 2.3. Crecimiento de cepa DAMM37 con incremento en fuente de nitrógeno y carbono. MCC: medio modificado de Rennie, MSM: medio de sales minerales, EL: extracto de levadura.

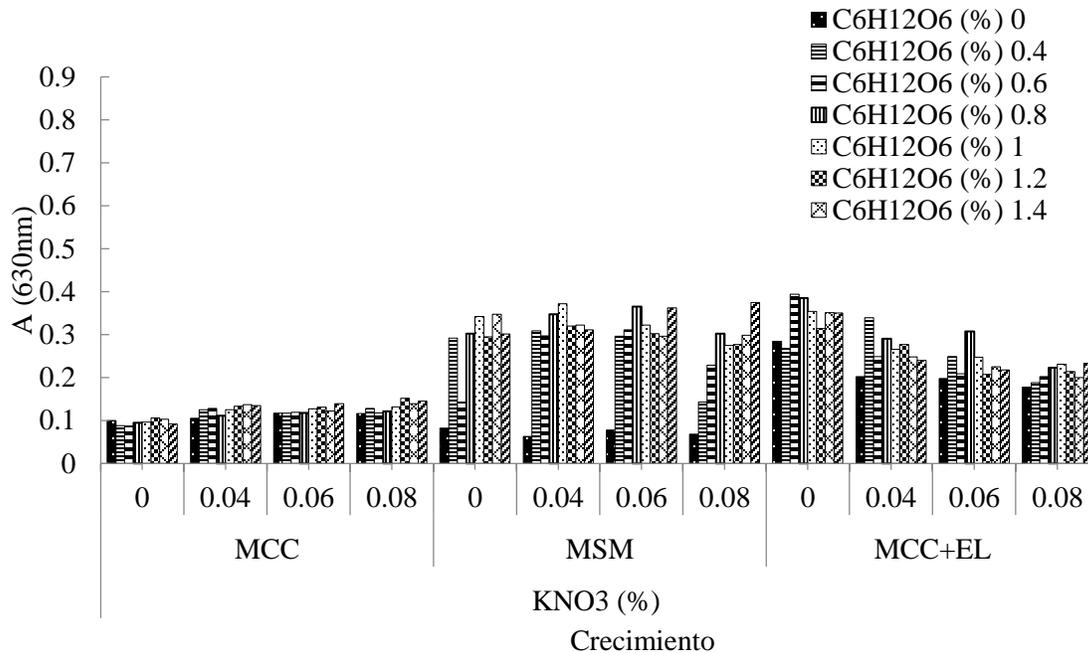


Figura 2.4. Crecimiento de cepa DAMM46 con incremento en fuente de nitrógeno y carbono. MCC: medio modificado de Rennie, MSM: medio de sales minerales, EL: extracto de levadura.

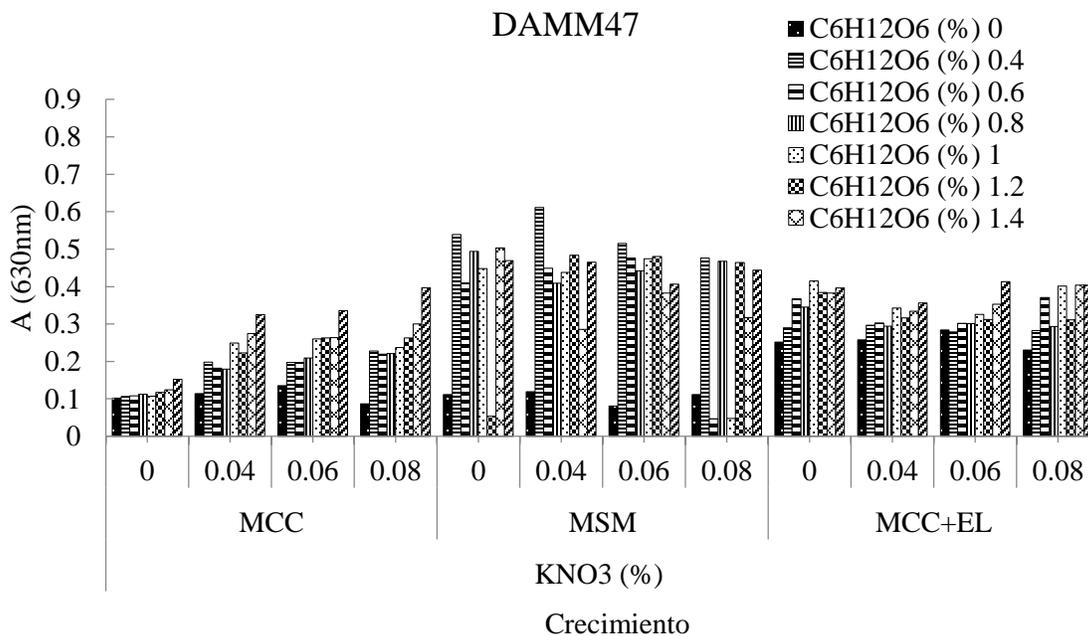


Figura 2.5. Crecimiento de cepa DAMM47 con incremento en fuente de nitrógeno y carbono. MCC: medio modificado de Rennie, MSM: medio de sales minerales, EL: extracto de levadura.

La Figura 2.6 ilustra la cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas. Se observa que DAMM30, con un comportamiento parecido a DAMM47, mostraron el mayor crecimiento que las otras cepas. El crecimiento en presencia del CP fue notorio y significativo, posiblemente debido a que el plaguicida fue aprovechado como fuente de carbono o co-metabolizado. Para esta cepa, el crecimiento máximo se presentó a las 72 horas (9.2×10^9 UFC mL⁻¹) y 48 (6.7×10^8 UFC mL⁻¹) horas, para la cepa cultivada con y sin plaguicida, respectivamente. Ya se han realizado diversos ensayos considerando al plaguicidas como fuente principal de carbono y como co-metabolismo.

El co-metabolismo se refiere a la transformación biológica de un co-sustrato (compuesto que se co-metaboliza por la adición de un sustrato al medio) mientras que el sustrato (compuesto adicionado al medio que permite la inducción de enzimas requeridas para la degradación) sirve como energía primaria como fuente de carbono (García-Rivero y Peralta-Pérez, 2008). En los ensayos realizados en este trabajo se utilizó extracto de levadura como un co-sustrato, aunque hay otros estudios que mencionan otros co-sustratos como la glucosa, el succinato, el salicilato, la peptona, inclusive algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos de bajo peso molecular (Zhong *et al.*, 2010).

Por ejemplo, especies de los géneros *Bacillus* y *Flavobacterium* utilizan este compuesto como co-metabolismo, pero *B. cereus*, *B. licheniformis*, *Klebsiella* sp., *Paracoccus* sp., *Pseudomonas nitroreducens*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *Serratia* sp. y *Sphingomonas* sp. lo hacen como parte de su catabolismo. Incluso, algunas otras especies como *Alcaligenes faecalis* y *Enterobacter* sp. realizan catabolismo de P además del C (Chishti *et al.*, 2013). La diferencia es la concentración del plaguicida y la matriz en donde se desarrolle el ensayo de aislamiento y degradación. Así también, en suelo se ha encontrado degradación de hasta 98% de CP (30 mg L^{-1}) en 10 días (Li *et al.*, 2007).

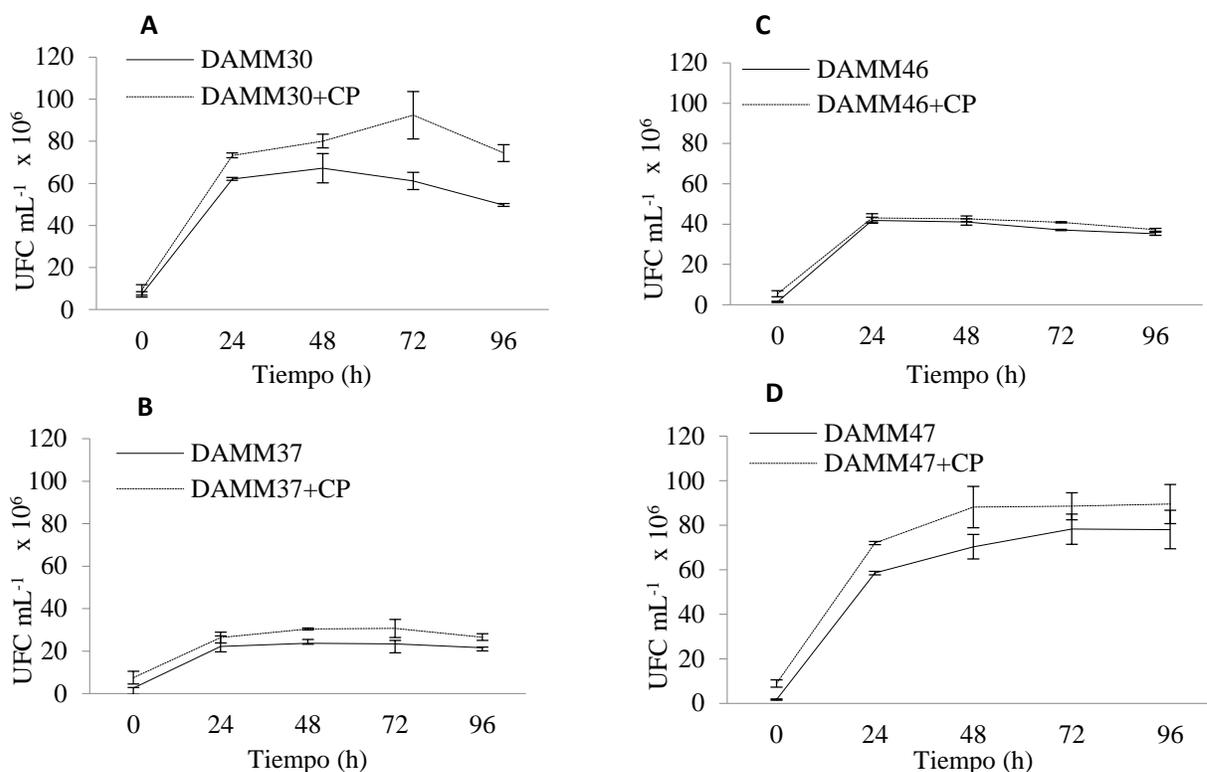


Figura 2.6. Cinética de crecimiento en medio de sales minerales con 50 mg L⁻¹ de clorpirifos (CP). A: *Pseudomonas putida* DAMM30. B: *P. oryzae* DAMM37. C: *P. oryzae* DAMM46. D: *Serratia grimesii* DAMM47.

2.4.2. Fijación de nitrógeno

Las bacterias diazotróficas de vida libre son aquellas que pueden fijar nitrógeno atmosférico sin necesidad de formar simbiosis con plantas, ya que estas poseen diferentes estrategias para proteger el complejo de la enzima nitrogenasa. El Cuadro 2.1 ilustra indirectamente la actividad de la enzima nitrogenasa presente en cada cepa, el ensayo de reducción de acetileno es sumamente útil para la selección de bacterias diazótrofes. Carcaño-Montiel *et al.* (2006) reportan valores de actividad nitrogenasa de hasta 70 nmol h⁻¹ mL⁻¹ para *Azospirillum* spp. AMRz1 aislada de rizosfera de plantas de teocintle raza Chalco. También mencionan que cepas de *Klebsiella* spp. la actividad nitrogenasa mostró valores desde 42 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹ (cepa KMRz2d) hasta 122.46 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹ (cepa KMR11-3).

La distribución de microorganismos fijadores de nitrógeno, aunque no está completamente dictada por la disponibilidad de nitrógeno en el ambiente, es aleatoria y puede predecirse con base en las características del hábitat (Zehr *et al.*, 2003). Nuncio-Orta *et al.* (2015) reportan 8.9 y 4.5 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹ para cepas de *Azospirillum* sp. AzTT2 y Az TN7. La cepa de *Acetobacter* sp. AceGN2 aislada de raíz de nopal presento 3.8 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹ estos valores son bajos comparados con los anteriores.

Los resultados obtenidos con las cepas aisladas de este ensayo indican que DAMM47 es la que mayor concentración de acetileno logró reducir, un valor de 30 nmol C₂H₄ h⁻¹ mL⁻¹. Este valor no está alejado del valor obtenido por fijadoras de nitrógeno y muestra una fijación de nitrógeno representativa por parte de estas cepas aisladas de suelos contaminados con plaguicidas. La diferencia en la actividad nitrogenasa de rizobacterias se puede deber a que la enzima varia su función en organismos simbioses dependiendo de la especie vegetal donde se encuentra y de la composición de la cepa (Orozco y Martínez, 2009). Eckert *et al.* (2001) mencionan que la cantidad de nitrógeno fijado depende probablemente del genotipo asociado con la bacteria.

En la filósfera, se ha reportado que las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre son las pigmentadas, como por ejemplo, *Methylobacterium mesophilicum* y *Pseudomonas syringae*, a las cuales se les ha atribuido una mejor adaptación a los rayos solares (Hirano y Upper, 2000). Dentro de las relaciones favorables en la rizósfera se encuentra la asociación con especies de *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Burkholderia* (Estrada *et al.*, 2001). También se ha encontrado que las bacterias fijadoras de nitrógeno incrementan la capacidad radical de absorción de nitrato, indirectamente como una consecuencia de la estimulación del desarrollo radical y directamente por estimulación del sistema transportador del compuesto.

Este hecho no se puede pasar por alto cuando los microorganismos están presentes en el suelo con algún contaminante orgánico. De modo que idealmente se podría inferir que las cepas aisladas pueden fijar nitrógeno a una tasa considerable para que otras especies de la

cadena trófica puedan aprovecharlo. Pero, también de manera sinérgica expresar genes específicos para poder metabolizar al clorpirifos.

Cuadro 2.1. Actividad nitrogenasa (reducción de acetileno) en cepas bacterianas seleccionadas creciendo en medio Rennie.

Medio de crecimiento	Cepa	Concentración de C ₂ H ₄ (nmol h ⁻¹ mL ⁻¹)
Rennie semisólido	<i>Pseudomonas putida</i> DAMM30	15.5 a
	<i>P. oryzihabitans</i> DAMM37	23.9 abc
	<i>P. oryzihabitans</i> DAMM46	28.3 bc
	<i>Serratia grimesii</i> DAMM47	30.1 c
Rennie líquido	<i>Pseudomonas putida</i> DAMM30	15.1 a
	<i>P. oryzihabitans</i> DAMM37	16.8 a
	<i>P. oryzihabitans</i> DAMM46	18.2 ab
	<i>Serratia grimesii</i> DAMM47	24.8 abc

* Diferentes letras en las columnas indican diferencia significativa (P <0.05).

2.4.3. Identificación molecular

Los datos de la secuenciación del gen 16S RNAr muestran que la cepa DAMM30 pertenece a *Pseudomonas putida*, mientras que DAMM37 y DAMM46 a *Pseudomonas oryzihabitans* y DAMM47 a *Serratia grimesii*. Las secuencias de nucleótidos se encuentran en la base de datos del GenBank con los códigos de acceso: KT354287, KT354288, KT354289, KT354290, respectivamente (anexos 1-4). En la Figura 2.7 se observan estas especies agrupadas en un árbol filogenético.

Algunas especies de estos géneros han demostrado tener capacidad de degradar este compuesto. Por ejemplo, Lakshmi *et al.* (2008) indican que *Pseudomonas aeruginosa* degrada hasta el 87% de CP en su metabolito principal 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) tan solo en 20 días en medio líquido. Por su parte, Yadav *et al.* (2014) reportaron que *Pseudomonas* sp. puede degradar hasta el 91% de CP (300 mg L⁻¹ d⁻¹) en un biorreactor, no obstante, los metabolitos afectan la eficiencia del equipo.

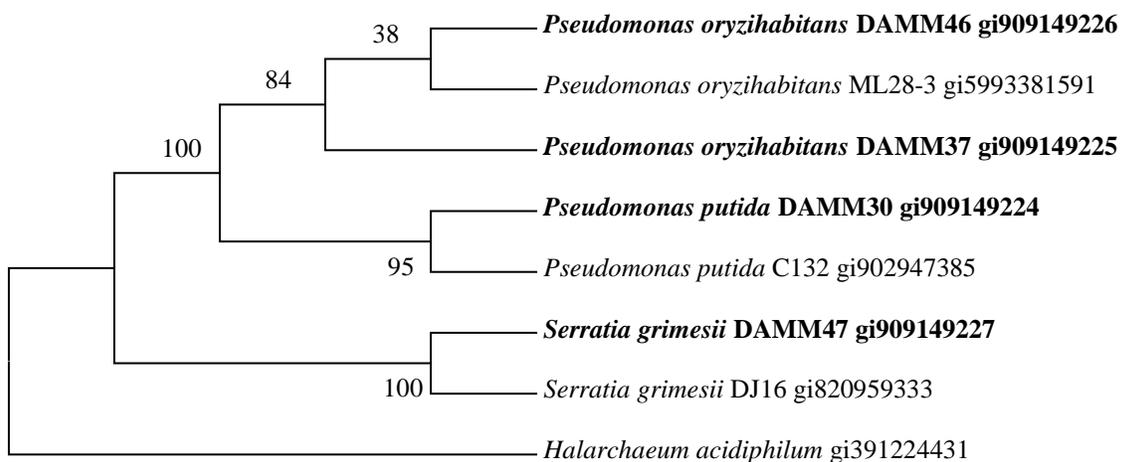


Figura 2.7. Análisis de taxa inferido usando máxima parsimonia. El análisis involucró 8 secuencias de nucleótidos, 788 posiciones.

De igual manera, *Serratia* sp. se ha considerado como degradadora de CP. Cycon *et al.* (2013) hacen mención de un 58.9% de degradación durante 14 días en MSM (y CP como única fuente de carbono), en suelo arenoso un 45.3% (en 42 días), en suelo franco arenoso 61.4% y 68.9% en suelo limoso. Indicando que la atenuación de CP con *Serratia marcescens* es lenta y está dada en función del tipo de suelo y otros factores, pero sí alcanza efectividad considerable si se combina con otras bacterias u hongos nativos del suelo. Ejemplo de ello es lo reportado por Xu *et al.* (2007), quienes consiguieron una mineralización completa de CP (50 mg L⁻¹) en co-cultivo con *Serratia* sp. y *Trichosporon* sp. en solo 18 h.

2.5. CONCLUSIONES

Considerando que la biorremediación es una tecnología eficaz en donde el potencial metabólico microbiano se puede aprovechar para su aplicación *in-situ* y *ex-situ*, las cepas aisladas presentaron características deseables para ser usadas como estrategias de detoxificación de suelos contaminados con clorpirifos. Hay muchos estudios que muestran la degradación completa de clorpirifos en cultivos líquidos y en suelo, dentro de ellos se incluyen algunas especies de los géneros encontrados con la identificación molecular.

Es posible que las especies encontradas contengan genes que codifican para proteínas degradadoras, lo cual es una opción viable para lograr la degradación completa de clorpirifos. De manera que la inducción de la expresión de genes deseados en microorganismos endémicos también puede aumentar el uso potencial de biorremediación en desintoxicar ambientes contaminados. Finalmente, es de gran importancia encontrar géneros bacterianos con múltiples funciones dentro del micro ecosistema que es el suelo. Más aún si estos favorecen su fertilidad fijando nitrógeno a tasas considerables, además de realizar la degradación de compuestos tóxicos.

2.6. REFERENCIAS

- Carcaño-Montiel M.G., Ferrera-Cerrato R., Pérez-Moreno J., Molina-Galán J.D. and Bashan Y. (2006). Nitrogenase Activity, Production of Phytohormones, Siderophores and Antibiosis in Strains of *Azospirillum* and *Klebsiella* Isolated from Maize and Teosintle. *Terra Latinoamericana* 24: 493-502.
- Cycon M., Zmijowska A., Wójcik M., Piotrowska-Seget Z. (2013). Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils. *J Environ Manage* 117: 7-16.
- De Luca L., Sarandon S., Gliessman S. (2006). Estimulación de microorganismos del suelo: una alternativa agroecológica a la esterilización con bromuro de metilo para el control de *Fusarium* en tomate. *Rev. Bras. de Agroecologia*.1(1): 21-24.
- Eckert B, Weber OB, Kirchof T, Halbritter A, Stoffels M, Hartmann A (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 17-26.
- Chishti Z., Hussain S., Arshad K.R., Khalid A., Arshad M. (2013). Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. *J Environ Manage* 114: 372-380.
- Estrada P., Bustillos R., Caballero J. (2001). *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol* 67 (6):2790-2798.
- García-Rivero M. and Peralta-Pérez M.R. (2008). Cometabolism in the biodegradation of hydrocarbons. *RMIQ* 7 (1): 1-12.
- Hirano S.S. and Upper C.D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen ice Nucleus and epiphyte. *Microbiol Mo Biol Rev* 64 (3): 624-653.

- Kalia A. and Gosal S.K. (2011). Effect of pesticide application on soil microorganisms. *Arch Agron Soil Sci* 57 (6): 569-596.
- Lakshmi C.V., Kumar M., Khanna S. (2008). Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. *Int Biodeter Biodegr* 62: 204-209.
- Li X., He J., Li S. (2007). Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the *mpd* gene. *Res Microbiol* 158: 143-149.
- Li X., Jiang J., Gu L., Ali S.W., He J., Li S. (2008). Diversity of chlorpyrifos-degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated samples. *Int Biodeter Biodegr* 62: 331-335.
- Lo C-C. (2010). Effect of pesticides on soil microbial community. *J Environ Sci Heal B* 45 (5): 348-359.
- Moreno-Medina D.A., Sánchez-Salinas E., Ortíz-Hernández M.L. (2014). Removal of methyl parathion and coumaphos pesticides by a bacterial consortium immobilized in *Luffa cylindrical*. *RICA* 30: 51-63.
- Ning J., Bai Z., Gang G., Jiang D., Hu Q., He J., Zhang H. and Zhuang G. (2010). Functional assembly of bacterial communities with activity for the biodegradation of an organophosphorus pesticide in the rape phyllosphere. *FEMS Microbiol Lett* 306: 135-143.
- Nuncio-Orta G., Mendoza-Villarreal R., Robledo-Torres V., Vázquez-Badillo M., y Almaraz-Suárez J.J.(2015). Influencia de Rizobacterias en la Germinación y Vigor de Semillas de Chile jalapeño (*Capsicum annuum* L. var. Grande). *Información Técnica Económica Agraria* (en prensa), 111 (1): 1-16.
- Orozco-Jaramillo C, Martínez-Nieto P (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *BOSQUE* (Valdivia) 30: 70-77.
- Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas-América Latina (RAP-AL) (2012). Clorpirifos: un posible COP a nivel mundial. Disponible en línea: http://www.rap-al.org/articulos_files/Clorpirifos_Rev_.pdf.
- Rennie R.J. (1981). A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can J Microbiol* 27: 8-14.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
- Xu G.M., Li Y.Y., Zheng W., Peng X., Li W., Yan Y.C. (2007). Mineralization of chlorpyrifos by co-culture of *Serratia* and *Trichosporon* sp. *Biotechnol Lett* 29: 1469-1473.

- Yadav M., Srivastva N., Singh R.S., Upadhyay S.N., Dubey S.K. (2014). Biodegradation of chlorpyrifos by *Pseudomonas* sp. in a continuous packed bed bioreactor. *Bioresour Technol* 165: 265-269.
- Zehr J. P., Jenkins B. D., Short S. M. and Steward G. F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: across-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5: 539-554.
- Zhong Y., Zou S., Lin L., Luan T.G., Qiu R., Tam N.F.Y. (2010). Effects of pyrene and fluoranthene on the degradation characteristics of phenanthrene in the cometabolism process by *Sphingomonas* sp. Strain PheB4 isolated from mangrove sediments. *Mar Pollut Bull* 60: 2043-2049.

CAPÍTULO III. REMOCIÓN DE CLORPIRIFOS POR CEPAS BACTERIANAS

RESUMEN

La eliminación de compuestos contaminantes puede realizarse a través de diferentes métodos, físicos, químicos y biológicos. Este último presenta ventajas sobre los anteriores. El tratamiento biológico incluye microorganismos con capacidad metabólica para remover el contaminante disminuyendo su toxicidad en el medio mediante su hidrólisis o mineralización completa. En este ensayo se evaluó la capacidad de remoción de clorpirifos tipo Batch con células aisladas de suelos contaminados con plaguicidas. Las determinaciones se realizaron con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los resultados indican que *P. putida* DAMM30 y *P. oryzihabitans* DAMM37 removieron cerca del 70% de clorpirifos, la cepa *P. oryzihabitans* DAMM46 removió 42% del plaguicida. *S. grimesii* DAMM47 tuvo el mas bajo porcentaje de remoción (23.3%). Estas remociones representan una alta actividad metabolica sobre clorpirifos, la cual tiene potencial para usarse en biorremediacion.

3.1. OBJETIVO

Evaluar la capacidad de remoción de clorpirifos por bacterias aisladas.

3.2. HIPÓTESIS

Los microorganismos aislados de suelos contaminados con plaguicidas pueden metabolizar el clorpirifos disminuyendo su toxicidad en el suelo.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Ensayo de remoción de clorpirifos.

Para determinar la remoción de clorpirifos por las cepas aisladas se realizó un experimento tipo Batch, por duplicado. Matraces Erlenmeyer con 50 mL de medio de sales minerales, con una concentración inicial de 50 mg L⁻¹ de CP fueron inoculados con 1x10⁹ UFC mL⁻¹ para cada cepa seleccionada. La curva de crecimiento se realizó mediante determinaciones en espectrofotómetro a 600 nm. Se colectaron muestras cada 24 h para extraer el plaguicida. Para lograr la concentración inicial del plaguicida, primeramente se disolvió en metanol para obtener una solución stock. Se realizó el cálculo teórico del volumen a agregar. El metanol fue evaporado y posteriormente fueron adicionados los diferentes medios de cultivo y el inóculo.

3.3.2. Extracción y cuantificación de clorpirifos

Para cuantificar la concentración de plaguicida remanente, se colectó 1 mL de muestra de cada matraz y se depositó en tubos de vidrio. Se adicionó 1 mL de diclorometano como agente extractor y la mezcla se homogenizó en vórtex durante 3 min, después de lo cual se dejó reposar por 2 min. La fase orgánica se recuperó por medio de una pipeta Pasteur y se filtró a través de embudos de vidrio empacados con fibra de vidrio (Whatman GF/B) y sulfato de sodio anhidro. El extracto se colectó en viales de color ámbar y el procedimiento se repitió tres veces agregando 1 mL de diclorometano cada vez y mezclando la fase orgánica así recuperada. Finalmente, el contenido de los viales se llevó a sequedad; estas muestras se reconstituyeron en 1 mL de metanol grado HPLC (modificado por Moreno-Medina *et al.*, 2012).

La concentración de clorpirifos en las muestras extraídas se determinó por cromatografía de gases (Agilent Technologies 6890N, Net Work GC System, columna DB-5, 5% fenilmetilpolisiloxano, 60 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm espesor de película). La temperatura del horno fue 80 °C, se elevó hasta 280 °C, 20 °C min⁻¹ durante 5

min. Se usó Helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL min⁻¹. La temperatura del inyector fue 250 °C. Se inyectó 1 µL de muestra (splitless). Una vez obtenidos los cromatogramas, se realizó la identificación de clorpirifos usando un espectrómetro de masas (Agilent Technologies 5975 inert XL). La identificación de clorpirifos se realizó por comparación con el tiempo de retención y el espectro de masas del estándar (Chlorpyrifos, Fluka 45395) y con una base de datos (Agilent ChemStation-NIST Mass Spectral Search Program, version 2.0d). Para la cuantificación del CP el espectrómetro de masas se operó en modo SIM.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 3.1** muestra que *P. putida* DAMM30 y *P. oryzihabitans* DAMM37 removieron cerca del 70% de CP. Esta remoción se observó a las 96 h, reduciéndose el CP hasta 15 mg L⁻¹. Además, la cepa *P. oryzihabitans* DAMM46 removió 42% de CP. Esta degradación muestra una fase estacionaria a las 24 h y es mas lenta que que las demás cepas. *S. grimesii* DAMM47 tuvo el mas bajo porcentaje de remoción (23.28%).

La **Figura 3.2** es un ejemplo de cromatograma obtenido, muestra una disminución del CP a las 72h como resultado de la remoción por la cepa *P. putida* DAMM30 (los demás cromatogramas se muestran en anexos 5-7). Sin embargo, es necesario enfatizar que *Serratia grimesii* no es considerada como microorganismo degradador de CP, pero si de otros organofosforados. La actividad fotodegradativa se controló durante los experimentos de remoción, no obstante, la adsorción pudo haber tenido una influencia mínima.

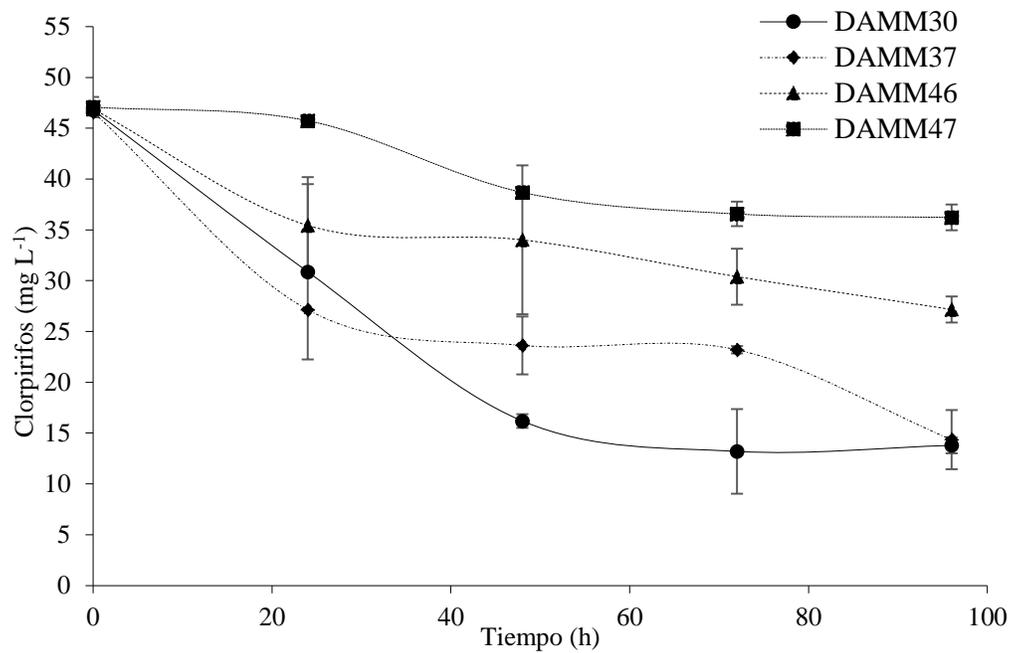


Figura 3.1. Cinética de degradación de clorpirifos por cepas aisladas *Pseudomonas putida* DAMM30, *P. oryzihabitans* DAMM37, *P. oryzihabitans* DAMM46 y *Serratia grimesii* DAMM47.

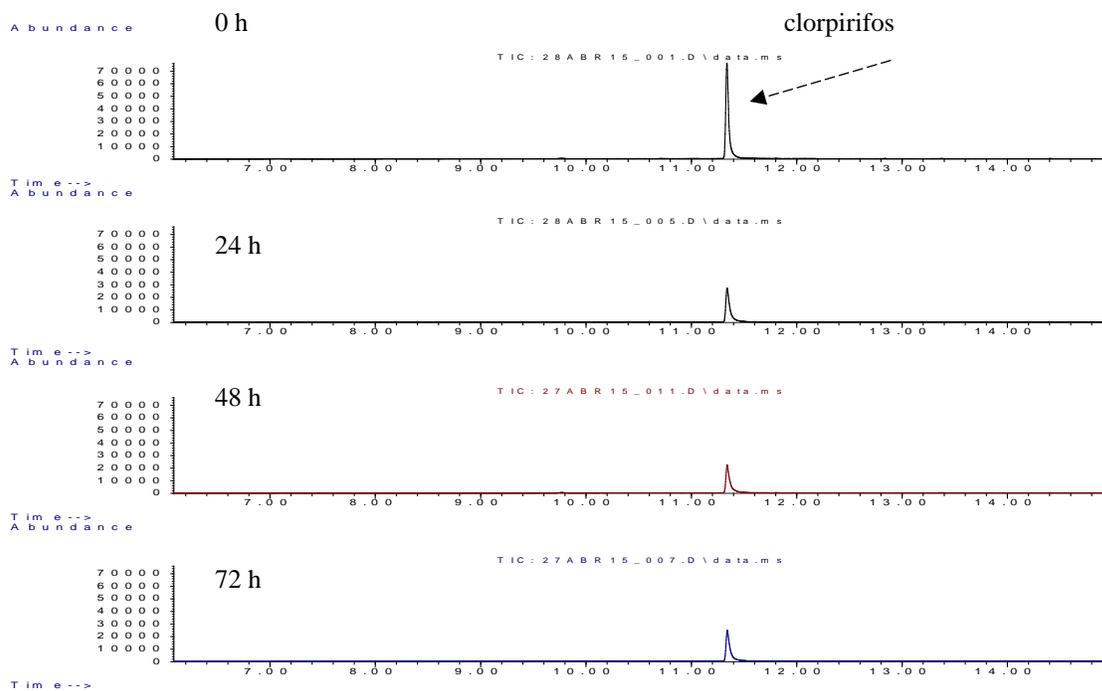


Figura 3.2. Cromatograma de degradación de clorpirifos por *P. putida* DAMM30.

Serratia sp. ha sido considerada para degradar CP. Cycon *et al.* (2013) hacen mención de una degradación del 58.9% en 14 días en medio de sales minerales (CP como única fuente de carbono), en suelos arenosos 45.3% (en 42 días), en franco arenosos 61.4% y en francos 68.9%. Indicando que la atenuación del CP por *Serratia marcescens* es lento y está en función de la textura del suelo y otros factores, pero su eficiencia se incrementa cuando se combina con el efecto de otras bacterias u hongos presentes en el suelo. Un ejemplo lo reportaron Xu *et al.* (2007), observaron una degradación completa de CP (50 mg L⁻¹) en un co-cultivo de *Serratia* sp. con *Trichosporon* sp., en solo 18 h. Para la degradación de plaguicidas es importante la concentración inicial y la matriz de aislamiento. Li *et al.* (2007) reportaron 98% de degradación de CP (30 mg L⁻¹) en 10 días en suelo.

En este estudio *Serratia grimesii* DAMM47 (cuya tasa de fijación de nitrógeno fue mayor que las demás cepas) mostró capacidad para degradar 23% de CP en 4 días. Este porcentaje de remoción es alto comparado con lo mencionado por Cycon *et al.* (2013). Es posible que tenga proteínas catalíticas para degradar al CP de manera metabólica o co-metabólica. Además, en esta especie, no hay reportes de otros trabajos en los que se haya comprobado la presencia de genes responsables de alguna actividad metabólica relacionada con la degradación de organofosforados.

En este ensayo se usó el extracto de levadura, sin embargo en otros estudios se ha reportado que la glucosa, succinato, salicilato y peptona se utilizan como co-sustratos, lo mismo que algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos de bajo peso molecular (Zhong *et al.*, 2010). Algunas especies como *Alcaligenes faecalis* y *Enterobacter* sp. realizan catabolismo de P además de catabolismo de C (Yang *et al.*, 2005, Singh *et al.*, 2004). Estas diferencias dependen de cada organismo, de su estrategia metabólica o co-metabólica.

Por ejemplo, especies del género *Bacillus* (Anwar *et al.*, 2009) y *Flavobacterium* (Mallick *et al.*, 1999) usan al CP como co-sustrato, pero *Bacillus cereus* (Liu *et al.*, 2012), *B. licheniformis* (Zhu *et al.*, 2010), *Klebsiella* sp. (Ghanem *et al.*, 2007), *Paracoccus* sp. (Xu *et al.*, 2008), *Pseudomonas nitroreducens* PS-2 (Korade y Fulekar, 2009), *P. aeruginosa* (Lakshmi *et al.*, 2008), *P. stutzeri* BCP5 (Awad *et al.*, 2011), *Serratia* sp. (Xu *et al.*, 2007),

Stenotrophomonas sp. (Yang *et al.*, 2006) y *Sphingomonas* sp. (Li *et al.*, 2007) lo usan como fuente principal de carbono. Jhon y Shaik (2015) mencionan otras especies capaces de degradar CP.

Yang *et al.* (2006) aislaron una cepa de *Stenotrophomonas* capaz de degradar CP e incrementaron esta actividad mediante clonación del gen *mpd* de *Plesiomonas* sp. M6. Li *et al.* (2007) aislaron *Sphingomonas* sp. DSP2 e indican que el gen *mpd* es responsable de la alta degradación de CP (100 mg L⁻¹). Barman *et al.* (2014) reportan que el gen *ophB* codifica para una proteína (proveniente de *Pseudomonas* sp. BF1-3 endofítica) que es involucrada en la hidrólisis de CP. Estos autores clonaron y expresaron el gen *ophB* en *E. coli* DH5α la cual degradó 97% de CP (100 mg L⁻¹) en nueve días.

3.5. CONCLUSIONES

Las cepas *P. putida* DAMM30 y *P. oryzihabitans* DAMM37 lograron remover hasta 70% de clorpirifos, esto indica su uso factible como microorganismos remediadores de suelos contaminados con este plaguicida. Tanto el metabolismo como el co-metabolismo bacteriano juegan un papel importante en la eliminación del clorpirifos. Es importante explorar el suelo como un nicho potencial de microorganismos con genes implicados en la degradación de los compuestos orgánicos contaminantes, para su posterior uso en la tecnología de biorremediación de plaguicidas.

3.6. REFERENCIAS

- Anwar S., Liaquat F., Khan Q.M., Khalid Z.M., Iqbal S. (2009). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1.J Hazard Mater 168(1):400-405.
- Awad N.S., Sabit H.H., Abo-Aba S.E.M., Bayoumi R.A. (2011). Isolation, characterization and fingerprinting of some chlorpyrifos-degrading bacterial strains isolated from Egyptian pesticides-polluted soils. Afr J Microbiol Res 5: 2855-2862.

- Barman D.N., Haque M.A., AsrafulIslam S.M., Yun H.D. and Kim M.K. (2014). Cloning and expression of *ophB* gene encoding organophosphorus hydrolase from endophytic *Pseudomonas* sp. BF1-3 degrades organophosphorus pesticide chlorpyrifos. *Ecotox Environ Safe.* 108, 135-141.
- Cycon M., Zmijowska A., Wójcik M., Piotrowska-Seget Z. (2013). Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils. *J Environ Manage* 117: 7-16.
- Ghanem I., Orfi M., Shamma M. (2007). Biodegradation of chlorpyrifos by *Klebsiella* sp. isolated from an activated sludge sample of waste water treatment plant in damascus. *Folia Microbiol (Praha)* 52(4):423-427.
- John E.M. and Shaik J.M. (2015). Chlorpyrifos: pollution and remediation, review. *Environ Chem Lett* 13:269-291.
- Korade D.L., Fulekar M.H. (2009). Rhizosphere remediation of chlorpyrifos in mycorrhizospheric soil using ryegrass. *J Hazard Mater* 172: 1344-1350.
- Lakshmi C.V., Kumar M., Khanna S. (2008). Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. *Int Biodeter Biodegr* 62: 204-209.
- Li X., He J., Li S. (2007). Isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Sphingomonas* sp. strain Dsp-2, and cloning of the *mpd* gene. *Res Microbiol* 158: 143-149.
- Liu Z.Y., Chen X., Shi Y., Su Z.C. (2012). Bacterial degradation of chlorpyrifos by *Bacillus cereus*. *Adv Mater Res* 356:676-680.
- Mallick K., Bharati K., Banerji A., Shakil N.A., Sethunathan N. (1999). Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure cultures and in soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 62(1):48-54.
- Moreno-Medina D.A., Sánchez-Salinas E., Ortíz-Hernández M.L. (2014). Removal of methyl parathion and coumaphos pesticides by a bacterial consortium immobilized in *Luffa cylindrical*. *RICA* 30: 51-63.
- Singh B.K., Walker A., Morgan J.A.W., Wright D.J. (2004). Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Appl Environ Microbiol* 70(8):4855-4863.
- Xu G., Zheng W., Li Y., Wang S., Zhang J., Yan Y. (2008). Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP. *Int Biodeter Biodegr* 62(1):51-56.
- Xu G.M., Li Y.Y., Zheng W., Peng X., Li W., Yan Y.C. (2007). Mineralization of chlorpyrifos by co-culture of *Serratia* and *Trichosporon* sp. *Biotechnol Lett* 29: 1469-1473.

- Yang C., Liu N., Guo X.M., Qiao C.L. (2006). Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated. FEMS Microbiol Lett 265: 118-125.
- Zhong Y., Zou S., Lin L., Luan T.G., Qiu R., Tam N.F.Y. (2010). Effects of pyrene and fluoranthene on the degradation characteristics of phenanthrene in the cometabolism process by *Sphingomonas* sp. Strain PheB4 isolated from mangrove sediments. Mar Pollut Bull 60: 2043-2049.
- Zhu J., Zhao Y., Qiu J. (2010). Isolation and application of a chlorpyrifos-degrading *Bacillus licheniformis* ZHU-1. Afr J Microbiol Res 4(24):2716-2719.

CAPÍTULO IV. GENES MICROBIANOS DEGRADADORES DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS PRESENTES EN SUELOS CONTAMINADOS

RESUMEN

La biorremediación permite restaurar ambientes contaminantes con la ayuda de microorganismos, los cuales pueden degradar parcial o completamente las moléculas contaminantes. La degradación se lleva a cabo gracias a su actividad metabólica, específicamente a los genes presentes dentro de su genoma. En este ensayo se investigó a algunos genes responsables de la degradación de clorpirifos. Se realizó la extracción de ADN de cepas aisladas con potencial de uso en biorremediación. Se observó la presencia del gen *gox* en *S. grimesii* DAMM47), *opd* (en *P. putida* DAMM30) y *mpd* (en *P. putida* DAMM30 y *S. grimesii* DAMM47). Además, el gen que degrada paratión metílico y otros organofosforados (*mpd*) se encontró en *P. oryzihabitans* DAMM46. Este gen (*mpd*) también se encuentra ligeramente en *P. oryzihabitans* DAMM37 y DAMM46. El gen *cehA* no se encontró en las cepas aisladas.

4.1. OBJETIVO

Identificar genes degradadores de plaguicidas organofosforados presentes en bacterias aisladas.

4.2. HIPÓTESIS

Las cepas aisladas contienen genes específicos para la degradación de plaguicidas. Los genes de degradación de plaguicidas pueden usarse como estrategia biotecnológica para la restauración de suelos contaminados con estos compuestos.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Búsqueda de genes

Primeramente se realizó la extracción de ADN genómico por CTAB 2% (anexo 8) de cuatro cepas degradadoras de clorpirifos, aisladas de suelos contaminadas con plaguicidas organofosforados. Para amplificar genes presentes en el ADN de las cepas, se diseñaron primers (forward y reverse) específicos para los genes *opd*, *mpd*, *gox*, *cehA*, cuya secuencia se muestra en el Cuadro 4.1.

Cuadro 4.1. Cebadores usados para la amplificación y búsqueda de genes en cepas aisladas

Primer	Secuencia
opd F	5`ggatcgagcggcttaccggcgcct3`
opdR ₁	5`ctgcagttcgaaaagcacggtgtgcc3`
opdR ₂	5`ctgcagttcacgaaaacgacggtcgtc3`
mph F	5`gaattcatatgccctgaagaac3`
mph R	5`gaattctcgagcttggggtgacgacc3`
gox F	5`atgtcggagaaccacaaaaagtaggc3`
gox R	5`aattgaacggcctgggcaaacgaa3`
cehA F	5`acgttgaccaaccattcaaaccagat3`
cehA R	5`agtgaattcagcgaaagccgctacta3`

Para examinar la presencia de estos genes por alineamiento entre bases complementarias, se realizó la amplificación mediante PCR. El programa para la amplificación fue: 1) desnaturalización a 94 °C por 2 min, 2) 30 ciclos de desnaturalización (94 °C por 50 s), alineamiento (56 °C por 50 s) y extensión (72 °C por 1 min), 3) 5 min de extensión final a 72 °C.

Los geles de agarosa al 1.5% permitieron visualizar los fragmentos amplificados juntamente con electroporación, se utilizó GelRed™ para teñir los fragmentos y observarlos en un Transiluminador UV ENDURO™. Para las comparación de tamaños de los fragmentos amplificados de las muestras se utilizaron marcadores de peso molecular (MP) de 1 kb y 100 pb Thermo Scientific GeneRuler (Figura 4.1). Las figuras posteriores muestran esta escalera de ADN como MP.

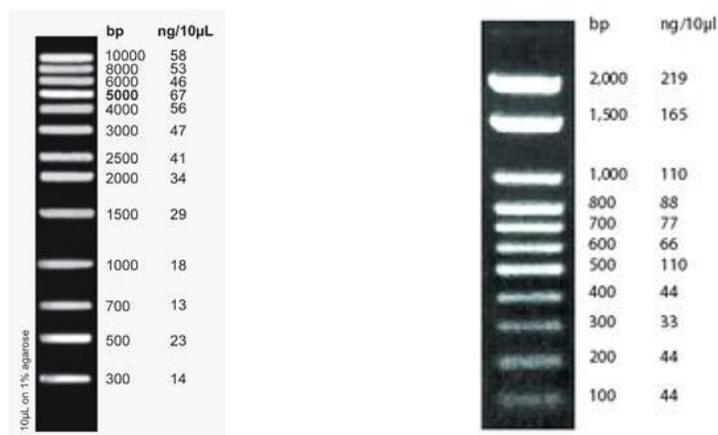


Figura 4.1. Marcadores de peso molecular utilizados (1 kb y 100 pb, respectivamente).

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1. Genes presentes en cepas aisladas

Después de obtener resultados positivos en la degradación del CP (remoción de 50 mg L⁻¹), el siguiente paso fue buscar genes relacionados con la degradación de plaguicidas organofosforados y un carbamato, tomando en cuenta su aplicación indiscriminada en los suelos muestreados.

Considerando el peso molecular de los genes reportados, en la Figura 4.2 el patrón de bandas muestra la presencia de genes en las cepas aisladas. En a) y e) se observa la presencia del gen *opd* (organophosphate pesticide degrading enzyme EF515812) en DAMM30, el cual tiene un tamaño aproximado entre las 1000 a 1300 pb de acuerdo a Harper *et al*, (1988). En las otras cepas (f, g, h) se observan además fragmentos pequeños de otros fragmentos en los cuales se hibridan los cebadores, no obstante son de menor

tamaño (500 pb aproximadamente). El gen *cehA* (carbamate hidrolase FR751312) no se observa en ninguna de las cepas aisladas (i, j, k, l) el cual ha sido reportado con tamaños de 2400 pb. El gen *gox* (FAD dependent glyphosate oxidoreductase) con peso aproximado de 1300 pb reportado en *Ochrobactrum* sp. G1 (GU214711) y *Chelativorans* sp. BNC1 (CP000389) es responsable de la degradación de glifosato, posiblemente se encuentre en las cepas DAMM37, DAMM46y DAMM47 como se observa en n, o y p de la misma figura.

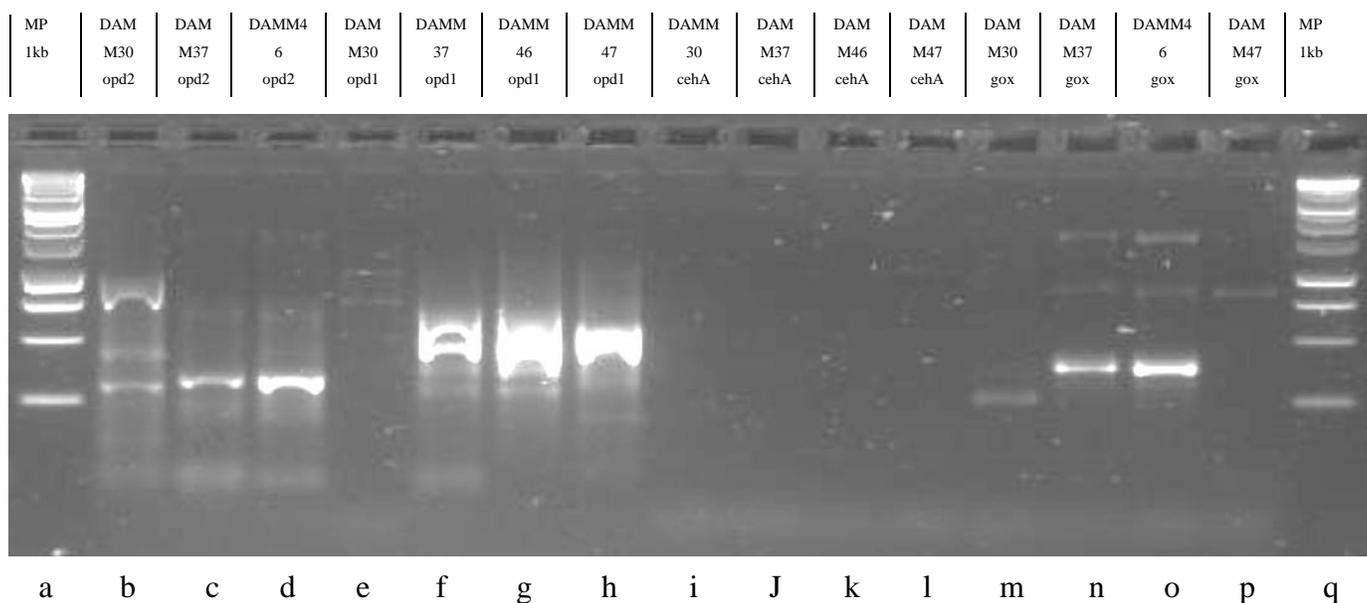


Figura 4.2. Fragmentos amplificados en las cepas aisladas de suelos contaminados con plaguicidas.

Para corroborar la presencia del gen *opd*, responsable de la degradación de organofosforados incluyendo el clorpirifos, se realizó la purificación de las bandas. De esta manera, en la Figura 4.3 se repite el mismo patrón de banda para 1000 pb en c y k, indicando la presencia de *opd* en la cepa DAMM30. En la Figura 4.4A se observa igualmente que el cebador opd2 tiene un mejor pegado al gen degradador de organofosforados (c). Se observa una ligera concentración de este mismo gen en las demás cepas (e, f, j, k, n, o). La presencia de gen *gox* se observó y se reiteró solo en DAMM47.

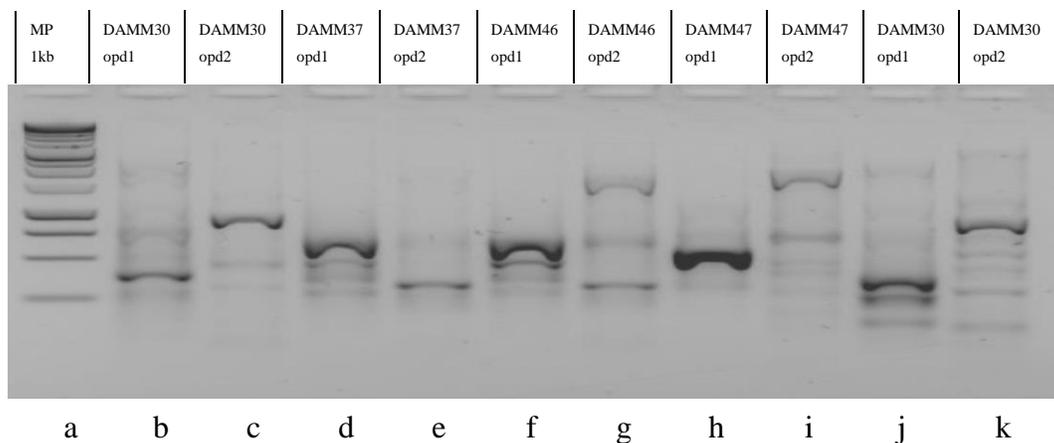


Figura 4.3. Fragmentos purificados y amplificados de las cepas aisladas de suelos contaminados con plaguicidas.

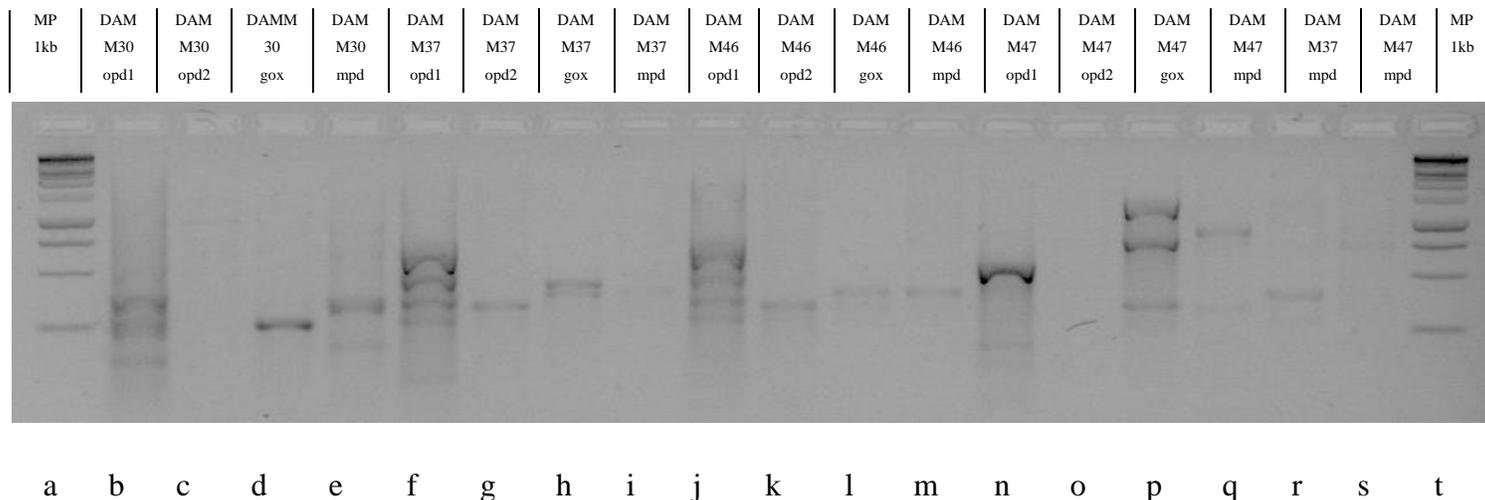


Figura 4.4A. Fragmentos purificados y amplificados de las cepas aisladas de suelos contaminados con plaguicidas.

Cabe mencionar que hay otros genes reportados con actividad catalítica de clorpirifos. El gen *mpd* (methyl parathion hydrolase) es el ejemplo más común para este plaguicida, degrada paratión metílico y además otros organofosforados. Se encuentra en varias especies del genero *Pseudomonas*. De acuerdo a Zuo *et al.* (2015) este gen se insertó en *P. putida* para propiciar una degradación simultanea de organofosforados y piretroides. Tiene un tamaño aproximado de 1000 pb (EF515812) y se observó en *P. putida* DAMM30 (e) y *S. grimesii* DAMM47 (q). Es importante enfatizar no hay reportes de la presencia de genes

degradadores en esta última especie. La Figura 4.4B muestra que este gen (*mpd*) también se encuentra ligeramente en *P. oryzihabitans* DAMM37 y DAMM46.

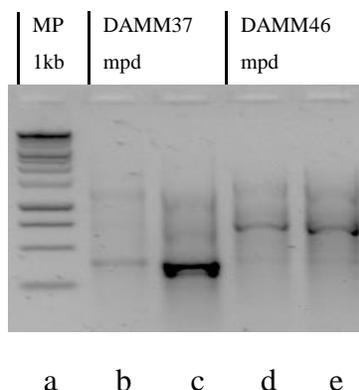


Figura 4.4B. Gen *mpd* en las cepas aisladas

De estos fragmentos seleccionados se procedió a la extracción del amplicón del gel para clonarlo.

4.5. CONCLUSIONES

Las cepas aisladas contienen genes que degradan algunos organofosforados. Se encontró al *opd* en DAMM30 y a *gox* en DAMM37, DAMM46 y DAMM47. Se observó la presencia de *mpd* en DAMM30, DAMM37, DAMM46 y DAMM47. El gen *cehA* no se detectó en las cepas aisladas. En *Serratia grimesii* no se había reportado la presencia de estos genes. Estos genes son importantes en estas especies, su expresión podría ayudar a la degradación de compuestos organofosforados de sitios contaminados.

4.6. REFERENCIA

Harper LL, McDaniel CS, Miller CE, Wild JR. 1988. Dissimilar plasmids isolated from *Pseudomonas diminuta* MG and a *Flavobacterium* sp. (ATCC 27551) contain identical *opd* genes. *Appl Environ Microbiol.* 54(10):2586-9.

Yang C., Liu N., Guo X.M., Qiao C.L. (2006). Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated. *FEMS Microbiol Lett* 265: 118-125.

Zuo, Z.; Gong, T.; Che, Y.; Liu, R.; Xu, P.; Jiang, H.; Qiao, C.; Song, C.; Yang, C. 2015. Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for simultaneous degradation of organophosphates and pyrethroids and its application in bioremediation of soil. *Biodegradation* 26:223-233.

CAPÍTULO V. CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES DE LA DEGRADACIÓN DE CLORPIRIFOS EN BACTERIAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

RESUMEN

Es importante el aislamiento y la caracterización de especies microbianas de sitios contaminados con estos compuestos. Pero más aún, conocer los genes responsables de la degradación y remoción de estos plaguicidas, los cuales afectan indirectamente la fertilidad de muchos suelos mexicanos. La clonación y expresión de genes responsables de la degradación de compuestos xenobioticos dentro de los microorganismos es una estrategia biotecnológica, facilita la obtención de sus productos metabólicos, por ejemplo, la obtención de enzimas hidrolíticas. En este estudio se obtuvieron clonas de *E. coli* transformadas con el gen *mpd* usando diferentes vectores PGEM-T y pMP92. Este gen codifica para una hidrolasa degradadora de organofosforados (MPH), la cual es responsable de la degradación de clorpirifos. Se evaluó su crecimiento con resultados favorables para usar estas cepas transformadas en biorreactores para la obtención de proteínas recombinantes.

5.1. OBJETIVO

Clonar el gen *mpd* en *E. coli*. Usar estos microorganismos modificados genéticamente para la degradación de clorpirifos.

5.2. HIPÓTESIS

Las cepas transformadas con el gen *mpd* mejoran y aceleran la degradación clorpirifos.

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1. Activación de cepas

Las cepas fueron aisladas de suelos contaminados de Texcoco, México. Para su conservación y transporte se liofilizaron. Se obtuvieron degradaciones de clorpirifos de hasta 71% mostrada previamente. De esta manera, se encontró que el principal gen responsable de la hidrólisis del clorpirifos fue el gen mpd. La activación de estas cepas (silvestres DAMM30, DAMM37, DAMM46 y DAMM47, principalmente DAMM46) se realizó en agar nutritivo. El cultivo de cepas transformadas también se desarrollo en medio mínimo el cual se ilustra en el Cuadro 5.1A y 5.1B.

Cuadro 5.1A. Medio de sales minerales .

Sal	Cantidad (g L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	2.92
KH ₂ PO ₄	2.74
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.20
KNO ₃	2.00
ctab(NH ₄) ₂ SO ₄	0.99

Se agregan además 2 mL L⁻¹ de la solución de elementos traza y 15 g L⁻¹ de agar (para medio sólido).

Cuadro5.1B. Solución de elementos traza usados en el medio de sales minerales

Sol. traza	Cantidad (g L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	2.80
MnSO ₄ .H ₂ O	2.55
CuSO ₄ .H ₂ O	0.20
CoCl ₂ .6H ₂ O	2.43
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.25

5.3.2. Extracción de ADN

Para la extracción de DNA genómico se usó el kit de extracción “G-spin™ Total DNA” de iNtRON Biotech. Para el DNA plasmídico se usó el kit “Zyppy plasmid miniprep kit” de Zymo research.

5.3.3. Diseño de primers degenerados

En algunos casos, se diseñaron primers degenerados considerando la secuencia del fragmento a amplificar. Para esto, una vez realizado un alineamiento múltiple, con Clustal W, con los genes homólogos, se buscaron sitios de inicio conservados o en donde varíe en un solo nucleótido, primeramente con Forward. Por ejemplo: 5'AGTCCGT/CCGC 3'. Indicando que la T o la C están presentes posiblemente debido a una mutación, de manera que el fabricante pondrá en este caso 50% con T y el otro 50% con C. Pueden ponerse dos o tres nucleótidos degenerados, posiblemente más. Pero, es importante mencionar que es necesario colocar secuencias dianas para seguirlo o monitorearlo y utilizarlo para sitios de corte al momento de que se usen en clonación.

Para entender: “GAATTC” para EcoRI, también, generalmente se pone una G al comienzo para que la polimerasa se sostenga de manera estequiométrica. El primer degenerado diseñado quedaría en este ejemplo así: 5' GGAATTCAGTCCGT/CCGC 3'

Se pueden poner las dianas en función del plásmido de transformación a usar y las enzimas de restricción con que se dispongan. De igual manera se realiza para el Reverse, pero considerando las complementarias y con la dirección correcta. También se toma en cuenta el número de nucleótidos, relación G/C de acuerdo a Chargaff, etc.

5.3.4. Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en diferentes condiciones en función de los primers utilizados y de los fragmentos a amplificar. En general, para el mix de reacción de PCR se

usó agua 17 μL , 1 μL de Fw, 1 μL de Rv, 1 μL de muestra de ADN y se usaron tubos de Maxime PCR premix de iTaq (con buffer de carga, endoenzima y dNTPs).

Para examinar la presencia de estos genes por alineamiento entre bases complementarias, se realizó la amplificación mediante PCR. El programa para la amplificación fue: 1) desnaturalización a 94 °C por 2 min, 2) 30 ciclos de desnaturalización (94 °C por 50 s), alineamiento (56 °C por 50 seg) y extensión (72 °C por 1 min), 3) 5 min de extensión final a 72 °C. Cabe señalar que en algunos casos se realizó una PCR con gradiente de temperatura para favorecer el pegado (polimerización) de cebadores.

5.3.5. Electroforesis en gel de agarosa

El gel de agarosa se preparó al 1%, en algunos casos al 1.5%. Consistió de 40 mL TAE 1X, y 0.4 g agarosa, se calentó y vertió en molde (con peine) junto con 2 μL de RedGel™ para revelar. Para correr el gel en la cámara de electroforesis se ponen 2 μL de colorante (para muestras en donde no se usa iTaq) y además 10 μL de la muestra de DNA o producto de PCR. Las condiciones de voltaje y amperaje varían en función del tipo de muestra y concentración del gel de agarosa. Se realizaron experimentos de purificación de DNA, y clonación en diferentes vectores. Posteriormente los geles se observaron en un Transiluminador UV ENDURO™.

5.3.6. Vectores utilizados

Para la clonación en *E. coli* DH5 α y en *Pseudomonas oryzae* DAMM46 se utilizaron los vectores el pJET1.2/blunt de 2.9 kb, y pTZ57R/T de 2.8 kb, ambos con resistencia a ampicilina. El segundo con el lacZ como gen reportero. Se utilizó también el vector PGEMT de 3 kb quien también presenta el gen lacZ como reportero. Además para promover la sobreexpresión se utilizó el vector pMP92 de 7 kb ya que presenta promotores fuertes para la transcripción de genes de acuerdo con Spaik *et al* (1987). Se utilizaron vectores de clonación y de expresión.

5.3.7. Transformación de *E. coli* DH5α

Los fragmentos amplificados se purificaron del gel con Ultraclean Gelspin Kit. Posteriormente los fragmentos puros se volvieron a amplificar por segunda vez para concentrar la muestra y determinar además la concentración presente. Así, los fragmentos amplificados y puros (genes) *mpd*, *opd*, *gox* y *cehA* se usaron para insertarlos en cepas de *E. coli* DH5α competentes (anexo 9). Para la inserción de estos fragmentos se utilizaron dos vectores de clonación: pJET1.2 y pTZ57R/T (anexo 11). Una vez extraído el ADN plasmídico se amplificaron los fragmentos con los primers diseñados inicialmente (Cuadro 4.1) y también con primers universales M13Fw, M13Rv, T7 y SP6 los cuales están dentro de los vectores usados en la clonación.

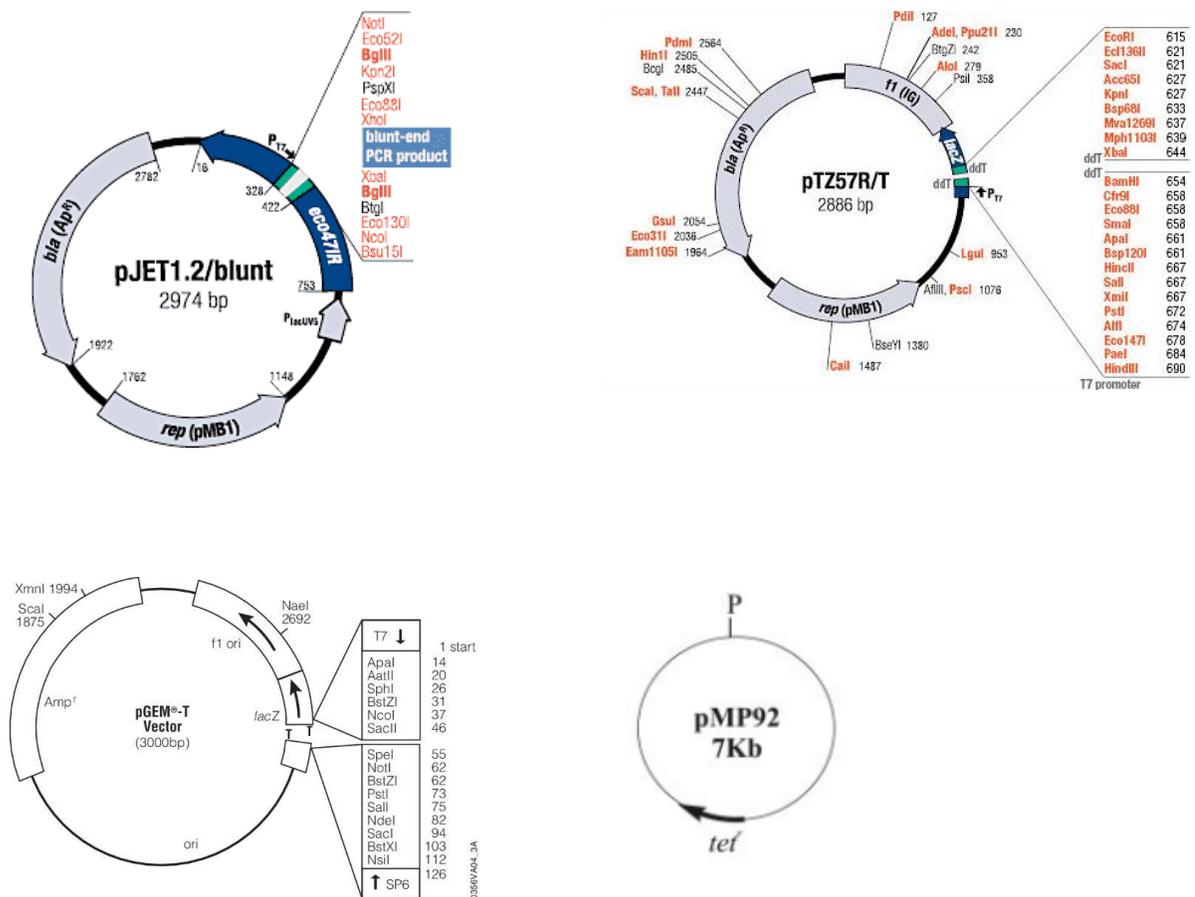


Figura 5.1. Vectores utilizados durante la transformación de *E. coli* y *Pseudomonas oryzihabitans* DAMM46.

5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1. Extracción de DNA

La Figura 5.2 indica la presencia de DNA plasmídico (p) con los primers para *mpd* dentro de la cepa DAMM46. Considerando el tamaño del fragmento se puede deducir que los cebadores se pegaron en otro sitio, ya que el peso molecular (400 pb) no coincide con el tamaño del gen reportado por Yang *et al.*, 2006, dicho peso es de aproximadamente 1 kb.

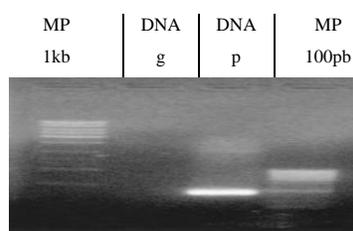


Figura 5.2. DNA genómico (g) y DNA plasmídico (p) en *Pseudomonas oryzihabitans* DAMM46.

El DNAg no amplificó con los primers de *mpd*, de este modo se verificó en gel si hay DNA en la extracción. Fue necesario considerar gradientes de temperatura para el alineamiento de la PCR, tomando en cuenta lo sucedido con el DNA genómico. Citando al autor antes mencionado, describe una temperatura de alineamiento de 52 °C, no obstante esta temperatura se usó para DNA de *Stenotrophomonas* YC-1 y el de nuestro interés es de *P. oryzihabitans* DAMM46. El Cuadro 5.2 muestra los gradientes de alineamiento usados para que el *mpd* se amplifique.

Cuadro 5.2. Gradientes de temperaturas usados para la PCR de *mpd* en *P. oryzihabitans* DAMM46.

Columna en termociclador	Temp (°C)	Tubo id de la PCR
3	43.6	1
5	47.3	2
6	49.1	3
8	52.7	4

MP 1 2 3 4
1kb

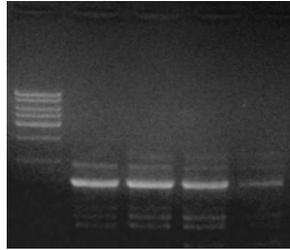


Figura 5.3. Reacción de PCR a diferentes temperaturas de alineamiento para el gen *mpd* en *P. oryzihabitans* DAMM46.

En el gel (Figura 5.2) se observa que sí hay amplificación en las tres primeras temperaturas del DNAg con el tamaño aproximado de 1000 pb, equivalente al peso del gen *mpd*. Sin embargo, se observan bandas inespecíficas, para ello se eliminaron estas bandas agregando DMS (1 μ L de dimetilsulfoxido) en el mix de PCR. Dicho esto, los fragmentos del tamaño 1 kb se cortaron y se procedió a eliminar la agarosa y restos de la reacción de PCR mediante un kit de purificación de bandas. Cabe mencionar que la temperatura de alineamiento seleccionada por su mejor y mayores concentraciones de fragmento amplificado fue a 47.3 °C.

MP DNAp 1 2 3 4
1kb



Figura 5.4. DNAp y fragmentos de DNAg purificados.

Conocida esta temperatura, se amplificó el DNA plasmídico con los primers diseñados inicialmente. Se corrió el gel con el DNAp y las bandas de ADNg que se purificaron para verificar la presencia de ADNg (que haya sido buena la purificación). La Figura 5.4

muestra un buen resultado. Se logró amplificar el fragmento en 1000 pb (posible *mpd*) y se observa el fragmento de DNAg purificado de la banda. Se sospecha que este gen es el responsable de la remoción del clorpirifos. Para ello se realizó un pequeño bioensayo creciendo cepas transformadas de *E. coli* DH5a-*mpd* para observar su comportamiento en presencia del plaguicida a diferentes concentraciones, lo cual se mencionó en capítulos anteriores. Las condiciones de los tratamientos se observan en el Cuadro 5.3.

Cuadro 5.3. Condiciones de bioensayo de tolerancia de clonas en clorpirifos

Tratamiento id	1	2	3	4	5
Cepa	<i>E. coli</i> DH5a azul	<i>E. coli</i> DH5a	<i>E. coli</i> DH5a	<i>E. coli</i> DH5a	<i>E. coli</i> DH5a
Plásmido PTZ57R/T	Plásmido sin <i>mpd</i>	Plásmido con <i>mpd</i>	Plásmido con <i>mpd</i>	Plásmido con <i>mpd</i>	Plásmido con <i>mpd</i>
Clorpirifos	0 ppm	0 ppm	1 ppm	10 ppm	100 ppm

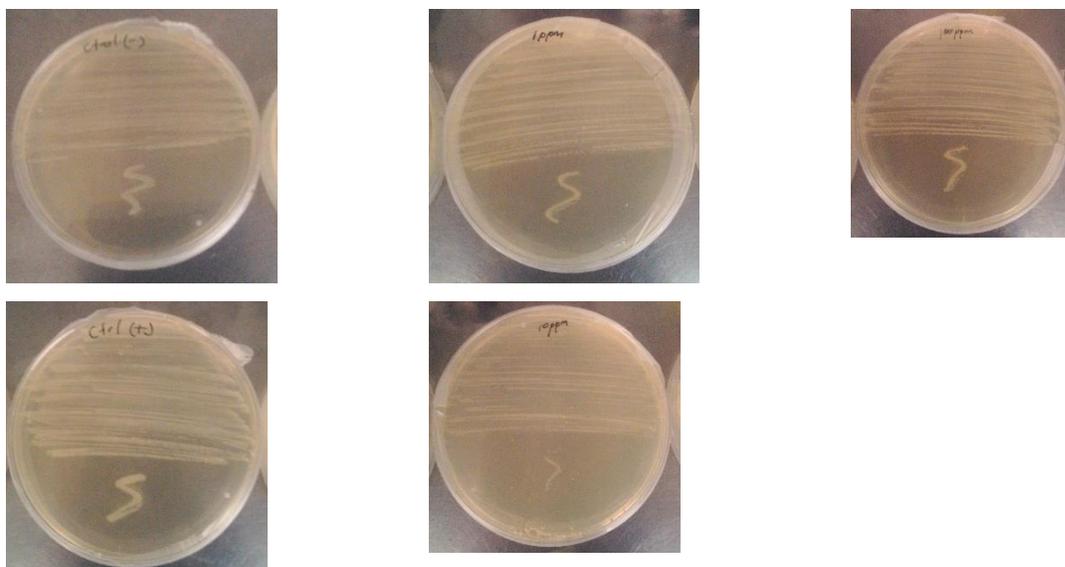


Figura 5.5. Crecimiento de clonas de *E. coli* con y sin PTZ57R/T en LB y clorpirifos.

Las cepas crecieron en LB con plaguicida en todos los tratamientos. Su crecimiento colonial y tolerancia en estas condiciones se observan en la Figura 5.5. De esta manera, se procedió a someterlas a crecimiento en medio mínimo y al plaguicida como única fuente de

carbono. Su crecimiento fue positivo a estas concentraciones evidenciando de igual manera la presencia de este gen en el genoma de las clonas de *E. coli*.

5.4.2. Clonación en PGEM-T

Al obtener los resultados previos se procedió a comenzar con la clonación de los fragmentos de 1 kb (gen *mpd*) purificados. Primeramente los fragmentos se digirieron con EcoRI (Cuadro 5.4), y se ligaron en el plásmido pGEM-T, se verificaron sitios de corte acordes con Yang *et al.* (2006). Para la ligación se usaron 5 μ L de buffer de ligación, 1 μ L del vector, 1 μ L de ligasa, 3 μ L del inserto y se incubó la mezcla de ligación a 16 °C por 16 h.

Cuadro 5.4. Condiciones para la digestión con EcoRI.

Tubo 1. pMP92	Tubo 2. Fragmento <i>mpd</i>	Tubo 3. pTZ57R/T- <i>mpd</i>
16.5 μ L del vector	8.5 μ L	16.5 μ L vector
1 μ L EcoRI	1 μ L Eco RI	1 μ L Eco RI
2.5 μ L Buffer para EcoRI	2.5 μ L Buffer para EcoRI	2.5 μ L Buffer para EcoRI
	8 μ L agua mQ	

La digestión se realizó a 37 °C durante 1 h 30 min. Posteriormente se observó en gel de agarosa al 1.5%. Se esperaba que en el gel se observaran los siguientes patrones. En el tubo 1 una banda de 7 kb perteneciente al pMP92 abierto, en el tubo 2 una banda de 1 kb perteneciente al *mpd*, y en el tubo 3 dos bandas: una de 3 kb (del plásmido) y otra de 1 kb (del *mpd*). No obstante, se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 5.6.

De este modo, en A se observó el tamaño correcto (7 kb), en B se observó un tamaño grande (aprox. 2 kb), aun así, se cortó el fragmento del gel y se purificó, y en C se obtuvo un tamaño de 2 kb (grande), también se cortó del gel y purificó. Pese a que en B y C no se obtuvo el tamaño esperado se procedió a su purificación. Como el tamaño resultó ser muy grande, se ligó en PGEM-T y se envió a secuenciar. Una vez ligado el PGEM-T se clonó en *E. coli* DH 5 α . Para la transformación se usaron 10 μ L de ligación, 100 μ L de células

competentes (en ultra congelador previamente preparadas como se muestra en anexos 9 y 10) y se incubó durante 10 min en hielo. Inmediatamente transcurrido el tiempo se agregaron 400 μ L de medio SOB y 4 μ L de glucosa 2M (a esto se le llamó medio SOC) y se incubó a 37 °C durante 1 h 30 min y agitación de 200-300 rpm.

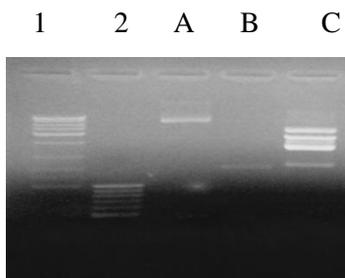


Figura 5.6. Digestión con EcoRI. Bandas 1, 2, corresponden a los marcadores de peso molecular 1 kb y 100 pb respectivamente. A: pMP92, B: *mpd* (producto de PCR de 47.3 °C) y C: pTZ57R/T-*mpd*.

Por separado se prepararon placas con medio LB/Amp/Xgal-IPTG. Se sembraron con varilla 100 μ L del medio en una placa de Petri, en otra placa se sembró el concentrado (previamente centrifugado para obtener el pellet, re suspendido en 100 μ L de medio, esto se puede hacer no tirando el sobrenadante), finalmente se incubó a 37 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo se obtuvieron 5 colonias blancas (transformadas con PGEMT-*mpd*) como se muestra en la Figura 5.7.



Figura 5.7. Obtención de clonas positivas de *E. coli* PGEM-T-*mpd*.

Posteriormente, se resembraron las cinco colonias (y una colonia azul como control, en esta el vector sin el inserto) en medio LB líquido (3 mL con 3 μ L de Amp), y también en una placa LB/Xgal-IPTG para observación de que no hubiese contaminación. Se incubaron

24 h durante 37 °C. Después, se realizó la extracción del DNA plasmídico (de las colonias blancas). Se envió a secuenciar 10 µL del PGEM-T-*mpd*. 10 µL para el Fw y para el Rv (se usaron los cebadores universales para PGEM-T: SP6 y T7).

5.4.3. Clonación en pMP92

Para promover una mayor expresión del gen se clonó además en pMP92. Se procedió a digerir el PGEM-T y cortar el fragmento *mpd* para usarlo y clonarlo. Para ello, se usaron 16.5 µL de DNA plasmídico (PGEMT-*mpd*) con EcoRI (1 µL), Buffer (2.5 µL), e incubó a 37 °C por 1 h 30 min. Los resultados de esta digestión se observan en la Figura 5.8.

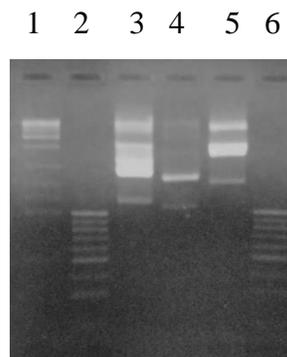


Figura 5.8. Gel de agarosa 1.5%. Digestión de *mpd* con EcoRI. 1, 2 y 6 son marcadores de peso molecular 1 kb y 100 pb, respectivamente. 2, 4 y 5 corresponden al DNA plasmídico de clonas, digerido con EcoRI.

Se observan bandas de 3 kb y de 1 kb. Se cortó y purificó la muestra 4, la cual corresponde a una clona positiva. La banda de 1 kb corresponde al fragmento de *mpd*. Posteriormente, este fragmento se digirió con XhoI (Figura 5.9), tanto el fragmento como el plásmido (pMP92).

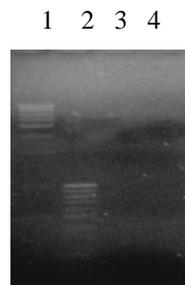


Figura 5.9. Gel de agarosa. En las bandas 3 y 4 se muestran la digestión de *mpd* con XhoI. Las bandas 1 y 2 son los marcadores 1 kb y 100 pb respectivamente.

No obstante, no se observó un buen resultado, la nula digestión con XhoI posiblemente se debe a que hay muy poco DNA, ya que se pierde durante la purificación del gel. De esta manera se repitió el experimento hasta obtener fragmentos *mpd* digeridos con EcoRI y XhoI, lo mismo para la digestión de pMP92. Una vez realizado estas digestiones, se clonó esta ligación de pMP92-*mpd* en *E. coli* DH5 α : 10 μ L de ligación, 100 μ L de células competentes DH5 α , incubación 10 min en hielo y se agregan 400 μ L de SOB, después 4 μ L de glucosa 2M e incubar 1 h 30 min (o 2 h) a 37 °C, 200-300 rpm. Finalmente se sembraron 100 μ L en placas previamente preparadas con LB-Tc (tetraciclina) 15.mg mL⁻¹. Además, se centrifugó y sembraron otros 100 μ L del pellet concentrado como se describió anteriormente.

Los clones positivos, que crecieron en LB con Tc 15.mg mL⁻¹, se seleccionaron y se conservaron en glicerol 15%. Para la verificación de la selección de clones positivos se extrajo DNAp transcurrido el tiempo de incubación de *E. coli*. El DNA se digirió con NdeI para verificar que el fragmento se insertó en la dirección correcta, es decir, si NdeI cortaba el DNA, la orientación es correcta, y si no quiere decir que el *mpd* está en sentido contrario y el marco de lectura para la MPH cambia. Además, se digirió con EcoRI para ver si hay solo dos bandas es que no está contaminado.

Debido a que el *mpd* no se pudo amplificar, fue necesario que se diseñaron primers internos para comprobar que el fragmento se encuentra en el DNAp, de esta manera es necesario cortar con endoenzimas dentro del *mpd*. Para conocer estas enzimas se realizó un alineamiento múltiple (Figura 5.10). Primeramente se encontró que este gen tiene sitios de restricción para BglII (AGATCT), dentro del *mpd* y no en pGEM-T (lo cual es conveniente). Además, podría cortarse además con NdeI y tener un control con colonias azules. Estos primers internos ayudaron a demostrar que el fragmento está inserto de manera correcta y en la dirección correcta dentro del genoma bacteriano.

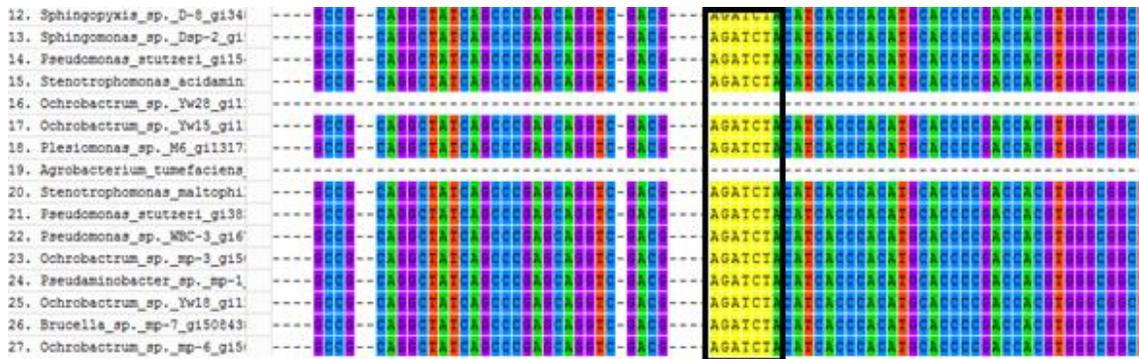


Figura 5.10. Alineamiento múltiple con CLUSTALW. En recuadro se observa sitio de corte interno para BglII.

Posteriormente se realizó otro bioensayo para verificar la expresión del gen comparando su crecimiento en presencia del clorpirifos con la cepa silvestre. En la Figura 5.11 se muestra aparentemente un mayor crecimiento en las colonias transformadas con pMP92-*mpd*. Al comparar los dos tratamientos en el tiempo, se observa que a las 24 h la cepa transformada muestra un mayor crecimiento en su fase logarítmica que la silvestre, creciendo hasta 48.11×10^6 UFC mL⁻¹. No obstante, la fase estacionaria para ambas cepas comienza a las 48 h y no se encontró diferencia estadística significativa ($P=0.0504$, $\alpha=0.05$). A las 72 h la cepa transformada con pMP92-*mpd* comienza su fase de muerte, y se observa que no hay diferencia en el crecimiento comparado con la cepa silvestre.

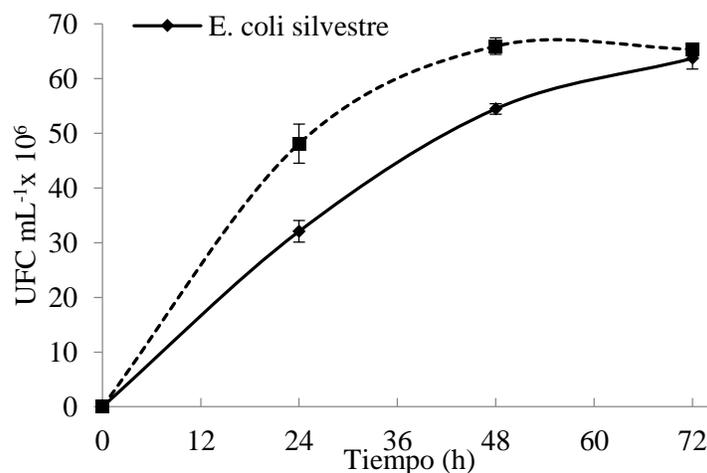


Figura 5.11. Crecimiento bacteriano de cepas de *E. coli* silvestre vs transformada con pMP92-*mpd*.

5.5. CONCLUSIONES

La clonación y expresión de genes responsables de la degradación de compuestos xenobioticos, dentro de los microorganismos, facilita la obtención de sus productos metabólicos, por ejemplo, la obtención de enzimas hidrolíticas. En este estudio se obtuvieron clonas de *E. coli* transformadas con el gen *mpd* usando diferentes vectores, este gen codifica para una hidrolasa degradadora de organofosforados (MPH), responsable de la degradación de clorpirifos. Posteriormente se pretende usar estas cepas transformadas en biorreactores para la obtención de proteínas recombinantes.

5.6. REFERENCIAS

- Harper LL, McDaniel CS, Miller CE, Wild JR. 1988. Dissimilar plasmids isolated from *Pseudomonas diminuta* MG and a *Flavobacterium* sp. (ATCC 27551) contain identical *opd* genes. *Appl Environ Microbiol.* 54(10):2586-9.
- Imfeld, G. and Vuilleumier, S. (2012) Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical Review. *European Journal of Soil Biology* 49: 22-30.
- John, E.M. and Shaik, J.M. (2015) Chlorpyrifos: pollution and remediation, review. *Environmental Chemistry Letter* 13: 269-291.
- Lu, P., Li, Q., Liu, H., Feng, Z., Yan, X., Hong, Q., Li, S. (2013) Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1. *Bioresource Technology* 127: 337-342.
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch ET. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2ed. Book1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU.; 1989:p. 1,82-1,84.
- Sasikala, C.; Jiwal, S.; Rout, P.; Ramya, M. (2012) Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. *World J. Microbiol. Biotechnology* 28: 1301-1308.
- Solomon, K.R., Williams, M., Mackay, D., Purdy, J., Giddings, J.M., Giesy J.P. (2014) Properties and Uses of Chlorpyrifos in the United States. *In: Giesy, J.P. and Solomon, K.R. (Eds) Ecological risk assessment for chlorpyrifos in terrestrial and aquatic systems in the United States. Reviews of environmental contamination and Toxicology* 231: 13-34.
- Spaink H.P., Wijffelman C.A., Pees E., Okker R.J.H., Lugtenberg B.J.J. (1987) *Rhizobium* nodulation gene *NodD* as a determinant of host specificity. *Nature* 328 (6128): 337-340.

- Yadav, M.; Srivastva, N.; Singh, R.S.; Upadhyay, S.N.; Dubey, S.K. (2014) Biodegradation of chlorpyrifos by *Pseudomonas* sp. in a continuous packed bed bioreactor. *Bioresource Technology* 165: 265-269.
- Yang C., Liu N., Guo X., Qiao C. (2006) Cloning of mpd gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *FEMS Microbiol Lett* 265(1):118-125.
- Zuo, Z.; Gong, T.; Che, Y.; Liu, R.; Xu, P.; Jiang, H.; Qiao, C.; Song, C.; Yang, C. 2015. Engineering *Pseudomonas putida* KT2440 for simultaneous degradation of organophosphates and pyrethroids and its application in bioremediation of soil. *Biodegradation* 26:223-233.

ANEXOS

ANEXO 1. Formato FASTA *Pseudomonas putida* strain DAMM30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
>KT354287.1 Pseudomonas putida strain DAMM30 16S ribosomal RNA gene,  
partial sequence  
CGATTCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGG  
AACGCTAATACCGCATAACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACTTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCT  
AGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATG  
ATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT  
GGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTG  
GGAGGAAGGGCATTAAACCTAATACGTTAGTGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTG  
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGG  
TGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGA  
GTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGG  
CGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC  
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAA  
CGCATTAAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA  
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAA  
CTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGT  
CGTGAGATGT
```

ANEXO 2. Formato FASTA *Pseudomonas oryzihabitans* strain DAMM37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
>KT354288.1 Pseudomonas oryzihabitans strain DAMM37 16S ribosomal RNA
gene, partial sequence
GCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATA
CCGCATACGTCTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGAT
TAGCTTGTGGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC
ACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAG
CCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGG
GCAGTAAGCGAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTGTT
AAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCAAGCTAGAGTACAGTAG
AGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGA
CCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAG
TTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGA
GATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATG
TTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTT
```

ANEXO 3. Formato FASTA *Pseudomonas oryzihabitans* strain DAMM46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

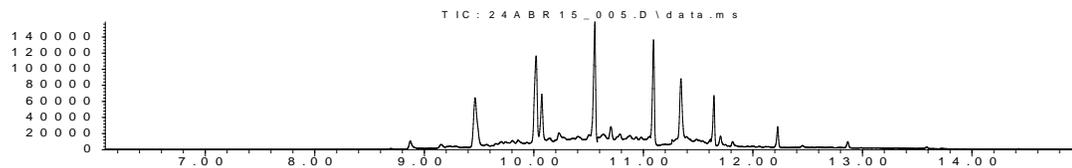
```
>KT354289.1 Pseudomonas oryzihabitans strain DAMM46 16S ribosomal RNA
gene, partial sequence
GATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGT
CACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGA
AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGA
AGGGCAGTAAGCGAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTT
GTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTACAG
TAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGG
CGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATT
AAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCC
AGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTCG
```

ANEXO 4. Formato FASTA *Serratia grimesii* strain DAMM47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

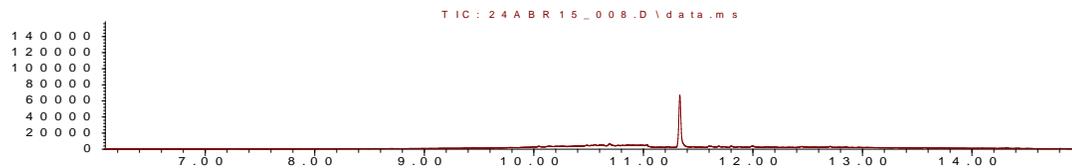
```
>KT354290.1 Serratia grimesii strain DAMM47 16S ribosomal RNA gene,  
ACTTTCGGGCCTCACGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTA  
GGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGA  
AGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTTCAGTGTTAATAGCACTGTGCATTGACG  
TTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA  
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGGATGTGAAATCCCCGCGCTTAA  
GTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTG  
AAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTG  
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGCGACTTGGAGG  
TTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG  
TTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCG  
AAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTCGCTAGAGATAGCTTAGTGCCTTCGGGAAGTCTGAG  
ACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGT
```

ANEXO 5. Cromatograma de degradación de clorpirifos por *P. oryzae* DAMM37

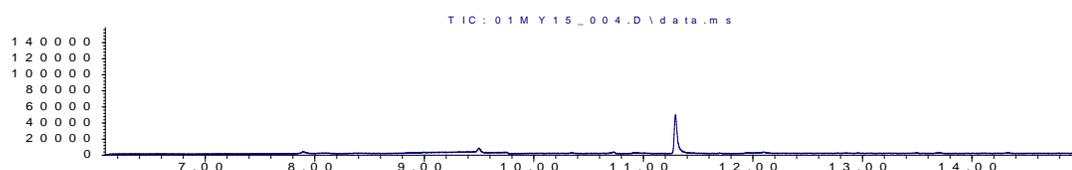
Abundance



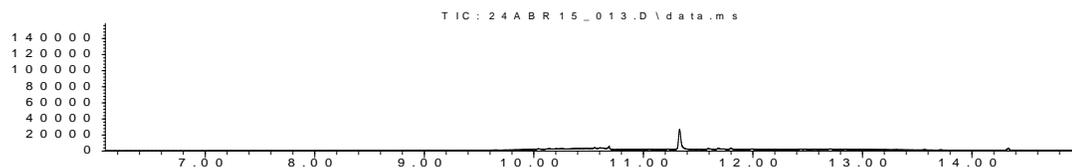
Time-->
Abundance



Time-->
Abundance

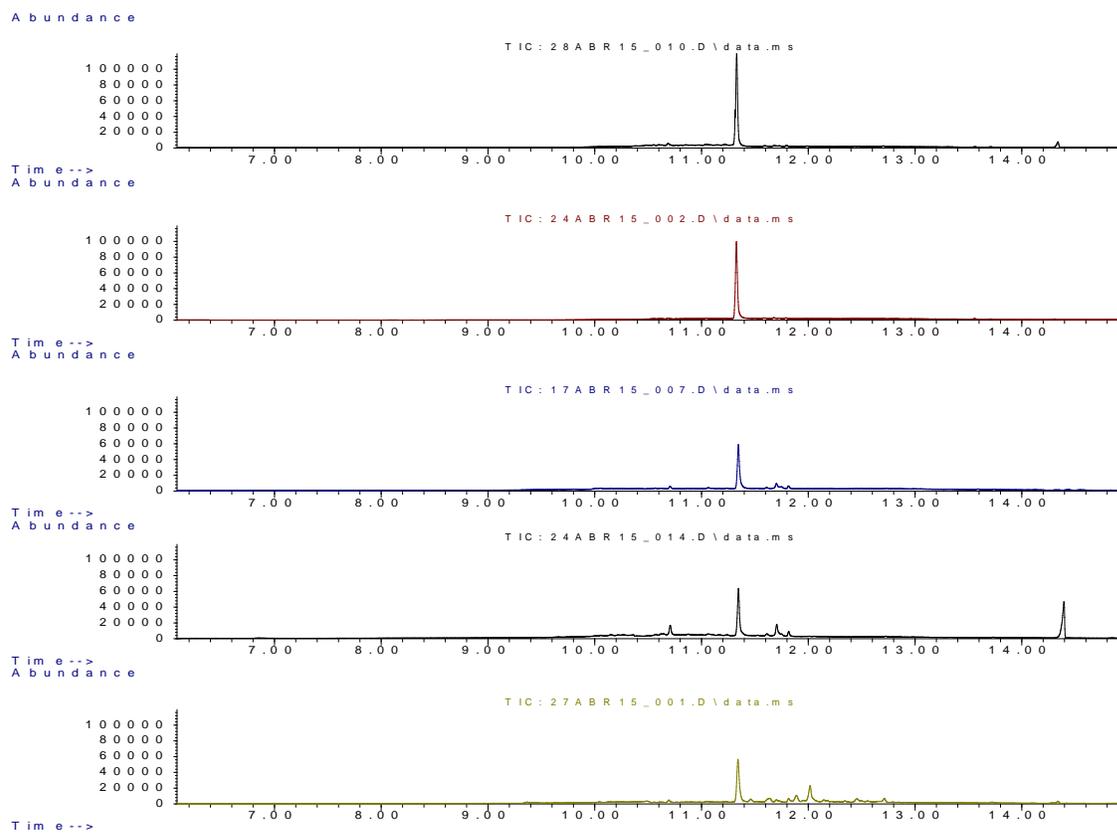


Time-->
Abundance

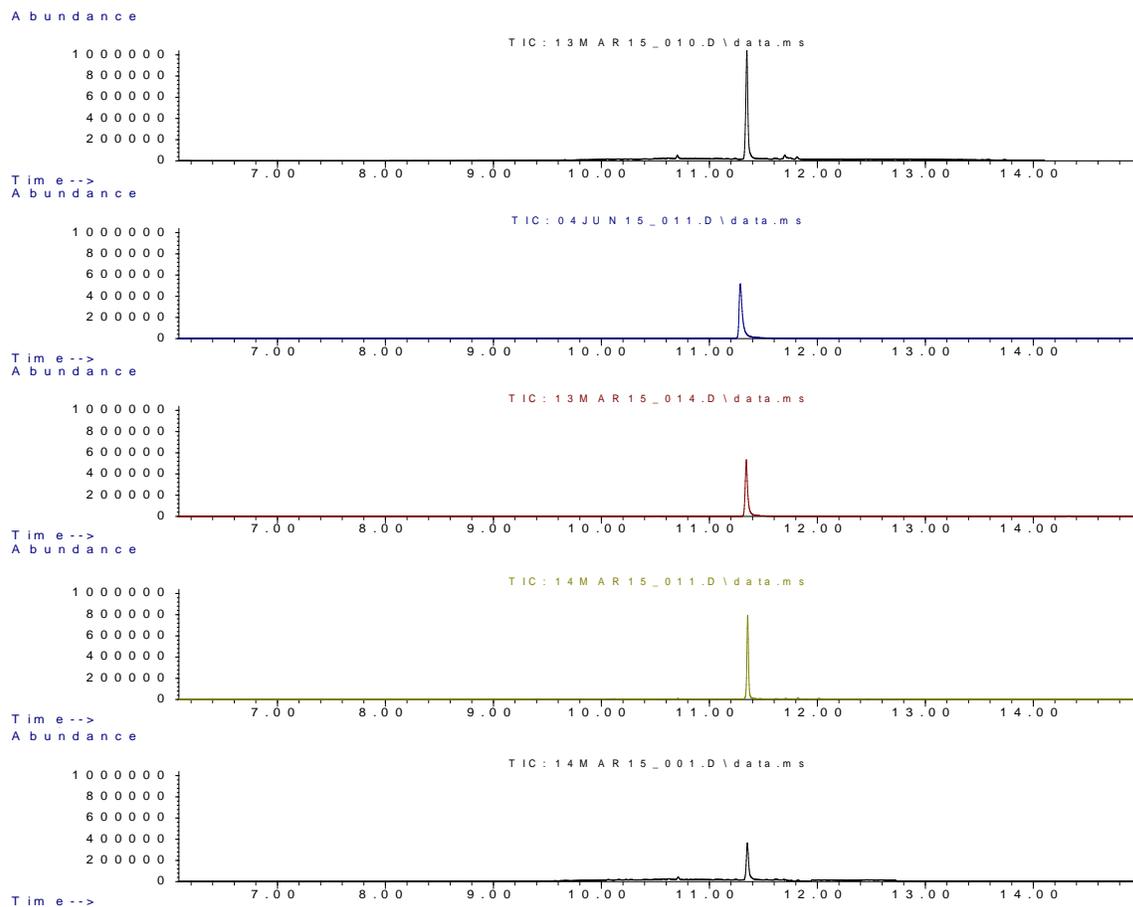


Time-->

ANEXO 6. Cromatograma de degradación de clorpirifos por *P. oryzae* DAMM46



ANEXO 7. Cromatograma de degradación de clorpirifos por *Serratia gimesii* DAMM47



ANEXO 8. Procedimiento de extracción de ADN con CTAB 2%

1. Precalentar el CTAB 2% (Tris HCl 10 mM pH 8.0, Na₂ EDTA 2H₂O 20 mM pH 8.0, CTAB 2%, NaCl 1.4 M a 60 °C) para diluirlo.
2. Poner 250 µL de H₂O grado HPLC en tubo de 2 mL. Diluir biomasa auxiliándose con punta estéril. Agregar el CTAB 2%. Inducir a vórtex.
3. Incubar tubos a 96 °C durante 60 min. Mezclar a intervalos de 10 min en vórtex.
4. Centrifugar a 11,150 rpm durante 5 min.
5. Transpasar el sobrenadante en tubo nuevo de 2 mL.
6. Agregar 500 µL de cloroformo isoamílico (24:1). Mezclar por inmersión cada tubo durante 10 min.
7. Centrifugar a 11,150 rpm durante 10 min. Descartar sobrenadante con ayuda de pipeta para no coleccionar la fase inferior.
8. Agregar 700 µL de cloroformo isoamílico (24:1) en un tubo nuevo. Mezclar durante 10 min por inversión.
9. Centrifugar 11,150 rpm durante 10 min. En un tubo nuevo adicionar 950 µL de etanol 100% (frio, -20 °C).
10. Mezclar por inversión (siete veces mínimo).
11. Incubar a -20 °C durante por lo menos 2 h.
12. Centrifugar a 11,150 rpm durante 30 min. Descartar sobrenadante evitando perder el pellet.
13. Resuspender en 400 µL de buffer TE o H₂O grado HPLC. Incubar a 55 °C durante 15 min.
14. Añadir 34 µL de NaOAc 3 M y 1 mL de Etanol 95%. Incubar a -20 °C durante 1 h.
15. Centrifugar a 11,150 rpm durante 5 min. Descartar sobrenadante.
16. Lavar la pastilla o pellet con 600 µL de isopropanol 70%. Centrifugar a 11,150 rpm durante 10 min. Descartar sobrenadante.
17. Secar la pastilla (los lavados de la pastilla dependen del color de esta). Resuspender en 100 µL (en función del tamaño de la pastilla) de buffer TE.
18. Almacenar a -20 °C.
19. Cuantificar el ADN. En el Nanodrop, el ácido nucleico debe tener una relación de absorbancia 260/280 entre 1.8 y 2.0. Realizar el cálculo diluirlo y tener una concentración de 20 ng µL⁻¹ útil para la PCR.

ANEXO 9. Metodología para preparación de células quimiocompetentes.

1. Inocular 1 mL de un precultivo en 100 mL de medio LB y se suplementa con 20 mmol L⁻¹ de disolución de MgCl₂. La densidad óptica a 600 nm se selecciona en el intervalo de 0.4 a 0.6.
2. Las células se coleccionan mediante centrifugación a 8,000 rpm a 4 °C durante 10 min, el sobrenadante se desecha y la biomasa bacteriana se re suspende en 20 mL de una disolución de 50 mmol L⁻¹ de CaCl₂ previamente colocada sobre hielo.
3. La suspensión se dispone en baño de hielo durante 30 min y las células nuevamente se coleccionan por centrifugación a 8,000 rpm durante 10 min.
4. Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se re suspende en una mezcla de una disolución de 50 mmol L⁻¹ de CaCl₂ con glicerol al 20%. La mezcla previamente colocada sobre hielo y la concentración celular obtenida debe ser aproximadamente de 5 x10⁹ UFC mL⁻¹.
5. Finalmente, alícuotas de 200 µL se conservan a -70 °C.

ANEXO 10. Metodología para la preparación de células electrocompetentes.

1. Preparar un cultivo overnight de la cepa (precultivo). 37 °C para *E. coli*, 28 °C para *P. oryzihabitans*.
2. Inocular un volumen 1/100 del precultivo en un matraz de 50 mL.
3. Incubar a 37 °C, 300 rpm, hasta obtener una DO₆₀₀ de 0.5 a 0.7.

4. Poner las células en hielo 20 min aproximadamente. Para los pasos siguientes mantener las células en frío.
5. Transferir las células a tubos Falcon previamente enfriados. Centrifugar a 7,000 rpm, 4 °C, 8 min. No usar freno en la centrifuga.
6. Descartar sobrenadante.
7. Resuspender el pellet en 5 mL de glicerol 10% (previamente enfriado). Realizar tres lavados de esta manera.
8. Resuspender el pellet en un poco de glicerol restante (aprox. 200 µL) del último centrifugado.
9. Conservar a -80 °C.

ANEXO 11. Metodología para ligación de fragmentos.

1. Preparar la mezcla de ligación con:
 - 3 µL de vector
 - 6µL de Buffer de ligación 5X
 - Producto de PCR (se considera el tamaño del fragmento para calcular el volumen).
 - Agua libre de nucleasas (aforar a 30 µL de volumen total)
 - 1µL de Ligasa DNA de T4.
2. Inducir a vórtex y centrifugar de 3-5 s.
3. Incubar la mezcla de ligación a temperatura ambiente (22 °C) durante 1 h. Si se requieren más transformadas incubar a 4 °C (*overnight*).
4. Usar 2.5 µL de la mezcla de ligación directamente en la transformación bacteriana.
5. Conservar a -20 °C si se requiere trabajar después.

ANEXO 12. Transformación bacteriana por electroporación.

1. Se colocan 100 µL de células competentes y de 1 a 10 µL del vector (o de ligación) en un tubo Eppendorf. Se prepara esta elución en agua mQ. Es conveniente realizar una diálisis; para ello, en una placa de Petri colocar agua, después una membrana (la parte brillante hacia arriba) y 10 µL del vector.
2. Por separado, se secan las cubetas en campana de flujo laminar y se colocan en hielo.
3. Transferir mezcla a la cubeta.
4. Colocar la cubeta en electroporador.
5. Dar pulso e inmediatamente sacar la cubeta y añadir 800 µL de medio SOB para *E. coli* (Medio Kings para *Pseudomonas*). Nota: para *Agrobacterium* es necesario agregar dos veces 800 µL de medio TY inmediatamente.
6. Incubar a 37 °C durante 1 h 30 min.
7. Sembrar en placas de Petri previamente preparada con el antibiótico requerido en función del mapa genómico del vector.