



**UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

**CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE UN ORGANISMO
PRODUCTOR DE ENZIMA METIL PARATIÓN
HIDROLASA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

PRESENTA:

ADRIANA MORALES ORTEGA

HERMOSILLO, SONORA

OCTUBRE 2008

UNIVERSIDAD DE SONORA

APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

Adriana Morales Ortega

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

23/09/08

Fecha



M.C. Jesús Haydée Yeomans Reina

Presidente

23/09/08

Fecha

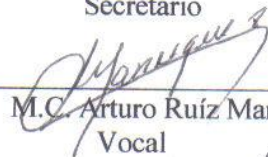


M.C. Esther Carrillo Pérez

Secretario

23/09/08

Fecha

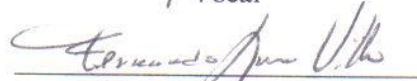


M.C. Arturo Ruíz Manríquez

Vocal

23/09/08

Fecha



Dr. Ferrnando Lares Villa

Sinodal Externo

UNIVERSIDAD DE SONORA
AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO

Septiembre 24, de 2008.

Por la presente se hace constar que la estudiante **ADRIANA MORALES ORTEGA**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de Grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.



DR. VICTOR MANUEL SANCHEZ CORRALES
COORDINADOR
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

RESUMEN

Los plaguicidas han jugado un papel relevante en la agricultura por su uso para el control de plagas, sin embargo, la aplicación intensiva e inadecuada de ellos ha venido impactando el medio ambiente poniendo en riesgo la salud humana y la estabilidad de otras especies. La alta productividad agrícola del estado de Sonora lo ha llevado a la aplicación masiva de plaguicidas, principalmente organofosforados como el metil paratión (mPAR), el cual tiene un grado elevado de toxicidad. Como una forma de contribuir a la solución de este problema, en este trabajo se evaluó el proceso de biodegradación de mPAR a través de estudios específicos de la cinética de crecimiento de una bacteria aislada a partir de un cultivo mixto con capacidad para utilizar mPAR como fuente de carbono. Se estudió la cinética de producción de la enzima metil paratión hidrolasa, así como el efecto de la temperatura y los cationes Cu^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} . El organismo se cultivo intermitentemente en MSM con mPAR así como en caldo nutritivo a 30°C y 35°C y 150 rpm. Se determinó el crecimiento midiendo la $A_{600\text{ nm}}$ y se cuantificó la actividad enzimática del extracto intracelular. El organismo creciendo en caldo nutritivo tuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.048 h^{-1} con un tiempo de doblado de 14.4 horas y de 0.019 h^{-1} con un tiempo de doblado de 36 horas, cuando se cultivó en MSM con mPAR. Un aumento de la temperatura de 30°C a 35°C cuando creció en caldo nutritivo incrementó la velocidad específica de crecimiento así como la actividad de la enzima, aunque la estabilidad de ésta se vio afectada. La presencia de cationes tuvo un efecto inhibitorio tanto en el crecimiento como en la actividad de la enzima.

ABSTRACT

Pesticides have played an important role in agriculture for their use on the control of plagues; nevertheless, the intensive and inadequate application of them has come impacting the environment putting in risk the human health and the stability of other species. The high agricultural productivity at state of Sonora has taken it to the massive application of pesticides, mainly organophosphates as methyl parathion (mPAR), which has an elevated degree of toxicity. In this work, was evaluated the process of biodegradation of mPAR through specific studies of the growth kinetic of a bacterial isolated from a mixed culture with capacity to use mPAR as a carbon source. The production kinetic of the methyl parathion hydrolase was studied, as well as the temperature effect and the Cu^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} cations. The organism was cultivated intermittently in MSM with mPAR as well as in nutrient broth at 30°C to 35°C and 150 rpm. The growth was determined measuring $A_{600\text{ nm}}$ and the enzymatic activity of the intracellular extract was quantified. The organism growing in nutrient broth had a specific growth rate of 0.048 hr^{-1} with a doubling time of 14.4 hours and 0.019 hr^{-1} with a doubling time of 36 hours, when it was cultivated in MSM with mPAR. An increase of the temperature from 30°C to 35°C when it grew in nutrient broth, increased the specific growth rate as well as the activity of the enzyme, although the stability of this one was affected. The cation presence had an inhibiting effect with both the bacterial growth and the activity of the enzyme.

A mis padres, mis hermanos y mis abuelos.

Por su apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xi
NOMENCLATURA	xii
AGRADECIMIENTOS	xiv
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos	2
1.2.1 General	2
1.2.2 Específicos	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	4
2.1 Problemática de la contaminación ambiental	4
2.1.1 Tipos de contaminantes	4
2.1.2 Formas de contaminación	5
2.2 Contaminación con plaguicidas	6
2.3 Plaguicidas organofosforados	7
2.3.1 Metil paratión	8
2.3.1.1 Características fisicoquímicas	9
2.3.1.2 Toxicidad	11
2.4 Contaminación regional de organofosforados (OP)	11
2.5 Alternativas de descontaminación	12
2.5.1 Métodos fisicoquímicos	13
2.5.2 Biodegradación de compuestos xenobióticos	14
2.6 Organismos biodegradadores de OP	17
2.6.1 Organismos nativos	20
2.6.2 Organismos genéticamente diseñados	22

	Página
2.7 Enzimas degradadoras de organofosforados	22
2.7.1 Mecanismo de reacción de paratión hidrolasa	24
2.8 Bases teóricas	24
2.8.1 Microorganismos	24
2.8.2 Cinética de crecimiento microbiano	27
2.8.3 Velocidad de crecimiento	29
2.8.4 Rendimiento	30
2.9 Determinación de crecimiento	31
2.9.1 Determinación de peso seco	33
2.9.2 Método turbidimétrico	33
2.10 Determinación de actividad enzimática	34
3. METODOLOGÍA	39
3.1 Descripción general del trabajo	39
3.2 Materiales	39
3.2.1 Reactivos	39
3.2.2 Microorganismo	41
3.2.3 Selección de cepas	41
3.2.4 Medios de cultivo	41
3.3 Propagación	42
3.3.1 Preparación del inóculo	42
3.4 Determinación del crecimiento	42
3.5 Rompimiento del paquete celular	42
3.6 Clarificación del extracto intracelular	43
3.7 Determinación de actividad enzimática	43
3.8 Determinación de proteína	45
3.9 Determinación de peso seco	45
3.10 Cinética de crecimiento	46
3.10.1 Muestreo	46

	Página
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1 Selección y propagación de cepas productoras	48
4.2 Rompimiento celular	48
4.3 Cinética de crecimiento	51
4.4 Efecto de la temperatura	61
4.5 Efecto de los cationes sobre el crecimiento y producción de la Enzima	63
4.5.1 Efecto del ión Cu^{2+}	63
4.5.2 Efecto del ión Zn^{2+}	65
4.5.3 Efecto del ión Co^{2+}	65
4.6 Rendimiento del cultivo	68
5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
5.1 Conclusiones	70
5.2 Recomendaciones	71
BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXOS	79
A. Determinación de Proteína por el Método de Bradford	80
B. Determinación de Actividad Enzimática	82

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ruta de degradación de paratión por un cultivo mixto bacteriano	18
2	Ruta de degradación de metil paratión por la cepa bacteriana <i>Pseudomonas</i> sp. A3	19
3	Mecanismo de degradación de paroxón por fosfortriesterasa de <i>P. diminuta</i>	25
4	Curva de crecimiento bacteriano	28
5	Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten	37
6	Diagrama de flujo de la descripción general del trabajo	40
7	Sistema de rompimiento celular	44
8	Crecimiento de la cepa seleccionada en metil paratión	49
9	Curva estándar de PNF	50
10	Correlación de absorbancia vs. peso seco de células	54
11	Cinética de crecimiento y actividad enzimática de mPAR hidrolasa en caldo nutritivo a 30° C	55
12	Cinética de crecimiento y actividad de mPAR hidrolasa en medio de sales minerales con 200 ppm de mPAR	56
13	Regresión lineal de la fase log de la curva de crecimiento en caldo nutritivo	57
14	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y actividad de mPAR hidrolasa	62
15	Cinética de crecimiento y producción de enzima mPAR hidrolasa en presencia de Cu^{2+}	64
16	Cinética de crecimiento y producción de enzima mPAR hidrolasa en presencia de Zn^{2+}	66
17	Comparación de crecimiento con Co^{2+} a diferentes concentraciones	67

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Principales características fisicoquímicas del metil paratión	10
2	Comparación de la sensibilidad de algunos métodos para estimar la biomasa bacteriana	32
3	Rompimiento celular utilizando una bomba de descompresión	52
4	Parámetros de crecimiento de la cepa seleccionada	58
5	Producción de enzima	59
6	Rendimientos del cultivo	69

NOMENCLATURA

OP	Organofosforados
OPA	Anhidrasa de organofosforados
FAO	Food and Agriculture Organization: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
AOPs	Procesos de oxidación avanzada
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
CN	Caldo nutritivo
MSM	Medio de sales minerales
mPAR	Metil paratión
PNF	Paranitrofenol
LB	Luria-Bertani
t_d	Tiempo de duplicación
t_{gen}	Tiempo de generación
X	Concentración celular en g/l
N	Concentración celular en células/l
T	Tiempo
μ	Velocidad específica de crecimiento (masa)
μ_n	Velocidad específica de crecimiento (número)
μX	Velocidad de crecimiento volumétrico
μ_{max}	Velocidad específica máxima de crecimiento
S	Concentración de sustrato
K_s	Constante igual a la concentración de sustrato cuando $\mu = 0.5\mu_{max}$
$Y_{X/S}$	Rendimiento celular
$Y_{P/S}$	Rendimiento de productos
R	Fracción de masa celular representada por cenizas
L	Distancia
E	Coefficiente de absorción molar
C	Concentración
A	Absorbancia

NOMENCLATURA

ϵ'	Coeficiente de extinción molar
T	% de transmitancia
E	Enzima
S	Sustrato
ES	Complejo transitorio enzima-sustrato
$[E]$	Concentración de enzima
$[S]$	Concentración de sustrato
$[ES]$	Concentración del complejo enzima-sustrato
v_0	Velocidad inicial de reacción
V_{max}	Velocidad máxima
K_m	Constante de Michaelis-Menten
U	Unidad internacional de enzima

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios por guiarme y permitirme sentir su presencia en el transcurso de mi vida, lo cual me ha permitido alcanzar mis metas.

A mis padres por ser tan comprensivos y darme su apoyo incondicional durante la elaboración de este trabajo, así como también por tenerme tanta paciencia y por estar conmigo siempre que los he necesitado. A mis hermanos Ana Gabriela y Juan Carlos por apoyarme y ayudarme en el laboratorio cuando los necesitaba (en especial en el rompimiento celular). Y a mi hermano Ignacio por su apoyo al acompañarme en las madrugadas que estaba en el laboratorio y ayudarme en lo que necesitara.

A la Universidad de Sonora y al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia por ofrecerme la oportunidad de desarrollarme y realizar mis estudios de posgrado, a través de la Maestría en Ciencias de la Ingeniería. Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyarme económicamente durante mis estudios.

Un especial y muy grande agradecimiento a la M.C. Jesús Haydée Yeomans Reina por su asesoría, constante apoyo, confianza, paciencia y acertada dirección en la realización del presente trabajo. De la misma manera agradezco al resto de mis sinodales la M.C. Esther Carrillo Pérez, M.C. Arturo Ruiz Manriquez y al Dr. Fernando Lares Villa por su valiosa colaboración en el trabajo y por su intervención como jurado.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera me apoyaron y estuvieron conmigo en el transcurso de mi vida, muchas gracias.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

Los plaguicidas han jugado un papel relevante en la agricultura por su uso para el control de plagas (Ortiz y col., 2001). Sin embargo, la aplicación intensiva de estos compuestos ha tenido efectos adversos por el impacto sobre los sistemas biótico (animales y plantas principalmente) y abiótico (suelo, aire y agua) que debido a su alta toxicidad ponen en riesgo la salud humana y la estabilidad de otras especies (Kanekar y col., 2004).

El estado de Sonora es una región con alta productividad agrícola debido a la tecnificación de las labores del campo y a la aplicación masiva de plaguicidas, principalmente organofosforados como el metil paratión, el cual tiene un grado elevado de toxicidad (Ortiz y col., 2001). Esto lo hace un contaminante con potencial para causar intoxicación aguda y aun la muerte, principalmente a las personas que tienen contacto directo con él (jornaleros, población rural, entre otros), así como a los consumidores de productos agrícolas impregnados con sus residuos (Ortega, 1994).

Una forma de solucionar este problema es la degradación de estos plaguicidas utilizando microorganismos con la capacidad para hacerlo (Kanekar y col., 2004). A la fecha se ha aislado un cultivo mixto bacteriano degradador de metil paratión; dicha degradación ocurre paralela al crecimiento del cultivo, ya que utiliza metil paratión como única fuente de carbono. De este cultivo se han obtenido tres cepas puras, algunas de las cuales posee la enzima metil paratión hidrolasa, del grupo de las anhidrasas ácidas de organofosforados (OPA anhidrasa, por sus siglas en inglés) la cual lleva a cabo la fase

inicial de la degradación y destoxificación de metil paratión, quedando por determinar cuál de estas cepas posee dicha enzima.

Tradicionalmente, se han desarrollado estrategias para asegurar que las necesidades fisiológicas del cultivo se satisfagan para óptimo crecimiento y producción de productos de interés. Estas estrategias han sido muy efectivas para la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, con respecto a la producción de enzimas degradadoras de plaguicidas solo se ha reportado la aplicación de dichas estrategias en la producción de la enzima paratión hidrolasa recombinante producida en *Streptomyces lividans* (De la Cruz y col., 1992).

Los factores que influyen en la producción de la enzima degradadora pueden ser tanto fisiológicos (crecimiento o inhibición por ciertos componentes), como ambientales (variación de temperatura, pH, agentes quelatantes) (Karpouzias, 2000). De acuerdo a lo anterior el presente trabajo tiene como objetivo determinar las condiciones de crecimiento bajo las cuales el organismo seleccionado se desarrolla y produce la enzima metil paratión hidrolasa, para de esta manera tener una fuente producción de enzima la cual pueda ser purificada y así utilizarla en procesos de biorrestauración de sitios contaminados.

1.2 Objetivos

1.2.1 General

Determinar las condiciones de crecimiento y producción de metil paratión hidrolasa de una cepa bacteriana aislada de un cultivo mixto que utiliza metil paratión como fuente de carbono, para su posible uso en biorremediación.

1.2.2 Específicos

1. Seleccionar una cepa bacteriana productora de metil paratión hidrolasa.
2. Estandarizar las metodologías para evaluar crecimiento y actividad enzimática.
3. Determinar la cinética de crecimiento del cultivo productor de la enzima.
4. Determinar la cinética de producción de la enzima metil paratión hidrolasa.
5. Determinar la influencia de la temperatura y cationes en el cultivo y la actividad de la enzima.

CAPITULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Problemática de la contaminación ambiental

En la actualidad nuestro mundo está sufriendo muchos cambios debido a la acción del hombre, cambios que de alguna manera u otra desequilibran las condiciones ambientales preexistentes. El aumento continuo de la población, su concentración progresiva en grandes centros urbanos y el desarrollo industrial ocasionan, día a día, más problemas al medio ambiente.

El desarrollo de técnicas analíticas más sensibles y confiables puso en evidencia un grado de contaminación ambiental anteriormente desconocido alertando y creando conciencia en la sociedad sobre este problema. La acumulación de productos y residuos, algunos de ellos tóxicos, se ha agudizado por el desarrollo acelerado de una industria extractiva y de manufactura demandada por una creciente necesidad de bienes de consumo, así como por la necesidad de generar suministros agrícolas cada vez mayores. El impacto de la contaminación ambiental sobre las poblaciones más sensibles ha promovido la creación de una legislación para el manejo y tratamiento de residuos y el surgimiento de asociaciones ambientalistas (Yeomans y col., 2004).

2.1.1 Tipos de contaminantes

La contaminación se manifiesta como la presencia de sustancias extrañas de origen humano (basura, pesticidas, aguas residuales) en el medio ambiente, ocasionando alteraciones en la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas. Los causantes o contaminantes pueden ser químicos que se refieren a compuestos provenientes de la industria química. Estos pueden ser sustancias de efectos perjudiciales muy marcados,

como metales pesados (compuestos de fierro, cobre, zinc, mercurio, plomo, cadmio), ácidos (sulfúrico, nítrico, clorhídrico), álcalis (potasa, soda cáustica), disolventes orgánicos (acetona), detergentes, plásticos, derivados del petróleo (gasolina, aceites, colorantes, diesel), pesticidas (insecticidas, fungicidas, herbicidas), detergentes y abonos sintéticos (nitratos, fosfatos). Otro tipo de contaminantes son los físicos y biológicos, como son los emisores de radiación ionizante y agentes patógenos.

2.1.2 Formas de contaminación

La contaminación se manifiesta de diversas formas tales como la del suelo causada por plaguicidas, abonos sintéticos, petróleo y sus derivados, basuras, etc. La contaminación que afecta a los alimentos es originada por la presencia de sustancias riesgosas o tóxicas para la salud de los consumidores, generada durante la producción, manipulación, transporte, industrialización y el consumo de alimentos.

La contaminación agrícola es originada por desechos sólidos, líquidos o gaseosos de las actividades agropecuarias; pertenecen a este grupo los plaguicidas, fertilizantes, desechos de establos, la erosión, el polvo del arado, el estiércol, los cadáveres entre otros.

Con frecuencia se descubren nuevas formas y fuentes de contaminación, que afectan al ambiente y a la salud. En la era moderna y con el desarrollo de nuevas tecnologías y productos surgen nuevas fuentes contaminantes, que al inicio parecen inofensivos, y luego se demuestra que ocasionan daños a la salud física o mental de las personas o al ambiente (extinción de especies y degradación de recursos básicos como agua, suelo, bosques, etc.).

2.2 Contaminación con plaguicidas

Los plaguicidas son considerados como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal. (SEMARNAP, 1999).

Estos son manufacturados y dispersados en el ambiente contaminándolo. Esta contaminación se puede dar por distintas causas: aplicaciones directas en cultivos agrícolas, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento y residuos descargados y dispuestos en el suelo (Ortiz y col., 2001). Los plaguicidas desde su descubrimiento y fabricación han jugado un papel primordial en el desarrollo agrícola a través del control de insectos, hongos, hierbas y demás plagas que merman la producción de los cultivos. También han contribuido al control de enfermedades transmitidas por vectores biológicos como el paludismo, dengue y tifo, entre otras (Ortiz y col., 1997).

Sin dejar de tomar en cuenta los beneficios que el uso de plaguicida ha generado, considerando que en los países en desarrollo más del 60 % de la población económicamente activa depende de la agricultura, no se puede negar el impacto que estos están ejerciendo sobre suelos y cuerpos de agua superficiales y subterráneos incrementando el riesgo de las especies sensibles expuestas, sobre todo el hombre donde se pueden manifestar efectos toxicológicos agudos y crónicos de este tipo de compuestos (Cebrián, 1998). Esta plenamente documentado los efectos tóxicos agudos de los plaguicidas organofosforados y carbamatos sobre el sistema nervioso al inhibir la enzima colinesterasa, esencial para la adecuada conducción del impulso nervioso, lo que se traduce en alteraciones que van desde leves hasta graves e inclusive la muerte (Ecobichon, 1996). Otros, como piretroides, organofosforados y organoclorados tienen efecto genotóxico crónico, alterando la función reproductiva de las especies e inclusive hay evidencias de carcinogenicidad de plaguicidas como amitrol, clordano, DDT,

heptaclor, clorofenoles, bromuro de etilo, óxido de etileno, mirex y toxafeno. Se ha asociado cáncer de ovario a exposición de herbicidas triazínicos; cáncer mamario diversos plaguicidas; cáncer pancreático y DDT, entre otros (McConell, 1993). De igual forma se han reportado anomalías en el sistema reproductivo y endocrino de la vida silvestre de ecosistemas impactados por plaguicidas.

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud cada año entre 500,000 y 1 millón de personas se intoxican con plaguicidas y entre 5,000 y 20,000 mueren. Al menos la mitad de los intoxicados y el 75% de los que fallecen son trabajadores agrícolas, el resto se debe a envenenamientos por consumo de alimentos contaminados. En total, entre los dos grupos la mortalidad alcanza la cifra de 220 mil defunciones al año (OMS, 1990; Eddleston y col., 2002).

La Red Internacional de Acción Contra el Uso de Plaguicidas informa que los países en vías de desarrollo utilizan la quinta parte del consumo mundial de estos compuestos y se estima que la verdadera cifra de intoxicaciones por dichas sustancias asciende a 25 millones de casos, siendo el 99% de las defunciones atribuibles a los plaguicidas en estos países (PAN Internacional 1990).

2.3 Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados son ésteres derivados del ácido fosfórico, originados por la sustitución de los grupos OH por grupos OR (donde R corresponde a grupos alquilo; También el grupo P=O del ácido puede ser sustituido por el grupo P=S; los grupos OR por grupos S-R (donde R y S corresponden a grupos alquilo y sulfhidrilo respectivamente) así como otras sustituciones adicionales como halógenos o NH₂ (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007; Ortiz y col., 1997).

En el hombre actúan sobre el sistema nervioso central, inhibiendo la acetilcolinesterasa, enzima que modula la cantidad y los niveles del neurotransmisor acetilcolina,

interrumpiendo el impulso nervioso por fosforilación del grupo hidroxilo de serina en el sitio activo de la enzima. Los compuestos órgano-fosforados inhiben la acción de la colinesterasa y por tanto se acumulan niveles exagerados de acetilcolina que producen funciones anormales del sistema nervioso y que producen la muerte (Martínez–Valenzuela y Gómez–Arroyo, 2007).

Los síntomas que causan son pérdida de reflejos, dolor de cabeza, mareos, náuseas; muy altas dosis puede resultar en pérdida de consciencia, incontinencia, convulsiones, coma y hasta la muerte. Las personas con enfermedades respiratorias, exposición reciente a inhibidores de la colinesterasa, deterioro y mal funcionamiento del hígado tienen un mayor riesgo de exposición al metil paratión (EXTOXNET, 1996).

Asimismo se ha descrito que tienen propiedades alquilantes (Martínez–Valenzuela y Gómez–Arroyo, 2007), lo cual desde el punto de vista de la mutagénesis es de suma importancia, puesto que actúan directamente sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN) añadiendo grupos alquilo principalmente metilo y etilo a las bases nitrogenadas que tienen grupos nucleofílicos capaces de reaccionar con electrofílicos (Wild, 1975). Los compuestos organofosforados son los más utilizados en la agricultura, la mayoría son insecticidas y también acaricidas, su forma de ingreso a estos organismos es por ingestión y por contacto. Se utilizan en cultivos de hortalizas, árboles frutales, granos, algodón, caña de azúcar, entre otros. Entre los diversos grupos de plaguicidas que son usados mundialmente, el grupo de los organofosforados es el mayor y más usado representando más del 36% del total del mercado mundial de plaguicidas (Kanekar y col., 2004).

2.3.1 Metil paratión

El metil paratión (*O,O*-dimetil-*O-p*-nitrofenil fosforotioato) es un insecticida altamente tóxico, muy utilizado principalmente en agricultura para el control de plagas de insectos; según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en

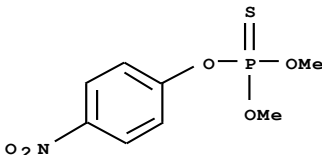
inglés) tiene una toxicidad de clase I y es de contacto e ingestión. Su uso es restringido y para su aplicación es necesario personal certificado; además, al estar incluido dentro de las listas de residuos peligrosos de la EPA cualquier producto que contenga metil paratión debe de estar etiquetado con la leyenda “peligroso”. De acuerdo a CICOPLAFEST (1997), es extremadamente peligroso para animales de sangre caliente (como mamíferos y aves). En México se ha recomendado para más de 70 cultivos, incluyendo vegetales, algunas plantas frutales y cereales. Además este tipo de plaguicida es utilizado en baños de ganado y las aguas residuales se dispersan sin previo tratamiento (Ortiz y col., 2001).

El metil paratión es de baja persistencia en el suelo, medio ambiente, con un tiempo de vida media de 1 a 30 días. La velocidad de degradación se incrementa con la temperatura y exposición a la luz del sol. El metil paratión es moderadamente adsorbido por la mayoría de los suelos y es ligeramente soluble en agua, donde puede sufrir fotólisis con una vida media de 8 días en verano y 38 días en invierno. Cuando hay grandes concentraciones de metil paratión en el suelo, o en derrames accidentales, la degradación se producirá sólo después de muchos años, con la fotólisis como ruta de degradación dominante (EXTOXNET, 1996).

2.3.1.1 Características fisicoquímicas

El metil paratión puro (*O,O*-dimetil-*O-p*-nitrofenil fosforotioato) es un sólido cristalino incoloro. El producto técnico es de un color café claro a café rojizo, con alrededor de un 80% de pureza. Es disponible en el mercado en forma de polvo, concentrado emulsificable, líquido y como formulación en polvo humidificable. Su fórmula y características fisicoquímicas se aprecian en la tabla 1.

Tabla 1. Principales características fisicoquímicas del metil paratión.

Nombre químico	(O,O-dimetil-O-p-nitrofenil fosforotioato)
* Estructura química	
Peso molecular	263.21
Solubilidad en agua	55-60 mg/L a 25° C
Punto de fusión	35-36° C
Presión vapor	1.3 mPa a 20° C
Coeficiente de partición	3.5185-3.8388
Coeficiente de adsorción	5100
Solubilidad en otros solventes	Soluble en diclorometano, 2-propanol, tolueno y la mayoría de disolventes orgánicos; insoluble en n-hexano.

Fuentes: EXTOXNET, 1996; * Merck Index, 1989

2.3.1.2 Toxicidad

El metil paratión es altamente tóxico vía oral, así como también vía cutánea. Efectos agudos asociados con la exposición al metil paratión son similares a aquellos asociados con la exposición a otros plaguicidas organofosforados previamente descritos.

Efectos ecológicos: el metil paratión es muy tóxico para aves, moderadamente tóxico para los peces y los animales que comen pescado; también se ha reportado toxicidad hacia las abejas (EXTOXNET, 1996).

2.4 Contaminación regional de organofosforados (OP)

Históricamente el uso de plaguicidas se ha concentrado en los estados del noroeste del país, en donde prevalece la agricultura dedicada a los cultivos de exportación.

Para esto se han tenido que incorporar avances tecnológicos que permitan que sus productos puedan seguir siendo competitivos y aceptados en otros países. La sustitución de plaguicidas persistentes por no persistentes, ha dado por resultado un mayor riesgo inmediato para los jornaleros (Albert, 2004).

Según los datos disponibles, actualmente las regiones con mayor uso de plaguicidas son: Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco-Nayarit-Colima, Sonora-Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México y Puebla-Oaxaca. Se calcula que en ellas se aplica el 80 % de total de plaguicidas usados en el país, lo que comprueba que el uso de plaguicidas tiene una fuerte concentración en algunas regiones y algunos cultivos. En las zonas noroeste y centro (Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Baja California, Guanajuato y Jalisco) se consumen cantidades importantes de plaguicidas de todo tipo para producir granos y una gran variedad de hortalizas de exportación. Se puede afirmar que hasta el 2004 prácticamente no había un agricultor en México que no usara uno o

más tipos de plaguicidas, sin la asesoría técnica y medidas de protección adecuadas (Albert, 2004).

No hay datos claros sobre la cantidad de plaguicidas que se usa actualmente en el país, pero hace unos 10 años se decía que se consumían alrededor de 50,000 toneladas anuales de ingrediente activo, con un valor en el mercado de entre 400 y 600 millones de dólares US. Un problema relacionado con el uso de plaguicidas, y que también plantea un riesgo ambiental y de salud importante, es el de los envases vacíos; donde el total de estos pudiera ser de unas 7 mil toneladas anuales, la gran mayoría de las cuales quedan dispersa en los campos y es fuente de riesgo ambiental y de salud (Albert, 2004).

García y Meza (1991), analizaron la presencia de plaguicidas en muestras de leche materna y sangre de infantes menores a tres meses de vida, residentes de Pueblo Yaqui, Sonora. Los resultados indicaron que el 100% de las muestras presentaban trazas de plaguicidas y en algunos casos, rebasaban las concentraciones límites establecidos por la FAO. En la misma zona, González (1991) detectó plaguicidas en seis pozos de ocho comunidades rurales que las abastecen de agua potable. La concentración de los plaguicidas rebasaron los límites máximos establecidos en la normatividad ambiental vigente en ese año. En otro estudio, Canales (1991) señala que la actividad agrícola de la región está ocasionando la elevación en la concentración de plaguicidas en los acuíferos, alcanzando ya las fuentes de agua potable y riego (Ortiz y col., 1997). Sin embargo, los plaguicidas seguirán siendo una herramienta necesaria para el control de plagas en los próximos años, a menos que se propongan alternativas para reemplazarlos totalmente (Kanekar y col., 2004).

2.5 Alternativas de descontaminación

Se han llevado a cabo estudios con el objetivo de minimizar o eliminar las propiedades tóxicas de estos plaguicidas en el ambiente. Se han aislado diversos géneros de bacterias

que son capaces de degradarlos, bajo un proceso de biorremediación, en un tiempo más corto que bajo condiciones naturales (Ortiz y col., 1997).

2.5.1 Métodos Fisicoquímicos

Las principales rutas de degradación de organofosforados en el suelo incluyen hidrólisis homogénea y heterogénea, misma que puede ser incrementada por la presencia de metales, sustancias húmicas y otros compuestos presentes en el suelo (Bavcon y col., 2007). Una de las principales rutas de degradación es la irradiación solar, donde la fotodegradación puede ocurrir por fotólisis directa ya que estos compuestos absorben en la región UV entre 240-310 nm. El proceso puede incrementarse por la presencia de otras especies como oxígeno o sustancias húmicas (fotólisis indirecta), que actúan como sensibilizadores naturales (Pehkonen y Zhang, 2002).

La mayoría de los procesos de degradación han surgido de los sistemas de tratamiento químico del agua, en los cuales, a través de procedimientos de degradación oxidativa se generan intermediarios muy reactivos que inician una serie de reacciones que llevan a la destrucción y remoción de estos contaminantes orgánicos. Estos procesos de oxidación avanzada (AOPs, por sus siglas en inglés) incluyen fotólisis de peróxido de hidrógeno y ozono, reactivo de Fenton y radiólisis del agua (Burrows y col., 2002).

Aun cuando algunos de estos procesos son efectivos, pueden presentar algunos inconvenientes como son la fotodegradación solar inducida de la mayoría de los plaguicidas que dan origen a productos muy persistentes en el ambiente. Por el contrario, los procesos que utilizan luz UV resultan ser más efectivos pero muy costosos. Los procesos fotocatalíticos que utilizan fotosensibilizadores son efectivos en el tratamiento de plaguicidas, aunque tienen la desventaja de que los fotosensibilizadores son altamente biotóxicos. Por otro lado, procesos químicos de degradación que utilizan radicales hidroxilos, son efectivos y de bajo costo, pero algunos productos de las reacciones pueden ser problemáticos (Burrows y col., 2002).

La presencia de microorganismos en el suelo puede dar origen a procesos bióticos importantes en la disipación de estos y otros compuestos xenobióticos, por lo que resultan ser una alternativa de degradación de plaguicidas atractiva.

2.5.2 Biodegradación de compuestos xenobióticos

Existen innumerables reportes sobre degradación biótica de compuestos orgánicos en el ambiente, mostrando la capacidad degradativa de una gran variedad de organismos, dentro de los cuales destacan hongos y bacterias.

Los microorganismos tienen la capacidad de degradar sustratos diferentes a las fuentes de carbono naturales debido a su capacidad evolutiva y de adaptación o aclimatación al medio (Alexander, 1994; Ortiz y col., 1997). Las transformaciones microbiológicas que ocurren durante el tratamiento de desechos son las mismas reacciones mediante las cuales los microorganismos heterotróficos se nutren y captan la energía necesaria para satisfacer sus requerimientos nutricionales, algunas de las cuales también destoxifican su ambiente inmediato (Yeomans y col., 2004).

Los compuestos orgánicos xenobióticos pueden ser degradados completamente (mineralización) a CO₂ y H₂O por poblaciones aeróbicas o a dióxido de carbono y metano por organismos anaerobios, procesos que están asociados al crecimiento; por otro lado, pueden ser transformados parcialmente a compuestos inocuos o de menor toxicidad que el compuesto original. Sin embargo, muchas veces la degradación no es muy eficiente, los compuestos son metabolizados lentamente o resultan resistentes al ataque microbiano bajo las condiciones ambientales prevalecientes. En este último caso, los microorganismos pueden carecer de las enzimas necesarias para llevar a cabo la transformación del compuesto a intermediarios metabólicos que puedan ser degradados completamente por las rutas del metabolismo central. En otras ocasiones, no están dadas en el sitio las condiciones necesarias para su desarrollo, o bien, los microorganismos degradadores necesarios no están presentes en el sitio (Yeomans y col., 2004).

En algunos casos el compuesto xenobiótico es transformado por algunas de las reacciones metabólicas sin servir de sustrato o fuente de energía para el microorganismo en un proceso no asociado al crecimiento (cometabolismo), teniendo por lo tanto que suministrar al medio una fuente de nutrientes y energía adicional para el desarrollo. En este caso el compuesto es transformado pero nunca degradado totalmente por el microorganismo, con el riesgo de acumulación de productos de degradación que pudieran resultar de mayor toxicidad (Alexander, 1999).

En los procesos de degradación bióticos se deben considerar algunos factores que afectan la actividad de los organismos heterotróficos y que finalmente determinan el tipo de proceso degradativo que se puede dar (aerobio o anaerobio; asociado al crecimiento o cometabólico).

Entre los factores podemos mencionar algunos fisicoquímicos que determinan la biodisponibilidad del contaminante (sorción, disolución, etc.) o limitaciones en el transporte de masa (difusión y solubilidad de oxígeno y nutrientes). Factores biológicos, como la disponibilidad de aceptores de electrones, tipo de población presente, tipo y concentración del contaminante, fuente de carbono alternativa en el medio, tipo de interacción y diversidad de la comunidad microbiana. Factores ambientales como pH, temperatura y contenido de humedad (Yeomans y col., 2004).

La biodegradación de un compuesto orgánico puede ser llevada a cabo por un organismo puro o mediante la participación concertada de una comunidad microbiana en la cual puede encontrarse una mayor capacidad degradativa y resistencia a toxicidad (Alexander, 1999).

Los sistemas enzimáticos responsables de la biodegradación de los compuestos xenobióticos están sujetos a control del metabolismo celular y requieren de un proceso de inducción de su síntesis para que se hagan presentes en el medio; esto se hace evidente al principio de la fase de aclimatación característica de las poblaciones

degradadoras. Otros mecanismos de control enzimático como la represión catabólica que pueden ejercer otros sustratos en el medio, deben considerarse, sobre todo cuando la degradación es cometabólica, ya que implica la utilización de una fuente de carbono alternativa, frecuentemente asociada a este tipo de regulación (Yeomans y col., 2004).

La movilización de material genético a través de plásmidos durante eventos de conjugación entre los microorganismos juega un papel primordial en la adquisición de capacidad degradativa de xenobióticos, ya que esta se encuentra, en muchos casos, codificada en los plásmidos que poseen; tal es el caso de la degradación de aromáticos como tolueno, xileno y naftaleno; terpenos, alcaloides e hidrocarburos halogenados como 2,4-D, clorobenzoato, y p-clorobifenilo, entre otros. De esta forma, los plásmidos participan en el surgimiento de nuevos caminos metabólicos involucrando enzimas que degradan xenobióticos hasta intermediarios del metabolismo central, a partir del cual completan su mineralización (Grady, 1985).

Los organismos degradadores de compuestos xenobióticos han adquirido esta habilidad tomando ventaja de las condiciones ambientales a las que han estado sujetas a través del tiempo, aunque muchas veces esta actividad ocurre a una velocidad menor que la necesaria para limpiar sitios muy contaminados. Hoy en día se están generando variedades de microorganismos genéticamente mejoradas con respecto a la capacidad degradadora de compuestos tóxicos en el ambiente (Ensley, 1994).

Siendo los plaguicidas organofosforados muy utilizados en México, es importante contar con cepas bacterianas con la habilidad de degradar este tipo de compuestos y poder utilizarlas en tratamientos biológicos de desechos y suelos contaminados, o aislar a partir de ellos sus sistemas enzimáticos (Ortiz y col., 2001).

2.6 Organismos biodegradadores de OP

Con el objetivo de minimizar o eliminar las propiedades tóxicas de estos plaguicidas en el ambiente, se han aislado de suelo, colectores de aguas negras y cuerpos de agua, diversos géneros de bacterias que son capaces de degradarlos, los cuales hidrolizan, reducen u oxidan el compuesto bajo un proceso de biorremediación, en un tiempo más corto que bajo condiciones naturales (Ortiz y col., 1997).

Se ha reportado la degradación de paratión etílico por bacterias tales como *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Flavobacterium* sp. ATCC (Siddaramappa y col., 1973; Munnecke y Hsieh, 1974; Daughton y Hsieh, 1977; Adhya y col., 1981). De igual forma, organismos degradadores de paratión metílico tales como *Flavobacterium* sp. ATCC y *Pseudomonas* sp. ATCC (Adhya y col., 1981); *Pseudomonas* sp. (Chaudry y col., 1988); *Pseudomonas putida* (Rani y Lalithakumari, 1994); *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter sakazakii* y *Citrobacter freundii* (Ortiz y col., 2001); *Plesiomonas* sp. (Zhongli y col., 2001); *Bacillus* sp. (Sreenivasulu y Apama, 2001). Otros organofosforados como fenetotrión, coumafós y malatión también han sido degradados por algunos microorganismos.

La degradación de paratión ha sido más investigada que la de paratión metílico. La ruta metabólica mediante la cual algunos microorganismos degradan paratión fue inicialmente determinada por Munecke y Hsieh (1976), como se aprecia en la figura 1 donde algunos pasos han sido plenamente confirmados (flecha gruesa) mientras que otros fueron solo postulados (flecha delgada), quedando pendiente su confirmación.

En otras investigaciones, mediante estudios de incorporación de radioactividad en [¹⁴C] PNF, Ramanathan y Lalithakumari (1999) determinaron la ruta metabólica mediante la cual *Pseudomonas* sp A3 degrada metil paratión (Figura 2), confirmándose la incorporación de carbono proveniente de la porción aromática del metil paratión a los

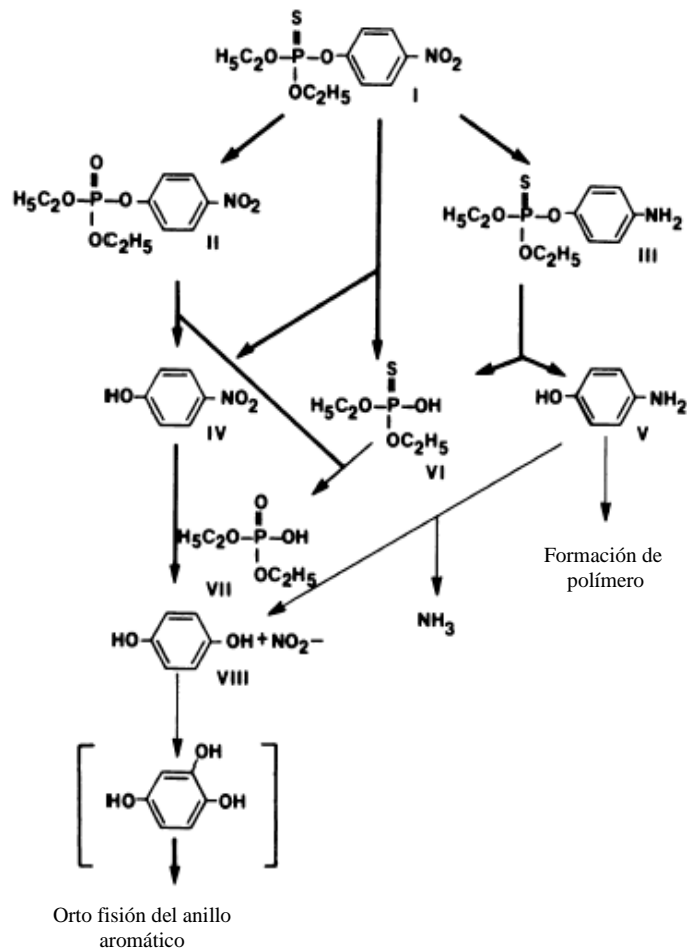


Figura 1. Ruta de degradación de paratión por un cultivo mixto bacteriano.

➡ Rutas definitivas; —→ Rutas postuladas.

Fuente: Munnecke y Hsieh, 1976.

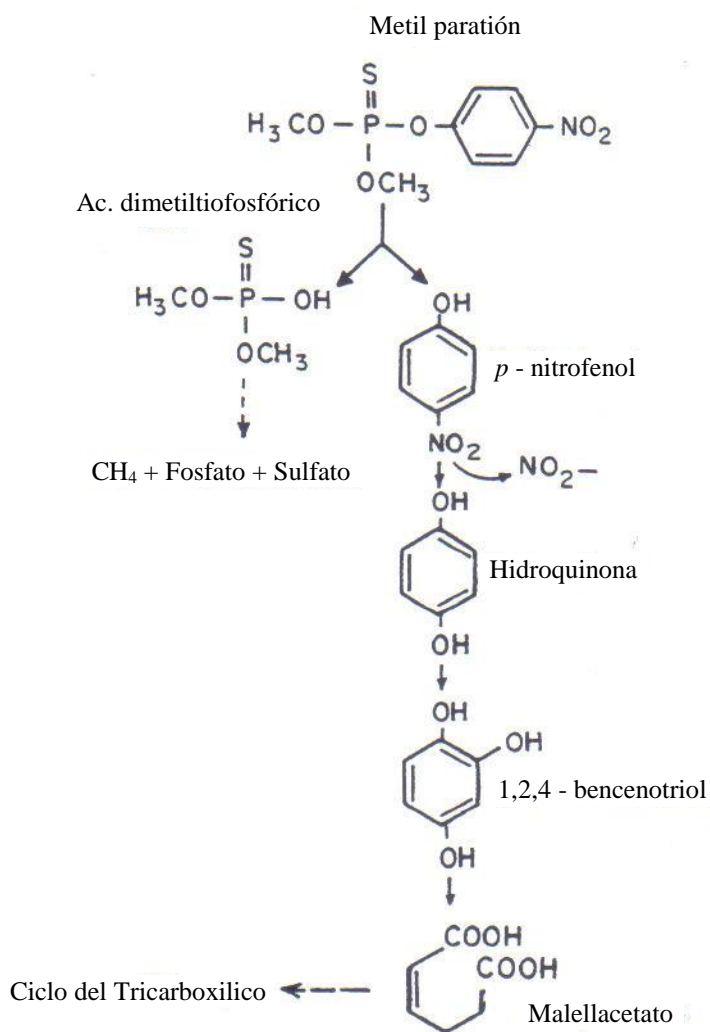


Figura 2. Ruta de degradación de metil paratión por la cepa bacteriana *Pseudomonas* sp A3.

Adaptación de Ramanathan y Lalithakumari, 1999.

componentes celulares. De acuerdo a estas investigaciones, el PNF formado a partir del metil paratión fue utilizado como fuente de carbono y energía para llenar los requerimientos metabólicos de *Pseudomonas* sp A3 quien hidroliza metil paratión a dimetil fosforotioato y *p*-nitrofenol, donde este último al ser mineralizado hasta CO₂, sirvió como fuente de carbono. En una serie de reacciones, *p*-nitrofenol pierde el grupo NO₂⁻ hasta llegar a la *orto* fisión del anillo bencénico generando los intermediarios que entran al metabolismo central para ser completamente mineralizado a través del ciclo del ácido tricarbóxico.

La capacidad degradadora de estos organismos, se debe a la presencia de enzima hidrolítica, conocida genéricamente como una anhidrasa de organofosforados. Se han aislado numerosos organismos nativos y se ha evaluado su capacidad para degradar organofosforados. Sin embargo, recientemente se ha puesto énfasis en la generación de organismos genéticamente diseñados, con el fin de hacer más eficientes los procesos degradativos para su aplicación en biorremediación de sitios contaminados.

2.6.1 Organismos nativos

Sedar y col. (1982) aislaron un organismo con alta actividad de una enzima a la que llamaron paratión hidrolasa. Este organismo fue identificado como *Pseudomonas diminuta*. Encontraron que las colonias con actividad enzimática hidrolizaban rápidamente al paratión en *p*-nitrofenol (PNP), como lo indicaba la aparición del color amarillo en el cultivo. La enzima paratión hidrolasa estuvo presente en el cultivo aún sin la presencia del plaguicida, lo cual mostró que esta codifica constitutivamente en un plásmido.

Chaudhry y col. (1988) aislaron del suelo dos cultivos bacterianos mixtos capaces de utilizar paratión metílico y paratión etílico como única fuente de carbono. De esa mezcla solo *Pseudomonas* sp., hidrolizó el plaguicida a *p*-nitrofenol, aunque se necesitó glucosa u otra fuente de carbono para su crecimiento. Cuando se llevó a cabo la hibridación del

DNA de esta bacteria con el gen *opd* de *Flavobacterium* sp., se demostró una homología en su secuencia de bases (Ortiz y col., 1997).

En estudios realizados en México, Ortiz y col., (2001) aislaron un consorcio bacteriano con la capacidad de degradar paratión metílico en suelos agrícolas de Morelos, México. Utilizando al plaguicida como única fuente de carbono. Se determinó la actividad enzimática midiendo el cambio en absorbancia a 410nm, cuando una solución de 15mg/L de paratión metílico fue expuesta a un extracto enzimático el cual contenía la enzima paratión hidrolasa para producir *ácido dimetiltiofosforico* y *p-nitrofenol* (PNP). Para medir la actividad enzimática, consideraron la aparición de PNP. La enzima rompe paratión metílico y produce este metabolito y *ácido dimetiltiofosforico*, produciendo 1mol de PNP por cada mol de paratión metílico hidrolizado. En sus resultados observaron que el crecimiento fue aumentando al aumentar la concentración de paratión metílico. En su cinética se observó que al incrementar el crecimiento bacteriano, disminuía la concentración de paratión metílico.

Techelet y col., (1993) aislaron dos bacterias del género *Pseudomonas* sp. y *Xathomonas* sp. las cuales degradaron paratión en dos etapas; primero se liberó el PNP con la acción de paratión hidrolasa y después el PNP se degradó por completo. También estudiaron el efecto de los cationes sobre la hidrólisis del paratión. Dicha hidrólisis fue inhibida en *Pseudomonas* sp. por la presencia de Cu^{+2} ; por el contrario, en *Xathomonas* sp., el Cu^{+2} estimuló la hidrólisis del plaguicida (Ortiz y col., 1997).

Chen y col., (2002) optimizaron la composición de un medio para la producción de la enzima elastasa por la bacteria EL31410, en el que mantuvieron constante el pH a 7.4 y la temperatura a 37° C. Utilizaron un diseño factorial para estudiar los principales factores que afectan la producción de la enzima, una vez que encontraron los factores que más influían en la producción, utilizaron el método de superficie de respuesta para derivar el modelo estadístico de cada uno de los factores.

2.6.2 Organismos genéticamente diseñados

Recientemente algunas líneas de investigación se han enfocado a la generación de metodologías para manipulación de los genes que codifican OPA anhidrasas con el fin de incrementar la efectividad de estas enzimas hacia sustratos pobremente degradados. Se han implementado diferentes estrategias tales como mutagénesis dirigida para modificar varios aminoácidos involucrados en el sitio activo de la enzima y dar origen a mutantes con características catalíticas mejoradas contra paroxón y otros organofosforados (Ang y col., 2005).

Otra estrategia ensayada consistió en utilizar ingeniería genética para posicionar la enzima en la superficie de *Pseudomonas putida* JS444, con el fin de sobrellevar los problemas que tienen algunos organofosforados para ingresar fácilmente a la célula (Lei y col., 2005). Ya que la enzima es intracelular, Coppella y col., (1990) obtuvieron una versión de la enzima que pudiera ser excretada, para lo cual clonaron el gene que codifica paratión hidrolasa en *Streptomyces lividans* donde se expresó y excretó para su utilización en la restauración de aguas residuales.

En otros estudios Walker y Keasling (2002) introdujeron el gen *opd* que codifica la enzima degradadora de paratión así como los operones responsables de la degradación de p-nitrofenol en el genoma de *Pseudomonas putida* KT2442, con lo cual esta cepa pudo utilizar paratión como única fuente de carbono y energía.

2.7 Enzimas degradadoras de organofosforados

La capacidad degradadora de organofosforados de las bacterias se debe a la presencia en ellas de enzimas conocidas como triesterasas de organofosforados, pertenecientes al grupo de las anhidrasas de organofosforados tipo A. Estas enzimas responsables de iniciar la degradación, son altamente eficientes pudiendo hidrolizar un amplio rango de compuestos organofosforados, donde catalizan la ruptura de las uniones P=O, P-F o P=S

de la molécula. La mayoría de los microorganismos que son capaces de producir OPA anhidrasas son bacterias Gram-negativas, donde estas enzimas se localizan intracelularmente o pueden ser secretadas a través del espacio periplásmico. La membrana externa actúa como una barrera permeable y limita la interacción entre el plaguicida y la OPA anhidrasa que se encuentra dentro de la célula (Zhang y col., 2005). Entre las bacterias productoras de este tipo de enzimas podemos citar *Flavobacterium* sp. PAR⁺, *Pseudomonas diminuta* MG, *Escherichia coli* HB101, *Pseudomonas putida* PRS 2015, *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Las anhidrasas se pueden encontrar en mamíferos, insectos, bacterias y hongos (Attaway y col., 1987).

Recientemente estas enzimas han sido motivo de interés y extensa investigación por su potencial aplicación para remediar sitios contaminados con plaguicidas residuales y armas químicas como soman y sarin. Ellas pueden ser inhibidas por agentes quelatantes como el EDTA, ya que requieren la presencia de un ión divalente como Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ y Mn²⁺ para su actividad. El peso molecular de la A-esterasas están entre 30 y 90 kDa (Jokanović, 2001).

La estructura tridimensional de la triesterasa de *Pseudomonas diminuta* muestra 3 sitios de unión distintos (sub sitios) como bolsas hidrofóbicas responsables de la orientación del sustrato hacia el sitio activo de la enzima. Mediante mutagénesis dirigida de aminoácidos claves en cada uno de estos tres sub sitios se pudo mostrar que el aminoácido histidina 257 juega un papel importante en la estereo selectividad de la enzima. Los estudios han revelado también como la efectividad de la hidrólisis varía con el tipo de sustrato con el cual la enzima interacciona; por ejemplo, algunos insecticidas como metil paratión, clorpirifus y diazinón son hidrolizados de 30 a 1000 veces más lento que Paroxón, debido a interacciones desfavorables con el sitio activo (Dumas y col., 1989).

2.7.1 Mecanismo de reacción de paratión hidrolasa

Dumas y col., (1989) propusieron un mecanismo para la acción de la enzima paratión hidrolasa de *Pseudomonas diminuta* el cual se muestra en la figura 3. En este caso, el sitio activo de la enzima extrae un protón al agua y se activa para atacar directamente al fósforo de la molécula de paroxón el cual experimenta una inversión en su oxígeno de la molécula de paroxón favoreciéndose la hidrólisis de la unión éster del mismo para generar p-nitrofenol. Estudios adicionales han reportado la participación esencial en la catálisis de un residuo de histidina del sitio activo, ya que su ausencia inactiva a la enzima (Dumas y Raichel, 1990).

2.8 Bases teóricas

Los microorganismos crecen en un amplio espectro de ambientes físicos y químicos; su crecimiento y otras actividades fisiológicas son una respuesta de su ambiente fisicoquímico.

2.8.1 Microorganismos

El crecimiento de microorganismos es caracterizado por el tiempo requerido para doblar su masa celular (biomasa) o número de células. La velocidad de crecimiento, es la velocidad en la que aumenta el número de células o biomasa por unidad de tiempo y el tiempo requerido para que la población se duplique se conoce como tiempo de duplicación (t_d) o tiempo de generación (t_{gen}). El tiempo de doblado de masa difiere del tiempo de duplicación celular porque la masa celular puede incrementar sin que incremente el número de células. Sin embargo, si en determinado medio el intervalo entre la masa celular o número de duplicación es constante con el tiempo, el organismo está creciendo a una velocidad exponencial. Bajo esas condiciones, el crecimiento se puede describir de la siguiente manera:

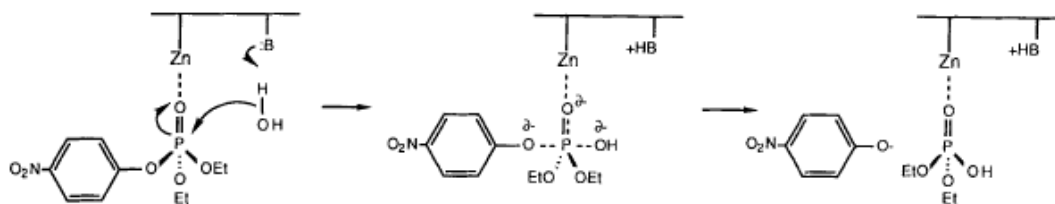


Figura 3. Mecanismo de degradación de Paroxón por fosfortriesterasa de *P. diminuta*.

(Dumas y col., 1989)

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

ó

$$\frac{dN}{dt} = \mu_n N \quad (2)$$

donde X es la concentración celular en g/L, N es la concentración celular en células/L, t es el tiempo, μ es la velocidad específica de crecimiento en h^{-1} (masa) y μ_n es la velocidad específica de crecimiento (número).

La ecuación 1 describe el incremento de masa celular con respecto al tiempo y la ecuación 2 describe el incremento en número de células con respecto al tiempo. En la mayoría de las circunstancias el crecimiento es medido por el incremento de masa, de tal manera que se usara μ . El valor μX es la velocidad de crecimiento volumétrico (productividad volumétrica) en g/L-h (Wang y col., 1979).

Integrando la ecuación 1 y si la velocidad específica de crecimiento es constante la ecuación 3 queda de la siguiente manera:

$$\ln \frac{X_2}{X_1} = \mu \Delta t \quad (3)$$

La ecuación 3 puede ser resuelta para el caso en que $\Delta t = t_d$, que es, el tiempo requerido para que $X_2 = 2X_1$, entonces,

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \quad (4)$$

De la ecuación 3, se ve que la velocidad específica de crecimiento es obtenida de la pendiente de la grafica de $\ln X$ contra el tiempo (Wang y col., 1979).

2.8.2 Cinética de crecimiento microbiano

El crecimiento, el cual es caracterizado por el incremento en la masa celular y/o número, ocurre solo cuando se satisfacen ciertas condiciones químicas y físicas, como son temperatura y pH, así como también la disponibilidad de los nutrientes requeridos.

Una curva de crecimiento intermitente típico de un microorganismo crecido en un medio químicamente definido se muestra en la figura 4. Esta curva de crecimiento consta de tres fases distintas: una fase lag que ocurre inmediatamente después de la inoculación del medio y es un periodo de adaptación de la población a las nuevas condiciones de crecimiento, en la cual se dan la síntesis o represión de enzimas o componentes estructurales de la célula. Como consecuencia, la fase lag puede ser muy corta o bastante larga; durante esta fase la masa celular irá cambiando sin cambiar el número de células (Wang y col., 1979).

Una vez que se completa esta fase, las células pasan a la fase de crecimiento; este crecimiento es usualmente exponencial o log, es decir, constante. La fase log es caracterizada por una línea recta en una grafica semilog del $\ln X$ contra el tiempo. Este es un periodo de crecimiento en equilibrio o de estado estacionario durante el cual, la velocidad específica de crecimiento μ es constante. En algún momento, la velocidad de crecimiento empieza a decrecer, ya sea por agotamiento de un nutriente esencial, o por acumulación de un producto de inhibición. No obstante, las células pasan por una transición hasta que la velocidad de crecimiento neta es cero.

La fase estacionaria ocurre cuando todas las células han dejado de dividirse o cuando las células viables están en equilibrio con las células muertas, es decir, cuando la velocidad de crecimiento es igual a la velocidad de muerte (Wang y col., 1979).

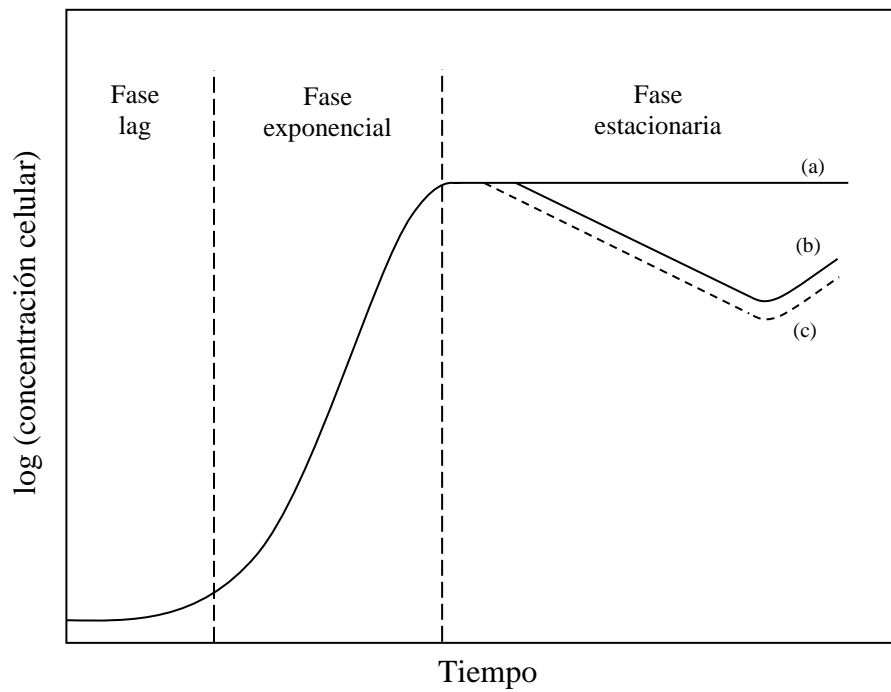


Figura 4. Curva de crecimiento bacteriano.

- (a) Masa celular sin lisis.
- (b) Masa celular cuando hay lisis y crecimiento crítico.
- (c) Cuenta viable cuando hay lisis.

Adaptada de Wang y col., 1979.

2.8.3 Velocidad de crecimiento

Durante la mayoría de las fermentaciones intermitentes típicas la velocidad específica es constante e independiente de la concentración de nutrientes que va cambiando. Sin embargo, la velocidad de crecimiento es función de la concentración química que en este caso, son los nutrientes esenciales o sustratos para el crecimiento. La relación entre la velocidad de crecimiento y la concentración de sustrato fue observada por Monod (1949) la cual es similar a la cinética de saturación exhibida por adsorción molecular. Por lo tanto, un modelo similar a la isoterma de Langmuir de absorción molecular fue aplicado al crecimiento. El modelo de Monod tiene la siguiente forma:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

donde μ es la velocidad específica de crecimiento, μ_{\max} es la velocidad específica de crecimiento máxima, S es la concentración de sustrato y K_s es una constante igual a la concentración de sustrato cuando $\mu = 0.5\mu_{\max}$.

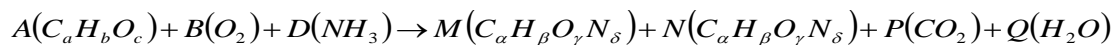
Los valores de K_s son bastante pequeños, lo que significa que $\mu \approx \mu_{\max}$ cuando $S > 10K_s$ y no es hasta que $S < 10K_s$ que la velocidad específica de crecimiento se vuelve una función fuerte de la concentración de sustrato. Ya que el valor de K_s es bajo, la velocidad específica de crecimiento durante la fase log es constante. La transformación de la fase log a estacionaria es usualmente muy rápida o abrupta, desde que el sustrato residual es muy poco, las altas concentraciones celulares rápidamente utilizan el sustrato restante. Por lo que es muy difícil estimar los valores de K_s en fermentaciones de cultivos intermitentes. Sin embargo es posible emplear velocidades cinéticas iniciales donde niveles iniciales bajos de sustrato son empleados y cuando la

velocidad de crecimiento inicial es medida antes de que la concentración de sustrato cambie significativamente (Wang y col., 1979).

El modelo de Monod está basado en observaciones empíricas pero es frecuentemente racionalizada por una analogía con la cinética enzimática de Michaelis-Menten con la hipótesis de que una sola velocidad limite el paso de la enzima-catalizada en control de la velocidad de crecimiento. Además, se les puede atribuir un significado físico y biológico a las dos constantes: μ_{\max} es la velocidad máxima de crecimiento en un medio químico dado, a temperatura específica y pH, y K_s es inversamente proporcional a la afinidad del microorganismo por el sustrato (Wang y col., 1979).

2.8.4 Rendimientos

El crecimiento y la formación de productos por microorganismos son procesos de bioconversión en los cuales los nutrientes químicos alimentados a la fermentación, son convertidos en masa celular y metabolitos. Cada una de estas conversiones puede ser cuantificada por el coeficiente de rendimiento expresado como la masa de células o producto formado por unidad de masa de nutrientes consumidos, $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$ para células y productos, respectivamente. Por lo que el coeficiente de rendimiento representa la eficiencia de conversión. El significado de rendimiento de celular y de productos puede ser visto en una examinación de la estequiometría para el crecimiento y la formación de productos:



El coeficiente de rendimiento celular en el carbono:

$$Y_{x/s} = \frac{M(12\alpha + \beta + 16\gamma + 14\delta)/(1-r)}{A(12a + b + 16c)}$$

donde r es la fracción de masa celular representada por cenizas.

De una manera similar el rendimiento del producto:

$$Y_{P/S} = \frac{N (12\alpha' + \beta' + 16\gamma' + 14\delta')}{A (12a + b + 16c)}$$

En ambas ecuaciones, los términos en paréntesis son pesos moleculares.

La manera usual de calcular rendimientos es midiendo la masa celular o productos producidos y sustrato consumido durante un periodo de tiempo y se calcula de la siguiente manera:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

Los valores anteriores representan los coeficientes de rendimiento observados (Wang y col., 1979).

2.9 Determinación del crecimiento

Biomasa es un término comúnmente utilizado para referirse a un organismo en un cultivo y los parámetros que se utilizan para medirla nos sirven para estimar el crecimiento así como otros parámetros que nos permiten analizarlo.

Se han diseñado diferentes métodos para medir la biomasa cuya selección depende de las propiedades de la misma, del medio de cultivo en el que se está desarrollando, de la exactitud, sensibilidad, así como velocidad requerida. Entre las propiedades del medio que determinan la selección del método a utilizar podemos mencionar la viscosidad, color, presencia de sólidos, presencia de productos de almacenamiento del organismo tales como glicógeno, entre otros. En la tabla 2 se pueden comparar algunos métodos en base a su sensibilidad.

Tabla 2. Comparación de la sensibilidad de algunos métodos para estimar la biomasa bacteriana.

Método	Peso seco mínimo de bacteria requerido para una estimación con un error < 2% (mg)
Peso seco	50
Proteína (Biuret)	1.0
DNA	1.0
Proteína (Lowry)	10^{-1}
Turbidez	10^{-1}
Cuenta celular	10^{-5}

2.9.1 Determinación de peso seco

La determinación del peso de biomasa seca es un método directo que involucra la separación del organismo del medio, el lavado del mismo utilizando de preferencia una solución isotónica que prevenga la lisis osmótica de microorganismos y finalmente el secado de la misma bajo condiciones no destructivas (temperaturas de $105 \pm 2^\circ \text{C}$ o menos).

Este método es probablemente el parámetro más inequívoco para determinar la biomasa, sin embargo tiene la desventaja de requerir un mínimo de 50 mg de biomasa, de ser tedioso y lento. Por otro lado es inaplicable principalmente en medios particulados (Pirt, 1975).

2.9.2 Método turbidimétrico

Este método ofrece una forma simple, rápida y barata de estimar la biomasa rutinariamente. Está basado en que la turbidez o densidad óptica de un cultivo es proporcional a la masa celular. Para determinar la densidad óptica se considera que el cambio de la intensidad de la luz atravesando una distancia L de un cultivo esta dado por la ecuación:

$$\frac{-dI_t}{dL} = \varepsilon I_t C$$

donde ε es el coeficiente de absorción molar y C es la concentración. La integración de esta ecuación nos genera la ecuación:

$$\frac{I_t}{I_o} = e^{-\varepsilon CL}$$

Un rearrreglo de la ecuación anterior nos da el valor de absorbancia (A):

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \varepsilon'CL$$

Donde ε' es el coeficiente de extinción molar; T es el % de transmitancia e igual a $(I_t/I_o) \times 100$ y A es la absorbancia e igual a $\log_{10}(1/T)$. De esta manera una gráfica de absorbancia en coordenadas lineales vs. concentración deberá generar una línea recta (Wang y col., 1979).

La ley de Beer establece que la absorbancia es proporcional a la concentración y en suspensiones diluidas, la mayoría de las bacterias tienen casi la misma absorbancia por unidad de concentración (en base a peso seco) independientemente del tamaño celular. Esta relación es la base de la estimación del crecimiento en cultivos microbianos usando un método turbidimétrico el cual es rápido y no destructivo (Pirt, 1975). Cuando se estima la absorbancia de cultivos densos los valores se desvían de la linealidad predicha por la ley de Beer lo cual obliga a diluir las muestras para obtener un estimado de la absorbancia menor a 0.3. Igualmente, un método turbidimétrico no puede estimar concentraciones celulares menores a 10^7 unidades formadoras de células por ml.

La turbidez de una suspensión celular es medida mediante luz de longitud de onda entre 600 y 700 nm utilizando un espectrofotómetro o bien un colorímetro con filtro rojo (Wang y col., 1979).

2.10 Determinación de actividad enzimática

Durante la producción y purificación de una enzima es necesario contar con un método rápido y sensible que nos permita detectar y cuantificar la enzima en el sistema. Se han desarrollado métodos continuos que permiten el monitoreo continuo, mediante la determinación de alguna propiedad medible que permita la cuantificación de la

velocidad de desaparición del sustrato de la enzima o bien de la aparición de algún producto de la reacción, como sería medir un cambio de absorbancia generado por un compuesto que absorba en el rango UV-visible del espectro electromagnético. En el caso de métodos discontinuos se requiere que la muestra sea periódicamente extraída y analizada por algún método conveniente.

La cantidad de una enzima presente en solución no se expresa en unidades de masa o moles sino en unidades de actividad enzimática, basada en la velocidad de la reacción que la enzima cataliza.

La relación matemática entre la velocidad y la concentración de sustrato fue analizada por Michaelis y Menten, asumiendo que la enzima (E) se une al sustrato (S) para formar reversiblemente un complejo transitorio enzima-sustrato (ES) el cual se degrada para formar el producto y liberar la enzima. Asumiendo que la concentración de la enzima es mucho menor que la concentración de sustrato, que inicialmente el producto está ausente y que la concentración del complejo ES es constante y está en equilibrio con [S] y [E], ellos derivaron la ecuación que lleva su nombre y que después fue modificada por Briggs-Haldane quienes asumieron un estado estacionario, la cual se describe como:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

donde, v_0 es la velocidad inicial de la reacción, $[S]$ es la concentración de sustrato en moles /l, V_{\max} es la velocidad máxima e igual a: $V_{\max} = k_2 [E_0]$ y constante a muy alta concentración de sustrato, K_m es una constante (de Michaelis-Menten) y es el valor que tiene la $[S]$ cuando $v = \frac{1}{2} V_{\max}$.

La relación entre la velocidad inicial y la concentración de sustrato se puede apreciar en la figura 5.

La velocidad de una reacción catalizada por una enzima que ocurre bajo condiciones de estado estacionario está dada por la ecuación:

$$v_0 = \frac{k_2 [E_0][S_0]}{[S_0] + K_m}$$

donde a $[S_0]$ constante

$$v_0 \propto [E_0]$$

es decir, la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima es directamente proporcional a la concentración de la enzima a una concentración de sustrato fija, estableciéndose entre ellas una relación lineal. Esta relación es válida cuando la concentración de sustrato es suficientemente grande y se aproxima a la región de saturación de la enzima. De acuerdo a la ecuación de Michaelis–Menten una enzima solo está saturada a concentraciones de sustrato infinita, por lo cual se utiliza convenientemente el término “cercano a la saturación” para definir el rango en el cual la velocidad inicial es igual a la velocidad máxima y es independiente de la concentración. Por esto, para hacer una determinación exacta de la cantidad de enzima presente, es una condición asegurar que el sustrato esté en exceso y saturando a la enzima y así evitar que la concentración de sustrato esté limitando la velocidad de la reacción (Palmer, 1991).

Otros prerrequisitos para llevar a cabo una determinación enzimática es el contar con un método específico para medir la velocidad de reacción y que el ensayo se lleve a cabo a condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica adecuadas para la enzima, así como contar con los cofactores requeridos y evitar la presencia de inhibidores de la enzima.

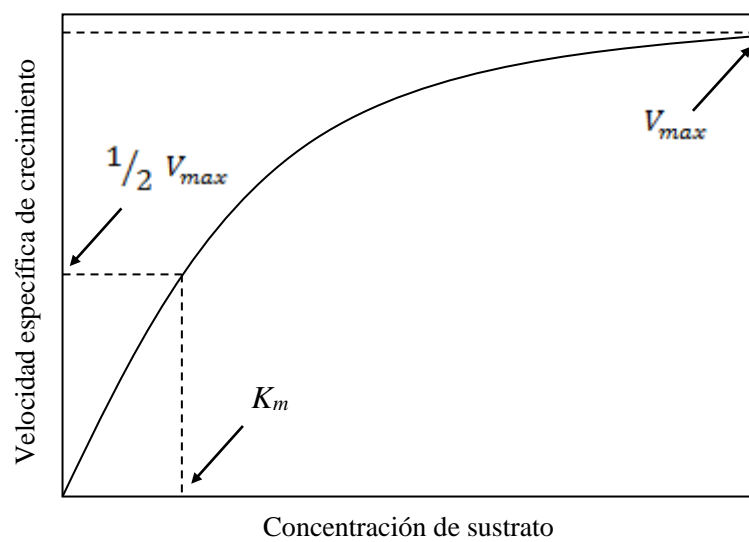


Figura 5. Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten
Adaptada de Wang y col., 1979.

La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB, por sus siglas en inglés) estableció una unidad estándar para medir la actividad de una enzima, la Unidad Internacional de enzima (U o IU) y la definió como la cantidad de enzima que convierte un micro mol de sustrato en producto en 1 minuto, bajo condiciones definidas de temperatura, pH y concentración de sustrato. Aunque esta es una unidad internacionalmente aceptada, muchos investigadores utilizan definiciones más convenientes para simplificar los cálculos (Segel, 1976).

Cuando se trabajan con protocolos de purificación de una enzima, la concentración de esta en extractos crudos se expresa como unidades/ml y siendo esta una proteína, durante las etapas de purificación, es común expresarla como actividad específica, donde las unidades de actividad de una enzima se dividen entre la cantidad total de proteína presente (unidades/mg de proteína). Este parámetro se incrementa a medida que se avanza en el proceso de purificación, permitiendo calcular el grado de purificación que va alcanzando la enzima (Palmer, 1991).

CAPITULO 3

METODOLOGÍA

3.1 Descripción general del trabajo

Se seleccionó una cepa con la capacidad de crecer en medio mínimo con metil paratión como única fuente de carbono a partir de un cultivo mixto previamente aislado. Se propagó la cepa en caldo nutritivo para aumentar la densidad celular, se recuperó el paquete celular y se utilizó éste como inóculo en los estudios de cinética de crecimiento. Se evaluaron actividad enzimática y proteína en el extracto libre de células obtenido mediante el rompimiento del paquete celular con una bomba de descompresión de nitrógeno.

Se llevaron a cabo estudios para determinar la cinética de crecimiento y producción de la enzima responsable de la hidrólisis de metil paratión. Se evaluaron el efecto de la temperatura, así como el de los iones Cu^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} sobre el crecimiento de la cepa, con el fin de determinar las mejores condiciones de producción de la enzima. En la figura 6 se muestra una descripción general de la cinética de crecimiento la bacteria productora de la enzima metil paratión hidrolasa, utilizada en el presente trabajo.

3.2 Materiales

3.2.1 Reactivos

Se utilizaron metil paratión estándar (*O,O*-dimetil-*O-p*-nitrofenil fosforotioato) con 91% de pureza, presentado como un compuesto al 1% en peso en base al material original, disuelto en benceno; metil paratión 720 (MP) grado técnico adquirido en Semillas del

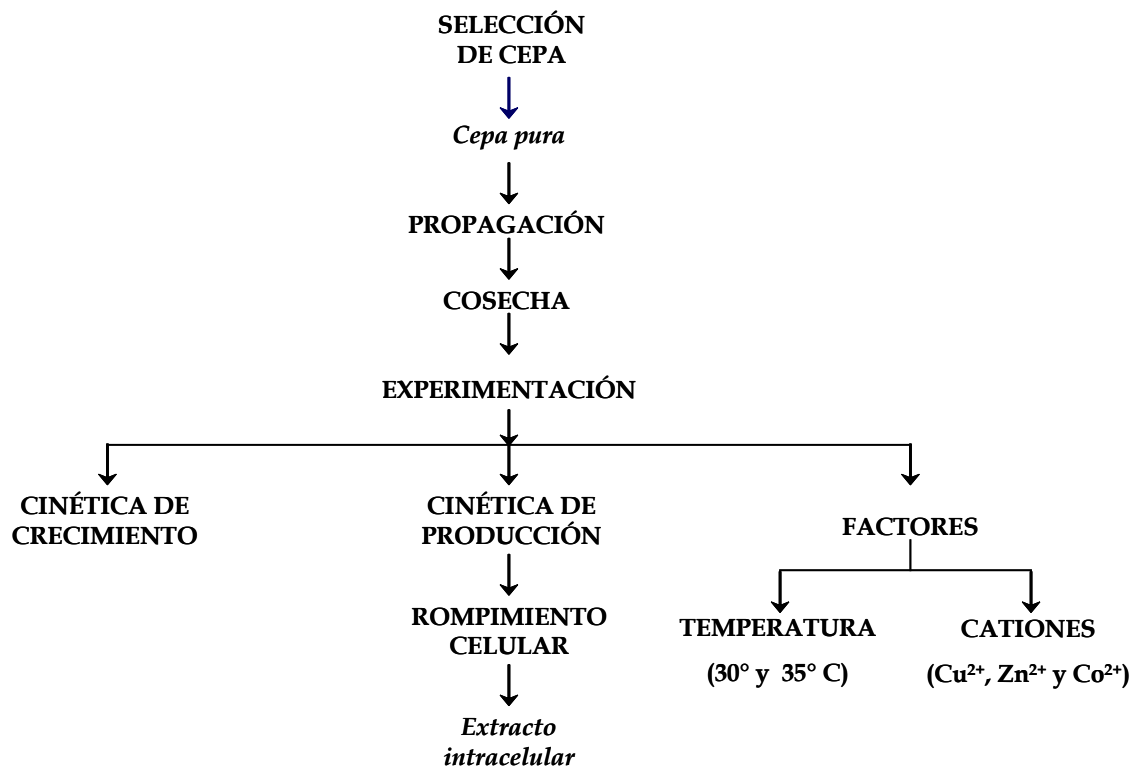


Figura 6. Diagrama de flujo de la descripción general del trabajo.

Pacífico, S.A.; nitrito de sodio, *p*-nitrofenol (PNF); agar así como los medios complejos para la propagación del cultivo fueron obtenidos de DIFCO.

3.2.2 Microorganismo

Se utilizó una cepa seleccionada a partir de un cultivo mixto aislado del Valle del Yaqui utilizando metil Paratión como única fuente de carbono, presumiblemente de los géneros *Pseudomonas* o *Flavobacterium*.

3.2.3 Selección de cepas

Se seleccionó y propagó la cepa que presentó mejor crecimiento a partir de 26 cepas previamente aisladas en medio de sales minerales (MSM) con metil paratión grado técnico como única fuente de carbono.

Mantenimiento de cepas. Las cepas se preservaron en tubo inclinado en medio de agar nutritivo así como en medio de agar-sales minerales con m-PAR las cuales se resembraron cada 6 meses y se conservaron a 4°C.

3.2.4 Medios de cultivo

Se preparó una solución conteniendo 10,000 ppm de metil paratión en acetona para utilizarse en la preparación de medio mínimo (MSM) y complejo (caldo nutritivo). Se preparó un medio MSM con la siguiente composición en g/L: K_2HPO_4 , 4.8; KH_2PO_4 , 1.2; NH_4Cl , 0.667; $CaCl_2$, 0.0188; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001. Se esterilizaron por autoclave a 121°C por 15 min excepto las sales que precipitan como fosfatos insolubles ($CaCl_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$) las cuales se esterilizaron por filtración en membranas de 0.2 μm . Para los medios sólidos se utilizó agar a una concentración de 15 g/L.

3.3 Propagación

Los cultivos se propagaron en 25 mL de MSM con 200 ppm de m-PAR como única fuente de carbono utilizando como inóculo una asada de la cepa original y se incubaron durante 72 h a 30°C y 150 rpm en una incubadora agitada (New Brunswick, Scientific CO., INC, serie 25). Se resembró en 50mL de caldo nutritivo para aumentar la densidad celular y se incubó por 24 h a 30°C y 150 rpm. Se cosechó el paquete celular centrifugando a 11400 x g por 15min en una centrífuga refrigerada (Baxter Scientific Products, modelo 17 R). Al sobrenadante considerado como extracto enzimático extracelular se le determinó actividad enzimática.

3.3.1 Preparación del inóculo

El paquete celular cosechado se utilizó para preparar el inóculo usado en los estudios, dispersándolo en 200 mL de caldo nutritivo el cual se incubó durante 8 h a 30°C y 150 rpm hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento; se registró la densidad óptica del cultivo a 600 nm y en seguida se recuperó el paquete celular centrifugando a 11400 x g por 15 min y se resuspendió en 10 mL de caldo nutritivo estéril para su dosificación en las series de matraces utilizados en las corridas experimentales.

3.4 Determinación del crecimiento

Para determinar la densidad celular, se ajustó el pH del cultivo a 5 y se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21, Milton Roy) previamente calibrado con un blanco del medio utilizado a pH de 5.

3.5 Rompimiento del paquete celular

Para la determinación de actividad en extracto crudo intracelular las células lavadas se resuspendieron en buffer Tris-HCl pH 8.5 y se sometieron a un rompimiento celular

utilizando una bomba de rompimiento celular por descompresión con nitrógeno (Parr Ins. Co., modelo 4639) a una temperatura de 0 °C, para lograrlo se utilizó un baño de hielo durante todo el proceso de ruptura (Figura 7). El rompimiento se realizó de la siguiente manera: primero se preparó una suspensión homogénea, con una relación de 10 mL de buffer Tris-HCl 0.25 M, pH 8.5, por gramo de células húmedas. Posteriormente la suspensión celular fue colocada directamente en el cilindro de la bomba, después de llevar a cabo el sellado y la presurización de la misma hasta obtener una presión de 1000 psi durante 5 minutos, para de esta manera permitir que el nitrógeno se disolviera y llegara al equilibrio en el interior de las células. Finalmente se realizó el rompimiento y colección de la muestra, ya que el proceso de rompimiento no ocurre mientras las células se encuentran presurizadas con el nitrógeno; en lugar de ello, ocurre en la válvula de descarga en el momento de efectuarse la descompresión mientras la muestra pasa de la cámara de alta presión en el interior de la bomba a la presión atmosférica del ambiente exterior. Para la colección de la muestra, se colocó la manguera de descarga dentro de un matraz de 100 mL tapado con papel aluminio, para evitar fugas de la muestra rota. Las suspensiones celulares fueron sometidas a 3 ciclos de rompimiento, para obtener la mayor cantidad de enzima libre.

3.6 Clarificación del extracto intracelular

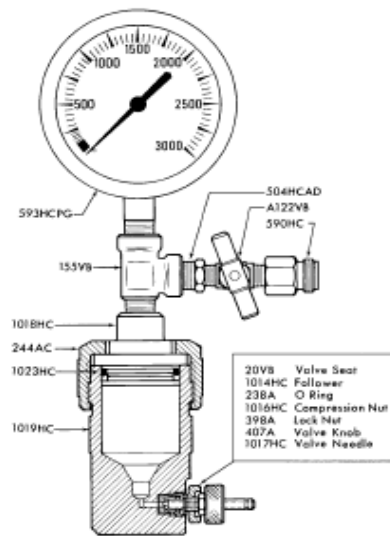
La suspensión resultante del rompimiento (extracto intracelular) se centrifugó a 11 400 x g por 40 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada, para eliminación de restos celulares y recuperación de extracto intracelular clarificado.

3.7 Determinación de actividad enzimática

La actividad de la enzima metil paratión hidrolasa se determinó midiendo el cambio de absorbancia a 410 nm producido por la formación de paranitrofenol observado al exponer los extractos extra e intracelular a la presencia de 100 ppm de metil paratión utilizando un buffer Tris-HCl 0.25 M, pH 8.5. Las mediciones se llevaron a cabo en un



a)



b)

Figura 7. Sistema de rompimiento celular

a) Vista exterior de una bomba de rompimiento Parr 4639

b) Esquema interno de la bomba de rompimiento Parr 4639

espectrofotómetro (Spectronic 21, Milton Roy). Una unidad de actividad metil paratión hidrolasa es definida como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar un μmol de metil paratión en 1 min a 30 °C.

3.8 Determinación de proteína

La proteína total se determinó de acuerdo al método de Bradford, usando suero de albúmina de bovino (BSA, por sus siglas en inglés) como estándar de calibración. Para la determinación se preparó una dilución de 200 μL de muestra en 800 μL de agua desionizada, para de allí tomar 800 μL y mezclarlos con 2 mL de agua desionizada y 200 μL de una solución de azul de Coomassie. La mezcla se incubó durante 20 minutos a 30 °C en un baño fisiológico. Se midió la absorbancia a 595 nm del complejo colorante-proteína. El contenido de proteína se determinó en el extracto libre de células (Bradford, 1976).

3.9 Determinación de peso seco

La determinación de peso seco se realizó llevando a peso constante 3 cajas Petri con filtro, para lo cual, se pusieron en un horno estacionario durante 12 horas; después se pasaron a un desecador para dejar estabilizar la temperatura y se registró el peso una vez que este dejó de variar.

A partir de un cultivo del microorganismo en fase logarítmica se preparó una suspensión la cual se centrifugó para recuperar el paquete celular. Este se resuspendió en 5 mL de solución salina al 0.85 % formando una suspensión muy espesa de microorganismos y se agitó en un vortex de forma intermitente para mantener una concentración homogénea. Después se filtró al vacío 1 mL de la suspensión homogénea y se lavó con 2 mL de solución salina al 0.85 % (todo se hizo por triplicado). Una vez preparadas las muestras se secaron en un horno al vacío (12 in Hg) y a 63° C durante un tiempo de 4 horas, después del cual se sacaron del horno y se pusieron en un desecador para dejar

estabilizar la temperatura; una vez que el peso dejó de variar este se registró y se tomó como base de cálculo.

Con esta suspensión se hicieron una serie de diluciones, generando 8 diferentes concentraciones celulares con densidades entre 0.1 y 1.5 unidades de absorbancia a 600 nm, los cuales se graficaron contra peso seco calculado, para generar una línea recta (Demain y col., 1986).

3.10 Cinética de crecimiento

Los experimentos de crecimiento se llevaron a cabo en una serie de 16 matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 200 mL de medio de cultivo, para generar los puntos de muestreo con respecto al tiempo. Se esterilizaron a 121° C por 15 min. Se dejaron enfriar antes de ser inoculados con un precultivo de concentración celular conocida, dosificándolo para obtener una absorbancia inicial a 600nm alrededor de 0.05, teniendo cuidado de agitar en un vortex de modo intermitente para mantener una concentración homogénea. Se registró la absorbancia inicial a 600nm de cada una de las muestras y se incubaron a 30° C y 150 rpm en una incubadora agitada. El muestreo se llevó a cabo por sacrificio de matraces y los tiempos de muestreo fueron cada 4 horas en la primera fase de crecimiento, espaciándolos a cada 12 horas hasta el final del experimento. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado en cada punto de muestreo.

3.10.1 Muestreo

Al momento de tomar la muestra el total del cultivo se agitó con un magneto durante 5 minutos para homogenizarla, se le midió la absorbancia final a 600 nm y se recuperó el paquete celular. Al extracto extracelular (sobrenadante) de la recuperación del paquete celular se le incrementó el pH a 8.5 agregándole 4 gotas de NaOH 1N y se midió la concentración de PNF a 410 nm. El paquete celular se sometió a rompimiento para determinar actividad enzimática al extracto intracelular liberado.

Experimentos similares se llevaron a cabo para el estudio de los factores que afectan la producción de enzima metil paratión hidrolasa producida por el organismo, tales como la temperatura y la presencia de iones en el medio. La influencia de la temperatura se evaluó a 30° y 35° C. La presencia de iones Cu^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} en el medio se evaluó llevando a cabo experimentos en cultivos con 180 mL de caldo nutritivo estéril y 20 mL del metal [1mM] los cuales se esterilizaron por filtración en membranas de 0.2 μm . A las muestras se les midió la densidad óptica usando un blanco de 3 mL de caldo nutritivo conteniendo la misma concentración del metal correspondiente.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección y propagación de cepas productoras

A partir de 26 cepas capaces de crecer en medio mínimo con metil paratión, se seleccionó para trabajar una cepa (denominada cepa N° 6) por presentar aparentemente, una mayor velocidad de crecimiento y densidad celular. Aun cuando no se detectó actividad enzimática en el medio libre de células, esta cepa pudo utilizar para crecer metil paratión como única fuente de carbono, lográndose detectar PNF en el medio de cultivo, el cual fue tomando una coloración amarilla característica de este compuesto (Figura 8).

Se evaluó la capacidad de esta cepa para hidrolizar metil paratión mediante un ensayo de actividad enzimática utilizando la curva estándar de PNF que se muestra en la figura 9. El resultado positivo del ensayo de actividad en extractos celulares, demuestra la presencia intracelular de la enzima al cultivar la bacteria, tanto en medio mínimo con metil paratión como en caldo nutritivo. Durante el presente trabajo se propagó esta cepa en caldo nutritivo por las ventajas que representa al obtener mejor rendimiento celular y velocidad de crecimiento.

4.2 Rompimiento celular

No se detectó actividad enzimática en el medio de cultivo por lo que se procedió a la utilización de un método de rompimiento celular para la recuperación de la enzima en el extracto intracelular.

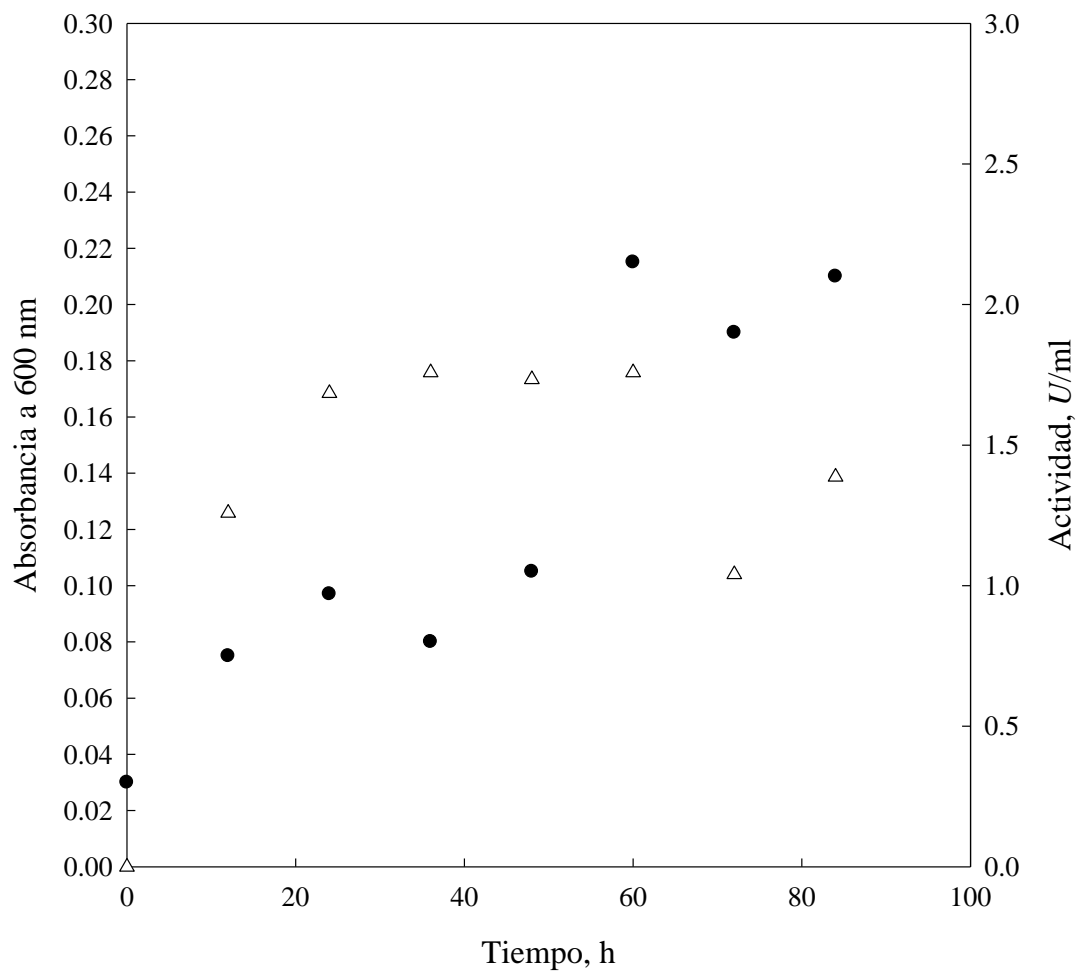


Figura 8. Crecimiento de la cepa seleccionada en metil paratión.

- Crecimiento celular
- △ Producción de PNF

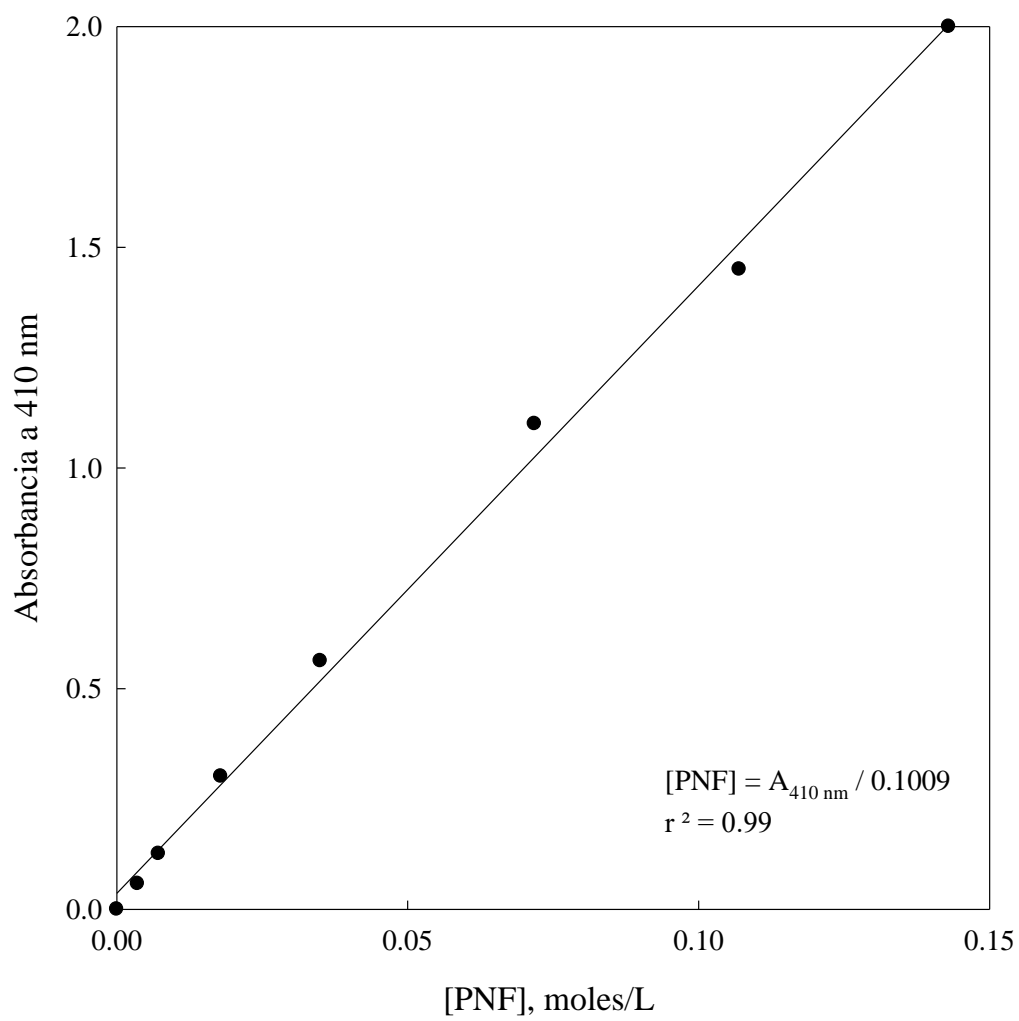


Figura 9. Curva estándar de PNF.

Se estandarizó el método de descompresión con nitrógeno para romper el paquete celular y se determinó experimentalmente el número de 3 ciclos a utilizar durante el rompimiento. Se midió el contenido de proteína en el extracto como criterio para determinar el grado de rompimiento. Los resultados se aprecian en la tabla 3, donde se puede observar que aplicando una presión de 1000 psi se puede lograr el rompimiento de las paredes celulares de la bacteria. Durante esta operación se trató de preservar la actividad de la enzima manejando la suspensión celular a 0° C entre cada ciclo con lo cual se pudo controlar que la temperatura no se elevara por arriba de 16 ° C durante el rompimiento.

Este método de rompimiento fue seleccionado porque, aunque es un método de descompresión explosiva, está considerado como un método no tan agresivo, lo cual es deseable cuando se trata de aislar enzimas cuya actividad se desea preservar. Durante la descompresión del nitrógeno se da una expansión adiabática que enfría la muestra y siendo el nitrógeno un gas no oxidante la protege evitando la oxidación de componentes celulares lábiles. Aunque este método es más utilizado para romper células animales, ha sido utilizado con buenos resultados para romper algunos tipos de bacterias Gram (-) con paredes celulares más débiles como las de la cepa utilizada.

En este caso se logró la mayor liberación de proteína en tres ciclos sucesivos, estabilizándose ésta en ciclos posteriores, sin incremento sustancial de la temperatura. Comparado con algunos valores para rompimientos mecánicos, éstos resultados son adecuados, considerando que se han reportado para el rompimiento de *E. coli*, rupturas del 75 % en un sólo ciclo y de más del 90 % en dos ciclos sucesivos con el método de descompresión (Fraser, 1951).

4.3 Cinética de crecimiento

El crecimiento fue monitoreado espectrofotométricamente midiendo la absorbancia del cultivo a 600 nm ya que este es un método rápido y no destructivo. Sin embargo, para la

Tabla 3. Rompimiento celular utilizando una bomba de descompresión.

Ciclo	Presión (psi)	Proteína total ($\mu\text{g/ml}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	
			T _{inicial}	T _{final}
1	1000	32.25	0	15
2	1000	36.34	0	14
3	1000	38.39	0	15
4	1000	37.61	0	16

cuantificación del crecimiento se hizo una correlación entre los valores de absorbancia a 600 nm y peso seco como se muestra en la figura 10, tomando en cuenta que la mayoría de las bacterias tienen casi la misma absorbancia por unidad de concentración (en base a peso seco) independientemente del tamaño celular.

La cinética de crecimiento de la cepa estudiada creciendo en caldo nutritivo y en MSM con mPAR se aprecia en las figuras 11 y 12 respectivamente. En el primer caso se puede observar que la bacteria tuvo un crecimiento 5 veces mayor que cuando creció en MSM con mPAR, mostrando un crecimiento logarítmico sostenido, sin fase lag que alcanzó su máximo a las 36 horas, para declinar después de las 40 horas. Por el contrario, el crecimiento en MSM con mPAR fue más lento y tuvo un máximo hasta las 60 horas, para después declinar. Esto se refleja en los valores de velocidad específica de crecimiento del organismo los cuales fueron de 0.048 h^{-1} (Figura 13) para un tiempo de duplicación de 14.4 horas en caldo nutritivo y 0.019 h^{-1} con un tiempo de duplicación de 36 horas en MSM con mPAR (Tabla 4).

La actividad enzimática se detectó desde el inicio del crecimiento cuando el organismo se cultivó en caldo nutritivo, alcanzando en este caso, un máximo de 18.9 U/mg biomasa a las 24 horas y declinando a la par que el crecimiento (Tabla 5). No obstante el crecimiento menor en MSM con mPAR, la actividad enzimática siguió un patrón también ligado al crecimiento con un máximo de 180.71 U/mg biomasa. La cepa seleccionada produjo la enzima responsable de la hidrólisis de metil paratión al parecer de manera constitutiva, tanto en medio mínimo con metil paratión como fuente de carbono así como en caldo nutritivo libre de él. En trabajos previos se ha reportado la producción constitutiva de paratión hidrolasa tales como lo señalado por Mulbry y Karns, (1989) en algunos cultivos de *Flavobacterium* y *Pseudomonas diminuta* así como lo reportado para *Flavobacterium* (Sethunathan y Yoshida, 1973) y *Pseudomonas alcaligenes* (Munnecke y Fischer, 1979).

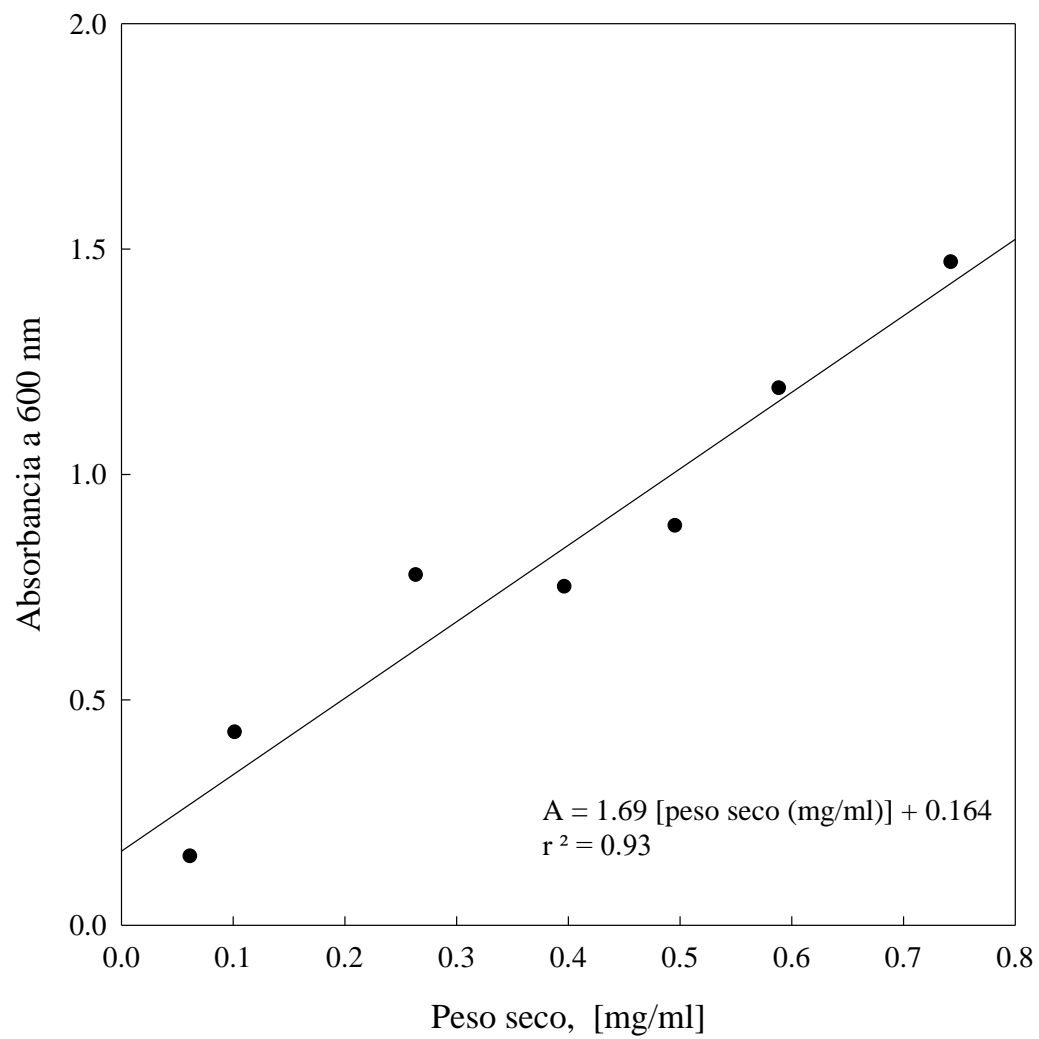


Figura 10. Correlación de absorbancia vs. peso seco de células.

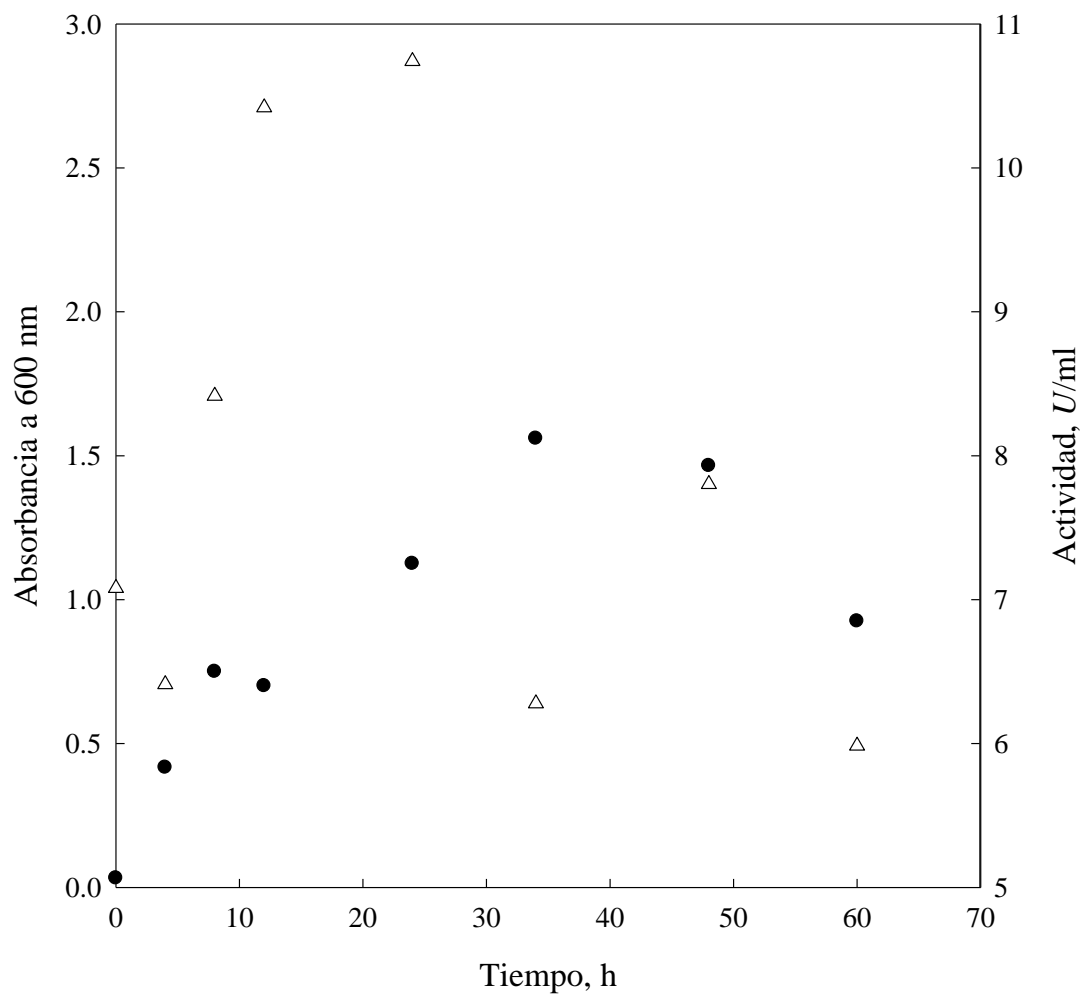


Figura 11. Cinética de crecimiento y actividad enzimática de mPAR hidrolasa en caldo nutritivo a 30° C.

- Crecimiento celular
- △ Actividad enzimática

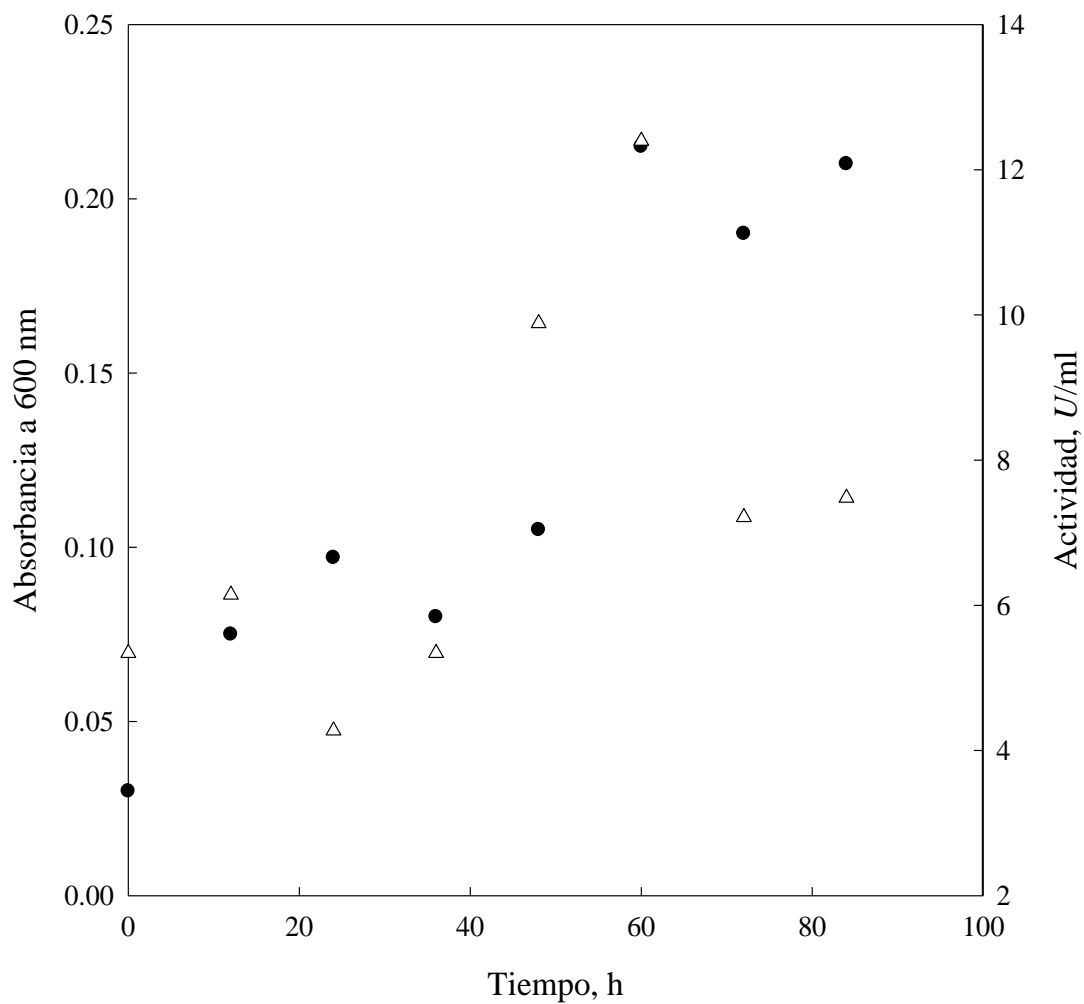


Figura 12. Cinética de crecimiento y actividad de mPAR hidrolasa en medio de sales minerales con 200 ppm de mPAR.

- Crecimiento celular
- △ Actividad enzimática

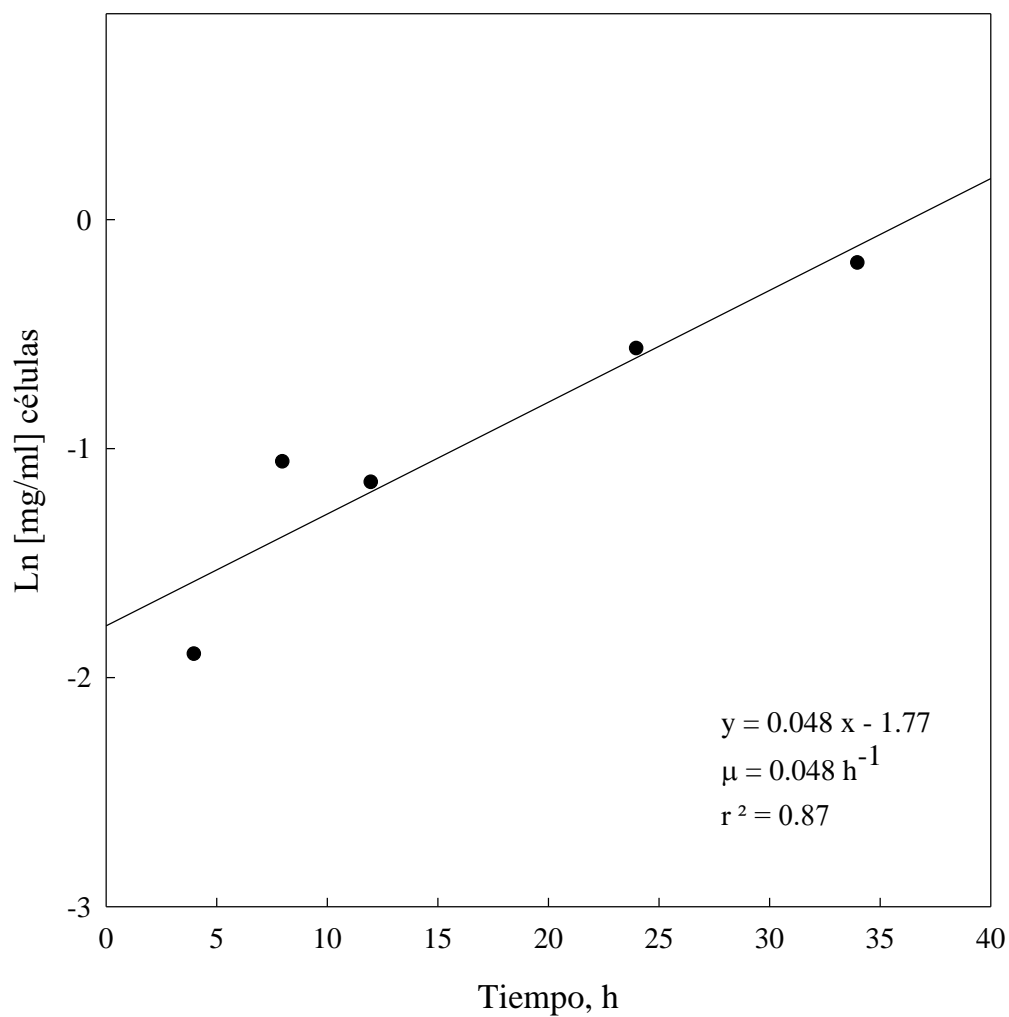


Figura 13. Regresión lineal de la fase log de la curva de crecimiento en caldo nutritivo.

Tabla 4. Parámetros de crecimiento de la cepa seleccionada.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO	TEMPERATURA (°C)	μ (h⁻¹)	t_d (h)
CN	30	0.048	14.4
CN	35	0.21	3.3
MSM + mPAR [200 ppm]	30	0.019	36
CN + Zn ²⁺ [1mM]	30	0.12	5.7
CN + Cu ²⁺ [1mM]	30	0.014	48

Tabla 5. Producción de enzima.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO	TEMPERATURA (°C)	$\frac{U}{\text{mg biomasa}}$
CN	30	18.90
CN	35	12.34
MSM + mPAR [200 ppm]	30	180.71

El patrón de crecimiento exhibido por esta bacteria es comparable al de otros organismos degradadores. Pakala y col., (2007) reportaron que *Serratia* sp. alcanzó su máxima densidad celular a las 50 horas cuando creció en 160 ppm de metil paratión; ellos encontraron localizada en la membrana celular el 65% de la actividad de la enzima responsable de la hidrólisis de metil paratión. También Walker y Keasling (2002) reportaron un crecimiento similar después de una fase lag de 15 horas para *P. putida* KT2442 recombinante creciendo en 160 ppm de paratión; aun cuando lograron incrementar la actividad de la enzima para hidrolizar organofosforados, ésta todavía estuvo por debajo de los niveles reportados para la cepa nativa. Serdar y col., (1982) reportaron el crecimiento de *P. diminuta* también con un perfil de crecimiento comparable mostrando un máximo a las 36 horas de cultivo; en este caso reportaron hasta 1.2 U/mL de actividad de paratión hidrolasa cuya producción estuvo ligada al crecimiento. Payne y col., (1990), trabajando con *Streptomyces lividans* recombinante lograron la expresión de la enzima hidrolasa de organofosforados (OPH, de sus siglas en inglés) en medio complejo, donde el organismo alcanzó un crecimiento máximo de 6 g/L con una producción ligada al crecimiento y excreción de la enzima al medio.

En la literatura se han reportado pocos valores de velocidad específica de crecimiento (μ) para organismos degradadores de organofosforados entre los que podemos citar a Munnecke y Fischer (1979), quienes reportaron una μ de 0.31 h^{-1} para *P. alcaligenes* creciendo en extracto de carne y produciendo 3.85 U/mL de la enzima paratión hidrolasa. Barik y col., (1984) reportaron una μ de 0.04 h^{-1} para un cultivo mixto creciendo en malatión como única fuente de carbono, señalando que al parecer la velocidad de crecimiento pudiera ser dependiente de la velocidad de solubilización del plaguicida. Recientemente, Gilbert y col., (2003) reportaron una μ de 0.19 h^{-1} para un consorcio con capacidad de biodegradar paratión en caldo Luria-Bertani (LB) del cual, *E. coli* SD2 fue la responsable del primer paso de degradación de paratión a PNF; estos investigadores atribuyeron estos bajos valores de μ a un posible efecto inhibitorio que pudiera ejercer el PNF al ir liberándose y aumentando su concentración en el medio.

4.4 Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción de la enzima se muestran en la figura 14 donde la cepa seleccionada fue crecida en caldo nutritivo a 30° y 35° C. La bacteria presentó un patrón de crecimiento similar en ambas temperaturas alcanzando un máximo a las 34 y 12 horas, con velocidades específicas de 0.048 h⁻¹ y 0.21 h⁻¹ y tiempos de doblado de 14.4 horas y 3.3 horas, respectivamente (Tabla 4); en este caso, el organismo creció 4.4 veces más rápido a 35° C que a 30° C .

Como era de esperarse, la máxima actividad enzimática a 35° C coincidió con su crecimiento máximo produciendo 12.34 U/mg biomasa (Tabla 5) y se alcanzó más rápido que a 30° C; esto como un reflejo de la influencia que tiene la temperatura sobre la velocidad de reacción de las enzimas; sin embargo, la estabilidad de la enzima se vio afectada por la temperatura, ya que después de las 16 horas la actividad empezó a perderse. En cuanto a la actividad a 30° C, esta fue aumentando a menor velocidad y de manera sostenida a través del crecimiento, alcanzando una producción máxima de 18.9 U/mg biomasa (Tabla 5) a las 34 horas, cuando el crecimiento entró en su fase estacionaria; lo anterior refleja una estabilidad mayor de la enzima a esta temperatura. Karpousas y Walker, (2000) en un estudio de la capacidad de *Pseudomonas putida* para degradar ethoprofos mostraron la misma tendencia de incremento en la degradación conforme se incrementó la temperatura hasta 37° C pero a 42° C la degradación disminuyó significativamente; estos resultados son consistentes con las características reportadas para especies de *Pseudomonas* y en especial para *P. putida* quien es incapaz de crecer más allá de los 42° C. Munnecke (1976), también reportó un efecto similar de la temperatura sobre la velocidad de hidrólisis enzimática de paratión de un cultivo mixto bacteriano.

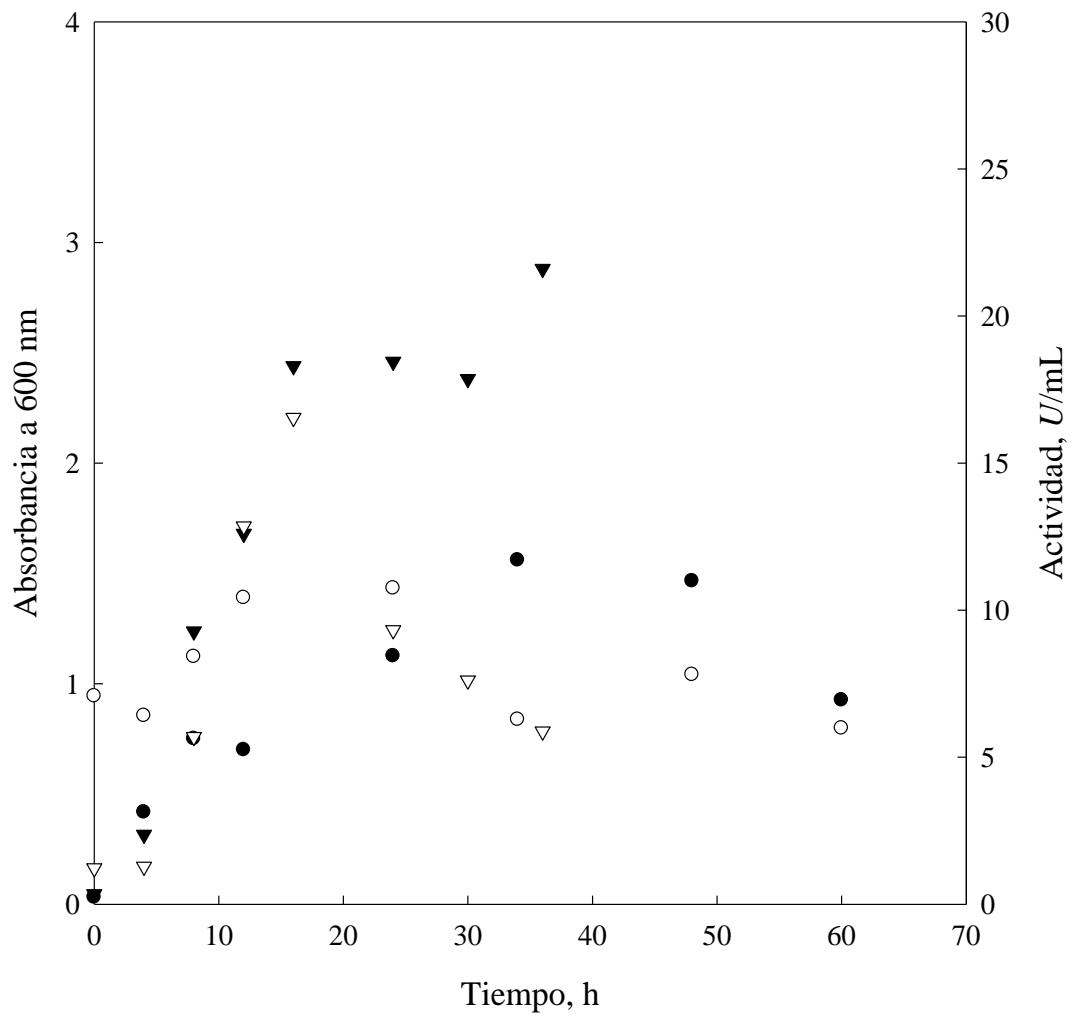


Figura 14. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y actividad de mPAR hidrolasa.

- Crecimiento a 30°C; ○ Actividad, 30°C
- ▼ Crecimiento a 35°C; ▽ Actividad, 35°C

4.5 Efecto de los cationes sobre el crecimiento y producción de la enzima

En la literatura se ha reportado que este tipo de enzimas es influenciado en su producción y actividad por la presencia de varios cationes entre los cuales podemos destacar a Cu^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} . Al parecer, el efecto de los cationes sobre el crecimiento y producción de la enzima responsable de la degradación de plaguicidas organofosforados es específica de cada tipo de organismo como se discute a continuación.

4.5.1 Efecto del ión Cu^{2+}

Cuando la bacteria creció en caldo nutritivo al cual se adicionó ión Cu^{2+} 1 mM, ésta inició un crecimiento exponencial después de una fase lag de 36 horas con una velocidad específica de 0.014 h^{-1} que dio un tiempo de duplicación de 48 horas. Durante el crecimiento no se apreció actividad enzimática significativa de la enzima en el medio de cultivo (Figura 15). Existen pocos datos del efecto de este catión en la degradación de metil paratión y a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, Chaudhry y col., (1988), reportaron como diversos cationes, entre los cuales podemos citar Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Mg^{2+} y Zn^{2+} , no mostraron ningún efecto sobre la actividad enzimática de la enzima degradadora de metil paratión de *Pseudomonas* sp.

En otros estudios sobre la degradación de paratión, Tchelet y col., (1993), observaron el efecto de la adición de ión Cu^{2+} al medio, en *Pseudomonas* sp. y *Xanthomonas* sp. La presencia de este catión incrementó la fase lag hasta 32 horas con respecto al crecimiento en ausencia o bajas concentraciones de Cu^{2+} las cuales mostraron fases lag menores. Los tiempos de generación de esta bacteria creciendo en presencia y ausencia de Cu^{2+} fueron 6.2 y 3.2 horas, respectivamente; en este caso no se observó un efecto significativo en la velocidad de degradación sino simplemente hubo un retardo en el inicio de la misma en presencia del catión. En el caso de *Xanthomonas* sp., con excepción de una disminución en la fase lag de crecimiento al añadir el catión, no se observó un efecto significativo en la velocidad de crecimiento de la bacteria; sin

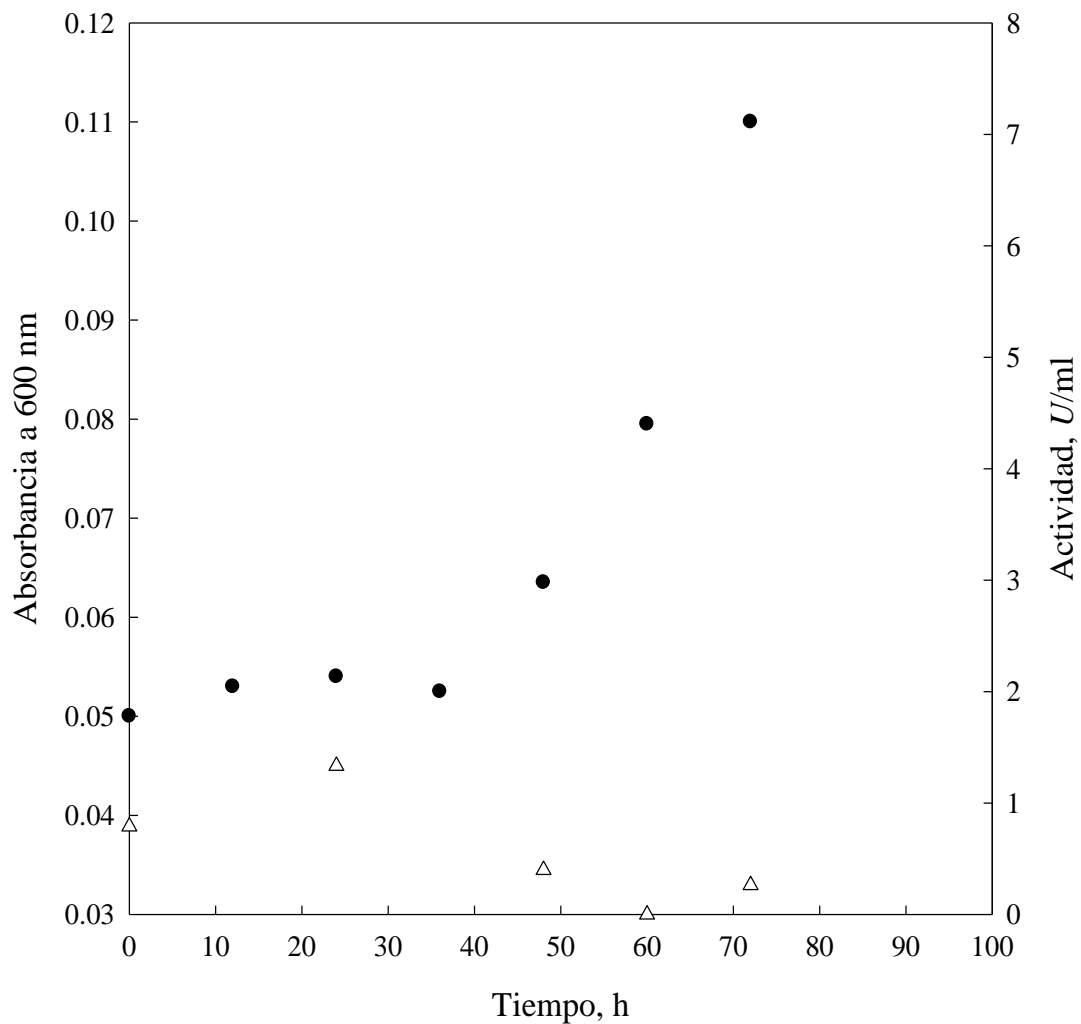


Figura 15. Cinética de crecimiento y producción de enzima mPAR hidrolasa en presencia de Cu^{2+} .

- Crecimiento celular
- △ Actividad enzimática

embargo si hubo un efecto en la velocidad de degradación, la cual fue mayor en presencia del catión.

4.5.2 Efecto del ión Zn^{2+}

Una concentración 1 mM de ión Zn^{2+} tuvo un efecto inhibitorio del crecimiento del microorganismo el cual después de una fase lag de 24 horas (Figura 16), creció 3.7 veces menos que en el medio sin el catión, aun cuando su velocidad específica fue mayor (0.12 h^{-1}) con tiempo de duplicación de 5.7 horas como se observa en la tabla 4.

En la figura 16 también se puede observar que, conforme aumenta el crecimiento la actividad enzimática disminuye drásticamente, indicando un fuerte efecto inhibitorio de este catión por la enzima degradadora. Este mismo efecto fue observado por Tchelet y col., (1993), en *Xanthomonas* sp. cuya actividad degradadora de paratión fue inhibida por este catión. Omburo y col., (1992), por el contrario encontraron un incremento en la actividad enzimática al suplementar el medio de crecimiento de *E. coli* recombinante con algunos cationes divalentes entre ellos Zn^{2+} , con respecto al medio sin suplementar; este efecto fue comprobado cuando al incubar la enzima con EDTA, esta perdió su actividad. Sin embargo, Chaudhry y col., (1988) reportaron que no hay efecto de este catión sobre la actividad de la enzima degradadora de metil paratión.

4.5.3 Efecto del ión Co^{2+}

El ión Co^{2+} 1 mM tuvo un efecto inhibitorio drástico sobre el crecimiento de la cepa seleccionada y por tanto no pudo determinarse actividad enzimática alguna; sin embargo, al crecerla en caldo nutritivo adicionado con una menor concentración del catión (0.5 mM), el crecimiento de éste fue muy similar como se aprecia en la figura 17, mostrando que el efecto inhibitorio del crecimiento no fue por incremento de la concentración del catión. Estos resultados son contrarios a los reportados en la literatura consultada, donde se muestra el efecto estimulador del catión sobre la actividad

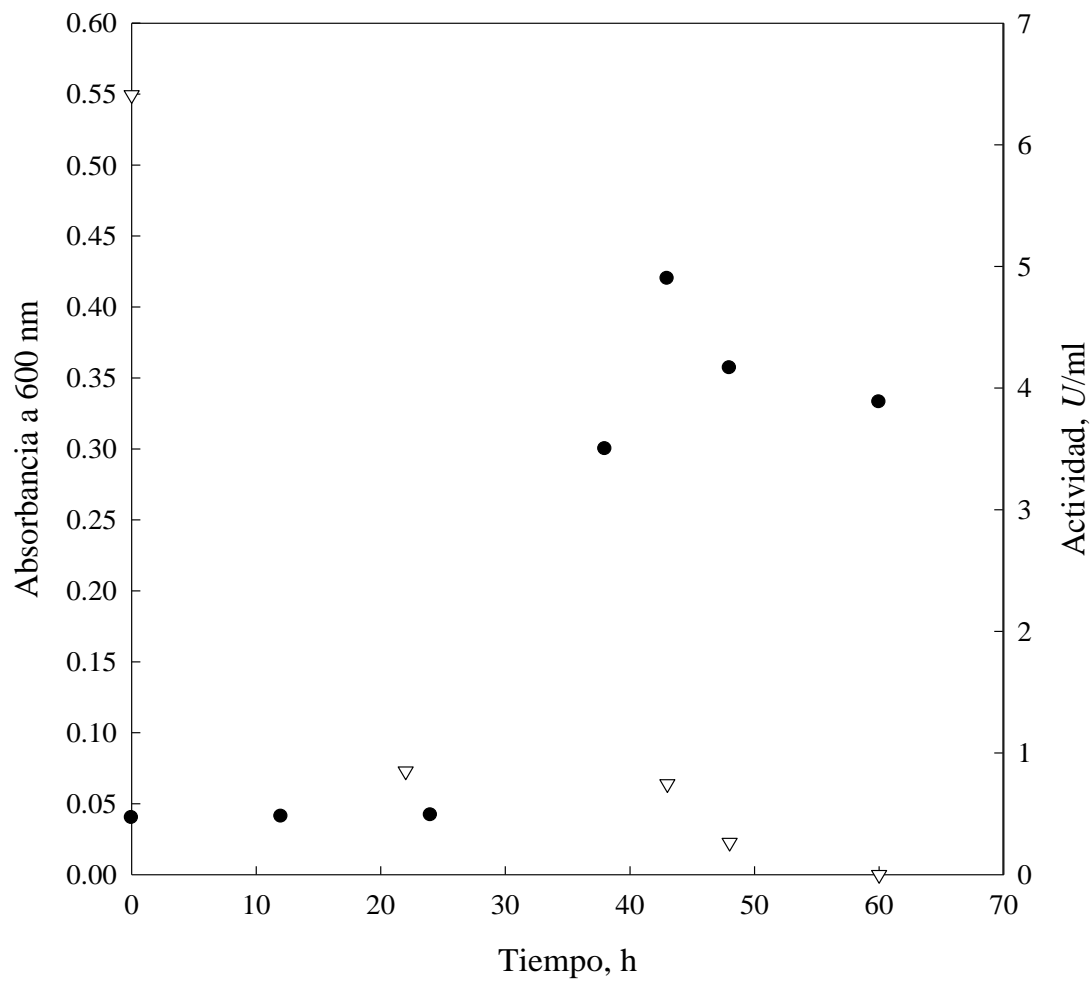


Figura 16. Cinética de crecimiento y producción de enzima mPAR hidrolasa en presencia de Zn^{2+} .

- Crecimiento celular
- ▽ Actividad enzimática

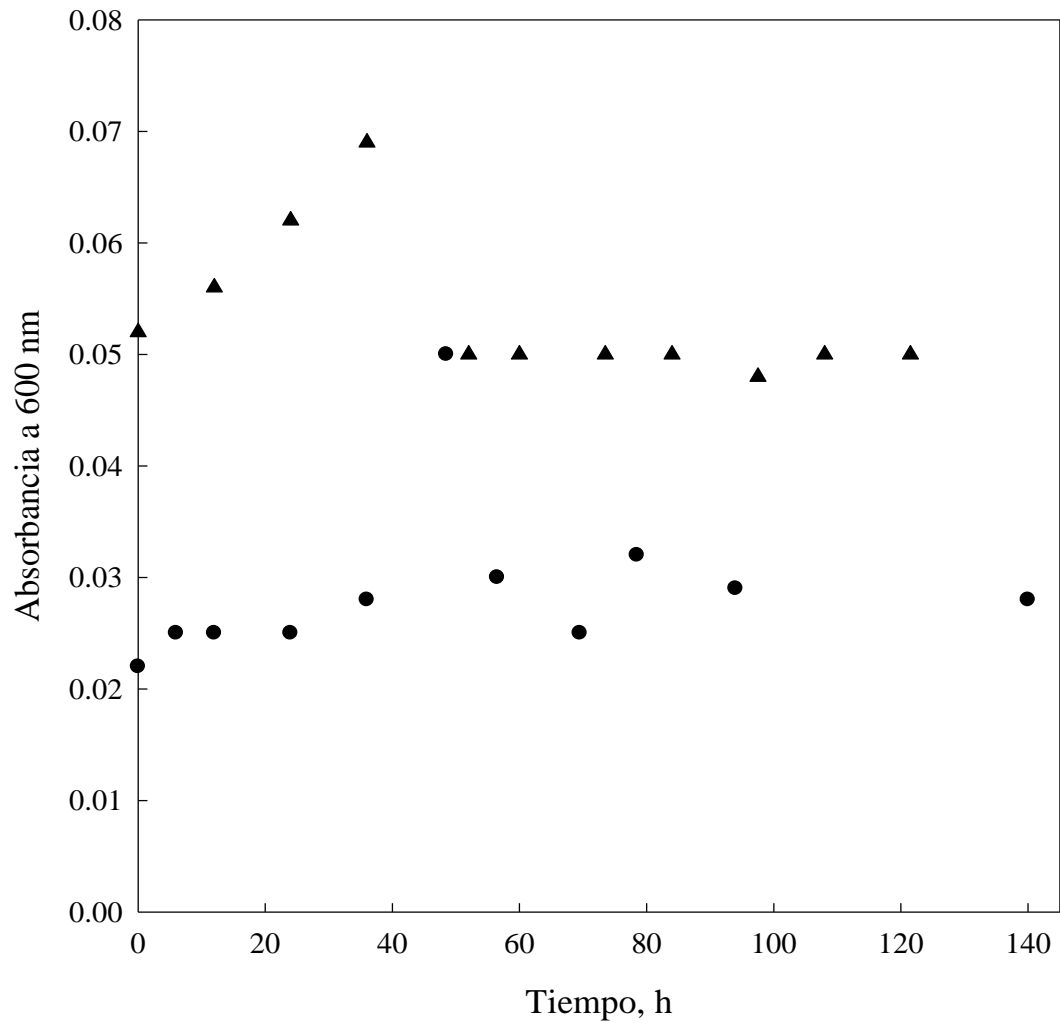


Figura 17. Comparación de crecimiento con Co^{2+} a diferentes concentraciones.

- Crecimiento celular [1 mM]
- ▲ Crecimiento celular [0.5 mM]

enzimática sin afectar el crecimiento de la bacteria degradadora de paratión (Omburo y col., 1992) y de un cultivo mixto con la misma capacidad como es reportado por Munnecke, (1976). Por otro lado, Chaudhry y col., (1988) reportaron como éste y otros cationes no tienen efecto sobre la actividad.

4.6 Rendimiento del cultivo

La capacidad del organismo para utilizar los nutrientes del medio de cultivo para producir biomasa se muestran como rendimientos (Y) en la tabla 6. Se puede apreciar que este tuvo un mejor rendimiento (34.3 %) cuando utilizó mPAR como fuente de carbono que cuando creció en caldo nutritivo a 30° C donde tuvo un rendimiento de tan solo 10.25 %. Sin embargo, el cultivo en caldo nutritivo se desarrolló con una velocidad específica de crecimiento 0.048 h⁻¹ comparada con 0.019 h⁻¹ en mPAR. A su vez, se logró un mejor rendimiento en caldo nutritivo a 35° C (16.75) que a 30° C, y cuando el medio se adicionó con Zn²⁺ el rendimiento bajó hasta 1.87 %.

Tabla 6. Rendimientos del cultivo.

CONDICIONES DE CRECIMIENTO	TEMPERATURA (°C)	Y_{CN}^1 (%)	Y_{mPAR}^2 (%)
CN	30	10.25	-
CN	35	16.75	-
CN + Zn ²⁺ [1mM]	30	1.87	-
MSM + mPAR [200 ppm]	30	-	34.3

1) mg biomasa/mg de nutrientes

2) mg biomasa/mg de mPAR

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. La cepa creció en mPAR como única fuente de carbono así como en caldo nutritivo, produciendo en ambos medios la enzima degradadora de metilparatión, al parecer de manera constitutiva.
2. El organismo creció en caldo nutritivo con una velocidad específica de crecimiento de 0.048 h^{-1} con un tiempo de duplicación de 14.4 horas.
3. El organismo cuando se cultivó en MSM con mPAR tuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.019 h^{-1} con un tiempo de duplicación de 36 horas.
4. Cuando el organismo creció en mPAR tuvo una mejor producción de enzima del orden de 180.71 U/mg de biomasa que cuando se cultivó en caldo nutritivo donde la producción fue de 18.9 U/mg de biomasa.
5. El aumento de la temperatura de 30° C a 35° C afectó el crecimiento incrementando la velocidad específica de 0.048 h^{-1} a 0.21 h^{-1} , cuando el organismo se cultivó en caldo nutritivo.
6. Al aumentar la temperatura se incrementó la actividad enzimática, sin embargo la estabilidad de la enzima fue afectada.
7. Los cationes Cu^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} tuvieron un efecto inhibitorio tanto en el crecimiento como en la actividad enzimática, cuando el organismo se cultivó en caldo nutritivo.
8. La capacidad del organismo para utilizar los nutrientes fue mejor cuando éste creció en mPAR donde tuvo un rendimiento de 34.3% que cuando lo hizo en caldo nutritivo donde tuvo un rendimiento de 10.25% , pero creció a menor velocidad.

5.2 Recomendaciones

1. Se recomienda continuar los estudios con el propósito de optimizar la producción de la enzima.
2. Se recomienda realizar la identificación de la cepa seleccionada.

BIBLIOGRAFÍA

- Adhya, T.K., Sudhakar-Barik y Sethunathan, N. (1981). Hydrolysis of Selected Organophosphorus insecticides by Two Bacteria Isolated from Flooded Soil. *Journal of Applied Bacteriology*, 50: 169.
- Albert, L.A. (2004). Panorama de los Plaguicidas en México. *Revista de Toxicología en Línea*, p. 1-17.
- Alexander, M. (1994). *Biodegradation and Bioremediation*. 1ra ed. Academic Press, Inc., San Diego, Ca., USA.
- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation*. 2da ed. Academic Press. Inc. San Diego, Ca., USA.
- Ang, E.L., Zhao, H. y Obbard, O.P. (2005). Recent advances in the Bioremediation of Persistent Organic Pollutants via Biomolecular Engineering. *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 487–496.
- Attaway, H., Nelson J.O., Baya A., Voll M.J., White W.E., D. Grimes J. y Colwell R.R. (1987). Bacterial Detoxification of Isopropyl Fluorophosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(7): 1685-1689.
- Barik, S., Munnecke, D.M. y Fletcher, J.S. (1984). Bacterial Degradation of Three Dithioate Pesticides. *Agricultural Wastes*, 10: 81-94.
- Bavcon, K.M., Franko, M. y Trebsje, P. (2007). Photodegradation of Organophosphorus Insecticides-Investigations of Products and their Toxicity using Gas Chromatography-Mass Spectrometry and AChE-Thermal Lens Spectrometric Bioassay. *Chemosphere*, 67: 99-107.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-54.
- Burrows, H.D., Canle, L.M., Santaballa, J.A. y Steenken, S. (2002). Reaction Pathways and Mechanisms of Photodegradation of Pesticides (Invited review). *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*, 67: 71-108.

- Canales, A., González, R., Mercado, F. y Chilton, J. (1991). Calidad del Agua Subterránea en el Valle del Yaqui: Salinidad y Contaminación por Agroquímicos. Informe técnico ITSON-DIEP para CONACYT, IMTA/CNA y BGS, Cd. Obregón, Sonora, México.
- Cebrián, M.E. (1998). Efectos de los Plaguicidas sobre la Función Reproductiva Humana: una Asignatura Pendiente. *Avance y Perspectiva*, 17: 205-213.
- Chaudhry, R.G., Ali, N.A. y Wheeler, B.W. (1988). Isolation of Methyl Parathion-Degrading *Pseudomonas* sp. that Possesses DNA Homologous to the opd Gene from *Flavobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 288-293.
- Chen, Q.H., He, G.Q. y Mokhtar, A.M. (2002). Optimization of Medium Composition for the Production of Elastase by *Bacillus* sp. EL31410 whit response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 667-672.
- CICOPLAFEST. (1997). Catálogo oficial de plaguicidas. SARH, SEDESOL, SS y SECOFI. México, D.F.
- Copella, S.J., Delacruz, N., Payne, G.F. Pogell, B.M., Speedie, M.K. Karns, J.S., Sybert, E.M. y Connor, M.A. (1990). Genetic Engineering Approach to Toxic Waste Management: Case Study for Organophosphate Waste Treatment. *Biotechnology Progress*, 6: 76-81.
- Daughton, C.G. y Hsieh, D.P.H. (1977). Parathion Utilization by Bacterial Symbionts in a Chemostat. *Applied and Environmental Microbiology*, 34(2): 175-184.
- DelaCruz, N., Payne, G.F., Smith, J.M. y Coppella, S.J. (1992). Bioprocess Development to Improve Foreign Protein Production from Recombinant *Streptomyces*. *Biotechnol. Prog.*, 8: 307-315.
- Demain, A.L. y Solomon, N.A. (1986). *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society of Microbiology, p. 108.
- Dumas, D.P., Caldwell, S. R., Wild, J. R. y Raushel, F.M. (1989). Purification and Properties of the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *The Journal of Biological Chemistry*, 264: 19659-19665.

- Dumas, D.P. y Raushel, M.F. (1990). Chemical and Kinetic Evidence for an Essential Histidine in the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *J. Biol. Chem.*, 265: 21498-21503.
- Ecobichon, D. J. (1996). Toxic Effects of Pesticides. En: Klaasen, (Editor). 5th edition. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. McGraw Hill, Washington.
- Eddleston, M., Karalliedde, L., Buckley, N., Fernando, R., Hutchinson, G., Isbister, G., Konradsen, F., Murray, D., Piola, J.C., Senanayake, N., Sheriff, R., Singh, S., Siwach, S.B. y Smit, L. (2002). Pesticide Poisoning in the Developing World-a Minimum Pesticide List. *The Lancet*, 360: 1163-1167.
- Ensley, B.D. (1994). Genetic Strategies for Strain Improvement. In: Biotechnology for the Treatment of Hazardous Waste. Stoner, D.L. (Ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla., p. 137-155.
- EPA. US. Environmental Protection Agency. (1991). Memorandum from the Office of Pesticides and Toxic Substances to Office of Pesticide Programs Division Director. Washington, DC, p. 5-6.
- EXTOXNET, Extension Toxicology Network. Methyl Parathion. (1996).
- Fraser, D. (1951). Bursting Bacteria by Release of Gas Pressure. *Nature*, 167: 33-34.
- García-Bañuelos, M.L. y Meza-Montenegro, M.M. (1991). Principales Vías de Contaminación por Plaguicidas en Neonatos-Lactantes Residentes en Pueblo Yaqui, Sonora, México. *ITSON-DIEP*, 1(2): 33-42.
- Gilbert, E.S., Walker, A.W. y Keasling, J.D. (2003). A Constructed Microbial Consortium for Biodegradation of the Organophosphorus Insecticide Parathion. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61: 77-81.
- González, R. (1991). Contaminación por Plaguicidas en el Acuífero del Valle del Yaqui, Sonora. Tesis de Maestría en Administración de Recursos Hidráulicos. ITSON, Cd. Obregón, Sonora, México.
- Grady, Jr., C.P.L. (1985). Biodegradation: Its Measurement and Microbiological Basis. *Biochem. Bioeng.*, 27: 660-674.

- Jokanović, M. (2001). Biotransformation of Organophosphorous Compounds. *Toxicology*, 16: 139-160.
- Kanekar, P.P., Bhadbhade, B.J., Deshpande, N.M. y Sarnaik, S.S. (2004). Biodegradation of Organophosphorus Pesticides. *Proc. Indian natn Sci Acad.*, B70(1): 57-70.
- Karpouzas, D.G. y Walker, A. (2000). Factors Influencing the Ability of *Pseudomonas putida* Strains epI and epII to Degrade the Organophosphate Ethoprophos. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 40-48.
- Karpouzas, D.G., Fotopoulou, A., Menkissoglu-Spiroudi, U. y Singh, B.K. (2005). Non-specific Biodegradation of the Organophosphorus Pesticides, Cadusafos and Ethoprophos, by Two Bacterial Isolates. *FEMS Microbiology Ecology*, 53: 369-378.
- Lei, Y., Mulchandani, A. y Chen, W. (2005). Improved Degradation of Organophosphorous Nerve Agent and p-Nitrofenol by *Pseudomonas putida* JS444 with Surface-expressed Organophosphorous Hydrolase. *Biotechnology Progress*, 21: 678-681.
- Martínez-Valenzuela, C. y Gómez-Arroyo, S. (2007). Riesgo Genotóxico por Exposición a Plaguicidas en Trabajadores Agrícolas. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 23(4). México.
- McConnell, S., Henao, O., Nieto, L., Rosenstock, A., Zanaga y C. Wesseling. (1993). Pesticides, En: Finkelman, J., Corey, G., y Calderon, R. (Eds). *Environmental Epidemiology: A project for Latin America and the Caribbean*. ECO/PAHO/OMS. Washington.
- Mulbry, W.W. y Karns, J.S. (1989). Purification and Characterization of Three Parathion Hydrolases from Gram-negative Bacterial Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(2): 289-293
- Munnecke, D.M. y Hsieh, D.P. (1974). Microbial Decontamination of Parathion and P-Nitrophenol in Aqueous Media. *American Society for Microbiology*, 28(2): 212-217.

- Munnecke, D.M. y Hsieh, D.P.H. (1976). Pathways of Microbial Metabolism of Parathion. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(1): 63-69.
- Munnecke, D.M. y Fischer, H.F. (1979). Production of Parathion Hydrolase Activity. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 8: 103-112.
- Omburo, G.A., Kuo, J.M., Mullins, L.S. y Raushel, F.M. (1992). Characterization of the Zinc Binding Site of Bacterial Phosphotriesterase. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(19): 13278-13283.
- OMS (1990). Plaguicidas. Informe Técnico N° 12. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.
- Ortega, J., Espinoza, F. y López, F. (1994). El Control de los Riesgos para la Salud Generados por los Plaguicidas Organofosforados en México: Retos ante el Tratado de Libre Comercio Salud Pública de México, 36: 6.
- Ortiz, M.L., Sánchez, E., Vázquez, R. y Quintero, R. (1997). Plaguicidas Organofosforados y Ambiente. *Bistec.*, 2: 129-151.
- Ortiz, M.L., Monterrosa, M., Yáñez, G. y Sánchez, E. (2001). Biodegradation of Methyl-Parathion by Bacteria Isolated of Agricultural Soil. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 17(3): 147-155.
- Pakala, S.B., Gorla, P., Pinjari, A.B., Krovidi, R.K., Baru, R., Yanamandra, M., Merrick, M. y Siddavattam, D. (2007). Biodegradation of Methyl Parathion and *p*-nitrophenol: Evidence for the Presence of a *p*-nitrophenol 2-hydroxylase en a Gram-negative *Serratia* sp. Strain DS001. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 73: 1452-1462.
- PAN Internacional (1990). Consult Manual. Pesticide Action Network International. California, EUA.
- Payne, G.F., DelaCruz, N. y Coppella, S.J. (1990). Improved Production of Heterologous Protein from *Streptomyces lividans*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 33: 395-400.
- Palmer, T. (1991). *Understanding Enzymes*. 3ra ed. Ellis Horwood. N.Y.

- Pehkonen, S.O. y Zhang, Q. (2002). The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters: a Critical Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 32: 17-72.
- Pirt, S.J. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. 1ra ed. John Wiley & Sons. N.Y.
- Ramanathan, M.P. y Lalithakumari, D. (1999). Complete Mineralization of Methyl Parathion by *Pseudomonas* sp. *A3*: 1-11.
- Rani, N. L. y Lalithakumari, D. (1994). Degradation of Methyl Parathion by *Pseudomonas putida*. *Can. J. Microbiol.*, (4): 1000-1006.
- Segel, I.H. (1976). *Biochemical Calculation: How to Solve Mathematical Problems in General Biochemistry*. 2da ed. John Wiley & Sons. Inc. USA.
- SEMARNAP, (1999). Anuario Estadístico de la Producción Forestal 1998, Subsecretaría de Recursos Naturales, Dirección General Forestal, México.
- Serdar, C.M., Gibson, D.T., Munnecke, D.M. y Lancaster, J.H. (1982). Plasmid Involvement in Parathion Hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1): 246-249.
- Sethunathan, N. y Yoshida, T. (1973). A Flavobacterium sp. that Degrades Diazinon and Parathion. *Canadian journal of Microbiology*, 19: 873-875.
- Siddaramappa, R., Rajaram, K.P. y Sethunathan, N. (1973). Degradation of Parathion by Bacteria Isolated from Flooded Soil. *Applied Microbiology*, 26: 846-849.
- Sreenivasulu, C. y Aparna, Y. (2001). Bioremediation of Methylparathion by Free and Immobilized Cells *Bacillus* sp. Isolated from Soil. *Environmental Contamination and Toxicology*, 67: 98-105.
- Tchelet, R., Levanon, D., Mingelgrin, U. y Henis, Y. (1993). Parathion Degradation by a *Pseudomonas* sp. and a *Xanthomonas* sp. and by their Crude Enzyme Extracts as Affected by some Cations. *Soil Biol. Biochem.*, 25(12): 1665-1671.

- Walker, A.W. y Keasling, J.D. (2002). Metabolic Engineering of *Pseudomonas putida* for the Utilization of Parathion as a Carbon and Energy Source. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(7): 715-721.
- Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunill, P., Humphrey, A.E. y Lilly, M.D. (1979). *Fermentation and Enzyme Technology*. Ed. Jhon Wiley & Sons, Inc.
- Wild, D. (1975). Mutagenicity Studies on Organophosphorus Insecticides. *Mutat. Res.*, 32: 133-150.
- Yeomans-Reina, J.H., Carrillo-Perez, E. y Ruiz-Manriquez, A. (2004). Biodegradación de Plaguicidas. *BIOTecnia*, VI(2): 3-62.
- Zhang, X-Z, Cui, Z-L, Hong, Q. y Li, S-P. (2005). High-Level Expression and Secretion of Methyl Parathion Hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7): 4101-4103.
- Zhongli, C., Shunpeng, L. y Guoping, F. (2001). Isolation of Methyl Parathion-Degrading Strain M6 and Clonig of the Methyl Parathion Hidrolase Gene. *Applied and Enviromental Microbiology*, p. 4922.

ANEXOS

ANEXO A

Determinación de Proteína por el Método de Bradford

Preparación de proteína

1. Pesar 20 mg de proteína BSA.
2. Disolver en 20 mL de agua aforados.
3. Concentración de 1 mg/mL.

Reactivo Bradford

1. Pesar 25 mg de azul de Coomassie G.
2. Disolverlo en 25 mL de etanol.
3. Filtrar con fibra de vidrio.
4. Agregar la solución a 50 mL de ácido fosfórico al 85%.
5. Aforar a 100 mL con agua destilada.
6. Almacenar en un frasco oscuro a 4 °C.

Solución blanco

1. Colocar 0.2 mL reactivo Bradford (dye).
2. Agregar 2.8 mL de agua destilada en un tubo de ensaye (Volumen total = 3 mL).

Micro Ensayo para el Método de Bradford

1. Preparar seis soluciones de trabajo, por duplicado.
2. Colocar 30, 40, 80, 120, 160 y 200 μ L de proteína de BSA en seis matraces.
3. Aforar a 2 mL con agua destilada, para obtener concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/mL.
4. Vaciar la anterior solución a nuevos tubos de ensaye.

5. Homogenizar la solución.
6. Posteriormente se debe; colocar 0.2 mL de colorante, 0.8 mL de proteína BSA y 2 mL de agua destilada, en otro tubo de ensaye (Volumen total = 3 mL).
7. Homogenizar cada una de las soluciones, incluyendo el blanco.
8. Dejar reposar durante 20 minutos, a una temperatura de 25 °C.
9. Leer absorbancia a 595 nm.

ANEXO B

Determinación de Actividad Enzimática

Curva Estándar de *p*-Nitrofenol (PNF)

Solución stock de PNF

1. En un aforado de 25 mL, colocar 898 μ L de PNP.
2. Aforar a 25 mL con agua destilada.

Solución blanco

1. Agregar 3 mL de solución amortiguadora Tris a un tubo de ensayo, por duplicado.

Ensayo

1. Preparar siete soluciones de trabajo, por duplicado.
2. Colocar 30, 60, 150, 300, 600, 900 y 1200 μ L de proteína de solución stock en siete tubos de ensayo.
3. Posteriormente se debe; colocar 2.97, 2.94, 2.85, 2.7, 2.4, 2.1 y 1.8 mL de solución amortiguadora Tris.
4. Homogenizar cada una de las soluciones, incluyendo el blanco.
5. Leer absorbancia a 410 nm.