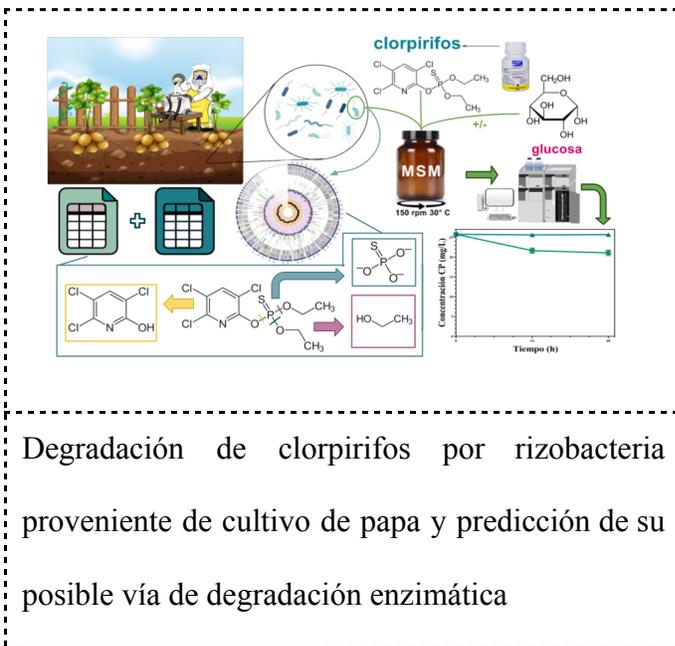


**Degradación del insecticida clorpirifos por *Pseudomonas aeruginosa*,
 rizobacteria aislada de cultivo de papa (*Solanum tuberosum*)**

**Degradation of the insecticide chlorpyrifos by *Pseudomonas aeruginosa*,
 rhizobacteria isolated from potato (*Solanum tuberosum*) crop**

Graphical Abstract (GA)



**Degradación del insecticida clorpirifos por *Pseudomonas aeruginosa*,
rizobacteria aislada de cultivo de papa (*Solanum tuberosum*)**

**Degradation of the insecticide chlorpyrifos by *Pseudomonas aeruginosa*,
rhizobacteria isolated from potato (*Solanum tuberosum*) crop**

Alba Marcela Gómez Gómez¹

¹ Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.

Dirigido por: Dra. Diana Martínez Pachón y Dr. Javier Vanegas Guerrero

Resumen

El insecticida clorpirifos se usa en variedad de cultivos agrícolas de todo el mundo y su aplicación a gran escala ha provocado contaminación ambiental. En este trabajo se determina la tasa de degradación de clorpirifos por la rizobacteria *Pseudomonas aeruginosa* (TN50) proveniente de cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en medio mínimo de sales. Se detectaron genes y enzimas en el genoma de TN50 que pueden estar asociados a la degradación de clorpirifos y sugieren que la bacteria podría degradar el insecticida como fuente de fósforo y carbono. Se validó la técnica cromatográfica y de extracción líquido-líquido para el seguimiento de clorpirifos y su principal metabolito de degradación 3,5,6-tricloro-2-piridinol y se estableció la capacidad de TN50 para usar el insecticida como única fuente de carbono. Se determinó la disminución del 17.43% de clorpirifos por *P. aeruginosa* con glucosa como fuente externa de carbono y con previa activación metabólica en medio con glucosa y clorpirifos, lo que indica que

TN50 no tiene la capacidad de utilizar el insecticida como única fuente de carbono pero puede llegar a degradar el compuesto como fuente externa de nutrientes. Estudios adicionales de degradación podrían determinar el potencial de TN50 para la biorremediación de este tipo de contaminantes.

Abstract

The insecticide chlorpyrifos is used on a variety of agricultural crops around the world, and its large-scale application has caused environmental contamination. In this work, the degradation rate of chlorpyrifos by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* (TN50) from potato (*Solanum tuberosum*) crop in minimal salt medium was determined. Genes and enzymes were detected in the genome of TN50 that may be associated with chlorpyrifos degradation and suggest that the bacterium may degrade the insecticide as a source of phosphorus and carbon. The chromatographic and liquid-liquid extraction technique for the monitoring of chlorpyrifos and its main degradation metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol was validated and the capacity of TN50 to use the insecticide as a sole carbon source was established. A 17.43% depletion of chlorpyrifos by *P. aeruginosa* was determined with glucose as an external carbon source and with prior metabolic activation in medium with glucose and chlorpyrifos, indicating that TN50 does not have the capacity to use the insecticide as a sole carbon source but can degrade the compound as an external nutrient source. Additional degradation studies could determine the potential of TN50 for bioremediation of this type of pollutants.

Keywords: chlorpyrifos, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, degradation, *Pseudomonas aeruginosa*, genes, enzymes.

Introducción

La papa es uno de los productos alimenticios más importantes del mundo [1] y uno de los principales cultivos agrícolas en Colombia [2]. La producción total de papa ocupa el 3.3% del producto interno bruto (PIB) agropecuario de Colombia [1] con una productividad de más de 2.000.000 t anuales, proporcionadas principalmente por los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia para consumo local, y más de 1 000 t para exportación a Estados Unidos, Curazao, Panamá, España, entre otros países [1,2].

En Colombia la producción de papa (*Solanum tuberosum*) aumentó en los últimos 18 años un 8% [1] debido a un incremento en el uso de insecticidas que favorecen la productividad agrícola [3,4] y la calidad de los productos [3] al protegerlos de plagas como el gusano blanco (*Premnotrypes vorax*), la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) y la pulguilla (*Epitrix cucumeris*) [5]. Anualmente, Colombia produce cantidades considerables de plaguicidas equivalentes a más de 22 millones de Kg y 66 millones de L [6] incluyendo aquellos insecticidas que tienen como compuesto activo clorpirifos (CP) (*O, O*-dietil-*O*-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato) (2921-88-2) [7].

El insecticida organofosforado CP es el más usado desde 1965 en todo el mundo [8,9,10,11,13] en cultivos de papa, maíz, algodón, cítricos, frutas, nueces, remolacha, legumbres, tabaco, maní, cebolla, entre otros [14]. El CP es el sustituto de insecticidas organoclorados y carbamatos debido a su alta eficacia frente a diversas plagas [15] al inhibir de forma irreversible la acetilcolinesterasa (AChE) [16,17,18] lo que disminuye el proceso de degradación y causa acumulación excesiva del neurotransmisor acetilcolina (ACh) [19,20] provocando sobreestimulación de las células diana [12,16] y parálisis de varios receptores que terminan en un fallo del sistema nervioso central y periférico [19,21].

Aunque los insecticidas juegan un papel importante en la agricultura [22], el uso masivo de CP ha provocado en muchas partes del mundo contaminación del suelo, el aire y el agua [23] a través de su liberación por diversos procesos industriales y agrícolas [24] como es la aplicación directa a cuerpos de agua [25] o suelo, fumigación de cultivos [26], enjuague de contenedores, derrames accidentales [11], descuido de recipientes vacíos [27] y descargas de plantas de fabricación de insecticidas [28].

El CP se puede desplazar en el medio ambiente por escorrentía agrícola [29,30] o filtración a través del suelo [26] disuelto o asociado a partículas [29] de acuerdo a factores como las características del suelo, la topografía, el clima, las prácticas agrícolas y las propiedades fisicoquímicas del propio CP [27], lo que genera que solo el 0.1% del insecticida aplicado cumpla su objetivo [3] y su vida media en el ambiente sea desde menos de un día [31] hasta por más de un año [32].

El CP puede acumularse en diferentes ecosistemas como sedimentos marinos, arroyos, sumideros, lodos, ríos, desagües pluviales urbanos, lagos, aguas subterráneas, niebla, lluvia y aire debido a su alto coeficiente de absorción y baja solubilidad en agua [18,27,33]; también se ha detectado CP en alimentos como cereales, hortalizas, granos [21,22], tomates, algodón, aceites y mostaza [14] alertando por su impacto en el ecosistema y la salud humana [23,34].

Aunque el CP se considera moderadamente tóxico ha provocado graves daños a especies no objetivo [18,26] como los seres humanos (Toxicidad >20 ppb) que entran en contacto con el insecticida y desarrollan una intoxicación severa con dolor de cabeza, sudoración, náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de coordinación [7] y en algunas ocasiones con la muerte [19,23]. Los peces también son ampliamente afectados por CP en concentraciones mayores a 0.367 ppb [7] y la toxicidad puede aumentar por la presencia de varios tipos de insecticidas [31] que son poco

estudiadas de manera sincrónica porque las pautas para determinar citotoxicidad se basan solo en las sustancias químicas individuales [25].

Por otra parte, el CP puede descomponerse en el medio ambiente por hidrólisis en el enlace fosfodiéster [35,36] a dietil tiofosfato (DETP) y 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) o puede oxidarse en el azufre de la porción $\frac{1}{4}$ S-P de la molécula para producir CP-oxon (CPO) que se hidroliza fácilmente a TCP y dietil fosfato (DEP); el TCP muy pocas veces en cualquiera de las dos rutas se metaboliza a tricloro-metoxipiridina (TMP) o productos más pequeños [30,36] a causa de sus características químicas que limitan su degradación [3].

El TCP no solo es el metabolito principal de degradación del CP sino también el de muchos otros compuestos relacionados estructuralmente [35]. A este metabolito se le clasifica como compuesto persistente [32,35,37], tiene una vida media entre 65 y 360 días (d) [32,34] y sólo una minoría de microorganismos contribuyen a su degradación [13, 34] porque este tiene efectos antimicrobianos y al reducir el número de bacterias limita su degradación y la del propio CP [32,37].

Frente a esta problemática se ha prohibido el uso de CP en países desarrollados [12,25] y se han diseñado numerosos tratamientos fisicoquímicos para eliminar CP y sus metabolitos de degradación del medio ambiente pero estos métodos son ineficientes a baja concentración de contaminantes, son costosos (costo-beneficio) y generan varios productos tóxicos para los ecosistemas [13,18,19, 24]. Existe otra estrategia rentable (costo-beneficio), eficiente y amigable con el ambiente como es el uso de microorganismos [31,32,38] y sus enzimas para la degradación y transformación de contaminantes [24] a través de vías catabólicas para obtener energía y nutrientes como carbono, nitrógeno o fósforo o mediante co-metabolismo donde se degrada CP durante la actividad normal de la bacteria sin obtener ningún beneficio [14,22,39].

Las *Pseudomonas* son microorganismos metabólicamente adaptables, abundantes en el suelo y capaces de degradar gran número de contaminantes como hidrocarburos aromáticos, aceites, productos de petróleo y plaguicidas en los que se clasifica CP [14] demostrando su capacidad para ser usadas como estrategia de biorremediación ambiental [19,23,38]. Varios aislamientos de *Pseudomonas* han evidenciado la degradación de hasta 100 mg/L de CP a partir del estándar como única fuente de carbono en un tiempo variable de 2 d [10], 5 d [38] y 9 d [18]; en algunos casos demostrando ausencia de TCP [38], indicativo de que tanto CP como el TCP pueden ser degradados de manera eficiente por estas bacterias [11]. El tiempo de degradación del CP depende de su concentración y del género de bacteria usado; Hossain et al., (2014) reportan que a partir del estándar de CP *Pseudomonas peli* tarda 8 d y 14 d en degradar 20 mg/L y 50 mg/L del organofosforado, respectivamente, como única fuente de carbono; en comparación con *P. aeruginosa* que degrada 140 mg/L de CP estándar en 10 d [33]. Asimismo, *P. aeruginosa* degrada el 84% de 50 mg/L de CP estándar después de 20 d [23]. También se han reportado consorcios bacterianos de *Pseudomonas* que incluyen a *P. aeruginosa* que degradan 150 mg/L del insecticida CP en 5 d [31] y Sasikala et al., (2011) reportan un consorcio que degrada 500 mg/L de CP insecticida en 7 d. La respuesta de la adición de una fuente externa de carbono como la glucosa (>1 000 mg/L) a esos ensayos es el aumento de la degradación de CP estándar [4,16] y del insecticida comercial [31].

Las oxidorreductasas y las hidrolasas son enzimas que participan activamente en el proceso de biorremediación [24], dentro de estas se destaca la arildialquilfosfatasa (EC 3.1.8.1), una fosfotriesterasa también conocida como organofosfato hidrolasa, paraoxonasa, paraoxon esterasa, A-esterasa, ariltrifosfatasa, esterasa organofosforada, entre otros nombres [4]. Esta enzima fue aislada por primera vez de *Pseudomonas diminuta* y demuestra una actividad hidrolítica

significativa frente a insecticidas organofosforados y es la principal enzima de degradación de estos compuestos [4].

Basados en estos antecedentes, este trabajo tiene como objetivo determinar la tasa de degradación del insecticida CP por la rizobacteria TN50 (*P. aeruginosa*) proveniente de cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en medio mínimo de sales (MMS) mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Esta bacteria previamente había demostrado crecimiento en agar mínimo de sales a diferentes concentraciones del insecticida por lo que se estableció como posible bacteria degradadora de CP. A partir de la secuencia del genoma de TN50 se detectaron genes y enzimas que pueden estar asociados a la degradación de CP y se predijo la posible vía de degradación del compuesto por la bacteria. Se validó la técnica cromatográfica y de extracción líquido-líquido para el seguimiento de CP y TCP durante la degradación y se estableció la capacidad de TN50 para usar el insecticida como única fuente de carbono.

Antecedentes grupo de investigación: Selección de bacterias

La *P. aeruginosa* (TN50) se reactivó en agar Luria-bertani (LB) a 30 °C por 24 h de un cepario del laboratorio de Microbiología de la Universidad Antonio Nariño que cuenta con una colección de 80 aislamientos bacterianos. Esta bacteria fue aislada del suelo rizosférico de cultivos de papa de la finca Tapias Negras (TN) de la vereda el Cucubo del municipio de Santa Rosa de Viterbo, Departamento de Boyacá, con el fin de estudiar su capacidad entomopatógena, de promoción de crecimiento en plantas y su potencial de degradación de plaguicidas. El insecticida Lorsban que tiene como compuesto activo CP es ampliamente aplicado en cultivos de papa de este sector agrícola se utilizó como insecticida de estudio. Los aislamientos se incubaron en agar mínimo de sales a diferentes concentraciones de CP-Lorsban para identificar de manera cualitativa una

posible capacidad de degradación del compuesto. Durante los ensayos en agar se observó el crecimiento de colonias y se estableció que esto podría indicar el consumo del insecticida para obtención de nutrientes y a las bacterias se les clasificó como posibles degradadoras de CP, entre las que se encontraba TN50. La bacteria de estudio demostró mayor crecimiento en comparación a las demás bacterias y se seleccionó para determinar sus características morfológicas, bioquímicas y genómicas. En la caracterización del genoma, se realizó la extracción de ADN genómico con el Kit Wizard® Genomic DNA Purification y el ADN se cuantificó y se determinó su calidad por espectrofotometría utilizando NanoDrop® y el genoma fue secuenciado por el método de secuenciación aleatoria por la plataforma Illumina Hiseq 4000 con finales pareados (Compañía Beijing Genomics Institute). Al producto de secuenciación se le realizó el análisis de calidad por el programa FastQC versión 0.11.4, el ensamblaje de novo mediante SPAdes versión 3.10.0, MUMmer e IMAGE, se le realizó el análisis filogenético por la herramienta Comprehensive Genome Analysis y se diseñó el árbol filogenético con la herramienta Phylogenetic Tree Building (método de FastTree), la anotación funcional y estructural de las secuencias codificantes (CDS) (Anexo 1) se llevó a cabo mediante la herramienta RAST tool kit (RASTtk); todas las herramientas utilizadas para el análisis y estudio del genoma se encontraban disponibles en la plataforma The Pathosystems Resource Integration Center (PATRIC) (<https://www.patricbrc.org/>) Versión 3.5.38 [40]. La información recopilada de cada uno de los estudios realizados permitieron determinar que TN50 pertenece al género *Pseudomonas* de la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

Materiales y Reactivos

El metanol, acetonitrilo y ácido acético glacial de grado analítico se adquirieron de Panreac. Los estándares cromatográficos utilizados de CP (98.0%) y TCP (98.0%) son de la marca Sigma Aldrich. Las soluciones de CP y TCP para la curva de calibración se prepararon a partir de una solución madre de 1 000 mg/L de cada estándar en acetonitrilo. El insecticida se adquirió del mercado local (Lorsban 48 EC) y se preparó a 25 500 mg/L de CP-Lorsban en metanol para añadirse al MMS líquido a 25 mg/L de CP y 0.1% metanol. Para la degradación de CP el MMS a pH 7 ± 0.3 contenía (g/L): 1.0 NH_4NO_3 ; 0.5 NaCl; 0.2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.5 KH_2PO_4 y 1.5 K_2HPO_4 [10] en agua destilada y se esterilizó a 121 °C por 20 min; estos reactivos y la glucosa grado reactivo se obtuvieron de Merck.

Metodología

1^{er} Obj. *Detectar genes relacionados con la degradación de CP a partir del genoma de TN50*

1.1. Genes relacionados con la degradación de CP

A partir de bases de datos bibliográficos y artículos de investigación se diseñó una base de datos de genes asociados a la degradación de organofosforados para su posterior búsqueda en el genoma de *P. aeruginosa* (TN50) en la plataforma PATRIC Versión 3.6.12 para detectar la presencia de estos genes en TN50. Adicional, se identificó la enzima de cada gen y su participación en diversas rutas metabólicas mediante Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<https://www.genome.jp/kegg/>) Versión 100.0 [41] (consultada en Octubre-2021) y se estableció el enlace sobre el que actúa cada enzima por la plataforma BRAunschweig ENzyme DAtabase (BRENDA) (<https://www.brenda-enzymes.org/index.php>) Versión 2021.2 [42] (consultada en Octubre-2021) para predecir su posible participación en la

degradación de CP.

2^{do} Obj. Predecir la posible vía de degradación de CP por TN50 a partir de su genoma

2.1. Vía de degradación de CP

A partir de genes y secuencias codificantes (CDS) del genoma de *P. aeruginosa* (TN50) que reporta la plataforma PATRIC Versión 3.6.12; se identificaron todas las posibles enzimas asociadas a la degradación de CP y se determinó su participación en la vía de degradación mediante el sistema de predicción EAWAG BBD-PPS (<http://eawag-bbd.ethz.ch/predict/>) que predice vías para la degradación microbiana de compuestos químicos y que ya ha sido implementada en CP por Khan et al., (2014). Las predicciones se basan en reglas de biotransformación reportadas en la base de datos EAWAG-BBD o en la literatura [43]. Debido a la poca información sobre enzimas capaces de degradar TCP, a partir de enzimas presentes en el genoma de TN50 que podrían degradar compuestos aromáticos se identificaron posibles enzimas asociadas a la degradación de TCP porque es probable que se pueda metabolizar de manera similar a compuestos relacionados estructuralmente [39].

3^{er} Obj. Validar la técnica analítica para el seguimiento por HPLC de la concentración del insecticida CP durante su degradación por TN50

3.1. Validación del método de HPLC para el seguimiento de CP y TCP

Se utilizó un sistema HPLC equipado con una columna C18 (150 mm x 3 mm, 5 µm) en un equipo Shimadzu LC-20AT con un detector de fotodiodos SPD-M20A ajustado a 290 nm para CP y 298 nm para TCP. La fase móvil contenía acetonitrilo:agua acidificada con ácido acético glacial (0.1%) (85:15) [32] a 25 °C en condiciones isocráticas con un flujo de 0.4 ml/min. Bajo estas condiciones, TCP y CP eluyen a 2.5 min y 5.6 min, respectivamente. La concentración de CP y TCP se determinó con una curva de calibración para concentraciones entre 0.1 mg/L y 25

mg/L con soluciones estándar. Para validar el método analítico, a partir de las curvas de calibración se analizó la linealidad, precisión, exactitud, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) para CP y TCP. Además se calculó el coeficiente de correlación, la desviación estándar, el coeficiente de varianza, t de student, el factor beta e intervalos de confianza en cada caso.

3.2. Validación del método de extracción líquido-líquido para el seguimiento de CP y TCP

Se llevó a cabo una extracción líquido-líquido diluyendo 1 ml de MMS suplementado con CP (25 mg/L) en 1 ml de acetonitrilo grado HPLC [31], la extracción se filtró mediante membrana de poliamida (0.22 μm) [27,32] y las muestras se mantuvieron en oscuridad a 4 °C antes de su análisis por HPLC. Para la validación de la técnica se analizaron 25 mg/L de CP por HPLC evaluando las siguientes condiciones: (1) MMS suplementado con CP sin extracción con acetonitrilo y sin filtración por membrana, (2) 1 ml de MMS suplementado con CP estándar diluido en 1 ml de acetonitrilo, sin filtración por membrana, (3) 0.5 ml de MMS suplementado con CP estándar diluido en 1.5 ml de acetonitrilo, sin filtración por membrana, (4) 1.5 ml de MMS suplementado con CP estándar diluido en 0.5 ml de acetonitrilo, sin filtración por membrana, (5) 1 ml de MMS suplementado con CP-Lorsban filtrado por membrana y diluido en 1 ml de acetonitrilo y (6) 1 ml de MMS suplementado con CP-Lorsban diluido en 1 ml de acetonitrilo y luego filtrado por membrana. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado; se determinaron los porcentajes de recuperación de cada una de las extracciones, se calculó la desviación estándar y el coeficiente de varianza y se estableció la condición de trabajo cuyo porcentaje de recuperación de CP fuera más alto.

*4^o Obj. Establecer la capacidad de TN50 (*P. aeruginosa*) para usar el insecticida CP como única fuente de carbono*

4.1. Preparación de inóculo

Se prepararon tres pre-inóculos en MMS líquido con 1 000 mg/L de glucosa (pre-inóculo 1), 25 mg/L de CP (pre-inóculo 2) y 1 000 mg/L de glucosa y 25 mg/L de CP (pre-inóculo 3) con el fin de evaluar con cada pre-inóculo si se requiere de una previa activación metabólica de las bacterias a CP para una degradación exitosa. Los pre-inóculos se incubaron en un agitador rotativo a 150 rpm y 30 °C [26,33] por ~20 h. Luego, las bacterias se centrifugaron a 10 000 rpm durante 5 min [19], los sedimentos se resuspendieron en MMS [32] y se ajustó el valor de densidad óptica (DO) a 0.8 ($\sim 3 \times 10^6$ células/ml) a 600 nm [4,37] mediante un espectrofotómetro tipo UV/VIS (Shanghai Mapada Instruments Co). Se utilizó como control medio no inoculado con la misma concentración de glucosa y CP respectivamente.

4.2. Degradación del insecticida CP

Con cada pre-inóculo se realizaron ensayos de degradación para establecer la capacidad de TN50 para degradar 25 mg/L de CP como única fuente de carbono y determinar el efecto de una fuente externa de carbono como la glucosa (19 mg/L) sobre la degradación de CP aportando la misma concentración de carbono orgánico (7.70 mg/L). Los medios con el 2% de inóculo [4,16] se incubaron a 150 rpm durante 48 h a 30 °C; cada 24 h se tomó asépticamente una alícuota de 1 ml para el seguimiento de CP y TCP por HPLC. Los controles fueron medios no inoculados con la misma concentración de glucosa y CP, respectivamente. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y en frascos ámbar para evitar la posible fotodegradación del CP [27].

Resultados y Discusión

1. Genes relacionados con la degradación de CP

La degradación de CP por las *Pseudomonas* se da por una serie de rutas catabólicas y enzimas que les permiten metabolizar el compuesto [14]. Para determinar la presencia de genes relacionados con la degradación de CP en el genoma de TN50; se identificaron por literatura, 15 genes asociados a la degradación de organofosforados (Anexo 2). Considerando la información recopilada, se detectaron seis genes en el genoma de TN50 (Tabla 1), los cuales codifican hidrolasas que se han caracterizado por participar activamente en procesos de biorremediación de plaguicidas [24].

Tabla 1. Genes asociados a la degradación de organofosforados encontrados mediante PATRIC (Versión 3.6.12) en el genoma de *P. aeruginosa* (TN50).

GEN	ENZIMA	EC	RUTA METABÓLICA	Enlace en el actua
<i>phoA</i>	Fosfatasa alcalina	3.1.3.1	Metabolismo de tiamina Síntesis de folato y cofactores	Éster
<i>plcH</i>	Fosfolipasa C	3.1.4.3	Metabolismo de Inositol fosfato	Éster
<i>glpQ</i>	Glicerofosforil diéster fosfodiesterasa	3.1.4.46	Metabolismo de Glicerofosfolípidos	Éster
<i>BifA</i>	Fosfodiesterasa	3.1.4.52	Formación de biopelículas	Éster
<i>pepA</i>	Aminopeptidasa	3.4.11.1	Metabolismo de glutatión	Amida
<i>phnX</i>	Fosfono acetaldehído hidrolasa	3.11.1.1	Metabolismo de fosfonato y fosfinato	Carbono-Fósforo

Los enlaces característicos de los insecticidas organofosforados como CP son los éster [29], en los cuales puede actuar la Fosfatasa alcalina (*phoA*), la Fosfolipasa C (*plcH*), la Glicerofosforil diéster fosfodiesterasa (*glpQ*) y la Fosfodiesterasa (*BifA*), hidrolizando CP a DETP [30,36] y

TCP [11], lo que corrobora que esta es la vía de preferencia por las bacterias para degradar CP [3,4,13]. Los genes *phnX* que codifica a la enzima fosfonoacetaldehído hidrolasa (EC 3.11.1.1) y *pepA* que codifica a Aminopeptidasa (EC 3.4.11.1) no podrían hidrolizar CP porque el compuesto no presenta el tipo de enlaces en el que actúa cada enzima.

2. Vía de degradación de CP

Para confirmar y determinar la posible participación de las cuatro enzimas en la hidrólisis de CP, por la predicción por defecto de la vía de degradación del compuesto se confirma que la hidrólisis es la vía más probable de degradación microbiana (Figura 1) y que este paso puede darse por la acción de la Fosfolipasa C (EC 3.1.4.3), enzima reportada en *P. aeruginosa* para descomponer hidrocarburos de petróleo [24], la Glicerofosforil diéster fosfodiesterasa (EC 3.1.4.46) y la Fosfodiesterasa (EC 3.1.4.52); estas tres enzimas pueden continuar la degradación por el compuesto DETP hasta obtener el ion fosforotioato y dos moléculas de etanol; en estos últimos pasos también puede participar la Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1) que se ha postulado como enzima final en la vía de degradación de fosfatos [39]. Esta predicción sugiere que TN50 podría usar CP como fuente de carbono por las moléculas de etanol [9] y como fuente de fósforo por el ion fosforotioato [15,20,33,39] así como lo hace la bacteria *Delftia acidovorans* al descomponer DETP por fosfodiesterasas [44].

Por otro lado, se confirma la difícil degradación de TCP por su estructura química [3] al señalarse como poco probable en la predicción de la vía de degradación de CP (Figura 1) debido a que se requiere de gran número de enzimas que actúen en conjunto para eliminar los enlaces de los átomos de cloro y romper el anillo piridinol [39,43]. Para determinar si TN50 podría contar con enzimas para degradar TCP, se detectaron 44 enzimas entre oxidorreductasas, hidrolasas y

líasas asociadas a la degradación de diversos compuestos aromáticos (Anexo 2) y de los cuales seis enzimas (Tabla 2) podrían participar en la degradación de TCP según EAWAG BBD-PPS.

Tabla 2. *Enzimas asociadas a la degradación de compuestos aromáticos y TCP detectadas en el genoma de P. aeruginosa (TN50).*

EC	Nombre	Compuestos Aromáticos
1.13.11.1	Catecol 1,2-dioxigenasa	2,4-diclorobenzoato
		Benzoato
		Fluorobenzoato
		Gamma-hexaclorociclohexano
1.14.12.12	Naftaleno 1,2-dioxigenasa	1- y 2-metilnaftaleno
		Etilbenceno
		Naftaleno y Antraceno
3.1.3.1	Fosfatasa alcalina	1,4-diclorobenceno
3.5.1.4	Amidasa	Estireno
4.2.1.17	Enoil-CoA hidratasa	1,4-diclorobenceno
		Benzoato
		Caprolactama
4.2.1.57	Isohexenilglutaconil-CoA hidratasa	Geraniol

Para que TN50 pueda posiblemente degradar TCP tendría que expresar los genes de las enzimas detectadas para que actúen en conjunto y rompan los enlaces de los átomos de cloro y dejen libre el anillo piridinol en el cual pueden actuar las enzimas oxidoreductasas como la Catecol 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.1) y la Naftaleno 1,2-dioxigenasa (EC 1.14.12.12) que son enzimas características de bacterias de suelo como las *pseudomonas* y transforman compuestos aromáticos en productos alifáticos [24]. Las oxidoreductasas se han reportado ampliamente en la degradación de muchos contaminantes naturales y artificiales como compuestos de petróleo, colorantes, sustancias fenólicas, metales radioactivos y compuestos clorados [24].

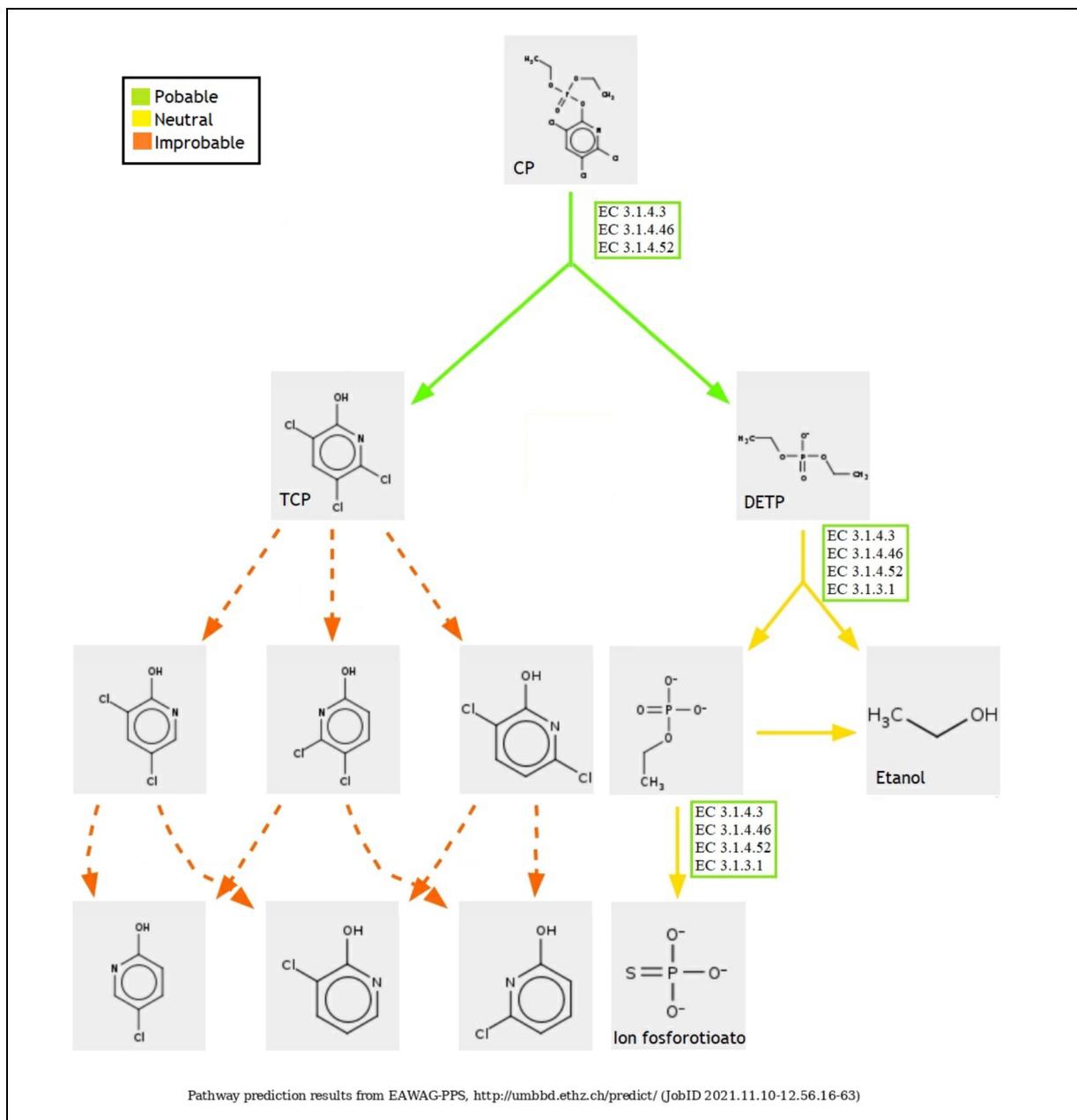


Figura 1. Resultados de la predicción por EAWAG-BBD PPS de la vía de degradación de CP. Clorpirifos (CP), 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), Dietil tiosfosfato (DETP), Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1), Fosfolipasa C (3.1.4.3), Glicerofosforil diéster fosfodiesterasa (EC 3.1.4.46) y Fosfodiesterasa (EC 3.1.4.52)

También se ha informado sobre otras enzimas que pueden participar en la degradación de CP como la polifenol oxidasa, la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión S-transferasa [28]; y de las cuales TN50 presenta catalasa (EC 1.11.1.6) codificada por el gen *KatE*, superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) codificada por *SOD2* y S-transferasa (EC 2.5.1.18); enzimas que también pueden estar involucradas en la degradación de CP por TN50. Las predicciones obtenidas permiten plantear como hipótesis que posiblemente la rizobacteria TN50 podría degradar CP como fuente de fósforo y carbono.

3. Seguimiento de la degradación del insecticida CP por HPLC

Para confirmar la hipótesis planteada, se determinó un método analítico para el seguimiento de CP y su metabolito principal de degradación TCP en ensayos de degradación por TN50 que se realizaron con CP insecticida (25 mg/L) en MMS.

3.1. Validación del método de HPLC para el seguimiento de CP y TCP

Se validó el seguimiento de la concentración de CP y TCP por HPLC. Los cromatogramas de los ensayos de especificidad no presentaron picos interferentes con los analitos de interés al analizar las degradaciones. La curva de calibración de CP y TCP (Anexo 4), mostraron linealidad y correlación entre la concentración del compuesto y el área bajo la curva. Se obtuvo un R^2 estadístico de 0.999 y 0.998 para CP y TCP, respectivamente, y un coeficiente de variación de una concentración inferior al 3.0% entre todas las réplicas, valores aceptados dentro de los criterios establecidos (menor o igual que 5.5%), lo que indica poca dispersión entre las mediciones. Se obtuvieron LOD y LOQ para CP de 0.019 mg/L y 0.125 mg/L, y para TCP de 0.062 mg/L y 0.125 mg/L, respectivamente, lo que garantiza una buena sensibilidad para la detección y cuantificación de los compuestos. En la precisión de las mediciones en las concentraciones de 1, 10 y 25 mg/L de CP y TCP, se obtuvo un coeficiente de variación inferior

al 3.0%; y para la exactitud, el porcentaje de error de las mediciones nunca fue superior a 4.5% (Anexo 5-6). Los resultados obtenidos de los parámetros de validación permiten afirmar que se validó el método para detectar y determinar la concentración de CP y TCP durante la degradación por la rizobacteria.

3.2. Validación del método de extracción líquido-líquido para el seguimiento de CP y TCP

Para validar el método de extracción líquido-líquido de CP en MMS se analizaron por triplicado alícuotas de 1 ml sin extracción con acetonitrilo ni filtración por membrana y se detectó mediante HPLC el 89.7% y el 86.1% de 25 mg/L de CP estándar y Lorsban respectivamente (Anexo 7). Para mejorar las condiciones de detección del compuesto, se diluyó MMS con CP estándar en acetonitrilo en diferentes proporciones de volumen, sin filtración por membrana y se encontraron bajos porcentajes de recuperación al evaluar 0.5 ml de MMS suplementado con CP estándar diluido en 1.5 ml de acetonitrilo (82.8%) (Anexo 8) y 1.5 ml de MMS suplementado con CP estándar diluido en 0.5 ml de acetonitrilo (74.3%) (Anexo 8) en comparación con el análisis de 1 ml de MMS en 1 ml de acetonitrilo donde se obtuvieron altos porcentajes de recuperación de CP estándar (99.1%) (Anexo 8), lo que demuestra que se requiere de un disolvente orgánico para facilitar la solubilidad de CP [19,37] y que la relación volumen de muestra:volumen acetonitrilo más eficiente para la extracción de CP es la relación 1:1. Para la técnica de extracción también se evaluó el filtrado por membrana de las alícuotas, donde se encontró que al filtrar el medio con CP-Lorsban antes de la dilución no se logra la detección del compuesto (Anexo 9) posiblemente porque queda adherido en el filtro en comparación con el alto porcentaje de recuperación del 96.6% que se obtuvo al analizar las alícuotas que se filtraron después de la dilución con acetonitrilo (Anexo 10), lo que denota la importancia de un disolvente

organico para superar las dificultades analíticas que presenta el compuesto por sus características fisicoquímicas. Adicional, se evaluó 1 ml de MMS suplementado con TCP estándar a 25 mg/L diluido en 1 ml de acetonitrilo y se recuperó el 100% del compuesto (Anexo 11), demostrando que la técnica de extracción no afecta al TCP en caso de su presencia en el medio durante el ensayo de degradación. La precisión de las mediciones mantuvo un coeficiente de variación inferior a 3.5% los cuales al ser valores menores de 5.5%, se aceptaron como criterios para la validación. La exactitud determinada por el porcentaje de recuperación, fue un factor importante para la selección de las condiciones de la extracción.

4. Degradación del insecticida CP por la bacteria TN50 (*P. aeruginosa*)

En los pre-inóculos 1 y 3 después de ~20 h de incubación se observó crecimiento bacteriano por el color verdoso característico de los pigmentos producidos por *P. aeruginosa* y se seleccionaron para el ajuste de DO y los ensayos de degradación. Por otro lado, el pre-inóculo 2 después del tiempo de incubación, no aumentó su DO y no se pudo usar como inóculo en ensayos de degradación, debido a que se requiere de un gran número de bacterias para una rápida degradación de CP [26]. Adicional, se realizó un repique de estas bacterias del pre-inóculo 2 en agar LB y se observó crecimiento de colonias demostrando que las bacterias no murieron y posiblemente se encontraban en estado de latencia.

Para los pre-inóculos 1 y 3, por separado se realizaron los ensayos de degradación con 25 mg/L de CP como única fuente de carbono y el efecto de una fuente externa de carbono (19 mg/L de glucosa) sobre la degradación de CP. En los medios con el inóculo 1 no disminuyó la concentración de CP después de 48 h de incubación, ni como única fuente de carbono ni en presencia de glucosa. Sin embargo, las bacterias TN50 provenientes del inóculo 3 degradaron el 17.43% de CP después de las 48 h de incubación en presencia de 19 mg/L de glucosa como

fuerza externa de carbono, pero no hay degradación de CP como única fuente de carbono (Figura 2). Esto demuestra la importancia de que las bacterias sean expuestas previamente al insecticida para activar su metabolismo y aumentar su potencial de degradación [33].

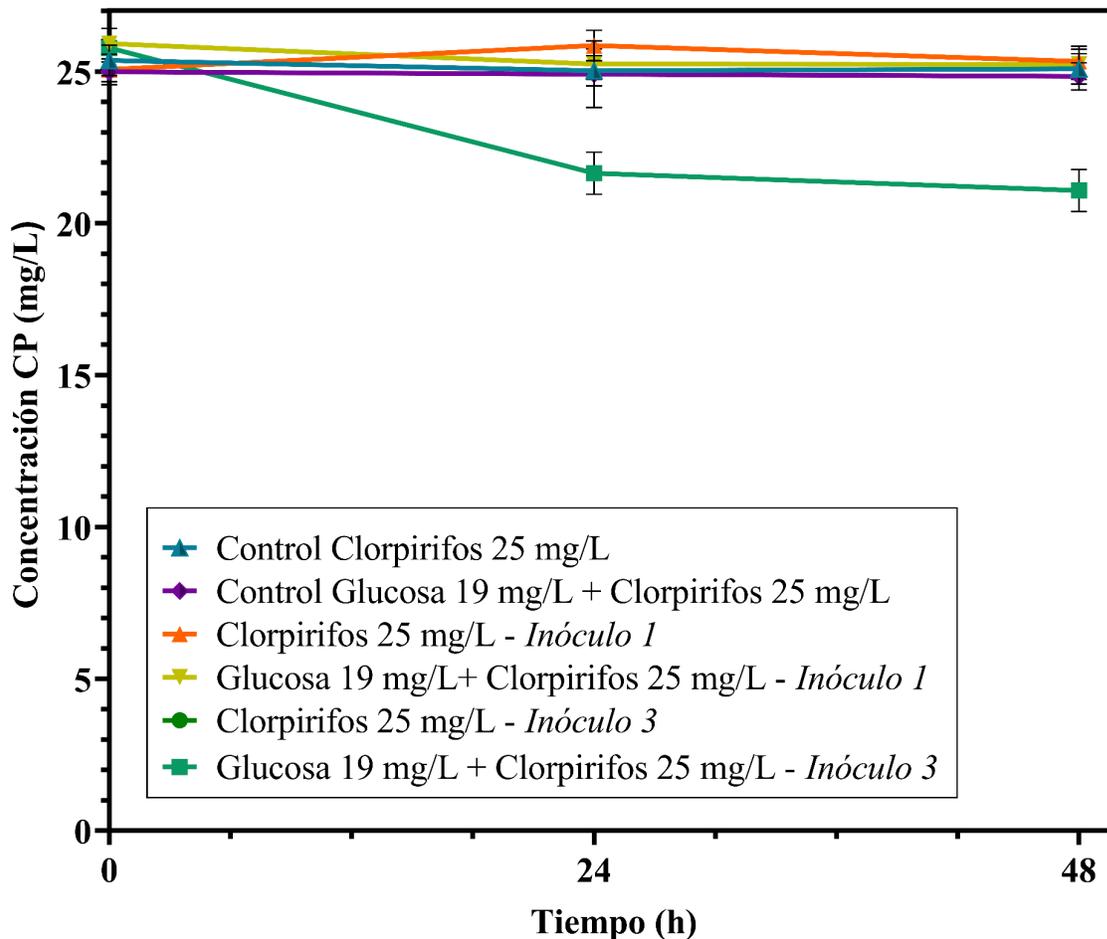


Figura 2. Degradación del insecticida CP en MMS por *P. aeruginosa* (TN50); partiendo de los inóculos 1 (1 000 mg/L de glucosa) y 3 (1 000 mg/L de glucosa y 25 mg/L de CP). Los valores se expresan en promedio \pm DS de los experimentos por triplicado.

La disminución del 17.43% de CP en MMS en presencia de glucosa, demuestra que TN50 no utiliza CP como única fuente de carbono y necesita fuentes de carbono externas para llevar a

cabo la degradación, algo que es común en algunas bacterias [39]. Es posible que el CP se consuma de forma simultánea con la glucosa, por tanto, un aumento de la concentración de glucosa puede incrementar la tasa de degradación del insecticida [4,16,22] y que CP sea degradado al verse convertido o comprometido en alguna vía del metabolismo de la bacteria [14,22], un mecanismo ampliamente informado en la degradación de plaguicidas [11; 39] en bacterias como *Flavobacterium* sp. y *P. diminuta* [39]. Adicional, durante el seguimiento de la degradación por HPLC no se detectó la presencia de TCP; igual que lo reportan Zhang et al., (2018) y Briceño et al., (2012) en sus trabajos de degradación de 100 mg/L de CP por *Pseudomona*, posiblemente porque TN50 lo degrada o su concentración se encuentra bajo los límites de detección del equipo. Con los resultados obtenidos es posible que TN50 tenga la capacidad de degradar CP y que esta acción dependa principalmente del papel que desempeñe el compuesto para la rizobacteria, la expresión de genes [39] y la actividad catalítica de las enzimas [24] que se detectaron en su genoma. Con estudios adicionales de degradación se podría determinar a *P. aeruginosa* (TN50) como potencial para la biorremediación.

Conclusiones

En este estudio se detectaron genes y enzimas en el genoma de TN50 que podrían estar asociados a la degradación de CP y sugieren que *P. aeruginosa* (TN50) podría degradar el insecticida como fuente de fósforo y carbono por acción de diversas oxidoreductasas, hidrolasas y liasas. Adicionalmente, se determinó la disminución del 17.43% de CP (25 mg/L) por TN50 en las primeras 48 h de incubación con 19 mg/L de glucosa como fuente externa de carbono en MMS y con previa activación metabólica en medio con glucosa y CP, lo que indica que TN50 no tener la capacidad de utilizar el insecticida CP como única fuente de carbono pero puede llegar a

degradar el compuesto como fuente externa de nutrientes.

Recomendaciones

- Establecer si TN50 requiere de una adaptación gradual a CP para aumentar su potencial de degradación.
- Evaluar el aumento de la concentración de glucosa (1 000 mg/L) para confirmar el incremento de la tasa de degradación del insecticida CP.
- Determinar si TN50 puede utilizar CP como única fuente de fósforo o nitrógeno o solo lo utiliza como fuente externa de nutrientes.
- Identificar la participación de diversas enzimas en la degradación de CP como las encontradas en el genoma de TN50.

Agradecimientos

Agradecimientos al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) por su apoyo con los proyectos “Mejoramiento de prácticas de fertilización en cultivos de importancia regional mediante el uso de genotipos eficientes en la utilización de macronutrientes y bacterias promotoras del crecimiento de plantas” (código IAEA RLA5078) y “Aplicación de técnicas nucleares en el mejoramiento genético y evaluación de rizobacterias para aumentar la productividad de papa criolla (*Solanum phureja*)” (código IAEA COL5026). A la Universidad Antonio Nariño por el conocimiento brindado y la contribución con las instalaciones y equipos, en especial al Grupo de Investigación en Ciencias Biológicas y Químicas en las líneas de investigación de Microbiología Industrial y Ecología Microbiana y Remediación Ambiental y Procesos Avanzados de Oxidación. Gratitud infinita a mis directores, doctora Diana Martínez y

doctor Javier Vanegas, por la oportunidad para llevar a cabo este proyecto, su buena dirección, paciencia, esfuerzo, dedicación, confianza y respaldo a mis ideas y sugerencias. Mil gracias a mi familia, amigos y compañeros por el apoyo, la fuerza y la motivación durante el desarrollo de este trabajo.

Referencias

- [1] Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Minagricultura (2020). CADENA DE LA PAPA Indicadores e instrumentos. *Unknown*.
<https://sioc.minagricultura.gov.co/Papa/Documentos/2020-06-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>. Consultado Marzo de 2021
- [2] Federación Colombiana de Productores de Papa, FEDEPAPA (2019). Informe de Gestión 2019. *Unknown*.
<https://fedepapa.com/wp-content/uploads/2021/09/BOLETIN-ECONOMICO-N%C2%B014.pdf>. Consultado Noviembre de 2021
- [3] Shabbir, M., Singh, M., Maiti, S., Kumar, S., & Saha, S. K. (2018). Removal enactment of organo-phosphorous pesticide using bacteria isolated from domestic sewage. *Bioresource Technology*, 263, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.122>
- [4] Aswathi, A., Pandey, A., & Sukumaran, R. K. (2019). Rapid degradation of the organophosphate pesticide – Chlorpyrifos by a novel strain of *Pseudomonas nitroreducens* AR-3. *Bioresource Technology*, 292(August), 122025. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122025>
- [5] Cámara de Comercio de Bogotá (CCB) (2015). Manual papa. Vicepresidencia de Fortalecimiento Empresarial; Programa de Apoyo Agrícola y Agroindustrial. *Unknown*.

- <http://hdl.handle.net/11520/14306>. Consultado Marzo de 2020
- [6] Instituto Colombiano Agropecuario, ICA (2016). ESTADÍSTICAS DE COMERCIALIZACIÓN DE PLAGUICIDAS QUÍMICOS DE USO AGRÍCOLA 2016. *Unknown*.
https://www.ica.gov.co/areas/agricola/servicios/regulacion-y-control-de-plaguicidas-quimicos/estadisticas/cartilla-plaguicidas-2016_22-01-18.aspx. Consultado Marzo de 2020
- [7] Pohanish, R. P. (2015). C. In Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals. 2, 91–195. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3148-0.00003-0>
- [8] Dow AgroSciences Colombia (2012). Lorsban, insecticida agrícola, concentrado emulsionante (EC). Etiqueta Web – Colombia.. *Unknown*.
https://www.dowagro.com/content/dam/hdas/dowagro_colombia/pdfs/0901b80380988d82.pdf. Consultado Marzo de 2020
- [9] Singh, B. K., Walker, A., Morgan, J. A. W., & Wright, D. J. (2004). Biodegradation of chlorpyrifos by Enterobacter strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4855–4863.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4855-4863.2004>
- [10] Li, X., Jiang, J., Gu, L., Ali, S. W., He, J., & Li, S. (2008). Diversity of chlorpyrifos-degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated samples. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62(4), 331–335.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.03.001>
- [11] Briceño, G., Fuentes, M. S., Palma, G., Jorquera, M. A., Amoroso, M. J., & Diez, M. C. (2012). Chlorpyrifos biodegradation and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol production by actinobacteria isolated from soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 73,

- 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.06.002>
- [12] Kharabsheh, H. A., Han, S., Allen, S., & Chao, S. L. (2017). Metabolism of chlorpyrifos by *Pseudomonas aeruginosa* increases toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 121, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.03.024>
- [13] Fan, S., Li, K., Yan, Y., Wang, J., Wang, J., Qiao, C., Yang, T., Jia, Y., & Zhao, B. (2018). A novel chlorpyrifos hydrolase CPD from *Paracoccus* sp. TRP: Molecular cloning, characterization and catalytic mechanism. *Electronic Journal of Biotechnology*, 31, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.10.009>
- [14] Gilani, R. A., Rafique, M., Rehman, A., Munis, M. F. H., Rehman, S. ur, & Chaudhary, H. J. (2016). Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus *Pseudomonas*. *Journal of Basic Microbiology*, 56(2), 105–119. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500336>
- [15] Yang, L., Zhao, Y. H., Zhang, B. X., Yang, C. H., & Zhang, X. (2005). Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2- pyridinol degrading bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 251(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.031>
- [16] Anwar, S., Liaquat, F., Khan, Q. M., Khalid, Z. M., & Iqbal, S. (2009). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*, 168(1), 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.059>
- [17] Sasikala, C., Jiwal, S., Rout, P., & Ramya, M. (2012). Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1301–1308. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0879-z>

- [18] Barman, D. N., Haque, M. A., Islam, S. M. A., Yun, H. D., & Kim, M. K. (2014). Cloning and expression of ophB gene encoding organophosphorus hydrolase from endophytic *Pseudomonas* sp. BF1-3 degrades organophosphorus pesticide chlorpyrifos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.023>
- [19] Maya, K., Singh, R. S., Upadhyay, S. N., & Dubey, S. K. (2011). Kinetic analysis reveals bacterial efficacy for biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP. *Process Biochemistry*, 46(11), 2130–2136. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.08.012>
- [20] Abraham, J., & Silambarasan, S. (2016). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol using a novel bacterium *Ochrobactrum* sp. JAS2: A proposal of its metabolic pathway. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 126, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.07.001>
- [21] Abraham, J., & Silambarasan, S. (2013). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Sphingobacterium* sp. JAS3. *Process Biochemistry*, 48(10), 1559–1564. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.034>
- [22] Govarathanan, M., Ameen, F., Kamala-Kannan, S., Selvankumar, T., Almansob, A., Alwakeel, S. S., & Kim, W. (2020). Rapid biodegradation of chlorpyrifos by plant growth-promoting psychrophilic *Shewanella* sp. BT05: An eco-friendly approach to clean up pesticide-contaminated environment. *Chemosphere*, 247, 125948. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125948>
- [23] Vidya Lakshmi, C., Kumar, M., & Khanna, S. (2008). Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*,

- 62(2), 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.12.005>
- [24] Sharma B, A. G., Bhatt, P., & Khati Vivekananda Parvatiya Krishi Anusandhan Sansthan, P. (2016). Microbial Degradation of Pesticides for Environmental Cleanup Bioremediation View project virology View project. January. <https://www.researchgate.net/publication/302909919>
- [25] Cáceres, T., He, W., Naidu, R., & Megharaj, M. (2007). Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: The influence of microbial degradation in natural water. *Water Research*, 41(19), 4497–4503. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.025>
- [26] Akbar, S., & Sultan, S. (2016). Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.009>
- [27] Hossain, M. S., Chowdhury, M. A. Z., Pramanik, M. K., Rahman, M. A., Fakhruddin, A. N. M., & Alam, M. K. (2015). Determination of selected pesticides in water samples adjacent to agricultural fields and removal of organophosphorus insecticide chlorpyrifos using soil bacterial isolates. *Applied Water Science*, 5(2), 171–179. <https://doi.org/10.1007/s13201-014-0178-6>
- [28] Palanisami, S., Prabakaran, D., & Uma, L. (2009). Fate of few pesticide-metabolizing enzymes in the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 20041 in perspective with chlorpyrifos exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 94(2–3), 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.03.003>
- [29] Karpuzcu, M. E., Sedlak, D. L., & Stringfellow, W. T. (2013). Biotransformation of chlorpyrifos in riparian wetlands in agricultural watersheds: Implications for wetland

- management. *Journal of Hazardous Materials*, 244–245, 111–120.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.11.047>
- [30] Tiwari, M. K., & Guha, S. (2014). Kinetics of biotransformation of chlorpyrifos in aqueous and soil slurry environments. *Water Research*, 51, 73–85.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.12.014>
- [31] Pino, N., & Peñuela, G. (2011). Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(6), 827–831.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.06.001>
- [32] Lu, P., Li, Q., Liu, H., Feng, Z., Yan, X., Hong, Q., & Li, S. (2013). Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Cupriavidus* sp. DT-1. *Bioresource Technology*, 127, 337–342. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.116>
- [33] Ali Mohammad Latifi. (2012). Isolation and characterization of five chlorpyrifos degrading bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 11(13), 3140–3146.
<https://doi.org/10.5897/ajb11.2814>
- [34] Shi, T., Fang, L., Qin, H., Chen, Y., Wu, X., & Hua, R. (2019). Rapid biodegradation of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos by *Cupriavidus nantongensis* x1T. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(23).
<https://doi.org/10.3390/ijerph16234593>
- [35] Math, R. K., Islam, S. M. A., Cho, K. M., Hong, S. J., Kim, J. M., Yun, M. G., Cho, J. J., Heo, J. Y., Lee, Y. H., Kim, H., & Yun, H. D. (2010). Isolation of a novel gene encoding a 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading enzyme from a cow rumen metagenomic library. *Biodegradation*, 21(4), 565–573. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9324-5>

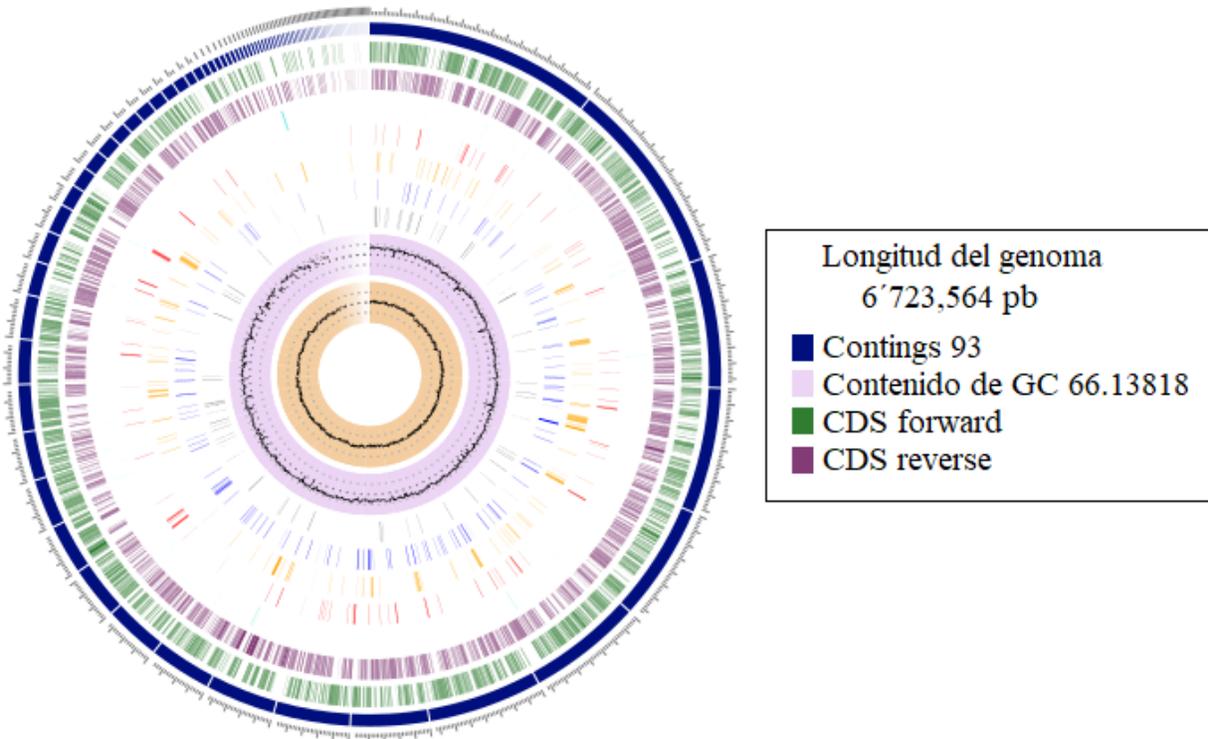
- [36] Huang, Y., Zhang, W., Pang, S., Chen, J., Bhatt, P., Mishra, S., & Chen, S. (2021). Insights into the microbial degradation and catalytic mechanisms of chlorpyrifos. *Environmental Research*, 194(December 2020), 110660. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110660>
- [37] Silambarasan, S., & Abraham, J. (2013). Kinetic studies on enhancement of degradation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP by a newly isolated *Alcaligenes* sp. JAS1. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(3), 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.12.002>
- [38] Zhang, Q., Li, S., Ma, C., Wu, N., Li, C., & Yang, X. (2018). Simultaneous biodegradation of bifenthrin and chlorpyrifos by *Pseudomonas* sp. CB2. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 53(5), 304–312. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1431458>
- [39] Singh, B. K., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(3), 428–471. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x>
- [40] Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomason, J. A., III, Stevens, R., Vonstein, V., Wattam, A. R., & Xia, F. (2015). RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep08365>
- [41] Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- [42] Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Lang, M., Munaretto, C.,

- Ulas, S., Stelzer, M., Grote, A., Scheer, M., & Schomburg, D. (2012). BRENDA in 2013: Integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: New options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D764–D772. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1049>
- [43] Khan, S., Dutt, K., & Garg, V. (2014, November 1). COMPUTATIONAL ANALYSIS OF BIODEGRADATION PATHWAYS FOR CHLORPYRIFOS USING EAWAG-BIOCATALYSIS/BIODEGRADATION DATABASE PATHWAY PREDICTION SYSTEM *Unknown*.
<https://www.researchgate.net/publication/271209949>
- [44] Tehara, S. K., & Keasling, J. D. (2003). Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Phosphodiesterase from *Delftia acidovorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 504–508. <https://doi.org/10.1128/aem.69.1.504-508.2003>
- [45] Chishti, Z., Hussain, S., Arshad, K. R., Khalid, A., & Arshad, M. (2013). Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. *Journal of Environmental Management*, 114, 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.10.032>
- [46] Jiang, B., Zhang, N., Xing, Y., Lian, L., Chen, Y., Zhang, D., Li, G., Sun, G., & Song, Y. (2019). Microbial degradation of organophosphorus pesticides: novel degraders, kinetics, functional genes, and genotoxicity assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(21), 21668–21681. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05135-9>
- [47] Theriot, C. M., & Grunden, A. M. (2010). Hydrolysis of organophosphorus compounds by microbial enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(1), 35–43. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2807-9>

Anexos

Anexo 1. Anotación funcional y estructural de las secuencias codificantes (CDS) de TN50, rizobacteria aislada de cultivo de papa (*Solanum tuberosum*).

Se representa la distribución de la anotación de los genomas en una gráfica circular, mostrando en el anillo del genoma: el número de contigs, el contenido de GC, CDS forward y CDS reverse.



Anexo 2. Genes y enzimas reportados por la literatura asociados a la degradación de insecticidas organofosforados

GEN	ENZIMA	ORGANISMO	REFERENCIA
cpd	Carboxipeptidasa	<i>Paracoccus sp.</i>	[13]
cph	Clorpirifos hidrolasa	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i>	[36]
lccA	Lacasa (EC 1.10.3.2)	<i>Pichia pastoris</i>	[36]
mpd	Metil paratión hidrolasa	<i>Plesiomonas sp.</i> <i>Cupriavidus sp.</i>	[39] [32]

		<i>Ochrobactrum sp.</i>	[20]
opaA	Anhidrolasa de ácido organofosforado (EC 3.1.8.2)	<i>Alteromonas sp.</i> <i>Alteromonas haloplanktis</i> <i>Alteromonas undina</i>	[39]
opd	Organofosfato hidrolasa (OPH) Hidrolasa de paratión	<i>Pseudomonas diminuta</i> <i>Flavobacterium sp.</i> <i>Flavobacterium balustinum</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Bacillus cereus</i>	[39] [36]
opdA	Organofosfato hidrolasa	<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Citrobacter youngas</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	[39] [45] [46] [36]
opdB	Organofosfato hidrolasa	<i>Cupriavidus nantongensis</i> <i>Cupriavidus taiwanensi</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Lactobacillus brevis</i>	[34] [36]
opdE	Organofosfato hidrolasa	<i>Bacillus wiedmannii</i> bv. <i>thuringiensis</i>	[46]
ophB	Organofosfato hidrolasa	<i>Pseudomonas sp.</i>	[18]
pdeA	Fosfodiesterasa (EC 3.1.4.52)	<i>Delftia acidovorans</i>	[44]
pepA	Aminopectidasa (EC 3.4.11.1)	<i>Escherichia coli</i> (Recombinante)	[39]
phnX	Fosfono acetaldehído hidrolasa (EC 3.11.1.1)	<i>Escherichia coli</i> (Recombinante) <i>Sinorhizobium meliloti</i>	[39]
phoA	Fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1)	<i>Enterobacter sp.</i>	[9] [39]
tcpA	3,5,6-tricloropiridin-2-ol monooxigenasa (EC 1.14.14.172/173)	<i>Escherichia coli</i> (Recombinante) <i>Cupriavidus nantongensis</i>	[35] [36]
	Fosfotriesterasa	<i>Pseudomonas diminuta</i>	[47]
	Fosfodiesterasa (EC 3.1.4.-)	<i>Enterobacter sp.</i>	[9]

Anexo 3. Enzimas identificadas en PATRIC (Versión 3.6.12) asociados a la degradación de compuestos aromáticos por *P. aeruginosa* (TN50)

EC	Nombre Enzima	Compuestos Aromáticos
1.1.1.157	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	Benzoato
1.1.1.35	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	2,4-diclorobenzoato

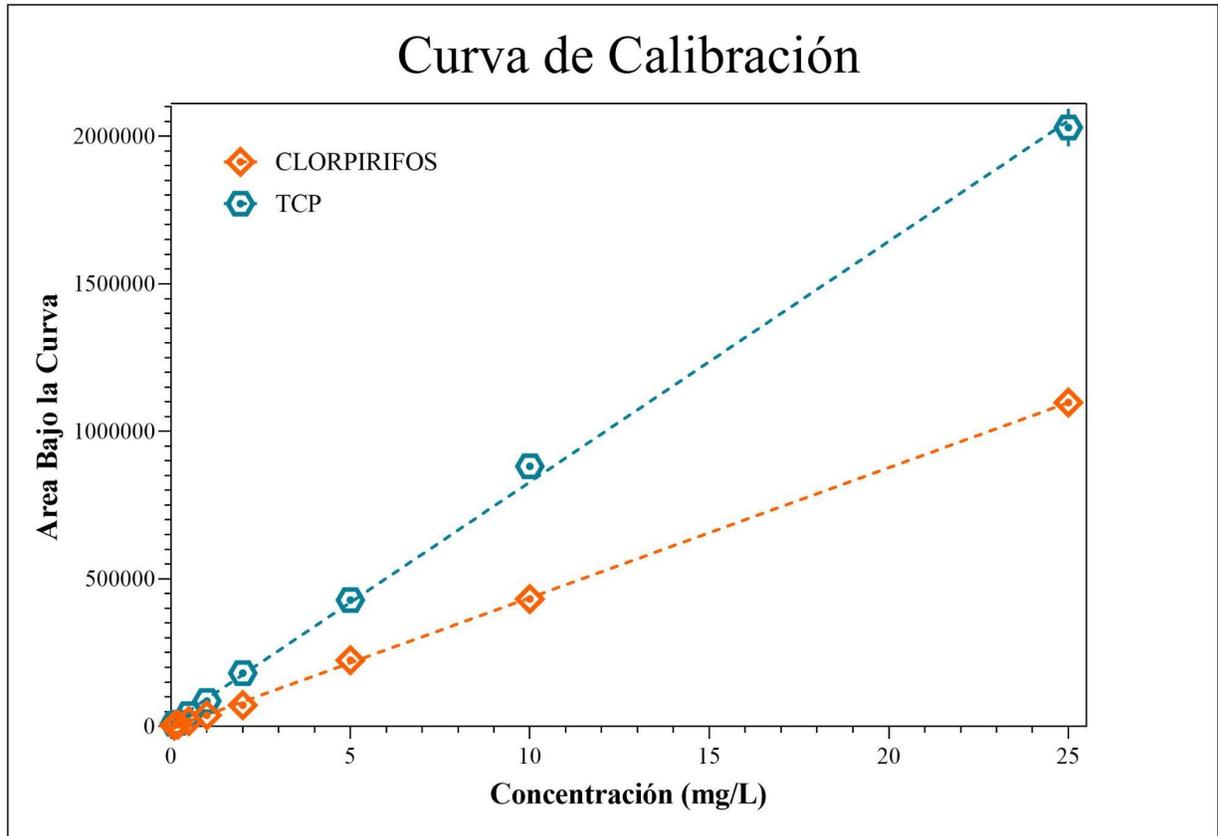
		Caprolactama
		Geraniol
1.1.2.8	Alcohol deshidrogenasa (Citocromo C)	Tetracloroetano
1.13.11.1	Catecol 1,2-dioxigenasa	2,4-diclorobenzoato
		Benzoato
		Fluorobenzoato
		Gamma-hexaclorociclohexano
1.13.11.2	Catecol 2,3-dioxigenasa	Benzoato
		Estireno
		Gamma-hexaclorociclohexano
		Tolueno y Xileno
1.13.11.39	2,3-dihidroxibifenil 1,2-dioxigenasa	Bifenilo
		Gamma-hexaclorociclohexano
1.13.11.5	Homogentisato 1,2-dioxigenasa	Estireno
1.14.12.10	Benzoato 1,2-dioxigenasa	Benzoato
		Fluorobenzoato
1.14.12.12	Naftaleno 1,2-dioxigenasa	1- y 2-metilnaftaleno
		Etilbenceno
		Naftaleno y Antraceno
1.14.13.2	P-hidroxibenzoato hidroxilasa	Benzoato
1.14.13.22	Ciclohexanona monooxigenasa	Caprolactama
1.14.13.82	O-desmetilasa oxigenasa de vainilla	1,4-diclorobenceno
1.2.1.10	Acetaldehído deshidrogenasa	Benzoato
		Bifenilo
		Tolueno y Xileno
1.2.1.28	Benzaldehído deshidrogenasa	1,4-diclorobenceno
		2,4-diclorobenzoato

1.2.1.3	Alcohol deshidrogenasa	Tetracloroetano	
1.2.1.39	Fenilacetaldehído deshidrogenasa	Estireno	
1.2.1.46	Formaldehído deshidrogenasa	Tetracloroetano	
1.3.1.25	1,2-dihidroxiciclohexano-3,5-dieno-1-carboxilato deshidrogenasa	Benzoato	
2.3.1.16	3-cetoacil-CoA tiolasa	Etilbenceno	
		Geraniol	
2.3.1.174	3-oxoadipil-CoA tiolasa	Benzoato	
2.3.1.9	Acetil-CoA acetiltransferasa		
2.8.3.6	3-oxoadipato CoA-transferasa		
3.1.1.24	3-oxoadipato enol-lactonasa		
3.1.3.1	Fosfatasa alcalina		
3.5.1.4	Amidasa	1,4-diclorobenceno	
		Estireno	
3.5.1.5	Ureasa	Atrazina	
3.5.1.54	Hidrolasa alofanato		
3.6.1.7	Acilfosfato fosfohidrolasa	1,4-diclorobenceno	
3.7.1.2	Fumarylacetoacetase	Estireno	
3.7.1.9	2-hidroximucónico semialdehído hidrolasa		Benzoato
			Tolueno y Xileno
3.8.1.2	Deshalogenasa de ácido 2-haloalcanoico	Gamma-hexaclorociclohexano	
		Tetracloroetano	
4.1.1.44	4-carboximuconolactona descarboxilasa	Benzoato	
4.1.1.77	4-oxalocrotonato descarboxilasa		
4.1.2.45	trans-O-hidroxibencilidenpiruvato hidratasa-aldolasa	Naftaleno y Antraceno	
4.1.3.39	4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa	Benzoato	
		Bifenilo	

		Tolueno y Xileno
4.1.3.4	Hidroximetilglutaril-CoA liasa	Geraniol
4.2.1.17	Enoil-CoA hidratasa	1,4-diclorobenceno
		Benzoato
		Caprolactama
4.2.1.57	Isohexenilglutaconil-CoA hidratasa	Geraniol
5.2.1.2	Isomerasa de maleacetoacetato	Estireno
5.3.3.4	Isomerasa de muconolactona	Benzoato
5.5.1.1	Cicloisomerasa de muconato	
		Fluorobenzoato
5.5.1.2	3-carboxi-cis, cis-muconato cicloisomerasa	Benzoato
6.2.1.32	antranilato-CoA ligasa	1,4-diclorobenceno
6.4.1.5	Geranil-CoA carboxilasa	Geraniol

Anexo 4. Curva de calibración de CP y TCP para el seguimiento de su concentración por HPLC.

Rango de cuantificación de 0.1 mg/L a 25 mg/L.



Anexo 5. Resultados de precisión y exactitud del método cromatográfico para CP

Concen tración (mg/L)	Concentración según la curva de calibración (mg/L)			Promed io	DS	CV	% de Error		
	1	10	25				1	10	25
1	1.035	0.997	1.034	1.029	0.022	2.114	3.491	-0.310	3.371
10	9.825	10.225	9.762	9.937	0.251	2.528	-1.752	2.249	-2.383
25	24.568	25.688	24.718	24.991	0.608	-2.434	1.730	2.752	-1.128

DS: Desviación estándar CV: Coeficiente de Variación

Anexo 6. Resultados de precisión y exactitud del método cromatográfico para TCP

Concen tración (mg/L)	Concentración según la curva de calibración (mg/L)			Promed io	DS	CV	% de Error		
1	1.035	1.034	1.032	1.033	0.001	0.142	3.460	3.362	3.174
10	10.408	10.302	10.025	10.245	0.198	1.934	4.083	3.020	0.246
25	24.566	25.679	26.092	25.445	0.789	3.102	-1.737	2.714	4.369

DS: Desviación estándar CV: Coeficiente de Variación

Anexo 7. Resultados de precisión y exactitud de MMS suplementado con CP (estándar y Lorsban) sin extracción con acetonitrilo y sin filtración por membrana

Muestra	Concentración según la curva de calibración (mg/L)			Promedio	DS	CV	% Detectado
CP estándar	21.689	22.774	22.812	22.425	0.637	2.843	89.700
CP Lorsban	20.790	21.862	21.909	21.520	0.633	2.942	86.081

DS: Desviación estándar CV: Coeficiente de Variación

Anexo 8. Resultados de precisión y exactitud al evaluar en diferentes proporciones de volumen MMS suplementado con CP estándar diluido en de acetonitrilo, sin filtración por membrana

Relación Muestra:A cetonitrilo	Concentración según la curva de calibración (mg/L)			Promedio	DS	CV	% de Recuperación
1:3	20.175	20.443	21.517	20.712	0.710	3.428	82.847
3:1	18.787	18.750	18.218	18.585	0.318	1.712	74.340
1:1	24.365	25.192	24.776	24.778	0.4136	1.669	99.112

DS: Desviación estándar CV: Coeficiente de Variación

Anexo 9. Resultados de precisión y exactitud de 1 ml de MMS suplementado con CP Lorsban filtrado por membrana y diluido en 1 ml de acetonitrilo

Muestra	Concentración según la curva de calibración (mg/L)			Promedio	DS	CV	% de Recuperación
CP Lorsban	0	0	0	0	0	0	0

DS: Desviación estándar CV: Coeficiente de Variación

Anexo 10. Resultados de precisión y exactitud de 1 ml de MMS suplementado con CP Lorsban diluido en 1 ml de acetonitrilo y luego filtrado por membrana

Muestra	Concentración según la curva de calibración (mg/L)			Promedio	DS	CV	% de Recuperación
CP Lorsban	23.970	23.803	24.716	24.163	0.486	2.013	96.652

DS: Desviación estándar CV: Coeficiente de Variación

Anexo 11. Resultados de precisión y exactitud de 1 ml de MMS suplementado con TCP estándar diluido en 1 ml de acetonitrilo y luego filtrado por membrana

Muestra	Concentración según la curva de calibración (mg/L)			Promedio	DS	CV	% de Recuperación
TCP	24.497	25.747	25.263	25.169	0.630	2.503	100.675

DS: Desviación estándar CV: Coeficiente de Variación