



Potencial biotecnológico de rizobacterias procedentes de papa (*Solanum tuberosum L*) para la degradación de tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D.

**Jennifer Carolina Parada Calderón
Laura Yamile Pinzón Franco**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá D.C., 2020**



Potencial biotecnológico de rizobacterias procedentes de papa (*Solanum tuberosum* L) para la degradación de tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D.

**Jennifer Carolina Parada Calderón
Laura Yamile Pinzón Franco**

**Asesor Externo
Javier Vanegas Guerrero**

**Asesor Interno
Ligia Consuelo Sánchez Leal**

**Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá D.C., 2020**



Potencial biotecnológico de rizobacterias procedentes de papa (*Solanum tuberosum* L) para la degradación de tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D.

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C., 2020**

DEDICATORIA

A Dios, mi creador, sustentador y forjador de mi camino. Él hace que todo sea posible, me invita a ser esforzada y valiente, a que no desmaye, pues está conmigo donde quiera que vaya. A Él quiero dedicarle este trabajo y le doy gracias por permitirme hoy estar más cerca de alcanzar mi título profesional.

A mi querida madre, por su amor incondicional, por ser una mujer virtuosa, que, con su ejemplo de abnegación y esfuerzo, me enseñó a luchar por mis sueños, a creer que todo es posible, y a vencer cualquier adversidad de la mano de Dios. A ella y mi querida familia, por creer en mis capacidades y por motivarme a ser mejor persona cada día.

Jennifer Carolina Parada Calderón

A Dios, por darme sabiduría para culminar con éxito mis sueños, por darme fuerza en los malos momentos y felicidad en los buenos, permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida, por confiar en mí y ayudarme a crecer como persona, a mis hermanos por su cariño y compañía. A mi abuelito que no se encuentra con nosotros, pero lo llevamos en el corazón, por sus valiosos consejos. A ellos y a toda mi familia va dedicado este logro.

Laura Yamile Pinzón Franco

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS, LA GOBERNACIÓN DE BOYACA y LA UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO mediante contrato 290-2018 del proyecto: “Interacciones entre *Tecia solanivora*, rizobacterias con actividad entomopatógena y plantas de papa para favorecer la competitividad de la cadena papera en el Departamento de Boyacá” Convocatoria 794-2017.

A Dios, primeramente.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, nuestra alma mater, por abrirnos sus puertas y permitirnos formar en sus aulas, brindándonos el conocimiento y las herramientas necesarias para forjarnos como profesionales.

A la Universidad Antonio Nariño por permitirnos desarrollar nuestro proyecto de grado en sus instalaciones y acogernos como uno más de sus alumnos en cada laboratorio, donde se llevó a cabo nuestro trabajo.

Al profesor Javier Vanegas Guerrero Dr. MSc. nuestro director y asesor externo por brindarnos la oportunidad de hacer parte de su equipo de investigación, por la paciencia, la guía y la compañía que nos brindó en cada uno de los procesos necesarios para el desarrollo y culminación de este proyecto. Al grupo de investigación de Microbiología, por compartir su conocimiento y amistad, por su confianza, esfuerzo y cooperación en la realización de este trabajo.

A la profesora Ligia Consuelo Sánchez MSc. nuestra asesora interna por el conocimiento y la formación académica que nos brindó en el énfasis de microbiología ambiental, por sus asesorías y aportes, por la confianza y el apoyo durante este proceso.

A nuestras familias, las personas más importantes de nuestra vida, por la confianza, el apoyo, la fuerza y la motivación para ser mejores cada día y tener el valor de superar cada uno de los obstáculos que se nos presentaron y poder cumplir con esta meta.

A nuestros amigos por ser cómplices y apoyo de este proceso.

A todos, Muchas gracias.

Jennifer Carolina Parada Calderón

Laura Yamile Pinzón Franco

Tabla de contenido

Pág.

RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo general.....	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. ANTECEDENTES	17
3.1 Microorganismos con actividad degradadora.....	17
3.2 Enzimas, plásmidos y genes involucrados en la degradación de plaguicidas.	19
4. MARCO TEÓRICO	21
4.1. El cultivo de papa en Colombia.....	21
4.2. Plaguicidas.....	22
4.2.1. Mecanismos de transporte de los plaguicidas	23
4.3 Clasificación de los plaguicidas.....	24
4.3.1 Según su toxicidad	24
4.3.2. Según su estructura química	24
4.3.3. Según su vida media.....	25
4.4 Descripción de los plaguicidas objeto de la investigación	25
4.4.1 Profenofos y Cipermetrina	25
4.4.2 Clorpirifos.....	27
4.4.3 Lambda cihalotrina	28
4.4.4 2, 4– D: Ácido Diclorofenoxiacético.....	29
4.5 Microorganismos de la rizósfera y potencial biotecnológico.....	30
4.6 Análisis bioinformático mediante la plataforma PATRIC.....	28
5. DISEÑO METODOLÓGICO	29
5.1. Diseño de investigación.....	29
5.2. Hipótesis.....	29
5.3. Metodología.....	29
5.3.1. Objetivo 1.....	32
5.3.2. Objetivo 2.....	34
5.3.3. Objetivo 3.....	37
6. RESULTADOS	40
7. DISCUSIÓN	51
8. CONCLUSIONES	57

9. RECOMENDACIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	65

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad basada en la dosis letal (LD50)	21
Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas según su estructura química	21
Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas según su vida media	22
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de Profenofos	23
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de Cipermetrina	23
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de Clorpirifos	24
Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas de Lambda cihalotrina	25
Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de 2, 4- D: Ácido Diclorofenoxiacético	27
Tabla 9. Genes y enzimas reportados por la literatura asociados a la degradación de organofosforados	33
Tabla 10. Crecimiento de rizobacterias en MSM sólido con Clorpirifos como única fuente de carbono	37
Tabla 11. Crecimiento de rizobacterias en MSM sólido con Profenofos: Cipermetrina (5:1), como única fuente de carbono	38
Tabla 12. Crecimiento de rizobacterias en MSM sólido con lambda-cihalotrina, como única fuente de carbono	38
Tabla 13. Crecimiento de rizobacterias en MSM sólido con 2,4: D, como única fuente de carbono	39
Tabla 14. Estimación del crecimiento bacteriano en UFC de <i>R. terrigena</i> y <i>E. asburiae</i>	41
Tabla 15. Parametros cinéticos de crecimiento de <i>Raoultella terrigena</i> C47 y <i>Enterobacter asburiae</i> TN152 con los cuatro plaguicidas como única fuente de carbono	42
Tabla 16. Compuestos y enzimas asociados a la degradación de xenobióticos por <i>Enterobacter asburiae</i> TN- 152 identificados por PATRIC (Versión 3.6.2)	43
Tabla 17. Compuestos y enzimas asociados a la degradación de xenobióticos por <i>Raoultella terrigena</i> C47 identificados por PATRIC (Versión 3.6.2)	44

Tabla 18. Área de los picos obtenidos en cromatograma de HPLC de los controles del tratamiento de clorpirifos.....	46
---	-----------

Índice de figuras

Figura. 1. Cinética de crecimiento de <i>Raoultella terrigena</i> C47.....	40
Figura. 2. Cinética de crecimiento de <i>Enterobacter asburiae</i> TN152.....	41
Figura. 3 Cinética de degradación evaluada con la medición de Carbono orgánico total (COT), mediante espectrofotometría de luz visible.....	45
Figura 4. Cromatograma de los controles del tratamiento con clorpirifos.....	46
Figura 5. John, Shaik (2015). vía de degradación propuesta para Clorpirifos.....	51



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Potencial biotecnológico de rizobacterias procedentes de papa (*Solanum tuberosum* L) para la degradación de tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D.

RESUMEN

El cultivo de papa es afectado por varias plagas, como insectos, hongos, bacterias y malezas. Su control depende, principalmente, de la aplicación de insecticidas, cuyos productos de degradación son persistentes y tóxicos para el hombre, animales y el medio ambiente. Se ha demostrado que estos pueden ser degradados mediante el uso de rizobacterias. El objetivo de este trabajo fue determinar la degradación de tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D utilizando rizobacterias de papa. Se seleccionaron dos bacterias por su capacidad de crecer en medio mínimo de sales utilizando como única fuente de carbono plaguicidas. Se realizó la búsqueda de genes y enzimas asociados a la degradación de compuestos xenobióticos de los dos aislamientos seleccionados. Se aplicó la metodología COT y HPLC para detectar la degradación de los plaguicidas. La cinética de crecimiento mostró que *Raoultella terrigena* C47 y *Enterobacter asburiae* TN152 utilizan los plaguicidas como única fuente de carbono, debido a que tienen genes que están asociados a la degradación de insecticidas. La enzima citocromo P450 fue detectada tanto en C47 como TN152, específica para el metabolismo y degradación de clorpirifos. Mediante la técnica de HPLC se comprobó la degradación de clorpirifos por parte de *R. terrigena* C47. Estos resultados demuestran que las rizobacterias aisladas de papa tienen el potencial de degradar los compuestos en estudio. Se espera a futuro que estos microorganismos puedan implementarse en técnicas de biorremediación y poder

llevar el diseño experimental a mayor escala, para el tratamiento directo de los productos de degradación de estos contaminantes.

Palabras Clave: Potencial biotecnológico, rizobacterias, insecticidas, degradación, *Solanum tuberosum* L.

ABSTRACT

The potato crop is affected by various pests, such as insects, fungi, bacteria and weeds. Its control depends mainly on the application of insecticides, whose degradation products are persistent and toxic to man, animals and the environment. These have been shown to be degraded through the use of rhizobacteria. The objective of this work was to determine the degradation of three organophosphate pesticides and the 2,4-D herbicide using potato rhizobacteria. Two bacteria were selected for their ability to grow in minimal salt medium using pesticides as the sole carbon source. The search for genes and enzymes associated with the degradation of xenobiotic compounds of the two selected isolates was performed. The TOC and HPLC methodology were applied to detect the degradation of pesticides. Growth kinetics showed that *Raoultella terrigena* C47 and *Enterobacter asburiae* TN152 use pesticides as the only carbon source, because they have genes that are associated with the degradation of insecticides. The cytochrome P450 enzyme was detected in both C47 and TN152, specific for the metabolism and degradation of chlorpyrifos. Using the HPLC technique, the degradation of chlorpyrifos by *R. terrigena* C47 was verified. These results demonstrate that isolated potato rhizobacteria have the potential to degrade the compounds under study. It is expected in the future that these microorganisms can be implemented in bioremediation techniques and be able to carry out the experimental design on a larger scale, for the direct treatment of the degradation products of these contaminants.

Keywords: Biotechnological potential, rhizobacteria, insecticides, degradation. *Solanum tuberosum* L.

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura es el eje principal de la economía de países en desarrollo y de transición(1) y su producción depende del uso de productos químicos sintéticos, responsables de al menos el 30% del aumento de la productividad de los cultivos(2) como los plaguicidas. El cultivo de papa es uno de los que presenta mayor demanda de insecticidas y es la base de la alimentación humana(3). Ocupa el cuarto lugar a nivel mundial como alimento de mayor consumo y producción, después del trigo, el arroz y el maíz. En Colombia, ocupa el tercer lugar de producción en la actividad agropecuaria nacional, después del maíz blanco, destacándose por su explotación y la variedad de actividades que genera. Es la base de la economía local de 283 municipios, distribuida principalmente en los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Antioquia y Nariño(4).

La agricultura intensiva para el cultivo de papa ha aumentado la diseminación y establecimiento de insectos plaga que son controlados por plaguicidas organofosforados, organoclorados y cipermetrinas, dentro de los cuales, los más usados son los del primer y tercer grupo, cuyos productos de degradación son persistentes en el suelo, agua y aire por varios meses y son tóxicos para insectos benéficos, mamíferos, peces y el hombre(4). Estos insecticidas representan un riesgo ambiental y de salud pública y pueden tener un impacto negativo en organismos que no son su objetivo y contaminar los alimentos(3). Lamentablemente, Colombia ocupa el tercer puesto en América Latina en el uso de plaguicidas, después de Brasil y México (FAO)(4).

Para enfrentar esta problemática, se han utilizado diferentes tecnologías. Una de ellas es la biorremediación, la cual emplea los procesos metabólicos de microorganismos como bacterias, virus y hongos, que alteran la estructura química de materiales orgánicos (contaminantes) para reducirlos a compuestos simples y menos o nada tóxicos. Debido a esta actividad microbiana, los contaminantes no se destruyen, sino que se pueden transformar en diferentes compuestos como dióxido de carbono, iones cloruro, agua y biomasa(5).

Entre los compuestos tratados por esta biotecnología, se pueden citar: plaguicidas, combustibles, hidrocarburos, solventes clorados, compuestos químicos industriales, entre otros. Es por esto, que el objetivo general de este trabajo fue determinar el potencial biotecnológico de dos rizobacterias de papa, para degradar tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D, contaminantes de cultivos de papa en Boyacá. Los objetivos específicos fueron: 1. Establecer la capacidad de dos rizobacterias de papa para utilizar tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D como fuente de carbono; 2. Identificar mediante herramientas de bioinformática, los mecanismos asociados a la degradación de compuestos xenobióticos de dos rizobacterias aisladas de papa y 3. Determinar la degradación de plaguicidas por rizobacterias mediante técnicas analíticas.

Para esto, se seleccionaron dos rizobacterias aisladas de suelo de papa, con capacidad de crecer en medio mínimo de sales utilizando como única fuente de carbono los tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D. Se realizó la búsqueda de genes y enzimas asociados a la degradación de insecticidas en bases de datos bibliográficas y artículos de investigación, para comparar con la base de datos de la plataforma PATRIC, donde se encuentran cargados los genomas de las bacterias en estudio, y así poder detectar la presencia de genes y enzimas en común. Con el fin de determinar el potencial de degradación de los plaguicidas en estudio, por medio de las dos rizobacterias, se aplicaron dos técnicas analíticas: Carbono orgánico total (COT) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Dentro de los resultados obtenidos, la cinética de crecimiento mostró que las rizobacterias seleccionadas por su óptimo crecimiento: *Raoultella terrigena* C47 y *Enterobacter asburiae* TN152, tienen la capacidad de utilizar los plaguicidas como única fuente de carbono. La enzima citocromo P450 fue detectada tanto en C47 como TN152, específica para el metabolismo y degradación de clorpirifos junto con otras enzimas asociadas. Mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se comprobó la degradación de clorpirifos por parte de *R. terrigena* C47.

Este estudio demuestra que las dos rizobacterias aisladas de papa, tienen el potencial de degradar los plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4: D, comúnmente utilizados en los cultivos de papa en Colombia. Se espera a futuro que estos microorganismos puedan implementarse en técnicas de biorremediación y poder llevar el diseño experimental a mayor escala, para el tratamiento directo de los productos de degradación de estos contaminantes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar el potencial de dos rizobacterias de papa para degradar tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D.

2.2 Objetivos específicos

1. Establecer la capacidad de dos rizobacterias de papa para utilizar tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D como fuente de carbono
2. Identificar mediante herramientas de bioinformática, los mecanismos asociados a la degradación de compuestos xenobióticos de dos rizobacterias aisladas de papa.
3. Determinar la degradación de plaguicidas por rizobacterias mediante técnicas analíticas.

3. ANTECEDENTES

3.1 Microorganismos con actividad degradadora

La biorremediación implica el uso de microorganismos para la degradación y transformación de contaminantes de forma amigable para el medio ambiente. Se han evaluado en bacterias, algas y hongos que demuestran la capacidad de biorremediación, por esto Singh *et al*(6) *en el* (2006), describen las vías para la degradación de algunos compuestos organofosforados por microorganismos. Analizan el aislamiento, la caracterización, la utilización y la manipulación de las principales enzimas desintoxicantes y las bases moleculares de la degradación, además de los principales logros y avances tecnológicos hacia la biorremediación de compuestos organofosforados.

Así mismo Castellanos(7) en el 2008, caracterizó bacterias degradadoras de carbofuran de cultivados con papa (*Solanum tuberosum*) con diferente historia de aplicación del plaguicida (1, 3 y 8 años respectivamente) usando carbofuran como única fuente de carbono y/o nitrógeno. El demostró que *Sphingomonas paucimobilis* aisladas del suelo con 8 años de aplicación de Furadan 3SC® pueden degradar el anillo aromático del carbofuran eficientemente.

Por otro lado, Pérez(8) en el (2014), comparó la capacidad de degradación de *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* sp y *Arthrobacter* sp en dos ensayos de biorremediación, uno en fase líquida y otro en fase sólida. El método más eficaz fue en fase sólida y el consorcio bacteriano mostró mayor capacidad de degradación con respecto a las cepas individualmente. También evidenciaron mediante cromatografía líquida y espectrofotometría del suelo, que el compuesto con mayor facilidad de degradación es el pesticida cleaner compuesto por Cyhalofop Butil como ingrediente activo, dando como resultado aproximadamente un 100% de biodegradación del compuesto.

Akbar *et al*(9), en el 2014, evaluaron la actividad degradadora de una comunidad bacteriana de suelo pakistaní con un historial de aplicación de clorpirifos (CP) durante más de 10 años. Los aislamientos se seleccionaron en agar mínimo con

CP como única fuente de carbono a 20 -100 mg/L durante 10 días. Las cepas de *Acinetobacter calcoaceticus* LCp4, *Stenotrophomonas maltophilia* LCp5, *Pseudomonas mendocina* LCp8 y *P. aeruginosa* LCp9 mostraron el mayor potencial de degradación de CP y fueron seleccionados para el desarrollo de consorcios. La biodegradación se estimó por HPLC. Los aislamientos individuales degradaron entre el 60 y el 75% de CP, mientras que la eficiencia del consorcio fue mayor.

La determinación del porcentaje de degradación de compuestos ha sido evaluada por distintos métodos. Marín *et al.*(10) en el 2015 realizaron un estudio donde determinaron la presencia de pesticidas organofosforados en muestras de suelo y leche de ganado bovino mediante métodos de extracción soxhlet y micro extracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME). Ellos reportaron la presencia de demeton-S-metilsulfón en concentraciones entre 272.9 y 1793.3 ppm en los suelos de cultivo y 12.9 ppm en leche de vaca. *Bacillus* sp y *Pantoea agglomerans* fueron los mejores aislamientos con degradación del compuesto organofosforado clorpirifos de 73.5% y 68.67% ⁽¹⁰⁾.

En Colombia, Jaramillo *et al.*(11), en el 2016, caracterizaron bacterias degradadoras de insecticidas organofosforados (OF) de suelo de Cartagena. Una parte de las muestras fueron sometidas a extracción Soxhlet para realizar análisis cromatográfico para identificar los OF. La otra parte del suelo se expuso a un pesticida organofosforado, monocrotofos (200 ppm) por 30 días. De estas muestras de suelo aislaron *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas aeruginosa* con capacidad degradadora de organofosforados.

En relación con este tema, Jayanthi y Sivagnanam(12) en el 2016, caracterizaron la bacteria *Ochrobactrum* sp de un cultivo de arroz, con la capacidad de degradar en menos de 24 h clorpirifos a una concentración de 300ppm como única fuente de carbono. Ellos comprobaron en suelo estéril la degradación de clorpirifos por HPLC.

3.2 Enzimas y genes involucrados en la degradación de plaguicidas

El potencial de degradación de los microorganismos se debe a la producción de enzimas que transforman de forma natural los compuestos tóxicos en sustancias menos tóxicas. Maldonado(13) en el 2017 evaluó la biodegradación de insecticida organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa por *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*. El tratamiento de muestra de suelo con *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum* fue el mejor tratamiento con un porcentaje de degradación del insecticida de 66.80%, a través de producción de las enzimas P-450 monooxigenasas en *Trichoderma harzianum*. El porcentaje de degradación del clorpirifos fue entre 50,63 a 60,80 %, lo cual indica que estos organismos son eficientes para la degradación del Clorpirifos. Además, concluyeron que factores como la temperatura, la humedad y los nutrientes influyen en el tiempo de biodegradación.

Así mismo, Fujioka y Casida(14) en el 2007, estudiaron *in vitro* la formación de conjugados de las enzimas S-transferasas (GSH o GST) y el sistema citocromo P450, las cuales están involucradas en el metabolismo de organofosforados. Mediante cromatografía líquida-espectrometría de ionización-masa por electropulverización (LC-ESI-MS), analizaron cinco conjugados de GSH identificados a partir de Clorpirifos y clorpirifos oxon en ratones que contenían estos compuestos. Como resultado evidenciaron que el metabolismo catalizado por GST se une a P450 e hidrolasas como contribuyentes importantes a la desintoxicación de OP.

Almonacid(15) en el 2015, evaluó la bioacumulación y biodegradación de Clorpirifos utilizando Clorpirifos¹⁴C, efectos ecotoxicológicos mediante bioensayos (EC50) y determinación de biomarcadores relacionados con el estrés oxidativo, como Glutación-S-transferasa (GST), catalasa (CAT), glutación reductasa (GR) y glutación peroxidasa (GPx) en la macrófita acuática *Lemna valdiviana* (Phil). Demostraron un promedio de bioacumulación de 16,8% a las 96 horas de exposición a partir de 12,5 mg L⁻¹ de Clorpirifos, el aumento significativo del biomarcador GST y el 34,8% de degradación. Por lo tanto, concluyeron que la

especie *Lemna valdiviana* puede ser usada para fitorremediación en ambientes contaminados con este tipo de pesticidas.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. El cultivo de papa en Colombia.

La papa (*Solanum tuberosum L.*) es una planta herbácea del género *Solanum*, de la familia Solanácea, originaria de los Andes de América del Sur. Su cultivo es uno de los más importantes en países desarrollados y en vía de desarrollo, el cual, según la FAO, ocupa el cuarto lugar a nivel mundial como alimento de alto valor nutricional y de mayor consumo y producción, después del trigo, el arroz y el maíz. Está presente en más de 100 países, entre ellos los de América del Norte y Europa como mayores productores, y, los de Asia, África y América Latina(16).

En Colombia, es un producto de consumo masivo para la población, cuyo cultivo se destaca en la actividad agropecuaria nacional como la principal actividad económica del piso térmico frío. Cerca de cien mil familias se dedican al cultivo de papa en 10 departamentos y 283 municipios, lo cual genera alrededor de 75 mil empleos directos y unos 189 mil indirectos. Los aspectos directamente relacionados tienen que ver con su explotación. En forma indirecta, es un gran promotor de otros sectores de la economía como el transporte, la industria procesadora de derivados de la papa, las firmas productoras y distribuidoras de agroquímicos, la producción de empaques, entre otros(17).

De acuerdo con la producción nacional alrededor del 90% de área sembrada de papa se concentra en Cundinamarca (37%), Boyacá (27%), Nariño (20%) y Antioquia (6%). Continúan en su orden los departamentos de Cauca, Santander, Tolima, Valle del Cauca y Caldas, pero con participaciones inferiores al 4,60%(18).

Su desarrollo depende de la variación de factores climáticos como la lluvia y las heladas, circunstancias que tienen influencia en la aparición de enfermedades y distintas especies de insectos plaga. En este sentido, dentro de las plagas de mayor impacto económico en el cultivo de la papa, se destacan: gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*), pulgillas (*Epitrix parvula*), polilla guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora*), tostón (*Liriomyza quadrata*), comedores de follaje (*Scrobipalpus absoluta*), polilla pequeña o palomilla (*Phthorimaea operculella*),

chisa, mojoy o morrongo (*Ancognatha scarabaeoide*, *Phyllophaga obsoleta*) polilla gigante de la papa (*Symmetrischema plaesiosema*), babosa (*Milax gagates*), trips (*Frankliniella tuberosi*, *Thrips palm*), gusano Blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*), Tiroteador (*Naupactus sp*) y áfidos. Igualmente, en cuanto a las enfermedades se resaltan: la gota de la papa, gotera o tizón tardío, tizón temprano o mancha negra de la hoja, roña polvosa, torbo, martaja, tocineta o macana, costra negra o rizoctoniasis, pudrición blanda, moco o dormidera, sarna común, marchitez bacteriana, enrollamiento de las hojas, mosaico rugoso, mosaico latente o mosaico suave, amarillento de venas de la papa, cenicilla u oidiosis, y nematodo dorado de la papa. Por otro lado, las enfermedades causadas por virus son introducidas a través de heridas causadas por insectos, hongos, medios mecánicos o por nematodos; además, algunos virus son esparcidos por la maquinaria y por el contacto entre plantas(19).

De ahí que, dentro de las prácticas para el control de las plagas que afectan el cultivo de papa, los agricultores utilizan con frecuencia una gran cantidad de plaguicidas químicos, sin el debido criterio técnico. En consecuencia, afecta los costos de producción y genera otros problemas secundarios como: resistencia de las plagas a los insecticidas, destrucción de los enemigos naturales, reducción de fauna y flora, desequilibrios eco sistémicos, alta contaminación ambiental por acumulación de plaguicidas y sus metabolitos secundarios en suelos, agua y aire(20).

4.2. Plaguicidas

El término plaguicida según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: Programas y proyectos (FAO) se refiere a «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 no deseadas de plantas o animales 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»(21).

Los plaguicidas son uno de los mayores contaminantes del ambiente, debido a que pueden contaminar fuentes de agua y representar un riesgo para la salud del ser humano. Además, la flora y fauna también se ve afectada y algunos insectos pueden generar resistencia a plaguicidas por su consumo frecuente. El alcance de los plaguicidas depende de factores como: estructura química, solubilidad, lipofiliidad, volatilidad, presión de vapor, tiempo de vida medio, coeficiente de partición, coeficiente de adsorción de carbono orgánico, entre otros(22).

4.2.1. Mecanismos de transporte de los plaguicidas

Los plaguicidas pueden desplazarse por el medio desde su fuente de origen mediante diferentes medios de transporte como: suelo, aire, agua, sedimento y biota. En cada una se generan procesos alternos que contribuyen al movimiento de estos contaminantes, tales como:

Difusión: Es un proceso físico donde las moléculas se mueven por gradiente de concentración, debido a que el soluto se mueve a través de soluciones o gases por azar, a medida que se va distribuyendo la sustancia las moléculas chocan entre ellas y este movimiento favorece la formación de enlaces entre el soluto y el solvente. Tiempo después los enlaces formados pierden su estabilidad y se fraccionan lo cual les permite una mejor distribución en el ambiente(23).

Lixiviación: Se define como la disolución de un elemento al tener contacto con un solvente, lo cual permite disolverse y traspasar y alcanzar las capas más profundas del suelo y tener acceso a las fuentes de agua(24).

Evaporación: Es un proceso físico en el cual una sustancia pasa de estado líquido a estado gaseoso, esto ocurre por la acumulación de energía que rompe la tensión artificial de la molécula y la libera a la atmósfera en forma de vapor(25).

4.3 Clasificación de los plaguicidas

Los plaguicidas pueden ser clasificados según sus características como son la toxicidad, estructura química y vida media.

4.3.1 Según su toxicidad

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad basada en la dosis letal (LD₅₀).*

Clase de la OMS		LD ₅₀ para la rata	
		(mg / kg de peso corporal)	
		Oral	Dérmica
IA	Extremadamente peligroso	< 5	< 50
IB	Altamente peligroso	5 - 50	50 - 200
II	Moderadamente peligroso	50 - 2000	200 - 2000
III	Ligeramente peligroso	>2000	> 2000
U	Es poco probable que presente peligro agudo		5000 o superior

* Tomado de: (WHO) World Health Organization(25). The who recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification (2009).

4.3.2. Según su estructura química

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas según su estructura química. *

FAMILIA QUÍMICA	EJEMPLOS
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malatión, Profenofos
Carbamatos	Carbaryl, methomyl, propoxur
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cypermethrin, fenvalerato, permetrín
Derivados bipiridilos	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, picram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazine, ametryn, desmetryn, simazine
Compuestos orgánicos del estaño	Cyhexatin, dowco, plictrán
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

*Tomado de: Ramírez J , Lacasaña M(2). Plaguicidas: Clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición (2001).

4.3.3. Según su vida media

Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas según su vida media. *

Persistencia	Vida media	Ejemplos
No persistente	De días a 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

* Tomado de: Ramírez J, Lacasaña M(2). Plaguicidas: Clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. 2001.

4.4 Descripción de los plaguicidas objeto de la investigación

4.4.1 Profenofos y Cipermetrina

Profenofos

Concentrado emulsionable de tipo insecticida, perteneciente al grupo químico de los organofosforados y clasificado como Categoría toxicológica: IB o altamente peligroso (Ficha técnica Anexo 3-A). Es usado comúnmente en el área agrícola. Su modo de acción es no sistémico, debido a que actúa por contacto y acción estomacal(26). Las propiedades fisicoquímicas de Profenofos se encuentran a continuación en la (Tabla 4).

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de Profenofos. *

PROPIEDAD	
Aspecto	
Punto de fusión	Líquido amarillo pálido con olor aliáceo No aplica ya que el producto es líquido a 20°C
Punto de ebullición	110°C a 0.001 mm de Hg
Presión de vapor	1.3 mPa a 20°C
Solubilidad en agua	20 mg/l a 20°C
Coefficiente de partición n-octanol /agua Kow: LogPow	4.44
Coefficiente de adsorción normalizada Koc	869 – 3162

*Tomado de: Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial(27). Resolución número (150). 2008

Cipermetrina

Concentrado emulsionable de tipo insecticida, perteneciente al grupo químico de los Piretroides sintéticos y clasificado como Categoría toxicológica: IB o altamente peligroso (Ficha técnica Anexo 3-B). Es usado comúnmente en el área agrícola por su amplio espectro de acción sobre diversas plagas, como lepidópteros, Coleoptera, Diptera, Hemiptera(27). Las propiedades fisicoquímicas de Cipermetrina se encuentran a continuación en la (Tabla 5).

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de Cipermetrina: *

PROPIEDAD	
Aspecto	
	Cristales, masa semisólida viscosa de color amarillo a pardo amarillo con olor característico
Punto de fusión	60 – 80°C
Punto de ebullición	170 – 195°C
Presión de vapor	2.3 nPa a 20°C
Solubilidad en agua	0.004 mg/l a pH 7 y 20°C
Coefficiente de partición n-octanol /agua Kow: LogPow	6.6
Coefficiente de adsorción normalizada Koc	160000 (ml/g)

* Tomado de: Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial(27). Resolución número (150). 2008

Usos

El insecticida fullminator (profenofos + cipermetrina) es usado para tratar plagas y/o enfermedades de gusano Cogollero (*Spodoptera frugiperda*), Trips (*Thrips palmi*), Tostón (*Liriomyza quadrata*), polilla Guatemalteca (*Tecia solanivora*), gusano Blanco (*Premnotrypes vorax*), Barrenador del Fruto (*Neoleucinodes elegantalis*), en cultivos de arroz, frijol, papa, y tomate(27).

Movilidad y transporte

Presenta baja persistencia en la mayoría de los suelos, a excepción de los suelos ácidos y arcilla donde tiene mayor tendencia a ser absorbido por el suelo(27).

4.4.2 Clorpirifos

Es un insecticida concentrado emulsionable perteneciente al grupo químico de los organofosforado y clasificado como Categoría toxicológica: II ó Moderadamente peligroso (Ficha técnica Anexo 3-C). Es uno de los insecticidas más utilizados en el área agrícola, veterinaria y doméstica. Su modo de acción es no sistémico, debido a que actúa por ingestión e inhalación(28). Las propiedades fisicoquímicas de Clorpirifos se encuentran a continuación en la (Tabla 6)

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de Clorpirifos. *

PROPIEDAD	
Aspecto	
Punto de fusión	Cristales de incoloros a blancos de olor característico 41-42°C
Punto de ebullición	320°F (descomposición)
Presión de vapor	3.35-x 10 ⁻³ Pa a 25°C
Solubilidad en agua	0.941 mg/l a 200°C
Coefficiente de partición n-octanol /agua Kow: LogPow	Log Kow = 4.96 - 5.11
Coefficiente de adsorción normalizada Koc	652-30,381 L/kg

* Tomado de: Watts M(29). Clorpirifos: Un posible COP a nivel global. 2012

Usos

Clorpirifos es usado para tratar plagas y/o enfermedades de cultivos como chile, tomate (jitomate), maíz, manzano, pepino, sorgo, frijol, ejotero, algodón, soya, trigo, alfalfa, cítricos, arroz, y garbanzo(30).

Movilidad y transporte

Clorpirifos presenta una baja volatilidad, debido a tiene tendencia a fijarse en la materia orgánica. Se ha reportado que la disipación de clorpirifos del suelo es más rápida bajo condiciones tropicales, dado que su vida media en el suelo es de 6-25 semanas. En otros estudios donde se ha aplicado clorpirifos bajo condiciones tropicales desnudas, la vida media varía entre 0.6 y 5,4 días, dado que la sombra parece reducir la fotodegradación y por ello es razonable asumir que la persistencia se aumentará en el frío y en las condiciones a menudo oscuras del Ártico(30).

4.4.3 Lambda cihalotrina

Es un insecticida concentrado, perteneciente al grupo químico de los piretroides y clasificado como Categoría toxicológica: II ó Moderadamente peligroso (Ficha técnica Anexo 3-D). Actúa por contacto e ingestión, tiene amplio campo de actividad, buen efecto de choque y buena persistencia(31). Las propiedades fisicoquímicas de Clorpirifos se encuentran a continuación en la (Tabla 7).

Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas de Lambda cihalotrina. *

PROPIEDAD	
Aspecto	Líquido de color marrón claro
Punto de fusión	49.2 °C
Punto de ebullición	275°C
Presión de vapor	Pa a 20°C: <0.001
Solubilidad en agua	Miscible
Coefficiente de partición n-octanol /agua Kow: LogPow	7.0
Coefficiente de adsorción normalizada Koc	345000 ml/g

*Tomado de: Organización Internacional del Trabajo (OIT)(32). Lambda-cihalotrina.1997

Usos

Lambda cihalotrina es usado para tratar plagas y/o enfermedades como chinche verde, garrapatillo y otras chinches (Hemípteros); numerosas moscas blancas, pulgones, *Scaphoideus titanus* y otros Homópteros; gusanos grises, orugas defoliadoras, orugas minadoras, polillas y otras muchas orugas (larvas de Lepidópteros); y otros Coleópteros, d cultivos de alcachofa, alfalfa, algodón, almendro, apio, brócoli, cebolla, cereales, cítricos, espinaca, colza, coliflor, leguminosas, lechuga, maíz, olivo, pimiento, repollo(33).

Movilidad y transporte

Lambda cihalotrina presenta baja movilidad por lo que no representa un riesgo de contaminación para el agua subterránea. Los suelos con alto contenido de arena o muy bajo contenido de materia orgánica tienden a retener menos este insecticida. Su persistencia en suelo es moderada, con una vida media que varía de 4 a 12 semanas. Además es estable a la hidrólisis en aguas ácidos y neutras(33).

En las plantas es metabolizado a una velocidad moderada, su vida media en los tejidos vegetales es de 40 días(33).

4.4.4 2, 4– D: Ácido Diclorofenoxiacético

Es un herbicida de acción sistémica, perteneciente al grupo químico de los derivados del ácido fenoxiacético y clasificado como Categoría toxicológica: II ó Moderadamente peligroso (Ficha técnica Anexo 3-E). Es usado para el control de una amplia gama de malezas de hoja ancha(34). Las propiedades fisicoquímicas de 2,4– D: Ácido Diclorofenoxiacético se encuentran a continuación en la (Tabla 8).

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas de 2, 4– D: Ácido Diclorofenoxiacético. *

PROPIEDAD	
Aspecto	Sólido blanco Incoloro
Punto de fusión	140.5°C
Punto de ebullición	
Presión de vapor	11 mPa (20°C)
Solubilidad en agua	311 mg/ L pH 1; 25°C)
Coefficiente de partición n-octanol /agua Kow: LogPow	2.58-2.83 (pH 1)
Coefficiente de adsorción normalizada Koc	88.4 ml/g (bajo: es móvil en el suelo)

*Tomado de: González J(35). Manual técnico Muestreo para el Control de la Calidad de Plaguicidas Agrícolas. 2003.

Usos

El 2,4-D es generalmente usado para el control de malezas en prados, céspedes, herbáceas y arbustos a lo largo de cercas, carreteras y pasos a nivel de vías de ferrocarril, también puede servir como un análogo sintético de auxinas(35).

4.5 Microorganismos de la rizósfera y potencial biotecnológico

La fertilidad del suelo está determinada por su capacidad de proveer los nutrientes necesarios para el desarrollo adecuado de las plantas; en ello la comunidad microbiana participa activamente en la captación de nutrientes y mineralización de la materia orgánica. Dentro de estos microorganismos del suelo el grupo más abundante corresponde a las bacterias, denominadas “rizobacterias”, las cuales colonizan la rizósfera (parte del suelo inmediata a las raíces y que está bajo la influencia directa de estas) de las plantas, donde generan una relación beneficiosa para ambas partes(36).

Dentro de las funciones de las rizobacterias se destacan: el control biológico de patógenos, la inducción de resistencia en las plantas contra enfermedades e

insectos plaga, promoción de crecimiento y degradación de compuestos xenobióticos, entre otros(37).

En este sentido, los microorganismos con capacidad degradadora, son potencialmente capaces de superar la baja disponibilidad en los suelos de compuestos xenobióticos, por medio de mecanismos específicos como la adhesión y producción de tensioactivos biológicos y la quimiotaxis. Además, son los únicos agentes capaces de transformar los compuestos químicos sintéticos a productos inorgánicos (proceso conocido como mineralización)(38).

Para que la biodegradación se lleve a cabo en el ambiente, es necesario: 1) La presencia de microorganismos con las enzimas necesarias para la degradación, 2) El compuesto químico debe ser accesible al microorganismo, 3) Si la enzima inicial que provoca la degradación es extracelular, los enlaces químicos sobre los que actúa la enzima deben estar expuestos para dar lugar a la catálisis, 4) Si la enzima inicial que provoca la degradación es intracelular, debe penetrar la superficie hasta la zona interna donde actuará, 5) Si la población de microorganismos es pequeña, las condiciones ambientales deben contribuir en la proliferación de los microorganismos(38).

Entre los géneros más comunes de bacterias del suelo que intervienen en el proceso de degradación de insecticidas, que se han reportado son: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinefobacter*, *Brevibacterium*, *Crynebacterium* y *Flavobacterium*(38).

4.6 Análisis bioinformático mediante la plataforma PATRIC

Una de las bases de datos más reconocidas es The Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC, por sus siglas en inglés), un centro de recursos de bioinformática bacteriano, el cual proporciona datos de las áreas genómica, transcriptómica, interacciones proteína-proteína (IBP). Los genomas que almacena el sistema los gestiona mediante RAST tk RASTtk (Rapid Annotation using Subsystem Technology)(39). Esta base de datos organiza los genes por categorías como metabolismo, degradación de xenobióticos, genes asociados a promoción de crecimiento, factores de virulencia, resistencia antimicrobiana, entre otros, permitiendo una búsqueda más fácil(40).

5. DISEÑO METODOLÓGICO.

5.1. Diseño de investigación

Tipo y enfoque de investigación: El presente estudio es de carácter mixto (cualitativo y cuantitativo) y su enfoque es experimental.

Universo: Microorganismos de suelo de cultivos de papa en Boyacá

Población: Microorganismos de suelo rizosférico de cultivos de papa en Boyacá.

Muestra: Rizobacterias procedentes de suelo de cultivos de papa en Boyacá.

5.2. Hipótesis

Las rizobacterias aisladas de papa (*Solanum tuberosum* L) tienen la capacidad de degradar tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4: D.

5.3. Metodología

5.3.1. Objetivo 1. Establecer la capacidad de dos rizobacterias de papa para utilizar tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D como fuente de carbono.

Variable independiente: Dos rizobacterias de papa que utilizan como fuente de carbono tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D.

Variable dependiente: Crecimiento en medio mínimo de sales (MMS) con los plaguicidas como única fuente de carbono de dos rizobacterias.

Indicador: Evaluación de crecimiento mediante absorbancia y unidades formadoras de colonia UFC.

Técnicas: Se realizaron siembras en agar MMS utilizando como única fuente de carbono los tres insecticidas organofosforados y el herbicida 2,4: D a distintas concentraciones, para selección de las bacterias según su crecimiento. Posteriormente, se realizaron ensayos de biodegradación en MMS líquido para las bacterias que tuvieron un óptimo crecimiento en agar.

FASE 1. Selección de rizobacterias en medio mínimo de sales con plaguicidas.

Reactivación y conservación.

Se realizó la reactivación de 10 bacterias de un cepario ya existente en el laboratorio de microbiología de la Universidad Antonio Nariño, proveniente de muestras de suelo de papa. Los 10 aislamientos se sembraron en agar nutritivo a 30°C por 24 horas, para evidenciar crecimiento, a fin de realizar los ensayos para exponer las bacterias a los insecticidas. Posteriormente, se crio-preservaron las bacterias en caldo nutritivo y glicerol al 50%, para mantener la viabilidad y tener una futura reactivación de los microorganismos conservados (Anexo 1).

Preparación stock insecticidas.

Se prepararon soluciones madre individuales de los tres plaguicidas (Clorpirifos, profenofos: cipermetrina (5:1), lambda-cihalotrina) y el herbicida (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) en metanol al 10%, utilizados como única fuente de carbono en MMS agar modificado y medio líquido para una concentración final de metanol al 1%.(Anexo 2).

Selección

Las 10 bacterias fueron sembradas en agar MMS con: 20, 50, 100, 200, 300 y 500 ppm de los insecticidas (Clorpirifos, profenofos: cipermetrina (5:1), lambda-cihalotrina) y el herbicida (2,4: D) como única fuente de carbono; sales minerales Na_2HPO_4 , KH_2HPO_4 , NaCl , NH_4Cl ; MgSO_4 y CaCl_2 y como agente gelificante agarosa. Los medios se incubaron a 30°C por 96 horas. Se seleccionaron dos cepas, que demostraron óptimo crecimiento y supervivencia en la totalidad de los tratamientos, designadas TN152 y C47, para estudios de degradación de los tres insecticidas organofosforados y el herbicida 2,4: D.

FASE 2. Crecimiento de las rizobacterias con plaguicidas en medio líquido.

Se evaluó la capacidad de degradación de TN152 y C47 de los cuatro plaguicidas en matraces de agitación. Se verificó la pureza de los dos aislamientos. Cada cepa

se inoculó por separado en 200 ml de MMS, para ser ajustadas a 0.2 Abs a una longitud de onda de 600 nm en espectrofotómetro GENESYS™ 20, usando como blanco MMS. Posteriormente, a cada inóculo en caldo mínimo se suplementó con los insecticidas (Clorpirifos, profenofos: cipermetrina (5:1), lambda-cihalotrina) y el herbicida (2,4: D) solo a 300 ppm por separado y como únicas fuentes de carbono. De cada tratamiento se transfirieron 15 ml a frascos ámbar por triplicado y se incubaron a 30°C y agitaron a 230 rpm. Se usó como control el medio no inoculado y suplementado con los insecticidas a igual concentración.

Crecimiento

Para los estudios de crecimiento, se extrajo 1 ml de cultivo durante 6 días, el cual se evaluó por espectrofotómetro a 600 nm y por método de goteo de recuento en placa por diluciones (Anexo 3).

5.3.2. Objetivo 2. Identificar mediante herramientas de bioinformática, los mecanismos asociados a la degradación de compuestos xenobióticos de dos rizobacterias aisladas de papa.

Variable independiente: Genes y enzimas asociados a la degradación de insecticidas.

Variable dependiente: Identificación de genes y enzimas en común, asociados a la degradación de insecticidas.

Indicador: Presencia de genes y enzimas asociados a la degradación de insecticidas en los genomas de dos rizobacterias.

FASE 1. Búsqueda de genes y enzimas asociados a la degradación de insecticidas.

Se creó una base de datos de gen o enzima asociados a la degradación de insecticidas organofosforados a partir de bases de datos bibliográficas y en

artículos de investigación para su detección en el genoma de las bacterias degradadoras (Tabla 9).

El laboratorio de Microbiología de la Universidad Antonio Nariño cuenta con un grupo de genomas completos de tipo bacteriano, dentro de los cuales se encuentran las bacterias en estudio. Los genomas se encuentran cargados en la plataforma PATRIC (Versión 3.6.2)(39), en la cual se realizó la búsqueda de los genes y enzimas asociados a la degradación de compuestos xenobióticos específicos de cada bacteria. Con los datos recopilados se construyó una base de datos por bacteria.

Tabla 9. Genes y enzimas reportados por la literatura asociados a la degradación de organofosforados.

ENZIMA	GEN CODIFICANTE	FUENTE
Piretroide hidrolasa	<i>pytH</i>	(41)
Carboxilesterasa hidrolizante piretroide	<i>pytZ</i>	(42)
Serina esterasa	CE	(43)
Fosfotriesterasa	<i>opdA</i>	(6)
Fosfonatasa	<i>Phn</i>	(6)
C-P lyase	glp A&B	(6)
ADPase	<i>adpB</i>	(6)
Fosfato éster hidrolasa	<i>pehA</i>	(6)
Organofosfato hidrolasa	<i>mpd</i>	(6)
Fosfotriesterasa	<i>PdeA</i>	(6)
Fosfotriesterasa	<i>hocA</i>	(6)
Hidrolasa organofosforada	<i>opd</i>	(6)
Anhidrolasa ácida organofosforada (OPAA)	<i>oph</i>	(6)
Aminopeptidasa A.	<i>PepA</i>	(6)
Glutación- S -transferasa	GSTT1	(14)
Citocromo P450	CYP, CYP2J2, CYP2T, CYP2V, CYP2W	(44)
Arildialquilfosfatasa	<i>adpB</i>	(6)
Esterasa	<i>est5S</i>	(45)

FASE 2. Comparación de las bases de datos

Se compararon las dos bases de datos anteriormente mencionadas (fase 1), para detectar la presencia de genes o enzimas en común. Además, se buscó de cada enzima o gen sus propiedades, el metabolismo, su relación con los insecticidas.

5.3.3. Objetivo 3. Determinar la degradación de plaguicidas por rizobacterias mediante técnicas analíticas.

Variable independiente: Dos rizobacterias creciendo en los tratamientos con los 4 plaguicidas individualmente.

Variable dependiente: Carbono orgánico total (COT) y la presencia del insecticida clorpirifos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Indicador: Carbono orgánico total (COT) y abundancia de clorpirifos cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Para la determinación de los compuestos orgánicos presentes en los tratamientos con los plaguicidas y la estimación residual de los mismos por HPLC se prepararon las bacterias con los insecticidas como se describió previamente. Luego de 6 días de incubación, se centrifugó dos veces el cultivo del control y los tratamientos. El sobrenadante de cada uno se filtró por separado en poro de 0.45 μm y 0.22 μm , a los cuales, se le agregó HCl a una concentración final del 10% para conservación para la medición del TOC, y para el estudio por HPLC se congelaron a -20°C .

FASE 1. Medición de Carbono orgánico total (COT), mediante espectrofotometría de luz visible.

Se prepararon soluciones iniciales (control) de cada plaguicida a 300 ppm en medio mínimo de sales con un COT de 23.70 mg/L, 20.54 mg/L, 22.10 mg/L y 32.72 mg/L para clorpirifos, profenofos: cipermetrina, lambda-cihalotrina y 2,4: D respectivamente. Las soluciones finales, fueron tratadas con igual concentración de cada insecticida (300 ppm) en medio mínimo de sales, pero inoculadas con cada cepa por separado.

Validación de la técnica.

Se prepararon soluciones madre, para las cuales se dejaron las sales hidrogenoftalato de potasio, bicarbonato de potasio y carbonato de potasio en horno a 37°C por 12 horas para retirar la humedad. Posteriormente, se pesó 1 g de

sal y cada una se disolvió en 100 ml de agua milli-Q. La solución madre quedó a 100 ml/L de hidrogenoftalato de potasio y otra a 100 mg de bicarbonato de potasio y carbonato de potasio. Se realizó una curva de calibración con las diluciones 0.5, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 y 50.0 mg/L de hidrogenoftalato de potasio y otra de bicarbonato de potasio con carbonato de potasio a las mismas concentraciones. A partir de los datos obtenidos, se analizó la linealidad, la precisión la exactitud, el límite de detección (LD) y de cuantificación (LC), como parámetros de validación del método analítico, calculando el coeficiente de correlación, desviaciones estándar, coeficientes de varianza, el factor Beta e intervalos de confianza.

FASE 2. Determinación del potencial de degradación de los compuestos por HPLC.

Con el fin de evaluar la degradación de los compuestos se realizó ensayos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Se usó una cromatografía de fase inversa en condiciones isocráticas con una columna C-18 con dimensiones 250 × 4.6 mm y poro de 5 µm, la fase móvil consiste en Acetonitrilo: Agua: Ácido acético glacial (90:10:1%) a una temperatura de 25°C con flujo de 0.6 mL/min para la detección del compuesto activo del insecticida Clorpirifos que absorbe a una longitud de onda de 290 nm.

Preparación de muestras de plaguicidas individuales

1. Plaguicidas usados: Clorpirifos, profenofos: cipermetrina (5:1), lambda-cihalotrina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético.
2. Se preparó soluciones madre en metanol de cada uno de los insecticidas a una concentración de 1000 ppm en 25 mL.
3. Se tomó una alícuota de 0.10 mL de cada solución preparada, se aforó a 100 mL con agua.

Las soluciones presentaron una concentración final de metanol a 0.10% y de cada uno de los compuestos activos de los pesticidas: 1 ppm de Clorpirifos, Lambda-Cihalotrina y Profenofos - 0.2 ppm de Cipermetrina.

4. Las soluciones se añadieron al medio para degradación.

Preparación muestras HPLC para curva y control.

1. Se tomó una alícuota de 5 ml de cada disolución y se añadió a cada una 1.5 g de NaCl; se agitó hasta solubilizar.
2. Se añadió 10 ml de acetato de etilo, se agitó aproximadamente por 10 min y se trasvasó a embudo decantación para la separación, dejando formar las fases por unos 5 a 10 min. Se repitió la separación por decantación añadiendo 5 ml de Acetato de etilo a la fase acuosa separada.
3. Se decantó nuevamente la solución orgánica obtenida y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min.
4. Se tomó 10 ml de sobrenadante y concentró en un rota evaporador.
5. Se recuperó con 1 ml de acetonitrilo o de fase móvil para obtención de la muestra.
6. Se filtró con filtros de jeringa PTFE 0,45 μm y se inyectó la muestra en el equipo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el paquete estadístico Real Statistics y el programa de Excel 2013, para graficar la cinética de crecimiento bacteriano y estimar el cálculo del modelo de la cinética bacteriana, los cálculos de la medición del carbono orgánico total (COT) y HPLC. Los datos se sometieron a evaluación estadística para determinación de normalidad mediante el tests de Shapiro- Wilk. Para los datos paramétricos se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, y para los no paramétricos la prueba de Kruskal-Wallis.

6. RESULTADOS

6.1. Objetivo 1. Establecer la capacidad de dos rizobacterias de papa para utilizar tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D como fuente de carbono.

6.1.1. Selección de rizobacterias en medio mínimo de sales con plaguicidas.

Se seleccionaron dos bacterias que demostraron óptimo crecimiento, basado en abundante cantidad de biomasa, más rápido crecimiento y supervivencia en todos los tratamientos. A 300 ppm de los insecticidas se observó el mejor crecimiento en biomasa, mientras a 500 ppm se observó una disminución del crecimiento. Las cepas bacterianas seleccionadas pertenecen a *Raoultella terrigena* C47 y *Enterobacter asburiae* TN152, las cuales también fueron objeto de estudio de la tesis de maestría titulada: “Efecto de moléculas señal tipo N-acil homoserina lactonas (AHLs) de aislamientos provenientes de cultivos de papa en el control de *Tecia solanivora* (Lepidóptera: Gelechiidae)”(46). Las características de crecimiento se encuentran a continuación en las Tablas 10-13.

Tabla 10. Crecimiento de rizobacterias en MSM sólido con Clorpirifos como única fuente de carbono.

Cepas	20ppm	50ppm	100ppm	300ppm	500ppm
2B	+	++	+	+++	+
3 ^a	++	++	+	+++	+
3B	-	+	++	++	++
6 ^a	++	++	+	++	+
1A3	+	++	+	++	-
1C3	++	++	++	+++	-
M3	-	++	+	++	+
M4	++	+++	+	+++	+
TN152	+++	+++	+++	++++	++
C47	+++	++	++	++++	++

Cantidad de biomasa expresada en Cruces (+): negativo: (-), escaso: (+), moderado:(++), abundante: (+++), muy abundante (++++).

Tabla 11. Crecimiento de rizobacterias en MSM sólido con Profenofos: Cipermetrina (5:1) como única fuente de carbono.

Cepas	20ppm	50ppm	100ppm	300ppm	500ppm
2B	++	++	++	+++	+
3 ^a	++	+	+	-	-
3B	++	++	++	++	++
6 ^a	+	++	+	+++	+
1A3	+	++	+	+++	-
1C3	+	++	++	++	++
M3	+	++	++	+++	+
M4	+	+++	+	++	+
TN152	++	+++	+++	++++	+
C47	++	+++	++	+++	+

Cantidad de biomasa expresada en Cruces (+): Crecimiento negativo: (-), escaso: (+), moderado: (++) , abundante: (+++), muy abundante: (++++).

Tabla 12. Crecimiento de rizobacterias en MSM sólido con lambda-cihalotrina, como única fuente de carbono.

Cepas	20ppm	50ppm	100ppm	300ppm	500ppm
2B	++	+	+	++	+
3 ^a	++	+	+	+	+
3B	+++	+	+	++	++
6 ^a	++	+	+	+	++
1A3	++	++	+	+	+
1C3	+	+	++	++	+
M3	++	++	+	+	+
M4	+	+	+	++	++
TN152	+++	+++	++	+	++
C47	+	++	++	+	++

Cantidad de biomasa expresada en Cruces (+): Crecimiento negativo: (-), escaso: (+), moderado (++) , abundante: (+++), muy abundante: (++++).

Tabla 13. Crecimiento de rizobacterias en MSM sólido con 2,4: D, como única fuente de carbono.

Cepas	20ppm	50ppm	100ppm	300ppm	500ppm
2B	++	++	++	+++	-
3 ^a	+	++	+	+++	+
3B	-	+	++	+	+
6 ^a	+++	++	+	++	-
1A3	++	++	++	+++	-
1C3	+	++	+	+++	+
M3	+	+	+	+++	+
M4	+	++	-	+++	++
TN152	+++	+++	++	++	+
C47	++	++	++	+++	+

Cantidad de biomasa expresada en Cruces (+): Crecimiento negativo: (-), escaso: (+), moderado (++) , abundante: (+++), muy abundante: (++++).

6.1.2. Crecimiento de las rizobacterias con plaguicidas en medio líquido.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para la cinética de crecimiento de los aislados de C47 y TN152 en los cuatro plaguicidas luego de 24 horas (Tabla 14). La bacteria C47 presentó una fase de adaptación, con un crecimiento mínimo en clorpirifos, lambda-cihalotrina y 2,4: D durante las 120 primeras horas de exposición (Fig. 1). Luego, inició la fase exponencial de crecimiento constante hasta la hora 144, donde finalizó el monitoreo, sin alcanzar la fase de mantenimiento. Mientras que en profenofos: cipermetrina (5:1) desde la hora 0 a la 72, presentó un rápido crecimiento (fase de aceleración) que se mantuvo con un incremento hasta las 120 horas, a partir de la cual se observó la fase de crecimiento constante (exponencial) hasta las 144 horas. El crecimiento de C47, comparado con el tratamiento control sin insecticida, mostró diferencias significativas en clorpirifos y profenofos: cipermetrina a partir de las 24 h; Lambda-cihalotrina no mostro diferencias significativas solamente en las horas 48 y 72; para 2,4: D no hubo diferencias significativas en las horas 96 y 120 respecto al control sin insecticida, de la hora 0 a la 48 las diferencias significativas que se presentaron, el crecimiento de la cepa con el herbicida tiende a disminuir; pero en la hora 144 en las diferencias significativas ($P= 0,042$), el crecimiento aumenta (Fig. 1).

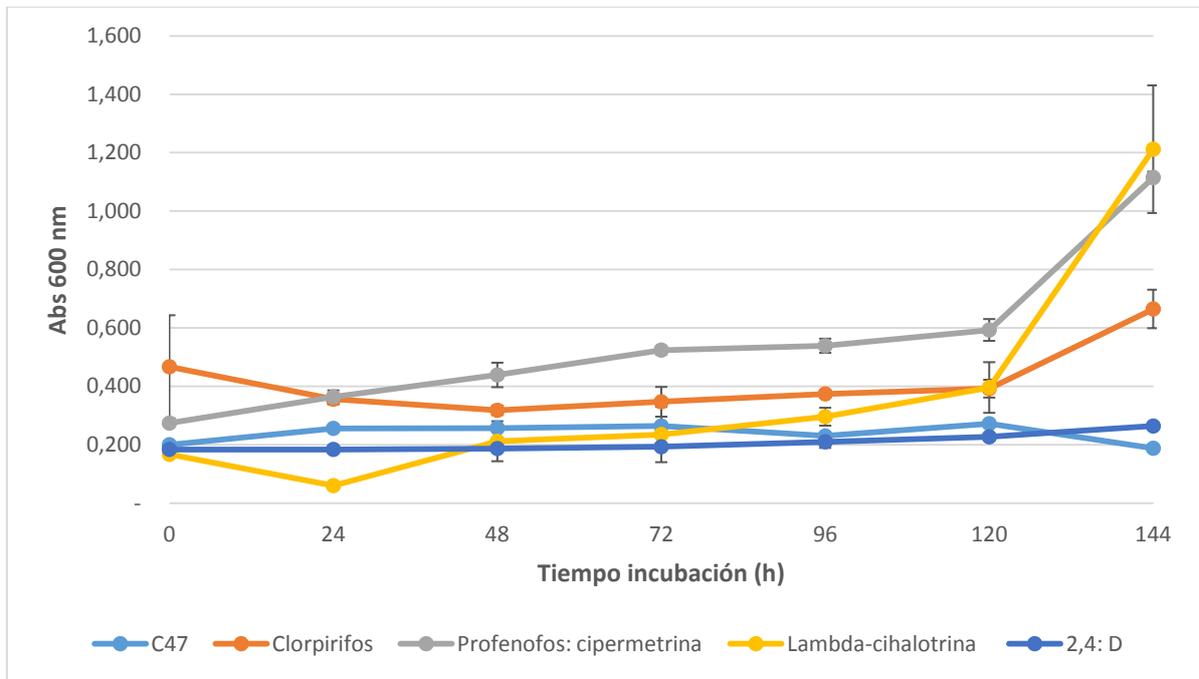


Figura. 1. Cinética de crecimiento de *Raoultella terrigena* C47. El crecimiento se llevó a cabo en medio mínimo de sales suplementado con clorpirifos, profenofos: cipermetrina, lambda-cihalotrina y 2,4: D a 300 ppm como única fuente de carbono. Tiempo de tratamiento: 6 días (144 h). Las líneas de color son el promedio de tres réplicas de cada tratamiento y la desviación corresponde a barras del error estándar.

En cuanto a *Enterobacter asburiae* TN152 presentó un crecimiento mínimo en la fase de adaptación desde la hora 0 a la 48 en clorpirifos, profenofos: cipermetrina (5:1) y lambda-cihalotrina (Fig 2). Posteriormente, se evidenció la fase exponencial de crecimiento constante hasta la hora 72, en donde se mantuvo en fase estacionaria hasta los 96 h. Luego, inició la fase de declinación o de muerte. Para el tratamiento con 2,4: D, la fase de adaptación se observó durante las primeras 24 h, donde inicia la fase de crecimiento mínimo exponencial hasta las 72 h, en la cual se mantiene hasta la hora 96, y finalmente inicia su fase de muerte (Fig. 2). Respecto al crecimiento bacteriano de la cepa *E. asburiae* TN152, en adición a cada compuesto de estudio, comparado con el tratamiento control sin insecticida, clorpirifos mostró diferencias significativas de la hora 48 a 96; en profenofos: cipermetrina hubo diferencias significativas de la hora 24 hasta las 144 h; lambda-cihalotrina presentó diferencias desde la hora 0 hasta las 120 h y 2,4:D tuvo diferencias de la hora 0 a la 144 h, donde el crecimiento de la cepa con el herbicida tiende a disminuir.

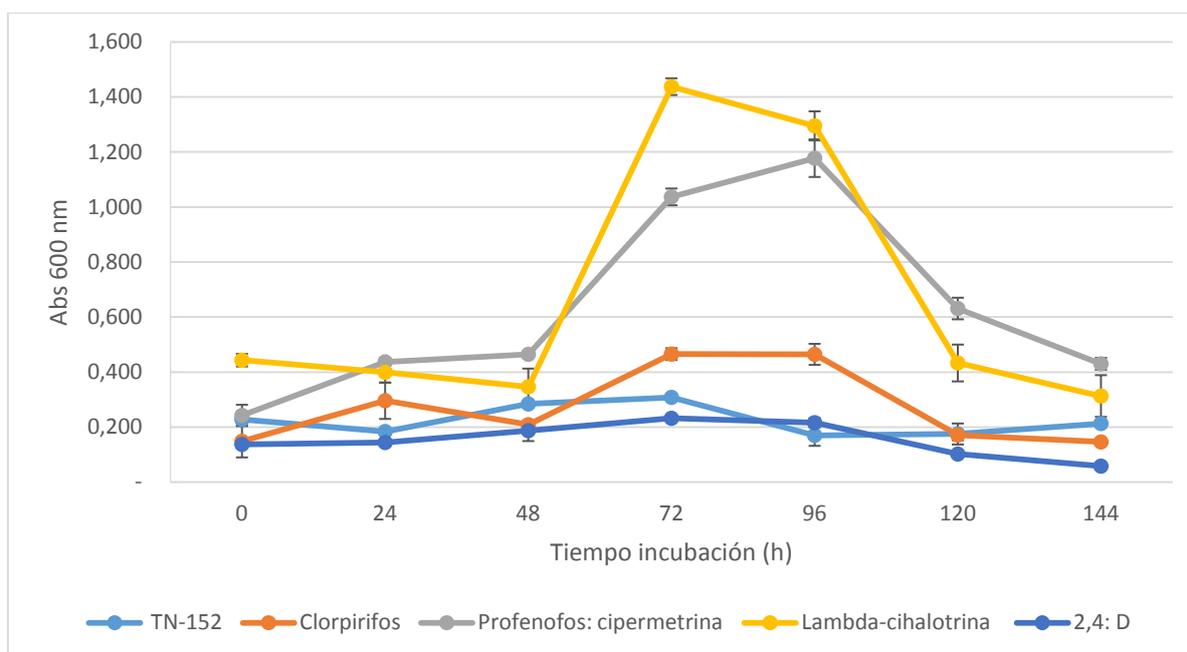


Figura. 2. Cinética de crecimiento de *Enterobacter asburiae* TN152. El crecimiento se llevó a cabo en medio mínimo de sales suplementado con clorpirifos, profenofos: cipermetrina, lambda-cihalotrina y 2,4: D a 300 ppm como única fuente de carbono. Tiempo de tratamiento: 6 días (144 h). Cada curva de color es el promedio de tres réplicas de cada tratamiento y la desviación corresponde a barras del error estándar.

Tabla 14. Estimación del crecimiento bacteriano en UFC de *R. terrigena* y *E. asburiae*

Tiempo (h)	C47 UFC/ml				TN152 UFC/ml			
	Clorpirifos	Profenofos: cipermetrina	Lambda-cihalotrina	2,4: D	Clorpirifos	Profenofos: cipermetrina	Lambda-cihalotrina	2,4: D
0	$2,2 \times 10^9$	$3,9 \times 10^{14}$	$2,2 \times 10^{11}$	$6,8 \times 10^3$	$2,7 \times 10^{12}$	$2,1 \times 10^{13}$	$1,7 \times 10^{15}$	$2,1 \times 10^{12}$
24	$1,1 \times 10^{11}$	$5,4 \times 10^{12}$	$7,3 \times 10^{12}$	$6,8 \times 10^8$	$6,8 \times 10^{13}$	$1,5 \times 10^{15}$	$6,4 \times 10^{14}$	$2,5 \times 10^{12}$
48	$1,1 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^{14}$	$7,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^{13}$	$2,7 \times 10^{15}$	$2,0 \times 10^{14}$	$6,3 \times 10^{12}$
72	$1,5 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^{12}$	$3,6 \times 10^{14}$	$9,6 \times 10^9$	$2,7 \times 10^{15}$	$6,9 \times 10^{20}$	$4,3 \times 10^{24}$	$1,7 \times 10^{13}$
96	$4,0 \times 10^9$	$1,1 \times 10^{13}$	$6,5 \times 10^{15}$	$1,8 \times 10^9$	$2,7 \times 10^{15}$	$1,5 \times 10^{22}$	$1,9 \times 10^{23}$	$1,2 \times 10^{13}$
120	$2,0 \times 10^{11}$	$2,2 \times 10^{13}$	$5,3 \times 10^{16}$	$3,6 \times 10^9$	$4,5 \times 10^{12}$	$1,0 \times 10^{17}$	$1,3 \times 10^{15}$	$9,9 \times 10^{11}$
144	$7,9 \times 10^8$	$8,6 \times 10^{17}$	$3,3 \times 10^{25}$	$1,5 \times 10^{11}$	$2,6 \times 10^{12}$	$1,3 \times 10^{15}$	$9,9 \times 10^{13}$	$3,8 \times 10^{11}$

El crecimiento de C47 y TN152 presentó una constante de velocidad de crecimiento mayor en los tratamientos con TN152+Lambda-cihalotrina, C47+Lambda-cihalotrina, TN152+Profenofos: cipermetrina, TN152 + Clorpirifos con una tasa constante de 0.0593, 0.0466, 0.0335 y 0.0334 respectivamente siguiendo una cinética de primer orden. Los tratamientos con C47+2,4: D y TN152+2,4: D presentaron una constante de velocidad de crecimiento baja con 0,0063 y 0,0090.

En todos los tratamientos se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 1 (Tabla 15).

Tabla 15. Parámetros cinéticos de crecimiento de C47 y TN152 con los cuatro plaguicidas como única fuente de carbono.

Tratamiento medio líquido	Promedio k	R^2
TN152 + Lambda-cihalotrina	0,0593	1
C47 + Lambda-cihalotrina	0,0466	1
TN152 + Profenofos: cipermetrina	0,0335	1
TN152 + Clorpirifos	0,0334	1
C47 + Profenofos: cipermetrina	0,0263	1
C47 + Clorpirifos	0,0220	1
TN152 + 2,4: D	0,0090	1
C47 + 2,4: D	0,0063	1

La ecuación lineal entre \ln de las Abs de cada tratamiento y el tiempo arrojó la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación (R^2).

6.2. Objetivo 2. Identificar mediante herramientas de bioinformática, los mecanismos asociados a la degradación de compuestos xenobióticos de dos rizobacterias aisladas de papa.

La búsqueda de genes y enzimas asociados a la degradación de compuestos xenobióticos en la plataforma PATRIC, reveló que tanto TN- 152 como C47 poseen genes que están asociados a la degradación de xenobióticos, incluyendo la degradación de insecticidas (Tabla 16 y 17).

En el caso de *Enterobacter asburiae* TN- 152, la plataforma PATRIC reporta un total de ocho compuestos que pueden ser degradados por esta bacteria; los compuestos detectados son: hidrocarburos como Naftaleno, antraceno y el bifenilo, insecticidas y herbicidas como Gamma-hexaclorociclohexano y la Atrazina, conservantes y sustancias utilizadas para fabricación de plásticos y combustibles como el 1- y 2-metilnaftaleno, compuestos y sustancias son tóxicos tanto para el medio ambiente como para el ser humano. Cada compuesto está asociado a enzimas, las cuales ayudan en el proceso de degradación.

Tabla 16. Compuestos y enzimas asociados a la degradación de xenobióticos por *Enterobacter asburiae* TN- 152 identificados por PATRIC (Versión 3.6.2*).

COMPUESTO	ENZIMA INVOLUCRADA
1- y 2-metilnaftaleno	2.1.1. Metiltransferasas
Naftaleno y antraceno	1.1.1.1 Alcohol deshidrogenasa
Gamma-hexaclorociclohexano	NADH o NADPH como un donante, e incorporación de un átomo de oxígeno.
Atrazina	3.5.1.5 Ureasa
Benzoato	4.2.1.17 Enoyl-CoA hidratasa 2.3.1.16 Acetil-CoA C-aciltransferasa 2.3.1.174 3-oxoadipil-CoA tiolasa
Bifenilo	4.2.1.17 4-hidroxi-2-oxoalerato aldolasa
1,4-diclorobenceno	3.6.1.7 Acilfosfatasa 1.14.13.82 Monooxigenasa de vainillato
Metabolismo de fármacos	2.4.2.4 Timidina fosforilasa
Metabolismo de xenobióticos por el citocromo P450	3.3.2.9 Epóxido hidrolasa microsomal
Degradación del 2,4-diclorobenzoato	3.1.1. Hidrolasas de éster carboxílico

*Tomado de PATRIC (39)(Versión 3.6.2).

Los compuestos asociados a la degradación de xenobióticos por *Raoultella terrigena* C47 identificados por PATRIC son 14 dentro de los cuales es importante resaltar que algunos compuestos como: El tetracloroetano, estireno, 2,4-Diclorobenzoato, y 1,4- Diclorobenceno están reportados como sustancias de categoría de riesgo alta por su elevada toxicidad para el medio ambiente y el ser humano. Uno de los compuestos asociado a degradación que PATRIC reporta en común para *Raoultella terrigena* y *Enterobacter asburiae* es el benzoato, este conservante es el compuesto que tiene más enzimas asociadas para su degradación. La enzima citocromo P450 fue detectada tanto en C47 como TN152. Está enzima es específica para el metabolismo y degradación de insecticidas como clorpirifos.

Tabla 17. Compuestos y enzimas asociados a la degradación de xenobióticos por *Raoultella terrigena* C47 identificados por PATRIC (Versión 3.6.2). *

COMPUESTO	ENZIMA INVOLUCRADA
Estireno	1.2.1.39 Fenilacetaldehído deshidrogenasa
Tetracloroeteno	Alcohol deshidrogenasa
Bisfenol	1.1.1 Con NAD (+) o NADP (+) como aceptor
1- y 2- Metilnaftaleno	1.13.11.3 Protocatecuato 3,4-dioxigenasa
2,4- Diclorobenzoato	1.13.11.1 Catecol 1,2-dioxigenasa
Metabolismo de fármacos: otras enzimas	2.4.2.8 Hipoxantina fosforibosiltransferasa
	1.1.1.205 IMP deshidrogenasa
	2.4.2.3 Uridina fosforilasa
Benzoato	4.1.3.39 4- hidroxil-2-oxovalerato aldolasa
Caprolactama	3.5.2. En amida cíclica
Atrazina	3.5.1.54 Alofanato hidrolasa
Degradación de benzoato por hidroxilación	3.1.1.24 3- oxoadipato enol-lactonasa
	2.3.1.174 3- oxoadipil-CoA tiolasa
	1.14.12.10 Benzoato 1,2-dioxigenasa
	1.14.13.2 4- Hidroxibenzoato 3-monooxigenasa
	3.1.1.24 3- Oxoadipato enol-lactonasa
	1.14.13.24 3- hidroxibenzoato 6-monooxigenasa
	4.1.1.44 4- Carboxi-muconolactona descarboxilasa
Tetracloroeteno	1.18.6.1 Nitrogenasa
Fluorobenzoato	5.5.1.1 Muconato cicloisomerasa
	1.3.1.25 1,6- dihidroxiciclohexa-2,4-dieno-1-carboxilato deshidrogenasa
Metabolismo de xenobióticos por el citocromo P450	3.3.2.9 Epóxido hidrolasa microsomal
1,4- Diclorobenceno	1.14.13.82 Monooxigenasa de vainillato
	3.6.1.7 Acilfosfatasa
	4.1.1.7 Benzoilformato descarboxilasa
Bifenilo	1.14.12.18 Bifenilo 2,3-dioxigenasa

*Tomado de PATRIC (Versión 3.6.2) (39)

6.3. Objetivo 3. Determinar la degradación de plaguicidas por rizobacterias mediante técnicas analíticas.

6.3.1. Medición de Carbono orgánico total (COT) mediante espectrofotometría de luz visible.

Para la cinética de degradación de los cuatro plaguicidas, se midió la disminución del carbono orgánico total (COT) presente en cada uno de los tratamientos frente al control, para determinar la capacidad de degradación de las bacterias.

Los resultados obtenidos están detallados en la figura 3. El carbono obtenido de los cuatro tratamientos de *R. terrigena* C47, se mantuvo o presentó una ligera disminución respecto al control. Por el contrario, el carbono de los cuatro tratamientos con *E. asburiae* TN152, aumento respecto al control. Se observaron diferencias significativas de ($P= 0,0007$) únicamente en el tratamiento de lambda-cihalotrina entre el control y TN152 debido al aumento del carbono de la cepa. Para los demás tratamientos no se encontró diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

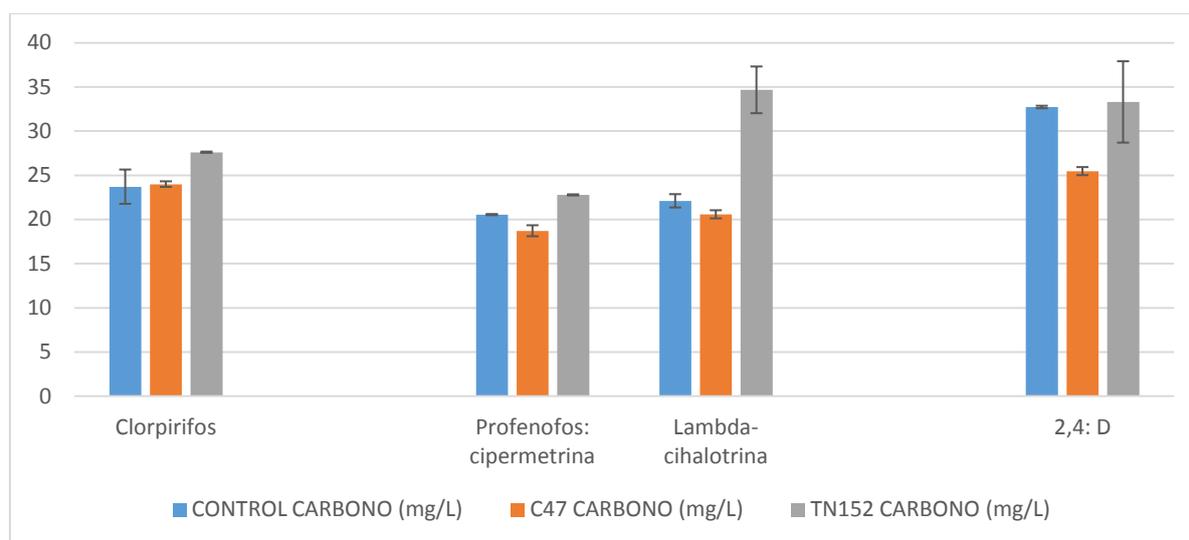


Figura. 3 cinética de degradación evaluada con la medición de Carbono orgánico total (COT), mediante espectrofotometría de luz visible. Solución inicial: control con una concentración de 300 ppm de cada plaguicida en medio mínimo de sales (barras azules); solución final: tratamiento con *Raoultella terrigena* C47 en medio mínimo de sales suplementado con clorpirifos, profenofos: cipermetrina, lambda-cihalotrina y 2,4: D a 300

ppm (barras de color naranja); solución final: *Enterobacter asburiae* TN152 en medio mínimo de sales suplementado con clorpirifos, profenofos: cipermetrina, lambda-cihalotrina y 2,4: D a 300 ppm (barras de color gris). Cada barra de color es el promedio de tres réplicas de cada tratamiento y las barras de error representan la desviación estándar de la media.

6.3.2. Determinación del potencial de degradación clorpirifos por HPLC.

Para evaluar la degradación de clorpirifos se analizó un control (clorpirifos sin bacteria) y el tratamiento con C47 (clorpirifos con C47). No fue posible realizar una curva patrón preliminar de concentración conocida del insecticida, debido a que no se contaba con la solución estándar de clorpirifos. Los controles permitieron evaluar la presencia del insecticida en el medio de cultivo sin ser inoculado y arrojaron un tiempo de retención para clorpirifos de 7.8 minutos (Cromatograma, Figura 4). Las áreas bajo la curva se muestran en la Tabla 18.

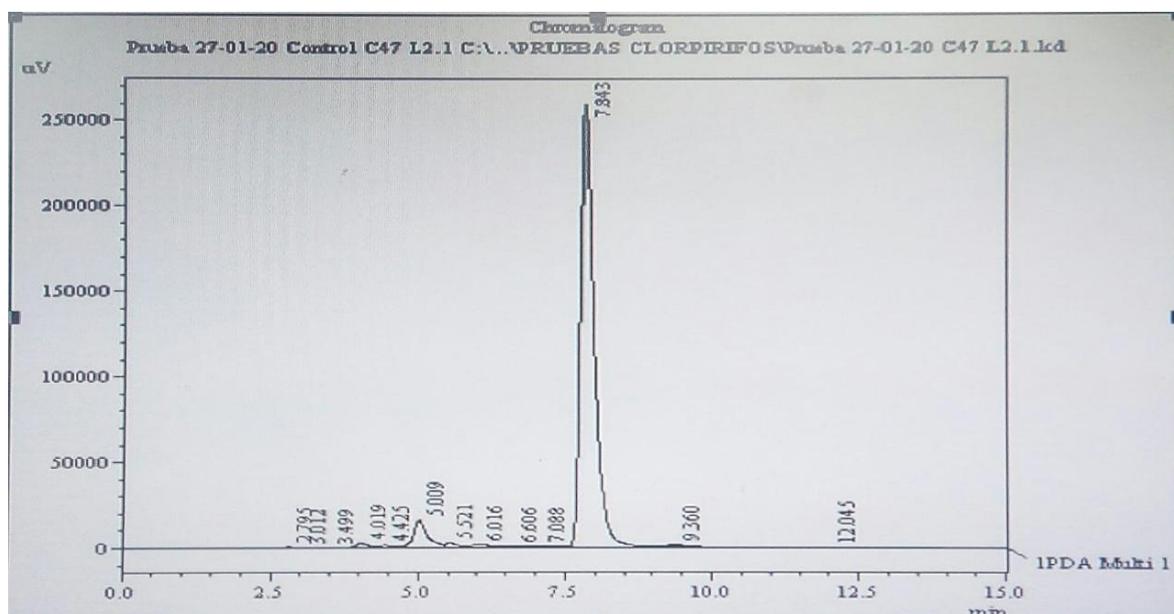


Figura 4. Cromatograma de los controles del tratamiento con clorpirifos.

Tabla 18. Área de los picos obtenidos en cromatograma de HPLC de los controles del tratamiento de clorpirifos.

CONTROL	TRATAMIENTO C47
5.206.383 (93.199)	4.051.567 (8.1399)

Promedio y error estándar.

Se puede observar una disminución significativa entre el control y el tratamiento con C47 del 22%, lo que indica la degradación del clorpirifos por parte de la bacteria.

7. DISCUSIÓN

El presente estudio se diseñó para determinar el potencial de degradación de bacterias aisladas de suelo rizosférico de papa en insecticidas organofosforados como: clorpirifos y profenofos; piretroides: cipermetrina y lambda-cihalotrina; y el herbicida 2,4: D, ampliamente utilizados en el control de plagas de estos cultivos. Se seleccionaron dos rizobacterias que demostraron supervivencia y un óptimo crecimiento en placas de agar de MMS con diferentes concentraciones de los plaguicidas, como única fuente de carbono. La capacidad de crecimiento de los dos aislamientos bacterianos se verificó en medio mínimo líquido que contenía 300 ppm de los plaguicidas individualmente. Este crecimiento se midió a través de densidad óptica, comparado con un blanco, como lo realizado en el estudio de Marín et al (10).

Las bacterias seleccionadas, *R. terrigena* C47 y *E. asburiae* TN152, presentaron un crecimiento exponencial en medio mínimo líquido con los plaguicidas como única fuente de carbono. Similares resultados presento Marín et al (10) con *Bacillus sp* y *Pantoea agglomerans*, bacterias degradadoras del plaguicida organofosforado clorpirifos. El crecimiento exponencial indica que las bacterias tienen la capacidad de adaptarse al medio selectivo y utilizar los insecticidas organofosforados, piretroides y cipermetrinas como fuente de carbono para su desarrollo.

Según Bertrand(47) et al, indican que, al estar en contacto con los plaguicidas en el medio como única fuente de carbono, las cepas pueden movilizar una cantidad de enzimas para poder utilizarlos. Esta degradación puede dar lugar a la biotransformación del compuesto y a su mineralización.

Los tratamientos de *R. terrigena* C47 y *E. asburiae* TN152 en clorpirifos y profenofos: cipermetrina y Lambda-cihalotrina presentaron el mayor crecimiento, con diferencias significativas respecto al control sin insecticida, lo que sugiere que las bacterias tienen la capacidad de usar los plaguicidas como fuente de carbono(9)(48). Los dos aislamientos no mostraron diferencias significativas en el crecimiento con 2,4: D, respecto al control sin insecticida. Esto es probable, porque el herbicida 2,4: D, puede ejercer efectos tóxicos en las células microbianas debido

a interferencia con la síntesis de ADN, ARN y proteínas (49). Aunque también depende de la tolerancia comunitaria inducida por la contaminación (PICT), la cual se basa en que la exposición a largo plazo de una comunidad microbiana a un tóxico determinado que conducirá a una mayor tolerancia a este contaminante (49). Cabe señalar, que en los tratamientos control sin insecticida, la biomasa se mantuvo sin aumento, lo que muestra que los microorganismos sobrevivieron a las condiciones del medio mínimo de sales, pero a la falta de fuente de carbono se mantuvieron en estado de latencia, sin aumentar la población bacteriana, similar a lo mostrado en el trabajo de Jiménez(50).

Por otro lado, Pillon et al(51), señalan que las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* producen exopolisacáridos (EPS). Estos se localizan en las paredes celulares de ciertos microorganismos, incluyendo las bacterias. Su formación está sujeta a cambios extremos en el medio ambiente, como la limitación de nutrientes como N, P, C, entre otros. Teniendo en cuenta que 3 de los 4 plaguicidas en estudio (Clorpirifos, profenofos:cipermetrina, lambda-cihalotrina), no son muy solubles en agua, en este caso en el medio de cultivo usado, puede que no estuvieran totalmente disponibles para su degradación en el momento de ponerlos en contacto con C47 y TN152 y por esto se presentó una fase de retraso en el crecimiento bacteriano(52). Sin embargo, las cepas en estudio por ser enterobacterias, es probable que produjeran EPS, los cuales suelen servir como un tipo de biosurfactante que puede ayudar en la solubilización de organofosforados, volviéndolos disponibles a la degradación y ayudando a disminuir la tensión superficial. Por ello, a los 5 días del ensayo la curva de crecimiento podría comenzar a aumentar(53).

Así mismo, se debe tener en cuenta que los microorganismos crecen de manera directamente proporcional a la concentración del sustrato(54). Sin embargo, a 300 ppm de cada plaguicida se observó una fase de retraso en la curva de crecimiento como lo reportado por Annwar et al(55), quienes evaluaron la degradación de clorpirifos también a 300 ppm hasta 1000 ppm. La explicación de este fenómeno puede deberse a que la acumulación del sustrato disminuye su disponibilidad, y de igual forma las altas concentraciones pueden inhibir la acción enzimática esencial de las rutas metabólicas centrales o los procesos de transporte(56). También se

necesita un mayor número de bacterias para iniciar una degradación rápida de los plaguicidas, según Karpouzias y Walker(57).

Otra probable explicación al menor crecimiento y fase de retraso de C47 y TN152 en presencia de los compuestos organofosforados como clorpirifos y profenofos, puede deberse a que estos compuestos poseen en su molécula un anillo clorado, lo que les confiere recalcitrancia a la degradación. Se ha demostrado que la concentración de piretroides es un factor importante a tener en cuenta en su proceso de degradación, debido a que tiene un efecto importante sobre su tasa de degradación en medios líquidos. Además, la concentración del piretroide puede variar según su tolerancia dado que cuanto mayor es la concentración utilizada, menor es la tasa de degradación con o sin fase de retraso. También se ha reportado que uno de los productos de degradación de los piretroides es el (3-PBA), el cual se acumula en el suelo y tiene efectos antimicrobianos que puede inhibir el crecimiento de las bacterias(58).

El herbicida 2,4: D es un compuesto recalcitrante difícil de degradar. El 2,4-diclorofenol y el 4-clorofenol son unos de sus productos de degradación, cuya acumulación puede inhibir la degradación bacteriana o producir lisis celular. Hay reportes de los efectos tóxicos del herbicida en el crecimiento de bacterias del suelo como *Delftia acidovorans* y *Pseudomonas putida*(59). Se han reportado perturbaciones metabólicas de *Escherichia coli* tratadas con 2,4-D, donde se encontró una superficie celular más rugosa, modificaciones de la fosforilación oxidativa y la biosíntesis de peptidoglicano(60). Parece ser que la forma liposoluble de este compuesto afecta la organización espacial de la membrana celular de las bacterias y deteriora su función como barrera de permeabilidad (61).

Según Kumar et al(62), existe una amplia cantidad de enzimas que usan las bacterias que participan en el proceso de degradación de varios contaminantes, como los plaguicidas. Estas enzimas ayudan en los procesos de biotransformación del compuesto o hasta su mineralización. Las monoxigenasas son una de las familias que están involucradas en la degradación de plaguicidas, mediante procesos metabólicos ayudan a mejorar la reactividad y solubilidad de los compuestos, volviéndolos más disponibles para su transformación. Una de las monoxigenasas implicadas son las monoxigenasas p450, (63)las cuales hacen

parte del sistema microsomal citocromo P450 (CYP). Este sistema está dividido en familias y subfamilias con funciones distintas. Las familias 1, 2 y 3 están encargadas de la degradación de compuestos xenobióticos, y lo hacen por reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis(44).

Uno de los principales mecanismos de degradación de plaguicidas en C47 y TN152 podría ser la presencia de la enzima Citocromo P450. Esta enzima ha sido reportada en la degradación de clorpirifós en *Trichoderma harzianum*, *Pleurotus ostreatus* y *Bacillus*, entre otros. Se han propuesto rutas hipotéticas de la degradación de Clorpirifos donde puede participar esta enzima, como la planteada por Fujioka y Casida(14) y otra planteada por John y Shaik(64) (figura 5) que indican que la enzima citocromo P450 puede estar involucrada en la degradación de este insecticida.

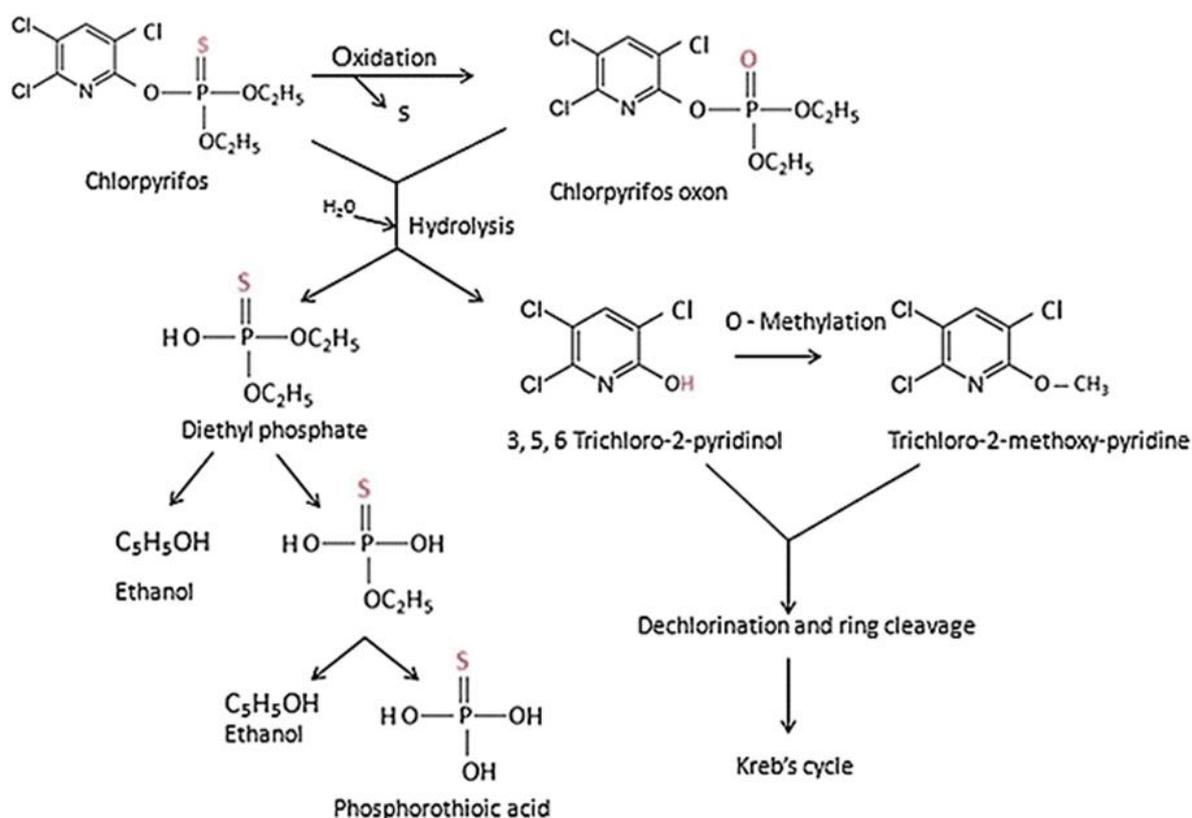


Figura 5. John y Shaik(64). Vía de degradación propuesta para Clorpirifos

Según John y Shaik(64), la biodegradación de plaguicidas comprende 3 fases: En la fase I se da la oxidación, reducción o hidrólisis, la cual conduce a aumentar la solubilidad y la biodisponibilidad del compuesto. Este proceso

puede darse por enzimas oxidativas, incluida el citocromo P450. Luego, en la segunda fase, el plaguicida o los metabolitos se conjugan con el glutatión S-transferasa, que es la enzima principal responsable de la fase II, que cataliza el ataque nucleofílico del átomo de azufre de GSH por el centro electrofílico del sustrato. La última fase implica la transformación de metabolitos de fase II en conjugados secundarios no tóxicos, en donde participan enzimas como las hidrolasas y fosfotriesterasas. Estas enzimas tienen en común que contienen un sitio activo hidrófobo con tres sitios de unión para acomodar los grupos éster sustrato.

Lamentablemente, no se pudo relacionar más enzimas con los plaguicidas estudiados. Sin embargo, la diversidad enzimática detectada sugiere la degradación de diversos xenobióticos de importancia ambiental, como el 1,4-diclorobenceno, líquido usado para fabricar herbicidas, insecticidas, medicamentos y tintes. Esta sustancia al entrar en contacto con el medio ambiente se adhiere al suelo, en el agua no se disuelve de manera óptima, por lo tanto, no se degrada con facilidad. Además, es muy volátil lo que causa contaminación del aire, lo cual puede desencadenar problemas respiratorios en el ser humano(65).

Para detectar la degradación de los plaguicidas, se aplicaron dos metodologías: la medición de Carbono Orgánico Total (COT) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). En la medición del COT, no se observó diferencias significativas en comparación con el tratamiento control, por el contrario, el tratamiento con la cepa *R. terrigenia* C47 el carbono se mantuvo o mostró una ligera disminución; y en cuanto a *E. asburiae* TN152, se observó un aumento en todos los tratamientos respecto al control. Esto es probable, ya que el tiempo de incubación de los tratamientos fue corto y se ha demostrado degradación de estos compuestos en periodos de tiempo hasta de 24 días(66).

Por otro lado, el aumento del carbono pudo deberse a la producción de exopolisacáridos por parte de las bacterias, debido a las condiciones de estrés generadas por los plaguicidas. Tanto *R. terrigena* y *E. asburiae* como todas las bacterias Gram negativas, producen lipopolisacáridos y exopolisacáridos. Se ha reportado que *R. terrigena* produce un exopolisacárido de alta masa molecular,

cuya estructura corresponde a un pentasacárido cargado con una unidad repetitiva de D-galactosa, D-glucosa, D-manosa y D-ácido glucurónico(51). *E. asburie* produce un ramnolípido que está compuesto por un grupo hidrofílico, que consiste en una o dos moléculas de ramnosa, con un enlace glucosídico al grupo hidrofóbico formado por uno o dos ácidos grasos b-hidroxiados(67). Esta clase de exopolisacáridos son obtenidos del sobrenadante de los medios de cultivo, lo que sugiere su presencia en las muestras analizadas por el COT y el alto contenido de carbono dado su composición. Cabe aclarar que los EPS en tiempos más prolongados de tratamiento pueden promover la biodegradación de los contaminantes como se mencionó anteriormente(58).

En la determinación de degradación por HPLC para Clorpirifos con *R. terrigena* C47 indica una degradación del 22% luego de 6 días, que comparado con el estudio de Marín et al(10) es baja, pues ellos también evaluaron la degradación de clorpirifos y encontraron una reducción del 73.50% y 69.67% en un periodo de 96 horas, por parte de *Bacillus sp* y *Pantoea agglomerans*, respectivamente. Por otro lado, en el estudio de Akbar et al(9), la cepa *Pseudomonas mendocina* degradó 60.5% después de 10 días. En el estudio de Jiménez(50), se mostró la degradación de 80.44% del insecticida organofosforado malatión por *Enterobacter amnigenus* en 24 días. Esto sugiere, que la cepa en estudio probablemente requiera mayor tiempo de incubación para poder degradar de manera representativa el insecticida.

También, se debe tener en cuenta que la degradación pudo ser dependiente a la concentración del insecticida, como lo demostrado por Jabeen et al(55) quienes evaluaron la degradación de clorpirifos a 50, 100, 200, 300 y 400 ppm por medio de *Mesorhizobium sp*. Ellos encontraron que, a concentraciones más bajas del insecticida, 50 y 100 ppm, la bacteria logró degradar el contaminante en un 100 y 85% respectivamente, después de tres días. Mientras que a 200, 300 y 400 ppm degradó solo 45, 33 y 15% respectivamente.

Cabe resaltar, que *R. terrigena* ha mostrado su capacidad para otro tipo de compuestos xenobióticos como TNT. Claus et al(68) determinaron la capacidad de esta bacteria para degradar el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) en un 100% a 10 y 100 mg/l. De la literatura revisada, este es el primer trabajo que evidencia la

capacidad degradadora de *R. terrigena* para compuestos de tipo organofosforado. En el estudio de Singh(69) *E. asburiae* fue reportado para la degradación de clorpirifos en suelo australiano, la degradación fue rápida desde la primera aplicación, con un porcentaje de degradación del 50% en menos de 4 días, la mayor parte del pesticida aplicado fue liberado en forma de CO₂.

8. CONCLUSIONES

- *R. terrigena* C47 y *E. asburiae* TN152 tienen la capacidad de asimilar los insecticidas Clorpirifos y Profenofos; piretroides: Cipermetrina y lambda-cihalotrina; y el herbicida 2,4: D como única fuente de carbono.
- Se reportaron genes y enzimas asociados a la degradación de compuestos xenobióticos. *Enterobacter asburiae* TN152 participa en la degradación de ocho compuestos y *R. terrigena* C47 en catorce.
- *R. terrigena* C47 y *E. asburiae* TN152 podrían degradar el insecticida organofosforado como Clorpirifos por la enzima citocromo P450.
- La técnica de HPLC permitió comprobar la disminución de la concentración de Clorpirifos presente en el medio mínimo de sales con *R. terrigena* C47.

9. RECOMENDACIONES

- Es necesario evaluar los compuestos en periodos de tiempo más prolongados para determinar una mayor degradación.
- Estandarizar las técnicas de HPLC para Profenofos: Cipermetrina, lambda cihalotrina y el herbicida 2,4:D, para determinar el nivel de degradación de estos compuestos.
- Realizar la curva de calibración con una solución estándar de los insecticidas para determinar la concentración del plaguicida.
- Determinar el porcentaje de degradación en suelo.
- Evaluar la capacidad de degradación de las bacterias en consorcios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sanchez M. Los plaguicidas. adsorción y evolución en el suelo. 1984.
2. Ramírez J, Lacasaña M. Plaguicidas: Clasificación, Uso, Toxicología Y Medición De La Exposición. Arch Prev Riesgos Labor. 2001;4(2):67–75.
3. Silva C. Conferencias del curso de la papa. Ministerio de agricultura instituto colombiano agropecuario ICA regional. 1975.
4. FAO, MinAgricultura. Uso del modelo aqua crop para estima rendimientos para el cultivo de papa en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. 2013;
5. Santos L. Biorremediación de suelos. In: Capítulo 3. 2019. p. 103–37.
6. Singh BK, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. FEMS Microbiology Reviews. 2006;30(3):428–71.
7. Castellanos J. Aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras de carbofuran presentes an suelos cultivados con papa (*Solanum tuberosum*) del municipio de silos Nortá de santender. 2008;
8. Perez M. Evaluación de la capacidad degradadora y acción de biorremediación de bacterias presentes en suelos con residuos de pesticidas de la florícola pencaflor. 2014.
9. Akbar S, Sultan S, Kertesz M. Bacterial community analysis in chlorpyrifos enrichment cultures via DGGE and use of bacterial consortium for CP biodegradation. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2014;30(10):2755–66.
10. Marín L. LF, Jaramillo Colorado BE. Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina. 2015;42(2):179–85.
11. Jaramillo B, Bermudez A, Tirado I. Organophosphorus pesticides degrading bacteria present in contaminated soils. Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias. 2016;25(3):13–22.
12. Javanthi A, Sivagnanam S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol using a novel bacterium *Ochrobactrum* sp.

- JAS2: A proposal of its metabolic pathway. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2016;126:13–21.
13. Maldonado L. Evaluación de la biodegradación de un insecticida organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa mediante *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*. [Internet]. 2017. Available from: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
 14. Fujioka K, Casida JE. Glutathione S-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields S-phospho-, S-aryl-, and S-alkylglutathione derivatives. *Chemical Research in Toxicology*. 2007;20(8):1211–7.
 15. Almonacid K. Bioacumulación, degradación y efectos ecotoxicológicos de clorpirifos en la planta acuática nativa: *Lemna valdiviana* Phil. *Journal of Banking and Finance*. 5(1):643–54.
 16. Pumisacho M, Sherwood S. El cultivo de la papa en Ecuador. 2002.
 17. Osorio P, Espitia E, Luque E. Reconocimiento de enemigos naturales de *Tecia solanivora* (Lepidoptera:Gelechiidae) en localidades productoras de papa en Colombia. 2001;
 18. Colprensa. Ministerio de Agricultura busca incentivar el consumo de papa en Colombia. 2019.
 19. (DANE). Boletín mensual: Insumos y factores asociados a la producción :El cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) y un estudio de caso de los costos de producción de papa Pastusa Suprema. 2017;1–98. Available from: www.radionacional.co
 20. Alarcón J, Arevalo E, Díaz A, Alberto A, Galindo J. Manejo Integrado de plagas enfermedades en el cultivo del caucho. 2012;75. Available from: <http://www.ica.gov.co/getattachment/47f3dbff-348d-4f63-968b-4cd196db8e4f/-nbs;Manejo-integrado-de-plagas-y-enfermedades-en.aspx>
 21. FAO. Eliminación de Grandes Cantidades de Plaguicidas en Desuso en los Países en Desarrollo. 1996. p. 1–8.
 22. INECC. Características físico-químicas de los plaguicidas y su transporte en el ambiente. 2014. p. 1–12.
 23. Briceño K. Difusión Simple [Internet]. 2014. Available from: <https://www.lifeder.com/difusion-simple/>

24. Boletinagrario. Lixiviación [Internet]. 2018. Available from: <https://boletinagrario.com/ap-6,lixiviacion,565.html>
25. (WHO) World Health Organization. The who recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. 2009;
26. Farmagro. FICHA TECNICA SELECRON 500 EC.
27. MinAmbiente. Resolución (150). 2008.
28. Watts M. Conceptos Generales. Medioambiente. Diagnóstico Ambiental. Una aproximación desde la Química. 2009;167–201.
29. Watts M. Clorpirifos: Un posible COP a nivel global. 2012;1–46.
30. Agrosiences. Lorsban Adanced (Clorpirifos etil). 2014.
31. Terralia. LAMBDA CIHALOTRIN. 2017.
32. International Labour Organization (ILO). LAMBDA-CIHALOTRINA. 1997.
33. INECC. Lamda cyalotrina. 2017.
34. Science W. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético. 2001.
35. González J. Manual Tecnico - Muestreo para el Control de la Calidad de Plaguicidas Agrícolas [Internet]. 2003. Available from: http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/prodali m/prodveg/bpa/normtec/varios/42.pdf
36. Martínez L, Peniche R, Iturriaga M, Medrano S, Pacheco J. Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2013;36(1):63–9.
37. Valle M, Niurka A, Hernández A, Heydrich M. Perspectivas del Empleo de Rizobacterias Como Agentes de Control Biológico en Cultivos de Importancia Económica. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2006;24:42–9.
38. Casal V. Biorremediación: Biodisponibilidad de xenobióticos en suelos. Papel de la quimiotaxis bacteriana. 2003; Available from: <http://digital.csic.es/handle/10261/66266>
39. Snyder E, Kampanya N, Lu J, Nordberg E, Karur H, Shukla M, et al. PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center. *Nucleic Acids Research*. 2007;35:401–6.
40. Boyacá V. Genómica de rizobacterias entomopatógenas de *Tecia solanivora* Genómica de rizobacterias entomopatógenas de *Tecia solanivora* (Lepidóptera : Gelechiidae). 2019.
41. Wang B, Guo P, Hang B, Li L, He J, Li S. Cloning of a novel pyrethroid-

- hydrolyzing carboxylesterase gene from *Sphingobium* sp. strain JZ-1 and characterization of the gene product. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(17).
42. Zhai Y, Li K, Song J, Shi Y, Yan Y. Molecular cloning, purification and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *Ochrobactrum anthropi* YZ-1. *Journal of Hazardous Materials* [Internet]. 2012;221–222:206–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.031>
 43. Goda S, Elsayed I, Khodair T, El-Sayed W, Mohamed M. Screening for and isolation and identification of malathion-degrading bacteria: Cloning and sequencing a gene that potentially encodes the malathion-degrading enzyme, carboxylestrase in soil bacteria. *Biodegradation*. 2010;21(6):903–13.
 44. Santoyo J, Montesinos A, Barbosa R, Garcia S, Rodriguez D, Ramos T, et al. El Citocromo P-450. *Rev Hosp Jua Mex*. 2014;81(4):250–6.
 45. Kambiranda D, Asraful-Islam S, Cho K, Math R, Lee YH, Kim H, et al. Expression of esterase gene in yeast for organophosphates biodegradation. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [Internet]. 2009;94(1):15–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.02.006>
 46. Pantoja L. Efecto de moléculas señal tipo N-acil homoserina lactonas (AHLs) de aislamientos provenientes de cultivos de papa en el control de *Tecia solanivora* (Lepidóptera : Gelechiidae) homoserina lactonas (AHLs) de aislamientos Gelechiidae). 2018.
 47. Bertrand J, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P, Sime-Ngando T. *Applied Microbial Ecology and Bioremediation. Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. 2015. 1–883 p.
 48. Yang L, Zhao Y, Zhang B, Yang C, Zhang X. Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2- pyridinol degrading bacterium. *FEMS Microbiology Letters*. 2005;251(1):67–73.
 49. Zabaloy M, Garland J, Gomez M. Assessment of the impact of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on indigenous herbicide-degrading bacteria and microbial community function in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*. 2010;46(2):240–6.
 50. Jimenez A. Degradación de los plaguicidas endosulfán y malatión por cepas bacterianas aisladas de suelo agrícola. 2014.

51. Pillon M, Pau C, Lequart V, Pilard S, Courtois B, Courtois J, et al. Structural investigation of an exopolysaccharide substituted with a lactyl ether group produced by *Raoultella terrigena* Ez-555-6 isolated in the Chernobyl exclusion zone. *Carbohydrate Research* [Internet]. 2010;345(9):1163–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2010.03.015>
52. Cedron M, Lecaros M. Aislamiento y evaluación de microorganismos nativos como biorremediadores de suelos contaminados con chlorpirifos en la universidad nacional agraria la molina. 2017.
53. Wilches A. Caracterización preliminar de enzimas relacionadas con la síntesis de exopolisacáridos producidos por *Raoultella terrigena* y *Pseudomonas fluorescens*. *Rev Acad Colomb Cienc*. 2004;28(109):577–83.
54. Brock T. *Biología de los Microorganismos*. 1970.
55. Jabeen H, Iqbal S, Anwar S. Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by a novel rhizobial strain *Mesorhizobium* sp. HN3. *Water and Environment Journal*. 2015;29(1):151–60.
56. Mendez E. Efecto de las concentraciones del insecticida clorpirifos como fuente de carbono sobre el crecimiento de *Trichoderma viride* . 2015.
57. Karpouzas D, Walker A. Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* strains epl and II to degrade the organophosphate ethoprophos. *Journal of Applied Microbiology*. 2000;89(1):40–8.
58. Cycon M, Piotrowska Z. Pyrethroid-degrading microorganisms and their potential for the bioremediation of contaminated soils: A review. *Frontiers in Microbiology*. 2016;1–26.
59. Piotrowska A, Syguda A, Chrzanowski Ł, Heipieper HJ. Toxicity of synthetic herbicides containing 2,4-D and MCPA moieties towards *Pseudomonas putida* mt-2 and its response at the level of membrane fatty acid composition. *Chemosphere*. 2016;144:107–12.
60. Bhat S, Booth S, Vantomme E, Afroj S, Yost C, Dahms T. Oxidative stress and metabolic perturbations in *Escherichia coli* exposed to sublethal levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Chemosphere*. 2015;135:453–61.
61. Viegas C, Cabral M, Teixeira M, Neumann G, Heipieper H, Sá-Correia I. Yeast adaptation to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid involves increased membrane fatty acid saturation degree and decreased OLE1 transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;330:271–8.

62. Dubey K, Kumar P, Singh P, Shukla P. Exploring Prospects of Monooxygenase-Based Biocatalysts in Xenobiotics [Internet]. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Elsevier Inc.; 2014. 580–616 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00026-1>
63. Sharma B, Dangi AK, Shukla P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *Journal of Environmental Management* [Internet]. 2018;210:10–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.075>
64. John E, Shaik J. Chlorpyrifos: pollution and remediation. *Environmental Chemistry Letters*. 2015;13(3):269–91.
65. Toxfaqs. Diclorobencenos. 2006.
66. Acuña A, Pucci G, Morales M, Pucci O. Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. Vol. 30, *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2012. p. 29–36.
67. Drakontis C, Amin S. Biosurfactants: Formulations, Properties, and Applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [Internet]. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.013>
68. Claus H, Bausinger T, Lehmler I, Perret N, Fels G, Dehner U, et al. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Raoultella terrigena*. *Biodegradation*. 2007;18(1):27–35.
69. Singh B, Walker A, Morgan J, Wright D. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(8):4855–63.
70. Agrosiences. Lorsban Advanced (Clorpirifos etil). 2014; Available from: [https://www.dowagro.com/content/dam/hdas/dowagro_mexico/pdfs/FT_INS_MEX_LORSBAN_ADVANCED \(1\).pdf](https://www.dowagro.com/content/dam/hdas/dowagro_mexico/pdfs/FT_INS_MEX_LORSBAN_ADVANCED (1).pdf)

ANEXOS

Anexo 1. Reactivación y conservación de bacterias aisladas de muestras de suelo de papa.

Principio del método

El principal objetivo de la preservación y el almacenamiento de microorganismos es mantener la viabilidad, con las características típicas morfológicas, fisiológicas, y genéticas, para una futura reactivación del microorganismo conservado. Esto se convierte de gran importancia para establecer pruebas específicas, donde se necesita una cepa control, la cual pueda ser reactivada fácilmente y utilizada para llevar a cabo experimentos específicos, además se debe garantizar que estas cepas conserven sus características típicas.

Existen diferentes métodos de conservación, uno de los más usados es la criopreservación, en la cual se fundamenta en la conservación de los microorganismos a temperaturas inferiores a 0 °C actuando como paralizador del metabolismo celular.

Para que el microorganismo sobreviva a estas temperaturas debe tener un crioprotector, esta sustancia actúa protegiendo del daño a la célula en el momento de la criopreservación.

Glicerol: Es un criopreservante de bajo peso molecular, su acción crioprotectora se justifica en la capacidad de prevenir la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, por lo que modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolípidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua.

Materiales y equipos

Materiales

- Fiola
- Cajas de petri
- Agar nutritivo o agar LB
- Caldo nutritivo
- Tubos eppendorf estériles
- Glicerol
- Micropipetas
- Puntas nuevas y estériles
- Vinipel
- Gradilla para eppendorf

Equipos

- Incubadora
- Shaker
- Cabina de flujo laminar

Fase experimental

Reactivación de las cepas:

- **Preparación del Agar nutritivo:** Medio con 3.0 g de extracto de carne + 5.0 g gelatina de digestión pancreática + 15.0 g de agar agar, para 1 L.
- **Preparación del Agar LB:** Medio con 0.1 g de peptona + 0.5 g de NaCl + 0.5 g de extracto de levadura + 1.5 g agar-agar para 100 mL del medio.
- **Siembra en Agar Nutritivo y/o LB:** Se sirve el medio en cajas de petri de 100 x 15 mL, se siembra cada cepa por separado y se debe incubar a 30°C por 24 horas.

Conservación de las cepas:

1. Preparación del caldo nutritivo, agar nutritivo o agar king B y glicerol.
2. Tomar 20µl del tubo con la cepa y sembrar por agotamiento en agar nutritivo o king B (Dependiendo de la cepa).

3. Envolver las cajas en papel vinipel y poner a incubar durante 24 h a 30 °C en la incubadora.
4. Luego de las 24h, tomar la biomasa pura del agar y repicarla en el tubo eppendorf con 200µl de caldo nutritivo y 200µl de glicerol al 50%.
5. Terminado el proceso, llevar los tubos a -20°C y -70°C

NOTA: Repetir el procedimiento con cada una de las cepas a conservar.

Referencias

1. Lesmes Hernández A, Barragán Cárdenas D. Comparacion de dos metodos de conservacion, liofilizacion y microsecado sobre tres especies bacterianas”: eleccion del mejor metodo [internet]. Universidad javeriana. 2009 [cited 22 august 2019]. available from: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8468/tesis432.pdf?sequence=1&isallowed=y>

Anexo 2. Elaboración stock de muestras de insecticidas

Describir el procedimiento para la preparación de los stocks individuales de las muestras de los plaguicidas.

Materiales y equipos

Materiales

- Fcos. Ambar de 30 y 200 mL estériles
- Balón aforado estéril de 25 y 100 mL estériles
- Probeta de vidrio estéril

Reactivos

- Metanol
- Plaguicidas*
- Agua destilada estéril

* Plaguicidas a usar:

PLAGUICIDA	COMPUESTO ACTIVO
Fulminator	Profenofos: Cipermetrina (5:1)
Lorsban	Clorpirifos
Karate	Lambda-Cihalotrina
Invensamina (herbicida)	2,4-D: Ácido Diclorofenoxiacético

Fase experimental

1. Preparación de soluciones en metanol al 10% de cada uno de los plaguicidas a una concentración de 3000 ppm en 100 mL.

2. Tomar una alícuota de 5 mL de cada solución preparada, aforar a 50 mL con el medio.

Esto tiene como finalidad obtener una concentración final de metanol a 1% y de cada uno de los compuestos activos de los pesticidas así:

- 300 ppm de Clorpirifos, Lambda-Cihalotrina y Profenofos.
- 60 ppm de Cipermetrina.

Ejemplo:

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$V1 * 480000 \text{ ppm} = 100 \text{ ml} * 3000\text{ppm}$$
$$=0.025 \text{ ml de Clorpirifos}$$

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$V1 * 300 \text{ ppm} = 50 \text{ ml de medio} * 3000\text{ppm}$$
$$=5 \text{ ml de sln madre}$$

ANEXO 3. Determinación de UFC/mL de los formulados

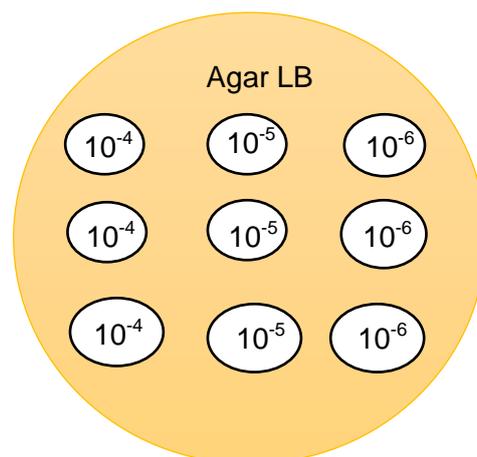
Determinar cuántas unidades formadoras de colonia es un inóculo de 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 abs.

Materiales

- Agua destilada estéril
- Balanza
- Tubos falcón
- Agar LB
- Eppendorf
- Puntas azules y amarillas
- Micropipetas
- Cajas de Petri

Procedimiento

1. A partir de un cultivo de las bacterias de 24 horas en agar LB se toma una colonia aislada y se suspende en 5 ml de caldo LB en un falcón de 15 ml. Se deja incubar por 24 horas a 30°C y 200 rpm.
2. Después del periodo de incubación, centrifugar los tubos falcón durante 10 minutos a 3000 rpm, se descarta el sobrenadante y el pellet se suspende en agua destilada estéril.
3. Se ajusta el inóculo bacteriano a 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 abs de todas las bacterias en una longitud de onda de 600 nm, (solución inicial).
4. La viabilidad se determina mediante series de diluciones en agua destilada estéril por el método de la gota
5. Tomar 100 μL y hacer diluciones en serie en tubos eppendorf con 900 μL de agua destilada hasta 10^{-10} de cada tubo falcón con la dilución del formulado.
6. Sembrar tres veces las diluciones 10^{-2} hasta 10^{-10} de cada dilución 20 μL en agar LB, con 3 diluciones por caja. Por ejemplo:

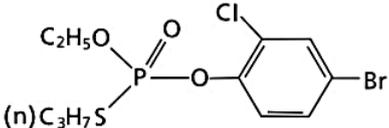


7. Incubar a 30°C durante 24 horas, finalmente se determina las Unidades formadoras de Colonia (UFC). Las lecturas se realizan cada 15 días, 30 días, 60 días, 90 días y 180 días.

Nota: Si en la dilución 10^{-6} las UFC son incontables, se debe hacer dilución a partir de esta, hasta 10^{-9} y sembrar nuevamente las diluciones 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} por duplicado.

ANEXO 4. Fichas técnicas plaguicidas en estudio.

A)

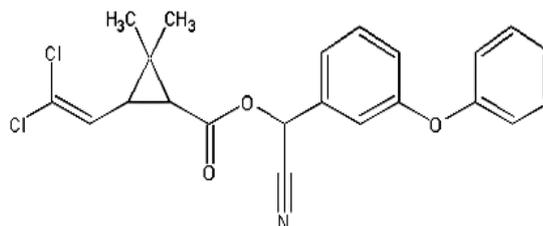
FICHA TECNICA PROFENOFOS	
Características generales	
Nombre común:	Profenofos
Grupo químico:	Organofosfato
Nombre químico (IUPAC):	O-4-bromo-2-clorofenil-O-etil-S-propil fosforotioato
Categoría toxicológica	IB - altamente peligroso
Fórmula empírica:	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$
Fórmula estructural:	
Masa molecular (g mol-1):	373.63

Tomado de: (26)

B)

FICHA TECNICA CIPERMETRINA	
Características generales	
Nombre común:	Cipermetrina
Grupo químico:	Piretroides sintéticos
Nombre químico (IUPAC):	(RS) - α -ciano-3-fenoxibencilo (1RS) -cis-trans-3- (2,2-diclorovinil) -2-2-dimetilciclopropanocarboxilato
Categoría toxicológica	IB - altamente peligroso
Fórmula empírica:	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$

Fórmula estructural:



Masa molecular (g mol⁻¹):

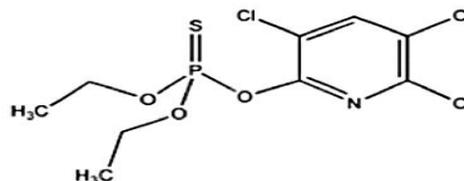
Tomado de: (28)

C)

FICHA TECNICA CLORPIRIFOS

Características generales

Nombre común:	Clorpirifos
Grupo químico:	Organofosforado
Nombre químico (IUPAC):	Clorpirifos O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotioato
Categoría toxicológica	II - Moderadamente peligroso
Fórmula empírica:	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Fórmula estructural:	



Masa molecular (g mol⁻¹):

350,58

Tomado de: (70)

D)

FICHA TECNICA LAMBDA CIHALOTRIN

Características generales

Nombre común:	Lambda cihalotrin
Grupo químico:	Piretroide sintético
Nombre químico (IUPAC):	Lambda cihalotrin 3-(2-cloro-3,3,3-trifluoro-1-propenil)-2,2-dimetil-ciano(3-fenoxifenil)metil

Categoría toxicológica

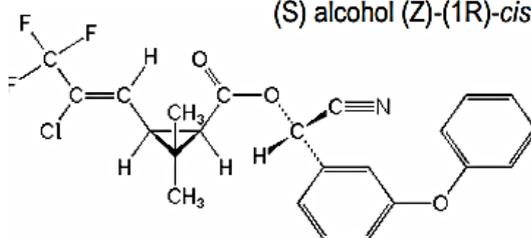
Fórmula empírica:

Fórmula estructural:

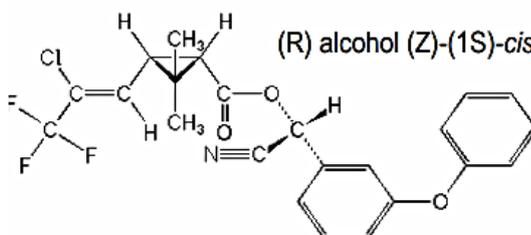
ciclopropanecarboxilato
II - Moderadamente peligroso

$\text{CH}_{19}\text{ClF}_3\text{NO}_3$

(S) alcohol (Z)-(1R)-*cis*-ácido



(R) alcohol (Z)-(1S)-*cis*-ácido



Masa molecular (g mol-1):

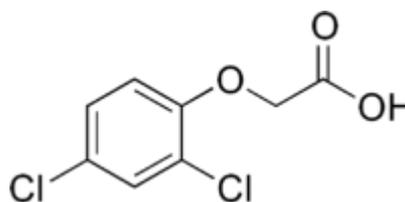
Tomado de:(31)

E)

FICHA TECNICA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Características generales

Nombre común:	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Grupo químico:	auxin sintético
Nombre químico (IUPAC):	2, 4- D: Ácido Diclorofenoxiacético
Categoría toxicológica	II - Moderadamente peligroso
Fórmula empírica:	$\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3$
Fórmula estructural:	



Masa molecular (g mol-1):

Tomado de: (34)

