



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

Jennifer Carolina Parada Calderón
Laura Yamile Pinzón Franco

Asesor externo: Javier Vanegas Guerrero
Asesor Interno: Ligia Consuelo Sánchez Leal

Mayo, 2020

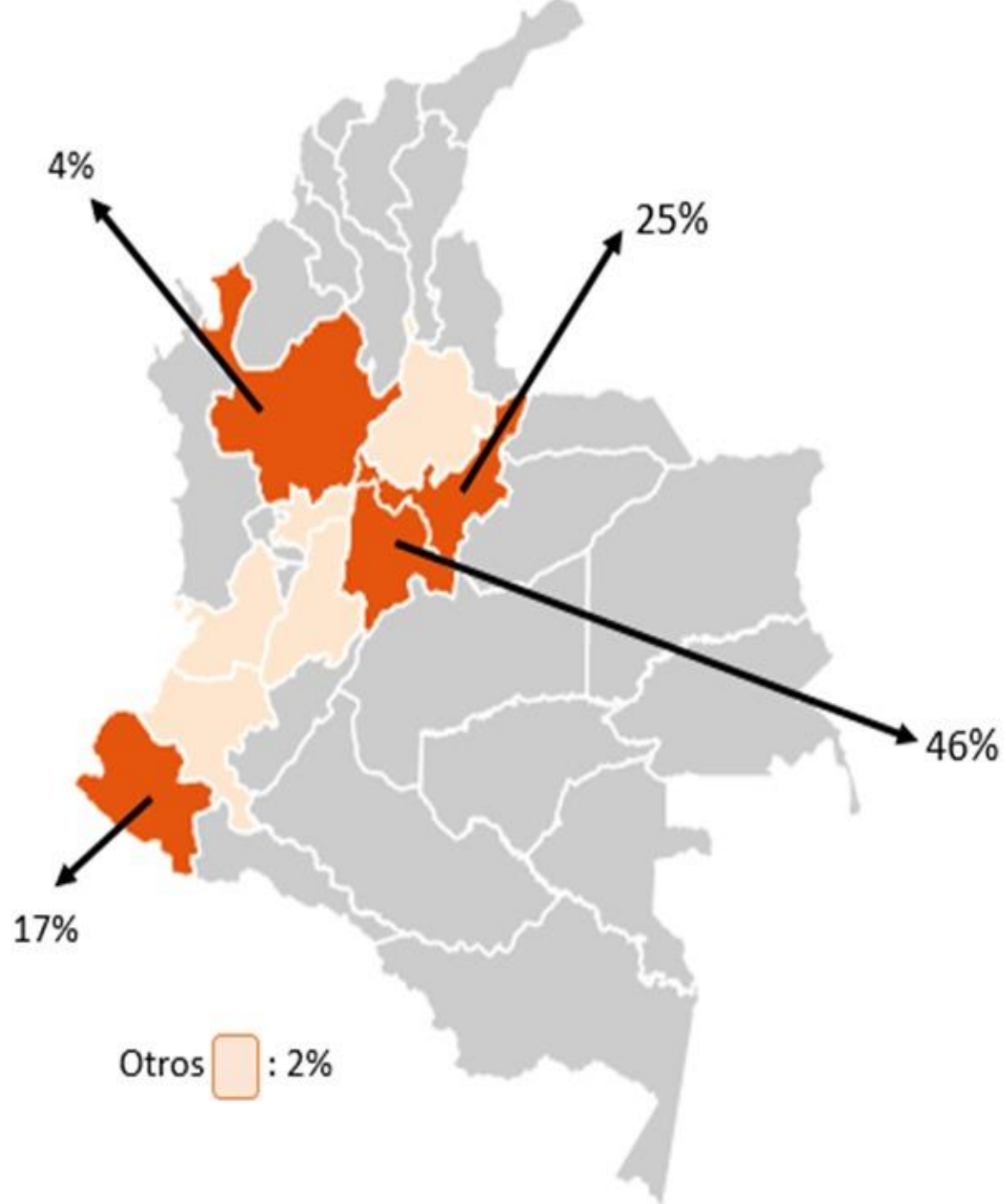


100.000 familias



FAOSTAT, 2014





183 mil ha

Sembradas

Ordoñez, Rosero, & Bacca (2012) y FAO (2017)





3.8 M Tn/año



Argenpapa, 2015



Tectia solanivora



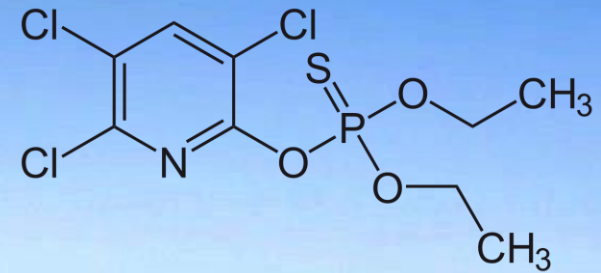
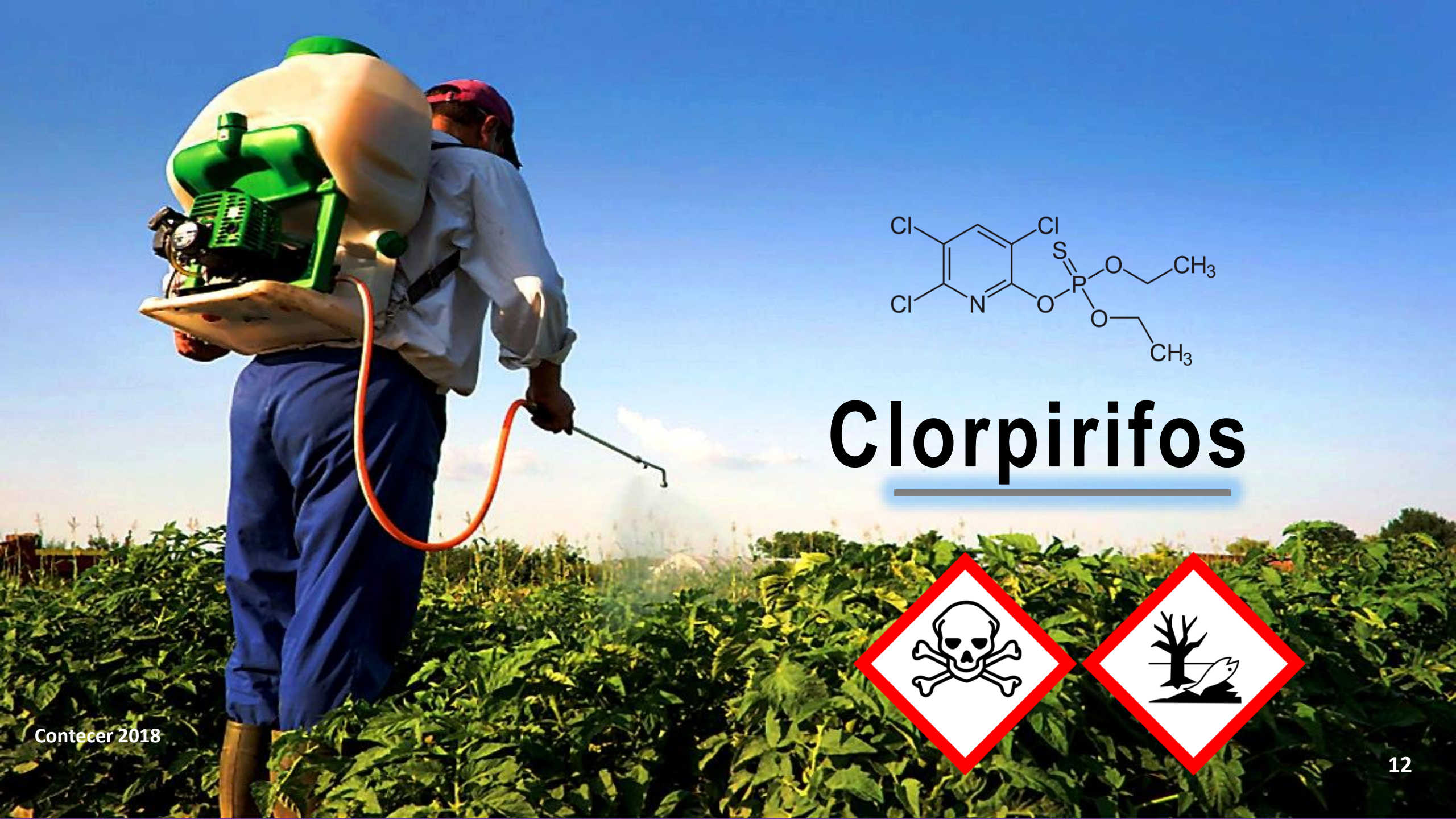
20%
Pérdidas





100%
Postcosecha





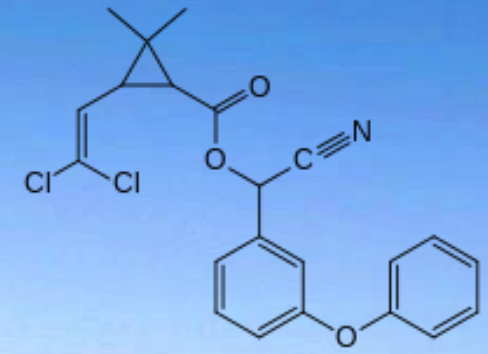
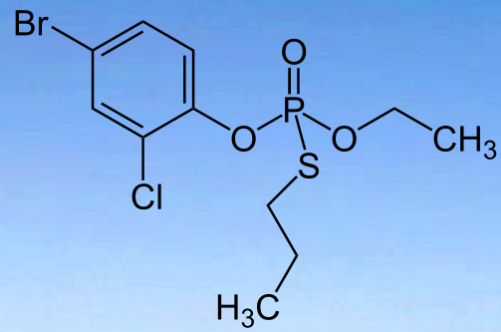
Clorpirifos





Profenofos, Cipermetrina





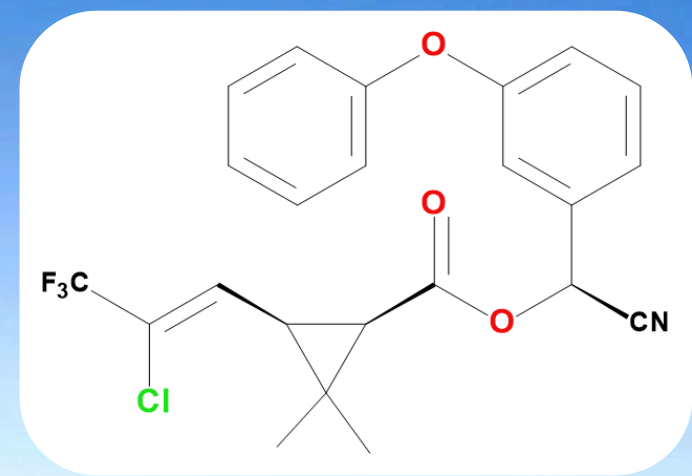
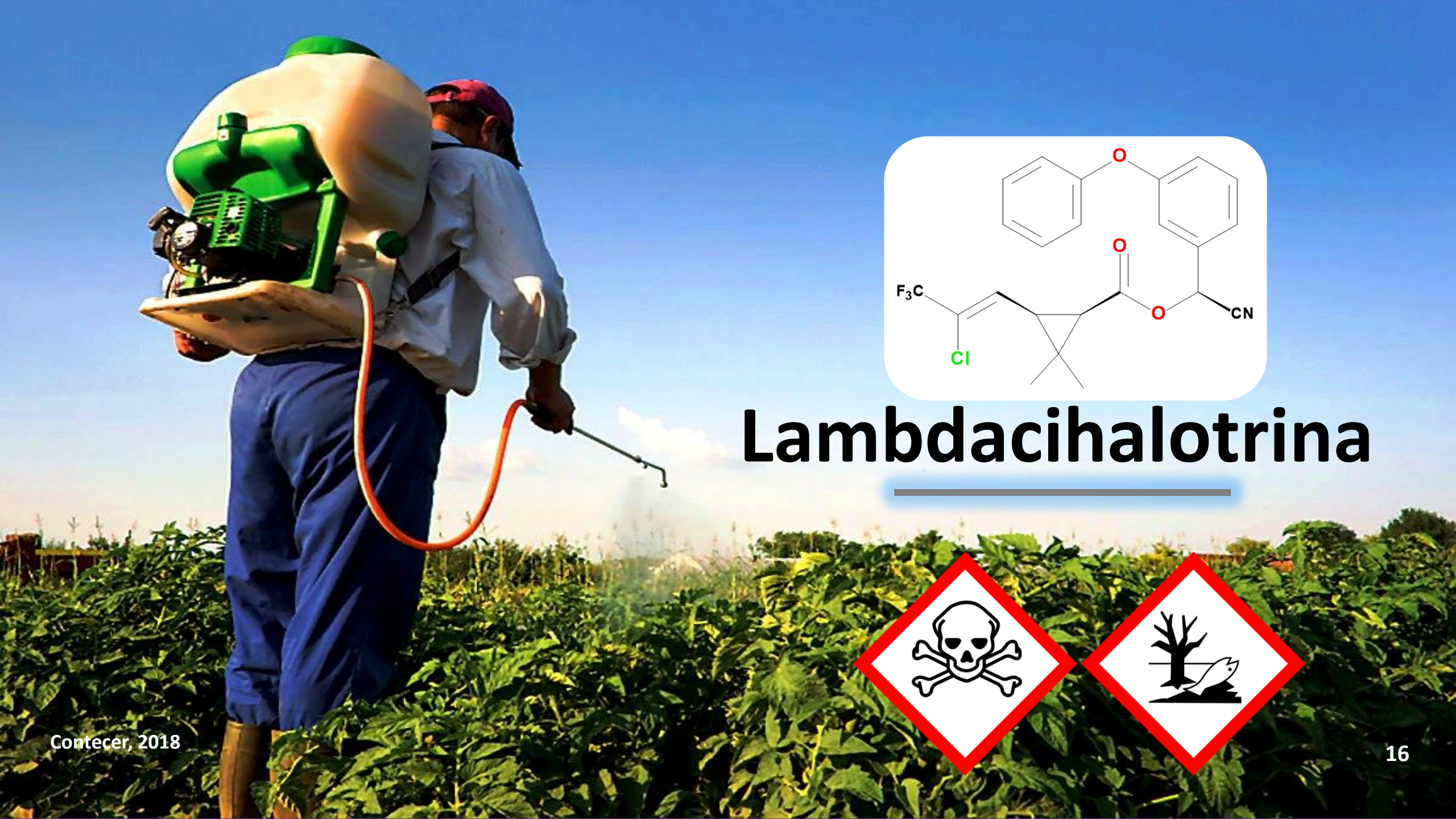
Profenofos-Cipermetrina





Lambdacihalotrina





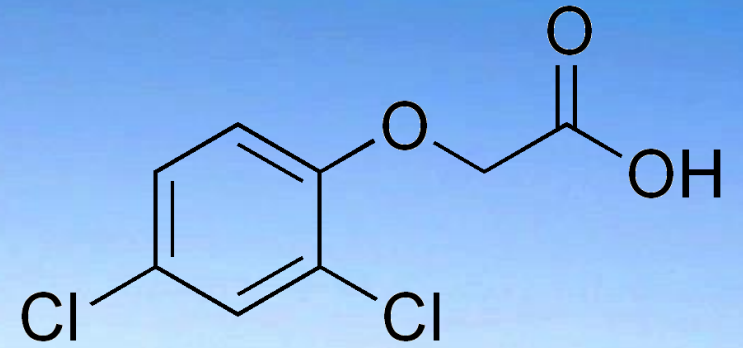
Lambdacihalotrina





2,4: D





2,4: D



Antecedentes

Microorganismos con actividad degradadora

Akbar *et al*, 2014

Actividad degradadora de clorpirifos.

Acinetobacter calcoaceticus,
Stenotrophomonas maltophilia,
Pseudomonas mendocina y
P. aeruginosa.

Después de 10 días los aislamientos individuales degradaron entre el 60 y el 75% de CP.

Marín *et al*, 2015

Pesticidas organofosforados en muestras de suelo y leche de ganado bovino.

Bacillus sp y *Pantoea agglomerans*.

Después 5 días los aislamientos presentaron un porcentaje de degradación de 73.5% y 68.67%.

Jaramillo *et al*, 2016

Suelo de Cartagena contaminado por insecticidas organofosforados (OF).

Klebsiella oxytoca, *Enterobacter cloacae*
y *Pseudomonas aeruginosa*.

Después de 30 días los aislamientos individuales degradaron el 100% del contaminante.

Antecedentes

Enzimas y genes involucrados en la degradación de plaguicidas

Fujioka y Casida, 2007

Maldonado, 2017

Enzimas S-transferasas de GSH o GST y el sistema citocromo P450, las cuales están involucradas en el metabolismo de organofosforados.

El metabolismo catalizado por GST se une a P450 e hidrolasas como contribuyentes importantes a la desintoxicación de OP.

Eficiencia de biodegradación de un insecticida organofosforado.

Trichoderma harzianum y *Pleurotus ostreatus*.

Degradación del 66.80% de insecticida biodegradado a través de los procesos enzimáticos como el uso de las enzimas P-450 monooxigenasas.



OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial de dos rizobacterias de papa (*Solanum tuberosum* L.) para degradar tres plaguicidas organofosforados y el herbicida 2,4-D.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS



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

OBJETIVOS ESPECÍFICOS



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



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

OBJETIVOS ESPECÍFICOS



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



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

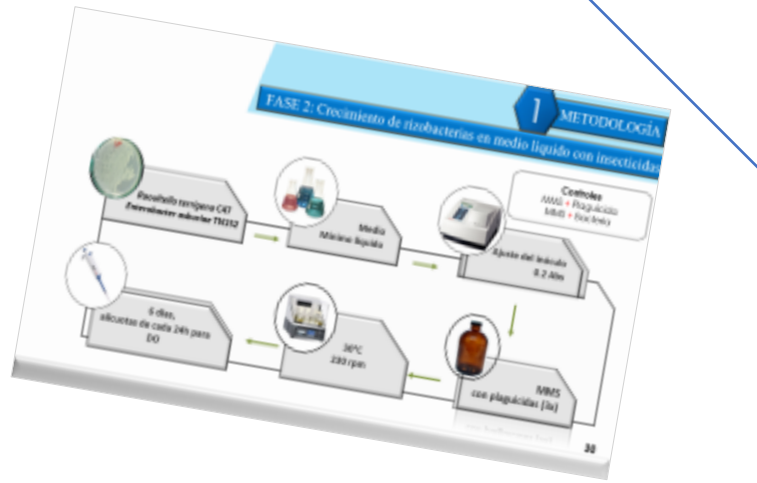
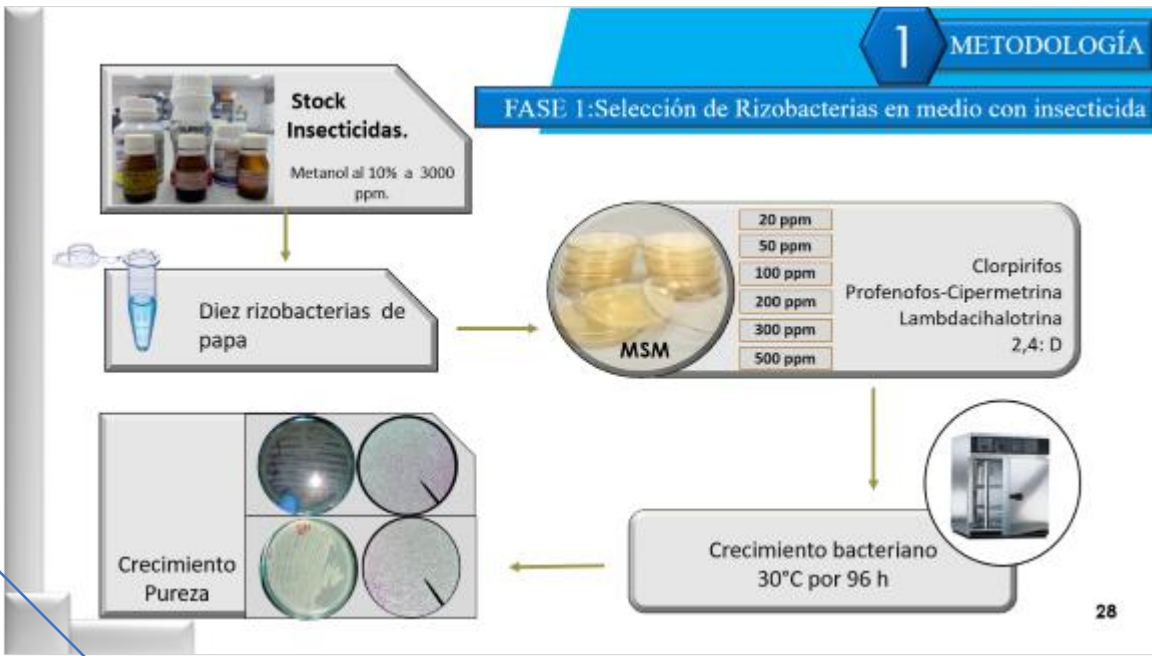


3. Determinar la degradación de plaguicidas por rizobacterias mediante técnicas analíticas.



Deadline, 2019

1



CRECIMIENTO EN INSECTICIDAS

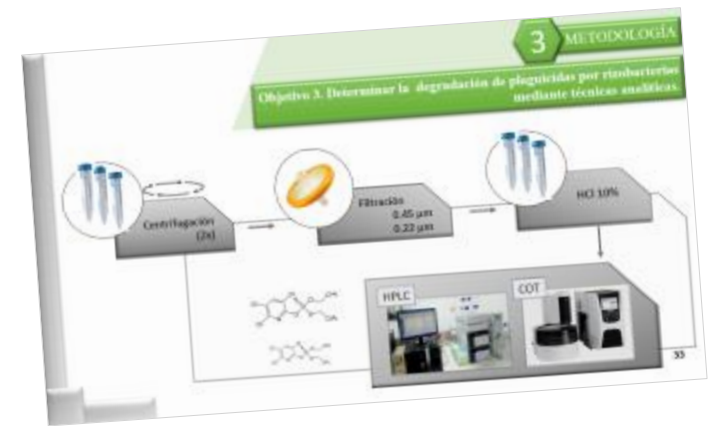
2

BIOINFORMÁTICA

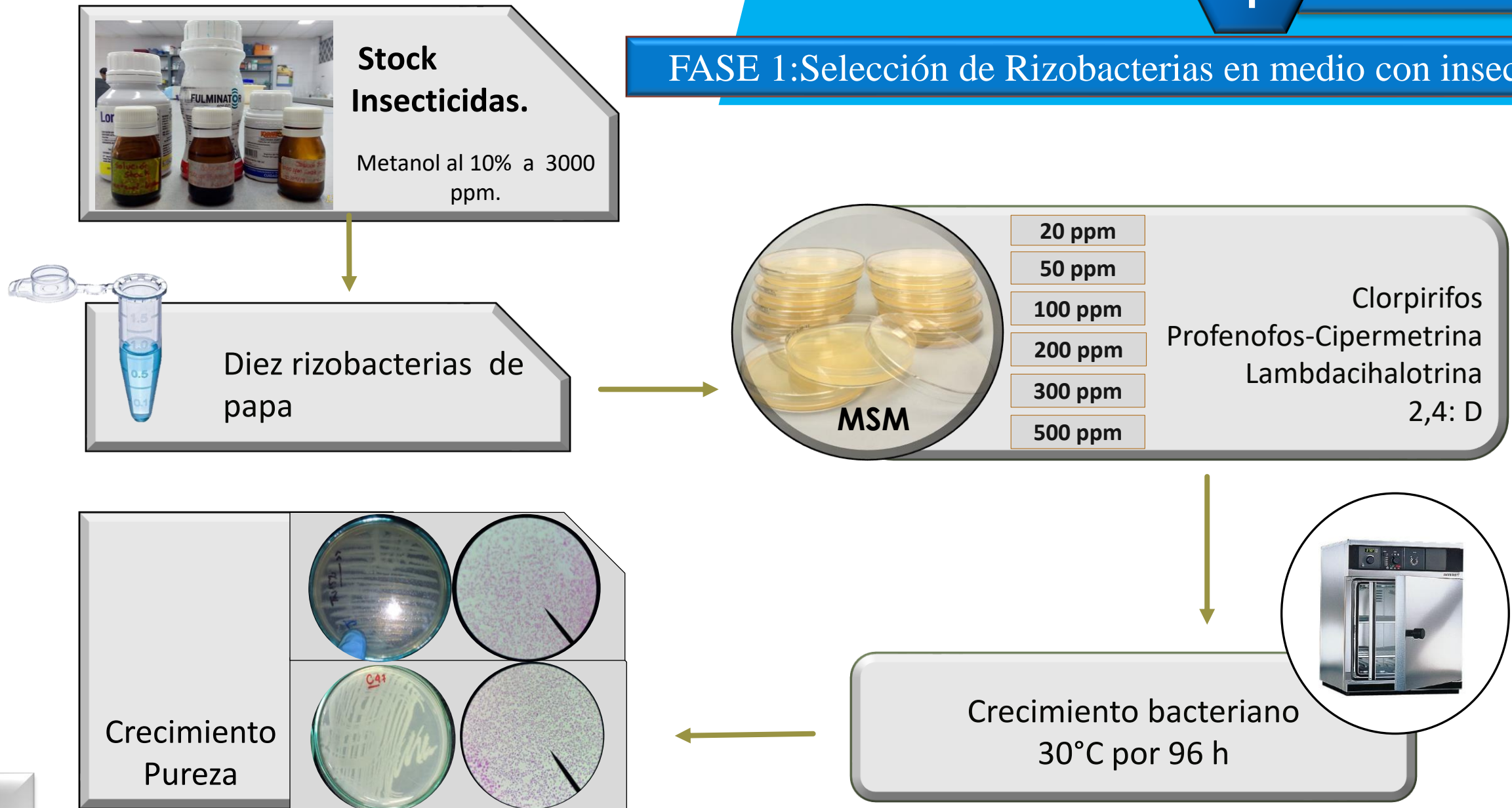


3

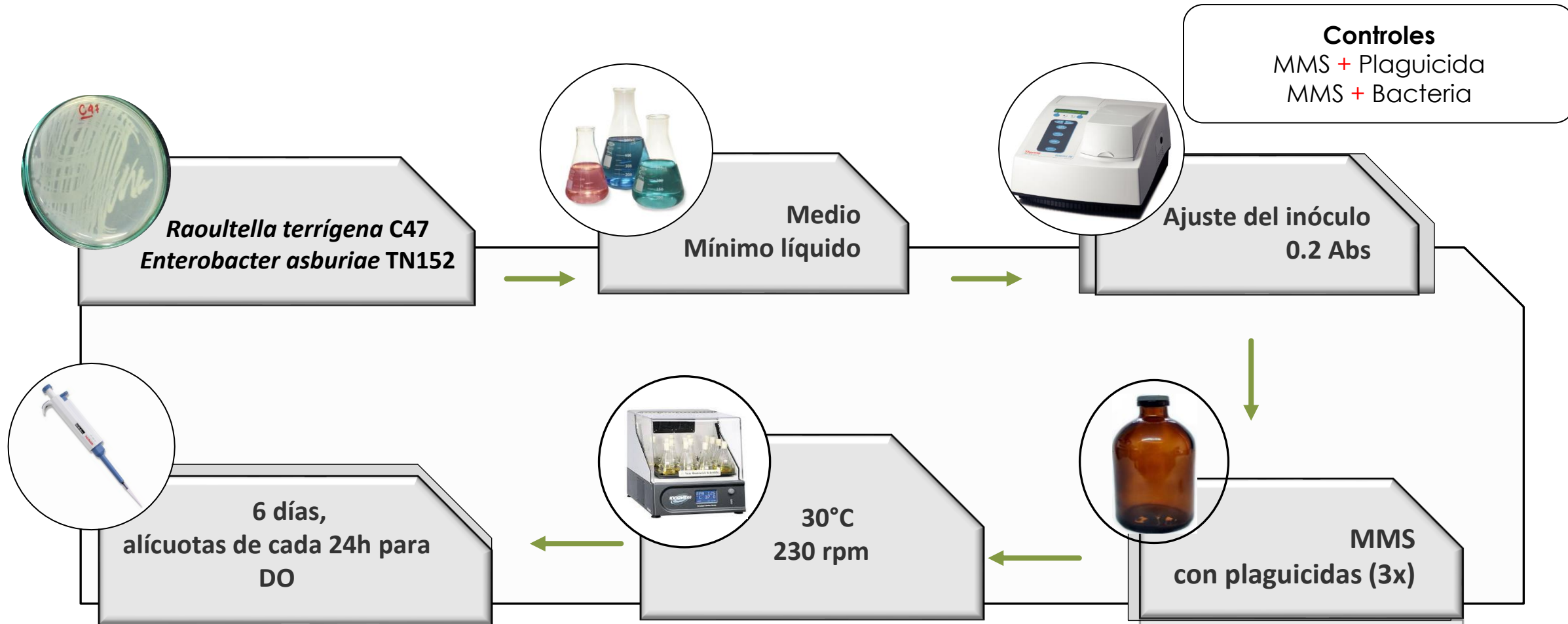
DEGRADACIÓN



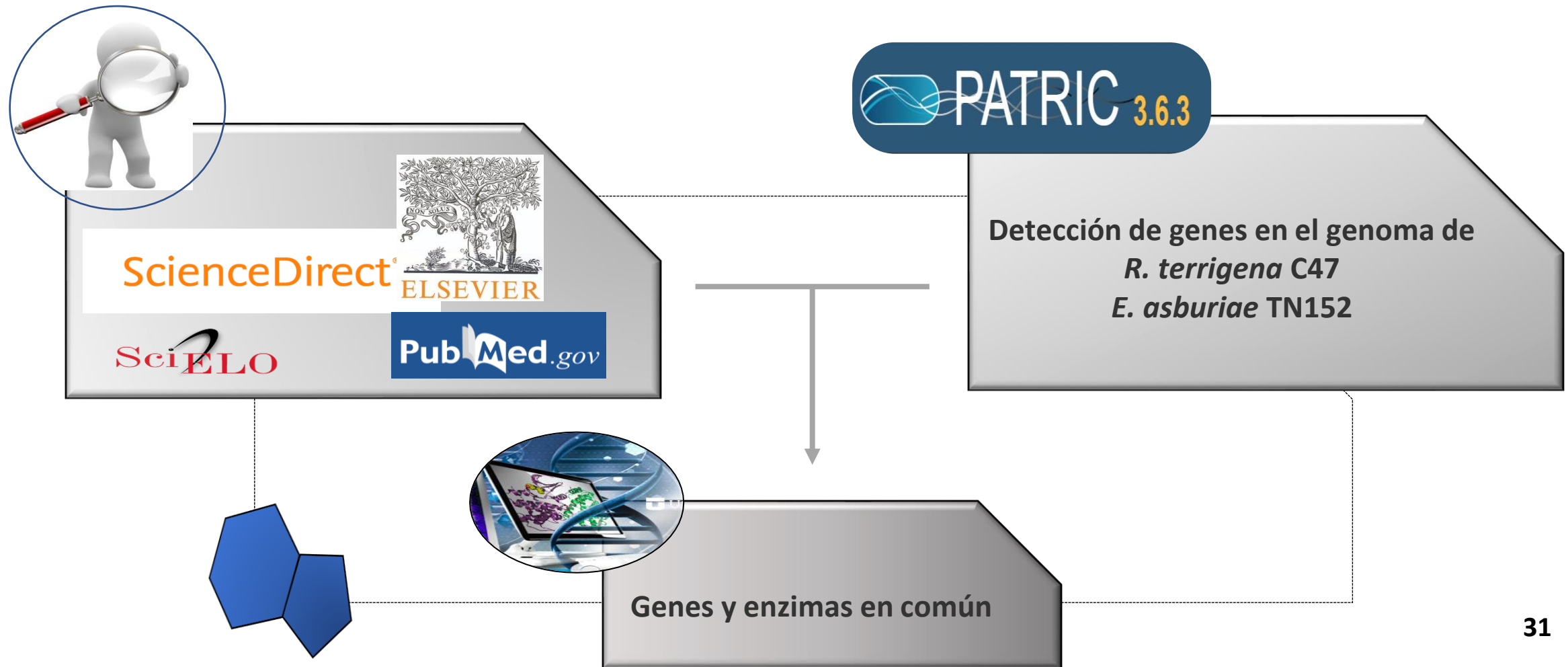
FASE 1: Selección de Rizobacterias en medio con insecticida



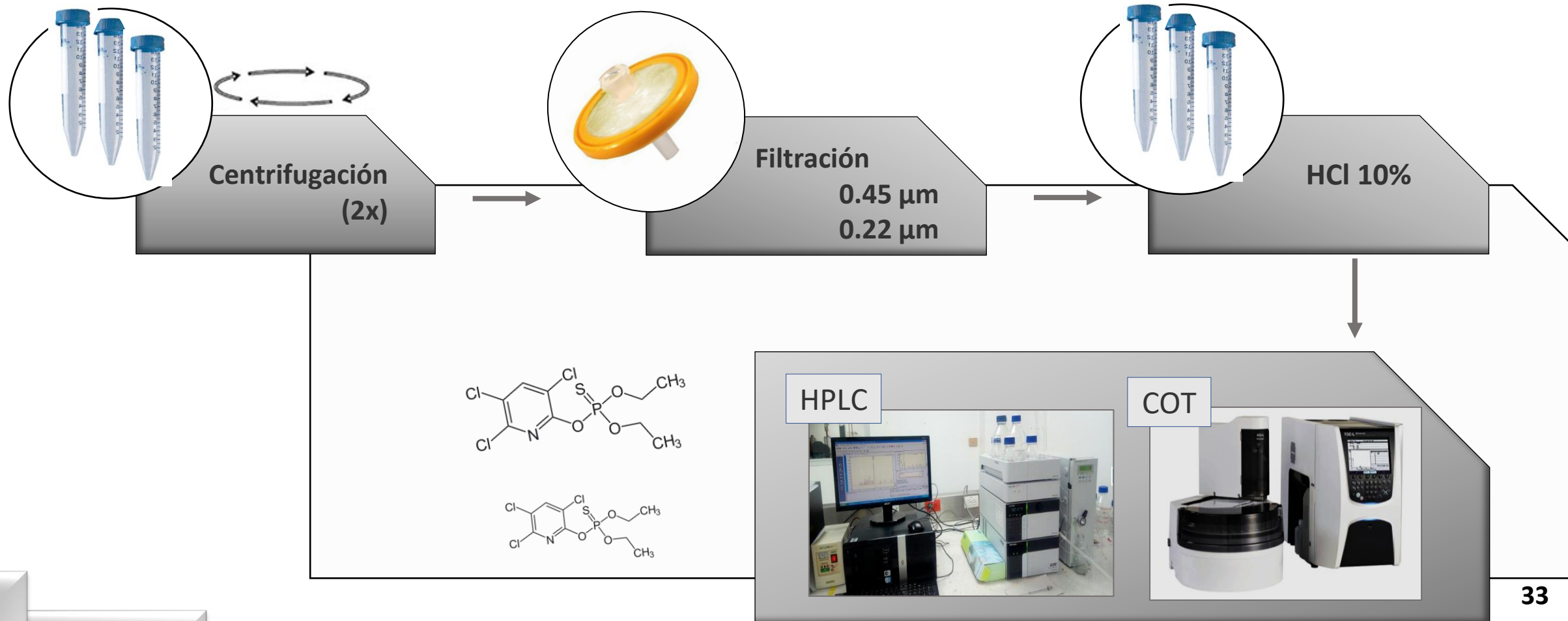
FASE 2: Crecimiento de rizobacterias en medio líquido con insecticidas



Objetivo 2. Identificar mediante herramientas de bioinformática, los mecanismos de degradación



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







RESULTADOS

Selección de Rizobacterias en medio con insecticida

Crecimiento en MSM sólido con
Clorpirifos

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

Crecimiento en MSM sólido con
Profenofos: Cipermetrina (5:1)

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

Crecimiento negativo: (-), escaso: (+), moderado (++), abundante: (+++), muy abundante: (++++).

Selección de Rizobacterias en medio con insecticida

Crecimiento en MSM sólido con
Lambda-cihalotrina

Cepas	20ppm	50ppm	100ppm	300ppm	500ppm
2B	++	+	+	++	+
3A	++	+	+	+	+
3B	+++	+	+	++	++
6A	++	+	+	+	++
1A3	++	++	+	+	+
1C3	Singh, 2004. <i>E. asburiae</i> fue reportado para la degradación de clorpirifos en suelo australiano.				
M3					
M4					
TN152	+++	+++	++	+	++
C47	+	++	++	+	++

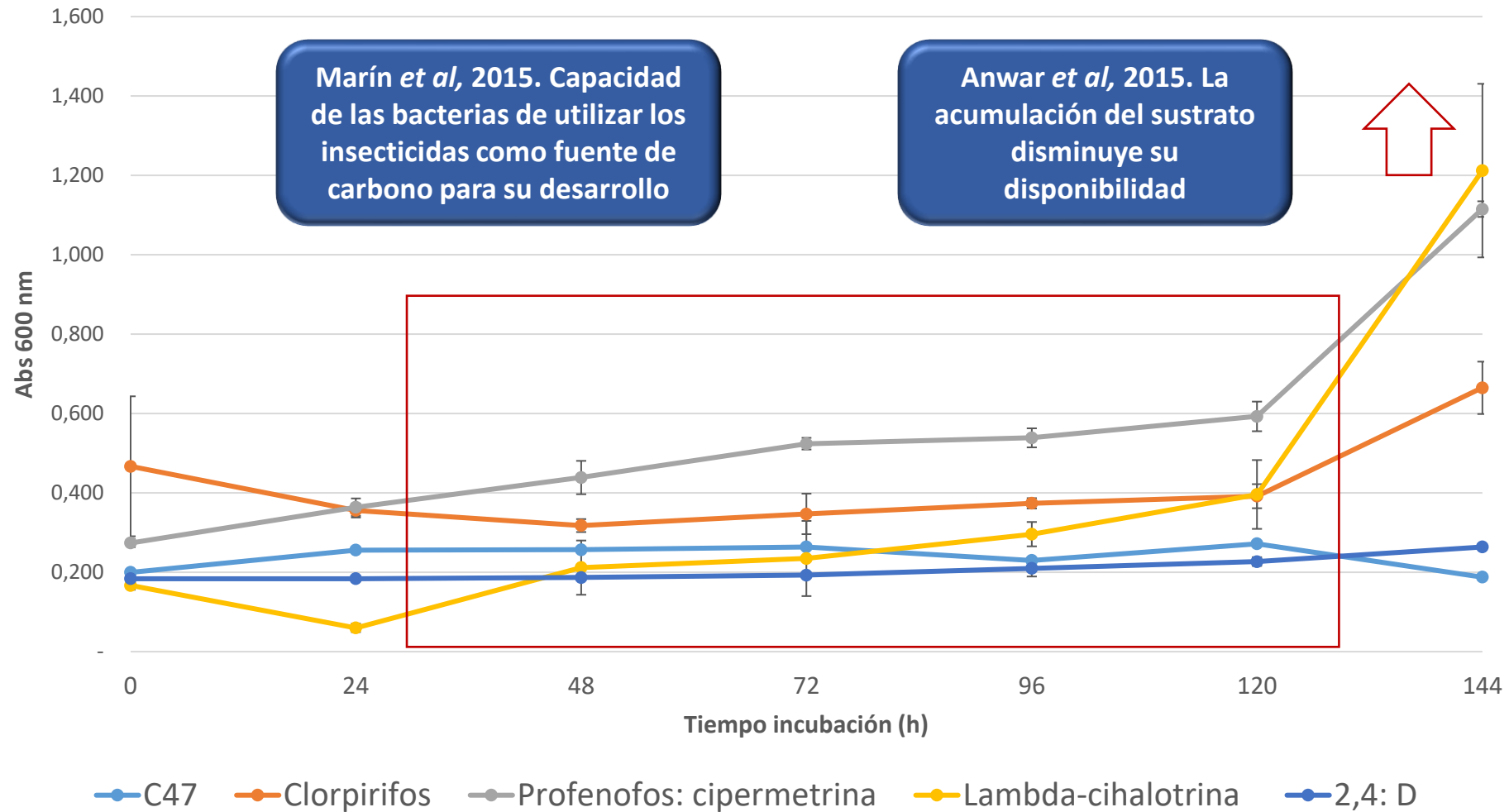
Crecimiento en MSM sólido con
2,4: D

Cepas	20ppm	50ppm	100ppm	300ppm	500ppm
2B	++	++	++	+++	-
3A	+	++	+	+++	+
3B	-	+	++	+	+
6A	+++	++	+	++	-
1A2	++	++	++	+++	++
1A3	++	++	++	+++	++
M4	+	++	-	+++	++
TN152	+++	+++	++	++	+
C47	++	++	++	+++	+

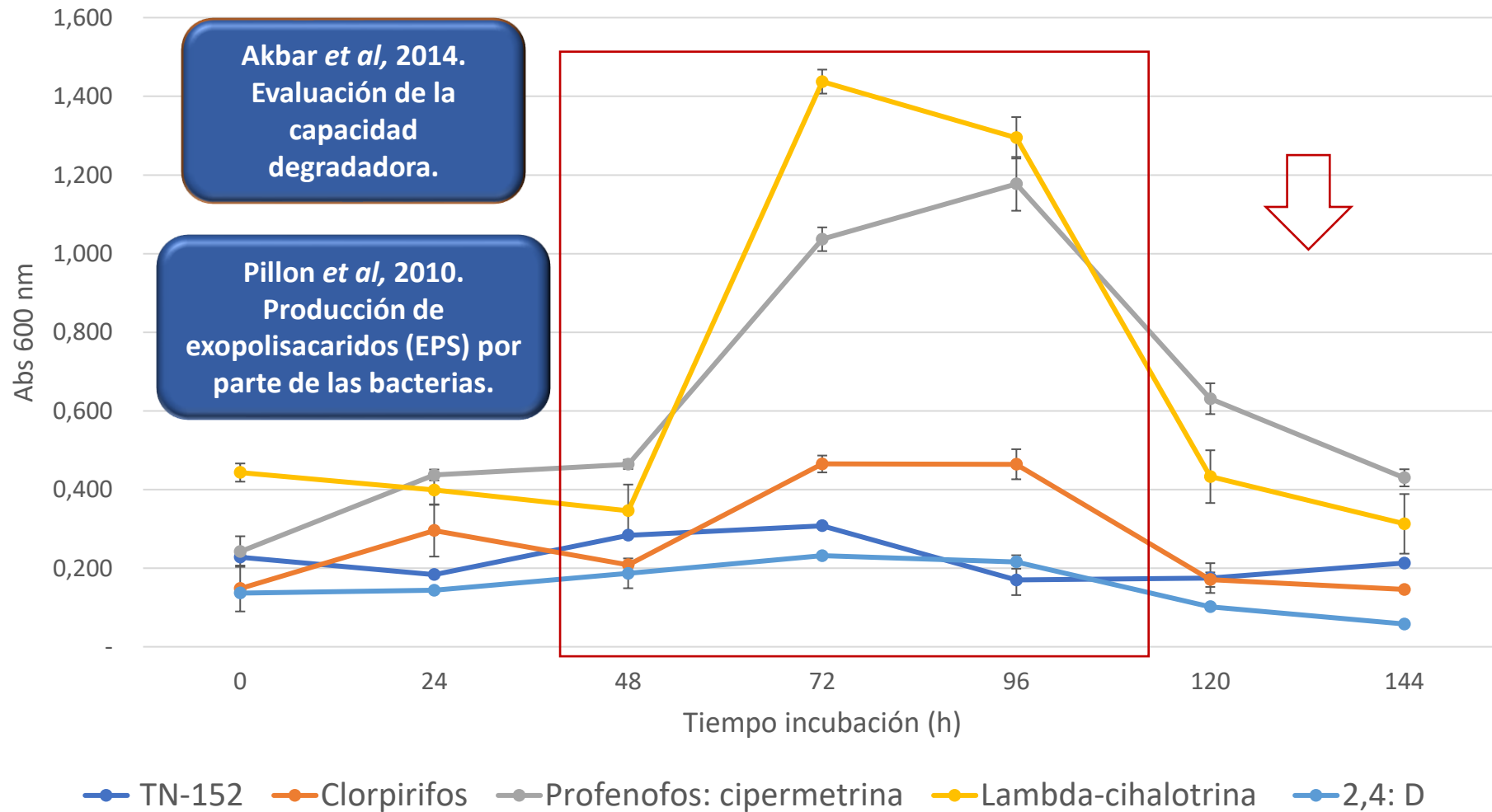
R. terrigena no ha sido reportada como degradadora de plaguicidas.

Crecimiento negativo: (-), escaso: (+), moderado (++), abundante: (+++), muy abundante: (++++).

Cinética de crecimiento de *Raoultella terrigena* C47.



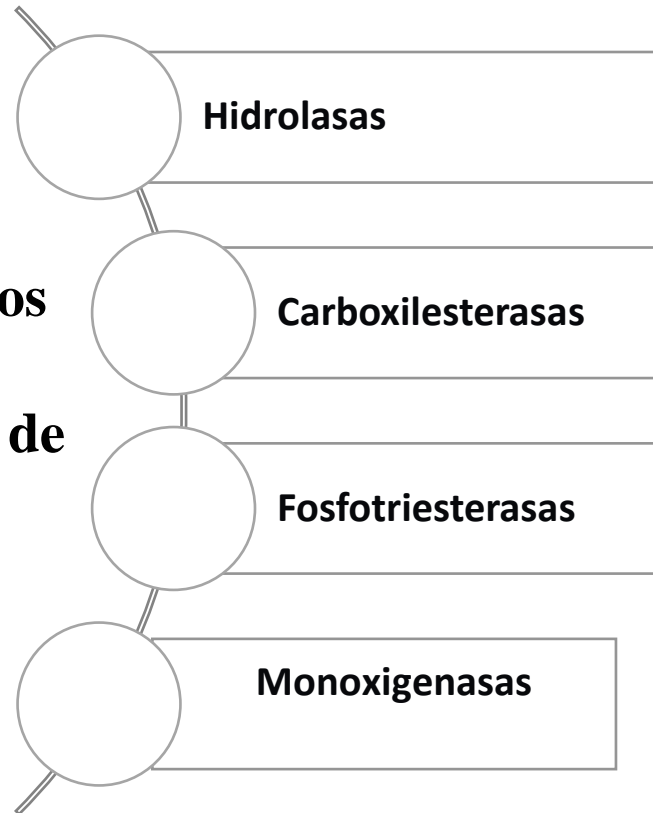
Cinética de crecimiento de *Enterobacter asburiae* TN152



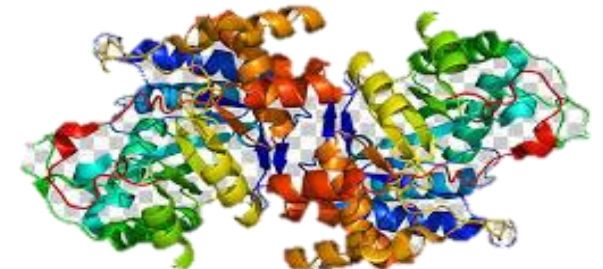
Objetivo 2. Identificar mediante herramientas de bioinformática, los mecanismos de degradación

22 genes

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



Bertrand *et al*, 2015. Las bacterias pueden movilizar una cantidad de enzimas para poder utilizar una fuente de carbono.



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

Kryuchkova *et al*, 2014. Capacidad de *E. cloacae* para degradar el glifosato por la presencia del sistema enzimático C-P liasa.

***E. asburiae* TN- 152**
Compuestos y enzimas asociados a la degradación de xenobióticos.

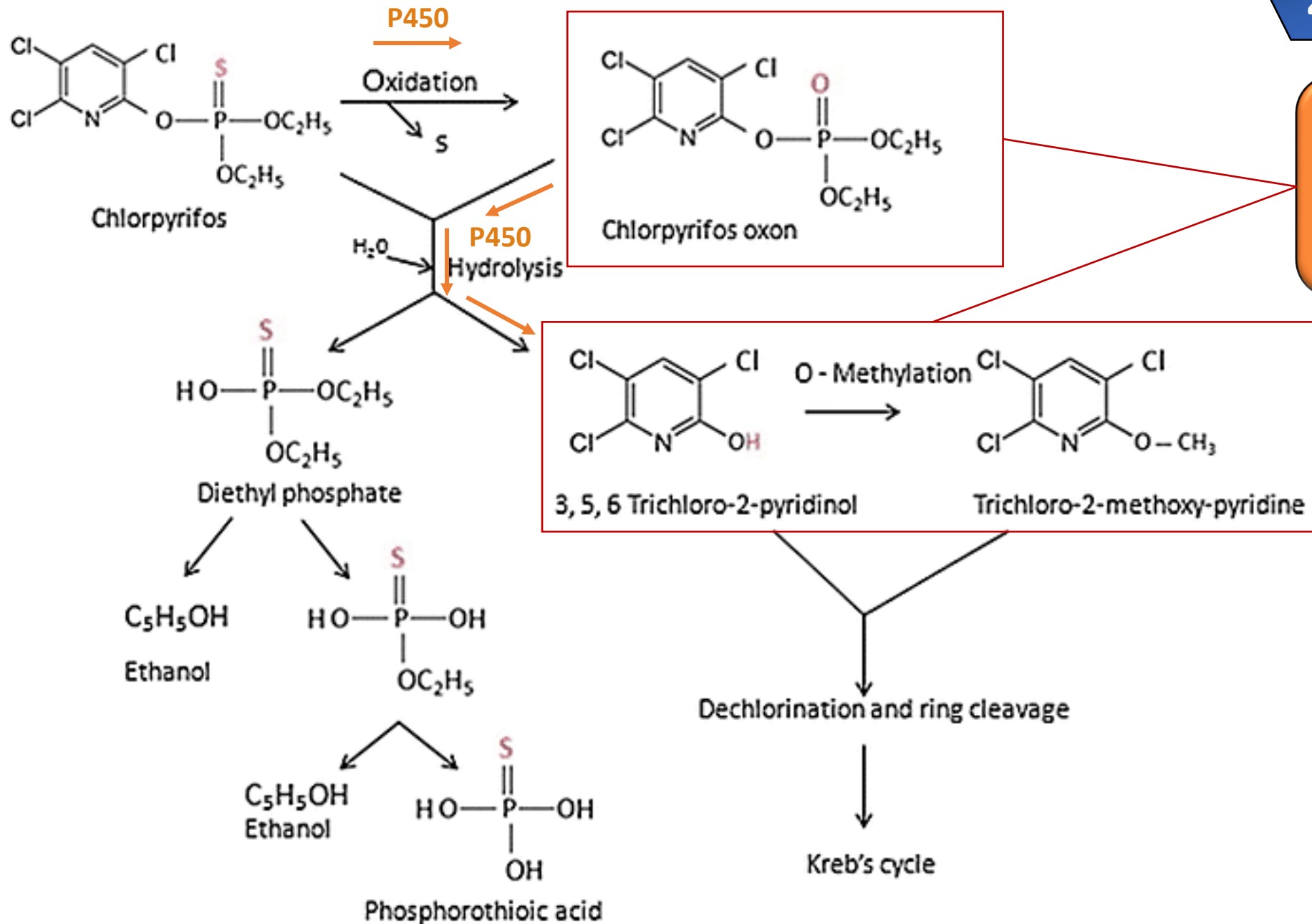
2 Resultados

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

Presencia de la complejo enzimático Citocromo P450 ha sido reportado en la degradación de clorpirifos

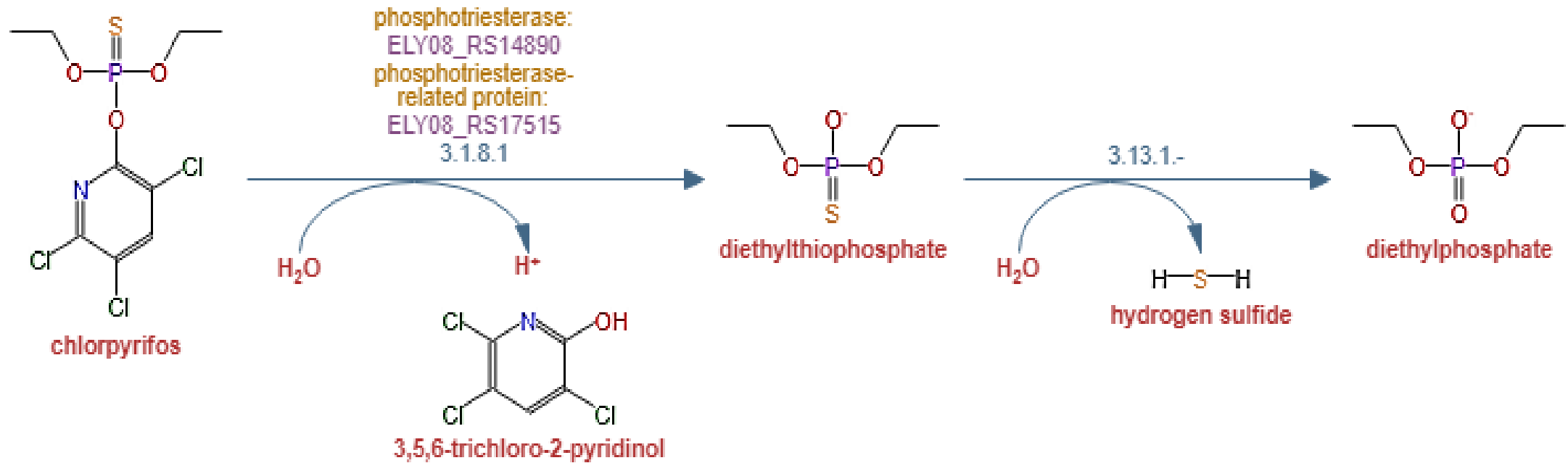
***R. terrigena* C47**
Compuestos y enzimas asociados a la degradación de xenobióticos.

2 Resultados

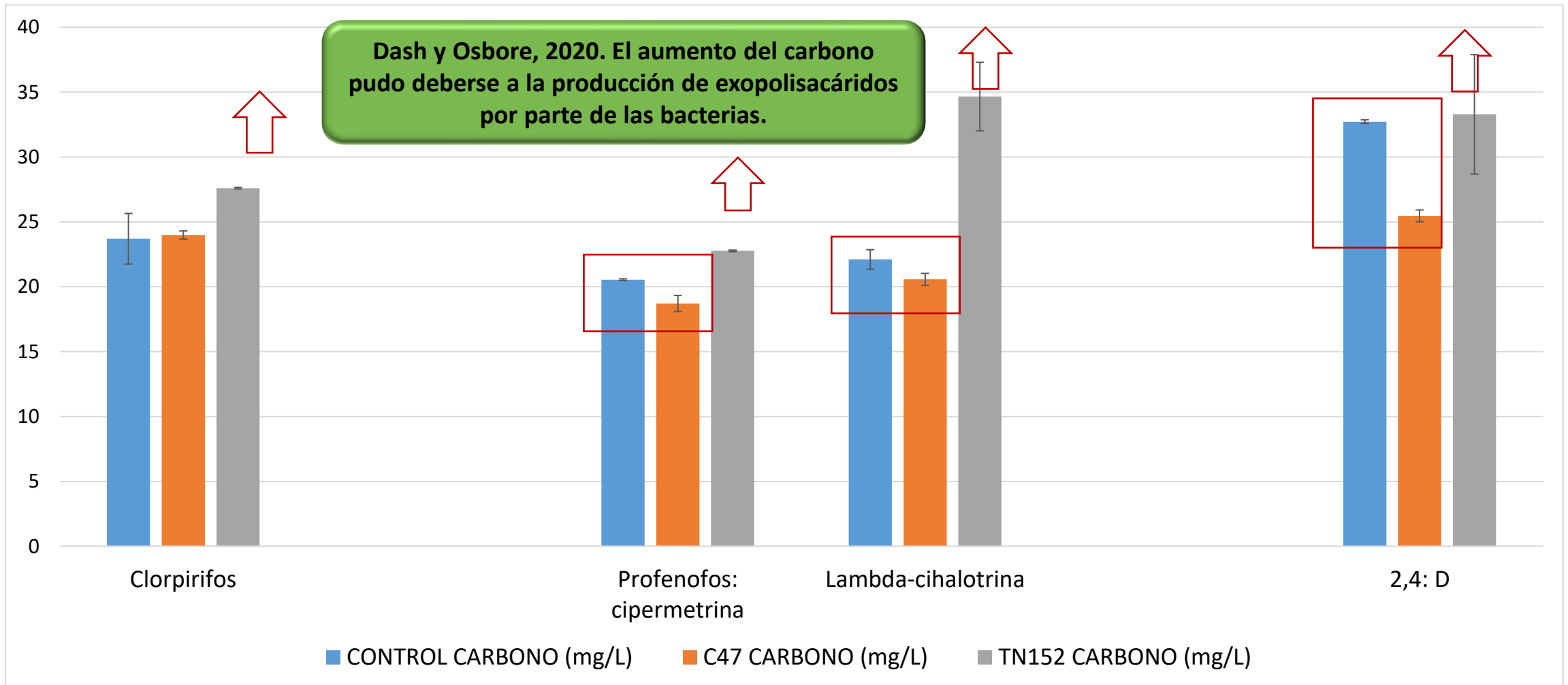


John y Shaik, 2015.
Proceso de degradación a nivel enzimático y molecular para esclarecer la ruta degradativa de Clorpirifos.

Raoultella terrigena NCTC13098 Vía: degradación del clorpirifos

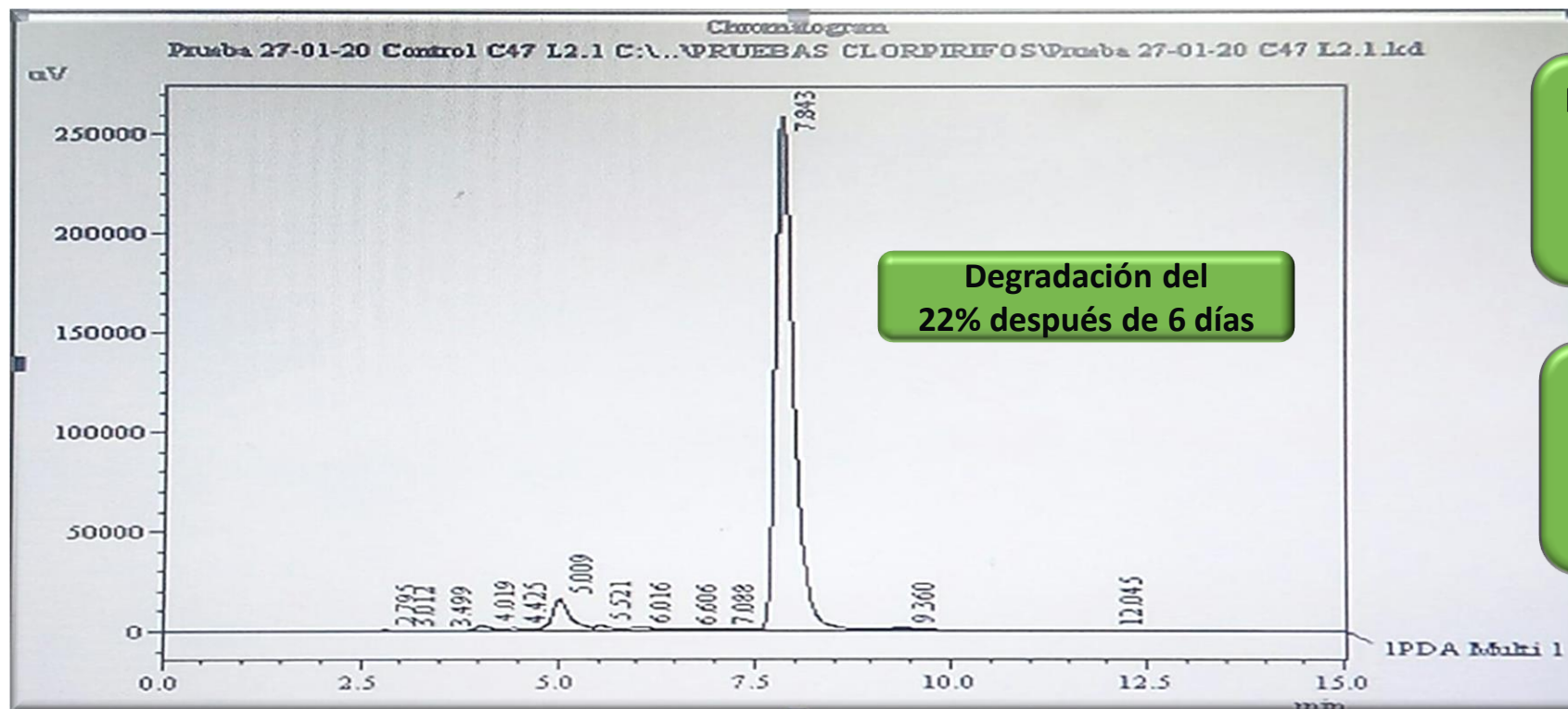


Medición de Carbono orgánico total (COT) mediante espectrofotometría de luz visible.



Determinación del potencial de degradación Clorpirifos por HPLC.

Cromatograma para Clorpirifos



Marín *et al*, 2015. Degradación de Clorpirifos: reducción del 73.50% y 69.67% en un periodo de 96 horas.

Akbar *et al*, 2014. La cepa *Pseudomonas mendocina* degradó 60.5% después de 10 días.

CONTROL	TRATAMIENTO C47
5.206.383 (93.199)	4.051.567 (8.1399)

Promedio y error estándar.



CONCLUSIONES

1. *R. terrígena* C47 y *E. asburiae* TN152 tienen la capacidad de asimilar los insecticidas Clorpirifos y Profenofos; Piretroides: Cipermetrina y Lambda-cihalotrina; y el herbicida 2,4: D como única fuente de carbono.



CONCLUSIONES

2. Se reportaron genes y enzimas asociados a la degradación de compuestos xenobióticos. *Enterobacter asburiae* TN152 participa en la degradación de 8 compuestos y *R. terrígena* C47 en 14.
3. *R. terrígena* C47 y *E. asburiae* TN152 podrían degradar el insecticida organofosforado como Clorpirifos por la enzima citocromo P450.



CONCLUSIONES

4. La técnica de HPLC permitió comprobar la disminución de la concentración de Clorpirifos presente en el medio mínimo de sales con *R. terrígena* C47.



Millares Torrón, 2019



Recomendaciones

- Evaluar la degradación en periodos más prolongados.
- Estandarizar las técnicas de HPLC para Profenofos: Cipermetrina, lambda cihalotrina y el herbicida 2,4; D.
- Evaluar las cepas en consorcio.



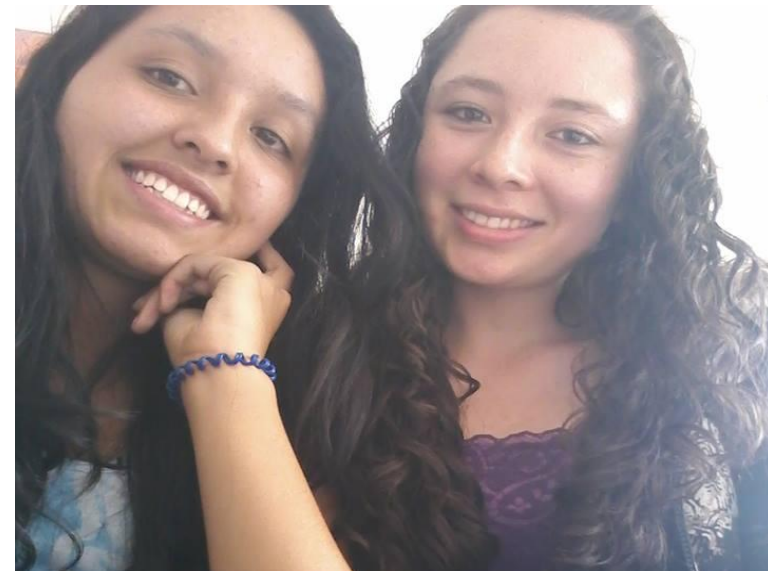
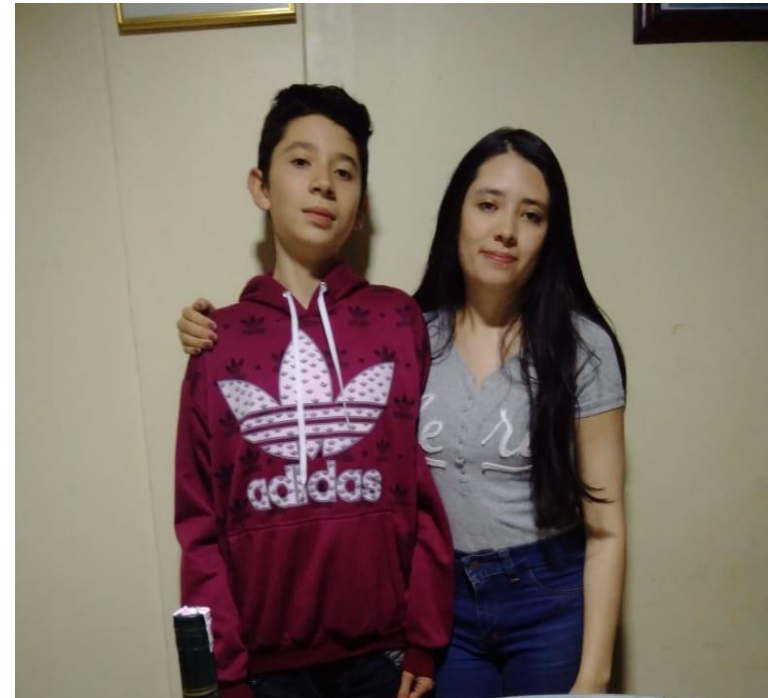
Agradecimientos



COLCIENCIAS
COLOMBIA

Financiamiento “Interacciones entre Tectia solanivora, rizobacterias con actividad entomopatógena y plantas de papa para favorecer la competitividad de la cadena papera en el Departamento de Boyacá” Convocatoria 794-2017.






Referencias

- Akbar S, Sultan S, Kertesz M. Bacterial community analysis in chlorpyrifos enrichment cultures via DGGE and use of bacterial consortium for CP biodegradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014;30(10):2755–66.
- Marín L. LF, Jaramillo Colorado BE. Aislamiento de bacterias degradadoras de pesticidas organofosforados encontrados en suelos y en leche bovina. 2015;42(2):179–85.
- Jaramillo B, Bermudez A, Tirado I. Organophosphorus pesticides degrading bacteria present in contaminated soils. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 2016;25(3):13–22.
- Maldonado L. Evaluación de la biodegradación de un insecticida organofosforado en muestras de suelo de cultivo de papa mediante 57 *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*. [Internet]. 2017. Available from: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Fujioka K, Casida JE. Glutathione S-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields S-phospho-, S-aryl-, and S-alkylglutathione derivatives. *Chemical Research in Toxicology*. 2007;20(8):1211–7
- Singh B, Walker A, Morgan J, Wright D. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(8):4855–63.
- Jabeen H, Iqbal S, Anwar S. Biodegradation of chlorpyrifos and 3, 5, 6- trichloro-2-pyridinol by a novel rhizobial strain *Mesorhizobium* sp. HN3. *Water and Environment Journal*. 2015;29(1):151–60
- Pillon M, Pau C, Lequart V, Pilard S, Courtois B, Courtois J, et al. Structural investigation of an exopolysaccharide substituted with a lactyl ether group produced by *Raoultella terrigena* Ez-555-6 isolated in the Chernobyl exclusion zone. *Carbohydrate Research* [Internet]. 2010;345(9):1163–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2010.03.015>
- Bertrand J, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P, Sime-Ngando T. *Applied Microbial Ecology and Bioremediation. Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. 2015. 1–883 p
- John E, Shaik J. Chlorpyrifos: pollution and remediation. *Environmental Chemistry Letters*. 2015;13(3):269–91.
- Kryuchkova Y, Burygin G, Gogoleva N, Gogolev Y, Chernyshova M, Makarov O, et al. Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiological Research* [Internet]. 2014;169(1):99–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.03.002>
- Dash D, Osborne W. Rapid biodegradation and biofilm-mediated bioremoval of organophosphorus pesticides using an indigenous *Kosakonia oryzae* strain -VITPSCQ3 in a Vertical-flow Packed Bed Biofilm Bioreactor. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [Internet]. 2020;192(January):110290. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110290>


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

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


Preparación de muestras de plaguicidas individuales



Clorpirifos, profenofos:
cipermetrina (5:1),
lambdacihalotrina y
ácido 2,4-
diclorofenoxiacético.




Soluciones madre en
metanol de cada uno de
los insecticidas a
una concentración de
1000 ppm en 25 mL.




Se tomó una alícuota
de 0.10 mL de cada
solución preparada, se
aforó a 100
mL con agua

Las soluciones presentaron una concentración final de metanol a 0.10% y de cada uno de los compuestos activos de los pesticidas: 1 ppm


Preparación muestras HPLC



Se tomó una alícuota de 5
ml de cada disolución y se
añadió a cada una 1.5
g de NaCl; se agitó hasta
solubilizar

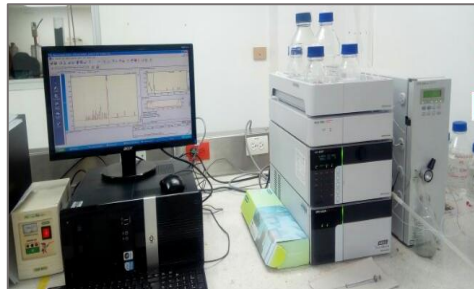


10 ml de acetato de etilo, se agitó
aproximadamente por 10 min y
se trasvasó a embudo decantación para
la separación, dejando formar las
fases por unos 5 a 10 min.



Se tomó 10 ml de sobrenadante y
concentró en un rota evaporador

Se recuperó con 1 ml de
acetonitrilo o de fase
móvil .
Se filtró con filtros de
jeringa 0,45 µm.



Se inyectó la
muestra en el
equipo.

Fase móvil	Acetonitrilo:Agua:Ácido acético glacial
Temperatura	25°C
Flujo	0,6 ml/min
Longitud de onda	290nm

Espectro UV-Vis del compuesto clorpirifos

