

OBTENCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS CON  
CAPACIDAD DEGRADATIVA DE COMPUESTOS  
ORGANOFOSFORADOS DEL SUELO  
CONTAMINADO DE UN BARRIO DE CARTAGENA,  
BOLÍVAR

Trabajo presentado para optar al título de Máster  
en Ciencias Ambientales

**Irina Patricia Tirado Ballestas**

Sistema de Universidades Estatales del Caribe SUE  
Caribe

Universidad De Cartagena  
2014

Obtención de cepas bacterianas con capacidad degradativa de  
compuestos Organofosforados del suelo contaminado de un  
barrio de Cartagena, Bolívar

Presentado por:  
Irina Patricia Tirado Ballestas  
Bacterióloga Esp. Microbiología Clínica

**Como requisito para obtener el grado de:  
Maestría en Ciencias Ambientales**

**Directores de tesis:  
Beatriz Jaramillo Colorado Ph.D.**

**Co-Director de tesis:  
Adriana Bermúdez Tobón Ph.D.**

Sistema de Universidades Estatales del Caribe SUE  
Caribe

Universidad De Cartagena  
2014

Nota de Aprobación del Jurado

---

---

---

---

Jurado

---

Jurado

CARTAGENA DE INDIAS, 2014.

La Universidad de Cartagena ni el jurado examinador, se hacen responsables de los conceptos emitidos en el presente trabajo

CARTAGENA DE INDIAS, 2014.

## **AGRADECIMIENTOS**

*Gracias a Dios por guiarme y fortalecerme en este crecimiento profesional y personal.*

*Gracias a mi madre, padre, hermana, esposo y hermoso hijo, por su compañía y apoyo.*

*Los amo.*

*Gracias a todas las personas que de una u otra forma colaboraron en la culminación exitosa de esta meta importante en mi vida, especialmente a la Universidad de Cartagena, facultad de Ciencias Exactas y Naturales, a las Doctoras Adriana Bermúdez y Beatriz Jaramillo, al Doctor Jesús Olivero, Orlando de la Rosa y a los estudiantes Hector Pertúz y Fernando Fernández.*

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág
<b>RESUMEN</b>	<b>Xiii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
2.1. Generalidades	4
2.2. Clasificación de los Pesticidas	4
2.3. Pesticidas Organofosforados	7
2.4. Métodos de detección de organofosforados	10
2.5. Métodos de extracción de OF	10
2.6. Técnicas de Separación de OF	11
2.6.1. Columnas y Fases Estacionarias	12
2.6.2. Detectores	12
2.7. Presencia de OF a nivel Global	13
2.8. OF en Cartagena de Indias	16
2.9. Problemas generados por pesticidas	18
2.10. Soluciones a los problemas generados por los OF	20
2.11. Biorremediación de OF	21
2.12. Identificación de bacterias degradadoras de OF	27
2.12.1. Identificación bioquímica de bacterias degradadoras de OF por BBL Crystal	27
2.12.2. Identificación molecular utilizando secuenciación del gen ADNr 16s	28
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
3.1. Tratamiento de suelos	32
3.1.1. Muestreo de suelos	32
3.1.2. Preparación de las muestras de suelos por medio de extracción Soxhlet	33
3.1.3. Estandarización de tiempos de retención de organofosforados	34
3.1.4. Evaluación de la muestra por GC-FID	37

3.2.	Tratamiento de material microbiológico	38
3.2.1.	Activación del metabolismo degradador de OF en las cepas bacterianas aisladas	38
3.2.2.	Aislamiento de bacterias de muestras tratadas con OF	38
3.2.3.	Identificación de cepas bacterianas aisladas	39
3.3.	Validación de la degradación del pesticida OF por acción bacteriana	41
3.4.	Análisis de datos	42
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>43</b>
4.1.	Evaluación de muestras por GC-FID	43
4.2.	Aislamiento e identificación de bacterias de muestras tratadas con OF	47
4.3.	Comprobación de biodegradación de OF por parte de las cepas aisladas	58
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>66</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>67</b>

## LISTA DE TABLAS

	Pág
1. Clasificación de Pesticidas	5
2. Comparación de métodos de tratamiento de residuos tóxicos	21
3. Patrones usados para identificar contaminantes del suelo evaluado	35
4. Especificaciones del equipo cromatográfico utilizado en el estudio	36
5. Generalidades de pesticidas OF encontrados en el suelo de Ciudadela 2000	46
6. Crecimiento bacteriano de las cepas en estudio	47
7. Identificación bioquímica de las cepas en estudio	49
8. Comportamiento bioquímico de cepas aisladas	49
9. Comportamiento del Monocrotofós en presencia de cepas bacterianas frente al Blanco	59



## LISTA DE FIGURAS

	Pág
1. Fórmula general de los pesticidas organofosforados	8
2. Mecanismo de acción de OF	8
3. Mapa físico de la expresión del plásmido <i>pQE-opd A</i> .	25
4. Ciudadela 2000, Cartagena de Indias	32
5. Toma de muestra de suelos del estudio	33
6. Muestreo de suelos en lote de Ciudadela 2000	33
7. Extracción Soxhlet de suelo – montaje en laboratorio	34
8. Cromatograma del patrón OF Fenclorfós	36
9. Cromatograma del patrón OF Forato	37
10. Cromatograma del patrón OF Demetón	37
11. Aislamiento, purificación e identificación bioquímica de colonias bacterianas con capacidad de crecimiento en medio M9	40
12. Curva de calibración utilizada en el método de GC-FID	41
13. Verificación de la degradación del pesticida por parte de las cepas en estudio.	42
14. Cromatograma de Muestra 1 de suelo	43
15. Cromatograma de Muestra 2 de suelo	43
16. Cromatograma de Muestra 3 de suelo	44
17. Crecimiento de colonias aisladas. Datos presentados como densidad óptica más o menos error estándar	48
18. Embalaje de las cepas en estudio para análisis molecular	51
19. Resultado de la comparación de la secuencia C1 contra la base de datos RDP	51
20. Alineamiento de secuencia obtenida en el laboratorio CorpoGen con la encontrada en el BLAST	53
21. Homología entre cepas de <i>Enterobacteriaceae</i> obtenidas por el BBL Crystal© y secuencia obtenida en el laboratorio CorpoGen	53
22. Árbol de distancias construido a partir de los 50 mejores arreglos con respecto a la base de datos de NCBI (C1)	54

23.	Resultado de la comparación de la Secuencia C2 contra la base de datos RDP	55
24.	Árbol de distancias construido a partir de los 50 mejores arreglos con respecto a la base de datos de NCBI (C2)	56
25.	Resultado de la comparación de la Secuencia C3 contra la base de datos RDP	57
26.	Árbol de distancias construido a partir de los 50 mejores arreglos con respecto a la base de datos de NCBI (C3)	58
27.	Comportamiento del monocrotófos por parte de las cepas bacterianas en contraste con el Blanco	59
28.	Comportamiento de los metabolitos 1 y 2 presentes en C1	61
29.	Comportamiento de los metabolitos 1 y 2 presentes en C2	61
30.	Comportamiento de los metabolitos 1 y 2 presentes en C3	62

## LISTA DE ANEXOS

	Pág
1. Secuenciación del fragmento de ADN analizado de la Cepa 1	82
2. Secuenciación del fragmento de ADN analizado de la Cepa 2	83
3. Secuenciación del fragmento de ADN analizado de la Cepa 3	84
4. Cromatograma de Blanco (Día 0).	85
5. Cromatograma de Blanco (Día 1).	86
6. Cromatograma de Blanco (Día 2).	87
7. Cromatograma de Blanco (Día 4).	88
8. Cromatograma C1 día 1	89
9. Cromatograma C1 día 2	90
10. Cromatograma C1 día 3	91
11. Cromatograma C1 día 4	92
12. Cromatograma C2 día 1	93
13. Cromatograma C2 día 2	94
14. Cromatograma C2 día 3	95
15. Cromatograma C2 día 4	96
16. Cromatograma C3 día 1	97
17. Cromatograma C3 día 2	98
18. Cromatograma C3 día 3	99
19. Cromatograma C3 día 4	100

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Ach:** Acetilcolina  
**AchEasa:** Acetil colinesterasa  
**AED:** Detector de emisión atómica  
**COPs:** Compuestos orgánicos persistentes  
**CSB:** Corporación Autónoma Regional del Sur de Bolívar  
**DDT:** Dicloro Difenil Tricloroetano  
**ECD:** Detector de captura de electrones  
**EMBL:** European Molecular Biology Laboratory  
**FAO:** Food and Agriculture Organization  
**FID:** Detector de ionización de llama  
**GC/FID:** Cromatografía de gases con detector de ionización de llama  
**GC/TFIR:** Espectrometría de masas, infrarrojo de transformadas de Fourier  
**GC-MS:** Cromatografía de gases con espectrometro de masas  
**GIA:** Grupo de Investigaciones Agroquímicas – Universidad de Cartagena  
**GESP:** Grupo de Epidemiología y Salud Poblacional  
**HPLC:** Cromatografía líquida de alto rendimiento  
**IDNS:** Integrated Database Network System.  
**INVEMAR:** Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “Jose Benito Vives de Andrés”  
**MeSH:** Medical Subject Headings  
**MAVDT:** Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial  
**NCBI:** National Center for Biotechnology Information  
**OF:** Organofosforados  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**RDP:** Ribosomal Database Project  
**RIDOM:** Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms  
**SCD:** Detector de quimioluminiscencia  
**SFE:** Extracción Supercrítica de Fluidos  
**SNC:** Sistema Nervioso Central  
**SNP:** Sistema Nervioso Periférico  
**TCD:** Detector de conductividad térmica

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo la obtención de bacterias capaces de degradar compuestos organofosforados (OF) de suelos de un barrio de Cartagena, Bolívar afectado con este tipo de contaminantes. Para lograr este fin, fueron tomadas muestras de suelo del barrio Ciudadela 2000. El mismo fue sometido a extracción Soxhlet y concentración por rotaevaporación. Para identificar los OF presentes por medio de GC-FID, fue necesaria una identificación inicial de tiempos de retención de patrones de OF en GC-FID. Asimismo, otra parte del suelo se sometió a 200ppm de Monocrotofos por 30 días. Luego de ello, fueron aisladas las bacterias presentes con capacidad de desarrollarse en medio altamente selectivo con OF como única fuente de carbono. Las mismas fueron identificadas bioquímica y molecularmente utilizando el kit BBL Crystal<sup>®</sup> y secuenciación de un fragmento del gen ribosomal 16S. El crecimiento bacteriano fue confirmado por medio de espectroscopía UV-VIS. Los resultados confirmaron la presencia de bacterias capaces de degradar pesticidas OF. Las mismas fueron identificadas como *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las bacterias obtuvieron el pico máximo de crecimiento en este tipo de medios a los 120 días de incubación aproximadamente pero en el presente estudio no fue necesario esperar este punto porque se logró la disminución del pesticida a las 72 h de incubación.

**Palabras Clave:** Contaminación ambiental, organofosforado, biodegradación, metabolismo, bacteria (*Fuente: MeSH*).

## ABSTRACT

The aim of this study was to obtain bacteria capable of degrade Organophosphorus compounds from soils of a neighborhood from Cartagena, Bolívar, contaminated with this kind of pollutant agents. To achieve this objective it was made a process beginning with the collection of soils. It was made in Ciudadela 2000's soils. Samples were submitted to Soxhlet extraction and rotary evaporation. Initial identification of retention times by means of GC-FID to detect

OP present in soils was necessary. Furthermore, another part of the sample was putted to 200ppm of Monocrotophos for 30 days. Thereupon, isolation of bacteria capable to develop in highly selective media with OP as the only carbon source was made. Strains were biochemically and molecularly identified by using BBL Crystal<sup>®</sup> kit and sequencing of a fragment of ribosomal DNA 16S gene. Bacterial grown was confirmed through UV-VIS spectroscopy and OP biodegradation was made by using GC-FID. Results confirmed presence of strains capable to degrade OP pesticides. The same were identified as *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* and *Pseudomonas aeruginosa*. Growth pick from isolated bacteria is obtain on the order of 120 days of incubation, but in the present study it was made on 72h of incubation.

**Key words:** Environmental pollution, Organophosphorus, biodegradation, metabolism, bacteria (*Source: MeSH*).

## 1 INTRODUCCIÓN

Los compuestos químicos organofosforados (OF), fueron desarrollados durante la década de los años cincuenta y usados como “gases nerviosos”, durante la Segunda Guerra Mundial (Gunderson, et al., 1992; Satoh & Hosokawa, 2000; De Silva, et al., 2006). Actualmente, se les reconoce principalmente por su utilización en la agricultura como fertilizantes e insecticidas, existiendo en el mercado aproximadamente cincuenta mil tipos de estos compuestos (Carod, 2002; Rozo & Alvarado, 2004; Eddleston, et al., 2012). También se han buscado otros usos y se ha explorado su potencial en el área farmacológica para el tratamiento de algunas enfermedades de tipo neuronal como el Alzheimer (Gunderson, et al., 1992), sin embargo hasta el momento no se han documentado avances importantes en estos campos de aplicación.

Debido al uso indiscriminado de los OF en agroindustria (Arbeli, 2009), existe un alto índice de intoxicaciones agudas caracterizadas por el desarrollo del síndrome colinérgico y múltiples complicaciones crónicas. Este es considerado un problema de Salud Pública dejando un aproximado de 400.000 fallecimientos por año a nivel mundial (Eddleston, 2004; Eddleston, et al., 2012).

Colombia, dada su naturaleza de país agrícola, ocupa el tercer puesto en América Latina en el consumo de plaguicidas después de Brasil y México. De acuerdo con la Food and Agricultural Organization (FAO), la agroindustria colombiana constituye el 40% de la fuerza laboral y representa el 50% de las divisas nacionales (FAO, 2012). Por lo que, por ejemplo, durante el año 2002, el consumo de agroquímicos de tipo plaguicida o fertilizante superó los 28 millones de kilogramos de los cuales el 97% correspondieron a insecticidas (organofosforados y carbamatos principalmente) seguidos por los herbicidas y fungicidas (Comunidad Andina. Secretaria General, 2002; Mojica & Guerrero, 2010).

El uso de compuestos OF en Colombia ha ocasionado la expansión de la

agroindustria por un lado, pero por el otro el uso indiscriminado y el mal manejo de los productos o sus residuos está ocasionando un problema de Salud Pública importantísimo. Solo por mencionar algunos casos, durante el año 2003, la compañía cementera Holcim Colombia S.A. ubicada en Nobsa (Boyacá) inició el co-procesamiento de cerca de 17 toneladas de pesticidas Metil Paration y Toxafeno provenientes del corregimiento de Caracolcito (Cesar), los cuales fueron reprocesados en sus propios hornos de producción de cemento, contraviniendo toda la reglamentación ambiental, legal y de salud pública (Bustamante, 2009). En los años 2008 y 2009 la Corporación Autónoma Regional del Sur de Bolívar (CSB) realizó un monitoreo de la zona costera de la región Caribe, encontrando seis compuestos plaguicidas en las aguas costeras y once en sedimentos, y además se encontraron trazas de otros compuestos, lo cual indica que pueden estar elevados en determinadas épocas del año (CSB, 2009).

En el departamento de Bolívar, el uso de plaguicidas es regulado mediante las resoluciones 1247 y 291 expedidas por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MAVDT, actual Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible), en los años 2006 y 2007 respectivamente, siendo la resolución 236 del 08 de febrero del 2005 la medida de control de más reciente expedición por parte del Gobierno central. Sin embargo, y a pesar de existir esta normatividad, el uso de los compuestos OF no siempre cumple con la reglamentación y se siguen reportando problemas asociados al mal manejo de estas sustancias (MAVDT, 2006; MAVDT, 2007). Uno de los casos más cercanos y graves fue documentado por el Grupo de Epidemiología y Salud Poblacional (GESP) en el Barrio Ciudadela 2000, localidad en la que fueron hallados plaguicidas enterrados sobre la margen derecha de la Troncal de Occidente afectando un megacolegio ubicado a 10 metros del lugar de exposición (MAVDT, 2006; GESP, 2009), esta situación provocó problemas de índole ambiental y socioeconómico para la ciudad de Cartagena.

Con base en el impacto que causan lo OF en la salud pública, a nivel internacional se han desarrollado diferentes iniciativas para minimizar el riesgo ambiental y la



contaminación causada por estos productos. Uno de los tratamientos probados con mejores resultados en cuanto a eficiencia por tiempo y bajos costos es la de la biorremediación bacteriana, que emplea microorganismos capaces de degradar compuestos químicos complejos por medio de diversas rutas metabólicas bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Huber, et al., 2000; Cycón, et al., 2009).

Se realizó la confirmación cualitativa de la presencia de compuestos OF en el suelo del Barrio Ciudadela 2000 y se realizó el aislamiento de cepas bacterianas autóctonas de la muestra. Posteriormente se determinó la capacidad de los microorganismos encontrados de crecer y desarrollarse en un medio selectivo con OF como única fuente de carbono y por último se identificaron mediante pruebas bioquímicas y moleculares.

El objetivo general del trabajo fue el de obtener cepas bacterianas con capacidad degradativa de compuestos organofosforados de suelos de un Barrio de Cartagena, Bolívar afectado con este tipo de contaminantes. Para lograrlo, fue necesario cumplir con los objetivos específicos: Identificar los tipos de pesticidas organofosforados presentes en el suelo del barrio Ciudadela 2000 Cartagena de Indias; Aislar cepas bacterianas puras autóctonas del suelo del barrio Ciudadela 2000 capaces de proliferar en un medio cuya única fuente de carbono es un patrón conocido de OF; Identificar bioquímicamente las cepas bacterianas aisladas; Comprobar la degradación de pesticidas organofosforados por parte de las cepas bacterianas aisladas; Realizar identificación molecular de género y especie de las cepas bacterianas aisladas por medio de secuenciación el gen ribosomal 16S.

Dentro de los ensayos realizados se comprobó el crecimiento bacteriano en medio líquido y se determinó la degradabilidad de OF de cada cepa por medio de análisis cromatográfico. Dentro de los resultados más significativos se detectó la presencia de compuestos OF en superficie y se aislaron e identificaron tres especies bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter cloacae*. Se comprobó que estos organismos fueron capaces de degradar un compuesto OF, por lo que se abre la puerta a la investigación local y nacional para buscar alternativas para la biorremediación con bacterias autóctonas, siendo factible el

uso de cepas inocuas que degraden *in situ* o que se logre la producción masiva del metabolito responsable de la degradación de este tipo de sustancias.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades

Los pesticidas son sustancias o mezclas químicas destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados plagas (Baird, 2001). Estos son usados ampliamente para protección de cultivos de frutas y verduras, generando un impacto significativo a la producción mundial de alimentos aumentando los rendimientos y minimizando el efecto de las plagas en los cultivos. Es conocida además su contribución positiva frente a la erradicación de enfermedades de importancia epidemiológica pública por lo tanto los plaguicidas forman parte integral y esencial de la agricultura y de diferentes programas de salud pública (Yu, 2002; Varona, et al., 2007; Zacharia, 2010).

Aunque es importante la acción protectora de los pesticidas, también es cierto que ellos afectan negativamente a los consumidores de los productos agrícolas. Ambientalmente estas sustancias pueden causar la degradación de los ecosistemas receptores de los pesticidas, bien sea por aplicación directa o transporte por viento o escorrentías (Carmona & Carmona, 2005; Hudson, 2006; Baird, 2001). Debido a la baja selectividad de los pesticidas, tanto la flora como la fauna presentan, una vez tienen contacto con estas sustancias, intoxicaciones de tipo agudo o crónico (Mulbry & Kearney, 1991; Yu, 2002; Varona, et al., 2007; Zacharia, 2010; Sirotkina, et al., 2012).

### 2.2 Clasificación de Pesticidas.

Los plaguicidas pueden ser clasificados de cinco maneras distintas, y en cada una se han identificado varios tipos. La forma de clasificarlos depende principalmente de los siguientes aspectos: destino de aplicación, acción específica, estado de presentación, constitución química y peligrosidad para las personas (Tabla 1) (Baird, 2001; Carmona & Carmona, 2005; Hudson, 2006).

Tabla 1. **Clasificación de los pesticidas.**

<b>CLASIFICACIÓN</b>	<b>TIPOS</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>EJEMPLO</b>
<b>SEGÚN DESTINO DE APLICACIÓN</b>	De uso fitosanitario	Utilización en el ámbito de la sanidad vegetal o el control de vegetales.	Paraquat
	De uso ganadero	Utilización en el ámbito de la sanidad animal o el control de ecto y endoparásitos.	Ivermectina
	Para industria alimentaria	Tratamientos de productos o dispositivos relacionados con la industria alimentaria.	N,N-dietil-m-toluamida
	De uso ambiental	Saneamiento de locales o establecimientos públicos o privados.	Temephos
	De uso en higiene personal	Aplicación directa sobre el ser humano.	N, N-dietil-toluamida-m-toluamida
	De uso doméstico	Aplicación en hogares por personas no calificadas	Piretroides
<b>SEGÚN SU ACCIÓN ESPECÍFICA</b>	Insecticida	Contra insectos	Clorpirifós
	Acaricida	Contra ácaros	Triazofos
	Fungicida	Contra hongos	Pentaclorofenol
	Desinfectante y Bactericida	Contra bacterias	Etanol
	Herbicida	Contra malezas	Terbutilazina
	Rodenticida	Contra roedores	Warfarina
	Protectores de maderas	Protege maderas	Compuestos de Cobre
	Post cosecha	Protege almacenaje de alimentos	Carbamato
<b>SEGÚN EL ESTADO DE PRESENTACIÓN</b>	Gases o gases licuados	Partículas muy diminutas	Glifosato

SEGÚN SU CONSTITUCIÓN QUÍMICA	Fumigantes y aerosoles	Partículas diminutas líquidas	Piretroides
	Polvos <50µm	Partículas muy diminutas	Paraquat
	Sólidos	Las plagas muerden la sustancia	Cloruros orgánicos
	Líquidos	Elimina plagas de suelos	DDT
	Cebos y Tabletas	Atrae plagas y las elimina	Fipronil
	Arsenicales	Tiene arsénico en su estructura química	Arseniato de cobre
	Carbamatos	Derivados del ácido carbámico (NH <sub>2</sub> COOH)	Poliuretano
	Derivados de cumarina	Anillo bencénico unido a un solo oxígeno derivado de fenilpropanoide	Warfarina
	Organoclorados	Compuesto orgánico cuya molécula tiene varios átomos de cloro en su estructura	DDT
	Organofosforados	Esteres de ácido fosfórico generalmente lipofílicos	Demeton
	Organometálicos	Enlaces covalentes (compartimiento de e <sup>-</sup> ) entre átomos moleculares y un átomo metálico	Dicloro (ciclo-1,5-octadieno) platino (II)
	Piretroides	Mezcla de compuestos orgánicos altamente tóxicos	Permetrina
	Tiocarbamatos	Complejos metálicos	Pirrolidina
Triazinas	Anillo heterocíclico, análogo al anillo de benceno pero con tres átomos de carbono reemplazados por átomos de nitrógeno.	Diazina	

SEGÚN PELIGROSIDAD PARA LAS PERSONAS			
Baja peligrosidad	Por inhalación, ingestión o penetración cutánea no entrañan riesgos apreciables.	Etanol	
Tóxicos	Por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan entrañar riesgos de gravedad limitada.	Demeton	
Nocivos	Por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan entrañar riesgos graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte	Paratión	
Muy tóxicos	Por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan entrañar riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte	DDT	

### 2.3 Pesticidas organofosforados.

Los compuestos Organofosforados (OF) son derivados del ácido fosfórico que dependiendo de la sustitución de sus radicales en la fórmula básica, pueden dar origen a nuevos grupos de compuestos con capacidad de penetración, distribución y activación del plaguicida, en su sitio de ataque y en su potencia y selectividad (Emerson, et al., 1999) (Figura 1). Los OF son sustancias generalmente líquidas e incoloras, aunque las formulaciones técnicas son de color pardo y algunos presentan un ligero olor afrutado. Se hidrolizan lentamente en agua, siendo dicha hidrólisis más rápida al aumentar el pH (Carmona & Carmona, 2005).

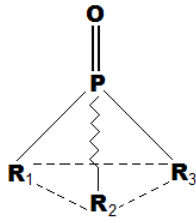


Figura 1. Fórmula general de los pesticidas organofosforados.

R: Radical orgánico.

La toxicidad de los OF depende básicamente de la hiperestimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos del Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP), provocando la interrupción de la transmisión normal de los impulsos nerviosos debido al aumento en la acetilcolina (ACh) al estar inhabilitada la colinesterasa (AChEasa) sinpática. El mecanismo de acción de los OF es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, encargada de la degradación del exceso de acetilcolina en la sinapsis entre células nerviosas, llevando a la sobre-estimulación e incluso muerte por paro respiratorio (Figura 2) (Carmona & Carmona, 2005; Carson & Harris, 2008). Lo que les ha dado su nombre como “gases nerviosos”.

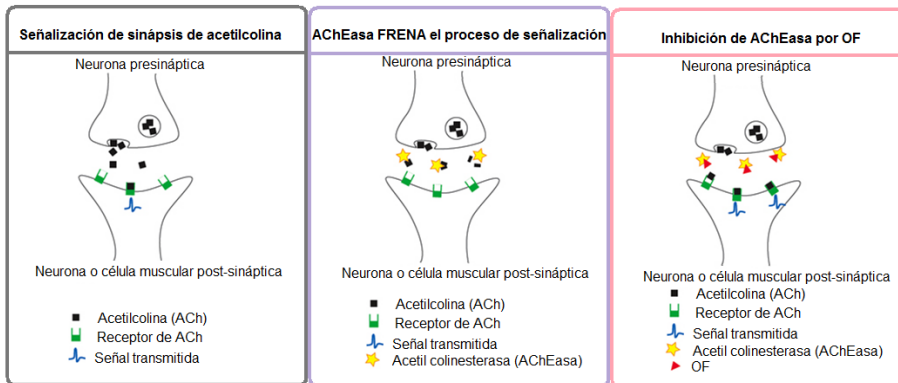


Figura 2. Mecanismo de acción de OF.

El tipo de acción de los OF, los convierte en tóxicos para animales y seres humanos (Ramesh, et al., 2012) y aunque en países industrializados las regulaciones restringen fuertemente su uso, informes internacionales indican que este tipo de químicos son exportados irregularmente, a países de economías emergentes (como la colombiana) o naciones en vía de desarrollo (África, Nigeria, etc.) violando normas legales y de salud pública y ambiental (Arbeli, 2009; Ramesh, et al., 2012; Banks & Lein, 2012).

Entre las décadas de los 40's y 50's, los OF experimentaron un fuerte auge debido a su capacidad insecticida, acción farmacológica y principalmente como agente de la guerra química (Gunderson, et al., 1992; Satoh & Hosokawa, 2000; De Silva, et al., 2006; Rozo & Alvarado, 2004; Eddleston, et al., 2012; Carod, 2002). Por ejemplo, el insecticida BLADAN tenía una acción insecticida frente a pulgones y ácaros, pero mostraba una alta toxicidad en mamíferos (1.2 mg/kg) e inestabilidad en el agua, por lo que se inició un frenético desarrollo de OF más estables y menos tóxicos marcando el inicio del empleo de los insecticidas organofosforados (Pose, et al., 2000) sacando al mercado aproximadamente cincuenta mil tipos. Los cuales actualmente se utilizan en la agroindustria para aumentar el rendimiento de los cultivos de algodón, maíz, trigo, legumbres y papa, convirtiéndose en sustancias importantes para el desarrollo económico mundial (Carmona & Carmona, 2005; Zacharia, 2010; Murcia & Stashenko, 2008).

Como agentes nerviosos de guerra, se destacan los productos clasificados como Tipo G (no persistentes) que causan muerte principalmente por inhalación, y Tipo V (persistentes) causantes de decesos por inhalación o absorción dérmica, por conjuntivas y por mucosas (Gronseth, 2005; Iversen, et al., 2007; Public Health, 2012), siendo uno de los más utilizado para fines bélicos (por ejemplo en Irak) el Tabun (= Sarin o Somán) caracterizado por una alta toxicidad (Zelicof, 2003; Gronseth, 2005; Iversen, et al., 2007).



## **2.4 Métodos de detección de organofosforados.**

Para la determinación de residuos de plaguicidas Organofosforados en cualquier matriz a analizar, los métodos analíticos utilizados incluyen entre otros: biosensores híbridos electroquímicos, cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC/FID) (Stoytcheva, et al., 2009; De Souza & de Andrade, 2009; Rodríguez, et al., 2011; Zhen, et al., 2012). Los cuales permiten la discriminación entre los diferentes tipos de compuestos organofosforados (Shaoqin, 2008). Antes de identificar este tipo de moléculas con los métodos antes mencionados es necesario someter las matrices a previa extracción y posteriormente concentración, para así asegurar la confiabilidad de los resultados.

## **2.5 Métodos de extracción de OF.**

La extracción con solventes de muestras sólidas es comúnmente conocida como extracción sólido líquido según terminologías fisicoquímicas. Este es un proceso de lixiviación utilizado por muchos años para el pre tratamiento de diversas muestras. Entre los métodos de extracción partiendo de matrices sólidas pueden ser mencionados: extracción líquida presurizada, extracción de fluido supercrítico y extracción Soxhlet, todas muy efectivas (Hawthorne, et al., 2000).

La extracción Soxhlet se realiza colocando la muestra en un dedal titular el cual es llenado durante la operación de condensados con solvente. Cuando el líquido llega al nivel de desbordamiento, un sifón aspira el soluto del dedal-titular efectuándose la descarga de nuevo en el matraz de destilación, llevando consigo los analitos extraídos en el líquido. Para obtener más efectividad el proceso se hace continuo ya que el disolvente es recirculado a través de la muestra (Luque, 1998; Murcia & Stashenko, 2008).

Entre las ventajas que ofrece la extracción Soxhlet es importante recalcar que la muestra se pone en contacto permanente con las fracciones nuevas de solvente,

lo que promueve a desplazar el equilibrio de transferencia. En cuanto a la temperatura del sistema sigue siendo relativamente alta debido a los calores aplicados al matraz de destilación que llega a la cavidad de extracción, hasta cierto punto. Una de las ventajas más importantes del proceso es que no es necesario filtrar después de la lixiviación. Si se quieren obtener mayores rendimientos la presencia de un agitador promueve al mejoramiento de la técnica. Es una metodología que tiene la posibilidad de extraer más masa de la muestra que la mayoría de los métodos más modernos (microondas extracción de fluidos supercríticos, entre otras) (Luque, 1998).

## **2.6 Técnicas de separación de OF.**

La técnica de separación más utilizada es la cromatografía puesto que cuenta con alta eficacia en la disociación de mezclas complejas. Este proceso consiste en una muestra que se desplaza por medio de una fase móvil (por ejemplo un gas) la cual se hace pasar a través de una fase estacionaria, esta última fijada en una columna o superficie. Para la escogencia de estas fases hay que tener en cuenta que no sean miscibles y que los componentes de la muestra se distribuyan de forma distinta entre estas dos. La interacción de los compuestos con la fase estacionaria es un factor decisivo para la separación, es decir, aquellos que sean más a fin con la fase estacionaria van a ser más retenidos y por ende tardan más tiempo en ser detectados (denominado tiempo de retención), mientras que los de poca atracción por esta fase muestran preferencia por la móvil, produciéndose así la elución deseada. Tras haber pasado por la columna cromatográfica los compuestos según el tiempo de interacción, van llegando a un detector (alta sensibilidad) el cual responde a la concentración del soluto y registra su señal en función del tiempo, formando una especie de gráfico llamado cromatograma, este último permite hacer análisis cualitativos y cuantitativos de los analitos (Skoog, 2011).

En cromatografía existen varios métodos que presentan ventajas o desventajas uno sobre otros dependiendo del tipo de muestra sometida al análisis. La cromatografía de gases es la técnica más utilizada en el estudio de pesticidas

debido a su capacidad alta de resolución y la disponibilidad de detectores bastante selectivos. En la práctica de laboratorio comprueba su eficiencia detectando más de 300 pesticidas (Chen, 2011).

En este tipo de separación cromatográfica, la fase móvil es un gas inerte cuya única función es la de arrastrar al analito por toda la columna, por esta razón los compuestos solo experimentan interacción con la fase estacionaria, que por consiguiente es necesario que cumpla ciertas características, entre las que se pueden mencionar: baja volatilidad, estabilidad térmica y poca reactividad. En consecuencia la mala aplicación de la fase estacionaria en el proceso conduce a la co-elución (dificultad de separación) de los compuestos presentes en la muestra, produciendo dificultades de resolución de los picos en los cromatogramas y haciendo de esta manera imposible una buena interpretación del estudio deseado. Por el contrario un acierto de fase estacionaria y una adecuada columna (numero de platos teóricos) contribuye a picos con alta definición (Skoog, 2011).

#### 2.6.1 Columnas y Fases Estacionarias.

En cromatografía de gases existen varios tipos de columnas , sin embargo es de nuestra pertinencia destacar las columnas abiertas o capilares , estas a su vez se clasifican en WCOT(columna abierta de pared recubierta) y SCOT(columna abierta recubierta con soporte) las primeras más eficaces que las ultimas, las WCOT construidas en 1979 son columnas abiertas de sílice fundida, son bastante flexibles y pueden doblarse en forma helicoidal con un diámetro de algunos centímetros también ofrecen grandes ventajas tales como resistencia física, poca reactividad frente a componentes de la muestra (Skoog, 2011).

#### 2.6.2 Detectores.

Si bien es cierto que la cromatografía ofrece un amplio sistema de detectores es necesario saber el tipo de analito para emplear el adecuado. Debido a que de acuerdo a sus características van a tener un mejor desempeño en el proceso. A

continuación se encuentran las variables a tener en cuenta a la hora de escoger un detector eficiente: adecuada sensibilidad, buena estabilidad, reproducibilidad, tiempo de respuesta lo más corto posible, alta fiabilidad, manejo sencillo, intervalo de temperatura correcto (Skoog, 2011). La cromatografía ofrece un amplio sistema de detectores pero es necesario saber el tipo de analito para emplear el adecuado, puesto que de acuerdo a sus características van a tener un mejor desempeño en el proceso. El detector FID es el más extensamente utilizado debido a que presenta una alta sensibilidad frente a un amplio rango de compuestos. En este proceso los compuestos se pirolizan en presencia de una llama de hidrógeno /aire, producen iones y electrones que al ser aplicada una diferencia de potencial entre el extremo del quemador y un electrodo colector la corriente resultante se dirige finalmente hacia el amplificador de señal. Con el fin de poder obtener datos claros y reproducibles en cuanto al análisis de mezclas complejas en los últimos años se ha optado por establecer combinaciones de la cromatografía con otras técnicas instrumentales como la espectrometría de masas, infrarrojo de transformadas de Fourier (CG/TFIR), así como también se han establecidos nuevos diseños (Skoog, 2011).

Existe una amplia gama de instrumentos de detección entre los que vale la pena mencionar los siguientes: Ionización en llama (FID), Captura de electrones (ECD) Emisión atómica (AED), conductividad térmica (TCD), detector de quimioluminiscencia (SCD) especial para compuestos azufrados (Skoog, 2011).

## **2.7 Presencia de OF a nivel global.**

Los pesticidas OF son la base contra las plagas que generan pérdidas a nivel económico por afectación de cultivos de diversa índole, siendo aceptados y regulados por normas nacionales e internacionales. Estos químicos reemplazaron a los temibles organoclorados puesto que su acción toxicológica es más aguda y son menos persistentes en el ecosistema (Castilho, et al., 2000), lo que ha favorecido su uso recientemente. Solo en Estados Unidos (USA), son aplicadas aproximadamente cuarenta mil toneladas anuales de diversos productos OF para

evitar pérdidas en la economía agropecuaria(Pierre & Betancourt, 2007).

A medida que el uso de OF se incrementa por la creciente demanda para mejorar la calidad y cantidad de producción agrícola, los mismos deben modificarse constantemente (Jokanovic, 2001; Arbeli, 2009) y evitar la resistencia de las plagas.

En Latinoamérica, caracterizada por tener muchos países en vía de desarrollo y normas flexibles o nulas frente al uso de este tipo de sustancias, la situación es muy preocupante (Li, et al., 2010). El impacto en la salud pública se refleja en el índice de intoxicación aguda por plaguicidas (IAP), el cual se ha estimado en un 3% dentro de los trabajadores agrícolas expuestos. La tasa de incidencia para las IAP en la subregión Centroamericana ha mostrado un progresivo aumento del riesgo para el período, pasando de tasas de 6,3 por 100.000 habitantes en 1992 a 19,5 por 100.000 en el año 2000 (Grupo Copesa, 2012).

Brasil es el país que muestra el desarrollo agropecuario más importante seguido de Argentina y México (Hurtado & Gutiérrez, 2005; Jácome, 2008; Grupo Copesa, 2012) lo que determina la demanda nacional por el uso de OF y aumento de los reportes de IAP (Salcedo & Melo, 2005; Hurtado & Gutiérrez, 2005; Fernández, et al., 2010; Rovasio, et al., 2011; Kavvalakis & Tsatsakis, 2012; Flaskos, 2012). Las tasas de mortalidad también registran una tendencia al ascenso, pasando de un riesgo de muerte de 0,3 por 100.000 habitantes en 1992 a 2,10 por 100.000 en el año 2000 (Grupo Copesa, 2012).

En Colombia, la industria agrícola ocupa el 40% de la fuerza laboral y representa el 50% de las divisas, por lo que ha requerido la utilización de plaguicidas para mejorar la producción y combatir las plagas (Hurtado & Gutiérrez, 2005; Cárdenas, et al., 2005; Feola & Binder, 2010; Olivero, 2011). Por lo que nuestro país ocupa el tercer puesto en el consumo de plaguicidas a nivel de Latinoamérica, después de Brasil y México, superando los 28 millones de kilogramos anuales, de los cuales el 97% corresponden a insecticidas, herbicidas y fungicidas tanto organofosforados como carbamatos (Comunidad Andina. Secretaria General, 2002; Mojica &

Guerrero, 2010; FAO, 2012).

El gobierno Colombiano ha establecido normas de control al uso de éstas sustancias mediante el decreto 1843 de 1991 en el cual se reglamenta los plaguicidas de uso doméstico y pecuario, en los aspectos relacionados con uso, manejo, experimentación, producción, registro, almacenamiento, distribución, venta, aplicación, formulación, manejo de desechos y residuos, vigilancia epidemiológica, rotulado, etiquetado y envases (Comunidad Andina. Secretaria General, 2002; Cárdenas, et al., 2005; FAO, 2012), y han sido desarrolladas actividades relacionadas con algunos compuestos OF como los COPs (Compuestos orgánicos persistentes) y fueron elaborados inventarios de su existencia, pero no hay planes de seguimiento y control de las mismas, por lo tanto no hay garantías de cumplimiento. Según el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial en el país existen cerca de 500 toneladas de pesticidas obsoletos, ubicados en almacenes y en entierros ilegales en distintos lugares de Colombia aún sin identificar con exactitud. Dada la afectación que han causado y pueden llegar a causar a la población cercana a sus zonas de ubicación, por el riesgo que representan para el medio ambiente, por la oposición pública a los intentos de eliminación dentro del país y por el desconocimiento general sobre la magnitud de la problemática, estos materiales merecen especial interés en el ámbito ambiental nacional (Caribello, 2004; Sánchez, et al., 2006).

Sólo por nombrar algunos ejemplos, se resalta el incidente relacionado con el co-procesamiento de paratión y toxafeno en en los hornos de la compañía cementera Holcim Colombia S.A. ubicada en Nobsa (Boyacá), a finales del año 2003. Cerca de 17 toneladas fueron “procesadas” de manera poco confiable para reutilizar en cultivos de Caracolcito, Cesar.

En los años 2008 y 2009 fue realizado un monitoreo de la zona costera encontrando la presencia de seis compuestos plaguicidas en las aguas costeras y once en sedimentos de la región Caribe, y otros compuestos en trazas, lo cual indica que pueden estar elevados en otras épocas del año (CSB, 2009; GESP, 2009). Dadas las condiciones de la Costa Caribe Colombiana, se presenta una

alta incidencia de contaminación por pesticidas, los cuales por escorrentía pueden llegar a los tributarios que recorren las áreas de cultivo, o ser lixiviados hasta los cuerpos de agua que finalmente drenan a la zona costera (INVEMAR, 2009). Este problema regional ha sido más notorio desde la bonanza algodonera en la década de los ochenta, donde iniciaron el uso de plaguicidas Metil-paratión y Toxafeno (Bustamante, 2010) y, aunque la ley 2472 del 2008 regula este tipo de prácticas, no hay seguimiento y control que permitan monitorear de manera real las mismas. Comunidades como El Copey, Cesar, están preocupados por la generación de secuelas como enfermedades congénitas (Lascano, et al., 2011) y proliferación de tumores (Sierra, et al., 1998) y piden a las autoridades ambientales la solución de ésta contaminación por plaguicidas, además de estudios de impacto ambiental, y la recuperación de los sitios afectados, pero ésta última petición asciende a más de 370 millones de pesos (INVEMAR, 2009).

El departamento de Bolívar ha seguido utilizando los plaguicidas de una manera controlada por el gobierno según el decreto 2472 del 2008, muchos no cumplen con los ordenamientos establecidos. Las autoridades confirmaron el problema de mal manejo de estas sustancias, generando con ello una normativa local para tratar de controlarlo (CSB, 2009; GESP, 2009).

## **2.8 Organofosforados en Cartagena de Indias**

En la ciudad de Cartagena de Indias desde hace aproximadamente una década fue detectado un problema de manejo inadecuado de pesticidas, el cual sigue afectando parte de la población. El gobierno nacional generó normas restrictivas y reguladoras en el uso de muchos pesticidas. Esto llevó a la comunidad algodonera (caracterizada por el uso excesivo de estos químicos por la susceptibilidad de estos cultivos de infestación de diversos tipos de plagas) a desaparecer los pesticidas indeseables y residuos. El problema se generó por la mala disposición de los mismos. Gran parte de estos fueron enterrados en un lote que años después fue convertido en un barrio de interés social llamado Ciudadela 2000, localizado a la salida de la Ciudad hacia Turbaco, sobre la margen derecha de la

Troncal de Occidente, aledaño a los barrios San Fernando, Colombiatón, Sierrita y Villa Corelca y que actualmente limita con un megacolegio: Ciudadela 2000. Cuando aumentó la densidad poblacional, la generación de anomalías serias asociadas a pesticidas alertó a las autoridades que efectivamente comprobaron la presencia de estos químicos (MAVDT, 2006; GESP, 2009).

Los habitantes del barrio Ciudadela 2000 han manifestado quejas desde que se mudaron al sector, por fuertes olores semejantes a plaguicidas, e incluso tienen sintomatología típica de éste tipo de intoxicaciones como dolor de cabeza, mareos y ardor en la vista (Aldana, 2006). Estas anomalías fueron más marcadas en un lote de 1200m<sup>2</sup> perteneciente a BANCO DE COLOMBIA SA (MAVDT, 2006). El Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial mediante la resolución N° 1247 del 30 de junio de 2006, continuó con la investigación administrativa de carácter ambiental, en contra de BANCOLOMBIA S.A., y ordenó como medida preventiva, la suspensión total e inmediata de actividades realizadas en la zona. Además hubo confirmación de la presencia de organofosforados y organoclorados, y fue determinado un debido proceso de remoción de plaguicidas de la zona utilizando fitorremediación(MAVDT, 2006).

Aunque las autoridades están conscientes del problema de la zona, no hay estudios serios de control y monitoreo. Hay propuestas de manejo del sector pero aún no han sido iniciados dichos proyectos, por lo que es un problema latente en éstos terrenos (GESP, 2009).

Esta población es entonces idónea para iniciar trabajos de recuperación de suelos contaminados con OF. El problema de éstos terrenos afecta la comunidad aledaña del barrio y el ecosistema donde se encuentra. Repercute en la comunidad convirtiéndose en un problema de salud principalmente en niños (CSB, 2009), afecta directamente otras zonas y cuerpos de agua costeros locales por transporte de OF en aguas de escorrentías y aguas subterráneas. Esto repercute también en la flora y fauna que en el caso del terreno en estudio porque aunque está ubicado en el perímetro urbano cartagenero, internamente cuenta con



relaciones inter-especies importantes, y tiene además cercanía con zonas no construidas que podrían servir, una vez recuperadas, de zonas de comunicación para fauna local, ayudado a preservar las mismas (MAVDT, 2006; CSB, 2009). Lo antes descrito confirma la importancia y la urgencia de iniciar proyectos de recuperación medioambiental en la población.

## **2.9 Problemas generados por pesticidas.**

Los procesos agrícolas ocupan un 50% del total del suelo en todo el mundo, (FAO, 2012). La contaminación por pesticidas es entonces un problema global de difícil control puesto que la globalización y el crecimiento poblacional aumentan cada día más (Durán & Collí-Quintal, 2000; Litchinger, et al., 2001; Carod, 2002; Hurtado & Gutiérrez, 2005; INVEMAR, 2009; Cárdenas, et al., 2005; Ghanem & Raushel, 2005; Aldana, 2006; Varona, et al., 2007; Jácome, 2008). Este crecimiento es directamente proporcional a la demanda de productos agrícolas incrementando el uso del suelo para este fin (Exner & Urquizo, 2009; Mojica & Guerrero, 2010; Hoai, et al., 2011; Zhao & Pei, 2012; Caballero, et al., 2012). El uso de pesticidas ha aumentado un 854% desde los años sesenta hasta la década de los noventa generando grandes problemas ambientales(FAO, 2012).

El uso de los plaguicidas en la agricultura ocasiona su liberación al medio ambiente, hecho que genera contaminación tanto por los productos básicos como por los subproductos que en muchas ocasiones son igualmente tóxicos. Esta exposición ambiental está presente en diversas matrices entre las cuales se resalta el agua y el suelo (Motohashi, et al., 1996; Lesueur, et al., 2008; Mojica & Guerrero, 2010).

Más del 98% de los insecticidas fumigados y del 95% de los herbicidas llegan a un destino diferente del buscado, incluyendo la fauna, la flora y los ecosistemas que los contienen (Invemar, 2005; Fong, et al., 1999; Carod, 2002; Eddleston, et al., 2012). Las partículas de pesticidas suspendidas en el aire son llevadas por el viento a otras áreas, pudiendo llegar a contaminarlas. Los pesticidas son una de las causas principales de la contaminación del agua y ciertos pesticidas

son contaminantes orgánicos persistentes que contribuyen a la contaminación atmosférica (Motohashi, et al., 1996; Litchinger, et al., 2001; Pierre & Betancourt, 2007; Murcia & Stashenko, 2008).

En adición, el uso de pesticida reduce la biodiversidad y la fijación de nitrógeno, contribuye al declive de polinizadores (Motohashi, et al., 1996; Mojica & Guerrero, 2010; Eddleston, et al., 2012), destruye hábitats y amenaza a especies en peligro de extinción (Mojica & Guerrero, 2010).

Muchas veces algunas especies “plaga” son capaces de adaptarse a los pesticidas, fenómeno conocido como resistencia a pesticidas, por lo cual sobreviven a las dosis recomendadas o incluso más altas. Esta resistencia conlleva al uso de otros pesticidas o mezclas de los mismos con dosificación mayor, causando consecuencias más preocupantes a nivel de salud pública y ecología (Feola & Binder, 2010; Olivero, 2011; Comunidad Andina. Secretaria General, 2002).

Un aproximado de 100.000 personas mueren al año solo en USA por el uso de pesticidas y 200.000 presentan intoxicación aguda por mal uso en la agricultura y la ganadería (Gunderson, et al., 1992; Carod, 2002; Rozo & Alvarado, 2004; Castrejón, et al., 2006; CSB, 2009).

Aunque para la población en general los riesgos de sufrir consecuencias en su salud por el uso de pesticidas son muy bajos, siempre que las condiciones de aplicación y eliminación de residuos hayan sido cumplidas correctamente, para los obreros de su manufactura, transporte y aplicación, así como para los agricultores, sobre todo de países como Colombia el riesgo es muy grande (Carson & Harris, 2008; Banks & Lein, 2012). Existe incertidumbre acerca de los efectos de la exposición prolongada de dosis bajas de pesticidas. Los sistemas de supervisión actuales son inadecuados para definir los riesgos potenciales relacionados con el uso de pesticidas y con enfermedades relacionadas a pesticidas. Teniendo en cuenta estas faltas de datos, es prudente limitar la exposición a pesticidas y usar los pesticidas químicos menos tóxicos o recurrir a alternativas no químicas (Feola,

et al., 2010).

Entre los pesticidas más importantes se encuentran los organofosforados (OF) por su uso indiscriminado y efectos.

## **2.10 Soluciones a los problemas generados por los organofosforados.**

Debido al impacto tanto nacional como internacional que este fenómeno presenta, la comunidad científica ha realizado diversos ensayos en diferentes líneas investigativas para tratar de disminuir la huella que produce el problema. Han sido iniciados estudios que pretenden generar productos naturales que reemplacen a las peligrosas moléculas sintéticas conocidas como pesticidas. Nerio *et al.*, Caballero *et al.*, Cossimi *et al.*, y Yoon *et al.* han probado la capacidad repelente de productos conocidos como aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas exóticas contra a insectos considerados plaga tanto de almacén de productos agrícolas como de sembrados, entre los que están *Tribolium castaneum* Herbst, *Sitophilus zeamays* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens), *Tenebrio molitor* (L.) y *Lycoma delicatula* Hemiptera:Fulgoridae) (Weber, 1994; Oshiro, et al., 1996; Tirado & Vásquez, 2005; Caballero, et al., 2012).

Este tipo de estudios son muy buenos puesto que generarán productos que reemplacen los pesticidas brindando más selectividad en el organismo a repeler, disminución de impactos ambientales negativos, biodegradación rápida sin consecuencias en salud pública o medioambiental, etc.

La principal medida tomada para evitar la contaminación con este tipo de químicos es el control sobre el uso de los mismos. Esta medida es positiva para evitar nuevos casos de contaminación y educar a las personas que utilizan plaguicidas pero desafortunadamente no soluciona el problema de OF acumulados de suelos (Varona, et al., 2007). Muchos autores han puesto sus esfuerzos en controlar este tipo de contaminación. Entre los métodos de limpieza de OF están: la extracción Supercrítica de Fluidos (SFE) implementando dióxido de carbono supercrítico, ozonificación, filtración con carbón activado, flotación, precipitación química,

adsorción, volatilización y arrastre de compuestos orgánicos volátiles (Tchobaloglus y Burton, 1995) y fotocátalisis (Tchobaloglus, 1995; Yu, 2002; Peñuela, 2005) . Estos tratamientos son muy eficientes como posibles soluciones al problema de contaminación de aguas por OF, pero son más efectivas en matrices líquidas (Yu, 2002; Andersen J., 2006). A continuación son mostrados diversos tratamientos utilizados para la depuración de matrices contaminadas (Oshiro, et al., 1996; Tsutsumi, et al., 2000):

Tabla 2. Comparación de métodos de tratamiento de residuos tóxicos

Tipo de tratamiento	Coste por metro cúbico (\$ colombiano)	Tiempo necesario (meses)	Factores adicionales / gastos	Cuestiones de seguridad
Incineración	1,000.000-2,000.000	6-9	Energía	Contaminación atmosférica
Inertización	200.000-300.000	6-9	Transporte y control a largo plazo	Lixiviación
Vertedero	800.000-1,000.000	6-9	Control a largo plazo	Lixiviación
Biorremediación	150.000-300.000	18-60	Tiempo dedicado	Metabolitos intermedios y polimerización

Entre las soluciones para depurar la contaminación generada por este tipo de actividades y evitar los efectos adversos medioambientales y de salud pública está la biorremediación, siendo la misma una rama de la biotecnología con resultados óptimos, eficaces y aplicables *in vivo*, trabajando además interdisciplinariamente con miras en el desarrollo en biología molecular e ingeniería genética (Mulbry & Kearney, 1991; Cycón, et al., 2009; Cosimi, et al., 2009; Yoon, et al., 2011; Sirotkina, et al., 2012; Zhao & Pei, 2012)

### 2.11 Biorremediación de organofosforados.

La biorremediación es la herramienta fundamental de la biotecnología, que emplea el potencial genético y enzimático de los microorganismos para el tratamiento de

suelos y aguas contaminadas (Tirado & Vásquez, 2005). Dentro de los principales microorganismos utilizados en procesos de biorremediación se encuentran las bacterias y hongos, siendo las primeras organismos que requieren menos esfuerzos para ser estudiadas y empleadas. Si bien es cierto que, dentro de las especies bacterianas utilizadas en la biodegradación de compuestos tóxicos se encuentran organismos altamente patógenos, la modificación genética de estas puede permitir su uso en procesos de recuperación de ambientes contaminados por plaguicidas de la familia química de OF (Zhao & Pei, 2012). Por lo que han sido desarrollados varios métodos de biodegradación de sustancias tóxicas eficientes y seguros (Levin, 1997).

Usualmente, se asocia la contaminación con un proceso negativo para los organismos, sin embargo, desde el punto de vista bacteriológico, ésta promueve el crecimiento de agentes microbiológicos que emplean los compuestos químicos para la nutrición y crecimiento de las colonias (Cosimi, et al., 2009). Este aprovechamiento de los recursos es posible gracias al empleo de enzimas específicas involucradas en el metabolismo de las bacterias generando tasas de reacción más rápidas y mejorando los procesos de degradación de los agentes contaminantes (Rona & Rosenmerg, 2002; Ezezika & Singer, 2010; Ezezika & Singer, 2010).

Este campo ha sido ampliamente estudiado desde la década de los noventa (Oshiro, et al., 1996; Weber, 1994), donde tuvo una acogida positiva puesto que fue comprobada la eficiencia de los microorganismos bacterianos para depurar diversas matrices contaminadas con xenobióticos entre los cuales se destacan los hidrocarburos aromáticos (Weber, 1994) e iniciaron los primeros estudios de degradación bacteriana de pesticidas polinucleares organofosforados.

Bacterias como el *Arthrobacter sp.* fueron aisladas de suelos contaminados con pesticidas OF entre los cuales están diazinón, paratión, fenitrotión, isofenfós, clorpirifós, y etoprofós produciendo degradación de los mismos en tasas que variaron de acuerdo a las condiciones de crecimiento del microorganismo (Oshiro, et al., 1996). Estudios similares han sido desarrollados a medida que las

tecnologías avanzan y la eficiencia de estos procesos mejoran, aunque los mismos afirman que estas bacterias deben ser utilizadas con cuidado por ser generalmente patógenas, por lo tanto si son utilizadas sin previo tratamiento de ingeniería genética o controladas por medio de biorreactores, pueden ser generadoras de desequilibrios ecológicos y de salud de flora y fauna aledaña (Tsutsumi, et al., 2000).

Cycón *et al.* (2009) aislaron tres cepas bacterianas de una muestra compuesta de suelo utilizado para actividades agrícolas, obteniendo tres géneros de la familia Enterobacteriaceae: *Serratia liquefaciens*, *Serratia maecescens*, y *Pseudomonas sp.* Estas cepas presentaron un crecimiento aceptable en medio M9 y fue confirmada la capacidad degradativa de las mismas al cuantificar la degradación de un patrón de OF presente en medios de cultivo altamente selectivos. Los resultados sugieren una fuerte correlación entre la actividad microbiana y los procesos químicos de degradación de diazinón. Además concluyen que las cepas bacterianas aisladas pueden tener un potencial para su uso en biorremediación de diazinón y otros OF de suelos contaminados. Por otra parte, Pino y Pañuela obtuvieron de suelos altamente contaminados de la ciudad de Medellín, Colombia, un grupo de cepas bacterianas resistentes a OF, las cuales fueron capaces de degradar metil parathión y clorpirifos simultáneamente. Este consorcio bacteriano fue compuesto por *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Stenotrophomonas sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.* y *Flavobacterium sp.* el consorcio fue capaz de degradar 150ppm en 120h, reduciéndose los pesticidas hasta en un 98% (Pino & Peñuela, 2011). El consorcio bacteriano conformado por microorganismos del género *Exiguobacterium sp.* y *Rhodococcus sp.* capaz de degradar hasta un 80% del pesticida con una concentración inicial de 50ppm a condiciones externas estáticas (Phugare, et al., 2012). Así mismo se ha detectado la presencia y actividad degradadora de *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*, consorcio bacteriano que logró degradar casi 90% del pesticida OF concentrado en 50ppm en el transcurso de 6 días, comprobando que

efectivamente estas bacterias pueden ser utilizadas en procesos de biorremediación(Rani & Juwarkar, 2012).

Es importante contar con una buena identificación de los microorganismos aislados de matrices estresadas con OF. Siendo las más trabajadas para biodegradación bacteriana el suelo, agua, leche, etc. (Oshiro, et al., 1996; Cycón, et al., 2009; Sirotkina, et al., 2012; Anon., 2012; Zhao & Pei, 2012). La identificación de las especies biodegradadoras permitirán el desarrollo de estudios a nivel de ingeniería genética y manipulación del gen que codifica las enzimas que hidrolizan OF.

Para identificar estas cepas bacterianas lo primero que debe hacerse una vez los microorganismos han sido aislados y purificados, es una tinción de Gram para determinar las características morfológicas microscópicas de los mismos. Esta tinción da las pautas a seguir para el tratamiento del microorganismo (Moaledj, 1986).

Entre las cepas referenciadas como capaces de hidrolizar OF han sido identificadas especies de *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium* y *Erwinia*. En suelos del territorio Colombiano en general no han sido estudiados los microorganismos autóctonos de zonas con éste problema, y Cartagena de Indias posee buenas condiciones para procesos de biorremediación por la poca altura, alta temperatura y humedad relativa alta características favorables para metabolismo bacteriano (Adams, et al., 1999; CIOH, 2012).

La microflora de suelos contaminados es uno de los agentes básicos para la detoxificación de pesticidas. Algunos investigadores encontraron que los suelos contaminados con OF podrían ser eficientemente descontaminados con microorganismos específicamente adaptados. La detoxificación enzimática de OF por parte de algunas especies bacterianas ha recibido gran atención (Mulbry & Kearney, 1991; Weber, 1994; Oshiro, et al., 1996; Cycón, et al., 2009; Zoubulis &

Moussas, 2011; Sirotkina, et al., 2012; Rani & Juwarkar, 2012). Estas bacterias logran este proceso por producción de fosfotriesterasas, y también organofosfato hidrolasas (OPH) y organofosfato degradadoras (OPDA). Las OPH y OPDA son capaces de hidrolizar un amplio rango de OP. Las OPDA son codificadas por los genes *opd*. Los genes *opd* tienen secuencias similares en las diferentes cepas bacterianas relacionadas con estos procesos (Sharaf, et al., 2006).

La expresión de estos genes es llevada a cabo de manera similar. La Figura 3 muestra la expresión del gen *opdA* para tener una idea del proceso molecular llevado a cabo por las bacterias(Sharaf, et al., 2006).

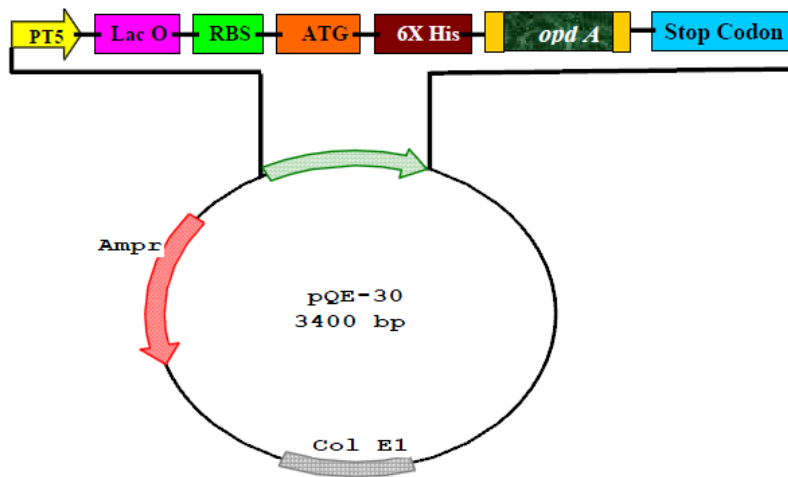


Figura 3. Mapa físico de la expresión del plásmido *pQE-opd A*.

Las bacterias tanto para la degradación de pesticidas OF como para cualquier otra sustancia utilizan enzimas especializadas. (Jokanovic, 2001). A continuación se presenta la reacción llevada a cabo por esta enzima.



La fosfotriesterasa hace parte de las esterasas clasificadas por el International Union of Biochemistry, 1992. Este grupo de enzimas fueron descritas como entidades especiales conocidas como triester fosforo hidrolasas (Jokanovic, 2001).



Las hidrolasas comprenden tres grupos enzimáticos: Monoéster fosfórico hidrolasas, diéster fosfórico hidrolasas y triéster fosfórico hidrolasas. Estas últimas se dividen en dos subgrupos similares: arildialquilfosfatasa y diisopropilfluorofosfatasa. Las primeras toman parte en la hidrólisis de dialkildifosfatos, cuya reacción produce dialkildifosfato y alcohol arílico. Estas enzimas reaccionan con OF como el parazón, pero también con fosfonatos y fosfofinatos. Otros nombres para este grupo de enzimas es el de hidrolasas de OF (Jokanovic, 2001).

Actualmente está comprobada la protección contra la acción de los OF en organismos capaces de producir este tipo de enzimas, o si los mismos son “vacunados” con estas, incluso fue comprobada la eficacia de la enzima al actuar *in vivo* en el cerebro de mamíferos roedores intoxicados con OF como diclorvos (Jokanovic, 2001).

Existen dos tipos de enlaces de las moléculas de OF que pueden ser eliminados por medio de acción enzimática: el anhídrido (PO, PS, PF) y el alquil-éster. Las enzimas hidrolíticas juegan un papel muy importante, al igual que los mecanismos de transferencia de ciertos grupos funcionales de una molécula endógena, como el glutatión, al sustrato OF. Todos estos mecanismos conllevan a la detoxificación de OF. Este tipo de reacciones pueden ser llevadas a cabo por células eucariotas, aunque menos eficientes que las procariontes (Jokanovic, 2001).

Las reacciones de hidrólisis enzimática son las vías metabólicas bacterianas por excelencia para degradar este tipo de sustancias. Las bacterias cuentan con esterasas capaces de hidrolizar los OF. Estas enzimas son conocidas como hidrolasas fosforo triesterasas y son muy importantes porque su actividad puede influir significativamente en la toxicidad de los OF (Jokanovic, 2001). Entre las enzimas utilizadas por las bacterias para el proceso degradativo de OF están: orfanofosfato hidrolasa (*Arthrobacter* sp.), ácido organofosfato anhidrasa (*Mycobacterium* sp.), arildialquilfosfatasa (*Bacillus* sp.), etc. (Motohashi, et al., 1996).

Aunque existen estos modelos de tratamiento de OF, éste proyecto tendrá como base para recuperar en un futuro éste terreno la biorremediación por ser una posible solución eficiente, confiable, efectiva, relativamente rápida y económica (Ronzano & Dapena, 2002; Ghanem & Raushel, 2005; Castrejón, et al., 2006).

## **2.12 Identificación de bacterias degradadoras de OF.**

### **2.12.1 Identificación bioquímica de bacterias degradadoras de OF por BBL Crystal.**

Para garantizar la confiabilidad en la identificación bacteriana hay métodos bioquímicos comprobados, entre los cuales sobresale el BBL Crystal®, método basado en la utilización y degradación de sustratos específicos por parte de los microorganismos detectados por distintos sistemas indicadores. Las reacciones de fermentación detectan la capacidad de un aislado para metabolizar los carbohidratos en ausencia de oxígeno atmosférico, y las reacciones de oxidación están basadas en la capacidad de un organismo para metabolizar el sustrato siendo el oxígeno el aceptor final de electrones, ambas reacciones se detectan normalmente mediante el uso de un indicador de pH en el sustrato de análisis. El medio contiene sustratos cromógenos que permiten la diferenciación de los microorganismos mediante la degradación de enzimas específicas de cada uno, cambiando de color al sufrir hidrólisis (Murray, et al., 1999).

El procedimiento se con la inoculación de la cepa en micropozos con diversos medios de cultivos liofilizados, los cuales luego de incubación, muestran cambios en su presentación inicial, permitiendo la obtención de un código dependiendo del comportamiento bioquímico del microorganismo y arrojando un porcentaje de homología con géneros y especies bacterianas. Además de esto, aumenta la confiabilidad de los resultados que el kit comercial tiene varias presentaciones dependiendo del tipo de bacteria que se espera encontrar (Moll, et al., 1996).

Aunque esta prueba es altamente confiable, existe la prueba confirmatoria para todo método de identificación, como la secuenciación del gen ribosomal 16S. Esta prueba molecular permite la identificación de 99.9% de las cepas sometidas a la

misma (Toney, et al., 2010).

### 2.12.2 Identificación molecular utilizando secuenciación del gen ADNr 16s.

La especie bacteriana se define, en taxonomía, como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más, en experimentos de reasociación ADN-ADN (Rodicio & Mendoza, 2004). Por lo que técnicas moleculares como la secuenciación son métodos comúnmente empleados en la microbiología. Aunque existen marcadores moleculares alternativos al ADN ribosomal del fragmento 16S, hasta el momento ninguno ha conseguido desplazarle. De hecho, esta macromolécula se prefiere dada su estructura y función en la célula, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios. Es una molécula relativamente grande, con una estructura secundaria estable que aparece en todas las especies, con funciones metabólicas importantes que ha permanecido constante. El ADNr sufre cambios muy lentos (en términos evolutivos), como para aportar información acerca de todos los procariotas y que junto con las variaciones en los ADNr 18S pueden resolver filogenias o problemas de identidades específicas. Estas características la han posicionado como una de las moléculas predilectas por diferentes investigadores de tal manera que se pueden encontrar bases de datos amplias y en continuo crecimiento con las secuencias del gen (Stackebrandt, et al., 2001).

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S incluye tres etapas: amplificación del gen a partir de la muestra apropiada; determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón, y análisis de la secuencia.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ADNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición

evolutiva en el contexto de los organismos comparados (Stackebrandt, et al., 2001).

Durante la última década se han implementado diferentes técnicas moleculares para complementar los análisis. Por ejemplo, el análisis de secuencias de ARNr, la cual aporta además, información sobre la estructura terciaria de la molécula. Presenta sin embargo, problemas cuando las cepas con un nivel de relación genética es cercano al 97% o más entre sus genes ARNr 16S. Sin embargo, existen cepas que comparten una similitud inferior al 50% en experimentos de reasociación de ADN, y son por tanto clasificadas en especies diferentes, pero presentan una identidad del 99-100% a nivel de ARNr 16S. Por ello, en taxonomía, actualmente es recomendada la identificación polifásica que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación, incluyendo la secuenciación completa del genoma (Patel, 2001).

#### 2.12.2.1 Amplificación:

La amplificación del ADNr 16S es lograda en un termociclador, gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como sustrato se utiliza normalmente ADN purificado a partir de un cultivo puro del agente patógeno. Para la extracción del ADN bacteriano existen protocolos generales, pero pueden requerirse modificaciones, dependiendo de la bacteria. Además, la amplificación también puede conseguirse directamente a partir de una colonia aislada o un cultivo líquido de la bacteria de interés, o incluso a partir de una muestra clínica, simplificando significativamente la identificación (Rodicio & Mendoza, 2004).

#### 2.12.2.2 Oligonucleótidos iniciadores:

Para la amplificación del ADNr 16S, las regiones conservadas facilitan el diseño de oligonucleótidos iniciadores. Cuando se pretende amplificar el ADNr 16S prácticamente completo, son utilizados iniciadores diseñados con base en secuencias conservadas próximas a los extremos 59 y 39 del gen, que originan amplicones de 1.500 pb, aproximadamente. Ha sido demostrado que una identificación precisa no siempre requiere amplificación y posterior secuenciación del ADNr 16S completo. En estas circunstancias son utilizados oligonucleótidos

que permitan la amplificación de fragmentos de menor tamaño, preferentemente las 500 pb correspondientes al extremo 5' del gen. En cualquier caso, antes de pasar a la siguiente etapa es conveniente comprobar el producto mediante electroforesis en gel de agarosa, para asegurar la presencia de un único fragmento (amplicón) del tamaño adecuado (Patel, 2001).

#### 2.12.2.3 Secuenciación del amplicón.

En esta etapa son llevadas a cabo las reacciones de secuenciación y el análisis de los productos por electroforesis. Actualmente, es empleada la secuenciación cíclica, en una reacción similar a la de amplificación, que utiliza un único iniciador por reacción y terminadores marcados con fluorocromos adecuados, que interrumpen la síntesis de manera aleatoria, y facilitan la detección posterior de los fragmentos interrumpidos. El número de bases generadas por un secuenciador automático es de 500 a 900, dependiendo del capilar utilizado en la electroforesis. (Patel, 2001).

Aunque existen posiciones filogenéticamente informativas a lo largo de todo el gen, la mayor variabilidad está en las primeras 500 bases, correspondientes al extremo 5'. Generalmente, esta secuencia de 500 bases será suficiente para la correcta identificación de un aislado, necesitándose únicamente 2 iniciadores. En cualquier caso, la secuenciación de las dos cadenas del ADNr 16S completo será necesaria a la hora de identificar nuevos patógenos.

#### 2.12.2.4 Análisis de la secuencia.

La última etapa es la comparación de la secuencia del ADNr 16S con las depositadas en bases de datos. Actualmente existen distintas bases de datos, algunas públicas, cuyo acceso es libre a través de internet, como GenBank, NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), y otras privadas, como MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGene IDNS (Integrated Database Network System). RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>) es la principal base de datos de secuencias de ADNr (no sólo 16S, sino también 23S de procariotas, y 18S y 28S de eucariotas).

Permite la comparación de secuencias online, y ofrece otras muchas posibilidades. En octubre de 2003 contenía más de 78.000 secuencias de ADNr 16S, que son alineadas, teniendo en cuenta la estructura secundaria de la molécula. La base de datos RIDOM (<http://www.ridom.de>) se limita también a secuencias de ADNr, centrándose exclusivamente en microorganismos patógenos. Como se verá posteriormente, la elección de la base de datos es importante, siendo recomendable la utilización de más de una de ellas, para comprobar si conducen al mismo resultado. Finalmente, se podrá construir un árbol filogenético, que refleja, de forma esquemática, el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Tratamiento del Suelo.

##### 3.1.1 Muestreo de suelos.

Un total de 3 muestras fueron colectadas en suelo del barrio Ciudadela 2000 en la ciudad de Cartagena, Bolívar (Figura 4) el mes de Junio del año 2012. La toma de muestra fue realizada de acuerdo con la metodología propuesta por Hudson (2006), que recomienda un muestreo en zigzag (Figura 5), a una profundidad de 20cm, con mezcla del suelo y almacenamiento en bolsas limpias y gruesas para transporte (Figura 6). Una vez colectadas las muestras, cada una con 3Kg, fueron llevadas al laboratorio y almacenadas a 18°C.



Figura 4. Ciudadela 2000, Cartagena de Indias. Cortesía GESP 2009

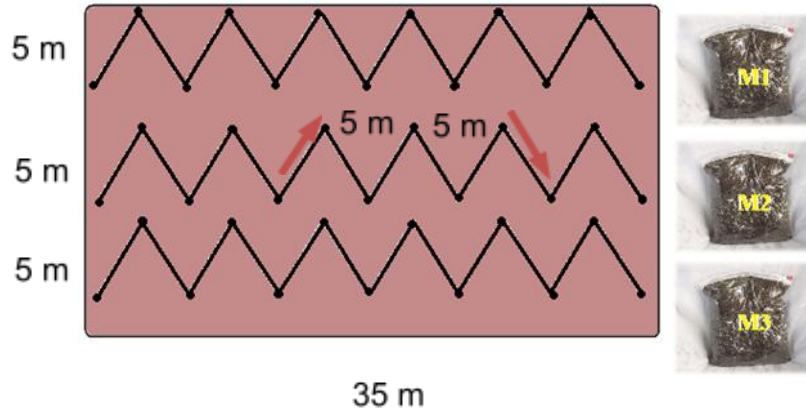


Figura 5. Toma de muestra de suelos del estudio



Figura 6. Muestreo de suelos en lote de Ciudadela 2000.

### 3.1.2 Preparación de las muestras de suelos por medio de extracción Soxhlet.

Para realizar el análisis cromatográfico de las muestras, cada una de ellas fue sometida a extracción Soxhlet (Page, 1982) (Figura 7). Para este paso se tomaron 5 a 10 g de muestra, se adicionó sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) hasta desecar completamente la mezcla. Posteriormente se colocó el preparado en un cartucho de celulosa impregnado con una solución de acetona – hexano (1:4) por



20 horas. Al finalizar, la muestra se concentró mediante el uso de un rotaevaporador hasta llevarla a un volumen final de 5 mL.



Figura 7. Extracción Soxhlet de suelo – montaje en laboratorio

### 3.1.3 Estandarización de tiempos de retención de organofosforados.

Se estandarizaron los tiempos de retención de organofosforados con base en 18 patrones (Linstrom & Mallard, 2011) (Tabla 3), los cuales se sometieron a la GC/FID, con el fin de determinar el parámetro de identificación de los pesticidas OFs presentes en las muestras. Este proceso se realizó tomando una pequeña porción (0,5 g) de cada patrón, se disolvió en 1mL de acetona – hexano (1:4) y de esta solución se inyectaron 5 $\mu$ L en un equipo de cromatografía (Tabla 4).

Tabla 3. Patrones usados para identificar contaminantes del suelo evaluado

<b>Compuesto</b>	<b>Formula</b>	<b>Peso Molecular (g/mol)</b>
Sulprofós	$C_{12}H_{19}O_2PS_3$	322,45
Demetón*	$C_6H_{15}O_5PS_2$	262,28
Paratión	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	291,26
Fenclorfós*	$C_8H_8Cl_3O_3PS$	321,55
Metil Paratión	$C_8H_{10}NO_5PS$	263,21
Metil - azinfos	$C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$	317,32
Forato*	$C_7H_{17}O_2PS_3$	260,38
Diclorvós	$C_4H_7Cl_2O_4P$	220,98
Diazinón	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	304,35
Cumafós	$C_{14}H_{10}ClO_5PS$	362,77
Fenil sulfotión	$C_{11}H_{17}O_4PS_2$	308,35
Clorpirifós	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	350,59
Disulfotón	$C_8H_{19}O_2PS_3$	274,42
Fentión	$C_{10}H_{15}O_3PS_2$	278,34
Malatión	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330,38
Monocrotofós	$C_7H_{14}NO_5P$	223,19
Sulfotep	$C_8H_{20}O_5P_2S_2$	322,32

\* Pesticidas OF encontrados en las muestras de suelo a analizar

Tabla 4. Especificaciones del equipo cromatográfico utilizado en el estudio.

<b>Equipo cromatográfico Agilent 48900D</b>	
Detector	Ionización de llama (FID)
Columna	HP-5
Rampa de Temperatura	50°C al inicio hasta 300 °C
Temperatura del horno	Inicio en 70°C por dos minutos hasta 300°C
Fase móvil	Hidrógeno (H <sub>2</sub> )
Volumen de muestra Inyectado	1µL en splitless
Tiempo de corrida	30 minutos

Las Figuras 8 a 10 muestran los cromatogramas de tiempos de retención para los patrones de los OF: Fenclorfós, Forato y Demetón, encontrados también en las muestras de suelo y sometidos a GC/FID.

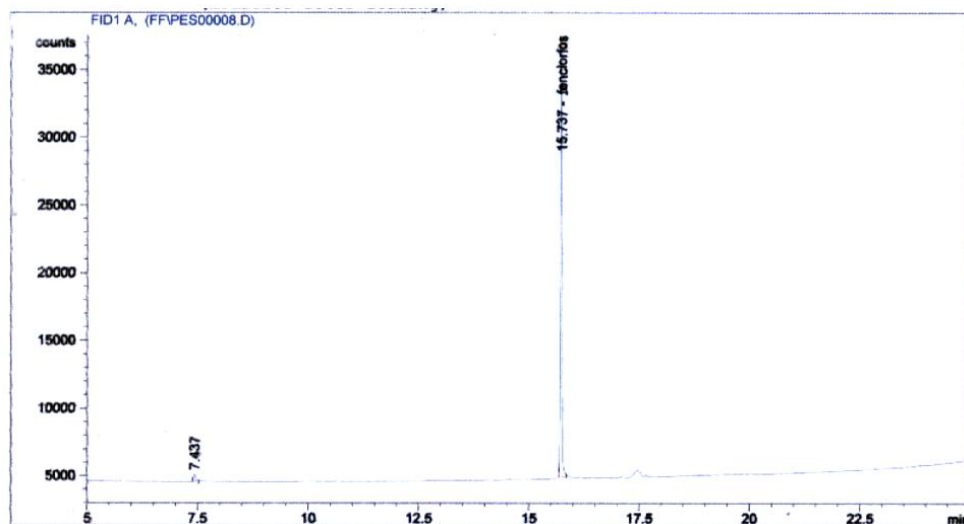


Figura 8. Cromatograma del patrón OF Fenclorfós.

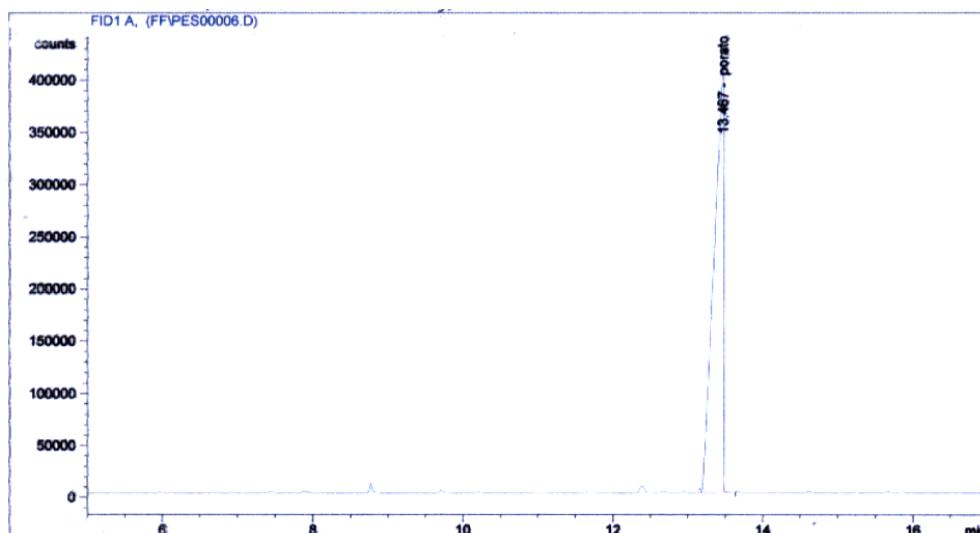


Figura 9. Cromatograma del patrón OF Forato.

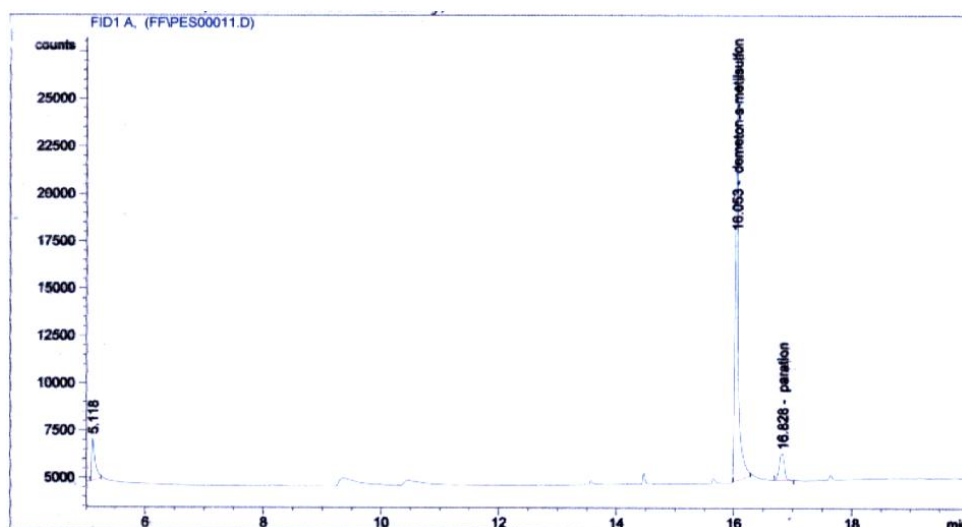


Figura 10. Cromatograma del patrón OF Demetón.

### 3.1.4 Evaluación de la muestra por GC/FID.

Una vez realizada la extracción mediante Soxhlet de las muestras de suelo, éstas se sometieron a GC/FID con el fin de identificar los OFs contenidos en ellas (Calonge, et al., 2002; Murcia & Stashenko, 2008; Phineiro & Restepo, 2009). Para ello se diluyeron 20µL del extracto de muestra en una solución acetona – hexano (1:4), hasta llevar a volumen final de 1mL. De esta disolución se tomaron 5 µL y se inyectaron en el CG/FID para la obtención de tiempos de retención para cada

muestra, identificando de este modo los posibles organofosforados presentes en el suelo (Murcia & Stashenko, 2008).

### **3.2 Tratamiento de material microbiológico.**

#### **3.2.1 Activación del metabolismo degradador de OF en las cepas bacterianas aisladas.**

Una parte de las muestras de suelo colectadas en Ciudadela 2000, fue utilizada para lograr la expresión del metabolismo degradador de OF, de acuerdo con lo recomendado por Cycón y colaboradores (2009). Primero se realizó una dilución de Monocrotofós a 200ppm, de esta dilución se tomaron 20mL y se impregnaron 300 g de suelo colectado, se dejó secar y se colocaron en oscuridad a 30 °C por 30 días (Cycón, et al., 2009).

#### **3.2.2 Aislamiento de bacterias de muestras tratadas con OF.**

Se tamizaron los 300 g de suelo tratado con Monocrotofós (en el paso anterior) utilizando una malla de 2mm. Luego fue adicionado 1g del tamizado en 9mL de agua destilada estéril. Esta dilución fue la base para la realización de soluciones sucesivas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  utilizando como solvente medio mínimo M9 con Monocrotofós como única fuente de carbono (Fernández, et al., 2005).

##### **3.2.2.1 Preparación del medio mínimo M9 matriz líquida.**

La solución de medio mínimo M9 (con un contenido de Monocrotofós a 200ppm) fue preparada con Fosfato ácido de sodio hidratado (6g), Fosfato ácido de potasio (3g), Cloruro de amonio (4g), Cloruro de sodio (0,5g), Sulfato de manganeso heptahidratado (0,25g), Cloruro de calcio hidratado (0,0168g), Patrón de Monocrotofós (0,2g) y se completó a 1 L con Agua destilada y agitación constante (Elbing & Brent, 2002). El pH se ajustó a 7-7,2 con ácido clorhídrico 1N e hidróxido de sodio 5N y se refrigeró hasta su utilización.

### 3.2.2.2 Preparación del medio mínimo M9 matriz sólida.

De la solución de medio mínimo M9 (sección 3.2.2.1), se prepararon 16 medios de fase sólida utilizando agar agar y siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante.

### 3.2.2.3 Aislamiento de bacterias con capacidad de crecimiento en medio altamente selectivo.

Para el aislamiento de microorganismos bacterianos con capacidad de crecimiento en medio mínimo M9 fue realizada una siembra masiva del suelo diluido (sección 3.2.2) en agar nutritivo. Luego, el mismo fue llevado a incubación por 1 semana a una temperatura de  $36^{\circ}\text{C}\pm 1$ . Una vez se comprobó el crecimiento de las colonias, fue realizada la siembra de las más grandes, mejor aisladas y con mejores cualidades organolépticas en el medio líquido M9.

Transcurrida una semana después de la siembra de las colonias en la matriz líquida de medio M9, se verificó el crecimiento bacteriano mediante la espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV/VIS) y se realizaron lecturas consecutivas durante cuatro días consecutivos. Luego de comprobar el crecimiento bacteriano en esta matriz líquida, fue tomada una alícuota (aprox.  $50\mu\text{L}$ ) de cada muestra para realizar la siembra masiva en medio sólido M9.

## 3.2.3 Identificación de cepas bacterianas aisladas.

### 3.2.3.1 Identificación bioquímica de bacterias aisladas.

Las colonias bacterianas aisladas en medio sólido M9 fueron tomadas y repicadas en tres oportunidades en agar nutritivo utilizando la técnica por agotamiento para garantizar así el aislamiento de cada una. Después del tercer repique, las colonias fueron sometidas a tinción de Gram y sembradas en kits de identificación bacteriana por métodos bioquímicos BBLCrystal® (Figura 11).

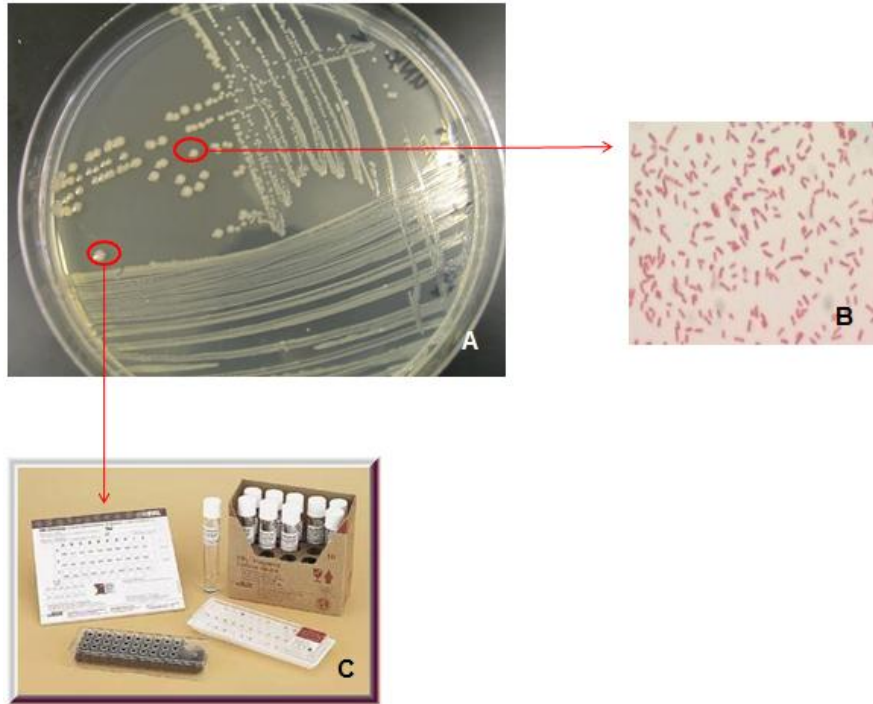


Figura 11. Aislamiento, purificación e identificación bioquímica de colonias bacterianas con capacidad de crecimiento en medio M9.

A. Cepas aisladas en medio mínimo M9. B. Tinción de Gram de colonias aisladas. C. Kit de identificación bioquímica BBL Crystal®.

### 3.2.3.2 Confirmación molecular de género y especie de las bacterias en estudio.

Las colonias aisladas, purificadas y caracterizadas bioquímicamente, fueron genotipificadas. Mediante la amplificación del gen ribosomal 16S por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la secuenciación de un fragmento de 1465pb. Una vez obtenidas las secuencias de los fragmentos se ensamblaron y compararon con las secuencias depositadas en las bases de datos de NCBI (National Center For Biotechnology Information) y RDP (Ribosomal Database Project). Procedimientos realizados comercialmente por CORPOGEN (Bogotá-Colombia).

### 3.3 Validación de la degradación del pesticida OF por acción bacteriana.

La verificación de la actividad degradadora de las bacterias aisladas e identificadas, fue realizada mediante la medición de la concentración de OF usando GC/FID.

Para verificar la disminución y/o eliminación del pesticida presente en el medio líquido fue necesario someter las muestras a GC-FID. Cada 24 horas se hicieron estas mediciones. La curva de calibración utilizada en el método es mostrada a continuación (Figura 12.)

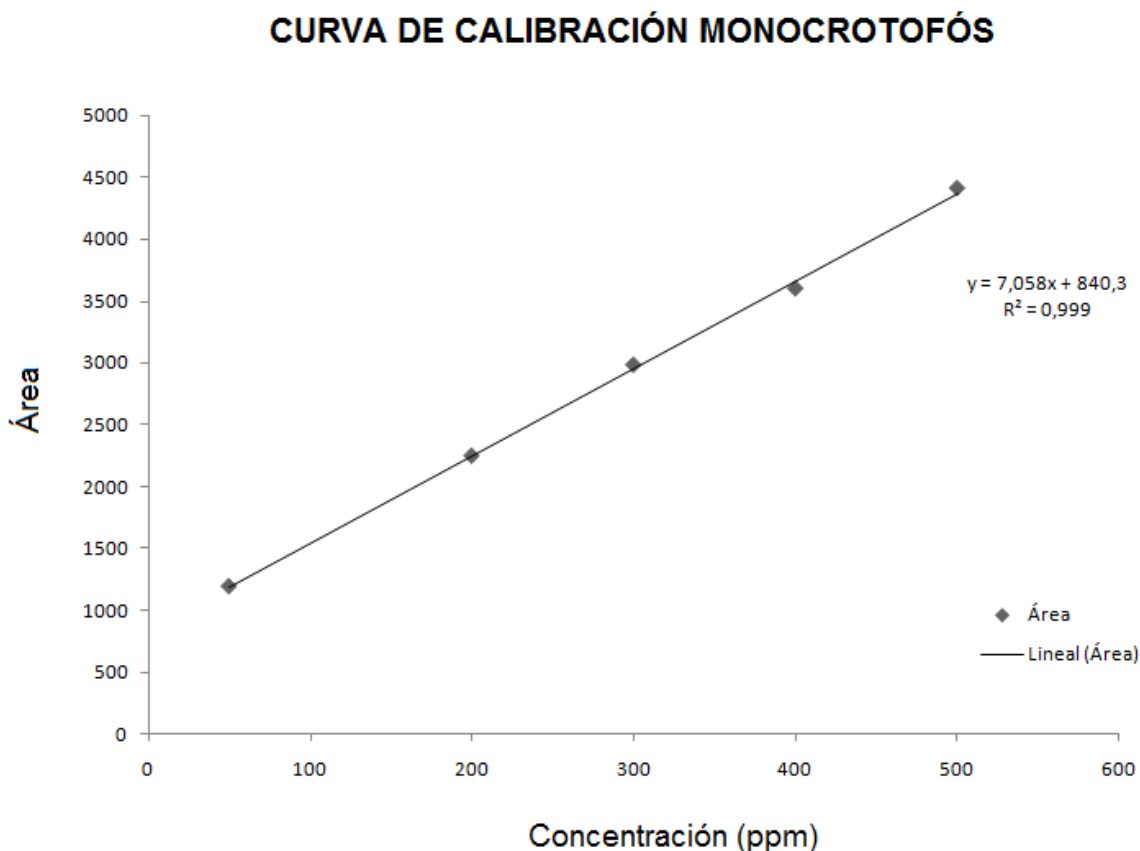


Figura 12. Curva de calibración utilizada en el método de GC-FID

Los medios de cultivo líquidos fueron sometidos a GC-FID para determinación del pesticida presente. Además de las tres cepas evaluadas, se tuvo un Blanco o Control Negativo, en el cual se utilizó el medio sin sembrar. Este paso fue importante como control de calidad y garantizar que la degradación vista en los



medios inoculados no fuera producto de la temperatura de incubación ( $36^{\circ}\text{C}\pm 1$ ). El límite de detección del equipo se tuvo de 40ppm aproximadamente.

Las cepas bacterianas fueron sembradas en la matriz líquida de medio M9 utilizando tubos Eppendorf © e incubadas a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 7 días y se tomó como referencia el valor inicial de concentración del medio M9 con Monocrotofos a 200ppm y 24 horas más tarde se realizó la primera medición de concentración con el cromatógrafo, con dos mediciones posteriores espaciadas cada una por 24 horas durante 3 días (Figura 13).

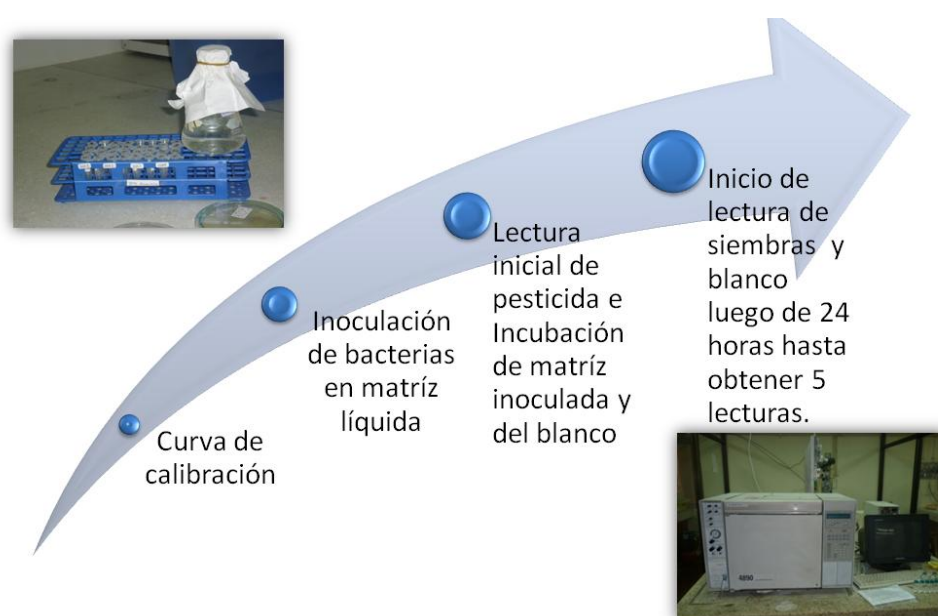


Figura 13. Verificación de la degradación del pesticida por parte de las cepas en estudio.

### 3.4 Análisis de los Datos.

Los datos obtenidos del procedimiento de verificación de degradación del pesticida fueron analizados por medio de estadística descriptiva de variables continuas, para distribución normal y homogeneidad de varianzas utilizando los test de Kolmogorov-Smirnov y Barlett, respectivamente.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Evaluación de la muestra por GC/FID.

La presencia de OFs en las muestras de suelo provenientes del barrio Ciudadela 2000, fue comprobada por medio de la GC/FID (Figuras 17 a 19).

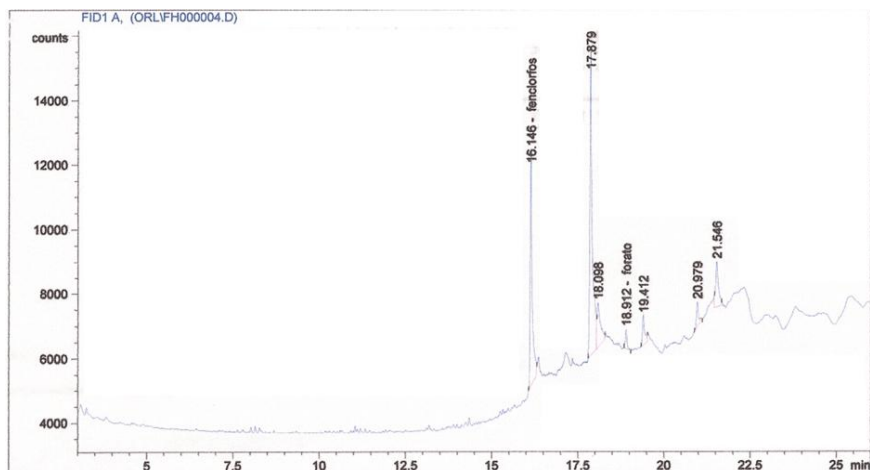


Figura 14. Cromatograma de Muestra 1 de suelo

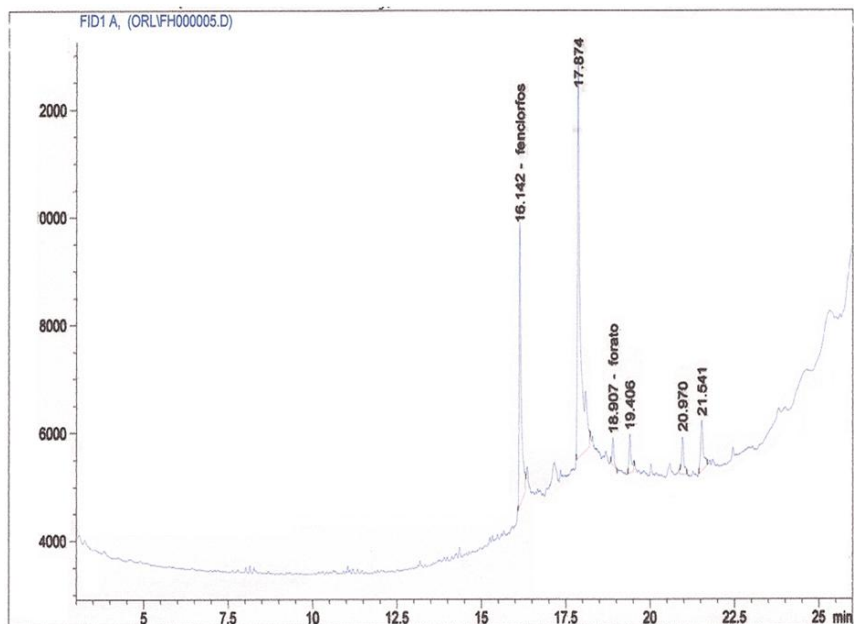


Figura 15. Cromatograma de Muestra 2 de suelo.

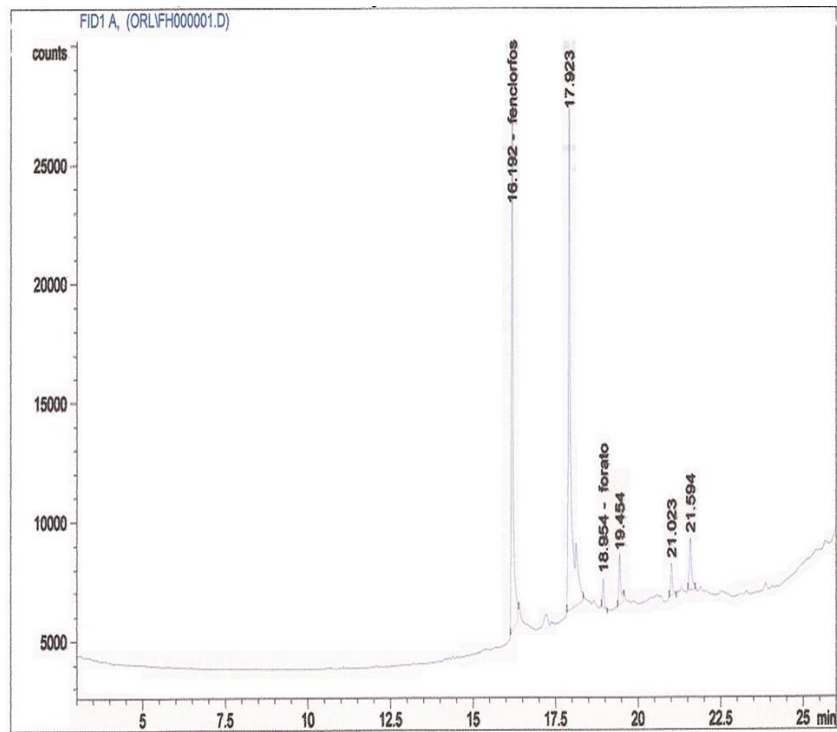


Figura 16. Cromatografía de Muestra 3 de suelo.

Los resultados arrojados por la GC/FID de la muestra analizada, confirman que en el área de estudio se presentan compuestos organofosforados, cuyos cromatogramas coinciden con Fenclorfós, Forato y Demeton (Figuras 16 a 18), siendo los tiempos de retención de los patrones de OF iguales a las moléculas presentes en el suelo de Ciudadela 2000. Si bien existe esta correspondencia, se debe tener en cuenta que dado el tiempo de depósito de los materiales en el lote, la exposición a los factores ambientales y la influencia de otros elementos, los picos detectados pueden tratarse de subproductos de OF más complejos que han sido degradados y pueden tener tiempos de retención similares a los de los patrones.

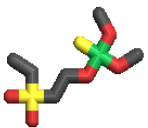
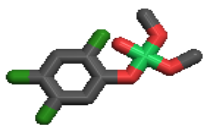
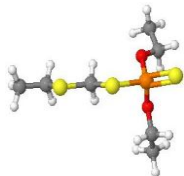
Los resultados obtenidos, apoyan la idea que las cápsulas almacenadoras de pesticidas bajo tierra están dejando escapar parte de su contenido. Si bien es cierto que la presencia de OFs en tierras bajas puede deberse a la acción de la escorrentía y depósito de aguas contaminadas por este tipo de compuestos

(Bedmar, 2006), también se ha demostrado que altas temperaturas, alta humedad y evaporación (condiciones del área de estudio) generarían volatilización del contaminante y presentarían bajos niveles de detección en cuerpos de agua (Aran & Paez, 2005; Vásquez & Tablas, 2009). Ensayos paralelos a este trabajo y llevados a cabo por el Grupo de Investigaciones Agroquímicas (GIA) confirman los bajos niveles de presencia en aguas aledañas a los lugares de muestreo (Pertuz y Fernández *comp. pers.* 2012).

Asumiendo que los productos detectados en las muestras de suelo, corresponden efectivamente a Demetón, Fenclorfós y Forato, se puede suponer que la presencia de estos elementos en el área de estudio puede generar problemas de salud importantes para la población expuesta a estas sustancias. Es reconocido que estos tres compuestos actúan directamente sobre el sistema nervioso, los tres se reconocen por su alto grado de toxicidad, que afecta desde invertebrados acuáticos y polinizadores hasta aves y mamíferos, incluso el Fenclorfós puede bioacumularse como metabolitos en peces (Tabla 5).

Es de resaltar que de acuerdo con los registros bibliográficos, el Demeton, Fenclorfós y Forato tienen períodos de persistencia máximos de 10 días.

Tabla 5. Generalidades de pesticidas OF encontrados en el suelo de Ciudadela 2000.

Características	PESTICIDAS OF ENCONTRADOS		
	Demeton	Fenclorfós	Forato
Producto	Demeton	Fenclorfós	Forato
Fórmula química	$C_8H_{19}O_3PS_2$	$C_8H_8Cl_3O_3PS$	$C_7H_{17}O_2PS_3$
N° CAS	8065-3	299-84-3	298-02-2
Moléculas (GNU-Darwing, 2012)			
Nivel Toxicológico	II (Vallet, et al., 2008)	III (Lemon, 1967)	
Tipo de plaguicida	Insecticida y acaricida OF (Unger, 1996).	Insecticida ((Lemon, 1967).	Insecticida, nematocida y Acaricida
Persistencia	Hasta 7 días (Unger, 1996; Ficha técnica Demeton).	Hasta 10 días (Inchem, 2012).	Hasta 10 días (EPA, 2012).
Efecto en el Ambiente	Extrema toxicidad para invertebrados acuáticos, alta toxicidad en peces, crustáceos y aves. Tóxico para abejas (Unger, 1996).	Altamente tóxico en organismos acuáticos. Bioacumulación de metabolitos en peces (Inchem, 2012).	Altamente tóxico para aves, peces, abejas y mamíferos (EPA, 2012; Rani & Juwarkar, 2012; Saquib, et al., 2012).
Efecto en la salud	Irritativo, neurotóxico, teratogénico, disruptor endocrino, causa Parkinson. (Shires, 1985).	Convulsiones, neurotóxico, teratogénico (Inchem, 2012).	Neurotóxico, capacidad de producir necrosis (EPA, 2012; Rani & Juwarkar, 2012).
Sinergismo con otras sustancias	Con organoclorados, mercurio y sales de benzalconio: mortalidad y potenciación de efectos. Con barbitúricos: potenciación de efectos (Unger, 1996).	-	-

## 4.2 Aislamiento e identificación de bacterias de muestras tratadas con OF.

Las colonias del aislado de la Cepa 1 macroscópicamente son cremosas, lisas, transparentes, olor *sui generis*. Microscópicamente son bacilos Gram negativos no esporulados, relativamente cortos y gruesos. Las colonias de la Cepa 2 macroscópicamente se observan cremosas y lisas sin color o aroma notables. Microscópicamente son bacilos Gram negativos no esporulados relativamente cortos y gruesos. La Cepa 3 se presentó con colonias cremosas, lisas, de un ligero color oscuro y olor dulce que recuerda a uvas. Microscópicamente son bacilos Gram negativos no esporulados, largos y delgados (Konneman, et al., 2001).

Las colonias en estudio fueron sembradas en medio líquido M9 y cada día de incubación fue monitoreado para calcular la densidad óptica de cada muestra y validar el crecimiento bacteriano. Los resultados obtenidos muestran que el desarrollo bacteriano en el medio altamente selectivo es el esperado con referencia a otros trabajos (Acuña, et al., 2010) (Tabla 6).

Tabla 6 Crecimiento bacteriano de las cepas en estudio.

Días de incubación	Densidad óptica*		
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
1	0,396±0,004	0,291±0,008	0,199±0,019
2	0,399±0,004	0,300±0,008	0,218±0,019
3	0,415±0,004	0,306±0,008	0,266±0,019
4	0,429±0,004	0,319±0,008	0,249±0,019
5	0,434±0,004	0,400±0,008	0,419±0,019
6	0,449±0,004	0,415±0,008	0,525±0,019
7	0,485±0,004	0,430±0,008	0,571±0,019

\* Los datos son presentados como densidad óptica ± error estándar.

Los resultados de crecimiento bacteriano en medio líquido fueron analizados y graficados (Figura 17).

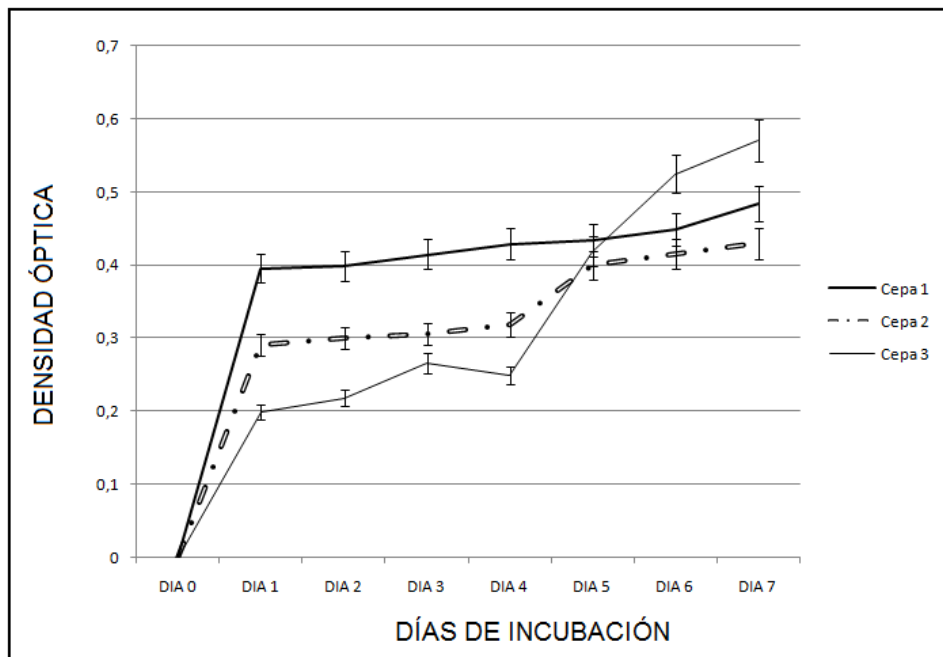


Figura 17. Crecimiento de colonias aisladas. Datos presentados como densidad óptica más o menos error estándar.

Acuña *et al.* (2010) obtuvieron un crecimiento exponencial similar al del presente estudio, y ellos hicieron el proceso por 20 días. Como las bacterias presentaron comportamiento similar, es posible afirmar que éstas seguirán un crecimiento de biomasa de hasta 1.6, así como lo muestra el estudio en mención.

Una vez aisladas y purificadas las cepas presentes en el medio mínimo M9 fue evidente que las tres colonias son de bacilos Gram negativos no esporulados sugestivos de Enterobacterias (Konneman, et al., 2001; Joachimisthal, et al., 2004). Este tipo de bacterias son normalmente encontradas en suelos (Lors, et al., 2010; Konneman, et al., 2001). Las cepas aisladas presentaron un crecimiento aceptable en medio líquido M9, confirmando así la afinidad de los microorganismos en estudio con la fuente de carbono utilizada (Monocrotofós).

Luego de confirmar el crecimiento de las bacterias en presencia de un patrón de OF como única fuente de carbono, estas fueron sometidas a identificación tanto bioquímica como molecular para determinar su identidad taxonómica hasta el nivel más bajo posible. La prueba bioquímica BBL Crystal® sugiere la presencia de dos tipos bacterianos de la Familia Enterobacteriaceae, pertenecientes a tres géneros *Klebsiella* y *Enterobacter*, y un tipo de la Familia Pseudomonadaceae perteneciente al género *Pseudomonas* (Tabla 7) de acuerdo con sus características bioquímicas (Tabla 8).

Tabla 7. Identificación bioquímica de las cepas en estudio

<b>Cepas aisladas</b>	<b>Identificación Bioquímica</b>	<b>Porcentaje de confiabilidad</b>
CEPA 1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98%
CEPA 2	<i>Enterobacter cloacae</i>	98%
CEPA 3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98%

Tabla 8. Comportamiento bioquímico de cepas aisladas

<b>Bioquímica</b>	<b>CEPA 1</b>	<b>CEPA 2</b>	<b>CEPA 3</b>
Degradación de arabinosa	+	+	-
Degradación de manosa	-	+	-
Degradación de sacarosa	+	+	-
Degradación de melibiosa	-	-	-
Degradación de ramnosa	+	+	-
Degradación de sorbitol	+	+	-
Producción de manitol	-	+	-
Degradación de adonitol	+	+	-
Degradación de galactosa	+	+	+
Producción de inositol	+	-	-
Producción de p-n-p fosfato	-	+	-



Producción de p-n-p $\alpha$ - $\beta$ glucósido:	+	-	-
Producción de p-n-p $\beta$ galactósido	+	+	-
Producción de prolina nitroanilida	+	-	+
Producción de p-n-p difosfato	+	-	-
Producción de p-n-p xiloxida	+	+	-
Producción de p-n-p $\alpha$ - arabinosida	+	+	-
Producción de p-n-p fosforicolina	-	-	-
Producción de p-n-p $\beta$ glucurónico	-	-	-
Producción de p-n-p N acetil glucosaminida	-	+	-
Producción de $\gamma$ -L glutamil nitroanilida	+	+	+
Producción de esculina	+	-	-
Producción de fenilalanina	-	-	-
Degradación de úrea	-	-	+
Degradación de glicina	-	-	+
Degradación de citrato	+	+	+
Degradación de malonato	+	+	+
Degradación de tetrazolium:	+	+	+
Degradación de Arginina	+	+	+
Degradación de lisina	+	+	+

Los resultados obtenidos con la identificación bioquímica bacteriana fueron confirmados mediante la secuenciación del ADN ribosomal 16S, a partir del extracto purificado, mediante la técnica de repique de colonias (Figura 18). Cada colonia fue sembrada en un medio de transporte líquido y enviada para su análisis en Corpogen.

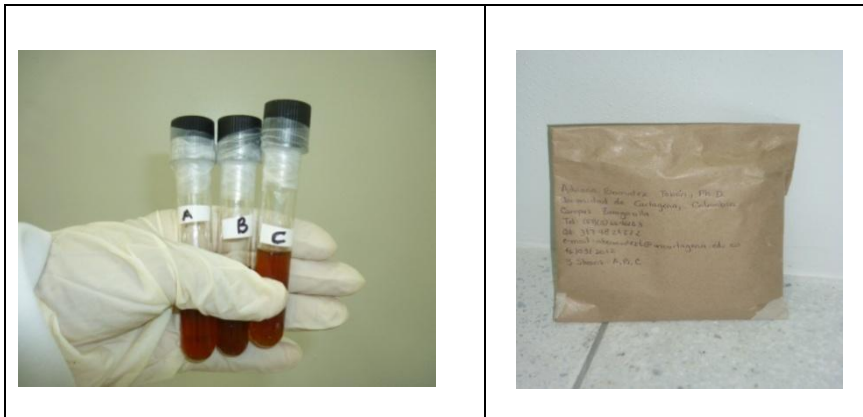


Figura 18. Embalaje de las cepas en estudio para análisis molecular

Los resultados obtenidos son presentados a continuación:

### Classifier :: Hierarchy View

[\[start over\]](#) [\[assignment detail\]](#) [\[help\]](#)

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier version 2.4, December 2011  
 Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 7, moved Chloroplast, rearranged Firmicutes, Verrucomicrobia and Acidobacteria  
 Query File:  
 Query Submit Date: Tue Apr 17 18:45:49 EDT 2012

Display depth:  Confidence threshold:

domain	%	Library
Bacteria	100.0	<div style="width: 100%; height: 10px; background-color: #800040;"></div>

Hierarchy View (click a node to make it the root -- click the root to see sequence assignment detail):

norank Root (1 sequences) [\[show assignment detail\]](#)   
 » » domain Bacteria (1)  
 » » » phylum "Proteobacteria" (1)  
 » » » » class Gammaproteobacteria (1)  
 » » » » » order "Enterobacteriales" (1)  
 » » » » » » family Enterobacteriaceae (1)  
 » » » » » » » unclassified\_Enterobacteriaceae (1)

Figura 19. Resultado de la comparación de la secuencia C1 contra la base de datos RDP.

### Cepa 1:

Los resultados del análisis taxonómico indican que la secuencia ensamblada obtenida de las bacterias cultivadas de la muestra C1, está conformada por 1475 pb. La comparación de esta secuencia mediante el clasificador de RDP (Ribosomal Database Project), la ubica dentro de la Familia Enterobacteriaceae, junto con otras especies del género *Enterobacter* incluyendo la especie *E.*

*cancerogenus*, con un grado de similaridad genética entre el 99 y el 100%.

Este resultado difiere con el obtenido por el kit BBL Crystal®. Aunque ambos análisis ubica a la especie dentro de la misma familia, el género y especie obtenidas con ambos métodos son distintos ya que con BBL Crystal la identidad de la cepa se ubicó como *Klebsiella oxytoca*, mientras que molecularmente muestra una homología del 100% con *Enterobacter sp.* Esto pudo deberse a que la cepa aunque efectivamente hace parte del último, puede ser una subespecie que se comporta metabólicamente muy similar a *Klebsiella sp.* Cabe resaltar que las mismas hacen parte de la misma familia y comparten muchas similitudes: morfología de colonias y microscopía, no son oxidativas, anaerobias facultativas, no son exigentes, metabolismo muy similar (Denton, 2007; Nordmann, et al., 2012) e incluso el genoma de las mismas es muy parecido y puede variar debido a la facultad de intercambio génico (Brunder & Karch, 2000). Al comparar la secuencia utilizando BLAST, los resultados obtenidos muestran que la misma tuvo un alineamiento máximo en el puntaje (“score”) de alineamiento (>200), lo cual es muy bueno puesto que indica que el alineamiento con la secuencia a analizar es óptimo (Figura 19).

El microorganismo que tuvo la identidad máxima con la secuencia según el software de BLAST fue *Citrobacter murlinae* con un 97% de homología. El mismo porcentaje fue encontrado para *Enterobacter cloacae* y una homología de 96% para *Klebsiella sp.*, resultados que confirman que genéticamente estas bacterias tienen similaridad y por ende comportamiento bioquímico prácticamente igual (Figura 20).

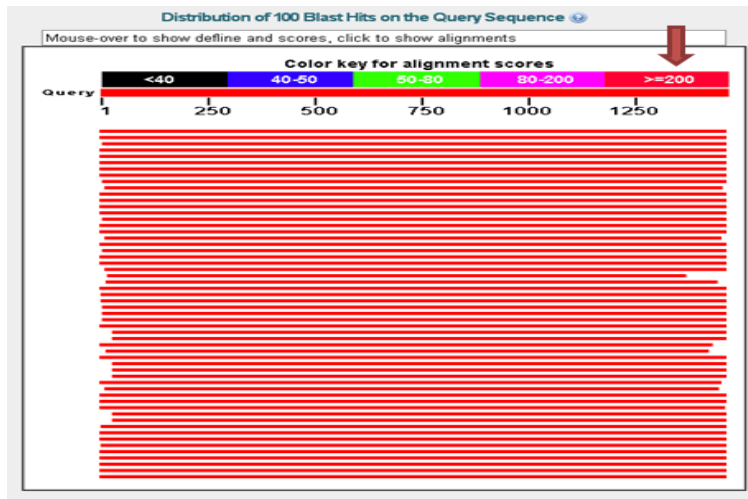


Figura 20. Alineamiento de secuencia obtenida en el laboratorio CorpoGen con la encontrada en el BLAST.

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NR_028688.1	Citrobacter murlinae strain CDC 2970-59 16S ribosomal RNA, p...	2462	2462	99%	0.0	97%	
NR_028824.1	Citrobacter freundii strain DSM 30039 16S ribosomal RNA, part	2457	2457	99%	0.0	97%	
NR_044977.1	Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S ribosomal RN	2455	2455	99%	0.0	97%	
NR_024862.1	Citrobacter werkmanii strain CDC 0876-58 16S ribosomal RNA,	2453	2453	99%	0.0	97%	
NR_028687.1	Citrobacter braakii strain 167 16S ribosomal RNA, partial seque	2446	2446	99%	0.0	97%	
NR_024861.1	Citrobacter farmeri strain CDC 2991-81 16S ribosomal RNA, pai	2405	2405	99%	0.0	96%	
NR_041692.1	Salmonella bongori strain BR 1859 16S ribosomal RNA, partial s	2403	2403	99%	0.0	96%	
NR_041697.1	Citrobacter gillenii strain CDC 4693-86 16S ribosomal RNA, part	2401	2401	99%	0.0	96%	
NR_044978.1	Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain LMG 2683 16S r	2398	2398	99%	0.0	96%	
NR_024641.1	Enterobacter gergoviae strain JCM1234 16S ribosomal RNA, pa	2388	2388	98%	0.0	97%	
NR_041696.1	Salmonella enterica subsp. arizonae strain ATCC 13314 16S ri	2383	2383	99%	0.0	96%	

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
NR_028688.1	Citrobacter murlinae strain CDC 2970-59 16S ribosomal RNA, p...	2462	2462	99%	0.0	97%	
NR_028824.1	Citrobacter freundii strain DSM 30039 16S ribosomal RNA, part	2457	2457	99%	0.0	97%	
NR_044977.1	Enterobacter cancerogenus strain LMG 2693 16S ribosomal RN	2455	2455	99%	0.0	97%	
NR_024862.1	Citrobacter werkmanii strain CDC 0876-58 16S ribosomal RNA,	2453	2453	99%	0.0	97%	
NR_028687.1	Citrobacter braakii strain 167 16S ribosomal RNA, partial seque	2446	2446	99%	0.0	97%	
NR_024861.1	Citrobacter farmeri strain CDC 2991-81 16S ribosomal RNA, pai	2405	2405	99%	0.0	96%	
NR_041692.1	Salmonella bongori strain BR 1859 16S ribosomal RNA, partial s	2403	2403	99%	0.0	96%	
NR_041697.1	Citrobacter gillenii strain CDC 4693-86 16S ribosomal RNA, part	2401	2401	99%	0.0	96%	
NR_044978.1	Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain LMG 2683 16S r	2398	2398	99%	0.0	96%	
NR_024641.1	Enterobacter gergoviae strain JCM1234 16S ribosomal RNA, pa	2388	2388	98%	0.0	97%	
NR_041696.1	Salmonella enterica subsp. arizonae strain ATCC 13314 16S ri	2383	2383	99%	0.0	96%	
NR_044979.1	Enterobacter cloacae subsp. dissolvens strain LMG 2683 16S r	2382	2382	99%	0.0	96%	
NR_028689.1	Salmonella enterica subsp. arizonae strain ATCC 13314 16S r	2377	2377	99%	0.0	96%	
NR_043222.1	Shigella flexneri strain ATCC 29903 16S ribosomal RNA, partial	2374	2374	99%	0.0	96%	
NR_028673.1	Enterobacter pyrusii strain 843 16S ribosomal RNA, complete	2372	2372	99%	0.0	96%	
NR_043226.1	Enterobacter nimpressuralis strain LMG 10245 16S ribosomal R	2368	2368	99%	0.0	96%	
NR_028622.1	Shigella dysenteriae strain ATCC 13313 16S ribosomal RNA, pa	2366	2366	99%	0.0	96%	
NR_028685.1	Salmonella enterica subsp. salamae strain DSM 9220 16S ribos	2362	2362	99%	0.0	96%	
NR_043221.1	Salmonella enterica subsp. salamae strain DSM 9220 16S ribos	2353	2353	99%	0.0	96%	
NR_043228.1	Enterobacter sakazakii strain ATCC 29544 16S ribosomal RNA, f	2351	2351	99%	0.0	96%	
NR_043229.1	Raoultella ornitholytica strain CIP 103 364 16S ribosomal RNA	2350	2350	99%	0.0	96%	
NR_028686.1	Citrobacter sedakii strain 1-75 16S ribosomal RNA, partial seq.	2346	2346	99%	0.0	96%	
NR_022549.1	Escherichia fergusonii ATCC 35469 16S ribosomal RNA, partial ;	2340	2340	98%	0.0	96%	
NR_043230.1	Enterobacter hormaechei ATCC 49102 strain CIP 103441 16S r	2337	2337	99%	0.0	96%	
NR_043223.1	Salmonella enterica subsp. houtenae strain DSM 9221 16S rbc	2322	2322	97%	0.0	96%	
NR_023228.1	Buttiauxella breunnerae strain 5176-571 16S ribosomal RNA, par	2316	2316	99%	0.0	95%	
NR_023230.1	Buttiauxella gaviniae strain 5171-984 16S ribosomal RNA, parti	2316	2316	99%	0.0	95%	
NR_023229.1	Buttiauxella ferrugitiae strain DSM 9390 16S ribosomal RNA, p.	2313	2313	99%	0.0	95%	
NR_023569.1	Escherichia alberti strain albert 19982 16S ribosomal RNA, par	2307	2307	99%	0.0	95%	
NR_043227.1	Erwinia pectus strain LMG 7034 16S ribosomal RNA, partial seque	2302	2302	99%	0.0	95%	
NR_043230.1	Pectobacterium carotovorum strain LMG 2386 16S ribosomal RI	2300	2300	99%	0.0	95%	
NR_023231.1	Pectobacterium carotovorum subsp. odoriferum strain LMG 174	2281	2281	99%	0.0	95%	
NR_043230.1	Pantoea stewartii subsp. stewartii strain ATCC 8199 16S ribos	2281	2281	97%	0.0	95%	
NR_024845.1	Pantoea ananatis strain 1840 16S ribosomal RNA, partial seque	2281	2281	97%	0.0	95%	
NR_024570.1	Escherichia coli strain U 5/41 16S ribosomal RNA, partial seque	2268	2268	99%	0.0	95%	
NR_024570.1	Escherichia coli strain U 5/41 16S ribosomal RNA, partial seque	2266	2266	99%	0.0	96%	

Figura 21. Homología entre cepas de *Enterobacteriaceae* obtenidas por el BBL Crystal© y secuencia obtenida en el laboratorio CorpoGen.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

El árbol de distancias construido por el método de Neighbor-Joining con un bootstrap de 1000 iteraciones (Figura 22), agrupó a la Secuencia Problema C1 con secuencias de *Enterobacter*, entre las cuales se encuentra *Enterobacter cancerogenus* y *Enterobacter hormaechei* con un soporte de ramas de más del 87%. Esto indica que la secuencia problema con una muy alta probabilidad se trata de *Enterobacter* sp., sin poder asignar una especie determinada, dando más peso a los datos obtenidos en la comparación de la secuencia con RDP.

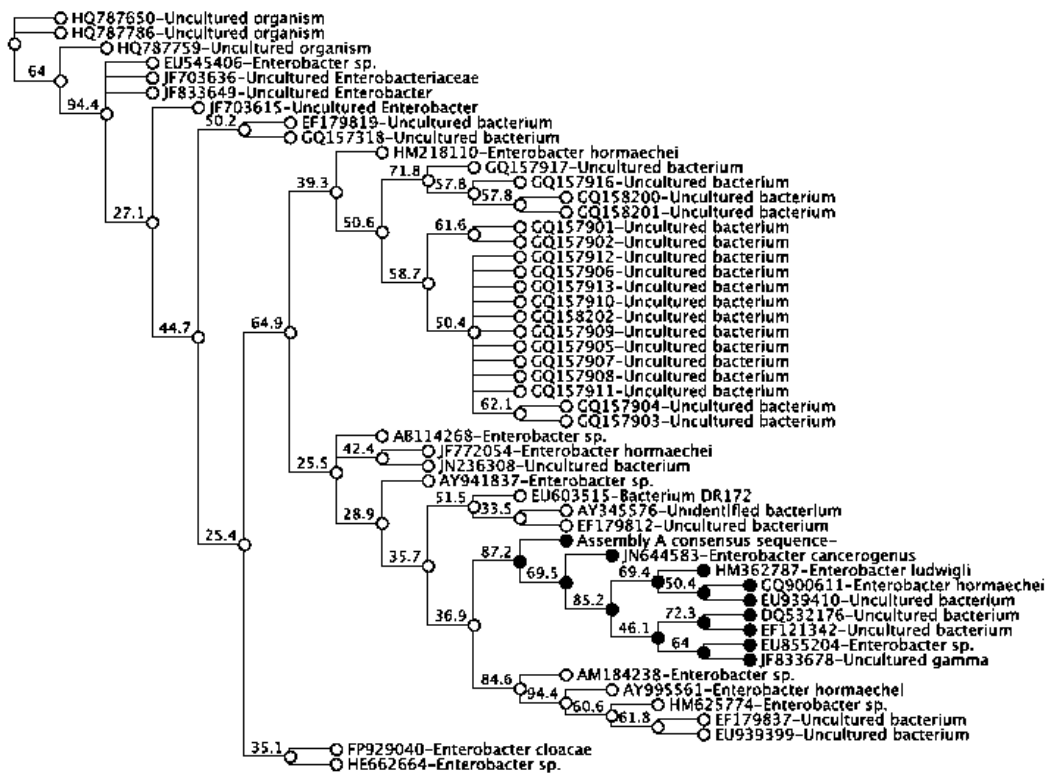


Figura 22. Árbol de distancias construido a partir de los 50 mejores arreglos con respecto a la base de datos de NCBI. ● Nodos correspondientes a la secuencia problema, correspondiente al clado de *Enterobacter cancerogenus* / *Enterobacter hormaechei*. Aunque con los resultados obtenidos es más probable que la cepa en estudio sea *Enterobacter* spp. y no *Klebsiella* spp., es muy probable que la secuencia haga parte de una sub-especie de *Klebsiella* spp. con características de *Enterobacter* spp.

## Cepa 2:

Los resultados del análisis taxonómico indican que la secuencia ensamblada obtenida de las bacterias cultivadas de la muestra C2, está conformada por 1477 pb. La comparación de esta secuencia mediante el clasificador de RDP (Ribosomal Database Project), la ubica dentro de la Familia Enterobacteriaceae, con un grado de similaridad del 99 a 100% con la especie *Enterobacter cancerogenus*

Los resultados del análisis taxonómico indican que la secuencia problema ensamblada de 1477pb (C2), tiene un de su longitud, con secuencias pertenecientes a varias especies del género *Enterobacter* y con otras no identificadas. La secuencia problema mostró mayor similitud con una secuencia de *E. cancerogenus*, sin embargo, el clasificador de RDP sólo llegó hasta una secuencia no clasificada del grupo (Figura 23).

### Classifier :: Hierarchy View

[\[ start over | assignment detail | help \]](#)

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.4, December 2011  
Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 7, moved Chloroplast, rearranged Firmicutes, Verrucomicrobia and Acidobacteria  
Query File:  
Query Submit Date: Tue Apr 17 18:46:32 EDT 2012 **GQ157910**

Display depth:  Confidence threshold:

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hiorarchy View (click a node to make it the root -- click the root to see sequence assignment detail):

norank Root (1 sequences) [\[ show assignment detail \]](#)   
" " domain Bacteria (1)  
" " " phylum "Proteobacteria" (1)  
" " " " class Gammaproteobacteria (1)  
" " " " " order "Enterobacteriales" (1)  
" " " " " " family Enterobacteriaceae (1)  
" " " " " " " unclassified\_Enterobacteriaceae (1)

Figura 23. Resultado de la comparación de la Secuencia C2 contra la base de datos RDP

El árbol de distancias construido por el método de Neighbor-Joining con un

bootstrap de 1000 iteraciones (Figura 24), agrupó a la secuencia problema con secuencias de *Enterobacter* con un soporte de ramas de más del 88%. Lo cual indica que la secuencia problema con una muy alta probabilidad se trata de *Enterobacter sp.* sin poder asignar una especie determinada.

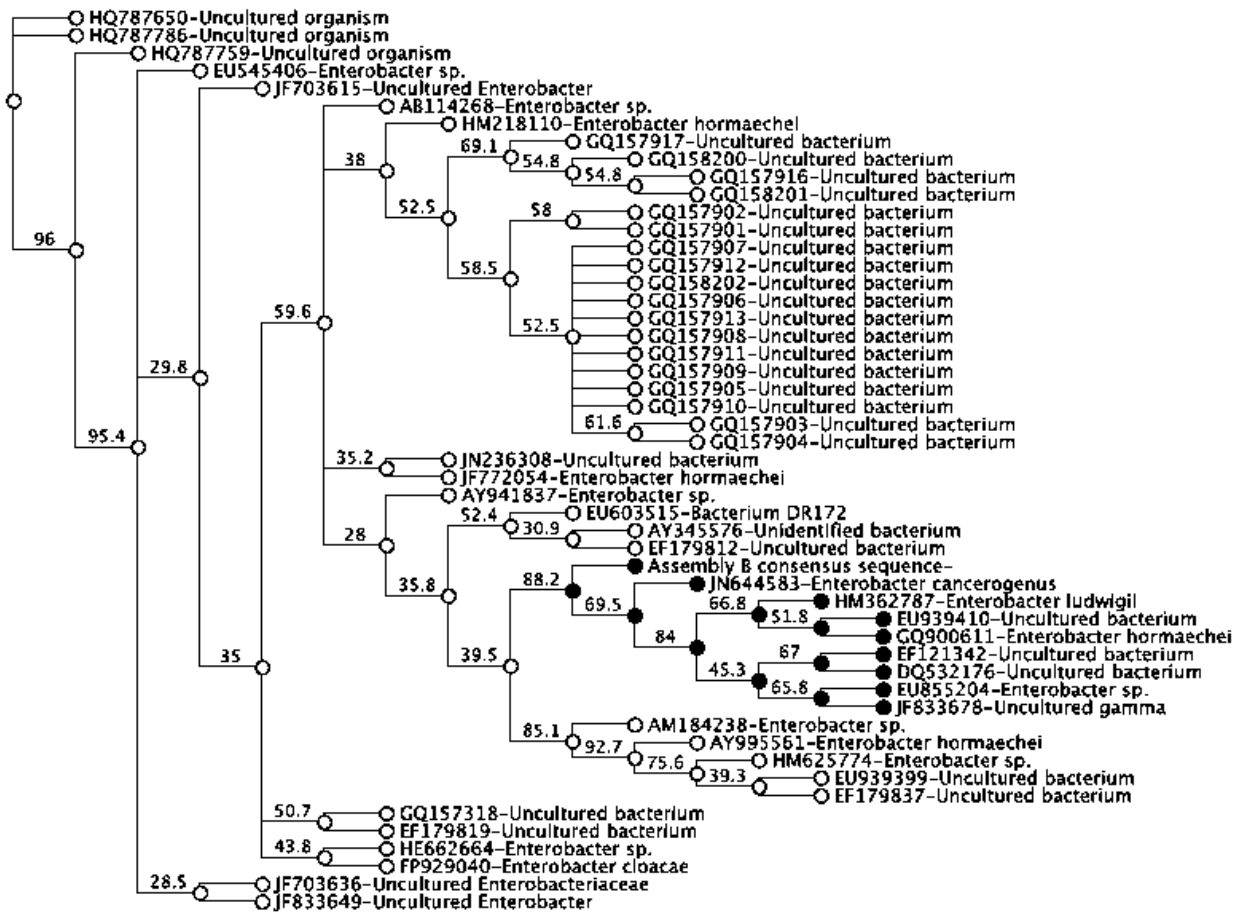


Figura 24. Árbol de distancias construido a partir de los 50 mejores arreglos con respecto a la base de datos de NCBI. ● Nodos correspondientes a la secuencia problema, correspondiente al clado de *Enterobacter cancerogenus* / *Enterobacter hormaechei*.

### Cepa 3:

Los resultados del análisis taxonómico indican que la secuencia ensamblada obtenida de las bacterias cultivadas de la muestra C3, está conformada por 1469pb. La comparación de esta secuencia mediante el clasificador de RDP (Ribosomal Database Project), la ubica dentro de la Familia Pseudomonaceae, con un grado de similaridad del 99 a 100% con la especie *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 30).

#### Classifier :: Hierarchy View

[\[ start over \]](#) [\[ assignment detail \]](#) [\[ help \]](#)

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.4, December 2011  
Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 7, moved Chloroplast, rearranged Firmicutes, Verrucomicrobia and Acidobacteria  
Query File:  
Query Submit Date: Tue Apr 17 18:49:00 EDT 2012

Display depth:  Confidence threshold:

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root -- click the root to see sequence assignment detail):

norank Root (1 sequences) [\[ show assignment detail \]](#)   
» » domain Bacteria (1)  
- - - phylum "Proteobacteria" (1)  
» » » class Gammaproteobacteria (1)  
- - - - order Pseudomonadales (1)  
» » » » family Pseudomonadaceae (1)  
» » » » » genus Pseudomonas (1)

Figura 25. Resultado de la comparación de la Secuencia C3 contra la base de datos RDP

El árbol de distancias construido por el método de Neighbor-Joining con un bootstrap de 1000 iteraciones (Figura 26), agrupó a la secuencia problema con secuencias de *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias no cultivadas, con un soporte de ramas del 100%. Lo cual indica que la secuencia problema con una muy alta probabilidad se trata de *Pseudomonas aeruginosa*.



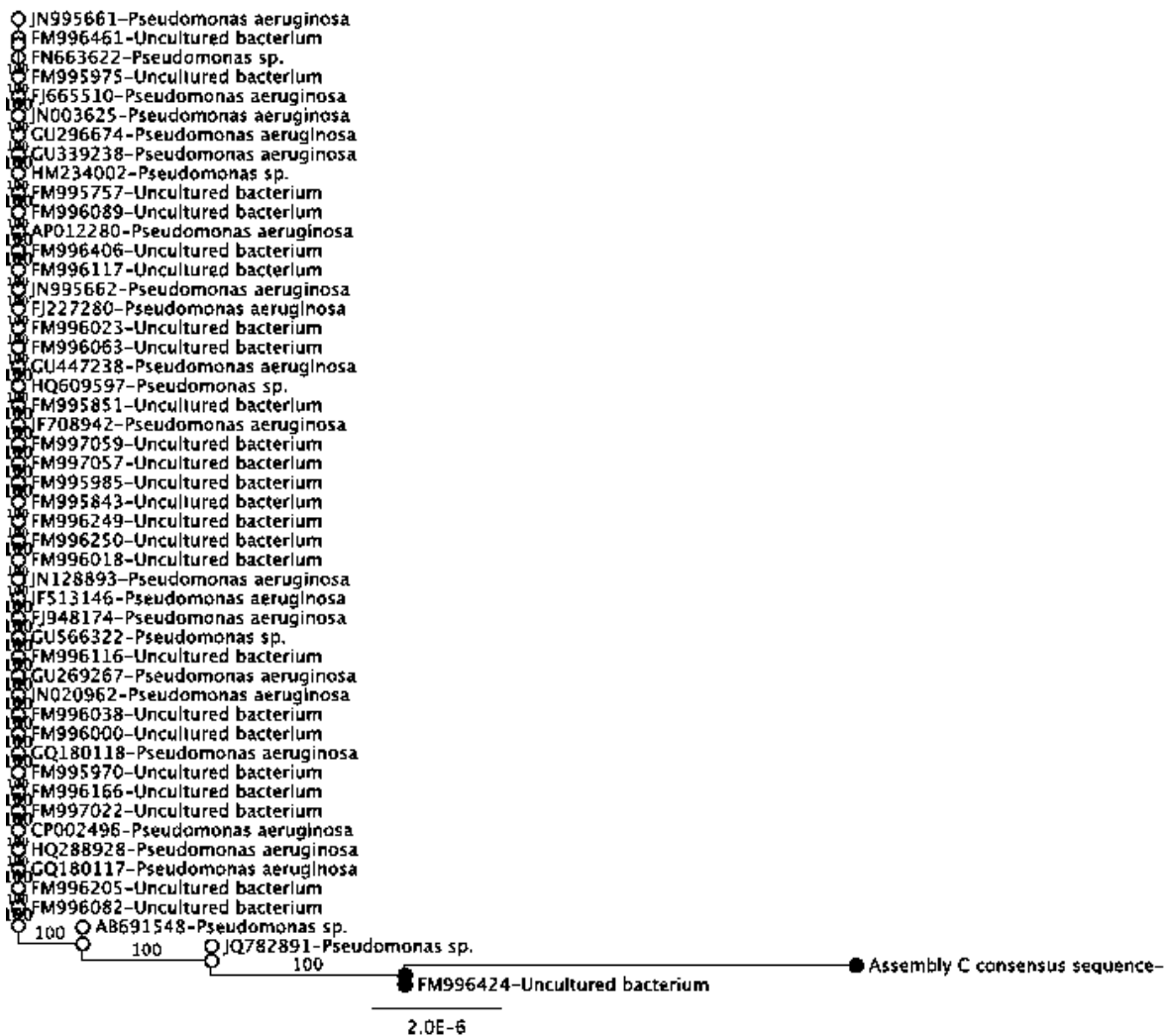


Figura 26. Árbol de distancias construido a partir de los 50 mejores arreglos con respecto a la base de datos de NCBI. ● Nodos correspondientes a la secuencia problema, correspondiente al clado de *Pseudomonas aeruginosa*.

### 4.3 Comprobación de biodegradación de OF por parte de las cepas aisladas.

Para verificar la disminución y/o eliminación del pesticida presente en el medio líquido fue necesario medir las muestras con GC/FID, cada 24 horas se hicieron estas mediciones. Para ello, fue realizada una curva de calibración requerida para el método cromatográfico (Figura 12).

Los medios de cultivo líquidos fueron sometidos a GC/FID para la determinación del pesticida presente. Además de las tres cepas evaluadas, se tuvo un Blanco o Control Negativo, en el cual se utilizó el medio sin sembrar. Este paso fue importante como control de calidad y garantizar que la degradación vista en los medios inoculados no fuera producto de la temperatura de incubación ( $36^{\circ}\text{C}\pm 1$ ).

La información obtenida de la GC/FID que monitoreó la degradación del patrón monocrotofós por parte de las tres cepas bacterianas aisladas (C1, C2 y C3) y el Blanco de reacción, se tabuló en la Tabla 9 u sintetizó en la Figura 33.

Tabla 9. Comportamiento del Monocrotofós en presencia de cepas bacterianas frente al Blanco.

MONOCROTOFÓS				
Horas de Incubación	BLANCO	C1	C2	C3
0 h Incubación	2193	2161	2188	2272
48 h Incubación	1808	0	0	0
72 h Incubación	1602	0	0	0
96 h Incubación	1274	0	0	0
120 h Incubación	1153	0	0	0

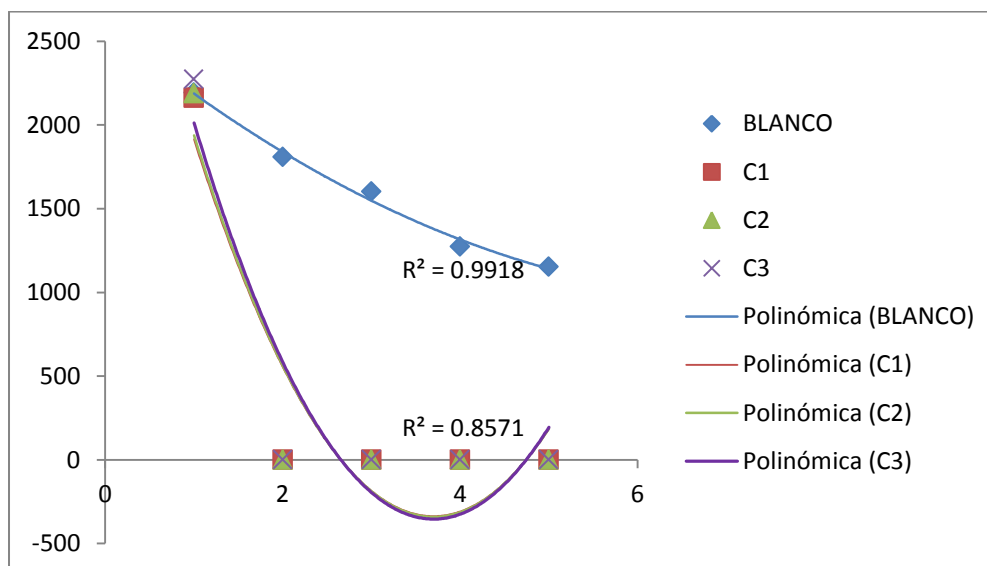


Figura 27. Comportamiento del monocrotofós por parte de las cepas bacterianas en contraste con el Blanco.

Los resultados de degradación del pesticida son óptimos pero es importante tener en cuenta que aunque el mismo tuvo una concentración por debajo del límite de detección del equipo (40ppm) luego de 48 horas de incubación, desde ese momento fue detectada la presencia de 2 compuestos organofosforados compatibles estructuralmente con dos pesticidas (Forato y Diazinón) lo cual sugiere que hubo producción de subproductos. El comportamiento de estos metabolitos está sintetizado en las Figuras 37 a 38.

En este estudio fue utilizado un medio con 200ppm del pesticida y cepas concentradas fue de cero a las 48h. Esto puede deberse a que las bacterias no tenían sesgos en su crecimiento, es decir pH controlado, temperatura óptima, alta concentración de los consorcios bacterianos, etc. Además, al utilizar medios sin fosfato inorgánico, las bacterias potenciaron la capacidad de captar este tipo de moléculas generando con ello optimización en el proceso (Subramanian, et al., 2012). Se descarta la desaparición del contaminante por evaporación a temperatura de incubación ( $36^{\circ}\text{C}\pm 1$ ) porque como muestra la gráfica, la disminución de los blancos fue paulatina y la concentración del monocrotofos fue detectada en los mismos luego de 4 días de incubación. (Ver Figura 27). Otros estudios han comparado la degradabilidad de monocrotofos en suelos esterilizados con suelos en el que crecimiento bacteriano fue permitido, cada uno dividido en dos: uno a altas temperaturas y otro a temperatura ambiente ( $18^{\circ}\text{C}$ ) mostrando que los suelos esterilizados tuvieron más persistencia del pesticida (Megharaj, et al., 1988), por lo tanto puede afirmarse que, aunque la temperatura potencia la degradación del pesticida.

El monocrotofos tiene una eliminación total en suelos (sin concentración bacteriana) de 20 días aproximadamente, a concentraciones de 100ppm (Gundi & Reddy, 2006).

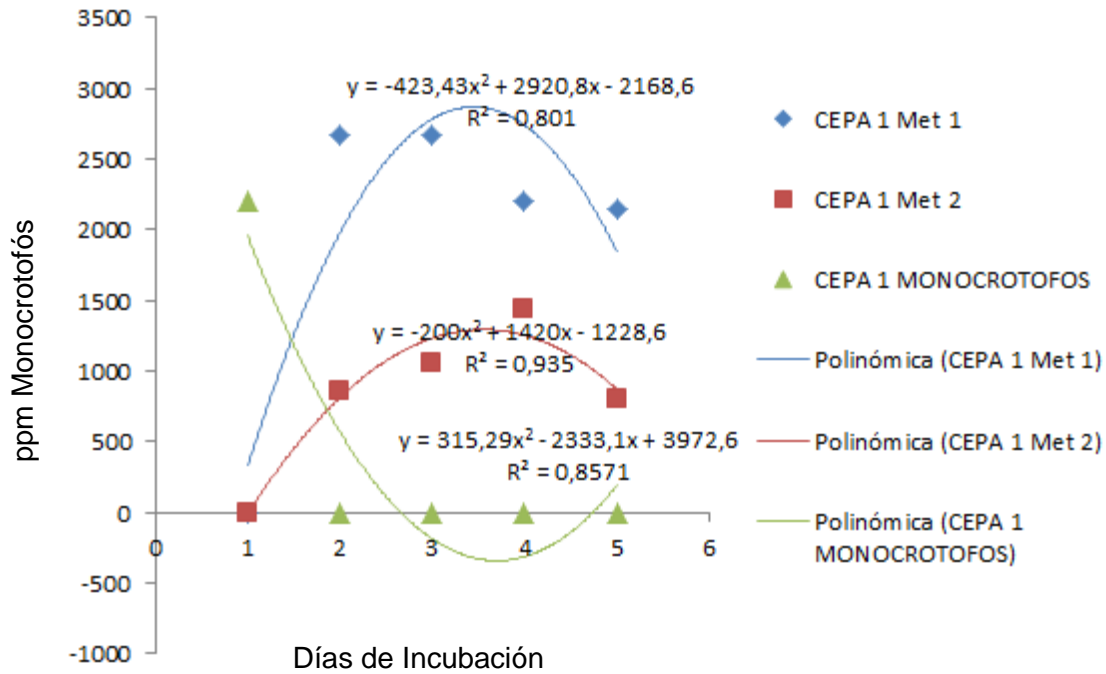


Figura 28. Comportamiento de los metabolitos 1 y 2 presentes en C1.

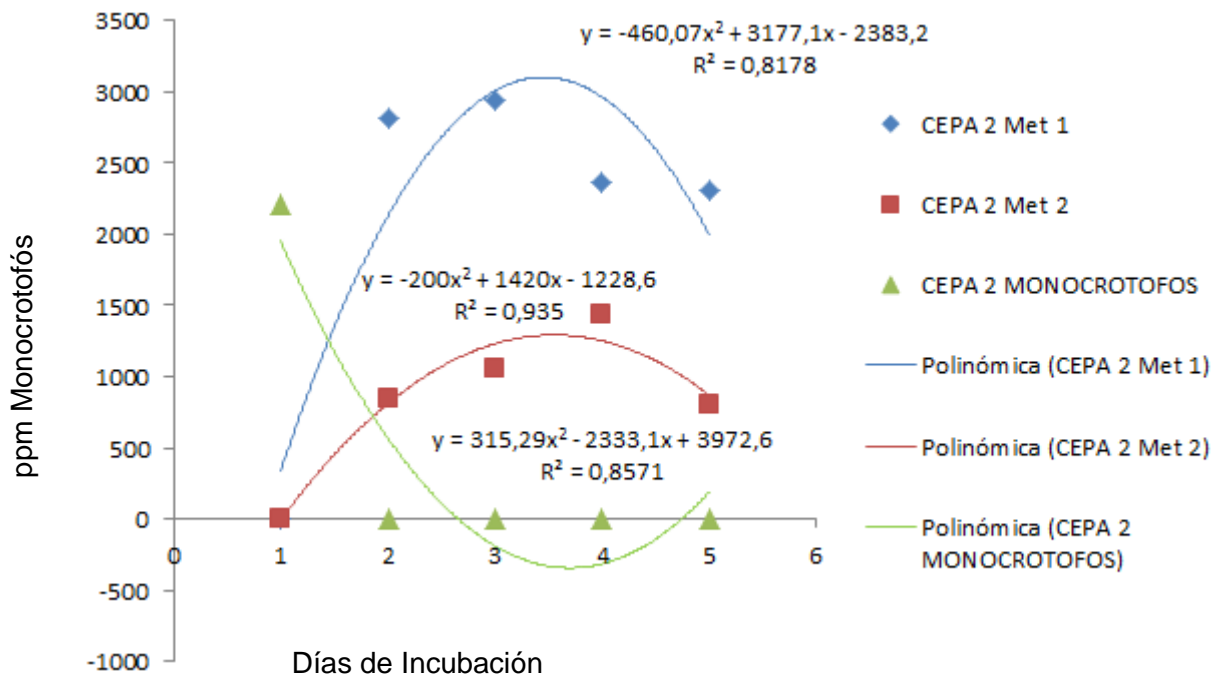


Figura 29 Comportamiento de los metabolitos 1 y 2 presentes en C2

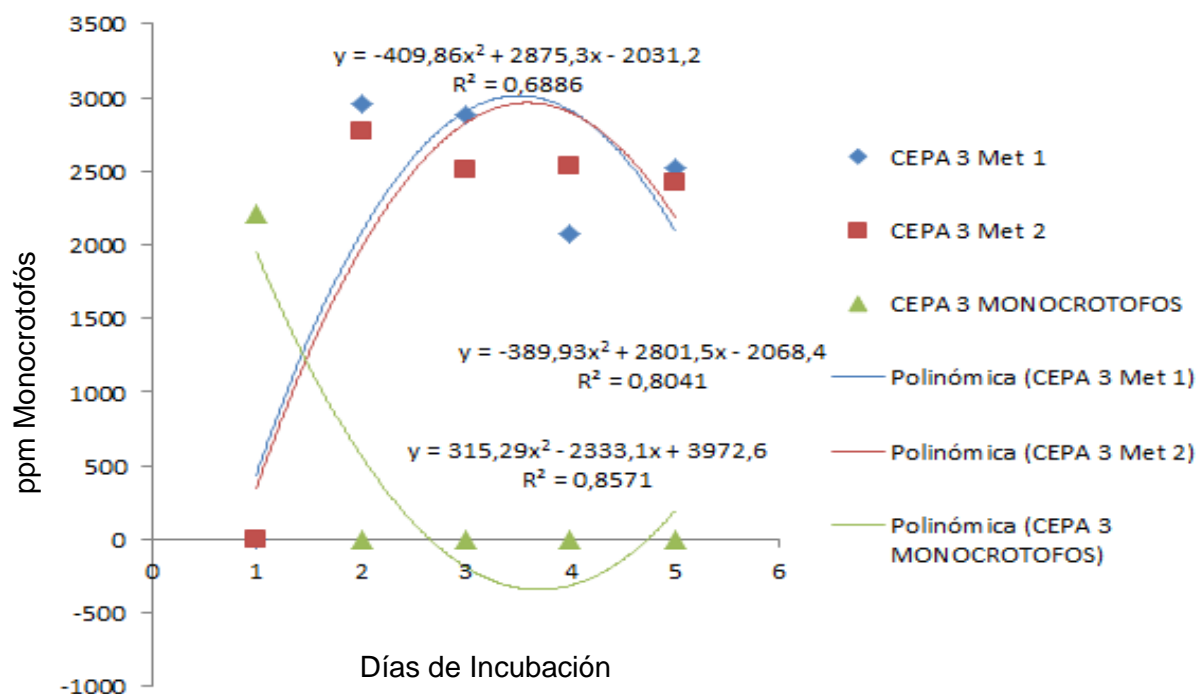
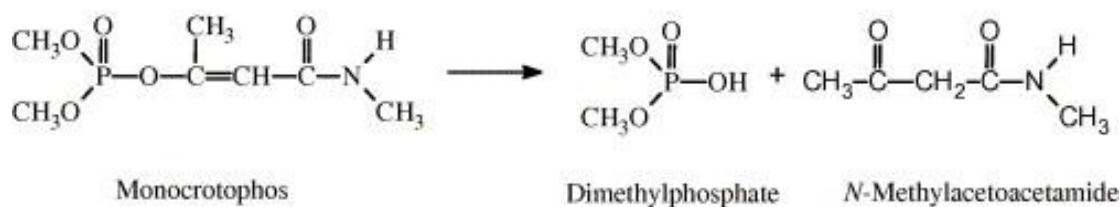


Figura 30. Comportamiento de los metabolitos 1 y 2 presentes en C3

La biotransformación de monocrotofós se desarrolla por medio de tres diferentes reacciones metabólicas: N-desmetilación, O-desmetilación, y la escisión del enlace fosfato de vinilo. El compuesto es totalmente degradable, mineralizándose a CO<sub>2</sub> y agua (Mücke, 1994). Generalmente el monocrotofós es metabolizado en N-hidroxi-metilamida (Rao, 2006) y n-metilacetoamida. Este último tiende a acumularse en suelos contaminados (Gundi & Reddy, 2006). Monocrotofós es convertido en hidroximetilo utilizando la ruta metabólica oxidativa (Rao, 2006; Hodgson, 2012). La reacción de hidrólisis llevada a cabo por bacterias de suelo sobre monocrotofós es mostrada a continuación (Gundi & Reddy, 2006).



Los resultados son mostrados como el promedio del área obtenida por GC/FID por cada día de incubación. La Figura 28 muestra el comportamiento de los metabolitos presentes en el cultivo inoculado con C1. Los dos metabolitos tienden a la disminución a través del tiempo, por lo tanto es predecible la desaparición del mismo. El metabolito 1 es mucho más alto que el 2, obteniendo diferencias altamente significativas entre uno y otro ( $P \geq 0.01$ ). La Figura 29 muestra el comportamiento de los metabolitos presentes en el cultivo inoculado con C2. Al comparar las cantidades de los mismos, puede afirmarse que el metabolito 1 significativamente más alto que el metabolito 2 ( $P \geq 0.01$ ), va en aumento hasta la hora 96 de la incubación, y luego de ello tiende a la baja. Por otra parte, el metabolito 2 aumenta paulatinamente hasta la hora 96 de incubación pero luego de ello tiene una baja significativamente grande. En cuanto a la C3 (Figura 30) muestra un comportamiento muy estable entre los dos metabolitos, los cuales no presentaron diferencias significativas entre uno y otro, y luego de 48h de incubación presentan un aumento importante en la amplitud del mismo, mientras que luego de ello bajan paulatinamente.

Ha sido demostrado que la formación de N-metilacetoamida a concentraciones de 100ppm luego de hidrólisis de monocrotófos, es de 25ppm aproximadamente (Gundi y Reddy, 2006), lo cual solidifica la suposición de presencia de éste en las muestras analizadas en el presente estudio. Además de los metabolitos antes mencionados, es importante tener en cuenta que en el proceso hay generación de fosfato inorgánico y enzimas bacterianas como la fosfatasa (Bhalerao & Puranik, 2009), por lo tanto estos elementos pueden verse reflejados en los picos encontrados en GC/FID (Figura 36 a 38).

En conclusión, estos metabolitos tienen comportamientos diferentes dependiendo de la cepa bacteriana en proceso de biodegradación, aunque está comprobado que la ruta metabólica que ellas siguen es la misma (Rao, 2006; Hodgson, 2012).

## 5. CONCLUSIONES

En los suelos del barrio Ciudadela 2000 en Cartagena de Indias, se detectó la presencia de cepas bacterianas con capacidad degradativa de compuestos organofosforados. Los organismos encontrados fueron capaces de desarrollarse en medios saturados con pesticidas organofosforados, con resultados satisfactorios y similares a los obtenidos con estudios de crecimiento microbiológico en medios altamente selectivos. Los resultados obtenidos con estas tres cepas bacterianas, muestran una eliminación satisfactoria y eficiente desde las 72 h de exposición. Evidenciado en el crecimiento exponencial de las colonias, las cuales se mantuvieron hasta por 20 días con una tendencia de crecimiento de biomasa de 1.6.

A nivel abiótico, se detectó la presencia de Fenclorfós, Forato y Demeton en las tres muestras. Estos compuestos organofosforados podrían tener origen tanto de las cápsulas almacenadoras de pesticidas bajo tierra como por el arrastre por escorrentía. Aunque esta última opción es menos probable debido a las características de la zona (altas temperaturas, alta humedad y evaporación) las cuales generan volatilización del contaminante y concentraciones tan bajas que no estarían en el límite de detección del GC/FID.

El poder degradativo de las cepas aisladas del suelo, fue comprobado sometiendo las muestras a medios con monocrotofós, el cual fue degradado produciendo en el proceso, metabolitos secundarios que también son considerados contaminantes, pero que probablemente estos sean degradados por vías metabólicas, hasta lograr inocuidad. El monocrotofós es metabolizado en N-hidroxi-metilamida y n-metilacetoamida. Este último tiende a acumularse en suelos contaminados, y puede convertirse también en hidroximetilo utilizando la ruta metabólica oxidativa.

Los microorganismos aislados fueron identificadas bioquímicamente como *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter clocae* y *Pseudomonas aeruginosa*. A nivel molecular del gen ribosomal 16S, permitió concluir que las bacterias cultivadas de

las muestras C1, C2 y C3 pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, obteniendo las dos primeras una similaridad genética entre 99 y 100% con *Enterobacter cancerogenus* y otras especies no especificadas, sin embargo, la iteración más acorde con cada una es muy diferente, por lo que puede ser concluido que las mismas podrían ser subespecies.

Cabe resaltar que al comparar los géneros arrojados por la identificación bioquímica y molecular de C1 y C2 difieren, las mismas hacen parte de la familia Enterobacteriaceae y comparten muchas similitudes, como por ejemplo la morfología de colonias, caracteres microscópicos, metabolismo no son oxidativo, caracterizadas como anaerobias facultativas, no son exigentes, metabolismo muy similar e incluso el genoma de las mismas es muy parecido y puede variar debido a la facultad de intercambio génico.

Las bacterias cultivadas de la muestra C3, fueron ubicadas dentro de la Familia Enterobacteriaceae, con un grado de similaridad del 99 a 100% con el de la especie *Pseudomonas aeruginosa*, aunque la distancia entre el clado de la cepa problema con dicha especie es bastante grande.

Con base en los resultados obtenidos en los árboles de distancias construidos a partir de la secuenciación del gen ribosomal 16S de las tres cepas, es posible afirmar que estas cepas pueden tratarse de subespecies no identificadas hasta el momento.

El proceso microbiológico y químico pre-analítico fue satisfactorio en todo el proceso metodológico utilizado tanto en la parte microbiológica como en la química.



## RECOMENDACIONES

Por los resultados obtenidos en la secuenciación del gen ribosomal 16S de cada una de las cepas aisladas en el presente trabajo, y con base en la divergencia que hubo entre esta tipificación y la obtenida con el kit BBL Crystal©, es importante considerar el desarrollo de estudios posteriores al presente en el cual se haga un análisis más profundo de estas bacterias, en el cual se incluya una secuenciación del genoma completo, para confirmar si efectivamente se trata de especies o subespecies no reportadas en las bases de datos internacionales.

Es necesario desarrollar estudios que indiquen el tipo de metabolitos secundarios generados por el proceso metabólico bacteriano y hacer seguimiento de los mismos para confirmar la terminación del proceso de biorremediación. Además, para la determinación de disminución de pesticida, es recomendable utilizar un método de cuantificación: GC-MS.

En cuanto al impacto ambiental, es importante la generación de estudios de monitoreo y control de la zona para hacer un seguimiento de la misma y por ende contar con datos para la recuperación medioambiental.

Finalmente, se recomienda iniciar procesos de concientización sobre la problemática ambiental en aledaños por medio de talleres y charlas de manejo, disposición y cuidados frente a exposición a pesticidas OF.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña, A., Pucci, G., Morales, M. & Pucci, O., 2010. Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de La Patagonia Argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30(2), pp. 29-36.

Adams, R., Domínguez, V. & García, L., 1999. Bioremediation Potential of Oil Impacted Soil and Water in the Mexican Tropics.. *Terra*, 17(2), pp. 159-174.

Aldana, E., 2006. *El Drama de la Vivienda. De Imaginarios Afrocaribeños. Compañía de Jesús, Provincia Colombiana.* [En línea] Available at:

<http://www.jesuitas.org.co/Documentos/opinion/EfrainAldana/eldramadelavi>  
[Último acceso: 02 05 2012].

Andersen J., B. K., 2006. Elimination of organophosphate ester flame retardants and plasticizers in drinking water purification. *Water Research*, Volumen 40, pp. 621-629.

Anon., 2012. *BESTechnologies.inc. 2012. Bioremediation cycle.* [En línea] Available at: [http://www.bestechcorp.com/bioremediation\\_cycle.aspx](http://www.bestechcorp.com/bioremediation_cycle.aspx)  
[Último acceso: 02 08 2012].

Anon., 2012. *Public Health..* [En línea] Available at: <http://www.publichealth.va.gov/exposures/gulfwar/medically-unexplained-illness.asp>  
[Último acceso: 29 08 2012].

Anon., 2012. Subramanian, G., Sekar, S., Sampooram, S. 2012. Biodegradation and utilization of organophosphorus pesticides by Cyanobacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 33(2), pp. 129-143.

Aran, V. & Paez, M., 2005. *Determinación de residuos de insecticidas organofosforados en aguas de la Laguna de Sonso Valle del Cauca mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.* [En línea] Available at: [http://200.21.104.25/udecaldas/downloads/Udecaldas25-2\\_8.pdf](http://200.21.104.25/udecaldas/downloads/Udecaldas25-2_8.pdf)  
[Último acceso: 15 08 2012].

Arbeli, Z., 2009. Biodegradación de compuestos orgánicos persistentes (COP): El caso de los bifenilospoliclorados (PCB). *Acta Biológica Colombiana*, pp. 57-88.

Baird, C., 2001. *Substancias Tóxicas, Pesticidas.* En: *Química Ambiental*. 2º ed. Barcelona: Reverté.

Banks, C. & Lein, P., 2012. A review of experimental evidence linking neurotoxic Organophosphorus compounds and inflammation. *Neurotoxicology*, 33(3), pp. 575-584.

Bedmar, F., 2006. *Agrolluvia.com. El Portal informativo para el productor agropecuario.* [En línea] Available at: <http://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/06/PERSISTENCIA-Y-TRANSPORTE-DE-LOS-HERBICIDAS-ATRAZINA-METOLACLORO-Y-METSULFUR%C3%93N-EN-DOS-SUELOS-DE-LA-PROV-DE-BS.pdf>

[Último acceso: 20 08 2012].

Bhalerao, T. & Puranik, P., 2009. Microbial degradation of monocrotophos by *Aspergillus oryzae*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(4), pp. 503-508.

Brunder, W. & Karch, H., 2000. Genome Plasticity in Enterobacteriaceae. *International Journal of Medical Microbiology*, 290(2), pp. 153-165.

Bustamante, A., 2009. Hallaron más desechos tóxicos en el Copey (Cesar). *El Tiempo.com*, 24 Agosto, pp. <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-5927747>.

Bustamante, A., 2010. *Hallaron más desechos tóxicos en El Copey (Cesar)*. [En línea]

Available at: [http://www.eltiempo.com/colombia/caribe/hallaron-mas-desechos-toxicos-en-el-copey-cesar\\_5927747-1](http://www.eltiempo.com/colombia/caribe/hallaron-mas-desechos-toxicos-en-el-copey-cesar_5927747-1)

[Último acceso: 20 05 2012].

Caballero, K., Stashenko, E. & Olivero, J., 2012. Caballero, K., Stashenko, E., Olivero, J. 2012. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia organoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research*, Volumen 50, pp. 62-66.

Calonge, M., Pérez, Y., Ordoñez, C. & Reguera, R., 2002. Determinación de residuos de siete insecticidas organofosforados en frutas mediante cromatografía de gases con detector de nitrógeno – fósforo y confirmación por espectrometría de masas. *Revista de Toxicología*, 19(1), pp. 55-60.

Cárdenas, O., Silva, E. & Morales, L., 2005. Estudio Epidemiológico de Exposición a Plaguicidas Organofosforados y Carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001. *Biomédica*, Volumen 25, pp. 170-180.

Caribello, A., 2004. "Tóxicos una 'papa caliente'" *Sección Academia*. [En línea]

Available at: <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/MAM-1572788>

[Último acceso: 10 11 2011].

Carmona, M. & Carmona, L., 2005. *Los Organofosforados*. [En línea]

Available at: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/55>

[Último acceso: 2012 02 05].

Carod, E., 2002. Insecticidas Organofosforados. "De la Guerra química al riesgo laboral y doméstico". *Medifam*, 12(5), pp. 333-340.

Carson, R. & Harris, M., 2008. "Organofosforados". En: *Manual de Toxicología para médicos*. 1° ed. Madrid: Elsevier, p. 12.

Castilho, J. A., Fenzl, N., Guillen, S. M. & Nascimento, F. S., 2000. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in the Atoya river basin, Chinandega, Nicaragua. *Environmental Pollution*, 110(3), pp. 523-533.

Castrejón, M., Sánchez, E. & Ortiz, M., 2006. *Caracterización e identificación de consorcios bacterianos capaces de crecer sobre plaguicidas organofosforados*. Universidad Autónoma del estado de Morelos. Centro de Investigación en Biotecnología, s.l.: s.n.

Chen, Y., 2011. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China. *Food Control*, 19(1), pp. 1114-1120.

CIOH, 2012. *Servicios Meteorológicos, Climatología de Cartagena de Indias*. [En línea]

Available at:  
[http://www.cioh.org.co/dev/proserv/dat\\_generales.htm#PARAMETROS](http://www.cioh.org.co/dev/proserv/dat_generales.htm#PARAMETROS)  
[Último acceso: 02 08 2012].

Comunidad Andina. Secretaria General, 2002. *Norma Andina para registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícola*, s.l.: s.n.

Cosimi, S., Rossi, E., Cioni, P. & Canale, A., 2009. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). *Journal of Stored Products*, 45(2), pp. 125-132.

CSB, 2009. *Corporación Autónoma Regional del Sur de Bolívar CSB*. [En línea]

Available at:  
<http://www.contratos.gov.co/archivospuc1/2009/DEPREV/132039000/09-9-66086/DEPREV PROCESO 09-9-66086 132039000 1086274.pdf>  
[Último acceso: 20 08 2011].

CSB, 2009. *Estudios Previos Suministro de Fertilizantes, Microelementos , Plaguicidas Para Mantenimientos de Proyectos de Reforestación..* [En línea]

Available at:  
<http://www.contratos.gov.co/archivospuc1/2009/DEPREV/132039000/09-9-66086/DEPREV PROCESO 09-9-66086 132039000 1086274.pdf>  
[Último acceso: 20 08 2011].

Cycón, M., Wójcik, M. & Piotrowska-Seget, Z., 2009. Biodegradation of the

organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere*, 76(4), pp. 494-501.

De Silva, H., Samarawickrema, N. & Wickremasinghe, A., 2006. Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure?. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.*, 100(9), pp. 803-806.

De Souza, A. & de Andrade, J., 2009. Development, validation and application of a SDME/GC-FID methodology for the multiresidue determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Talanta*, 79(5), pp. 1354-1359.

Denton, M., 2007. Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(3), pp. 9-22.

Durán, J. & Collí-Quintal, J., 2000. Intoxicación aguda por plaguicidas. *Salud Pública de México*, Volumen 42, pp. 53-55.

Eddleston, M., 2004. Self poisoning with pesticides. *British Medical Journal*, 3(28), pp. 42-44..

Eddleston, M., Street, J., Thomson, A. & Kings, T., 2012. A role for solvents in the toxicity of agricultural organophosphorus pesticides. *Toxicology*, 294(2-3), pp. 94-103.

Elbing, E. & Brent, R., 2002. Media Preparation and Bacteriological Tools. *Current Protocols in Molecular Biology*, pp. 111-117.

Emerson, G. y otros, 1999. Organophosphate poisoning in Perth, western Australia, 1987-1996. *The Journal of Emergency Medicine*, 7(2), pp. 273-277.

EPA, 2012. *Pesticides: Reregistration. Phorate IRED Facts..* [En línea] Available at: [http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/phorate fs.htm](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/phorate_fs.htm) [Último acceso: 02 05 2012].

Exner, C. & Urquiza, G., 2009. Organophosphate and carbamate intoxication in La Paz, Bolivia. *The Journal of Emergency Medicine*, Volumen 4, pp. 348-352.

Ezeziaka, O. & Singer, P. (., 2010. Genetically engineered oil microbes for bioremediation: Prospects and Regulatory Challenges. *Technology in Society*, 32(4), pp. 331-335.

Ezeziaka, O. & Singer, P. (., 2010. Genetically engineered oil-eating microbes for bioremediation processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(3), pp. 286-269.

FAO, 2012. [En línea]

Available at: <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y4252E/Y4252E00.HTM>. PDF disponible en: <ftp://ftp.fao.org/> [Último acceso: 10 04 2012].

FAO, 2012. *FAO (Food and Agroicultural Organization)*. [En línea] Available at: <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y4252E/Y4252E00.HTM>. PDF disponible en: <ftp://ftp.fao.org/> [Último acceso: 10 04 2012].

Feola, E. & Binder, C., 2010. Identifying and investigating pesticide application types to promote a more sustainable pesticide use. The case of small holders in Boyacá, Colombia. *Crop Protection*, 29(6), pp. 612-622.

Feola, E., Rahn, E. & Binder, C., 2010. Suitability of pesticide risk indicators for less developed Countries: A comparison.. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 142((3-4)), pp. 238-245.

Fernández, D., Mancipe, L. & Fernández, D., 2010. Intoxicación por organofosforados. *Revista de la Facultad de Medicina*, 18(1), pp. 1-2.

Fernández, L., Zalba, P., Gómez, M. & Sagardoy, M., 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Ciencias del Suelo*, 23(1), pp. 31-37.

Figuroa, R., Prasca, K. & Samacá, L., 2005. *Sondeo de bacterias del género Pseudomonas presentes en el ecosistema marino con potencial de degradación de fenol en la zona de influencia de los vertimientos de la refinería de petróleo, en el sector industrial de Mamonal*. Cartagena de Indias: Tesis de grado.

Flaskos, J., 2012. The developmental neurotoxicity of Organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites. *Toxicology Letters*, 209(1), pp. 86-93.

Fong, G., Moye, A., Seiber, J. & Toth, J., 1999. *Residues in Foods Methods, Techniques and Regulations*, s.l.: New York. John Wiley&Sons, Inc..

GESP, 2009. *Grupo de Epidemiología y Salud Poblacional GESP*. [En línea] Available at: [http://grupogesp.org/files/BOLETIN1\\_2009.pdf](http://grupogesp.org/files/BOLETIN1_2009.pdf) [Último acceso: 12 05 2012].

Ghanem, E. & Raushel, F., 2005. Detoxification of nerv organophosphate phosphotriesterase bacterial. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volumen 207, pp. 459-470.

Gronseth, G., 2005. Gulf war syndrome: a toxic exposure? A systematic review. *Neurologic Clinics*, 23(2), pp. 523-540.

Grupo Copesa, 2012. *Brasil es el mayor consumidor de pesticidas agrícolas, según ONG*. [En línea] Available at: <http://latercera.com/noticia/tendencias/ciencia-tecnologia/2012/06/739-467122-9-brasil-es-el-mayor-consumidor-de-pesticidas-agricolas-segun-ong.shtml> [Último acceso: 13 05 2012].

Gunderson, H., Lehmann, C., Sidell, F. & Jabbari, B., 1992. Nerve Agents: A Review. *Neurology*, Volumen 42, pp. 946-950.

Gundi, V. & Reddy, B., 2006. Degradation of monocrotophos in soils. *Chemosphere*, 62(3), pp. 396-406.

Gundi, V. & Reddy, B., 2006. Degradation of monocrotophos in soils. *Chemosphere*, 62(3), pp. 396-406.

Hawthorne, S., Grabanski, C. & Miller, D., 2000. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on ample mix. *Journal of Chromatography A*, 892(1-2), pp. 421-433.

Hoai, P. y otros, 2011. Pesticide Pollution in Agricultural areas of North Vietnam: Case study in Hoang Liet and Mihn Dai communes. *Environmental Pollution*, 159(12), pp. 3344-3350.

Hodgson, H., 2012. *Pesticide Biotransformation and Disposition*. 1 ed. North Carolina: AP Editions.

Huber, A., Bach, M. & Frede, H., 2000. Pollution of surface waters with pesticides in Germany: modeling non-point source inputs.. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 80(3), pp. 191-204.

Hudson, N., 2006. Contaminación y erosión del suelo. En: *Conservación del Suelo*. 2° ed. Barcelona: Reverté.

Hurtado, M. & Gutiérrez, M., 2005. Enfoque del paciente con intoxicación aguda por plaguicidas órganos fosforados. . *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia*, 53(4), pp. 244-258.

Inchem, A., 2012. *Fenchlorphos*. [En línea] Available at: <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0975.htm>

[Último acceso: 02 05 2012].

Invemar, 2005. *Informe del Estado de los Ambientes Marinos y Costeros en Colombia. (Serie de publicaciones periódicas/INVEMAR; No.8)*, Santa Martha: s.n.

INVEMAR, 2009. *Establecimiento de la línea base del escurrimiento de plaguicidas al Caribe colombiano. Monitoreo del escurrimiento de plaguicidas en la Zona costera del Caribe Colombiano*, Santa Marta: Invemar.

Iversen, A., Chalder, T. & Wessely, S., 2007. Gulf war illness: lessons from medically unexplained symptoms.. *Clinical Psychology*, Volumen 1, pp. 842-854.

Jácome, P., 2008. *“La Industria de Alimentos: Su aporte a la agroindustria Mundial”*. [En línea]

Available at:

<http://www.ailaonline.net/documentos/AgroindustriaEcuadorpptPABLOJACOME.pdf>

[Último acceso: 02 05 2012].

Joachimisthal, E., Ivanov, S. & Tay, J., 2004. Bacteriological examination of ballast water in Singapore Harbour by flow cytometry with FISH. *Marine Pollution Bulletin*, 49(4), pp. 334-343.

Jokanovic, M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166(1), pp. 139-160.

Kavvalakis, M. & Tsatsakis, A., 2012. The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human Organophosphorus pesticide's exposure. *Forensic Science International*, 218(1-3), pp. 111-122.

Koneman, E. y otros, 2001. *Koneman's color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

Lascano, C., Ferrari, A., Gauna, L. & L. C. C. C., 2011. 2011. Organophosphorus insecticides affect normal polyamine metabolism in amphibian embryogenesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*.101(3):240-247..

Lemon, R., 1967. The effect of fenchlorphos on *Sitophilus* spp. (Coleoptera, Curculionidae).. *Journal of Stored Products Research*, 3(4), pp. 397-400..

Lesueur, C., Gartner, M., Mentle, A. & Fuerhacker, M., 2008. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. *Talanta*, 75(1), pp. 284-293.



Levin, M., 1997. "Visión general del biotratamiento y su futuro". En: *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Selección, estimación y modificación de microorganismos y aplicaciones*. 1° ed. Madrid: Mc Graw-Hill.

Li, L. y otros, 2010. Enantiometric separation of organophosphorus pesticides by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis and their applications to environmental fate and toxicity assays. *Journal of Chromatography B*, 878(17-18), pp. 1264-1267.

Linstrom, P. J. & Mallard, W. G., 2011. *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database*. [En línea] Available at: <http://webbook.nist.gov> [Último acceso: 01 05 2013].

Litchinger, W., Arriaga, B. & Bolaños, R., 2001. Bases de la política para la prevención de la contaminación del suelo y su remediación. *Sermanat*, Volumen 1, pp. 5-65.

Lors, C. y otros, 2010. Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. .. *Chemosphere*, 81(10), pp. 1263-1271.

Luque, L., 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique. *Analytica Chimica Acta*, Volumen 1, pp. 1-10.

MAVDT, 2006. *Resolución Número 1247 del 30 de Junio del 2006 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial por la cual se establecen unas medidas ambientales y se toman otras determinaciones*. [En línea] Available at: [http://www.minambiente.gov.vo/documentos/res\\_0423\\_270209.pdf](http://www.minambiente.gov.vo/documentos/res_0423_270209.pdf) [Último acceso: 10 06 2012].

MAVDT, 2006. *Resolución Número 1247 del 30 de Junio del 2006 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial por la cual se establecen unas medidas ambientales y se toman otras determinaciones*. [En línea] Available at: [http://www.minambiente.gov.vo/documentos/res\\_0423\\_270209.pdf](http://www.minambiente.gov.vo/documentos/res_0423_270209.pdf) [Último acceso: 10 06 2012].

MAVDT, 2007. *Resolución 291 del Ministerio del Medio Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial por la cual se formula un pliego de cargos y se toman otras determinaciones*. [En línea] Available at: [http://www.minambiente.gov.co/documentos/res\\_2403\\_101209.pdf](http://www.minambiente.gov.co/documentos/res_2403_101209.pdf) [Último acceso: 15 04 2011].

MAVDT, 2007. *Resolución 291 del Ministerio del Medio Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial por la cual se formula un pliego de cargos y se toman otras*

determinaciones.

[En

línea]

Available at: [http://www.minambiente.gov.co/documentos/res\\_2403\\_101209.pdf](http://www.minambiente.gov.co/documentos/res_2403_101209.pdf)  
[Último acceso: 15 04 2011].

Megharaj, M., Venkateswarlu, K. & Rao, A., 1988. Microbial degradation and algal toxicity of monocrotophos and quinalphos in flooded soil. *Chemosphere*, 17(5), pp. 1033-1039.

Moaledj, K., 1986. Comparison of gram-staining and alternative methods, KOH test and aminopeptidase activity in aquatic bacteria: tjeir application to numerical taxonomy. *Microbiological Methods*, 5(5-6), pp. 303-310.

Mojica, A. & Guerrero, J., 2010. Extracción de residuos de plaguicidas en suelos asistida por ultrasonido. *Revista Colombiana de Química*, 39(3), pp. 371-387.

Moll, W., Ungerechts, J., Marklein, G. & Schaal, P., 1996. Comparison of BBL Crystal® and ID Kit and API rapid ID 32 A for identification of Anaerobic Bacteria. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 284(2-3), pp. 329-347.

Motohashi, N., Nagashima, H., Párkányi, C. & Zhang, G., 1996. Official multiresidue methods of pesticide analysis in vegetables, fruits and soil. *Journal of Chromatography A*, 754(1-2), pp. 333-346.

Mücke, W., 1994. Monocrotophos in animlas. *Environmental Contamination and Toxicology*, 139(2), pp. 59-65.

Mulbry, W. & Kearney, C., 1991. Degradation of pesticides by micro-organisms and the potential for genetic manipulation. *Crop Protection*, 10(5), pp. 334-346.

Murcia, A. & Stashenko, E., 2008. Determinación De Plaguicidas Organofosforados en Vegetales producidos en Colombia. *Agro Sur*. 36(2):71-81.. *Agro Sur*, 36(1), pp. 71-81.

Murray, P. y otros, 1999. *Manual of Clinical Microbiology*. 7 ed. Washington, D.C.: American Society of Microbiology.

Nordmann, P., Dortet, L. & Poirel, L., 2012. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the Storm!. *Trends in Molecular Medicine*, 18(5), pp. 263-72.

Olivero, J., 2011. Colombia: Environmental Health Issues. *Encyclopedia of Environmental Health*, Volumen 1, pp. 740-754.

Oshiro, K. y otros, 1996. Biodegradation of Organophosphorus insecticides by bacteria soil from turf green soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*,

82(3), pp. 299-305.

Page, A. L., 1982. *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2 ed. Wisconsin: American Society of Agronomy Inc..

Patel, J., 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*, 6(1), pp. 313-321.

Peñuela, G. M. G. M. J., 2005. Estudio de la fotocatalisis del pesticida malatión. *Dialnet*, Volumen 428, pp. 312-326.

Phineiro, S. & Restepo, J., 2009. *Curso Internacional: Vida, Salud y Cromatografía de suelos. Movimiento de Agricultura Orgánica de El Salvador MAOES y Brasil, Colombia, México COAS.* [En línea] Available at: <http://ruta.org/archivos-de-usuario/CALENDARIODOCS/CursoInternacionalMAOES/CartillaCursoInternacionalagosto2009final.pdf> [Último acceso: 12 05 2012].

Phugare, S. y otros, 2012. Biodegradation of acephate using a developed bacterial consortium and toxicological analysis using earthworms (*Lumbricus terrestris*) as a model animal. *International Biodeterioration & Biodegradation*.

Pierre, F. & Betancourt, P., 2007. Residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en el cultivo de cebolla en la depresión de Quíbor, Venezuela. *Bioagro*, 19(2), pp. 69-78.

Pino, N. & Peñuela, P., 2011. Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Volumen 65, pp. 827-831.

Pose, D., de Ben, S., Delfino, N. & Burger, M., 2000. Intoxicación aguda por organofosforados. Factores de riesgo. *Revista Médica Uruguay*, Volumen 16, pp. 5-13.

Public Health, 2012. *United States Department of veterans Affairs*. [En línea] Available at: <http://www.publichealth.va.gov/exposures/gulfwar/medically-unexplained-illness> [Último acceso: 29 08 2012].

Ramesh, A., Nagaraju, R. & Sharda, P., 2012. Insights into the mechanisms mediating hyperglycemic and stressogenic outcomes in rats treated with monocrotophos, an Organophosphorus insecticide. *Toxicology*, 294(1), pp. 9-16.

- Rani, R. & Juwarkar, A., 2012. Biodegradation of phorate in soil and rhizosphere of Brassica juncea(L.) (Indian Mustard) by a microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 71(3), pp. 36-42.
- Rao, J., 2006. Biochemical alteration in euryhaline fish, Oreochromis mossambicus exposed to sub lethal concentrations of an Organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Chemosphere*, 65(10), pp. 1814-1820.
- Rodicio, M. & Mendoza, M., 2004. <Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas de Microbiología Clínica*, 22(4), pp. 238-245.
- Rodríguez, F. y otros, 2011. Development of a headspace solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry method for determination of Organophosphorus pesticide residues in cow milk. *Microchemical Journal* , 98(1), pp. 56-61.
- Rona, E. & Rosenmerg, E., 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. Biotechnology. *Biotechnology*, 13(3), pp. 249-252.
- Ronzano, E. & Dapena, J., 2002. *Tratamiento biológico de las aguas residuales. Capítulo 2. Principios básicos de la oxidación biológica*. 1 ed. Barcelona: Díaz de Santos S.A..
- Ronzano, E. & Dapena, J., s.f. (2002). *Tratamiento biológico de las aguas residuales. 1º Edición. Editorial Díaz de Santos S.A. Capítulo 2. Principios básicos de la oxidación biológica. España. 510 páginas.. s.l.:s.n.*
- Rovasio, L., Framarini, S. & Baccaro, F., 2011. Disfunción múltiple de órganos en la intoxicación grave por organofosforados.. *Revista Médica Intensiva*, 35(7), pp. 2-4.
- Rozo, R. & Alvarado, J., 2004. *Prácticas y Procedimientos. Hospital Universitario San Ignacio, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana. Guías de Prácticas Clínicas. (1º ed.)*. Bogotá: Ediciones Médicas Latinoamericanas S.A..
- Salcedo, M. & Melo, O., 2005. Evaluación del uso de plaguicidas en la actividad agrícola del departamento de Putumayo. *Revista de Ciencias de la Salud*, 3(2), pp. 168-185.
- Sánchez, M., Rodríguez, M. & Sarria, V., 2006. Pesticidas obsoletos en Colombia. Situación actual y alternativas de tratamiento y disposición. *Revista de Ingeniería*, Volumen 23, pp. 13-22.

Saquib, Q. y otros, 2012. Cytotoxic and necrotic responses in human amniotic epithelial (WISH) cells exposed to organophosphate insecticide phorate.. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 744(2, 15), pp. 125-134.

Satoh, T. & Hosokawa, M., 2000. Organophosphates and their impact on the global environment. *Neurotoxicology*, 21(1-2), pp. 223-227.

Shaoqin, L., 2008. Recent Advances in Nanosensors for Organophosphate. *Advanced Powder Technology*, Volumen 1, pp. 419-444.

Sharaf, A. y otros, 2006. Molecular identification and cloning of organophosphate degradation gene in some bacterial isolates. *Arabic Journal of Biotechnology*. 10(2), pp. 259-254.

Shires, S., 1985. Effects of aerial applications of cypermethrin and Demeton-S-methyl on nontarget arthropods of wheat.. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. , 10(1), pp. 1-11. .

Sierra, C. y otros, 1998. In vitro and In vivo genotoxic activity of miral, an Organophosphorus insecticide used in Colombia.. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 415(1-2), pp. 59-67.

Sirotkina, M., Lyaying, I. & Efremenko, E., 2012. Hydrolysis of organophosphorus pesticides in soil: New opportunities with eco-compatible immobilized His6-OPH. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Volumen 68, pp. 18-23.

Skoog, D. W. D., 2011. *Fundamentos de química analítica*. 8° ed. Barcelona: Paraninfo.

Stackebrandt, E. y otros, 2001. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1), pp. 1043-1047.

Stoytcheva, M., Zlatev, R., Velkova, Z. & Valdéz, B., 2009. Hybrid electrochemical biosensor for organophosphorus pesticides quantification. *Electrochimica Acta*, 54(6), pp. 1721-1727.

Subramanian, G., Sekar, S. & Sampooram, S., 2012. Biodegradation and utilization of organophosphorus pesticides by Cyanobacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 33(2), pp. 129-143.

Tchobaloglus, G. B. F., 1995. *Ingeniería de Aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización*. 3° ed. Madrid: Mac graw-Hill.

Tirado, I. & Vásquez, M., 2005. *Determinación de la capacidad degradativa de materia orgánica por cepas del género Pseudomonas aisladas en las aguas de la ciénaga de las Quintas de la ciudad de Cartagena de Indias, Colombia*, s.l.: Tesis de Grado para optar al título de Bacteriólogo.

Toney, N., Toney, S. & Butler, R., 2010. Utility of high-performance liquid chromatography analysis of mycolic acids and partial 16S rRNA gene sequencing for routine identification of Mycobacterium spp. in a national reference laboratory. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(2), pp. 143-152.

Tsutsumi, H., Hirota, Y. & Hirashima, A., 2000. Bioremediation on the Shore after an Oil Spill from the Nakhodka in the Sea of Japan. II. Toxicity of a bioremediation agent with microbiological cultures in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 40(4), pp. 315-319.

Unger, T., 1996. Demeton-S-Metil Sulfon.. En: W. Andrew, ed. *Pesticide Synthesis Handbook*.. Washington D.C.: Applied Science Publishers, pp. 316-317.

Vallet, V. y otros, 2008. Percutaneous penetration and distribution of VX using in vitro pig or human excised skin: Validation of Demeton-S-methyl as adequate stimulant for VX skin permeation investigations. *Toxicology*, 246(1-3), pp. 73-82.

Varona, M. y otros, 2007. Factores de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en el Departamento del Putumayo. *Biomédica*, Volumen 27, pp. 400-409..

Vásquez, S. & Tablas, G., 2009. *Determinación de residuos plaguicidas organoclorados y organofosforados en leche de ganado bovino, agua y forraje en Piedras Negras, Veracruz*, s.l.: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/28577/1/Soledad%20Vazquez%20Vazquez.pdf> .

Weber, W. C. H., 1994. Inoculation of contaminated subsurface soils with enriched indigenous microbes to enhance bioremediation rates. *Water Research*, 28(6), pp. 1407-1414.

Yoon, C. y otros, 2011. Repellency of lavender oil and linalool against spot clothing wax cicada, *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae) and their electroscophysiological responses. *Journal of Aia-pacific Entomology*, 14(4), pp. 411-416.

Yu, J., 2002. Removal of organophosphated pesticides from wastewater by supercritical carbon dioxide extraction. *Water Research*, Volumen 36, pp. 1095-1101.

Zacharia, J., 2010. Biota uptake of pesticides by selected plant species; the case study of Kilombero. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Volumen 3, pp. 71-75.

Zelicof, A., 2003. *Primary Care Preparedness. Chemical Terrorism..* [En línea] Available at: [http://www.bioterrorism.slu.edu/bt/products/ahec\\_chem/scripts/Organophosphates.pdf](http://www.bioterrorism.slu.edu/bt/products/ahec_chem/scripts/Organophosphates.pdf).

[Último acceso: 12 01 2012].

Zhao, Y. & Pei, Y., 2012. Risk evaluation of groundwater pollution by pesticides in China: A Short review. *Procedia Environmental Sciences*, 13(1), pp. 1739-1747.

Zhen, X. y otros, 2012. Monitoring of Organophosphorus pesticides in vegetables using monoclonal antibody-based direct competitive ELISA followed by HPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 131(4), pp. 1569-1576.

Zoubulis, A. & Moussas, P., 2011. Groundwater and soil pollution: Bioremediation. *Encyclopedia of Environmental Health*, 19(1), pp. 1037-1044.

# ANEXOS



5' GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGC  
TTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGG  
GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCGAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCG  
GGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAG  
GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGAC  
TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGC  
GTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAAT  
AACCTCATCGATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGT  
AATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCA  
AGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCT  
TGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGT  
GGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA  
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG  
GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAA  
TGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAAC  
CTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAG  
ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC  
GCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAA  
CTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCT  
ACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTGTA  
GTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAA  
TGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGGAGTGGGTTG  
CAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGGT  
GAATC3'

## Anexo 1 Secuenciación del fragmento de ADN analizado de la Cepa 1

5' CGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAG  
CTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGG  
GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTC  
GGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTA  
GGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGA  
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCG  
CGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAA  
TAACCTCATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG  
TAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTC  
AAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTC  
TTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGG  
TGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG  
ATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGT  
GGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAA  
ATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAA  
CCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGA  
GACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG  
CGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAA  
ACTGGAGGAAGGTNNGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTG  
CTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCG  
TAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAG  
AATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGNGAGTGGGT  
TGCAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGG  
GTGAATC3'

## Anexo 2 Secuenciación del fragmento de ADN analizado de la Cepa 2

5' CCGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCT  
TGCTCCTGGATTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATA  
ACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATACTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACC  
TCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGA  
CGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGT  
GTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCT  
TGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
CGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCAGCAAGTT  
GGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTACTGAGCTAGAGTACGGTA  
GAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG  
AAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTG  
GCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATGAA  
TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA  
CCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAG  
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAA  
CCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGG  
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAA  
TGGTCCGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGTCC  
GGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTC  
ACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGNGAGTGGGTTGCTCC  
AGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGA3  
,

### Anexo 3 Secuenciación del fragmento de ADN analizado de la Cepa 3

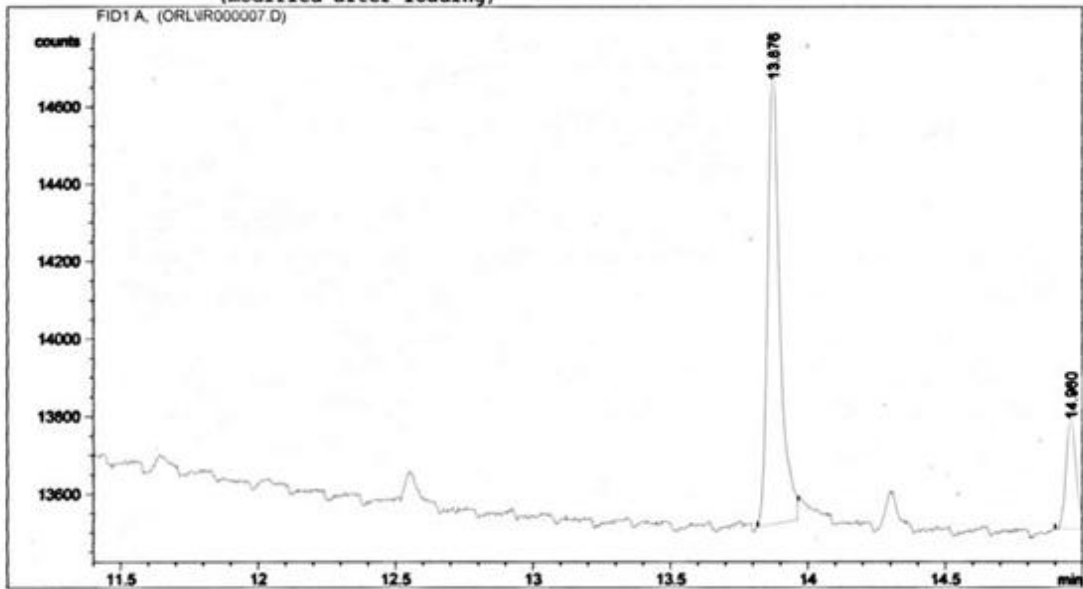
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA BLANCO DIA.0

```

-----
Injection Date : 06/03/2012 15:13:08
Sample Name    : estandar 200 ppm          Location : Vial 1
Acq. Operator  : irina tirado
Inj Volume    : Manually

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed  : 28/10/2011 6:10:10 by orlando de la rosa
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed  : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
                (modified after loading)

```




---

Area Percent Report

---

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.000e-3
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	0.554	PP	0.1016	1793.83606	319.26361	1.857e-7
2	0.745	VB S	0.0781	9.65444e8	1.93759e8	0.09995
3	1.693	BB T	0.1348	5.12760e5	5.39716e4	5.308e-5
4	5.246	BB	0.0404	608.10114	249.48846	6.295e-8
5	13.876	PB	0.0483	3667.52686	1179.23352	3.797e-7
6	14.960	PB	0.0460	790.63245	271.50748	8.185e-8

Totals :                    9.65964e8  1.93815e8

Results obtained with enhanced integrator!

---

\*\*\* End of Report \*\*\*

Anexo 4 Cromatograma de Blanco (Día 0).

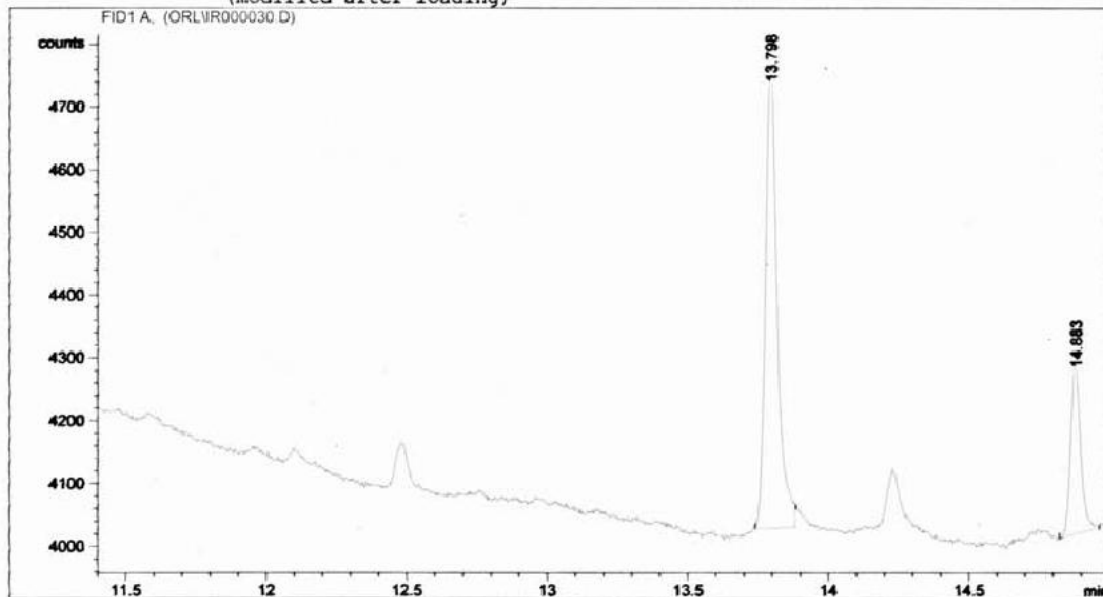
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA BLANCO DIAL

```

=====
Injection Date : 18/03/2012 6:49:45
Sample Name    : IR
Acq. Operator  : orlando de la rosa
Location       : Vial 1
Inj Volume     : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 06/03/2012 21:29:35 by irina tirado
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
                (modified after loading)
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.000e-3
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	0.787	BB S	0.0600	3.99765e8	8.96071e7	0.09990
2	1.615	BV X	0.0502	1.09967e4	3650.01099	2.748e-6
3	1.739	VB X	0.1554	1.08864e5	1.02945e4	2.721e-5
4	2.815	BV X	0.1184	8.52712e4	9350.46191	2.131e-5
5	3.050	VV X	0.1073	4.21538e4	6547.78809	1.053e-5
6	3.282	VB X	0.1439	4086.02832	441.64795	1.021e-6
7	6.746	BP	0.0306	798.67523	412.34943	1.996e-7
8	13.798	PB	0.0471	2179.08325	724.34778	5.446e-7
9	14.883	PB	0.0425	671.75751	257.20099	1.679e-7
10	17.319	BV	0.1586	1.07245e5	9030.12109	2.680e-5
11	17.426	VBA	0.0533	3.44476e4	1.07763e4	8.608e-6

```
Totals :                4.00162e8  8.96585e7
```

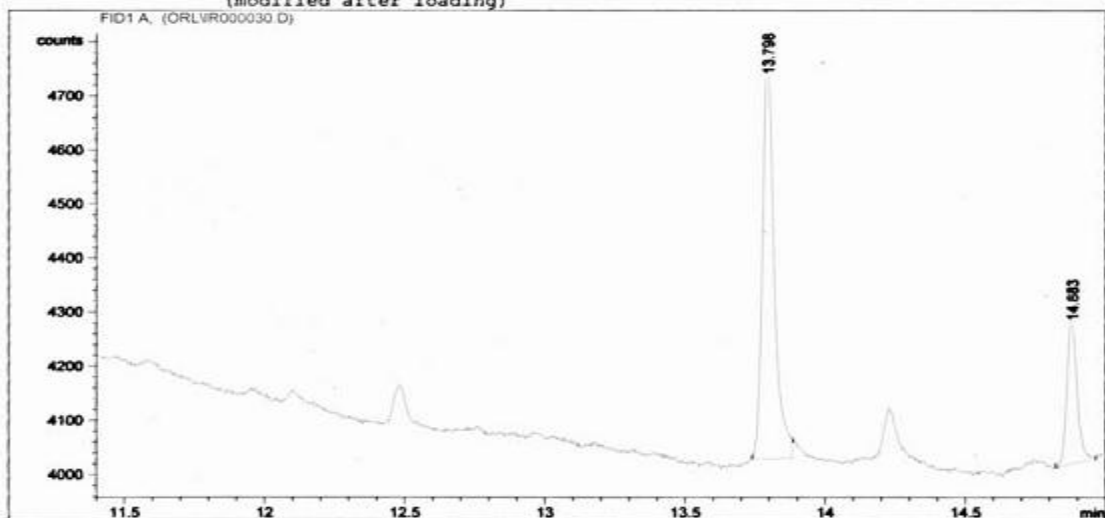
Anexo 5 Cromatograma del Blanco (Día 1).

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA BLANCO DIA2

```

=====
Injection Date : 18/03/2012 6:49:45
Sample Name    : IR
Acq. Operator  : orlando de la rosa
Location       : Vial 1
Inj Volume     : Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 06/03/2012 21:29:35 by irina tirado
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
                (modified after loading)
=====

```



-----  
Area Percent Report  
-----

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.000e-3
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	0.787	BB S	0.0600	3.99765e8	8.96071e7	0.09990
2	1.615	BV X	0.0502	1.09967e4	3650.01099	2.748e-6
3	1.739	VB X	0.1554	1.06864e5	1.02945e4	2.721e-5
4	2.815	BV X	0.1184	8.52712e4	9350.46191	2.131e-5
5	3.050	VV X	0.1073	4.21538e4	6547.78809	1.053e-5
6	3.282	VB X	0.1439	4086.02832	441.64795	1.021e-6
7	6.746	BP	0.0306	798.67523	412.34943	1.996e-7
8	13.798	PB	0.0471	2179.08325	724.34778	5.446e-7
9	14.883	PB	0.0425	671.75751	257.20099	1.679e-7
10	17.319	BV	0.1586	1.07245e5	9030.12109	2.680e-5
11	17.426	VBA	0.0533	3.44476e4	1.07763e4	8.608e-6

```
Totals :                4.00162e8  8.96585e7
```

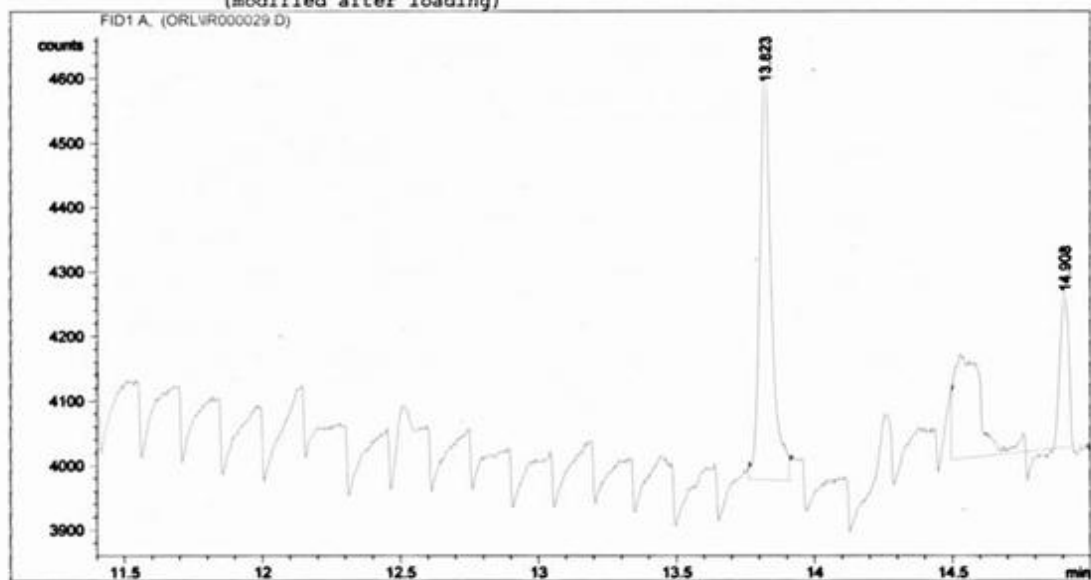
Anexo 6 Cromatograma del Blanco (Día 2).

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA BLANCO DIA3

```

-----
Injection Date : 18/03/2012 6:28:53
Sample Name    : IR                      Location : Vial 1
Acq. Operator  : orlando de la rosa      Inj Volume : Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 06/03/2012 21:29:35 by irina tirado
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
                (modified after loading)
-----

```



```

-----
Area Percent Report
-----

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.000e-3
Dilution      : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	0.792	BB S	0.0504	3.61643e8	9.95822e7	0.09991
2	1.391	BV X	0.0862	4.34844e4	8404.59668	1.201e-5
3	1.631	VV X	0.0564	1.49358e4	4412.76562	4.126e-6
4	1.757	VB X	0.1318	8.35295e4	1.05662e4	2.308e-5
5	2.614	BV X	0.1868	9.65527e4	7471.44238	2.667e-5
6	2.883	VB X	0.0673	4.36279e4	9210.98145	1.205e-5
7	4.906	BP	0.0686	835.52100	299.03766	2.308e-7
8	5.053	VP	0.0927	1890.01355	363.47501	5.222e-7
9	5.209	VP	0.3075	9596.33105	400.51572	2.651e-6
10	5.746	VP	0.0847	1688.55017	347.25809	4.665e-7
11	5.879	VV	0.0823	1591.72510	342.16013	4.397e-7
12	6.009	VP	0.0878	1734.83301	338.67947	4.793e-7
13	6.136	VV	0.0897	1781.93994	337.20639	4.923e-7
14	6.264	VP	0.0819	1679.21399	328.16561	4.501e-7

Anexo 7 Cromatograma Blanco (Día 4).

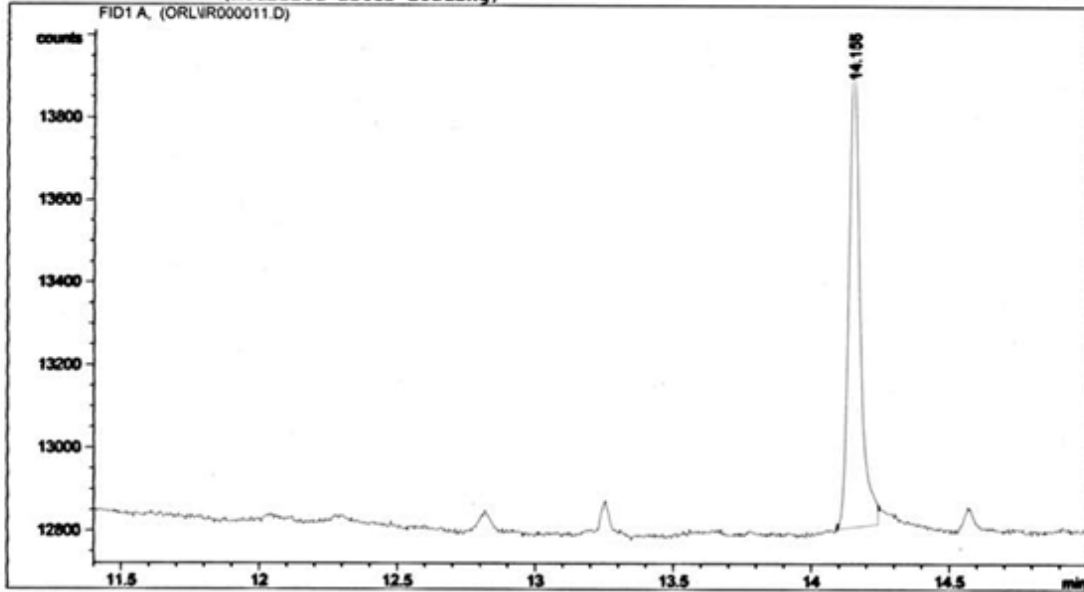
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA C1 Día0.

```

-----
Injection Date : 06/03/2012 19:25:43
Sample Name    : monocrotofos
Acq. Operator  : irina tirado
Location      : Vial 1
Inj Volume    : Manually

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed  : 28/10/2011 6:10:10 by orlando de la rosa
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed  : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
              : (modified after loading)

```




---

Area Percent Report

---

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.000e-3
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [counts*s]	Height [counts]	Area %
1	0.985	PB S	0.1155	1.06271e9	1.29851e8	0.09996
2	1.899	BB X	0.0470	4.18826e5	1.39431e5	3.940e-5
3	14.155	PB	0.0460	3247.71460	1115.48511	3.055e-7
4	15.237	PB	0.0440	704.26733	256.73853	6.624e-8

```
Totals :                1.06313e9  1.29992e8
```

Results obtained with enhanced integrator!

---

\*\*\* End of Report \*\*\*

Anexo 8 Cromatograma C1 día 1.



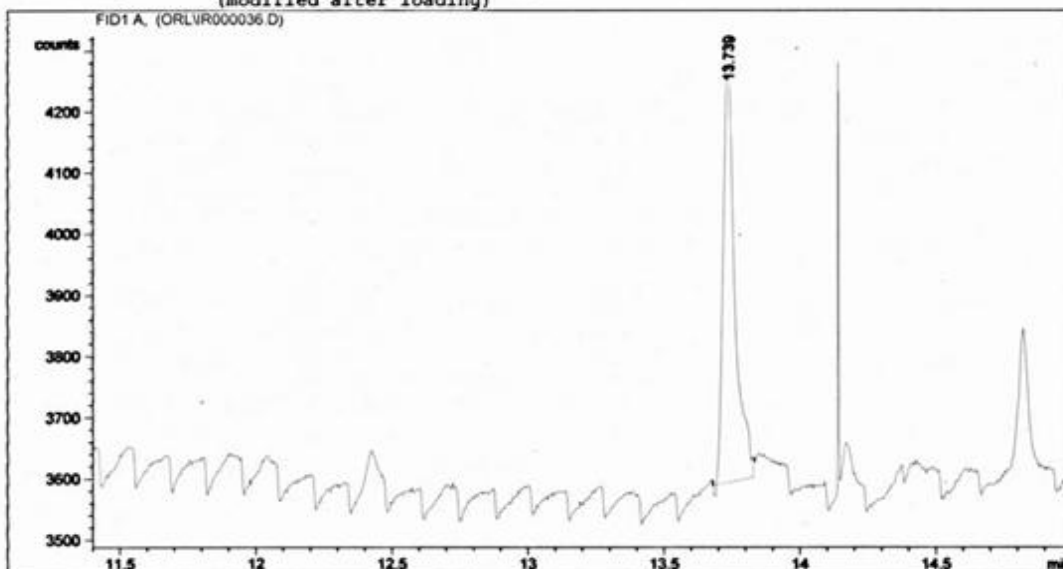
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA C1 DIA2

```

-----
Injection Date : 18/03/2012 9:10:10
Sample Name    : IR
Acq. Operator  : irina tirado
Location       : Vial 1
Inj Volume     : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 18/03/2012 7:10:39 by orlando de la rosa
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
                (modified after loading)

```



```

-----
Area Percent Report
-----

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.000e-3
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime (min)	Type	Width (min)	Area (counts*s)	Height (counts)	Area %
1	0.759	PB S	0.0571	3.52001e8	8.36349e7	0.09996
2	1.410	BB X	0.2041	1.32487e5	1.08190e4	3.762e-5
3	2.642	BB X	0.0992	9351.70117	1196.12732	2.656e-6
4	5.169	BP	0.0784	621.37012	143.82884	1.765e-7
5	13.739	PB	0.0479	2085.61914	677.45575	5.923e-7

```
Totals :                3.52146e8  8.36477e7
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

-----
*** End of Report ***

```

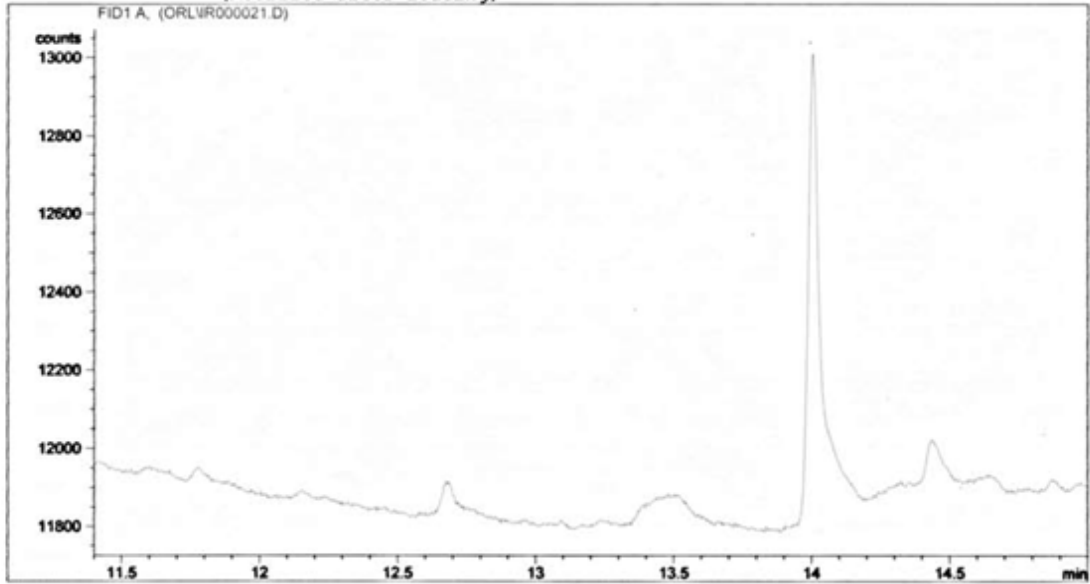
Anexo 9 Cromatograma C1 día 2.

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA C1 Dia 3

```

-----
Injection Date : 07/03/2012 12:53:55
Sample Name    : MONOCOTROFOS                Location : Vial 1
Acq. Operator  : IRINA TIRADO                Inj Volume : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 07/03/2012 12:27:58 by ORLANDO DE LA ROSA
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 19/03/2012 14:52:59 by Grupo 3
                (modified after loading)
    
```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 19/03/2012 14:40:01
Multiplier     : 1.000e-3
Dilution      : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp	Name
7.987	-	-	-	-	-	diclorvos
13.767	-	-	-	-	-	porato
13.940	-	-	-	-	-	monocrotofos
14.972	-	-	-	-	-	diazinon
15.088	PP	798.79504	0.00000	0.00000	-	disulfoton
15.912	-	-	-	-	-	metil paration
16.037	-	-	-	-	-	fenclorfos
16.353	-	-	-	-	-	demeton-s-metilsulfon
16.787	-	-	-	-	-	malation
16.849	-	-	-	-	-	clorpirifos
16.853	-	-	-	-	-	fention
17.100	-	-	-	-	-	paration

Anexo 10 Cromatograma C1 día 3

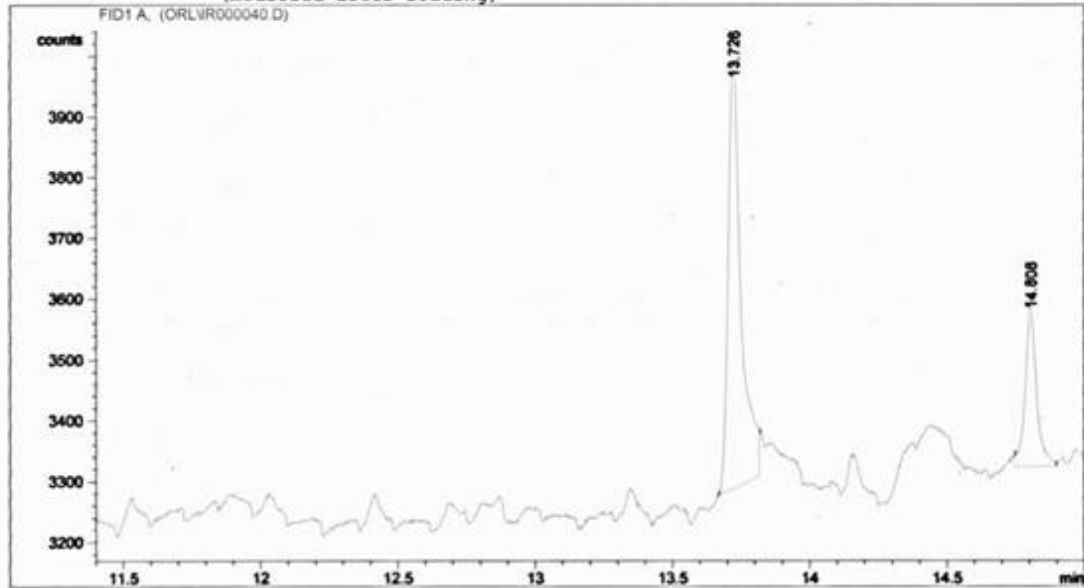
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA C1 DIA4

```

-----
Injection Date : 18/03/2012 10:46:23
Sample Name    : IR                               Location : Vial 1
Acq. Operator  : irina tirado                    Inj Volume : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 18/03/2012 7:10:39 by orlando de la rosa
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
                (modified after loading)

```



```

-----
Area Percent Report
-----

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.000e-3
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	0.753	RR S	0.0454	1.75825e8	6.13422e7	0.09949
2	1.513	BV T	0.1390	1.18584e5	1.34353e4	6.710e-5
3	1.651	VR T	0.9439	7.79414e5	1.37625e4	0.00044
4	13.726	PB	0.0506	2314.34009	699.83331	1.310e-6
5	14.808	BB	0.0471	756.92627	251.42818	4.283e-7

```
Totals :                1.76726e8  6.13704e7
```

Results obtained with enhanced integrator!

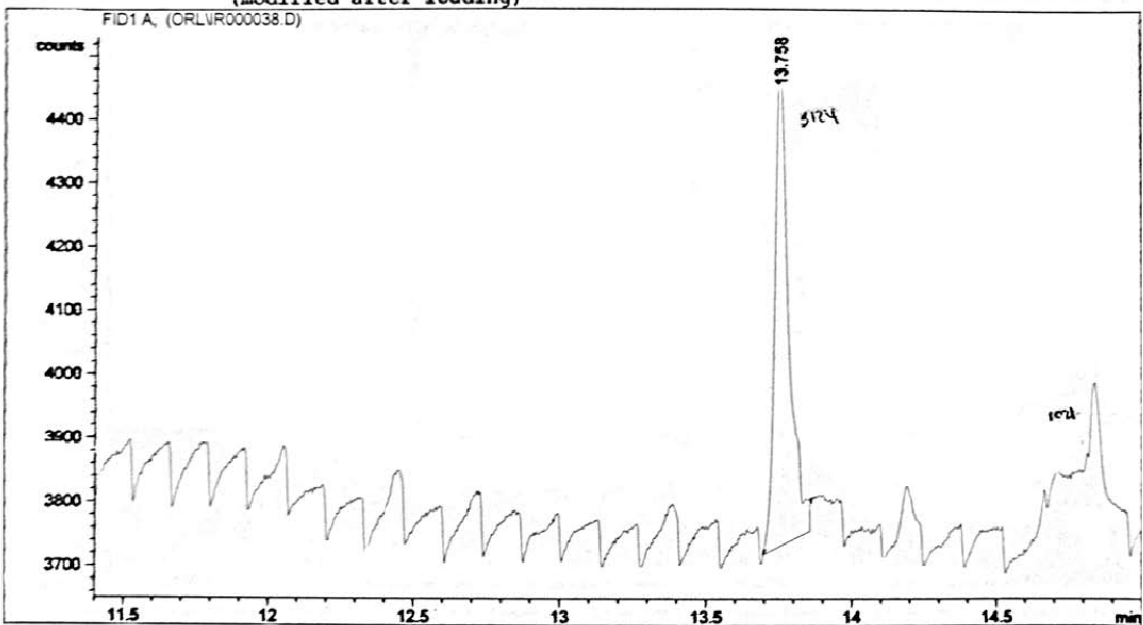
```

-----
*** End of Report ***

```

Anexo 11 Cromatograma C1 día 4

Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M Inj Volume : Manually  
Last changed : 18/03/2012 7:10:39 by orlando de la rosa  
(modified after loading)  
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M  
Last changed : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3  
(modified after loading)



---

Area Percent Report

---

Sorted By : Signal

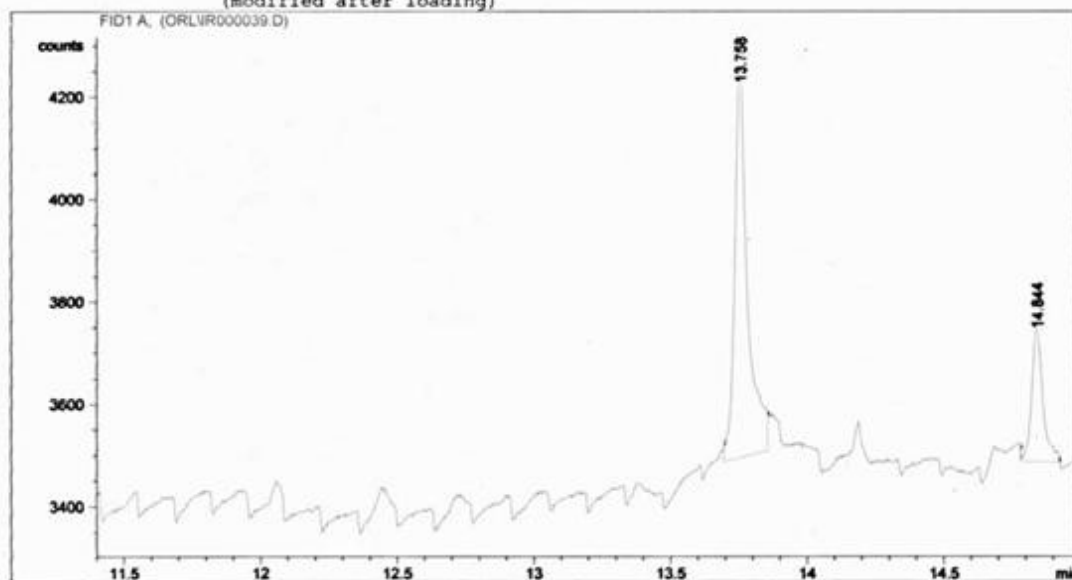
Anexo 12 Cromatograma C2 día 1.

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA C2 DIA2

```

-----
Injection Date : 18/03/2012 10:11:55
Sample Name    : IR
Acq. Operator  : irina tirado
Location       : Vial 1
Inj Volume     : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 18/03/2012 7:10:39 by orlando de la rosa
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
                (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.000e-3
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

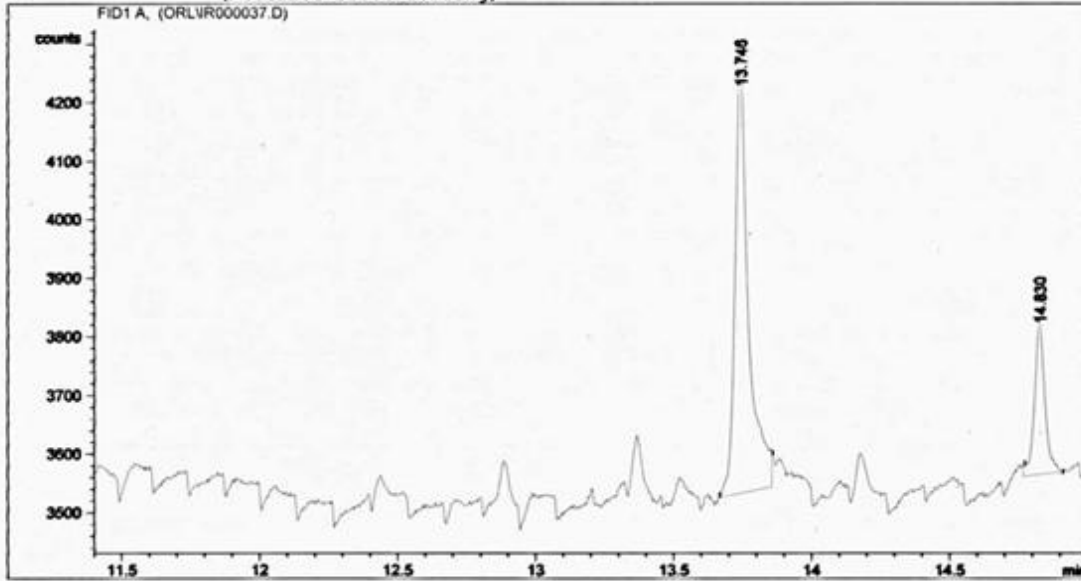
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	0.753	PB S	0.0463	5.11239e8	1.73890e8	0.09984
2	1.393	BV T	0.0647	4.15595e4	9948.68945	8.116e-6
3	1.480	VV T	0.1144	5.01434e4	7308.11621	9.793e-6
4	1.622	VV T	0.4713	3.05579e5	1.08072e4	5.968e-5
5	2.341	VV X	0.2003	2.83474e5	1.91956e4	5.536e-5
6	2.671	VB X	0.1339	1.02752e5	1.27910e4	2.007e-5
7	13.758	BB	0.0519	2523.38257	738.50055	4.928e-7
8	14.844	BB	0.0469	753.07501	251.70496	1.471e-7
9	15.239	BB	0.0582	1120.12378	309.44855	2.188e-7
10	15.709	BB	0.1014	1.37939e4	1884.23584	2.694e-6
11	17.165	PP	0.0541	949.84375	263.20114	1.855e-7
12	25.850	PP	0.1304	2462.57422	280.45932	4.809e-7

Anexo 13 Cromatograma C2 día 2.

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA C2 DIA 3

```

Injection Date : 18/03/2012 9:29:59
Sample Name    : IR                      Location : Vial 1
Acq. Operator  : irina tirado           Inj Volume : Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 18/03/2012 7:10:39 by orlando de la rosa
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
                (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.000e-3
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	0.770	PB S	0.0477	2.06081e8	7.20349e7	0.09934
2	1.421	BV T	0.1762	1.30044e5	1.22998e4	6.269e-5
3	1.633	VV T	0.1183	8.53363e4	1.20219e4	4.114e-5
4	1.841	VV T	0.4934	5.91447e5	1.42142e4	0.00029
5	2.471	VV X	0.5409	4.85776e5	1.49691e4	0.00023
6	3.094	VB X	0.1146	6.61731e4	9619.85254	3.190e-5
7	13.746	PB	0.0588	2519.80054	687.00439	1.215e-6
8	14.830	BB	0.0439	682.77905	249.69559	3.291e-7

Totals : 2.07443e8 7.20989e7

Results obtained with enhanced integrator!

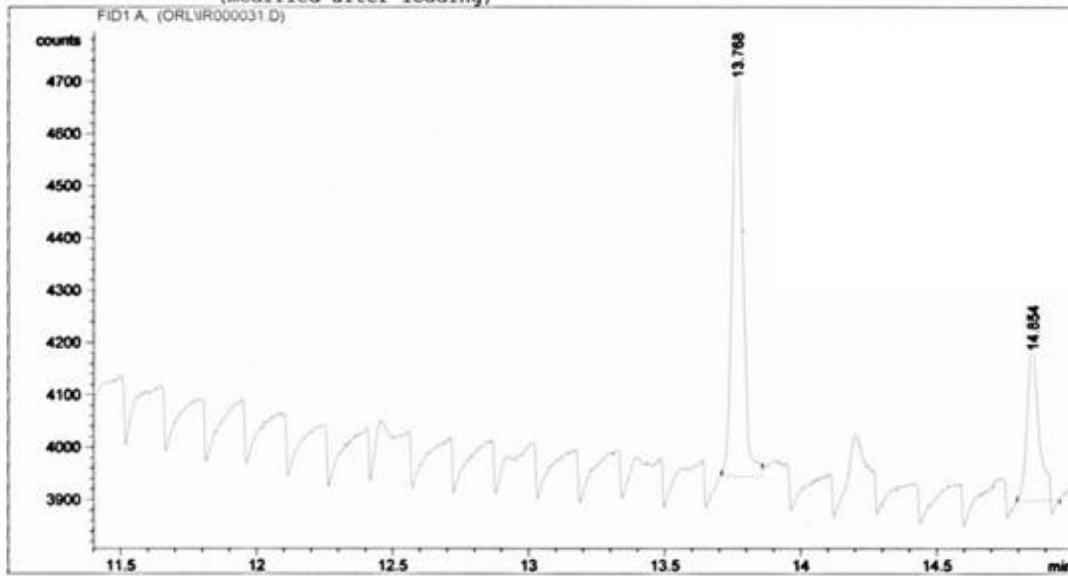
Anexo 14 Cromatograma C2 día 3.

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA C2 DIA1

```

-----
Injection Date : 18/03/2012 7:13:30
Sample Name    : IR
Acq. Operator  : irina tirado
Location       : Vial 1
Inj Volume    : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 18/03/2012 7:10:39 by orlando de la rosa
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
                (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.000e-3
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	0.781	BB S	0.0438	2.91293e8	1.10872e8	0.09986
2	1.390	BV X	0.1221	5.55075e4	7575.94873	1.903e-5
3	1.636	VB X	0.1824	6.00277e4	5484.91455	2.058e-5
4	2.608	BV X	0.1434	1.12118e5	1.02672e4	3.844e-5
5	2.927	VV X	0.0999	8.69945e4	1.41062e4	2.982e-5
6	3.047	VB X	0.0505	5960.24365	1967.07983	2.043e-6
7	3.440	BB X	0.1012	8768.60352	1444.33704	3.006e-6
8	4.158	BV T	0.1870	1.12341e4	1001.25824	3.851e-6
9	4.416	VV X	0.1547	4089.90552	440.67426	1.402e-6
10	4.623	VV X	0.1263	3764.57104	496.72467	1.291e-6
11	4.797	VV X	0.1141	3504.11792	511.84113	1.201e-6
12	4.966	VV X	0.1081	3071.91162	473.81329	1.053e-6
13	5.122	VV X	0.0981	2620.23779	445.15265	8.982e-7

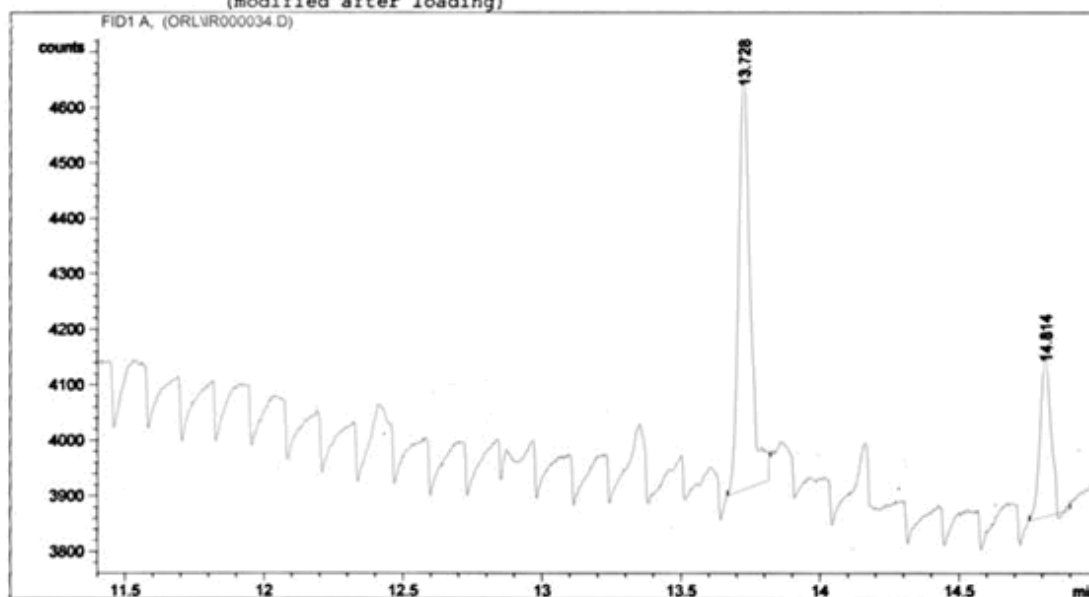
Anexo 15 Cromatograma C2 día 4.

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA C3 DIA1

```

-----
Injection Date : 18/03/2012 8:26:02
Sample Name    : IR
Acq. Operator  : irina tirado
Location       : Vial 1
Inj Volume     : Manually

Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 18/03/2012 7:10:39 by orlando de la rosa
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
                (modified after loading)
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.000e-3
Dilution       : 1.0000
    
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	0.754	RR S	0.0497	4.09013e8	1.26561e8	0.09950
2	1.604	BB X	0.1857	1.32710e5	1.19130e4	3.229e-5
3	2.316	RR T	0.4373	1.82060e6	6.93892e4	0.00044
4	4.354	BV X	0.1156	3725.31860	537.13641	9.063e-7
5	4.513	VV X	0.1043	2898.05811	463.28033	7.050e-7
6	4.665	VV X	0.0900	2663.60010	493.14639	6.480e-7
7	4.799	VV X	0.0877	2564.46924	487.62604	6.239e-7
8	4.932	VV X	0.0818	2201.26660	448.53180	5.355e-7
9	5.058	VV X	0.1794	4629.55322	430.19263	1.126e-6
10	5.294	VV X	0.0739	1713.14661	386.52200	4.168e-7
11	5.409	VV X	0.2625	5872.19238	372.89386	1.429e-6
12	5.842	VV X	0.0648	1160.22534	298.30450	2.823e-7
13	5.948	VV X	0.0645	1107.48608	286.19815	2.694e-7

Anexo 16 Cromatograma C3 día 1.

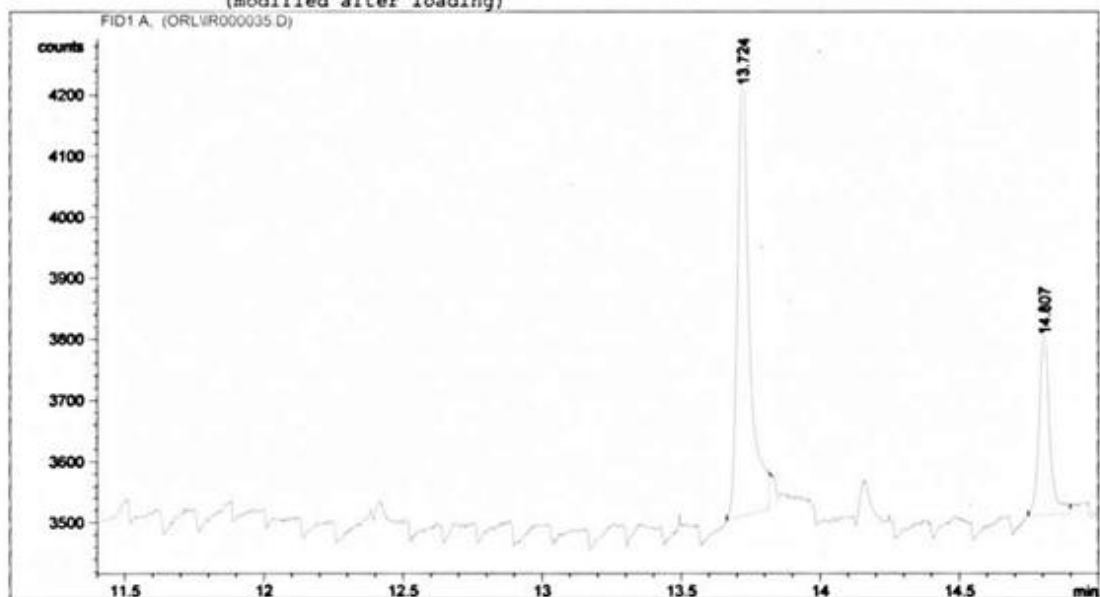


UNIVERSIDAD DE CARTAGENA C3 DIA2

```

-----
Injection Date : 18/03/2012 8:49:41
Sample Name    : IR                      Location  : Vial 1
Acq. Operator  : irina tirado           Inj Volume: Manually
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 18/03/2012 7:10:39 by orlando de la rosa
                (modified after loading)
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed   : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
                (modified after loading)
-----

```



```

-----
                          Area Percent Report
-----

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.000e-3
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [counts*s]	Height [counts]	Area %
1	0.769	RR S	0.0707	3.51021e8	1.33547e8	0.09990
2	1.380	BV T	0.1642	8.48805e4	8615.46094	2.416e-5
3	1.646	VB T	0.2289	6.59746e4	4804.56348	1.878e-5
4	2.434	BV T	0.1578	9.12472e4	7106.32520	2.597e-5
5	2.759	VB T	0.0819	1.17533e5	1.96094e4	3.345e-5
6	13.724	PB	0.0477	2198.61694	718.59851	6.257e-7
7	14.807	PB	0.0438	783.83319	287.35419	2.231e-7

```
Totals :                3.51384e8  1.33588e8
```

```
Results obtained with enhanced integrator!
```

```
*** End of Report ***
```

Anexo 17 Cromatograma C3 día 2.

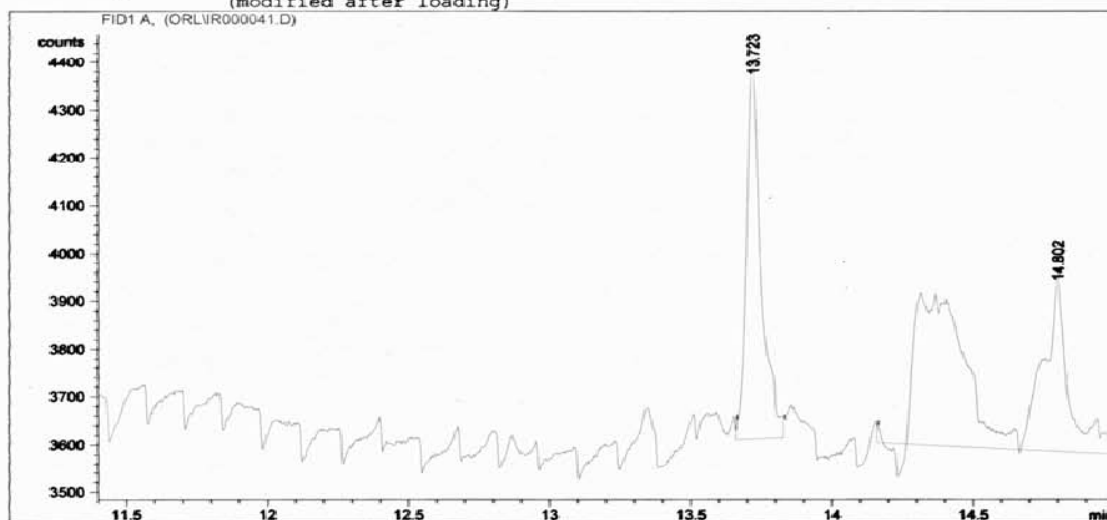
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA C3 DIA3

```

=====
Injection Date : 18/03/2012 11:06:43
Sample Name    : IR
Acq. Operator  : irina tirado
Location      : Vial 1
Inj Volume    : Manually

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed  : 18/03/2012 7:10:39 by orlando de la rosa
               (modified after loading)
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M
Last changed  : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3
               (modified after loading)
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.000e-3
Dilution      : 1.0000

```

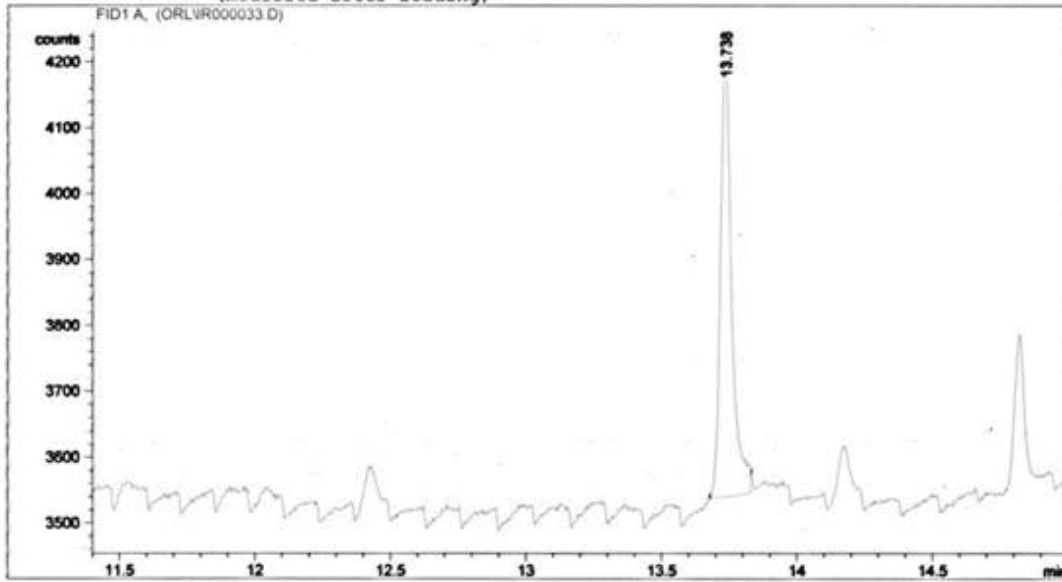
Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	0.780	BB S	0.0502	2.72504e8	7.53059e7	0.09951
2	1.312	BV X	0.1192	8.23599e4	1.10159e4	3.007e-5
3	1.628	VV X	0.4399	6.68693e5	1.91250e4	0.00024
4	2.343	VV X	0.1181	1.74540e5	1.99439e4	6.373e-5
5	2.575	VV X	0.1448	3.13364e5	3.02632e4	0.00011
6	2.865	VV X	0.1883	2.65280e4	2348.15820	9.687e-6
7	3.203	VB X	0.0326	1402.43860	716.93604	5.121e-7
8	4.719	BP	0.0925	1682.23193	304.42859	6.143e-7
9	4.803	VB	0.0423	3432.35400	1167.71838	1.253e-6
10	5.133	BP	0.0968	2483.11499	341.80203	9.067e-7
11	5.254	VV	0.0893	1447.42590	275.43011	5.285e-7
12	5.388	VV	0.1372	2603.10425	268.36588	9.505e-7

Anexo 18 Cromatograma C3 día 3.

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA C4 DIA 4replica

Injection Date : 18/03/2012 8:00:44  
 Sample Name : IR Location : Vial 1  
 Acq. Operator : irina tirado Inj Volume : Manually  
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M  
 Last changed : 18/03/2012 7:10:39 by orlando de la rosa  
 (modified after loading)  
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\FH.M  
 Last changed : 19/03/2012 15:06:37 by Grupo 3  
 (modified after loading)



Area Percent Report

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.000e-3  
 Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Height [counts]	Area %
1	0.779	BB S	0.0399	3.13829e8	1.14623e8	0.09960
2	1.331	BV T	0.1823	1.81126e5	1.65573e4	5.748e-5
3	1.679	VV T	0.6121	7.18449e5	1.41570e4	0.00023
4	2.562	VV X	0.1020	1.62464e5	2.10520e4	5.156e-5
5	2.772	VV X	0.1416	1.92842e5	1.85005e4	6.120e-5
6	3.016	VB X	0.1712	3693.00854	359.43481	1.172e-6
7	3.943	PP	0.0818	1638.42480	330.67114	5.200e-7
8	5.376	BB	0.0379	827.12866	372.75937	2.625e-7
9	13.738	PB	0.0466	1945.86365	656.48175	6.175e-7
10	18.054	PP	0.1475	4276.41553	464.10074	1.357e-6

Totals : 3.15096e8 1.14695e8

Anexo 19 Cromatograma C3 día 4

