



“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS AGRÍCOLAS QUE HIDROLIZAN PARATIÓN METÍLICO”

Concepción CHINO-FLORES¹, Enrique SÁNCHEZ-SALINAS¹, Edgar DANTÁN-GONZALEZ¹, Rafael DÍAZ-MENDEZ² y Ma. Laura ORTIZ-HERNÁNDEZ¹. ¹Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad #1001 Col. Chamilpa Cuernavaca Morelos. Tel. 01777 329-7057 fax 01777 329-7030. ²Centro de Ciencias Geonómicas-UNAM. Correo electrónico: chinofl@gmail.com

Palabras claves: bacterias, paratión metílico, genoma.

Introducción: Los plaguicidas organofosforados (OF's), como el paratión metílico (PM), son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AC). El PM es un compuesto extremadamente tóxico con una DL₅₀ de 14-24 mg/kg. El riesgo de daño fisiológico para organismos no blanco es alto, ya que la enzima AC esta presente en vertebrados, incluyendo humanos (1). Sin embargo, estos plaguicidas se siguen utilizando en los países en desarrollo causando unos tres millones de intoxicaciones y 200,000 mil muertes anuales, siendo un problema de salud pública (2). Los tratamientos físicos y químicos para eliminar residuos de plaguicidas impactan al ambiente, es por esto que la degradación microbiana es considerada como una opción de tratamiento.

El **objetivo** de este trabajo es seleccionar bacterias aisladas de suelos agrícolas que expresen actividad enzimática sobre PM, así como realizar su caracterización molecular.

Metodología: De un consorcio bacteriano previamente aislado de suelos agrícolas que han sido tratados con plaguicidas OF's, se eligieron cuatro cepas puras en función de los resultados de la actividad específica sobre el PM (medida sobre una solución 38 µM de PM que fue mezclada con extracto enzimático de cada cepa para dar como resultado al ácido dietiltiofosfórico y *p*-nitrofenol). Se utilizó la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) para determinar el tamaño del genoma y número de replicones de cada cepa (3). Para la identificación de las bacterias, se llevo a cabo la extracción y purificación de DNA genómico (4) y se realizó la amplificación del gen 16S rRNA con los oligonucleótidos U968 (5'-AAC GCG AAG AAC CTT AC-3') y el L1401 (5'-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3') de *Lactobacillus plantarum* (5). Los productos amplificados se purificaron y fragmentos de aproximadamente 450 pb fueron secuenciados en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Resultados y discusión: Los resultados obtenidos del análisis de las cepas se muestran en la tabla 1, donde de acuerdo con los resultados de la amplificación del gen 16S rRNA, se muestran los géneros de las cuatro cepas aisladas. De ellas, *Enterobacter* sp. presenta mayor actividad específica, la cual ya ha sido reportada para degradar al plaguicida clorpirifos; *Klebsiella* sp., degrada al plaguicida triazofos, ambos OF's. Estos géneros se han reportado como patógenos. No hay evidencias de

Proteobacterium para degradar este tipo plaguicidas. El tamaño de genoma de las cuatro cepas es diferente, y el (los) gen(es) responsable(s) de la actividad enzimática se encuentra en el cromosoma ya que no se detectaron plásmidos.

Tabla 1. Género, Actividad Específica y Tamaño del genoma de cada una de las cepas aisladas capaces de degradar PM.

| Género | Actividad específica del extracto intracelular (µmol/min/µg prot) | Tamaño aproximado del genoma (Mb) |
|--------------------------------------|---|-----------------------------------|
| <i>Enterobacter</i> sp. | 1.277 ±0.28 | 6.61 |
| <i>Enterobacter</i> sp. | 1.673 ±0.00 | 4.87 |
| <i>Proteobacterium</i> no cultivada. | 0.752 ±0.09 | 6.61 |
| <i>Klebsiella</i> sp. | 1.052 ±0.27 | 5.2 |

Conclusiones: Las especies bacterianas analizadas, pertenecen a géneros patógenos, con diferencias en su actividad enzimática y tamaños de genoma distintos. Estos géneros no han sido reportados para degradar al plaguicida PM.

Agradecimientos: Al M.B.Gustavo Yañez Ocampo, a la Dra. Lucia Perezgasca Ciscomani y al Biólogo José Luis Rodríguez Mejía por el apoyo técnico.

Bibliografía:

1. Singh B.K., y Walker A. (2006) Microbial degradation of organophosphorous compounds. *FEMS Microbiol Rev* (30) 428-471.
2. Sorgob-Sánchez M.A., Vilanova-Gisbert E. y Carrera González. (2004) Nuevas perspectivas en los tratamientos de intoxicaciones por insecticidas organofosforados y agentes nerviosos de guerra. *REV NEUR* Vol. (39) 739-747.
3. Murray B.E., Kavindra V. S., Heath J.D., Sharma B. R., y Weinstock G.M. (1990) Comparison of Genomic DNAs of Different Enterococcal Isolates Using Restriction Endonucleases with Infrequent Recognition Sites. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. (28) 2059-2063
4. Miller S.A., Dykes D.D., and Polesky H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. Vol. (16) 1215.
5. Lopez I., Ruiz-Larrea F., Coccolin L., Orr E., Phister T., Marshall M., Vanderghyest J. y Mills D. A. (2003) Design and Evaluation of PCR Primers for Análisis of Bacterial Populations in Wine by Denaturing gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Env. Microbiol*. Vol. (69) 6801-6807.