UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Campus Tuxpan

Maestría en Ciencias del Ambiente

“Degradación de los plaguicidas endosulfán y malatión por cepas bacterianas aisladas de suelo agrícola”

Que para obtener el título de:

MAESTRA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

P R E S E N T A:

Ana Catya de Jesús Jiménez Torres

Director:

Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Co- directores:

Dr. Pablo San Martín del Ángel

Dra. Adela Irmene Ortiz López

Tuxpan, Ver. 2014

Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Maestría en Ciencias del Ambiente

Universidad Veracruzana

Revisión del trabajo de intervención de la alumna: **Ana Catya de Jesús Jiménez Torres**

Nombre	Fecha	Fecha	Dictamen	Firma
Ma. Alejandra Lopez T		26/Sept/14	Aprobada la tesis p/presentación del examen	
Rodrigo Cuevas González		26/Sep/14	aprobada	
Marisela López Ortega		26/sep/2014	Aprobada	

En la presente revisión se acordó que el trabajo de intervención denominado "Degradación de los plaguicidas endosulfán y malatión por cepas bacterianas aisladas de suelo agrícola" que presenta el sustentante para obtener el Título de Maestra, está terminado por lo que puede proceder a su inmediata impresión.

El presente trabajo de intervención: **"Degradación de los plaguicidas endosulfán y malatión por cepas bacterianas aisladas de suelo agrícola",** realizada por la C. Ana Catya de Jesús Jiménez Torres, bajo la dirección de la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera y asesoría del consejo particular del Dr. Pablo San Martín del Ángel y de la Dra. Adela Irmene Ortiz López, ha sido revisado y aprobado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

DRA. ROSA IDALIA HERNÁNDEZ HERRERA

DIRECTOR

DR. PABLO SAN MARTÍN DEL ÁNGEL

DRA. ADELA IRMENE ORTIZ LÓPEZ

CODIRECTOR

Tuxpan de Rodríguez Cano, Ver. septiembre 2014

Casa abierta al tiempo

El presente estudio es fruto del trabajo en colaboración con la **Universidad Autónoma Metropolitana**. Realizando parte de la fase experimental en el laboratorio del Departamento de Procesos y Tecnología, Unidad-Cuajimalpa México, DF. El más sincero agradecimiento a la Dra. Irmene Ortiz López y a su equipo de trabajo.

AGRADECIMIENTOS

*A **Dios**.*

A todas las personas que influyeron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

*Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por otorgar la beca 490605 para el curso del posgrado.*

*A la Dra. **Irmene Ortiz López**, por compartir su conocimiento, por su confianza, esfuerzo y cooperación para la realización de este proyecto.*

*Al Dr. **Pablo San Martin del Ángel**, por reafirmar a cada momento la importancia de la responsabilidad para lograr sobresalir, por su tiempo y paciencia para la realización de este proyecto.*

*Al Ing. **Antonio Velasco** por su ayuda en la utilización del equipo y en el montaje del experimento.*

*A la **comisión revisora**, por todas sus sugerencias y correcciones acertadas.*

*Por ultimo pero no menos importante, a la Dra. **Rosa Idalia Hernández Herrera**, le agradezco por ser la primera persona en confiar en mi profesionalmente y hoy compartir conmigo un logro más, por el tiempo que ha dedicado a este proyecto, por el trabajo y el esfuerzo invertido. Gracias por su amistad.*

DEDICATORIA

A mi madre, cada nuevo reto está inspirado en ti. Gracias por guiarme y mostrarme las verdaderas riquezas de la vida. Te amo.

"La mente es como un paracaídas... Solo funciona si la tenemos abierta".

Albert Einstein

RESUMEN

Se aislaron dos cepas bacterianas a partir de un suelo agrícola, ambas con capacidad de crecimiento en presencia de endosulfán, las cuales se determinaron por sus características bioquímicas, morfológicas y por análisis del fragmento del gen RNA 16S como *Enterobacter cloacae* cepa PMM16 (E1) y *E. amnigenus* cepa XGL214 (M1), esta última también con capacidad de crecimiento en presencia de malatión. La cepa E1 removió endosulfán I (α-endosulfán) hasta en un 84.64% ± 8.95 y endosulfán II (β-endosulfán) desde 86.31% ± 1.18 hasta no ser detectado después de 24 días de exposición. La cepa M1 removió 74.39% ± 8.95 y 87.070%, de α-endosulfán y β-endosulfán respectivamente. En cuanto al malatión, se presentó una degradación de 80.44% ± 15.61 por la cepa (M1), mientras que en el segundo experimento a los 24 días el compuesto no fue detectado. Los resultados de la cinética de crecimiento por actividad metabólica mediante la producción de CO_2 y por biomasa, mostraron que las cepas bacterianas aisladas son capaces de utilizar los plaguicidas como única fuente de carbono en medio mineral en condiciones aerobias y son capaces de subsistir en estas condiciones sin afectar su crecimiento.

Palabras clave: Endosulfán, malatión, *Enterobacter cloacae* PMM16, *Enterobacter amnigenus* XGL214, degradación.

ABSTRAC

Two bacterial from agricultural soil strains capable of growth both in the presence of endosulfan were isolated, which are determined by its biochemical, morphological and analysis of 16S RNA gene fragment as *Enterobacter cloacae* strain PMM16 (E1) and *E. amnigenus* strain XGL214 (M1), the latter also capable of growth in the presence of malathion. The E1 strain removed endosulfan I (α-endosulfan) up to 84.64% ± 8.95 and endosulfan II (β-endosulfan) from 86.31 ± 1.18% to not be detected after 24 days of exposure. Degradation by strain M1 was 74.39% ± 8.95 and 87.07% of α-endosulfán y β-endosulfán respectively. The malathion degradation by strain (M1) was 80.44% ± 15.61, while in the second experiment at 24 days, the compound was not detected. The results of the kinetics of growth by metabolic activity using the production of CO2 and biomass showed that the bacterial isolates are capable of using the insecticides as sole carbon source in mineral medium under anaerobic conditions and are able to survive in these conditions without affecting its growth.

Key words: Endosulfan, malation, *Enterobacter cloacae* PMM16, *Enterobacter amnigenus* XGL214, degradation.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS iv
DEDICATORIA v
RESUMEN vi
I.- INTRODUCCIÓN 1
II.- ANTECEDENTES 4
III.- OBJETIVOS 11
3.1. Objetivo General: 11
3.2. Objetivos Particulares: 11
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS 12
4.1 Toma de muestras 12
4.2 Preparación de las muestras para el análisis 13
4.3 Caracterización del suelo 13
4.4. Aislamiento bacteriano 14
4.4. Caracterización y determinación taxonómica de las bacterias 15
4.4.1 Tipificación bioquímica 15
4.4.2 Extracción de DNA, PCR y análisis rRNA 16S 15
4.5. Aclimatación de las cepas bacterianas 17
4.7 Extracción de los plaguicidas 18
4.6 Biodegradación de los plaguicidas 18
4.8 Análisis por cromatografía de gases 21
4.9 Análisis estadístico 22
V. RESULTADOS 23
5.1 Análisis fisicoquímico del suelo 23
5.2 Detección y cuantificación de plaguicidas en el suelo 25
5.3 Caracterización y determinación taxonómica 27
5.3.1 Tipificación bioquímica 27
5.3.2 Análisis molecular rRNA 16S 31
5.4 Cinética de crecimiento de las cepas bacterianas en presencia de los insecticidas. 32
5.4.1 Actividad metabólica. 32
5.4.2 Biomasa bacteriana. 36

5.5 Biodegradación bacteriana 38
DISCUSIÓN 44
CONCLUSIÓN Y APLICACIÓN PRÁCTICA 53
BIBLIOGRAFÍA 55
ANEXO A 65
ANEXO B 70
ANEXO C 71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Georeferenciación de los puntos de muestreo……..…..12

Tabla 2. Diseño experimental……..19

Tabla 3. Resultados del análisis fisicoquímico del suelo……23

Tabla 4. Resultado de las pruebas bioquímicas aplicadas……..….27

Tabla 5. Resultados obtenidos a partir del Sistema API 20E ®……..…….29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proporciones de la clase textural del suelo…….24

Figura 2. Compuestos detectados en muestreo preliminar……..25

Figura 3. Compuestos detectados en muestreo inicial……...26

Figura 4. Morfología de las bacterias.……...27

Figura 5. Amplificación del producto de la PCR……..31

Figura 6. Producción de CO_2, controles endógenos……...32

Figura 7. Producción de CO_2, tratamiento con endosulfán……33

Figura 8. Producción de CO_2, tratamiento con malatión……..….35

Figura 9. Cinética de crecimiento *Enterobacter cloacae* PMM16…….……....36

Figura 10. Cinética de crecimiento *Enterobacter amnigenus* XGL214……....37

Figura 11. Degradación de malatión por *Enterobacter amnigenus* XGL214...…..38

Figura 12. Degradación de endosulfán I y II por *Enterobacter cloacae* PMM16....39

Figura 13. Degradación de endosulfán I y II por *Enterobacter cloacae* PMM16....41

Figura 14. Degradación de malatión por *Enterobacter amnigenus* XGL214……..42

Figura 15. Resultados de la prueba. Bacilos Gram (-)……...……....65

Figura 16. Resultado prueba oxidasa……...67

Figura 17. Resultado prueba SIM (Sulfhídrico- indol- motilidad)…….……...68

Figura 18. Extracción de los plaguicidas Sólido-líquido……...…….71

Figura 19. Extracción de los plaguicidas . Líquido-líquido……..72

I.- INTRODUCCIÓN

Mundialmente se ha dado un uso indiscriminado de los plaguicidas, este uso, anualmente se estima en una cantidad de 5,2 millones de estos compuestos (Grube *et al*., 2011). De esta manera, el estudio de las fuentes, su distribución, transformación y acumulación en los ecosistemas ha resultado de gran interés y se ha determinado que están presentes desde áreas muy pobladas hasta en zonas remotas del mundo, detectándose en diversas matrices ambientales, debido al transporte de estos compuestos desde las áreas de las que están en uso, hasta en las que su uso es escaso e incluso nulo (Ali *et al.,* 2014; Ratola *et al.,* 2014; Li *et al*., 2007).

En México se calcula que se emplean 260 marcas de estos productos químicos y debido a las deficientes medidas de control y previsión, el uso de estos compuestos es de las principales causas de intoxicación (CICLOPLAFEST, 2008).

Los plaguicidas endosulfán y malatión a pesar de pertenecer a dos familias químicas diferentes, ambos son de uso extenso, siendo el primero, uno de los plaguicidas más prominentes en México (Wong *et al.*, 2010). El endosulfán tiene un alto nivel de toxicidad y genotoxicidad (Li *et al.,* 2011). Mientras que el malatión, posee un bajo potencial de carcinogenicidad, y su toxicidad aguda también es alta, en estudios en rata, su exposición durante la lactancia puede

inducir disfunciones hepáticas y renales, así como trastornos funcionales y metabólicos (CICOPLAFEST, 2004) (Selmi *et al.,* 2013), ambos plaguicidas son inhibidores endócrinos (PAN , 2009) y se considera la exposición a estos compuestos como un factor de riesgo potencial para el desarrollo de enfermedades crónicas (Mostafalou y Abdollahi, 2013). Aunado a esto se le agregan dos factores importantes como es su persistencia, ya que se sabe que ambos productos son bioacumulables, y la facilidad de dispersión, dado que se ha determinado su presencia en poblaciones incluso no expuestas directamente a estos compuestos (Burillo *et al*., 2014).

Es por esto que se han buscado estrategias para mitigar este tipo de contaminación; siendo una opción potencial la capacidad metabólica bacteriana de degradación de estos xenobioticos para contribuir a la disminución de sus niveles en el ambiente. Teniendo en cuenta el hecho de que los microorganismos se han adaptado a la exposición de plaguicidas después de haber estado en contacto con los suelos contaminados, el primer paso es aislar y caracterizar cepas bacterianas que presentan capacidad de degradación de dichos compuestos, ya que diferentes cepas en conjunto pueden generar sinergias que faciliten el proceso de degradación y emplearlas así en técnicas de biorremediación (Carrillo *et al.*, 2004) (Sivagnanam y Jayanthi, 2014) (Festa *et al*., 2013).

Dado este contexto, en el presente trabajo se realizó la caracterización de dos cepas bacterianas aisladas a partir de un suelo agrícola del ejido de Poza de

Cuero, Municipio de Tihuatlán, Veracruz, para evaluar su capacidad biodegradativa a dos tipos de plaguicidas, endosulfán y malatión. Esto permitió conocer las especies bacterianas autóctonas con potencial para degradar los plaguicidas de estudio.

II.- ANTECEDENTES

Los plaguicidas son productos químicos empleados por el hombre para el control de plagas agrícolas. Según la definición de la FAO, 2012, un plaguicida es 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.

Los plaguicidas de acuerdo a su acción insecticida se dividen en insecticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. Los insecticidas organoclorados constituyen algunas familias de compuestos de importancia histórica, desarrollados poco antes y durante la segunda Guerra Mundial. Cuando Müller descubrió las propiedades del DDT inició una revolución en el campo de los plaguicidas, desencadenando la incorporación de productos derivados de síntesis orgánica a la lucha contra plagas y enfermedades (Albert y Loera, 2005).

Se pueden distinguir fundamentalmente tres familias de los organoclorados: la del DDT y análogos, la del hexaclorociclohexano (HCH), también conocido como lindano y la de los ciclodienos clorados (Jiménez, 2002).

El endosulfán (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6-9-metano-2,4,3-benzodioxatiepin 3-óxido) es un plaguicida organoclorado, de uso agrícola e industrial, se encuentra en el nivel II según la categoría toxicológica, en el suelo es moderadamente persistente; la fracción disponible es degradada en semanas, formando sulfato de endosulfán como el metabolito más importante, el cual es relativamente estable y persistente. Por su parte, la fracción adsorbida a las partículas puede persistir por años y es poco propensa a lixiviarse, junto con el DDT y toxafenos es uno de los plaguicidas más persistente (Wong *et al.* 2010) (CICOPLAFEST, 2004).

Por otro lado, los insecticidas organofosforados, derivados fosfóricos ocupan hoy en día también un lugar preponderante entre los plaguicidas más conocidos y utilizados, ya que constituyen un grupo muy efectivo.

Los plaguicidas organofosforados tienen diferentes características comparados con los organoclorados, entre ellas, su baja persistencia en el ambiente, su no acumulación en el organismo y su bajo potencial de carcinogenicidad; sin embargo, su toxicidad aguda es elevada Algunos productos de este tipo son extremadamente tóxicos y se han empleado con fines bélicos como gases

neurotóxicos. Estos compuestos se absorben bien por inhalación, ingestión y vía cutánea y su mecanismo de acción es por inhibición de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (CICOPLAFEST, 2004).

Con respecto, al malatión (dietil (dimetoxitiofosforiltio) succinato o S-1,2-bis(etoxicarbonil)etil O,O-dimetil fosforoditioato) es un plaguicida organofosforado de un amplia gama de usos, tales como uso agrícola, pecuario, jardinería, urbano e industrial, se encuentra en la categoría IV de toxicidad, pero en peces, su toxicidad puede variar de ligero a extremadamente tóxico en función de la especie, es altamente tóxico en abejas y moderadamente tóxico en aves. Es ligeramente persistente, la velocidad de su degradación depende del contenido de materia orgánica presente en el suelo y del grado de adsorción a las partículas. La afinidad de este compuesto por el suelo varía de muy baja a moderada y puede constituir un riesgo de contaminación para las aguas subterráneas en sitios donde las condiciones no favorezcan su degradación (CICOPLAFEST, 2004).

El empleo de ambos agroquímicos en las actividades agropecuarias es una de las más grandes amenazas para la pérdida de la fertilidad de los suelos, de su capacidad biodegradadora y otras funciones, frecuentemente mediante prácticas inadecuadas, constituye una de las formas de contaminación más importantes, 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 las especies marinas. Por otro lado, la aplicación de plaguicidas también genera conflictos sociales por el

elevado número de trabajadores del campo intoxicados por estos productos, con un alto índice de mortalidad, así como también por la sospecha de efectos adversos sobre la salud de las comunidades vecinas (Lichtinger *et al*., 2001).

Se menciona que México en el 2003 duplicó el uso de plaguicidas, alcanzando el segundo lugar en América Latina y se ha reportado que aunado al incremento en la utilización de los organofosforados, también aumentaron las intoxicaciones agudas (Palacios, 2003).

Según los datos disponibles, en México las regiones con mayor uso de plaguicidas en México son: Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco-Nayarit-Colima, Sonora-Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México y Puebla-Oaxaca (Albert, 2005). Se calcula que alrededor del 65% del consumo nacional de plaguicidas se aplica en los cultivos de maíz, sorgo, soya, caña de azúcar, arroz, hortalizas y pastos (Real *et al.*, 2005).

Se ha detectado la presencia de concentraciones de plaguicidas organoclorados persistentes en el suelo, paja y granos de trigo y se afirma que al movilizarse los plaguicidas acumulados en los suelos agrícolas estos penetran a las plantas de trigo, convirtiéndose en una fuente de contaminación adicional para los consumidores (Waliszewski e Infazon, 2003).

Debido a esta bioacumulación en el ambiente, a su alto grado de contaminación en el suelo por su persistencia y toxicidad, y el problema de salud que representa el uso de los plaguicidas. Actualmente, se ha considerado como alternativa la biorremediación de los suelos contaminados; dada la capacidad metabólica de algunos microrganismos como las bacterias, se evidenciado su potencial para degradar los plaguicidas y contribuir a la disminución de sus niveles en el ambiente (Carrillo *et al.*, 2004).

La presencia de bacterias en suelos agrícolas capaces de metabolizar dichos compuestos ha recibido una especial atención, debido a que han sido el resultado de un proceso de evolución de poblaciones microbianas autóctonas que se han adaptado a estos contaminantes y porque proveen la posibilidad de ser usadas *in situ* en la detoxificación de ambientes severamente contaminados, ya que se ha demostrado la capacidad de las algunas cepas bacterianas para crecer en presencia de estos compuestos y utilizarlos como única fuente de carbono y removerlos en medio rico(Ortiz *et al.,* 2001) (Ortiz y Sánchez, 2010)

De esta manera se han seleccionado diversos consorcios bacterianos aeróbicos con capacidad degradadora de plaguicidas persistentes como los organoclorados (Gómez *et al.*, 2003). A partir de esto, se han empleado diversas técnicas como la estimulación de poblaciones bacterianas nativas de suelos contaminados mediante la adición de cosubstratos como fuente de carbono, esta técnica de

estimulación bacteriana ha arrojado resultados favorables para la remoción de plaguicidas organoclorados (Ortiz *et al.,* 2012).

No obstante, también se ha observado que aunado a la degradación de los compuestos, ésta es acompañada por una disminución en la toxicidad de los mismos (Awasthi *et al*., 2003). Demostrando una capacidad de adaptación microbiana y el potencial para ser empleados en estrategias de biorremediación.

Se han reportado diversos estudios en donde se ha determinado la degradación del malatión y sus análogos, por cepas bacterianas, obteniendo la producción de distintos metabolitos de dicho compuesto (Singh *et al*., 2012). Demostrándose que la mineralización del malatión se debió principalmente a la actividad bacteriana (Levanon, 1993).

En pruebas de degradación del malatión aplicado directamente en campo, se obtuvieron resultados favorables que indican la viabilidad de ciertos microorganismos bacterianos para la degradación de este compuesto (Mosquera y Peñuela, 2009).

Cabe mencionar que se ha reportado el aislamiento bacteriano no solo partir de suelo, sino también de agua contaminada con malatión, demostrando la biodegradación del mismo, suministrando algunas fuentes de carbono convencionales adecuadas (Shan *et al*., 2009; Zeinat *et al*., 2010).

Sin embargo, durante la biodegradación de estos compuestos, los metabolitos generados pueden afectar el crecimiento de los organismos bacterianos (CICOPLAFEST, 2004).

Dado estos antecedentes, en el presente estudio se realizó primeramente el aislamiento a partir de un suelo agrícola de cepas bacterianas capaces de crecer en presencia de los compuestos de estudio; se determinaron taxonómicamente las cepas bacterias a nivel de especie, por biotipificación y por análisis del fragmento del gen RNA 16S. Finalmente, se evaluó la capacidad de dichas cepas para degradar y metabolizar endusulfán y malatión, simultáneamente se estimó la cinética bacteriana de cada cepa, para observar su actividad metabólica en presencia de los plaguicidas y evaluar su consumo.

III.- OBJETIVOS

3.1. Objetivo General:

Evaluar la capacidad de cepas bacterianas aisladas de un suelo agrícola para la degradación de los plaguicidas endosulfán y malatión.

3.2. Objetivos Particulares:

- Caracterizar físico-químicamente el suelo agrícola muestreado.

- Determinar taxonómicamente a nivel de género las bacterias del consorcio bacteriano aislado.

- Estimar la cinética de crecimiento bacteriano en presencia de los plaguicidas de estudio.

- Estimar la cinética de consumo de endosulfán y malatión por cepas bacterianas.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Toma de muestras

Se realizaron dos muestreos: uno preliminar y un muestreo inicial, en ambos, la muestra de suelo se tomó del Ejido de Poza de cuero, Municipio de Tihuatlán, Veracruz. El área de estudio es un ejido con cultivos de cítricos, mango, plátanos y vainilla, en cual se han utilizado los plaguicidas de estudio para mantener sus cultivos. El muestreo se realizó en base a la norma NOM- 021-SEMARNAT- 2000, que establece la clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

Para la recolección del suelo se delimitó un área aproximada de 1500 m^2 dentro de la cual se tomó una muestra compuesta (5 submuestras) (tabla.1) utilizando un muestreo aleatorio en cinco de oros. Se removió la capa superficial presente y se excavó hasta una profundidad de 20 cm aproximadamente (Benavides *et al*., 2006).

Tabla 1. Georeferenciación de los puntos de muestreo

PUNTO DE MUESTREO	N	W
1	20° 34.089	097° 26.961
2	20° 34.040	097° 26.976
3	20° 34.062	097° 26.910
4	20° 34.090	097° 26.838
5	20° 34. 025	097° 26.864

4.2 Preparación de las muestras para el análisis

Una vez colectado el suelo, se procedió a transportarlo al laboratorio de biotecnología ambiental de la Universidad Veracruzana, donde se secaron las muestras a temperatura ambiente por 120 h para obtener resultados estandarizados (por kg de suelo seco). Las muestras se pasaron a través de un tamiz de 2 mm de diámetro, separando las piedras y eliminando los agregados.

A partir de la muestra compuesta se tomó 1.5 kg de suelo para el análisis físico-químico del mismo. Respecto a cada punto de muestreo se colecto 50 g de suelo de cada muestra y se almaceno en frascos de vidrio para la detección de los plaguicidas.

4.3 Caracterización del suelo

Para la caracterización del suelo se llevaron a cabo los siguientes análisis, a) físicos: Clase textural, densidad real, granulometría, capacidad de campo; b) químicos: materia orgánica, nitrógeno inorgánico, fosforo asimilable, potasio intercambiable, calcio intercambiable, pH, capacidad de intercambio catiónico, carbonatos totales, conductividad eléctrica, adsorción de sodio, manganeso, salinidad, cloruros, sulfatos, magnesio. Los análisis se realizaron en el “Laboratorio Central Universitario UACh Suelos” de la Universidad Autónoma de Chapingo.

4.4. Aislamiento bacteriano

Las bacterias con capacidad de crecimiento en presencia de los plaguicidas se aislaron a partir del suelo de estudio, utilizando medio mineral rico, el cual previamente se esterilizó en autoclave a 14.5 lb de presión por 15 minutos a 120 °C.

Se colocaron 50 ml de medio mineral en frascos de vidrio previamente esterilizados, se añadieron 5 g de muestra de suelo y 1 ml del plaguicida de estudio respectivamente, obteniéndose una concentración de 21 mg/kg de malatión y 7.5 mg/kg de endosulfán (5.25 mg/kg de endosulfán I y 2.25 de endosulfán II) comerciales (fyfanon y sufan 35), los plaguicidas para este estudio fueron elegidos en base a la Guía de Plaguicidas Autorizados de Uso Agrícola.
Los tratamientos experimentales se realizaron por triplicado y se incubaron a 36°C. Se evaluó la presencia microbiana sembrando por estría en placa de agar soya tripticaseina (Difco) a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

Las colonias se eligieron en función de su morfología, color, bordes, tamaño, superficie y su capacidad de tolerancia a crecer en presencia de los plaguicidas de estudio. Una vez aisladas las colonias, se realizaron resiembras sucesivas para su purificación en placas de agar soya tripticaseina conteniendo 15 mg/ L. Las colonias se incubaron durante 24 horas a 36°C.

4.4. Caracterización y determinación taxonómica de las bacterias

La determinación de las cepas del consorcio bacteriano aislado se realizó a partir de una colonia aislada de cada cepa, mediante la implementación de pruebas bioquímicas y análisis molecular del fragmento del gen rRNA 16S.

4.4.1 Tipificación bioquímica

Para la caracterización bioquímica, a partir de un inoculado bacteriano (una colonia bacteriana fresca de cada cepa en 5 ml de agua destilada y estéril), se aplicó el sistema de identificación api® 20E., que consiste en una galería de plástico con microtubos que contienen diferentes medios deshidratados o diferentes sustratos de enzimas, lo que conforman 20 test bioquímicos (β - galactosidasa, arginina- dihidrolasa, lisina y ornitina descarboxilasa, citrato, producción de H_2S, ureasa, triptófano desaminasa, producción de indol, producción de acetoina, gelatinasa, fermentación / oxidación de glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amygdalina, arabiosa).

Simultáneamente se aplicaron diferentes pruebas bioquímicas como indol, oxidasa, tinción Gram, motilidad y anaerobiosis (Anexo A).

4.4.2 Extracción de DNA, PCR y análisis rRNA 16S

A partir de un cultivo en medio agar Luria Bertani, se tomó una colonia de cada cepa, se disolvió en 50 µl de agua miliQ. y se agregaron 50 µl de cloroformo, se

mezcló con vortex por medio minuto. Posteriormente se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a máxima velocidad (13,500 rpm), del centrifugado se tomaron 5 µl de DNA (sin tocar la fase orgánica). Consecutivamente se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificando con el cebador de inicio 63F (59-CAGGCC TAA CAC ATG CAA GTC-39) y cebador reverso 1387R (59-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-39), Tm= 55 ºC, Amplicón: 1500pb. La amplificación se realizó en reacciones de 50 µl [4 µl de cada cebador (5 µM), 4 µl de dNTP´s (2.5 µM), 5µl de buffer (10X), 10 µl de buffer (5X, GC), 1µl de dimetil sulfóxido (DMSO), 1 µl de Taq polimerasa (Hight Fidelity), 19 µl de H_2O y 2 µl de DNA. Las condiciones de la reacción fueron (i) 4 min. a 94°C, (ii) 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 55°C y 1:30 min. a 72°C, (iii) 7 min. a 72°C. El resultado de la PCR se comprobó electroforéticamente, en gel de agarosa al 1% teñido con gel red. Posteriormente se procedió a purificar el fragmento de PCR mediante el protocolo de "Purificación de DNA de fragmentos de PCR" (GE healthcare) (Anexo B). Una vez purificados los amplificados, se enviaron al servicio de Secugen (Sequencing and molecular diagnostics) (Madrid, España), para su secuenciación.

Para ensamblar y editar las secuencias se utilizó el paquete informático SnapGen Viewer, ingresando las secuencias de cada cepa por separado. El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo mediante el paquete informático CLUSTAL W.

Las secuencias se compararon con las del gen 16S rRNA de bacteria depositadas en el GenBank (Benson *et al*., 2013), por medio de un alineamiento con la

herramienta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool). Esta comparación mostró los alineamientos más significativos para designar el taxón más cercano a cada secuencia.

4.5. Aclimatación de las cepas bacterianas

A partir del aislamiento bacteriano de suelo agrícola, las cepas bacterianas se aclimataron con los dos diferentes plaguicidas comerciales: endosulfán y malatión.

Iniciando el tratamiento con una concentración inicial de 5 mg/ L, las cepas bacterianas se cultivaron en 500 mL de medio nutritivo caldo Luria Bertani (Sigma) con una concentración inicial de 5 mg/ L del respectivo plaguicida, por 168 h a 35°C a 150 rpm, e incrementando la concentración cada 24 horas haciendo recambios del medio hasta alcanzar una concentración máxima de 20 mg/ L para cada plaguicida. Para obtener un inóculo bacteriano puro ya aclimatado a los plaguicidas de estudio, se centrifugó el cultivo a 4000 rpm durante 4 minutos, el pellet se resuspendió en 10 mL de agua destilada y estéril, posteriormente se realizaron cuatro lavados continuos bajo las mismas condiciones. Finalmente se resuspendieron las cepas bacterianas en 10 mL de agua destilada, estéril y se homogenizaron con un vortex (un toque). A partir de este inóculo bacteriano se realizó el diseño experimental para ambos plaguicidas.

4.7 Extracción de los plaguicidas

Para conocer la concentración de los insecticidas presentes en el suelo de estudio, se siguió el protocolo de extracción de plaguicidas sólido- líquido US-EPA 2007b (Anexo C), a partir de 5 g de suelo de cada muestra. Posteriormente se procedió a concentrar la muestra en un rotoevaporador y finalmente se aforó a un volumen de 1 ml con hexano.

La extracción de los plaguicidas presentes en los tratamientos experimentales se llevó a cabo una vez transcurrido el periodo de cultivo de las cepas bacterianas. Para esto se filtraron las muestras en una membrana de 40 mm con bomba de vacío. Posteriormente se procedió a realizar la extracción líquido- líquido por agitación (Anexo C). Para finalmente concentrar la muestra en un rotoevaporador y aforar a un volumen de 1 ml con hexano.

4.6 Biodegradación de los plaguicidas

Se realizaron dos experimentos de cultivo en presencia de los plaguicidas. En el primero, la biodegradación del endosulfán y malatión se analizó por triplicado en frascos herméticos (125 mL) a los que se les adicionó 30 mL de medio mineral. Como fuente de carbono se empleó el plaguicida a una concentración de 27.43 mg/ L para el malatión y 1.70 mg/ L para el endosulfán. Se adicionó 1000 µl de inoculo bacteriano respectivamente (tabla. 2). Los frascos se incubaron a una temperatura de 35°C a 150 rpm, bajo condiciones de esterilidad y fueron protegidos a fin de evitar la posible fotodegradación de los plaguicidas. Los

experimentos se desarrollaron en 575 horas por triplicado. En este experimento se midieron las concentraciones iniciales y finales de plaguicidas y se monitoreo periódicamente la producción de CO_2.

Tabla 2. Diseño Experimental

PLAGUICIDA	DISEÑO	
Malatión	Medio mineral + Plaguicida (control abiótico) **T0** Medio mineral + *Enterobacter amnigenus* (control endógeno) **T1** Medio mineral + Plaguicida + *Enterobacter amnigenus* **T2**	Por Triplicado
Endosulfán	Medio mineral +Plaguicida (control abiótico) **T3** Medio mineral + Plaguicida + *Enterobacter amnigenus* **T4** Medio mineral + *Enterobacter cloacae* (control endógeno)**T5** Medio mineral + Plaguicida +*Enterobacter cloacae* **T6**	Por Triplicado

A continuación, se realizó un segundo experimento de degradación, siendo 17.37 mg / L la concentración inicial de malatión con *Enterobacter amnigenus* en medio mineral y 6.87 mg/ L de concentración inicial de endosulfán con *Enterobacter cloacae* en medio mineral. La cantidad de inóculo bacteriano adicionado, las condiciones de temperatura, agitación, esterilidad y controles fueron los mismos. Los experimentos se desarrollaron por duplicado, por 24 días (575 h). Se descartaron frascos para análisis de plaguicidas residuales a diferentes tiempos 0 (tiempo inicial), 6, 12, 18 y 24 días (tiempo final). Esto, con la finalidad de observar

el comportamiento de degradación durante el tiempo experimental y el crecimiento bacteriano en concentraciones de los insecticidas más baja para el malatión y más alta respecto al endosulfán. Además de estimar la degradación de los isómeros del endosulfán que conforman el producto comercial.

En ambos experimentos, la concentración de CO_2 se midió en 100 µL de muestra gaseosa por duplicado por cromatografía de gases equipado con un detector de conductividad térmica (GOW MAC Serie 550, EE.UU.) y una columna concéntrica CTR1 (Alltech, EE.UU.), con helio como gas acarreador, con las siguientes temperaturas, columna 38 °C, detector 25°C, inyector 32°C.

El valor del CO_2 se estimó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de } CO_2 = (87.22 * CO_2 * \text{Factor})/N$$

87.22= Constante de calibración del equipo

CO_2= Valor crudo de la medición (área)

Factor= [(N+O)/Aire]

N= Valor de nitrógeno (área)

El porcentaje de degradación se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de degradación} = Concen_1 - Concen_2 / Concen_1 * 100$$

Concen.$_1$= Concentración inicial del plaguicida, en mg/L

Concen.$_2$= Concentración final del plaguicida, en mg/L

Para calcular la cantidad de biomasa bacteriana producida, se empleó el método por diferencia de peso seco, pasando las muestras por una membrana de 40 mm.

4.8 Análisis por cromatografía de gases

Para la detección de los plaguicidas durante el estudio se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectro de masas (Agilent 6890N, MSD 5975B, Santa Clara, CA, USA), usando una columna 5 MS (Agilent) con helio como gas acarreador. El programa para la detección del compuesto organoclorado fue el detector y el inyector a 250 y 220 ºC, respectivamente, mientras que la temperatura inicial del horno fue de 90°C y con un incremento hasta temperatura final de 250 ºC, a una velocidad de 7°C/min.

Las condiciones utilizadas para la detección del compuesto organofosforado fueron las siguientes: 250°C para el detector e inyector, la temperatura inicial del horno fue de 70 °C, con un incremento hasta temperatura final de 250 ºC, a una velocidad de 7°C/min.

4.9 Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico STATISTICA 6.0 y el programa Excel 2010 para estimar el cálculo del modelo de la cinética bacteriana y graficar el cálculo del porcentaje degradación.

V. RESULTADOS

5.1 Análisis fisicoquímico del suelo

A partir de la muestra compuesta proveniente del suelo agrícola, se llevó a cabo la caracterización del hábitat bacteriano, se realizaron análisis físicos y químicos. En la tabla 3 se muestran los resultados de los análisis, en relación a los valores de referencia citados por la NOM-021-SEMARNAT-2000. Se puede observar que la densidad real (Dr) es de 2.59 t/m^3, considerándose normal según la clasificación agronómica. Mientras la conductividad eléctrica se encuentra en (CE) 0.44 dS/m, considerándose por lo tanto libre de sales. El suelo presentó alta capacidad de intercambio catiónico (CIC) y capacidad de campo (CC). Respecto a la cantidad de cloruros (Cl) y sulfatos (SO_4) en el suelo fue baja, muy bajo en la cantidad de fosforo asimilable (P) y nitrógeno inorgánico (NiOrg).

El valor del pH fue de 8.12, la cantidad de carbonatos totales ($CaCO_3$) y materia orgánica (MO) presentes en el suelo, se encontraron a nivel medio.

Tabla 3. Resultados del análisis fisicoquímico del suelo*.

Parametro	Resultados	Clasificación agronómica
pH	(8.12)	Medianamente alcalino
CE	(0.44 dS/m)	Libre de sales
RAS	(0.25)	Sin problemas de **sodio** "intercambiable"
Cl	(0.75 meq/L)	Baja en **cloruros** en solución
SO_4	(0.89 meq/L)	Sin problemas de **sulfatos** en solución
MO	(1.88 %)	Medio en **materia orgánica**
Ninorg	(4.8 mg/kg^{-1})	Muy bajo en **nitrógeno** inorgánico
P	(3.94 mg/kg)	Bajo en **fósforo** "asimilable"
K	(250 mg/kg)	Medio en **potasio** "aprovechable"
Ca	(6,672 mg/kg)	Muy alto en **calcio** "aprovechable"
$CaCO_3$	(12.92%)	Medio en **carbonatos totales**
Mg	(222 mg/kg)	Medio en **magnesio** "aprovechable"
Mn	(16.01 mg/kg)	Moderadamente alto en **manganeso** "asimilable"
CIC	(29.1 $Cmol_{(+)}/kg$)	Alto en **capacidad de intercambio catiónico**
CC	(32.8%)	Alto en **capacidad de campo**
Dr	(2.59 t/m^3)	Normal **densidad real**

* En relación a los valores de referencia citados por la NOM-021-SEMARNAT-2000.

En cuanto a los resultados obtenidos para la clase textural, el suelo mostró una proporción de arena del 16%, limo 51% y arcilla 33% (fig. 1), por lo tanto se obtuvo que es un suelo de clase textural franco-arcilloso-limoso, de acuerdo a la clasificación agronómica del triángulo de texturas.

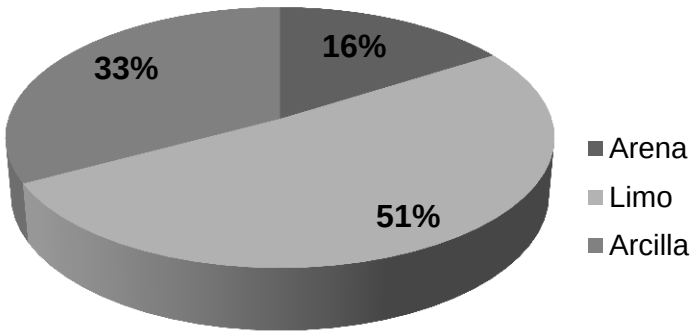


Fig. 1. Proporción de arena, limo y arcilla del suelo agrícola.

5.2 Detección y cuantificación de plaguicidas en el suelo

A partir del muestreo preliminar del suelo del área de estudio (tiempo cero) se detectó y se cuantificó la presencia de plaguicidas, expresando las concentraciones en μg de compuestos por kg de suelo seco. El isómero del compuesto de estudio, endosulfán II, se observó en las muestras de los puntos 4, 5 y en la muestra compuesta (6), con una concentración promedio de 4.37 µg/kg, siendo la concentración máxima de 6.52 µg/kg y una mínima de 1.85 µg/kg.

Por otro lado, también se detectó la presencia de dos compuestos organoclorados más, heptaclorobeceno y endrín aldehído, siendo este último el compuesto que se detectó en mayor y menor concentración, con 53.07 y 0.81 µg/kg, en la muestra compuesta (6) y en el punto 3, respetivamente, con una concentración promedio de 15.63 µg/kg (fig.2).

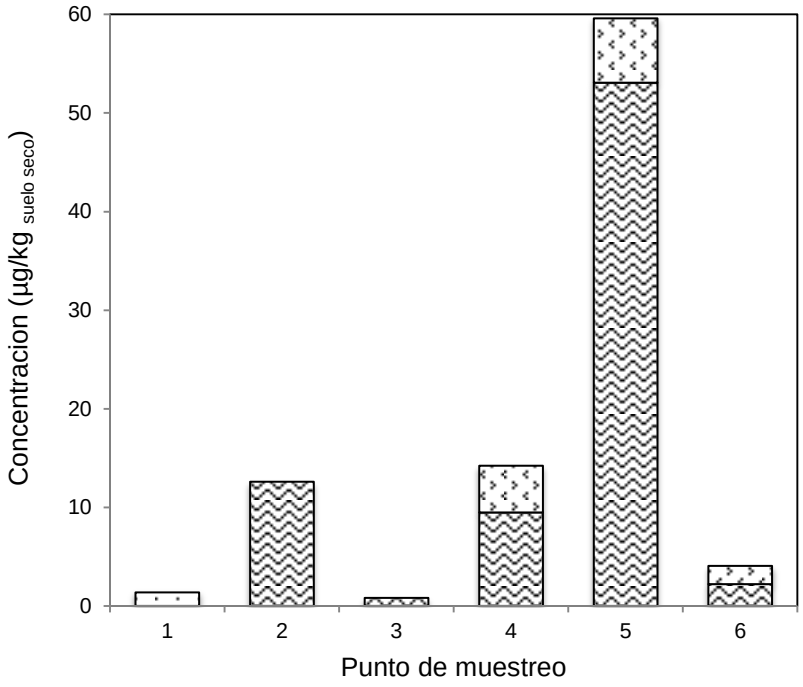


Fig. 2. Compuestos detectados en muestreo preliminar. Delta HCB (barra con puntos); endrín aldehído (barra con zigzag); endosulfán II (barra con ángulos).

Respecto al muestreo inicial del suelo se detectó la presencia de endosulfán sulfato, isómero del compuesto de estudio, obteniendo una concentración de 1.99 µg/kg en el punto 3. También fueron detectados los compuestos organoclorados endrín y heptacloro, siendo el endrín el que se detectó en mayor concentración

con 7.11 µg/kg de en el punto 3. Mientras que el heptacloro fue el compuesto que se detectó con la menor concentración del total de las muestras con 0.62 µg/kg (fig. 3).

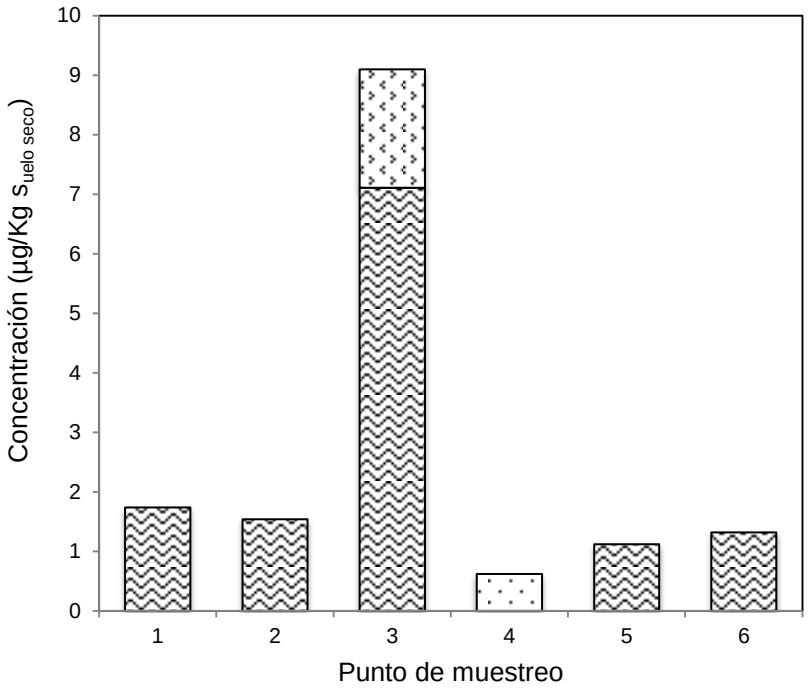


Fig. 3. Compuestos detectados en muestreo inicial. Heptacloro (barra con puntos); endrín aldehído (barra con zigzag); endosulfán sulfato (barra con ángulos).

5.3 Caracterización y determinación taxonómica

5.3.1 Tipificación bioquímica

Se aislaron dos cepas bacterianas, a las que se les asignó una clave respectivamente, M1 y E1. La cepa M1 con capacidad de crecer en presencia del plaguicida malatión, y ambas cepas E1 y M1, con capacidad de crecer en

presencia del plaguicida endosulfán. Al aplicar las pruebas bioquímicas correspondientes, se obtuvo que ambas cepas son morfotípicamente bacilos gram negativos (fig.4 a), b)), facultativos, catalasa positivos y oxidasa negativos. Ambos con presencia de motilidad (tabla.4).

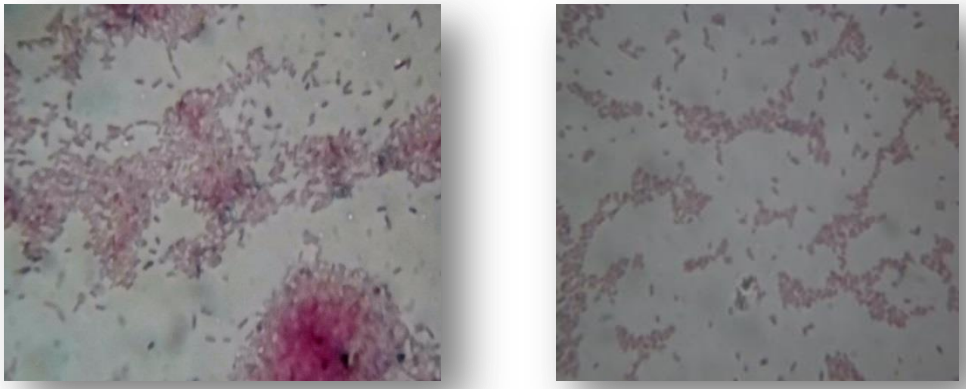


Fig. 4. Morfología de las bacterias. a) E1, b) M1. Bacilos Gram negativos.

Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas

	CEPA	
PRUEBA BIOQUIMICA	E1	M1
Tinción de Gram	Gram -	Gram -
Catalasa	+	+
Oxidasa	-	-
Crecimiento aerobio	+	+
Crecimiento anaerobio	+	+
Motilidad	+	+
Indol	-	-

Simultáneamente las cepas fueron sometidas al sistema de identificación API® 20E. De acuerdo con los resultados obtenidos de las pruebas aplicadas por medio

del sistema API® 20E (tabla 5), se determinó que la cepa E1 posee la presencia de la enzima ornitina descarboxilasa siendo positiva ante la prueba ODC. Además esta cepa produce acetoina (VP) y fermenta el sorbitol (SOR), ramnosa (RHA), sacarosa (SAC) y amigdalina (AMY). A diferencia de la cepa M1 que está fue negativa para todas las anteriores, pero se determinó positiva para la producción de ureasa (URE), gelatinasa (GEL) y fermentación de la glucosa (GLU). Mientras la E1 fue negativa a estas. Ambas cepas son fermentadoras de lactosa siendo positivas a la prueba ONPG (β- galactosidasa) y a la utilización de citrato como fuente carbono (CIT), no producen ácido sulfhídrico (H_2S), ni tampoco poseen la enzima triptofanasa, siendo negativas a indol (IND); ni presentan la lisina descarboxilasa (LDC). Pero si poseen la presencia de la enzima arginina descarboxilasa (ADH).

Ninguna de las dos cepas presentó capacidad de fermentar manitol (MAN) e inositol (INO), sin embargo se determinaron positivas a la fermentación de melibiosa (MEL) y arabiosa (ARA).

Tabla 5. Resultados obtenidos a partir del sistema API® 20E.

GALERIA api® 20 E			
		CEPA	
PRUEBA	ENZIMA	M1	E1
ONPG	β - galactosidasa	+	+
ADH	Arginina- dihidrolasa	+	+
LDC	Lisina Decarboxilasa	-	-
ODC	Ornitina Descarboxilasa	-	+
CIT	Citrato	+	+
H2S	Producción de H_2S	-	-
URE	Ureasa	+	-
TDA	Triptófano Desaminasa	+	+
IND	Producción de Indol	-	-
VP	Producción de acetoina	-	+
GEL	Gelatinasa	+	-
GLU	Fermentación / oxidación GLUcosa	+	-
MAN	Fermentación / oxidación MANitol	-	-
INO	Fermentación / oxidación INOsitol	-	-
SOR	Fermentación / oxidación SORbitol	-	+
RHA	Fermentación / oxidación RHAmnosa	-	+
SAC	Fermentación / oxidación SACarosa	-	+
MEL	Fermentación / oxidación MELibiosa	+	+
AMY	Fermentación / oxidación AMYgdalina	-	+
ARA	Fermentación / oxidación ARAbiosa	+	+

+ Positiva a la prueba.
- Negativa a la prueba.

Ambas cepas son facultativas, morfotípicamente bacilos gram negativos, catalasa positivos, oxidasa negativos y con motilidad. Siguiendo el manual de Bergey, este indica que organismos con estas características pertenecen a la familia Enterobacteriaceae. Dado a que ambas cepas no poseen la enzima triptofanasa, son negativas a indol, fermentan la lactosa y no producen ácido sulfhídrico, se determinó que ambas cepas pertenecen al género bacteriano Enterobacter. Se presume que la cepa E1 corresponde a la especie *Enterobacter cloacae*, mientras la cepa M1 pertenece a la especie *Enterobacter amnigenus*. Dado que la cepa E1 fermenta sorbitol a diferencia de la cepa M1.

5.3.2 Análisis molecular rRNA 16S

Se obtuvieron las secuencias del fragmento de un tamaño de 1500 pb, respectivamente (fig.5). Las secuencias de ambas muestras (E1, M1) se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank. El resultado arrojó que el taxón al que más se aproximan las cepas corresponde al género bacteriano Enterobacter. Perteneciendo a la especie *Enterobacter cloacae* cepa PMM16 con una identidad del 99% y 1/1234 gaps, y a la especie *Enterobacter amnigenus* cepa XGL214 con una identidad del 98% y 2/1246 gaps. El valor de E para ambos alineamientos fue de 0.0.

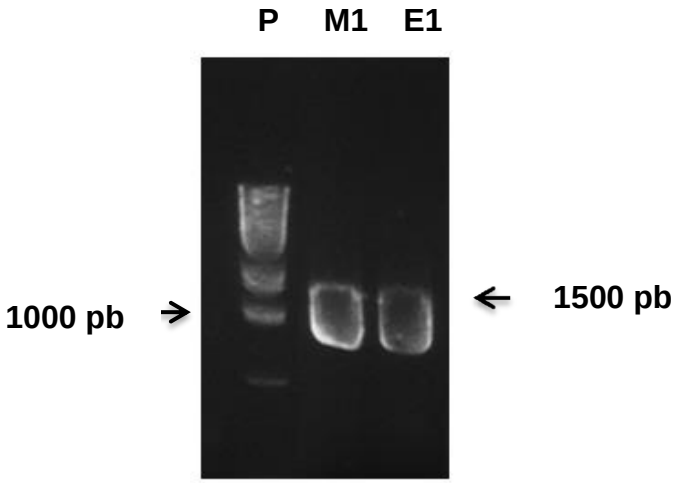


Fig. 5. Amplificación de producto de la PCR. (M1) cepa M1; (E1) cepa E1; (P) marcador de peso molecular Lambda DNA/Eco911 (BstEII) de 8453 pb. Gel de agarosa 1.5%.

5.4 Cinética de crecimiento de las cepas bacterianas en presencia de los insecticidas.

5.4.1 Actividad metabólica.

La cinética de crecimiento bacteriano se estimó por la actividad metabólica, mediante la producción de CO_2. En los controles abióticos no se detectó la producción de CO_2.

Respecto al tratamiento de malatión, el control T1 (control endógeno) de *Enterobacter amnigenus* XGL214 presentó una producción de CO_2 de 0.95 mg durante las primeras 74 h; en este tiempo y en las próximas 48 h posteriores del tratamiento se presentó un aumento hasta alcanzar 2.32 mg de producción final de CO_2. Respecto al tratamiento con la cepa *E. amnigenus* XGL214 en medio mineral

con plaguicida (T2), la producción de CO_2 durante las primeras 74 h. fue mayor a la del control con 3.56 mg, en las siguientes 43 h se presentó un mantenimiento en la producción, sin embargo para las 236 h la producción aumentó y posterior a esto solo se observó el incremento del CO_2 hasta alcanzar una producción final de 4.66 mg, observándose una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tratamientos (p= 0.004) (fig.6).

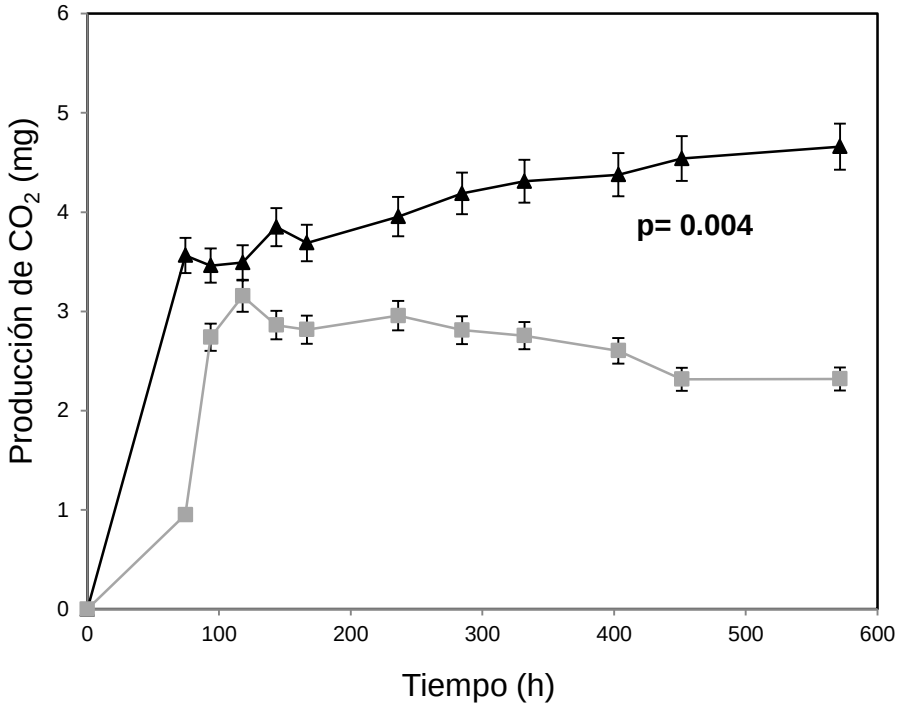


Fig. 6. Producción de CO_2 en experimento con malatión. Tratamiento T1: control endógeno (línea gris con cuadrado); T2: tratamiento cepa *Enterobacter amnigenus* XGL214 con (línea negra con triángulo). Desviación estándar representada por barras de error, n=3.

El tratamiento T4 (*Enterobacter amnigenus* XGL124 con endosulfán) durante las primeras 74 h presentó una producción de CO_2 de 2.11 mg. En las próximas 162 h está se observó inestable, sin embargo posterior a las 237 h se observó un incremento gradual de CO_2 hasta alcanzar 3.30 mg de producción final. Respecto al tratamiento control (T1) a diferencia del tratamiento experimental, presentó una producción máxima de 3.15 mg, alcanzada a las 117 h. Sin embargo, en las próximas 167 h. se observó inestabilidad en la producción y a partir de este punto el CO_2 disminuyo hasta 2.32 mg registrados como producción final, sin embargo no se obtuvo una diferencia estadísticamente significa entre ambos tratamientos (p= 0.37) (fig. 7).

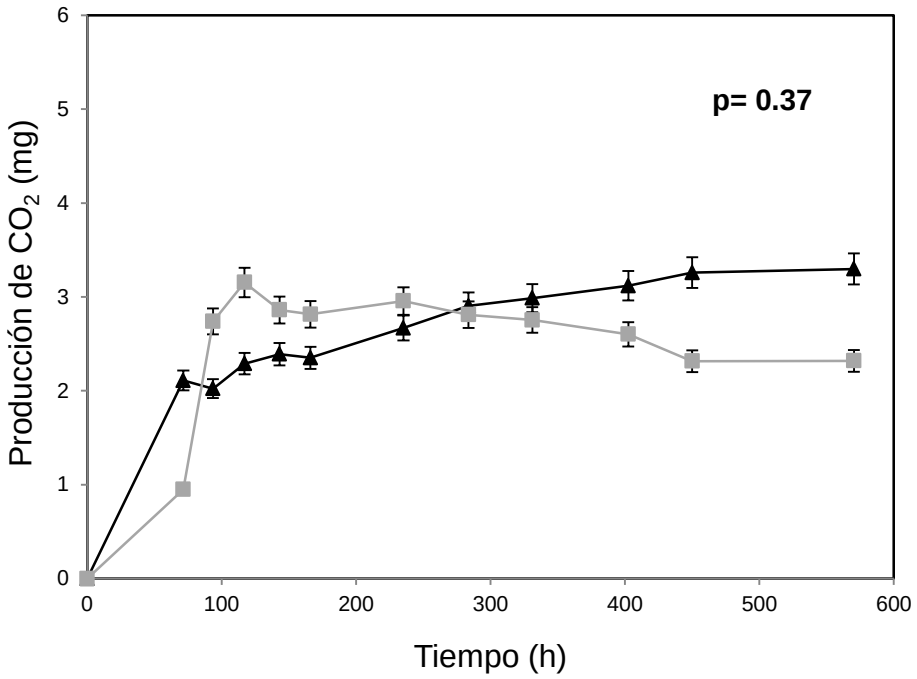


Fig. 7. Producción de CO_2 en experimento con plaguicida endosulfán. Tratamiento T1: control endógeno (línea gris con cuadrado); T4: tratamiento cepa *Enterobacter*

amnigenus XGL214 con (línea negra con triángulo). Desviación estándar representada por barras de error, n=3.

En cuanto al tratamiento control T5 (*Enterobacter cloacae* PMM16) se observó una producción de CO_2 de 0.90 mg durante las primeras 74 h. del experimento. Se presentó un incremento gradual, alcanzando la máxima producción de 3.59 mg a las 283 h. Sin embargo, posteriormente se observó un decremento, obteniendo 2.43 mg de producción final de CO_2. A diferencia del tratamiento control, el comportamiento que presento el tratamiento experimental con la cepa *E. cloacae* (T6) fue de incremento en la producción de CO_2 durante todo el experimento. En las 74 h. iniciales se observó una producción de 3.14 mg; posteriormente la producción siguió en aumento hasta alcanzar 5.37 mg de CO_2 final. El experimento mostró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tratamientos (p= 0.027) (fig.8).

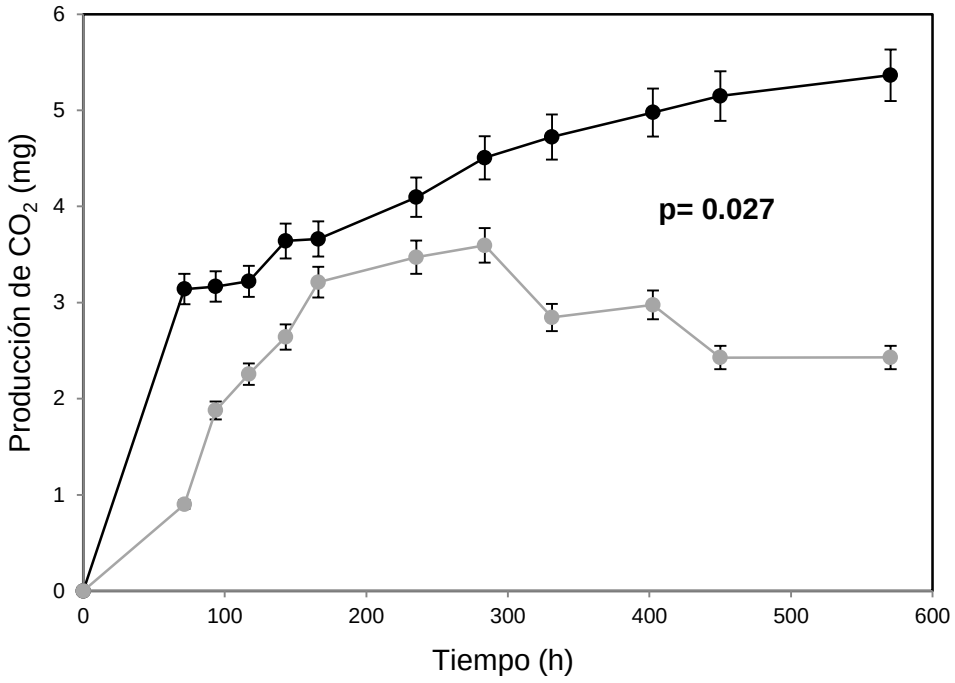


Fig. 8. Producción de CO_2 en experimento con endosulfán. Tratamiento T5: control endógeno (línea gris con círculo); T6: tratamiento cepa *Enterobacter cloacae* XGL214 con (línea negra con círculo). Desviación estándar representada por barras de error, n=3.

5.4.2 Biomasa bacteriana.

En un experimento posterior, se estimó la cinética de crecimiento y de consumo de los plaguicidas. Respecto a *Enterobacter cloacae* cepa PMM16 en presencia de endosulfán a una concentración de 6.87 mg/L, se obtuvo de biomasa final 2.31 mg/mL, a partir de 0.14 mg/mL de biomasa inicial. Durante los primeros doce días de exposición se observó la fase de adaptación, con un crecimiento mínimo,

mientras que a partir del día doce ocurrió la fase exponencial de crecimiento constante hasta el día dieciocho en donde se mantuvo en fase estacionaria hasta el día 24 (fig.9).

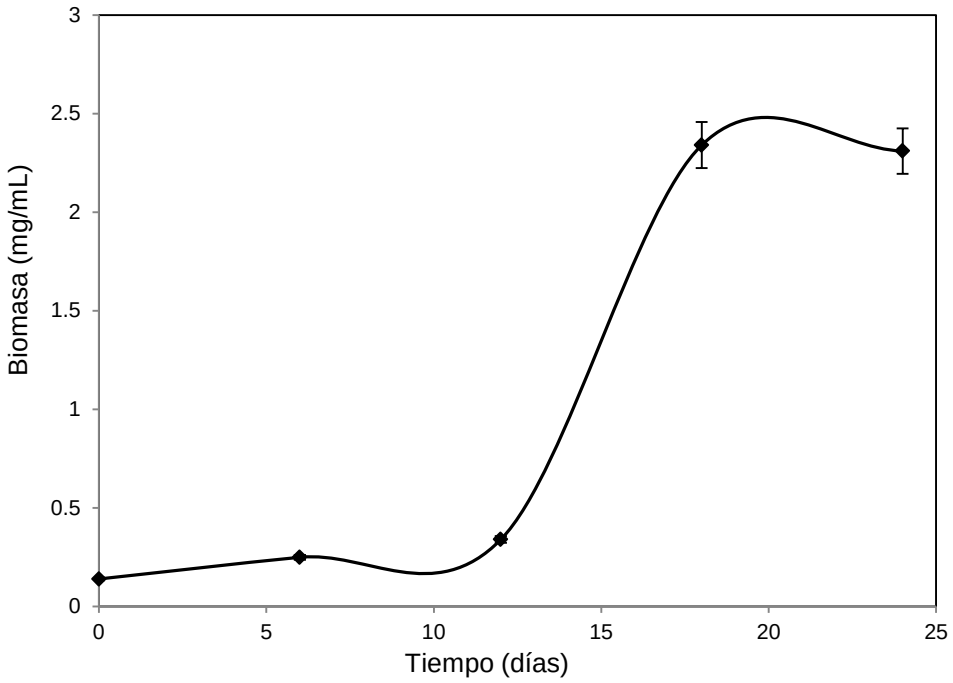


Fig. 9. Cinética de crecimiento. *Enterobacter cloacae* PMM16 en medio mineral con endosulfán. Tiempo de tratamiento: 24 días (575 h). Desviación estándar representada por barras de error, n=3.

En cuanto a *Enterobacter amnigenus* XGL214 cepa en medio mineral con malatión (17.37 mg/L), se obtuvo una biomasa final de 2.14 mg/mL, a partir de 0.24 mg/mL de biomasa inicial. La cinética de crecimiento arrojó que del día cero al doceavo presentó una tasa de crecimiento creciente (fase de aceleración). Posteriormente el crecimiento se mantuvo con un pequeño incremento hasta el día dieciocho a

partir de cual se observó la fase de crecimiento constante (exponencial) hasta el día 24 que finalizó el monitoreo en donde se puede observar que aún no alcanzaba la fase de mantenimiento (fig.10).

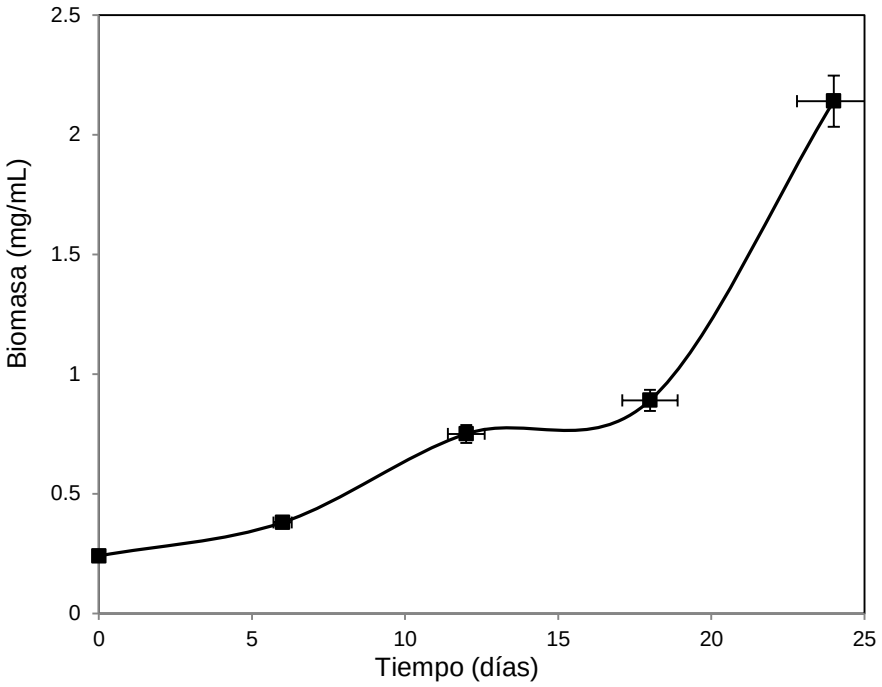


Fig. 10. Cinética de crecimiento. *Enterobacter amnigenus* XGL214 en medio mineral con malatión. Tiempo de tratamiento 24 días (575 h.). Desviación estándar representada por barras de error n=3.

5.5 Biodegradación bacteriana

A partir de una concentración inicial de 27.43 mg/ L de malatión en medio mineral se alcanzó una concentración final de 5.36 mg/ L, lo que indica un porcentaje de degradación por la cepa *Enterobacter amnigenus* XGL214 de 80.44 % ± 15.61 de la concentración inicial de malatión. Respecto al tratamiento control esté presentó

una degradación de 20% obteniendo una concentración final de 21.87 mg/ L (fig.11).

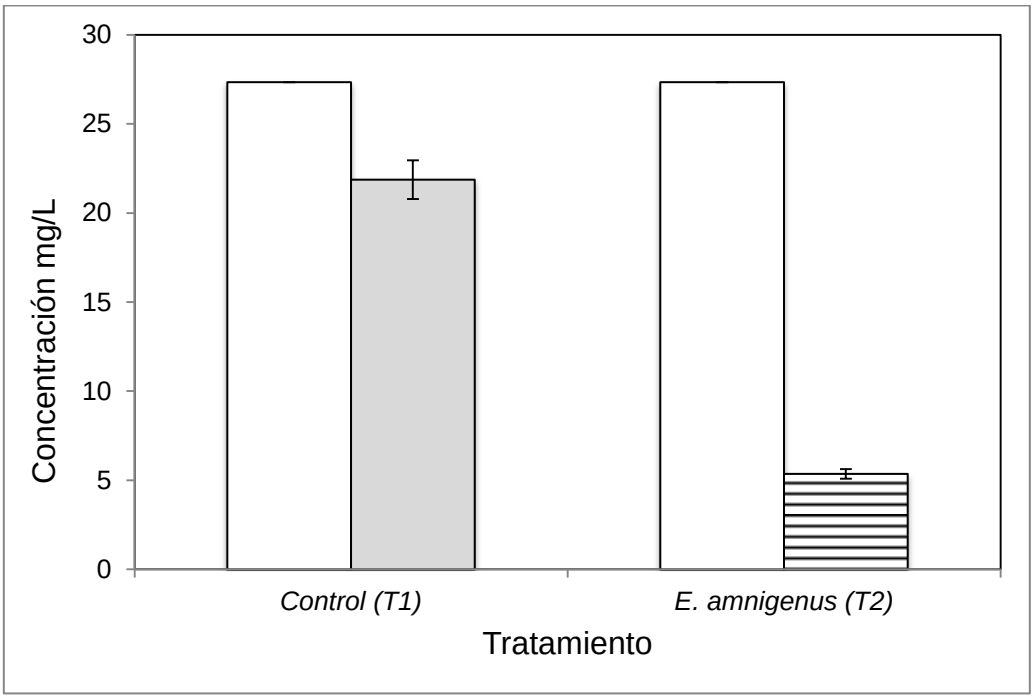
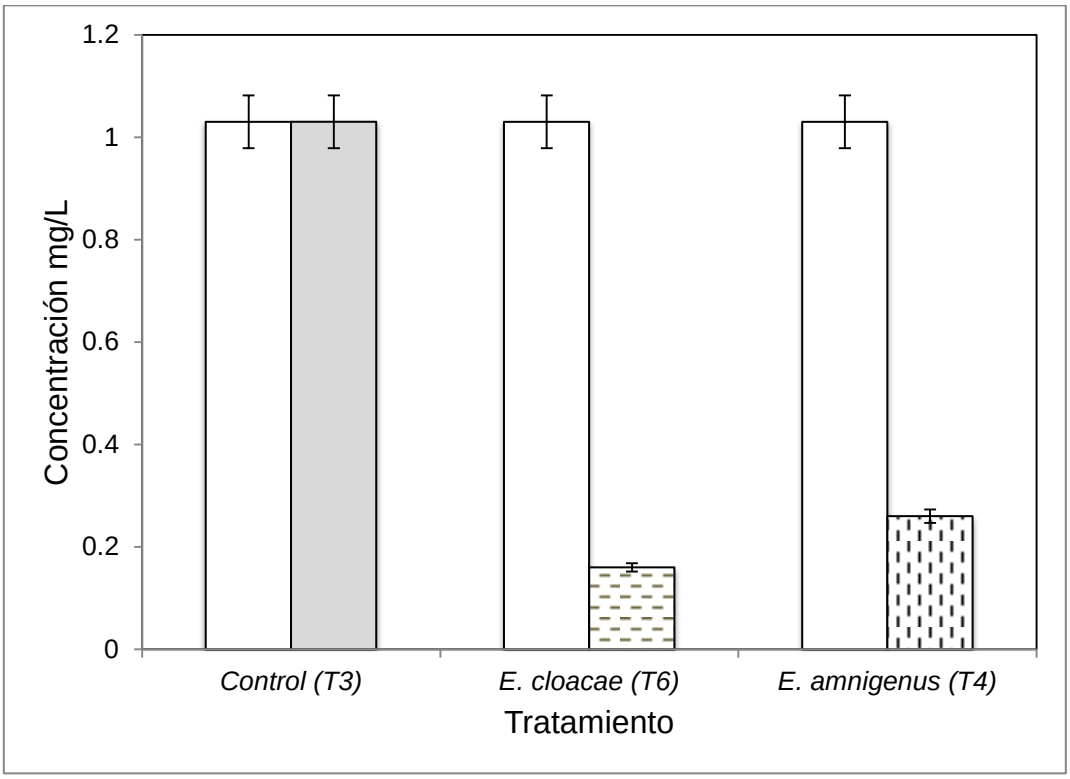


Fig. 11. Degradación de malatión por *Enterobacter amnigenus* XGL214. Control (T1): (barra blanca, concentración inicial), (barra gris, concentración final); (T2) (barra blanca, concentración inicial), (barra con líneas horizontales, concentración final). Tiempo de tratamiento: 575 h (24 días). Desviación estándar representada por barras de error, n=3.

Respecto al compuesto endosulfán (1.70 mg/L en medio mineral), al ser sometido al tratamiento, se obtuvo una concentración final de 0.26 mg/ L del isómero endosulfán I para el tratamiento con *Enterobacter amnigenus* XGL214 mg/ L y 0.16 mg/ L con la cepa de *E. clocae* PMM16 (fig.12a). Los porcentajes de

degradación fueron de 84.64 % ± 8.95 de endosulfán I por la cepa de *Enterobacter cloacae* y de 74.39 % ± 8.95 por la cepa de *E. amnigenus* durante 575 h de tratamiento. Para el isómero endosulfán II se detectó una concentración final de 0.09 mg/ L con ambos tratamientos, mientras que no se observó degradación para el tratamiento control (fig.12b).



a)

Fig. 12. a) Concentraciones finales de endosulfán I. Control (barra blanca, concentración inicia. Barra gris, concentración final); T6 (barra blanca, concentración inicial. Barra con horizontal discontinua, concentración final); T4 (barra blanca, concentración inicial. Barra con horizontal discontinua, concentración final).

b)

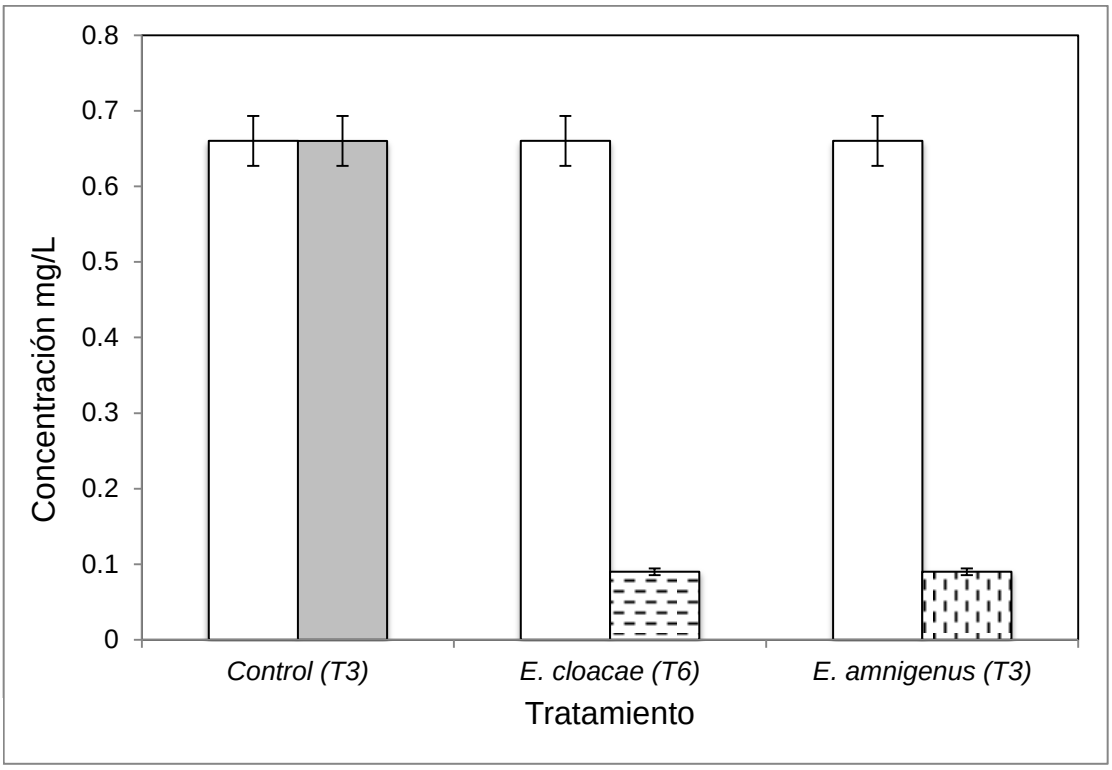


Fig.12. b) Degradación de endosulfán II. Control (barra blanca, concentración inicial. Barra gris, concentración final); T6 (barra blanca, concentración inicial. Barra con horizontal discontinua, concentración final); T3 (barra blanca, concentración inicia. Barra con vertical discontinua, concentración final).

Por otro lado, en el seguimiento de la cinética de consumo, , después de 25 días la concentración final de endosulfán I fue de 0.49 mg/L en presencia de *Enterobacter cloacae* PMM16, a partir de una concentración inicial de 5.52 mg/L, indicando un 71.32% ± 2.74 de eliminación. Respecto al endosulfán II la concentración inicial fue de 1.36 mg/L, y al finalizar el tratamiento el compuesto no fue detectado (fig. 13).

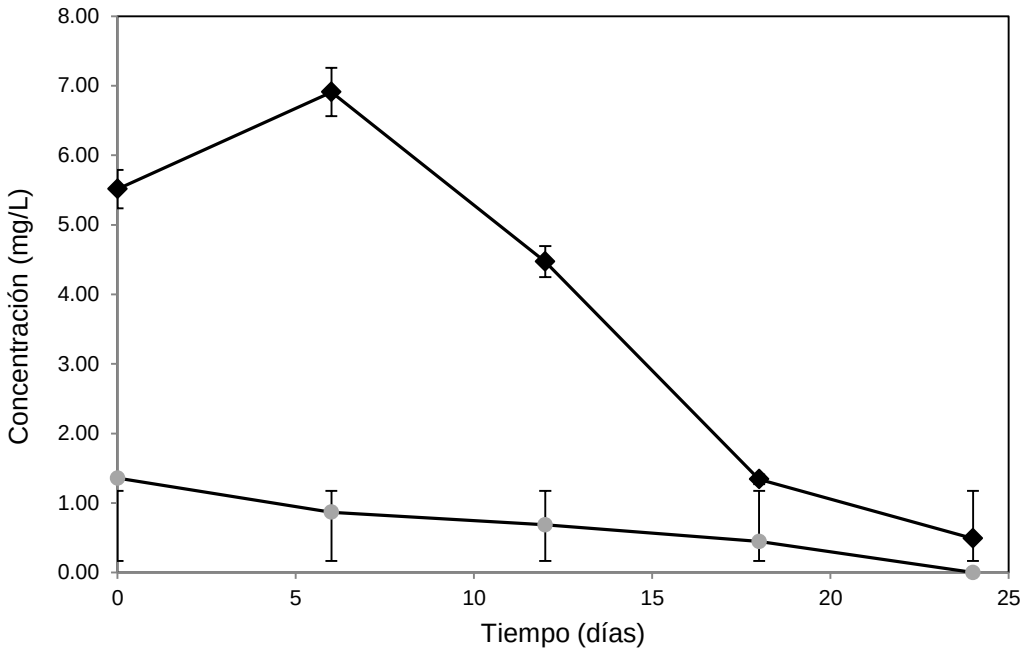


Fig. 13. Degradación por *Enterobacter cloacae* PMM16. Endosulfán I (línea con rombo), endosulfán II (línea con circulo). Tratamiento: 24 días (575 h). Desviación estándar representada por barras de error n=2.

La concentración final de malatión con *Enterobacter amnigenus* XGL214 no fue detectable después de 24 días de tratamiento; a partir de una concentración inicial de 17.37 mg/L, al día dieciocho se observó un porcentaje de degradación de 94.31% ± 7.18 (fig.14).

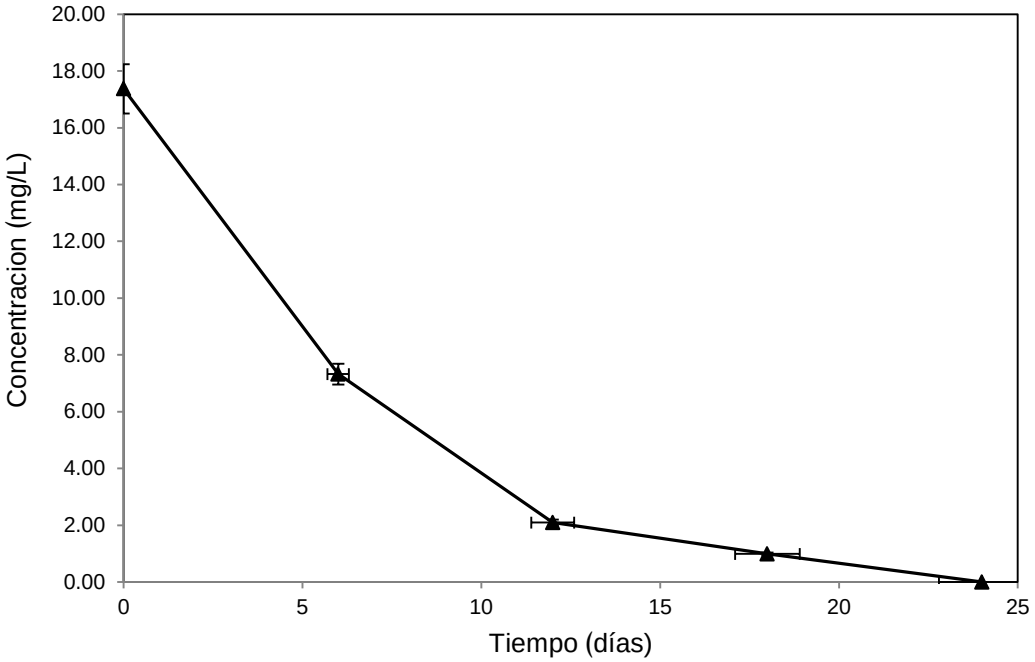


Fig. 14. Degradación de malatión. Desviación estándar representada por barras de error, n=2.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se obtuvieron dos cepas bacterianas aisladas a partir de un suelo agrícola. En los dos muestreos realizados se detectaron compuestos organoclorados como el endrín, heptacloro, endosulfán II (β- endosulfán) y su metabolito endosulfán sulfato, en cantidades bajas desde 0.62 hasta 12.59 µg/kg. Al igual que en este estudio, Weaver y colaboradores (2012) detectaron la presencia de endrín, β- endosulfán y sulfato de endosulfán en un suelo agrícola, siendo el primero el menos persiste de todos los compuestos detectados, a diferencia de los resultados encontrados en este estudio, que indicaron que el endrín fue el compuesto con mayores concentraciones, seguido por endosulfán II (β- endosulfán) y en concentraciones más bajas el metabolito sulfato de endosulfán.

A pesar de detectar estos compuestos organoclorados, la concentración de cloruros en el suelo fue baja con 0.75 meq/L, esto puede deberse a la lixiviación del compuesto de estudio y que de esta manera el suelo más superficial no reciba un aporte extra de cloruros. Teniendo en cuenta que el suelo presentó un nivel medio en cuanto a materia orgánica y según Fenoll *et al.,* 2011, los suelos con menor nivel de materia orgánica presentan alto potencial de lixiviación de plaguicidas como el endosulfán, a pesar de que se reporte para esté compuesto poco nivel de lixiviación. Respecto a los niveles de fósforo en el suelo, fue muy bajo con 3.94 mg/kg, lo cual podría estar relacionado con la cantidad de

compuestos organofosforados detectados en los muestreos, misma que fue nula, por lo que podría entenderse que no está recibiendo aportes extra de fósforo.

Debido a que en el muestro inicial se detectó el metabolito endosulfán sulfato se sugirió la presencia de bacterias presentes en el suelo con capacidad metabólica para la degradación del compuesto endosulfán (Sivagnanam and Jayanthi, 2014). No obstante, solo se lograron aislar dos cepas bacterianas del mismo género con capacidad de degradación de los insecticidas, esto podría estar relacionado con el nivel del pH del suelo que fue moderadamente alcalino (8.12), ya que esté está relacionado directamente con el crecimiento de las comunidades bacterianas, según Fernández *et al.,* 2011 mencionan que el crecimiento bacteriano presenta un patrón de interacción con el pH del suelo, siendo más óptimo para esté el pH con valores bajos.

Los dos aislados bacterianos con capacidad de mineralizar los compuestos de estudio se sometieron a pruebas bioquímicas para determinar sus características morfológicas y metabólicas, para esto último, similar a lo realizado por Lacayo y colaboradores (2005), en este estudio también se empleó el sistema de identificación para pruebas bioquímicas api® 20E. En su publicación, Lacayo y colaboradores describen dos cepas bacterianas también con capacidad de degradar pesticidas y las determinan como *Enterobacter cloacae* subsp. dissolvens' (LMG 2683) y *E. cloacae* (ATCC 13047T) y según sus resultados, igual que la cepa E1 aislada en el presente estudio fueron positivas para β-

galactosidasa, para catalizar el aminoácido L-arginina por el sistema dihidrolasa, descarboxilar el aminoácido L-ornitina, fueron citrato positivas, producen acetoina y fermentan sorbitol, rhamnosa, sacarosa, melibiosa y arabiosa. Y también fueron negativas a la enzima lisina descarboxilasa, a la producción de H_2S y para la fermentación de glucosa. Sin embargo, para la prueba triptófano desaminasa la cepa de estudio fue positiva igual que la cepa *Enterobacter cloacae* subespecie dissolvens' (LMG 2683) y para la prueba de gelatinasa el resultado fue negativo similar al descrito para la cepa *E. cloacae* (ATCC 13047T). Ambas características también difieren con lo reportado por Kryuchcova y colaboradores, en donde a diferencia de este estudio describen a la cepa *Enterobacter cloacae* K7 siendo positiva para ambas pruebas (gelatinasa y fermentación de glucosa). Lo anterior indica que la cepa de estudio pertenece a la especie *Enterobacter cloacae,* pero a otra cepa bacteriana y que estas características bioquímicas son específicas de cada cepa.

Respecto a los resultados para la cepa M1, estos presentaron mayores diferencias en relación a las cepas anteriores debido a que está fue positiva a la enzima ureasa y negativa para la producción de acetoina y sorbitol. Según el manual de Bergey esta última prueba es diferencial para la identificación de la especie entre el género Enterobacter, indicando que la especie de estudio pertenece a *Enterobacter amnigenus*.

Cabe mencionar que las pruebas bioquímicas relevantes para la determinación indicaron un posible género y especie, sin embargo algunas pruebas no concordaron con otras características descritas para determinar la cepa. Por este motivo se decidió emplear una técnica a nivel molecular para la determinación de las especies bacterianas aisladas, igual que Basha y colaboradores (2012), se utilizó el análisis del fragmento del gen RNA 16S. Dado que la comparación de la secuencia del gen rRNA 16S bacteriano ha surgido como una técnica genética preferida para determinar relaciones taxonómicas más allá del nivel de género. Debido a que la molécula de rRNA 16S contiene regiones altamente variables que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias (Clarridge, 2004).

Anteriormente, se mencionaron diversas cepas de la especie *Enterobacter cloacae*, sin embargo a diferencia del presente estudio, Lacayo y colaboradores (2005), y Kryuchcova y colaboradores (2014), emplearon el fragmento del gen rDNA 16S para la determinación de la cepa bacteriana. No obstante, la tipificación molecular del presente estudio a partir del fragmento del RNA 16S, indicó que la cepa E1 del presente estudio es una cepa diferente a las descritas anteriormente, perteneciendo a *Enterobacter cloacae* PMM16, según el alineamiento con un 99% de identidad. Mientras que la cepa M1 pertenece a la especie *E. amnigenus* cepa XGL214 con una identidad de 98%; el valor de E para ambas secuencias fue de 0.0, lo cual indica el mejor nivel de significancia para los alineamientos.

Con este estudio a nivel molecular se destacan dos puntos importantes, primero que la identificación tradicional de bacterias sobre la base de características fenotípicas generalmente no es tan precisa como la identificación basada en métodos genotípicos. Ya que como se mencionó anteriormente, los organismos exhibieron diferencias bioquímicas con otras cepas (Lacayo *et al*., 2005). Lo cual podría indicar que estas características no pertenecen a la especie en general y por esto radica la importancia de realizar ambas pruebas simultáneamente ya que nos proporciona un panorama más amplio sobre las características propias del organismo en estudio, esto estaría traducido en sus requerimientos y tratamiento específico. Y en segundo punto, el presente estudio coincidió con estudios anteriores que demuestran que el género Enterobacer y específicamente cepas de la especie *Enterobacter clocacae* son aptas para la degradación de plaguicidas.

Respecto al crecimiento bacteriano en adición de cada compuesto de estudio, el tratamiento de la cepa *Enterobacter amnigenus* XGL124 en malatión, tuvo una mayor producción de CO_2, mostrando una diferencia estadísticamente significativa respecto al tratamiento control sin insecticida, por lo que se presume que la bacteria respondió de manera favorable al insecticida como fuente de carbono. En cuanto al compuesto endosulfán con la cepa *Enterobacter amnigenus* XGL214, no mostró una diferencia estadísticamente significativa respecto a la producción de CO_2 a diferencia del tratamiento con *Enterobacter cloacae* PMM16, que presento diferencia estadísticamente significativa en el patrón de producción de CO_2 respecto al control, el cual mostró una menor producción y más lenta durante

el experimento, a diferencia del tratamiento con insecticida. Es decir, la cepa *Enterobacter cloacae* PMM16 tuvo mayor respuesta en adición al plaguicida, obteniendo una mayor actividad metabólica.

Sin embargo, en general, la producción de CO_2 obtenida de los tratamientos realizados con ambos plaguicidas fue baja referente a estudios anteriores realizados por Ortiz y colaboradores (2012) y Shan y colaboradores (2009), esto pudo deberse a que en este estudio los compuestos fueron utilizados como única fuente de carbono sin la adición de compuestos orgánicos (co-sustratos) que coadyuvaran al proceso de mineralización por el organismo y actuaran como fuente de carbono alterna.

Cabe mencionar que en los tratamientos control se presentó un aumento en la producción de CO2, a pesar de esto, la cantidad de biomasa se mantuvo sin incrementos, lo cual indica que organismos subsistieron en dichas condiciones en presencia de medio mínimo mostrando actividad metabólica, pero a falta de fuente de carbono se mantuvieron en estado de latencia sin desarrollar un aumento de la población bacteriana.

Se ha reportado que durante la degradación del endosulfán los metabolitos generados pueden afectar el crecimiento del organismo (CICOPLAFEST, 2004), sin embargo, de acuerdo a la cinética de crecimiento por biomasa de *Enterobacter cloacae* PMM16 en adición con endosulfán y *Enterobacter amnigenus* XGL214 en

malatión, ambas mostraron el mismo patrón de crecimiento, aunque que para la cepa PMM16 el crecimiento fue más lento, ambas cepas mostraron un crecimiento bacteriano típico. Esto indica que ninguno de los insecticidas inhibió en el crecimiento de las cepas. No obstante, en el presente estudio, la técnica empleada para calcular la biomasa fue por peso seco, por lo que no existe una discriminación en células vivas o muertas y en la posible bioacumulación del compuesto.

Para la degradación de compuestos organoclorados se ha reportado al género Enterobacter, atribuyendo porcentajes del 20% de degradación por actividad bacteriana (Kumar *et al*., 2008). En el presente estudio dos especies de este género presentaron la capacidad metabólica de remover el compuesto organoclorado endosulfán de un 71.32% hasta un 84.64%. Por otro lado, específicamente la especie *Enterobacter cloacae* ha presentado capacidad degradadora de insecticidas como el aldrín, esto en un consorcio bacteriano aerobico formado por tres especies bacterianas más, *Bacillus cereus*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*, sin embargo la remoción por degradación bacteriana fue de 20% (Gómez *et al*., 2003).

También se ha reportado otra especie del genero enterobacter, *E. aerogenes,* con capacidad de crecimiento en el insecticida organofosforado malatión como única fuente de carbono y fósforo en medio mineral, pero debido a que es una cepa patógena, no la emplearon en el estudio de degradación (Zeinat *et al.*, 2010). En el

presente estudio la cepa *Enterobacter amnigenus* mostró un 57.85 % de degradación y capacidad de crecimiento en malatión como única fuente de carbono después de 6 días, lo cual a diferencia de otras cepas bacterianas no patógenas como *Brevibacillus* sp. y *Bacillus cereus* cepa PU fueron capaces de remover 36.22% y 49.31% respectivamente, esto en un tiempo de 7 días en condiciones aerobias y de limitación de energía (Singh *et al*., 2011); por lo que se presume que la cepa de estudio posee un mayor potencial para la remoción del insecticida.

También se ha reportado a la cepa *Acinetobacter johnsonii* con capacidad para transformar casi el 100% de malatión en presencia de acetato de sodio/ succinato de sodio y el 26% y 30% con adición de glucosa y fructosa, respectivamente, en un tiempo de 84 h (Shan *et al*., 2009). La cepa de *E. amnigenus* aislada en el presente estudio removió el 94.31% ± 7.18 al día 18 del experimento, al día 24 no fue detectado. Es importante mencionar que en estudios anteriores el tiempo de exposición es menor, sin embargo, se presume que la cepa *E. amnigenus* es capaz de descomponer el insecticida utilizándolo como única fuente de carbono, lo cual podría indicar que al agregar un co-sustrato el tiempo de remoción podría ser menor al aumentar la actividad metabólica.

En cuanto a la degradación del isómero endosulfán I fue de 74.39 % con *Enterobacter amnigenus* y 84.64% y 71.32% con *E. cloacae.* Sin embargo, se ha descrito que organismos como *Ochrobacterum* sp. , *Arthrobacter* sp. , y

Burkholderia sp. en estudios realizados en microcosmos, presentan la degradación de – endosulfán I de un 57 %, 88 % y 91 % respectivamente, esto indica que la cepa de estudio podría ser más viable que *Ochrobacterum* sp. para la remoción de endosulfán. Mientras que para la remoción de endosulfán II los organismos han presentado la degradación de 4%, 60% y 67 % respectivamente, después de 30 días (Kumar *et al*., 2008). En el presente estudio la degradación de endosulfán II fue de 87.070 % ± 1.18 con *Enterobacter amnigenus* y 86.31 % ± 1.18 con *Enterobacter cloacae* en el primer experimento, y 66.83% ± 31.09 al día dieciocho con *E. cloacae* en el segundo experimento, al día 24 el isómero no fue detectado. Por lo que se presume que las cepas aisladas tienen mayor capacidad metabólica de remover el isómero endosulfán II que las especies descritas en estudios anteriores y un menor tiempo de exposición.

También se ha reportado la degradación del compuesto endosulfán con una mineralización completa durante doce días de tratamiento con el hongo *Aspergillus niger*, sin embargo se ha detectado la formación de los metabolitos endosulfán diol y endosufán sulfato, siendo este último el más tóxico de todos (Bhalerao y Puranik, 2007). Sin embargo, al igual que el estudio de Kong *et al.*, 2013 donde mostraban la degradación del compuesto por la cepa *Alcaligenes faecalis* JBW4, el presente estudio mostró que las cepas *Enterobacter amnigenus* y *E. cloacae* no producen el metabolito endosulfán sulfato, el cual es el metabolito más persistente y toxico del compuesto, por lo que se sugiere que las cepas de estudio degradan el endosulfán por una vía no oxidativa.

CONCLUSIÓN Y APLICACIÓN PRÁCTICA

Se determinó que el suelo presentó una textura franco-arcillosa-limosa, con pH alcalino. Nivel medio en cuanto a materia orgánica, el nivel de cloruros fue bajo con 0.75 meq/L y muy bajo con 3.94 mg/kg, respecto al nivel de fosforo.

Taxonómicamente se determinaron dos especies bacterianas: *Enterobacter cloacae* cepa PMM16, crece en presencia del insecticida endosulfán y *E. amnigenus* cepa XGL214, con capacidad de crecer en presencia de ambos insecticidas, malatión y endosulfán.

La cinética de crecimiento presentó un incremento en la biomasa de 2.14 mg/mL para *Enterobacter cloacae*, y de 1.19 mg/mL para *E. amnigenus* en presencia de endosulfán y malatión respectivamente.

Se mostró la degradación de 80.44 % ± 15.61 de malatión por *Enterobacter amnigenus* cepa XGL214. La degradación de endosulfán I fue de 74.39 % ± 8.95 y 87.070 % ± 1.18 de endosulfán II por *Enterobacter amnigenus*. Y 84.64 % ± 8.95 de endosulfán I y 86.31 % ± 1.18 de endosulfán II por *Enterobacter cloacae*.

El experimento 2, mostró la remoción de malatión con *Enterobacter amnigenus* de 94.31% ± 7.18 al día dieciocho del experimento, al día 24 no fue detectado.

La remoción de endosulfán I al día 24, fue de 71.32% ± 28.31 y 66.83% ± 31.09 de endosulfán II al día 18 con *Enterobacter cloacae*, al día 24 del experimento no fue detectado.

Lo anterior indica que las cepas bacterianas aisladas utilizaron los insecticidas como única fuente de carbono, así como son capaces de subsistir en estas condiciones sin afectar su crecimiento y metabolizar los compuestos de estudio.

De esta manera se señala que los organismos de estudio son viables para su implementación en técnicas de biorremediación mediante la utilización de sistemas tal como los biorreactores y poder llevar el diseño experimental a mayor escala, para el tratamiento directo de los residuos líquidos de los productos.

Si bien, en el presente proyecto los organismos se aislaron a partir de suelo, es importante tener en cuenta que por ser cepas patógenas, su utilización directa no es aconsejable, debido a que los suelos principalmente contaminados por estos productos son de uso agrícola. Por esto, el siguiente paso recomendado, en cuanto a la investigación, es el estudio de los organismos a un nivel más específico, para determinar la ruta de degradación de los compuestos de estudio en estos y determinar que genes están implicados en la metabolización de los mismos y así transferir esta información genética.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña, O., Peña W., Serrano, E., Pocasangre, L., Rosales, F. Delgado, E., Trejos, J., Segura, A. 2006. Importance of microorganisms for soil quality and health. Costa Rica.

2. Albert, L., y Loera, R., 2005. Química y ecotoxicología de los insecticidas, p. 177-190. *In:* A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. De Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.

3. Albert, L. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. Servicios de Salud de Nayarit y Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios. Revista de Toxicología. Tepic, Nayarit.

4. Ali, U., Hussain, J., Naseem, R., Katsoyiannisc, A., Lid, J., Zhangd, G., Jonese, K. 2014. Organochlorine pesticides (OCPs) in South Asian region: A review. Science of the Total Environment. Vol. 476–477. pp. 705–717.

5. Awasthi, N., Singh, A. Jain, R. Khangarot, B. Kumar, A. 2003. Degradation and detoxification of endosulfan isomers by a defined co-culture of two Bacillus strains. Appl Microbiol Biotechnol 62. pp. 279–283.

6. Basha, A., Novikov, B., Resenom, Y., Rusell, D., Wales, M., Siddavattam, D. 2012. Mineralization of Acephate a recalcitrant organophosphate insecticide is initiated by a Pseudomonad in environmental samples. Vol. 7.

7. Bhalerao, T., Puranik, P. 2007. Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. International Biodeterioration & Biodegradation. Vol. 59. pp. 315–321.

8. Burrillo, G., Luzardo, O., Pérez, C., Zumbado, M., Yanes, C., Trujillo, M., Fernández, C., Boada, L. 2014. Exposure to persistent and non-persistent pesticides in a non-occupationally exposed population in Tenerife Island (Spain). Gaceta sanitaria.

9. Carrillo, P. Ruiz, M. Yeomans, R. 2004. Aislamiento, Identificación y Evaluación de un cultivo mixto de Microorganismos con capacidad para degradar DDT. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. Vol. 20. N° 002. pp. 69-75.

10. CICOPLAFEST. 1998. Catálogo oficial de plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. SEMARNAP, SECOFI, SAGAR y SSA, México D.F.

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

12. Clarridge, J. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clinical Microbiology.

13. Ewing, W. 1973. Differentation of Enterobacteriaceae by biochemical reactions, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Center for Disease Control.

14. Fenoll, J., Ruiz, E., Flores, P., Hellín, P., Navarro, S. 2011. Reduction of the movement and persistence of pesticides in soil through common agronomic practices. Chemosphere 85. pp. 1375–1382.

15. Fernández, D., Rousk, J., Brookes, P., Baath, E. 2011. Bacterial pH-optima for growth track soil pH, but are higher than expected at low pH. Soil Biology and Biochemistry. Vol. 43. pp. 1569-1575.

16. Festa, S., Coppotelli, B., Morellia, I. 2013. Bacterial diversity and functional interactions between bacterial strains from a phenanthrene-degrading consortium obtained from a chronically contaminated-soil. International Biodeterioration & Biodegradation. Vol. 85. pp. 42–51.

17. Gómez, G., Campos, H., Dussán, J., Suarez, M. 2003. Selección de un consorcio bacteriano aeróbico de la Ciénega grande de Santa Marta con capacidad degradadora del plaguicida organoclorado (Aldrín). San José Costa Rica.

18. Grube, A., Donaldson, D., Kiely, T., Wu, L. 2011. Pesticides industry sales and usage: 2006 and 2007 market estimates. Biological and economic analysis division. Office of pesticide programs. Office of chemical safety and pollution prevention. U.S Enviromental protection agency. Washington, DC 20460.

19. Jiménez, C., 2002. Determinación, persistencia y distribución de insecticidas de uso agrícola en el medio ambiente. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

20. Kong, L., Zhub, S., Zhua, L., Xiea, H., Sua, K., Yana, T., Wanga, J., Wanga, J., Wanga, F., Suna, F. 2013. Biodegradation of organochlorine pesticide endosulfan by bacterial strain *Alcaligenes faecalis* JBW4. Journal of Environmental Sciences. Vol. 25. pp. 2257–2264.

21. Kumar, M., Lakshmib, V., Khannaa, S. 2008. Biodegradation and bioremediation of endosulfan contaminated soil. Bioresource Technology. Vol. 99. pp. 3116–3122.

22. Kryuchkova, Y., Burygin, G., Gogoleva, N., Gogolev, Y., Chernyshova, M., Makarov, O., Federov, E., Turkovskaya, O. 2014. Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. Microbiological Research. Special Issue on Plant Growth Promotion. Vol. 169. pp. 99–105.

23. Lacayo, M., Quillaguaman, J., Bavel, B., Mattiasson, B. 2005. A toxaphene-degrading bacterium related to *Enterobacter cloacae*, strain D1 isolated from aged contaminated soil in Nicaragua .Systematic and Applied Microbiology. Vol. 28. pp. 632–639.

24. Levanon, D. 1993. Roles of fungi and bacteria in the mineralizacion of the pesticides atrazine, alachlor, malathion and carburofan in soil. Soil Biol. Biochem. Vol. 25, No. 8, pp. 1097- 1105.

25. Li. D, Liu. J , Li. J. 2011. Genotoxic evaluation of the insecticide endosulfan based on the induced GADD153-GFP reporter gene expression. Environmental Monitoring and Assessment. Vol. 176. pp. 251-258.

26. Li, J., Zhang, G., Guoa, L., Xu, W., Li, X., Lee, C., Ding, A., Wang, T. 2007. Organochlorine pesticides in the atmosphere of Guangzhou and Hong Kong: Regional sources and long-range atmospheric transport. Atmospheric Environment. Vol. 41. pp. 3889–3903.

27. 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. pp. 5-65.

28. Mosquera, R., Peñuela, G. 2009. Biodegradación del malatión utilizando microorganismos nativos de suelos agrícolas. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 22. pp 189- 198.

29. Mostafalou, S., Abdollahi, M. 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. Toxicology and Applied Pharmacology. Vol. 268 pp. 157-177

30. Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA1-1993, Plaguicidas. Productos para uso agrícola, forestal, pecuario, de jardinería, urbano e industrial. Etiquetado.

31. Ortiz, H., Sanchez, S. 2010. Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in México. Rev. Int. Contam. Ambient. 26 (1). pp 27-38.

32. Ortiz-Hernández M. L., Bello-Ramírez A., Sánchez-Salinas E., Castillo-Pérez R. y Quintero-Ramírez R. 2001. Hydrolysis of tetrachlorvinphos by bacteria isolated of agricultural soils and identification of its metabolite. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. pp. 1-24.

33. Ortiz, I., Velazco, A., Le Borgne, S., Revah, S. 2012. Biodegradation of DDT by stimulation of indigenous microbial populations in soil with cosubstrates. Springer Science. Vol. 24. pp. 215-225.

34. Palacios, N. 2003. Aplicación de un instrumento para evaluar exposición a plaguicidas organofosforados, efectos agudos y subagudos en la salud de trabajadores agrícolas. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de México. Vol. 46. N° 1.

35. PAN, 2009. List of Lists: A Catalogue of Lists of Pesticides Identifying Those Associated with Particularly Harmful Health or Environmental Impacts. P. A. Network

36. Ratola, N., Homem, V., Silva, J., Araújo, R., Amigo, J., Santos, L., Alves, A., 2014. Biomonitoring of pesticides by pine needles — Chemical scoring, risk of exposure, levels and trends. Science of The Total Environment. Vol. 476–477. pp. 114–124.

37. Real, M., Ramírez, A., Pérez, E., Noa, M. 2005. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche cruda y pasteurizada de la zona metropolitana de Guadalajara, México. Rev. Salud animal. Vol 27. pp. 48-54.

38. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Alimentación. SAGARPA. 2007. Programa Sectorial de Desarrollo Agropecuario Pesquero 2007-2012. pp.14.

39. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo rural, Subsecretaria de Agricultura, Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, Dirección General de Sanidad Vegetal. S/F. Guía de plaguicidas autorizados de uso agrícola.

40. Selmi, S. El. F., Gharbi. N. 2013. Oxidative stress and alteration of biochemical markers in liver and kidney by malathion in rat pups. Toxicol Ind. Health.

41. Shan, X., Junxin, L., Lin, L.,Chuanling, Q., 2009. Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates. Journal of Environmental Sciences 21(2009) 76–82.

42. Sivagnanam, S., Jayanthi, A. 2014. Halophilic bacterium JAS4 in biomineralisation of endosulfan and its metabolites isolated from Gossypium herbaceum rhizosphere soil. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.

43. Singh, B., Kaur, J., Singh, K. 2012. Transformation of malathion by *Lysinibacillus* sp. Isolated from soil. Biotechnol Lett. Vol. 34. pp. 863–867.

44. Singh, B., Kaur, J., Singh, K. 2011. Biodegradation of malathion by Brevibacillus sp. strain KB2 and Bacillus cereus strain PU. World J. Microbiol Biotechnol. Vol. 28. pp. 1133–1141.

45. Waliszewski, M., Infazon, M. 2003. Diferencias en concentración de plaguicidas organoclorados persistentes en el suelo, paja y granos de trigo. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. Vol. 19. pp 5-11.

46. Weaver, T., Ghardiri, H., Hulugalle, N., Harden, S. 2012. Organochlorine pesticides in soil under irrigated cotton farming systems in Vertisols of the Namoi Valley, north-western New South Wales. Chemosphere. Vol. 88, Issue 3. pp. 336-343.

47. Wong, F., Alegria, H., Bidleman, T. 2010. Organochlorine pesticides in soils of Mexico and the potential for soil–air exchange. En Enviromental pollution 158. pp 749- 755.

48. Zeinat, K., Mohamed, A., Nashwa, A., Sherif, M. 2010. Isolation and molecular characterization of malathion-degrading bacterial strains from waste water in Egypt. Journal of Advanced Research 1. pp. 145–149.

ANEXO A

Tipificación bioquímica

- TINCION DE GRAM

La tinción de Gram es usada para clasificar bacterias sobre la base de sus formas, tamaños, morfologías celulares y reacción Gram (color). A nivel del laboratorio es útil como test para un rápido diagnóstico presuntivo de agentes infecciosos, tanto en muestras como en cultivos en crecimiento, y adicionalmente sirve para valorar la calidad de la muestra clínica. Las bacterias se tiñen gram positivas (+), gram negativas (–) o no se tiñen debido a sus diferencias en la composición de su pared y arquitectura celular.

Las bacterias gram (+) tienen una gruesa capa de péptidoglucano y gran cantidad de ácidos teicóicos que no son afectados por la decoloración con alcohol y/o acetona, reteniendo el colorante inicial acomplejado con iodo y visualizándose en distintos grados de tonos desde el violeta al azul claro, dependiendo de si la naturaleza de su pared celular está intacta o dañada. Las bacterias gram (–) tienen en su pared celular una delgada capa de peptidoglucano ligada a una membrana externa por moléculas de lipopolisacáridos. Esta membrana externa es dañada por el alcohol y/o acetona de la decoloración, permitiendo que el primer colorante acomplejado con iodo escape y sea remplazado por el contracolorante.

Clásicamente los reactivos utilizados para la realización de la tinción de Gram han sido el cristal violeta como colorante inicial, la solución de lugol para acomplejar a éste, el alcohol y/o acetona para la decoloración y la safranina o fucsina básica como contracolorante.

Método:

Recoger la muestra, hacer el extendido en espiral. Dejar secar a temperatura ambiente y fijar la muestra con metanol durante un minuto o al calor (flameado 3 veces aprox.). Agregar azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y esperar 1 min. Todas las células gram positivas y gram negativas se tiñen de color azul-purpura. Enjuagar con agua, agregar lugol y esperar 1 minuto, enjuagar de nuevo con agua y agregar acetona y/o alcohol y esperar 4 segundos. Enjuagar con agua. Agregar safranina o fucsina básica y esperar 1-2 min para la tinción de contraste. Este tinte dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas.

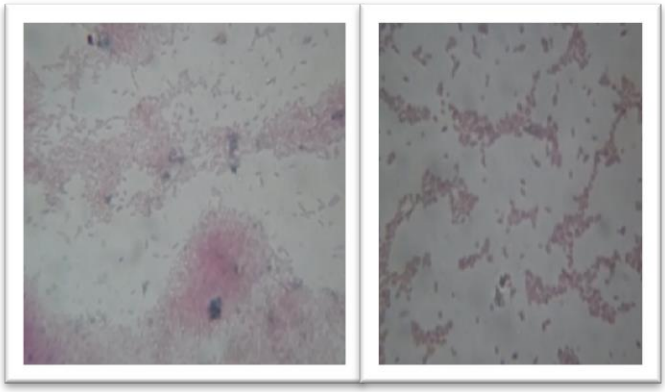


Fig. 15. Resultado de la prueba. Bacilos Gram (-)

- Prueba de la oxidasa

Esta prueba está basada en la identificación de una enzima bacteriana llamada citocromo C oxidasa y para reducir el nombre se le dice oxidasa. Todas las bacterias aerobias obtienen su energía en forma de ATP a partir del proceso de respiración también llamado cadena respiratoria, este se lleva a cabo en la membrana celular bacteriana. En la respiración hay una secuencia de enzimas y transportadores que pasan los electrones desde sus sustratos hasta llegar al citocromo C, la enzima llamada citocromo C oxidasa le quita electrones al citocromo C, estos electrones son transferidos por la enzima al oxígeno siendo este el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria, finalmente debido a que el oxígeno tiene un exceso de electrones puede atraer átomos de Hidrógeno formando dos posibles productos: Agua o peróxido de hidrógeno.

El reactivo usado para esta prueba está basado en una disolución acuosa de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%, es el más común y recibe el nombre de reactivo de Kovacs. El reactivo de Kovacs es incoloro pero al ponerlo en contacto con la enzima citocromoC oxidasa cambia a un color morado debido a que el tetrametil-p-fenilendiamina es una amina aromática y la oxidación de esta produce quinolonas de color morado-azulado.

Reactivo de Kovac´s

Para- dimetil- benzaldehído…….1 g

Alcohol amílico o butílico……..80 ml

Ácido clorhídrico químicamente puro……20 ml

Disolver el para-dimetil-benzaldehido en alcohol amílico o butílico y añadir el ácido clorhídrico. Conservar en un frasco ámbar con tapón de vidrio en sitio oscuro.

NOTA: El reactivo debe de tener una coloración amarillo claro a café claro.

Procedimiento: se toma con un asa bacteriológica una muestra bacteriana a partir de una colonia aislada proveniente de un cultivo de 24h. La muestra se pone en contacto en un porta objetos impregnado. Se debe observar una coloración morada en un lapso no mayor a 30segundos para que sea positivo, de lo contrario el resultado es negativo.

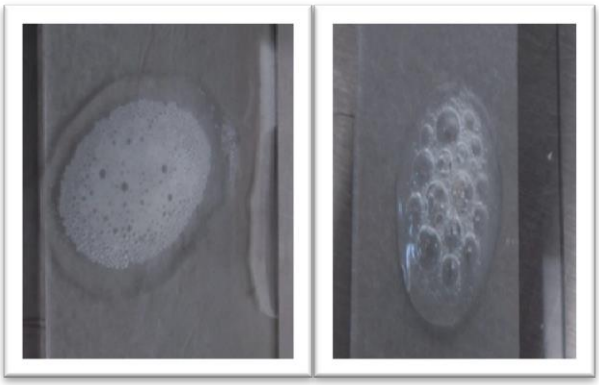


Fig. 16. Resultado negativo para ambas cepas de estudio.

- SIM (Sulfhídrico- indol- motilidad).

Es un medio semi-sólido transparente que pone en evidencia la movilidad, la producción de triptofanasa y de SH_2.

Contiene: Triptofano. La enzima triptofanasa, lo desdobla, produce indol, que se pone de manifiesto con el reactivo de Kovac´s. Citrato de hierro y amonio: los microorganismos productores de SH_2 ennegrecen el medio de cultivo. Si los microorganismos son móviles, al ser éste un medio semi-sólido se produce enturbiamiento del medio de cultivo, caso contrario solo crece en la punción.

Procedimiento: se inocula el microorganismo por punción con ansa de punta. Se deja incubar a 35ºC durante 24hs. y luego de este tiempo se agregan unas gotas del reactivo de Kovac´s dejándolo resbalar por las paredes del tubo.

Interpretación: Triptófano (+): observar la interfase, la aparición de un color rojo fucsia brillante por la formación de un complejo entre el indol y el p-dimetilaminobenzaldehido.

M (+) / SH_2 (-) enturbiamiento del medio

M (+) / SH_2 (+), se ennegrece todo el medio

M (-) / SH_2 (-) se observa crecimiento solamente en la estría

M (-) / SH_2 (+), se observa precipitado negro alrededor de la estría (pero no ennegreciendo de todo el medio).

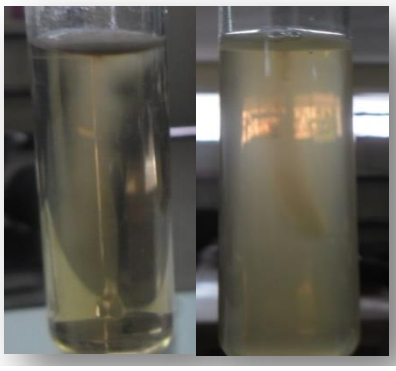


Fig. 17. Motilidad positiva. H_2S e indol negativas.

ANEXO B

- Protocolo de purificación de fragmentos de PCR (GE healtcare).

Pesar en un tubo de 1.5 mL (para microcentriguga, libre de DNasas), cortar la banda de interés y colocarla en el tubo. Pesar el tubo con la banda del gel de agarosa. Posteriormente calcular el peso del gel de agarosa. Agregar 10 µL de Capture buffer tipo 3 (azul) por cada 10 mg de agarosa; mezclar por inversión y someter a 60°C hasta que la agarosa este completamente disuelta. Observar el color de la mezcla del buffer capture tipo 3 con la muestra (amarilla o naranja). Posteriormente agregar 600 µL de la mezcla (Capture buffer tipo 3 y la muestra) en una columna con tubo para colectar ensamblado e incubar a 60 segundos a temperatura ambiente. Centrifugar 30 segundos a 16 000 RPM y eliminar el líquido. Colocar la columna en el tubo de colectar y repetir este pasó hasta que toda la muestra está cargada. Una vez realizado esto agregar 500 µL del Wash buffer tipo 1 (amarillo), centrifugar 30 segundos a 16 000 RPM y desechar el eluido. Centrifugar nuevamente, esta vez por 1 minuto a 13 000 RPM (2 veces). Eliminar el tubo colector y transferir la columna a un tubo limpio de 1.5 mL libre de DNAsa.

Agregar 10-50 µL de Elution buffer tipo 6 (rosa) e incubar 60 segundos a temperatura ambiente. Centrifugar 60 segundos a 16 000 RPM, retirar y guardar la muestra purificada de DNA a -20°C.

ANEXO C

- Extracción de plaguicidas solido- líquido.

Pesar 5 g de suelo y colocarlo en un vaso de precipitados de 100 ml.

Añadir por la pared del vaso de pp 30 ml de hexano: acetona 1:1, tapar con papel aluminio y someterlos a sonicacion por 7 minutos. *El agua del sonicador debe cubrir el suelo y el solvente, los vasos de pp deben estar bien tapados. Emplear un matraz bola de 250 ml por cada muestra de suelo, colocarle papel filtro y agregar sulfato de sodio (etiquetar los matraces de acuerdo a la muestra que correspondan). Sacar la muestra del sonicador, secar el exterior del vaso con una franela y dejar reposar por 2 minutos aprox. Vaciar paulatinamente el líquido por el centro del filtro poco a poco, teniendo cuidado de que no se pase suelo al matraz.

Una vez vaciado todo el líquido posible, volver a agregar 30 ml del solvente y repetir el procedimiento durante tres veces.

Transcurridas las tres veces, quitar el papel filtro y colocar con cuidado el matraz en el rotoevaporador a una temperatura de 65°c, encender y esperar a que se evapore hasta observar una cantidad de líquido como de 1ml aproximadamente (fig.19). Apagar inmediatamente el rotoevaporador, salvar el líquido con ayuda de una pipeta pasteur (nueva y limpia) y colocarlo en un tubo graduado (1 ml) y aforar a con hexano. Vaciar la muestra a un vial de 2 ml ámbar con tapa. Enjuagar el tubo graduado con hexano. Proceder a realizar el análisis cromatografico.

Fig. 18. Procedimiento para la extracción de los plaguicidas. Solido-liquido

- Extracción de plaguicidas líquido-líquido

Se coloca el equipo (embudo de separación en soporte universal, matraz bola con embudo con papel filtro). Se verifica que la válvula del embudo este cerrada, entonces se coloca la muestra; el matraz que contenía la muestra se enjuaga con 30 mL de diclorometano grado HPLC y estos se colocan también en el embudo. Se tapa y se agita vigorosamente el embudo de separación (abriendo la válvula frecuentemente para liberar la presión) por tres veces. Posteriormente se coloca en el shaker durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se retira y se coloca de nuevo en el soporte. Se observaran dos fases, se filtra la fase acuosa sin dejar pasar la fase orgánica. Este procedimiento de lavado se repite por 3 veces.

Una vez transcurridos los 3 lavados se rotoevapora la muestra a 45 °C para eliminar el diclorometano (hasta aproximadamente 1 mL), se colocan 10 mL de hexano y se procede a eliminar por rotoevaporacion a 50°C (hasta

aproximadamente 1 mL o menos). Apagar inmediatamente el rotoevaporador, salvar el líquido con ayuda de una pipeta pasteur (nueva y limpia) y colocarlo en un tubo graduado (1 ml) y aforar a con hexano. Vaciar la muestra a un vial de 2 ml ámbar con tapa. Enjuagar el tubo graduado con hexano. Proceder a realizar el análisis cromatografico.

Fig. 19. Extracción de los plaguicidas. Líquido- líquido.