

LOCALIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE *Serratia ficaria* SOBRE TETRACLORVINOS

Gustavo Yañez Ocampo¹ Enrique Sánchez Salinas¹ y Ma. Laura Ortíz Hernández¹

¹Centro 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 gusabio@cib.uaem.mx

Palabras clave: *fosfotriesterasa*, *tetraclorvinos* y *enzimas*

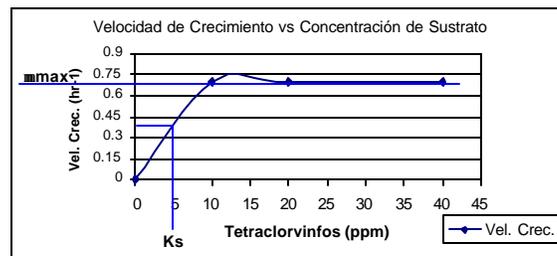
Introducción. Los plaguicidas organofosforados (POs) son derivados del ácido fosfórico, sus grupos -OH están sustituidos por azufre, oxígeno, grupos amino y radicales orgánicos; unidos por enlaces éster (1). En México el 65% del consumo de plaguicidas se aplica en la agricultura; el 35% se emplea en ganadería, en control de vectores transmisores de enfermedades y en el control de plagas del hogar y la industria. Cada año, 5 millones de personas en el mundo se intoxican por acción de los plaguicidas, de las cuales, 40,000 fallecen (2). La presencia de plaguicidas en el ambiente, provocan el desarrollo de poblaciones de microorganismos capaces de transformarlos, a partir de sistemas enzimáticos. La enzima estudiada en mayor detalle es una fosfotriesterasa aislada de *Pseudomonas diminuta* y de *Flavobacterium* ATCC 27551, de la que se ha obtenido las condiciones óptimas de actividad catalítica sobre paratión metílico (3). *Serratia ficaria*, recientemente aislada de suelos agrícolas de Morelos, mostró actividad enzimática sobre el plaguicida organofosforado tetraclorvinos (TCV). El objetivo del trabajo conocer los parámetros cinéticos de crecimiento de *S. ficaria* y localizar la actividad enzimática sobre el TCV.

Metodología. Se realizaron cinéticas de crecimiento en caldo de soya tripticaseína (TS), adicionados con TCV a concentraciones de 10, 20 y 40 mg/L. El crecimiento se midió por densidad óptica a 625 nm. Se calculó la velocidad de crecimiento de la bacteria (μ , h^{-1}), la μ_{max} y la K_s . Posteriormente se obtuvieron extractos crudos de proteína extracelular, intracelular y de membrana a partir de cultivos de *S. ficaria* a los cuales se les cuantificó la concentración por el método de Lowry. Subsecuentemente se realizaron pruebas de actividad enzimática en 5 mL de una mezcla de reacción que consistió en TCV (20 mg/L), buffer pH 7.2 y los diversos extractos enzimáticos por separado durante un tiempo de 20 minutos. La actividad enzimática se midió utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 215 nm (este dato se investigó mediante pruebas previas con el plaguicida).

Resultados y Discusión. La figura 1 muestra los resultados de los parámetros cinéticos de *S. ficaria* sobre TCV. El valor de μ_{max} fue de $0.693 h^{-1}$ y el de K_s de 5 mg/L. El cuadro 1 presenta los resultados de concentración de proteína. El valor mayor se obtuvo en el medio TS (nutritivo) en el extracto extracelular, no habiendo diferencias entre las diferentes condiciones de cultivo (presencia o ausencia de TCV). Para

el caso del medio mineral, la mayor concentración de proteína se obtuvo en la fase intracelular, con el mismo comportamiento en presencia o ausencia del TCV..

Fig. 1. Resultados de los parámetros cinéticos de crecimiento de *S.*



ficaria.

Se apreciaron los mayores valores de actividad enzimática en el extracto intracelular, principalmente del que provenía del cultivo con TS. Los resultados coinciden con los valores mayores de la concentración de proteína en TS y en MM. La actividad enzimática se apreció en los primeros 5 min de reacción. Los resultados sugieren que la expresión de la enzima es constitutiva.

Cuadro 1. Resultados de la concentración de proteína (mg/mL) en los diferentes extractos enzimáticos.

Cultivo de <i>S. ficaria</i>	EE	EI	EM
ST+plaguicida	698.91	206.85	551.82
ST	701.57	221.84	407.64
MM+ plaguicida	118.92	174.11	160.58
MM	108.84	199.88	180.33

EE=Extracto extracelular; EI=extracto intracelular; EM=extracto de membrana; ST=caldo de soya tripticaseína; MM=medio mineral
Conclusiones. Los parámetros cinéticos de *S. ficaria* muestran un comportamiento típico para una bacteria, incluso en presencia del PO. La actividad enzimática se localiza intracelularmente y de manera constitutiva.

Agradecimientos. Dra. María del Carmen Gutierrez Villafuerte y M. en B. José Santos Chimal, Dr. Eduardo Aranda Escobar y M. en C. Mauricio Trujillo por su apoyo y sugerencias.

Bibliografía. 1. Ortiz-Hernández, L, Sánchez-Salinas, E, Vazquez-Duhalt, R y Quintero-Ramírez, R. (1999). Plaguicidas organofosforados y ambiente. *Biotecnología*. 3(2): 129-151.

2. López, L. (1993). Exposición a Plaguicidas organofosforados Perspectivas en la salud pública. Instituto Nacional de Salud Pública. México. 89 pp.

3. Dumas, P, Caldwell, S, Wild, J y Raushel, F (1989). Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *J. Biol. Chem.* 264(33):19659-19665