

# ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *Pseudomonas citronellolis*, SOBRE LA REMOCIÓN DE TETRACLORVINFOS

Gustavo Yañez Ocampo<sup>1</sup> Enrique Sánchez Salinas<sup>1</sup> y Ma. Laura Ortíz Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, C.P. 62210 Tel. (017) 329-7057, fax 329-7030 [gusabiol@yahoo.com.mx](mailto:gusabiol@yahoo.com.mx)

Palabras clave: fosfotriesterasa, tetraclorvinfos y enzimas

**Introducción.** En México, el 65% del consumo de plaguicidas se aplica en la agricultura; el otro 35% se emplea en ganadería, control de enfermedades y de plagas domésticas. Cada año, 5 millones de personas en el mundo se intoxican por acción de los plaguicidas, de las cuales, 40,000 fallecen. La presencia de plaguicidas en el ambiente, favorece el desarrollo de microorganismos capaces de utilizarlos como nutrientes, a partir de sistemas enzimáticos. Por lo tanto es importante entender en detalle, los mecanismos de biodegradación de los plaguicidas utilizados por bacterias; para reducir los contaminantes a niveles ambientalmente aceptables (1). Bajo este contexto, a partir de *Pseudomonas diminuta* y de *Flavobacterium* ATCC 27551 se aisló la enzima fosfotriesterasa, cuyas condiciones de actividad catalítica se obtuvieron con paratión metílico (2). Sin embargo, se ha comprobado que esta enzima no es capaz de hidrolizar otros plaguicidas organofosforados como es el caso del tetraclorvinfos (3).

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad catalítica de extractos proteicos crudos de *Pseudomonas citronellolis* sobre tetraclorvinfos (TCF).

**Metodología.** A partir del cultivo de *P. citronellolis*, previamente aislada del suelo, se realizaron cinéticas de crecimiento en caldo de soya tripticaseína (TS) y medio mineral (MM), con TCF a 20 mg/L. Se obtuvieron y cuantificaron los extractos proteicos crudos (EP), intracelular (Intra) y de sedimento celular (Scel) de acuerdo con la metodología citada en (1). Subsecuentemente se realizó el análisis de actividad enzimática considerando un tiempo de reacción de 5 minutos. La mezcla de reacción consistió en TCF (20 mg/L), buffer NaHPO<sub>4</sub> 20 mM pH 7.2 y el extracto proteico respectivo. La actividad enzimática se midió a través de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

**Resultados y discusión.** El ANOVA factorial realizado en la cuantificación de proteína de los EP, percibió diferencias altamente significativas para todas las variables: medio de cultivo ( $F_{med; 1, 31} = 21.17$ ), extracto proteico ( $F_{ext; 1, 31} = 22.57$ ) y presencia de plaguicida ( $F_{pp; 1, 31} = 4.96$ );  $P < 0.05$ ). El extracto Scel presentó mayor concentración de proteína. No se presentaron diferencias significativas (ANOVA) en la actividad enzimática, para ninguno de las variables; medio de cultivo ( $F_{med; 1, 21} = 0.113$ ), extracto proteico ( $F_{ext; 1, 21} = 2.902$ ), presencia de plaguicida ( $F_{pp; 1, 21} = 0.130$ )  $P > 0.05$ . Sin embargo, se observó que el extracto proteico intracelular mostró una mayor actividad enzimática (Figura 1).

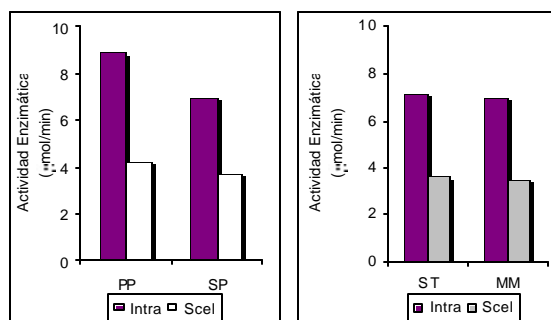


Figura 1. Comparación de la actividad enzimática de los extractos proteicos de *P. citronellolis*. PP: presencia de TCF, SP: sin presencia, ST y MM los medios de cultivo.

Así mismo se apreció que en extractos proteicos provenientes de cultivos con TCF, se incrementa la actividad enzimática, lo que sugiere que el plaguicida favorece el incremento en la actividad catalítica. El análisis por espectrometría de masas reportó la presencia de un producto de la actividad enzimática llevada a cabo por *P. citronellolis*, lo que sugiere un mecanismo de hidrólisis (Figura 2).

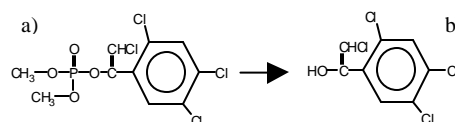


Figura 2. Análisis del metabolito encontrado por espectrometría de masas. En a) el sustrato original (TCF) y en b) 2,4,5 tricloro fenacil cloruro

**Conclusión.** El extracto proteico intracelular, presentó una mayor actividad enzimática respecto al sedimento celular. Se sugiere que los extractos proteicos crudos de *P. citronellolis* llevan a cabo un mecanismo de hidrólisis del tetraclorvinfos.

**Agradecimiento.** Al Dr. Rafael Vazquez Duhalt por las facilidades otorgadas en el análisis de cuantificación del TCF, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

**Bibliografía.** 1.- Yañez-Ocampo G. (2003) Evaluación de la actividad enzimática presente en cepas bacterianas aisladas de suelos agrícolas, sobre tetraclorvinfos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 56 pp.  
2.- Benning, M. M., J. M. Kuo, F. M. Raushel y H. M. Holden. (1995). *Biochem.* 34:7973-7978.  
3.-Ortiz-Hernández, M. L. (2002). Biodegradación de plaguicidas organofosforados por nuevas bacterias aisladas del suelo. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. 92 pp.