

**DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGANOFOSFORADOS
EN LECHE DE GANADO BOVINO Y SUELOS DE CULTIVO
PROVENIENTES DEL MUNICIPIO DE SAN BERNARDO DEL
VIENTO, CÓRDOBA, Y OBTENCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS
NATIVAS DEL SUELO CON CAPACIDAD DEGRADATIVA DE ESTE
TIPO DE CONTAMINANTES**

Trabajo presentado para optar al título de Master en Química

Luis Fernando Marín López

Noviembre de 2014



Universidad de Cartagena
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Posgrados

TESIS DE MAESTRÍA EN QUÍMICA

Determinación de contaminantes organofosforados en leche de ganado bovino y suelos de cultivo provenientes del municipio de San Bernardo del Viento, Córdoba, y obtención de cepas bacterianas nativas del suelo con capacidad degradativa de este tipo de contaminantes

Presentado por:

Luis Fernando Marín López
Químico

Como requisito para obtener el grado de:
Maestría en Química

Director de tesis:

Beatriz Jaramillo Colorado, Ph.D.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios todo poderoso por mantenerme fuerte en este arduo proceso académico, por guiarme por el camino correcto y permitirme llegar a esta instancia profesional.

Gracias a toda mi familia por su apoyo incondicional, principalmente a ANA MARIA LÓPEZ CAVADIA, por ser una madre excepcional y brindarme todo su amor; gracias a mi padre REMBERTO ESPITIA PACHECO, mis hermanas GISELA ESPITIA LÓPEZ, MARGARITA ESPITIA LÓPEZ y a mi segunda madre FANNY LÓPEZ CAVADIA por todos sus consejos y momentos felices.

Finalmente gracias a todas las personas que creyeron en mí e hicieron parte de esta etapa y colaboraron en la culminación exitosa de esta meta importante en vida, especialmente a YURANIS GENES NARVAEZ, ROBINSON MENDOZA GONZÁLEZ y a mi directora BEATRIZ JARAMILLO COLORADO.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	8
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Generalidades	12
2.2. Clasificación de los pesticidas.....	13
2.3. Pesticidas Organofosforados	16
2.4. Toxicidad de los pesticidas organofosforados.....	18
2.5. Métodos de detección de pesticidas organofosforados.....	20
2.6. Métodos de extracción de OPs	20
2.6.1. Extracción Soxhlet	21
2.6.2. Micro extracción en fase solida (SPME)	23
2.7. Cromatografía de gases (GC)	26
2.7.1. Fases estacionarias y columnas Cromatográficas.....	27
2.7.2. Detectores	28
2.8. Problemática generada por pesticidas	29
2.9. Biorremediación de OPs	32
3. METODOLOGÍA	37
3.1. Obtención de las muestras.....	37
3.1.1. Muestras de leche de ganado bovino	37
3.1.2. Muestras de suelo de cultivo	38
3.2. Preparación de las muestras y concentración de los OPs	38
3.2.1. Muestras de leche	38
3.2.2. Muestras de suelo de cultivo	39
3.3. Determinación cromatográfica	39
3.3.1. Determinación de patrones OPs por GC – FID.....	39
3.3.2. Exposición de la fibra PDMS – DVB.....	40
3.3.3. Condiciones Cromatográficas.....	41
3.4. Tratamiento de material microbiológico.....	41

3.4.1. Activación del metabolismo degradador de OPs en las cepas bacterianas.....	41
3.4.2. Preparación de medio mínimo M9 como matriz líquida	41
3.4.3. Aislamiento de bacterias nativas del suelo de cultivo	42
3.4.4. Purificación e identificación bioquímica de cepas aisladas [23].....	42
3.4.5. Sometimiento de bacterias identificadas a medios de cultivo selectivos para degradación de OPs.	43
3.4.6. Análisis estadístico de los datos	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
4.1. Determinación de OPs en muestras de suelo de cultivo y leche de ganado bovino	45
4.2. Validación de método de extracción de OPs por HS – SPME	49
4.2.1. Linealidad, precisión y exactitud	49
4.2.2. Determinación del tiempo de exposición de la fibra de PDMS/DVB por HS – SPME	51
4.3. Aislamiento, purificación e identificación de bacterias nativas del suelo de cultivo.....	52
4.4. Crecimiento de bacterias aisladas y verificación de su capacidad degradadora en presencia de OPs	56
5. CONCLUSIONES	63
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	64
ANEXOS	77
Anexo 1. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para Blanco día 1	78
Anexo 2. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para Blanco día 2	79
Anexo 3. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para Blanco día 3	80
Anexo 4. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para Blanco día 4	81
Anexo 5. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para Blanco día 5	82
Anexo 6. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para <i>Bacillus sp.</i> Día 1	83
Anexo 7. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para <i>Bacillus sp.</i> Día 2	84
Anexo 8. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para <i>Bacillus sp.</i> Día 3	85
Anexo 9. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para <i>Bacillus sp.</i> Día 4	86

Anexo 10. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para <i>Pantoea agglomerans</i> . Día 1	87
Anexo 11. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para <i>Pantoea agglomerans</i> . Día 2	88
Anexo 12. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para <i>Pantoea agglomerans</i> . Día 3	89
Anexo 13. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para <i>Pantoea agglomerans</i> . Día 4	90

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de pesticidas.	13
Tabla 2. Tipos de fibra y sus recubrimientos utilizados en SPME.....	25
Tabla 3. Patrones usados para identificar contaminantes del suelo evaluado (Linstrom & Mallard, 2011).	40
Tabla 4. Precisión del método analítico según desviación estándar relativa.....	50
Tabla 5. Resultados de exactitud para la validación del método.....	51
Tabla 6 Crecimiento bacteriano de cepas de estudio en presencia de OPs (Clorpirifos).....	57
Tabla 7. Análisis de Varianza para el porcentaje de reducción de Clorpirifos en cada tratamiento, incluido el blanco.	59
Tabla 8. Porcentaje de degradación de clorpirifos por parte de cepas bacterianas aisladas y Blanco	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula general de los pesticidas organofosforados (Carmona & Carmona, 2005). Donde: R: Radical orgánico.....	17
Figura 2. Características de los OXONES y TIONES).....	18
Figura 3. Mecanismo de acción de los OPs (Carmona & Carmona 2005),.....	19
Figura 4. Extracción soxhlet).....	22
Figura 5. Dispositivo de Micro extracción en fase solida.....	24
Figura 6. Tipos de degradación bacteriana (Napoles & Abalos 2010)	34
Figura 7. Hidrolisis de Etil paratión catalizado por la enzima Fosfotriesterasa.....	35
Figura 8. Ciclo de biorremediación bacteriana.....	36
Figura 9. Diagrama de toma de muestras de suelos de cultivo.....	38
Figura 10. Curva de calibración de Demeton – S – Metilsulfón.....	45
Figura 11. Cromatograma de suelo de cultivo, presencia de Demeton – S – Metilsulfon 272,9 ppm	46
Figura 12. Cromatograma de suelo de cultivo, presencia de Demeton – S – Metilsulfon 1793,3 ppm.	46
Figura 13. Cromatograma de leche de ganado bovino por HS – SPME en el día cero (0) de pastoreo.....	48
Figura 14. Cromatograma de OPs determinado (Demeton – S – Metilsulfon) en leche de ganado bovino por HS – SPME en el día cinco (5) de pastoreo.....	48
Figura 15. Gráfico de Linealidad Demeton – S – Metilsulfon.....	49
Figura 16. Tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB en el espacio de cabeza (HS).....	52
Figura 17. Cepas aisladas en suelos de cultivo.....	52
Figura 18. Tinción de Gram en objetivo de inmersión 100x de Cepa 1 aislada.....	53
Figura 19. Tinción de Gram en objetivo de inmersión 100x de Cepa 2 aislada.....	53
Figura 20. Prueba de Agar sangre (Gamma hemolisis) – Oxidasa (-) para cepa 1.	54
Figura 21. Prueba de catalasa (+) positiva para cepa 1	54
Figura 22. Prueba de Agar sangre (Gamma hemolisis) – Oxidasa (-) para cepa 2.	55
Figura 23. Prueba de catalasa (+) positiva para cepa 2.....	55
Figura 24. Identificación bioquímica de cepa 1.....	56
Figura 25. Crecimiento bacteriano de cepas de estudio en presencia de OPs (Clorpirifos).....	57
Figura 26. Curva de calibración para Clorpirifos.....	58
Figura 27. Porcentajes de reducción de OPs (Clorpirifos) por parte de las cepas de estudio.....	59
Figura 28. Capacidad degradadora de cepas bacterianas.....	61

ABREVIATURAS

V/V	Porcentaje volumen volumen
μL	Microlitro (s)
AcHE	Acetilcolinesterasa
AED	Detector de emisión atómica
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
CG	Cromatografía de Gases
CG/EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CG-FID	Cromatografía de Gases con Detector de Ionización en Llama
cm	Centímetro (s)
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
ECD	Detector de Captura de Electrones
FID	Detector de Ionización de Llama
FTIR	Transformada de Fourier

HPLC	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
g	Gramo (s)
L	Litro (s)
mL	Mililitro (s)
Min	Minuto (s)
Nº	Numero
NPD	Detector Nitrógeno Fosforo
OPs	Pesticidas Organofosforados
SCD	Detector Para Compuestos de Azufre
SCOT	Columna Abierta Recubierta con Soporte
TCD	Detector de Conductividad Térmica
Vol.	Volumen
WCOT	Columna Abierta de Pared Recubierta

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 40 años se ha producido un drástico cambio en las prácticas agropecuarias, de tal modo que los compuestos organofosforados (OPs) han reemplazado ampliamente a los compuestos organoclorados (OCs) (Eddleton et al. 2012, Martínez et al. 2009).

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).

Los OPs constituyen una clase de pesticidas que son ampliamente utilizados en estas prácticas para combatir un alto número de plagas como insectos, hongos y malezas que afectan a variedades de cultivos y animales (Rodríguez et al. 2011, Matthaios et al. 2012, Fernández et al. 2008, Ortiz et al. 2014). Los compuestos organofosforados constituyen un grupo heterogéneo con estructuras químicas derivadas del ácido fosfórico, específicamente son ésteres de este ácido, dentro de sus principales propiedades fisicoquímicas encontramos que son mayormente liposolubles y medianamente volátiles (Heno 2014), lo que le permite a este grupo de plaguicidas presentar altos niveles de toxicidad y bioacumulación en las cadenas tróficas, por lo que a nivel mundial se han realizado estudios exhaustivos de sus propiedades tóxicas y capacidad de afección en los seres vivos que no son su objetivo, ya sea de manera directa en los animales, tales como el ganado, para el control de plagas y de forma indirecta para el hombre por medio del consumo de alimentos que han sido tratados por estos compuestos de tipo OPs (Eddleton et al. 2012, Menezes et al. 2010, Cycon et al. 2009).

En Colombia, el municipio de San Bernardo Del Viento por estar ubicado en el departamento de Córdoba, en una zona de trópico bajo y según el ministerio de agricultura, protección social y de ambiente, es apta para el ejercicio de actividades agropecuarias, por lo tanto, no está exento al uso de este tipo de compuestos (OPs), este municipio comprende una extensa zona, propicia para el desarrollo de las actividades agropecuarias tales como la ganadería y cultivo, de los que resaltan el arroz, maíz, ñame, yuca, plátano y coco. Pero en su mayoría presenta un grado bajo de tecnificación y una mano de obra no calificada, los campesinos del sector realizan sus actividades de manera artesanal, principalmente al momento de controlar todo tipo de plagas mediante el uso de pesticidas sin la supervisión de personas expertas, bajo criterio propio, lo que estaría generando un desequilibrio ambiental y de salud pública por el uso de estos compuestos, ya que debido al uso indiscriminado e irresponsable de los OPs en la agroindustria (Arbeli, 2009), existe un alto índice de intoxicaciones agudas caracterizadas por el desarrollo del síndrome colinérgico y múltiples complicaciones crónicas. Este problema de salud pública ha matado al menos 400.000 personas anualmente a nivel mundial (Eddleston, 2004; Eddleston, et al., 2012).

Aunque el gobierno Colombiano ha establecido normas de control al uso de éstas sustancias químicas por medio del decreto 1843 de 1991 (Cárdenas et al., 2005) y han sido desarrolladas actividades y estudios, relacionando algunos compuestos Organofosforados con los efectos producidos en la salud (Mavdt, 2007), hasta la fecha persisten los problemas. Un caso relevante y notorio ocurrió en la región del Copey en el César desde la bonanza algodonera en la década de los ochenta, donde se usaron desmedidamente plaguicidas como Metil Paration y Toxafeno (Bustamante, 2010) dichos químicos fueron prohibidos en 1990 y 1991 respectivamente; el primero debido a su alta toxicidad por inhalación e ingestión y modestamente toxico por absorción dérmica (UNEP,2000); el segundo por su alta persistencia, bioacumulación y cancerogénesis humana (Decreto 305 de 1988, Ministerio de Salud). La problemática regional (Copey, Cesar) se agrava aún más

con la existencia de casos en los cuales se presentan enfermedades congénitas y proliferación de tumores, lo que ha llevado a la población a solicitar una solución urgente al problema de contaminación por plaguicidas. Según las autoridades ambientales que han realizado estudios del impacto generado, este problema crea además de alteraciones en la salud, un gasto económico enorme para la recuperación tanto del terreno como de la salud de los afectados, llegando a más de trescientos setenta millones de pesos (Bustamante, 2010).

Las características de estos compuestos han permitido que se utilicen diversos métodos para su extracción en las diferentes matrices existentes, los cuales hoy en día unos se caracterizan por sus eficientes resultados debido al permanente contacto con la muestra como las extracciones Soxhlet (Zygler 2012) y otros por el bajo consumo de solventes y disminución de tiempo. La Micro extracción en fase sólida en el espacio de cabeza (HS-SPME) constituye un método eficaz de extracción ya que reduce los costos de solvente, tiempo y es aplicable a todo tipo de muestras (Ruiz et al. 2012), además ha mostrado excelentes resultados en la extracción de pesticidas en todas las matrices (Fernandez et al. 2008, Bonansea 2012, Kin 2009, Schummer 2012).

En vista del fuerte impacto que causan los OPs 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; Cychón, et al., 2009).

Esta rama de la biotecnología ha mostrado grandes resultados en países como México y en nuestro país es una herramienta útil para la eliminación de Hidrocarburos en diferentes matrices, reduciendo de esta manera el impacto ambiental generado por este tipo de compuestos (Vargas et al. 2004), por tal motivo en la presente investigación se ha determinado cuáles son los OPs que se

encuentran en los suelos de cultivo del municipio de San Bernardo Del Viento y en la leche de ganado bovino para mostrar la dinámica de estos compuestos ya que este producto lácteo termina siendo ingerido por los habitantes pudiendo ocasionar intoxicaciones a causa de este tipo de sustancias, además se aislaron bacterias nativas de estos suelos con capacidad degradadora de OPs como una alternativa para la investigación local y nacional en la mejora de suelos contaminados por esta clase de compuestos.

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). La mayoría de los alimentos de origen vegetal se cultivan utilizando pesticidas para el control de malezas, insectos y otras plagas para así mejorar la productividad y obtener beneficios económicos (Tsiplakou et al. 2010), además estas sustancias son de gran importancia para la erradicación de ciertas plagas de importancia epidemiológica y forman parte esencial para los programas de salud pública (Yu, 2002; Varona, et al., 2007; Zacharia, 2010).

Sin embargo estos beneficios no están exentos de riesgos para la salud humana y del daño ambiental, ya que estas sustancias pueden causar la degradación de los ecosistemas receptores de los pesticidas, ya que por lo general son capaces de dañar a todas las formas de vida que se encuentre alrededor de las plagas, pero a pesar que algunos pesticidas se describen ser selectivos en su modo de acción, su rango de selectividad solo se limita a la prueba de animales (Zacharia, 2010), a su vez sus residuos son conocidos como contribuyentes de varias enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiacas y otras enfermedades atribuidas al sistema nervioso como Alzheimer y Parkinson (Carmona & Carmona 2005, Hudson 2006, Tsiplakou et al. 2010).

2.2. Clasificación de los pesticidas

Los pesticidas han sido clasificados en una gran variedad de grupos los cuales atienden diversos aspectos, donde la forma de clasificarlos depende principalmente de los siguientes:

- ✚ Según destino de aplicación
- ✚ Según su acción específica
- ✚ Según su estado de presentación
- ✚ Según su constitución química
- ✚ Según su peligrosidad para las personas

En la tabla 1 se describe la clasificación de los pesticidas teniendo en cuenta cada uno de los aspectos anteriormente mencionados (Baird, 2001; Carmona & Carmona, 2005; Hudson, 2006).

Tabla 1. Clasificación de pesticidas.

CLASIFICACIÓN	TIPOS	DESCRIPCIÓN	EJEMPLO
SEGÚN DESTINO DE APLICACIÓN	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

Tabla 1. Clasificación de pesticidas.

CLASIFICACIÓN	TIPOS	DESCRIPCIÓN	EJEMPLO
	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
	Insecticida	Contra insectos	Clorpirifós
	Acaricida	Contra ácaros	Triazofos
	Fungicida	Contra hongos	Pentaclorofenol
SEGÚN SU ACCIÓN ESPECÍFICA	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
SEGÚN EL ESTADO DE PRESENTACIÓN	Gases o gases licuados	Partículas muy diminutas	Glifosato
	Fumigantes y aerosoles	Partículas diminutas líquidas	Piretroides
	Polvos <50µm	Partículas muy diminutas	Paraquat

Tabla 1. Clasificación de pesticidas.

CLASIFICACIÓN	TIPOS	DESCRIPCIÓN	EJEMPLO
SEGÚN SU CONSTITUCIÓN QUÍMICA	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 ₂ 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	Demetón
	Organometálicos	Enlaces covalentes (compartimiento de e ⁻) 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	

Tabla 1. Clasificación de pesticidas.

CLASIFICACIÓN	TIPOS	DESCRIPCIÓN	EJEMPLO
SEGÚN PELIGROSIDAD PARA LAS PERSONAS	Triazinas	Anillo heterocíclico, análogo al anillo de benceno pero con tres átomos de carbono reemplazados por átomos de nitrógeno.	Diazina
	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 pesticidas organofosforados (OPs) son sustancias químicas derivadas del ácido fosfórico, generalmente liposolubles y semivolátiles, bajo esta denominación se encuentran una gran variedad de compuestos que son utilizados para el control de diferentes plagas que dependiendo de la sustitución de sus radicales en la

formula básica pueden dar origen a nuevos grupos de compuestos con capacidad de penetración, distribución, y activación en su sitio de ataque, así como también en su potencia y selectividad (Emerson et al. 1999).

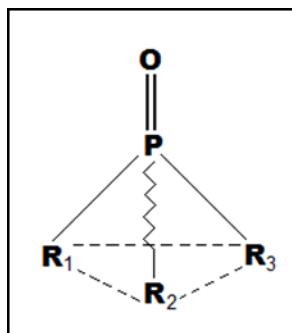


Figura 1. Fórmula general de los pesticidas organofosforados (Carmona & Carmona, 2005). Dónde: R: Radical orgánico.

La liposolubilidad de estos compuestos facilita su absorción porque atraviesan las barreras biológicas (piel, mucosas), también penetran el sistema nervioso central y algunos pueden almacenarse en los tejidos provocando toxicidad retardada debido a la liberación tardía, su mediana presión de vapor permite que sean semivolátiles y que puedan ser absorbidos por vías respiratorias, sufren hidrólisis alcalina en la tierra y en líquidos biológicos, no siendo persistentes en el ambiente (Carmona & Carmona 2005).

Todas estas propiedades antes mencionadas están ligadas al átomo que se une al fósforo por el doble enlace, cuando el átomo unido al fósforo es el oxígeno estos compuestos se denominan OXONES, mientras que si es el azufre son llamados TIONES

(http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/milla_c_o/generalidades.pdf)

En la **figura 2** se muestran las diferencias entre estos dos grupos de compuestos:

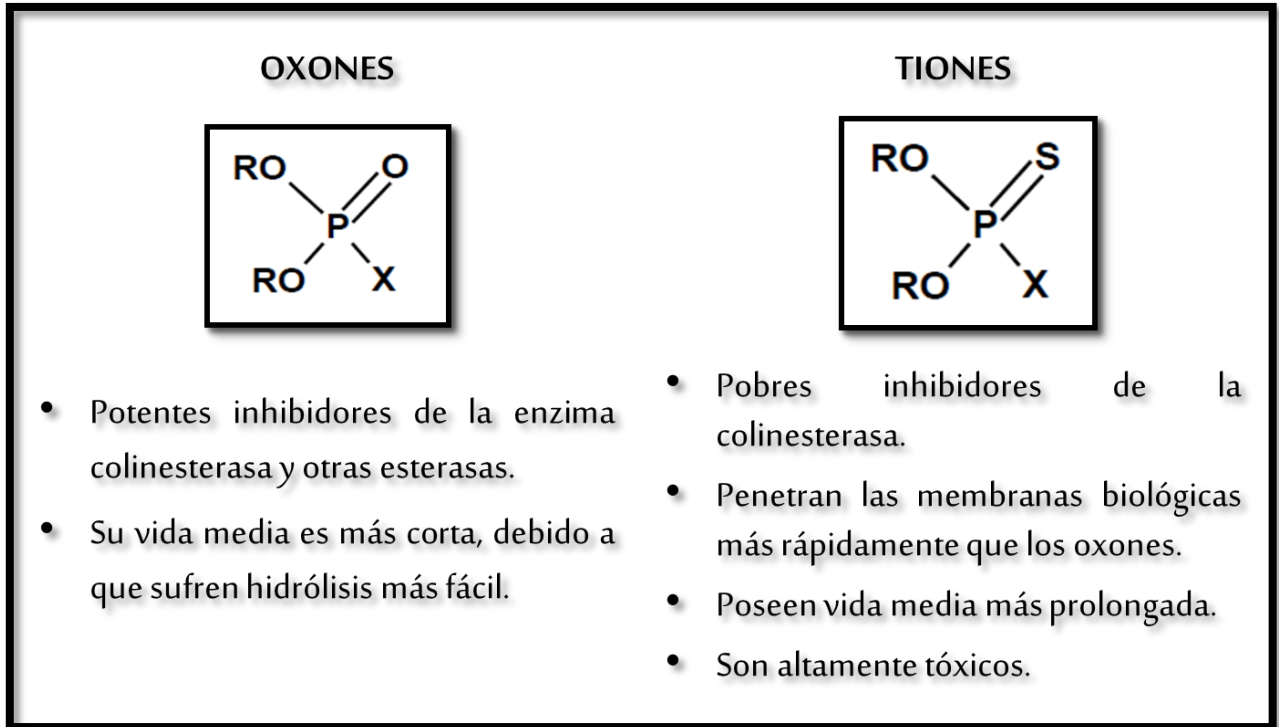


Figura 2. Características de los OXONES y TIONES.

En la actualidad los Organofosforados son la clase de pesticidas más utilizados alrededor de todo el mundo para el control de plagas, tanto en entornos residenciales como agrícolas (Lacasaña, 2010). También son utilizados por la industria como disolventes, plastificante, retardantes de llama y aditivos de extrema presión (por ejemplo lubricantes) e incluso por los militares como agentes nerviosos (Mackenzie, 2010).

2.4. Toxicidad de los pesticidas organofosforados

Los OPs una vez que ingresan en el organismo poseen una vida media corta y son metabolizados por una serie de enzimas (esterasas, transferasas, etc.) fundamentalmente en el hígado, sufriendo una serie de transformaciones químicas, las cuales tienden a aumentar su hidrosolubilidad facilitando su excreción, la cual se da a nivel renal. Los organofosforados desarrollan su toxicidad a través de la fosforilación de la enzima Acetilcolinesterasa (AChEasa)

en las terminaciones nerviosas; los OPs reaccionan con la zona esterasica de la enzima formando una unión estable que si no se rompe mediante tratamiento, se hace irreversible, quedando la enzima inhabilitada para ejercer su función normal. La pérdida de dicha función permite la acumulación de la Acetilcolina (ACh) en las uniones colinérgicas neuroefectoras (efectos muscarinicos), en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos (efectos nicotínicos) y en el sistema nervioso central (SNC) (Carmona & Carmona, 2005; Carson & Harris, 2008, Fernández et al. 2010)

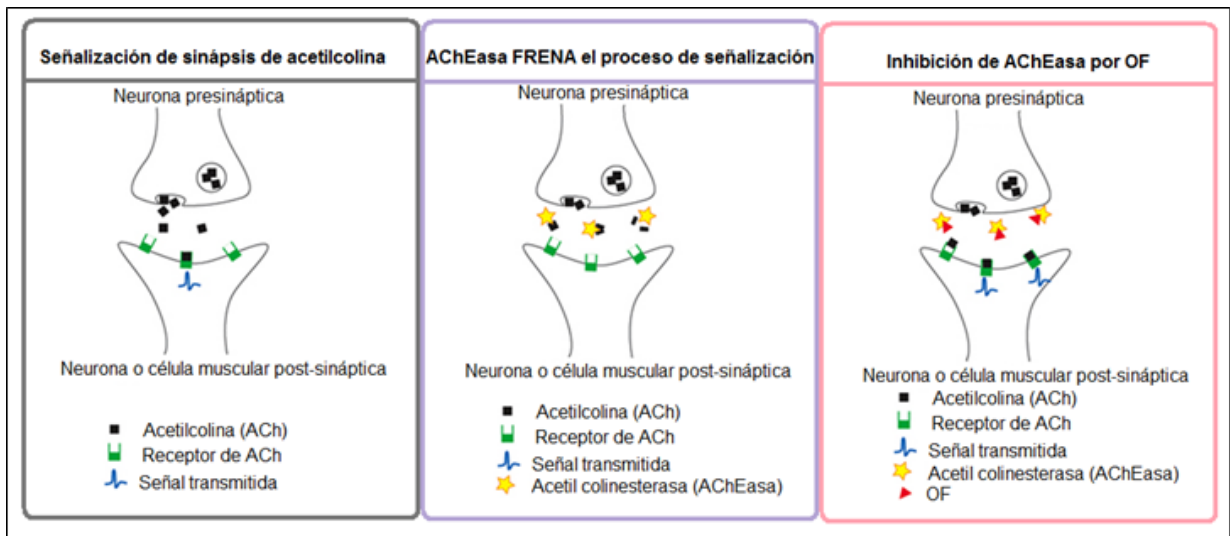


Figura 3. Mecanismo de acción de los OPs (Carmona & Carmona 2005)

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor que interacciona con dos tipos de receptores postsinápticos (nicotínicos y muscarínicos) y es el responsable de la transmisión fisiológica del impulso nervioso de:

- ⚡ Las fibras colinérgicas postganglionares simpáticas y parasimpáticas a las células efectoras (receptores muscarínicos).
- ⚡ Las neuronas preganglionares a las postganglionares en los sistemas parasimpáticos y simpáticos (receptores nicotínicos)
- ⚡ Los nervios motores al músculo esquelético (receptores nicotínicos)
- ⚡ Algunas terminaciones nerviosas en el SNC

Una vez liberada y ha interactuado con su receptor, la Acetilcolina es destruida mediante la acción de la AChEasa la cual reacciona con el neurotransmisor hidrolizándolo y produciendo Colina y Ácido acético que entran al pool metabólico pre sináptico para volver a ser utilizados (Fernandez et al 2010).

2.5. Métodos de detección de pesticidas organofosforados

Para la determinación cualitativa y cuantitativa de residuos de pesticidas organofosforados en cualquier matriz, las técnicas utilizadas son variadas, las cuales permiten la detección de los diferentes tipos de moléculas basándose en las características fisicoquímicas de las mismas, dentro de este grupo podemos encontrar las más utilizadas (Shaoquin 2008, Stoytcheva, et al., 2009; De Souza & de Andrade, 2009; Rodríguez, et al., 2011; Zhen, et al., 2012):

- ✚ Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)
- ✚ Cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID)
- ✚ Cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD)
- ✚ Cromatografía de gases con detector de Nitrógeno y Fosforo (GC-NPD)
- ✚ Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)
- ✚ Biosensores híbridos electroquímicos
- ✚ Inhibición enzimática

Todas estas técnicas, deben ser acompañadas de metodologías de extracción y preparación de muestras para asegurar la confiabilidad de los resultados esperados.

2.6. Métodos de extracción de OPs

Los contaminantes orgánicos como los OPs suelen estar presentes en las diferentes matrices ambientales en niveles trazas por lo que no es posible determinar sus concentraciones directamente mediante las medidas instrumentales y se hace necesario utilizar métodos de pre concentración como

etapa previa para la determinación de estos compuestos. Las metodologías más utilizadas son la extracción soxhlet, extracción líquido – líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), micro extracción en fase sólida (SPME), extracción con fluido supercrítico (SFE) (Hawthorne et al. 2000).

En la práctica la selección del método depende de varios factores por lo que se hace necesario que el analista conozca los principios, procedimientos experimentales, ventajas y desventajas de todos los métodos conocidos con el objetivo de seleccionar aquel o aquellos más adecuados para la matriz específica bajo estudio para evitar que los resultados obtenidos conduzcan a conclusiones erróneas.

2.6.1. Extracción Soxhlet

Este tipo de extracción se realiza a matrices no fluidas, utilizando como principio la existencia de un coeficiente de distribución favorable a los analitos entre el agente extractante y la matriz.

Generalmente la extracción soxhlet se realiza colocando la muestra en un dedal titular el cual es llenado durante la operación de condensados con solvente (Figura 4). 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).

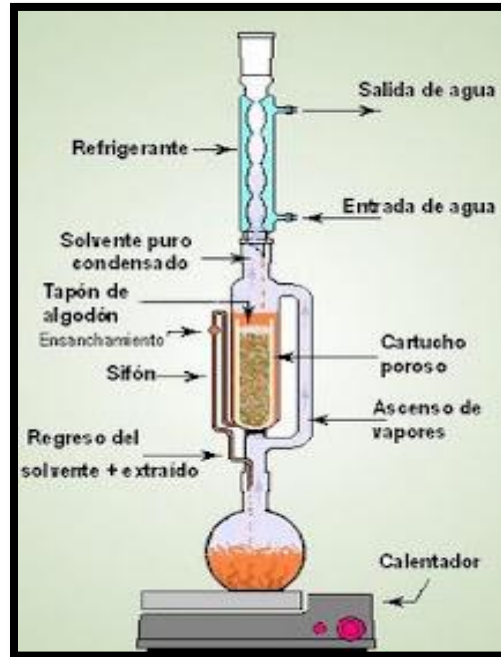


Figura 4. Extracción soxhlet. Fuente: <http://procesosbio.wikispaces.com/Extraccion+solido-liquido> (2014).

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).

2.6.2. Micro extracción en fase sólida (SPME)

La SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico. Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a las técnicas de pre concentración mencionadas anteriormente ya que es muy simple, presenta un bajo coste, puede ser automatizada, requiere pequeños volúmenes de muestra y generalmente no precisa del uso de disolventes orgánicos para llevar a cabo la pre concentración, a diferencia de la LLE y la extracción soxhlet. Además, debido a su diseño, es fácilmente transportable por lo que la hace una técnica muy adecuada para realizar análisis de campo. Otra ventaja que presenta es la posibilidad de utilizarse con todos los tipos de muestras, ya sean gaseosas como por ejemplo aire o aliento, líquidas como aguas o bebidas, o sólidas como sedimentos, alimentos, etc. Además, se puede aplicar a la determinación de compuestos de diferente volatilidad (Jaramillo 2009).

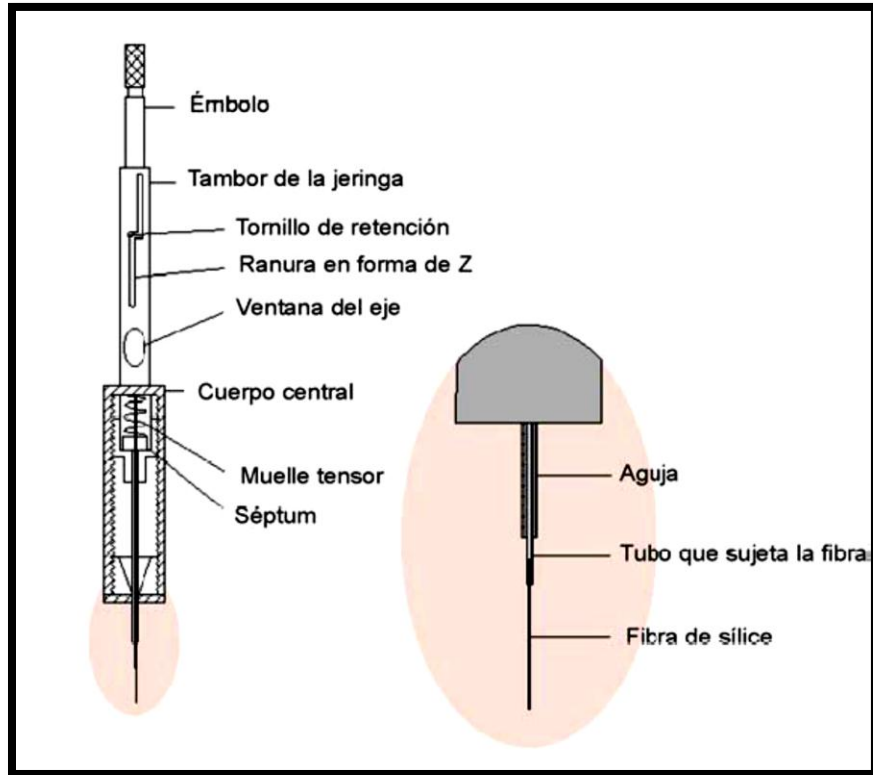


Figura 5. Dispositivo de Micro extracción en fase solida

El principio en el que se basa la SPME generalmente es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de fibra. Así, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra, la cual posee diferente polaridad dependiendo al polímero usado como fase sólida y al grosor del mismo. Existen básicamente dos modos de extracción posibles en SPME, introduciendo la fibra directamente en la muestra o bien en el espacio de cabeza o headspace (Jaramillo 2009).

En el proceso de SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas. Una primera etapa de extracción en la que la fibra recubierta del sorbente se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y temperatura determinadas, de manera que se produce una migración de los analitos desde la solución a la fibra hasta que se alcanza la situación de equilibrio, cabe resaltar que esta inmersión

de la fibra se puede realizar mediante contacto directo con la muestra o en el espacio de cabeza (headspace). Después de esta primera etapa el paso siguiente consiste en la desorción de los analitos retenidos en la fibra, la cual sería térmicamente si la determinación de estos analitos será efectuada por cromatografía de gases (Jaramillo 2009).

En la Tabla 2 se muestran las diferentes fibras utilizadas con los diferentes recubrimientos utilizados para SPME, donde el uso de estas fibras está ligado a las características de los analitos (OPs para este caso) a determinar.

Tabla 2. Tipos de fibra y sus recubrimientos utilizados en SPME

FASE ESTACIONARIA/ESPESOR	TEMP MAX DE USO (°C)	POLARIDAD	USO RECOMENDADO
Polidimetilsiloxano (PDMS)			
100 µm-fase no enlazada	280	No polar	GC/HPLC
30 µm-fase no enlazada	280	No polar	GC/HPLC
7 µm fase enlazada	340	No polar	GC/HPLC
Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS_DVB)			
65 µm-fase parcialmente entrecruzada	270	Bipolar	GC
60 µm-fase parcialmente entrecruzada	270	Bipolar	HPLC
65 µm-fase muy entrecruzada	270	Bipolar	GC
Poliacrilato (PA)			

85 μm -fase parcialmente entrecruzada	320	Polar	GC/HPLC
Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)			
75 μm -fase parcialmente entrecruzada	320	Bipolar	GC
85 μm -fase muy entrecruzada	320	Bipolar	GC
Carbowax/Divinilbenceno (CW/DVB)			
65 μm -fase parcialmente entrecruzada	265	Polar	GC
70 μm -fase muy entrecruzada	265	Polar	GC
Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS)			
50/30 μm -fase muy entrecruzada	270	Bipolar	GC

2.7. Cromatografía de gases (GC)

Es de suma importancia decir que entre las diversas técnicas de separación de mezclas, la más utilizada por su capacidad para separar mezclas complejas de una manera eficaz es la cromatografía. Este proceso consiste en una muestra que se desplaza a través 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. Las interacciones 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 (Skoog, 2011).

Tras haber pasado por la columna cromatografía los compuestos según el tiempo de interacción, van llegando al detector (alta sensibilidad) el cual responde a la concentración del soluto y registra su señal en función del tiempo, formando una especie de grafico llamado cromatograma, este último permite hacer análisis cualitativos y cuantitativos sobre 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 plaguicidas debido a su capacidad alta de resolución y la disponibilidad de detectores bastante selectivos. En la práctica de laboratorio demuestra 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. (Skoog, 2011).

2.7.1. Fases estacionarias y columnas Cromatográficas

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 y poca reactividad frente a componentes de la muestra (Skoog, 2011).

2.7.2. 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, ya que de acuerdo a sus características van a tener un mejor desempeño en el proceso. En el momento de escoger un detector eficiente, este debe presentar una adecuada sensibilidad, buena estabilidad, reproducibilidad, tiempo de respuesta lo más corto posible, alta fiabilidad, manejo sencillo e 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. Entre los detectores usados por la cromatografía de gases encontramos el de Ionización en llama (FID), Captura de electrones (ECD), Emisión atómica (AED), conductividad térmica (TCD) y detector de quimioluminiscencia (SCD) especial para compuestos azufrados. (Guerrero, 2010).

El detector FID es el más extensamente utilizado debido a que presenta una alta sensibilidad frente a un amplio rango de compuestos y más exótico lo hace el hecho de ser insensible al agua. 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 los cuales han ocasionado gran satisfacción (Skoog, 2011).

2.8. Problemática generada por pesticidas

Los pesticidas son usados ampliamente en frutas y verduras debido a su susceptibilidad a plagas y ataques de enfermedades. Por lo tanto los residuos de estas sustancias afectan a los consumidores finales, especialmente cuando estos productos son consumidos frescos (Zawiyah, 2007).

El uso de pesticidas en la agricultura y la salud pública ha generado una contribución significativa a la producción mundial de alimentos y el bienestar humano, aumentando los rendimientos de los cultivos enormemente, por lo que este hecho hace que los pesticidas formen parte integral y esencial de la agricultura y diferentes programas de salud pública (Zacharia, 2010).

El uso de los pesticidas en la agricultura ocasiona su liberación al medio ambiente, hecho que genera contaminación tanto por los productos básicos como por los metabolitos secundarios que en muchas ocasiones son igualmente tóxicos. Esta exposición ambiental está presente en diversas matrices entre las cuales resalta el agua, matrices biológicas 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 fauna, flora y 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).

Latinoamérica se caracteriza por tener muchos países en vía de desarrollo y normas flexibles o nulas frente al uso de éste 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 OPs y aumento 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).

Los reportes de la organización mundial de la salud (OMS) muestran que anualmente a nivel mundial, hay un millón de intoxicaciones aproximadamente

ocasionadas por insecticidas, de las cuales 200,000 terminan en la muerte. A pesar de que en Colombia las intoxicaciones generadas por pesticidas representan un importante problema de salud pública debido de los múltiples usos de estos en los diferentes campos, especialmente en el agrícola, las estadísticas sobre las intoxicaciones por OPs son muy bajas debido a un marcado subregistro en la notificación de las intoxicaciones causadas por estos compuestos. En las últimas décadas en el país se han presentado eventos masivos por intoxicación de OPs: En 1967 en Chiquinquirá se intoxicaron 500 personas con Metilparation de las cuales murieron 63, en Puerto López cerca de 190 personas se intoxicaron con un pesticida no identificado, donde 7 personas fallecieron y en Pasto en 1977 alrededor de 300 personas resultaron intoxicadas por Paration causando la muerte a 15 de ellas (Fernandez et al. 2010)

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).

2.9. Biorremediación de OPs

Es una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el uso de microorganismos capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrios en el medio ambiente tales como: Hidrocarburos, PCB's, Metales pesados, pesticidas, entre otros (Tirado & Vasquez 2005). 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 aerobio o anaerobio 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).

El proceso de degradación se lleva a cabo mediante el aprovechamiento de las características de los microorganismos a utilizar:

- ✚ Tamaño
- ✚ Distribución
- ✚ Versatilidad enzimática
- ✚ Especificidad
- ✚ Tasa de crecimiento

La biorremediación bacteriana ha sido estudiada desde hace más de tres décadas, obteniendo una buena acogida puesto que fue verificada la eficiencia de los microorganismos para depurar diversas matrices contaminadas por diferentes sustancias dentro de las cuales se encuentran los OPs (Oshiro, et al., 1996; Weber, 1994). Muchos han sido los estudios relacionados con estos compuestos y muchos han sido los resultados favorables, los comienzos pueden remitirse a los años noventa donde estudiaron el rol de los microorganismos eucarióticos (levaduras) y procarióticos (bacterias) de un sedimento costero relativo a la

biotransformación del fenantreno (Mac Gillvray & Shiaris 1994). Los estudios siguieron mostrando que bacterias como el *Arthrobacter sp.* Fueron aisladas de suelos contaminados por OPs entre los cuales están diazinon, paration, fenitroion, clorpirifos produciendo degradación de los mismos en tasas que variaron de acuerdo a las condiciones de crecimiento del microorganismo (Oshiro et al. 1996).

Kim y colaboradores (2002) investigan la degradación de Coumafos mediante una cepa de *Escherichia coli*; Cycón y colaboradores (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 OPs presente en medios de cultivo altamente selectivos. Estos resultados sugieren que las cepas bacterianas aisladas pueden tener potencial para la degradación de suelos contaminados con OPs.

En el contexto nacional se encontraron grupos bacterianos resistentes a los OPs, los cuales fueron capaces de degradar metilparation y clorpirifos en suelos altamente contaminados en la ciudad de Medellín, dentro del consorcio bacteriano se lograron identificar cepas como *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).

De manera sucinta son muchos los trabajos relacionados con la degradación bacteriana por lo que se han encontrado diferentes grupos de bacterias capaces de degradar pesticidas con muy buenos resultados, donde el porcentaje de degradación de estos compuestos llegan casi al 90% de la concentración establecida (Phugare et al. 2012, Rani & Juwarkar 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. El fundamento bioquímico se basa en que en la cadena respiratoria o transportadora de electrones de las células, se van a producir una serie de reacciones de oxidación - reducción cuyo fin es la obtención de energía (Napoles & Abalos 2010):

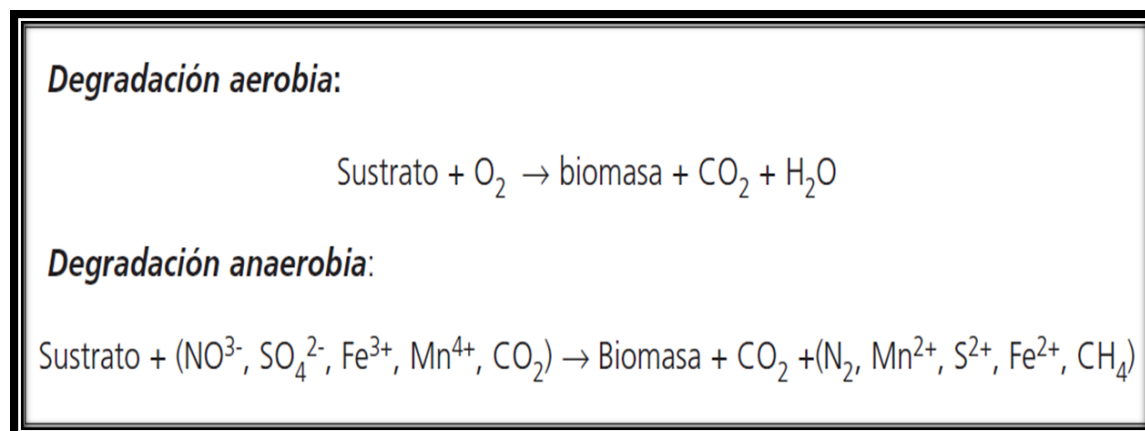


Figura 6. Tipos de degradación bacteriana (Napoles & Abalos 2010)

Algunas investigaciones han mostrado los suelos contaminados por OPs podrían ser descontaminados de una manera eficiente con la utilización de microorganismos específicamente adaptados. La detoxificación enzimática de OPs por parte de ciertas 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) (Sharaf et al. 2006)

Las bacterias tanto para la degradación de pesticidas OF como para cualquier otra sustancia utilizan enzimas especializadas. La enzima utilizada en la hidrólisis bacteriana para degradar OF es conocida como fosfotriesterasa. La misma es muy importante porque su actividad puede influir significativamente en los procesos biotecnológicos de biorremediación (Jokanovic, 2001). La Figura 7 muestra un ejemplo de la reacción llevada por esta enzima.

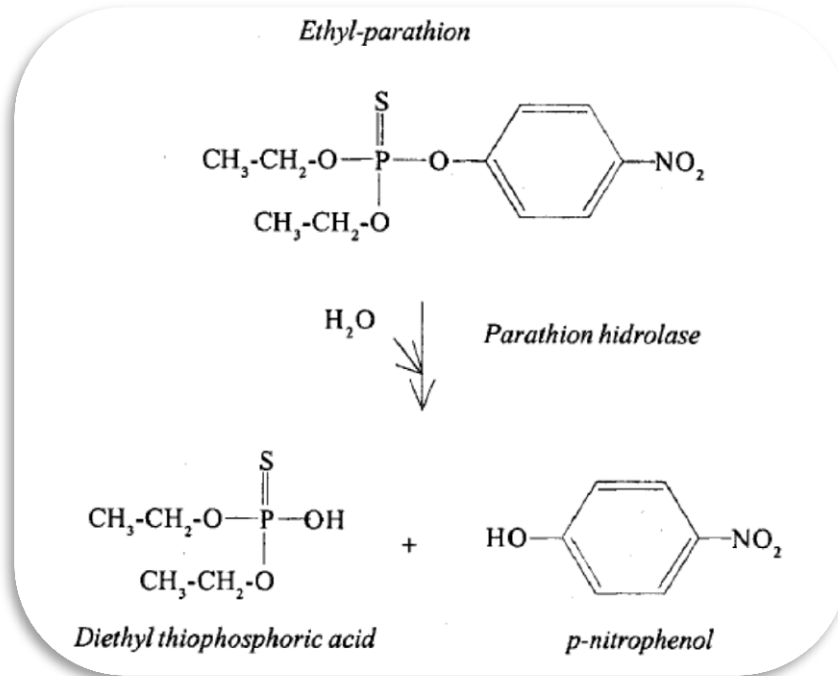


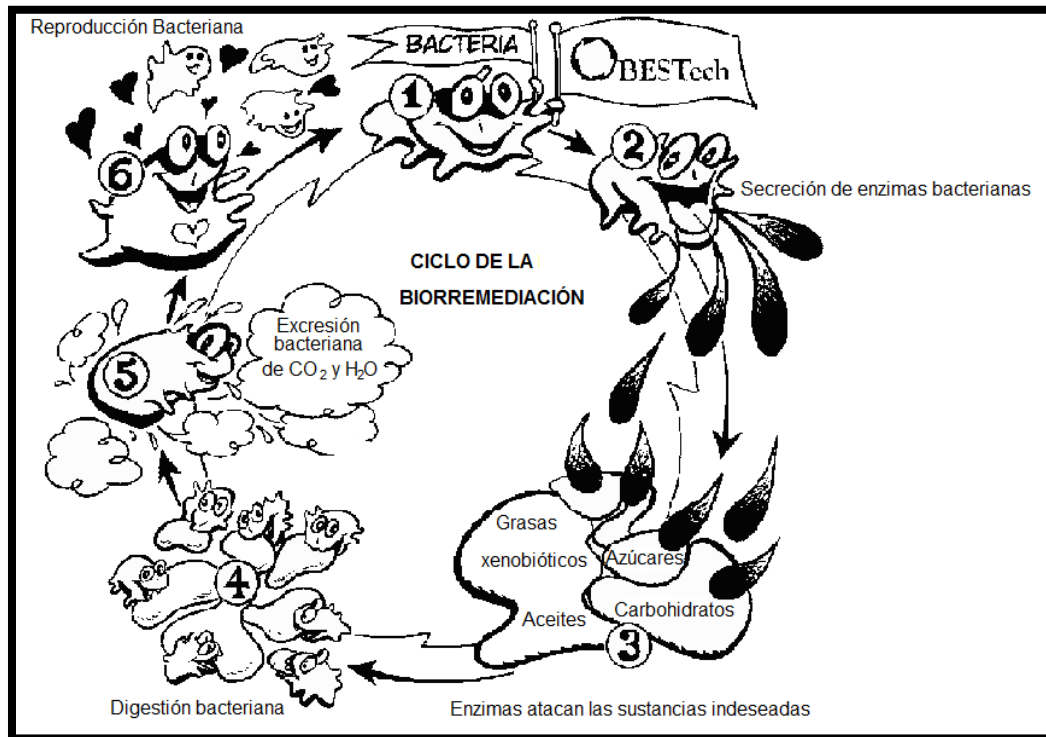
Figura 7. Hidrolisis de Etil paratión catalizado por la enzima Fosfotriesterasa

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, diester fosfórico hidrolasas y triester fosfórico hidrolasas. Estas últimas se dividen en dos subgrupos similares: arildialquilfosfatasas y diisopropilfluofosfatasas. Las primeras toman parte en la hidrólisis de dialkilfosfatos, cuya reacción produce dialkilfosfato 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).

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). La base de la biodegradación esta sintetizada de manera sencilla en la Figura 8 (Anon 2012):



Por lo anterior 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 OPs. Para garantizar la confiabilidad en la identificación bacteriana hay métodos bioquímicos comprobados, entre los cuales sobresale el BBL Crystal©. El mismo está 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 inicia por medio de 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, además estas especies pueden ser identificadas por sus características morfológicas y microscópicas mediante una batería bioquímica específica (Moll, et al., 1996, Forbes et al 2009).

3. METODOLOGÍA

3.1. Obtención de las muestras

3.1.1. Muestras de leche de ganado bovino

Diariamente todas las mañanas se tomaron 50 mL – 100 mL de leche de un grupo de vacas en ordeño por un periodo de 5 días. Las muestras fueron almacenadas en un frasco colector y guardadas en un congelador inmediatamente para análisis posterior (Rodriguez et al. 2011).

3.1.2. Muestras de suelo de cultivo

La toma de muestra fue realizada de acuerdo a lo descrito por (Brady y Weil, 1999) y (Blanco, 2003): tomar 2 muestras M1 y M2, cada una de 13 submuestras (ICA, 1992). Las submuestras fueron recogidas en zigzag, a una profundidad de 0-20cm y una masa aproximada de 200 – 300 gramos, se mezclaron, se almacenaron en cartuchos de aluminio e introducidas en un congelador hasta previo análisis. (Vargas 2014, Brady y Weil 1999).

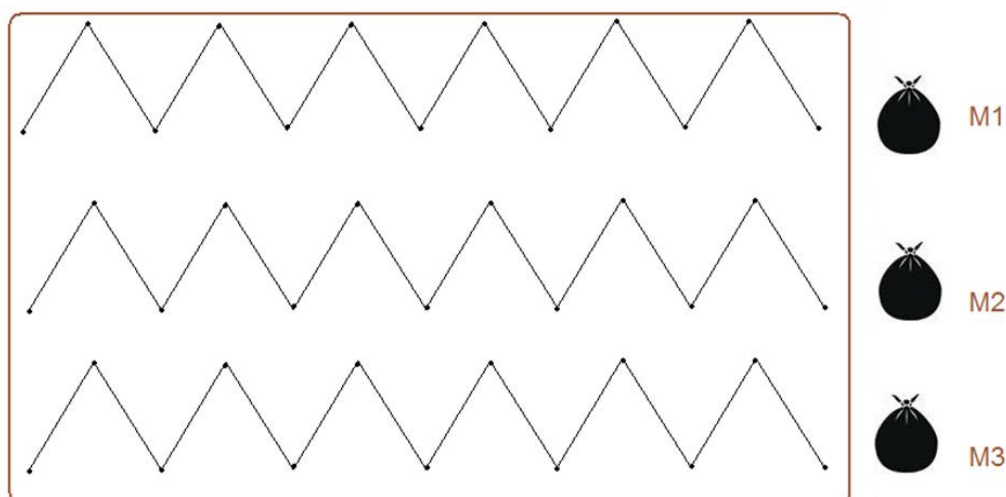


Figura 9. Diagrama de toma de muestras de suelos de cultivo

3.2. Preparación de las muestras y concentración de los OPs

3.2.1. Muestras de leche

las muestras de leche fueron descongeladas y se tomaron 12 mL y depositadas en un vial de vidrio, se agregó agua ultra pura y una solución de cloruro de sodio al 20% para obtener una mejor condición de salting out, el vial es sellado y dejado por un periodo de 30 min en equilibrio, posteriormente fue introducida una fibra de Polidimetilsiloxano – Divinilbenceno (65 μ m - PDMS-DVB) en el espacio de cabeza del vial, esta extracción fue realizada colocando el vial en una plancha de

calentamiento con agitación magnética por un periodo de 15 a 60 minutos a 600 rpm y una temperatura aproximada de 90°C, con la finalidad de validar el tiempo de equilibrio entre el analito y la fibra (Rodriguez et al. 2011).

3.2.2. Muestras de suelo de cultivo

Fueron tomados 7 gramos de muestra de suelo previamente tamizados a un tamaño de partícula < 2 mm y se sometieron a extracción soxhlet por un periodo de 18 horas, usando como solvente hexano/acetona (Panreac, Estados Unidos) (4:1) (Kuranchie-Mensah et al. 2012), posteriormente los extractos se concentraron por Kuderna Danish, limpiados en una columna de florisil e inyectados en un equipo de cromatografía de gases GC/FID (Agilent 4890) (Menezes et al. 2010).

3.3. Determinación cromatográfica

3.3.1. Determinación de patrones OPs por GC – FID

Se estandarizaron los tiempos de retención de los compuestos organofosforados con base en 18 patrones (Fluka® y Chem Service ®) (Tabla 3), los cuales se sometieron a la GC/FID, con el fin de determinar el parámetro de identificación de los posibles pesticidas OFs presentes en las muestras. Este proceso se realizó tomando una pequeña porción (0,5 µg) de cada patrón, se disolvió en 1mL de acetona/hexano (1:4) y de esta solución se inyectaron 5µL en un equipo de cromatografía.

Tabla 3. Patrones usados para identificar contaminantes del suelo evaluado (Linstrom & Mallard, 2011).

Compuesto	Formula	Peso Molecular (g/mol)
Sulprofós	$C_{12}H_{19}O_2PS_3$	322.45
Demeton-S-Metilsulfon*	$C_6H_{15}O_5PS_2$	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

3.3.2. Exposición de la fibra PDMS – DVB

Una vez concentrados los analitos en la fibra de PDMS – DVB, la fibra fué insertada directamente en el inyector del cromatógrafo donde se realizó su

desorción durante 5 minutos a una temperatura de 250°C. Este procedimiento es individual para cada muestra (Rodríguez et al. 2011).

3.3.3. Condiciones Cromatográficas

Una vez realizada la desorción para cada muestra, los analitos fueron determinados bajo las siguientes condiciones:

- ✚ Una columna capilar HP-5 (30m * 0.32 mm* 0.25 µm)
- ✚ Gas de arrastre Helio a un flujo de 1 – 2 mL/min
- ✚ La rampa de temperatura del horno iniciara en 60°C durante 2 minutos, luego se elevara a 160°C a razón de 15°C/min durante un periodo de 6 minutos y finalmente será llevada a una temperatura de 280°C a razón de 20°C/min.
- ✚ Gases de combustión: Hidrogeno/Aire en proporciones 1:3 respectivamente (Rodríguez et al. 2011)

3.4. Tratamiento de material microbiológico

3.4.1. Activación del metabolismo degradador de OPs en las cepas bacterianas

Una parte de las muestras de suelo de cultivo colectado del municipio de San Bernardo Del Viento, fue utilizada para lograr la expresión del metabolismo degradador de OPs, de acuerdo con lo recomendado por Cycón y colaboradores (2009). Primero se realizó una dilución Demeton – S – Metilsulfón 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).

3.4.2. Preparación de medio mínimo M9 como matriz líquida

La solución de medio mínimo M9 (con un contenido de Demeton – S - Metilsulfon a 200ppm) es 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 monocrotofos (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.

3.4.3. Aislamiento de bacterias nativas del suelo de cultivo

El aislamiento de cepas fue llevado a cabo utilizando las técnicas empleadas normalmente en microbiología, siguiendo el siguiente esquema a partir de una muestra de suelo (Boonchan et al . 2000, Fernandez et al. 2005):

- ✚ Tomar 1g de suelo previamente tamizado en una malla de 2 mm y diluir en 9mL de agua destilada estéril.
- ✚ Realizar diluciones sucesivas de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ en medio mínimo M9 con un estándar de OPs (Demeton – S – Metilsulfon) como única fuente de carbono a partir de la dilución anterior.
- ✚ Incubar 37°C por 24-48 horas.
- ✚ Sembrar 100 µL de cada una en medio de cultivo modificado (Agar con medio mínimo y un estándar de OPs como única fuente de Carbono).
- ✚ Incubar 37°C por 24-48 horas.

3.4.4. Purificación e identificación bioquímica de cepas aisladas [23].

- ✚ Tomar colonias representativas y purificarlas en medio nutritivo.
- ✚ Realizar Tinción de Gram, catalasa, oxidasa, agar sangre.
- ✚ Sembrar en BBL CRYSTAL.
- ✚ Sembrar cada cepa pura en caldo nutritivo.

3.4.5. Sometimiento de bacterias identificadas a medios de cultivo selectivos para degradación de OPs.

- ✚ Sembrar cada una de las cepas en caldo (hasta alcanzar turbidez 0.5 Mac Farland) y agar (Tomar 100 μ L de colonia re suspendida en agua destilada estéril y sembrar por agotamiento) en medio mínimo con un estándar de organofosforado (Clorpirifos) como única fuente de carbono [21] a diferentes concentraciones (de 10^{-1} a 10^{-10}).
- ✚ Incubar 37°C 24-48h.
- ✚ Medir la turbidez por medio de espectrofotometría para calcular el crecimiento.
- ✚ Someter caldos a cromatografía de gases con detector de ionización de llama (FID) antes y después de la inoculación e incubación con cepas, para determinar si hay o no degradación por parte de las bacterias y determinar los posibles metabolitos producidos en el proceso de síntesis.

Esta última parte metodológica es muy importante debido a que mediante esta se confirmara la presencia de los microorganismos nativos con capacidad de degradar compuestos organofosforados.

También es vital recalcar que los puntos antes descritos serán realizados con blancos y testigos para garantizar la confiabilidad de los resultados y los ensayos serán efectuados por triplicado como medida de control y para obtener datos estadísticamente significativos.

3.4.6. Análisis estadístico de los datos

Para el desarrollo de la investigación se empleó un diseño experimental unifactorial, con dos tratamientos (cepas bacterianas) y un blanco (ausencia bacteriana), teniendo como variables de respuesta, el crecimiento bacteriano y el porcentaje de reducción de la concentración de Clorpirifos.

Para procesar estadísticamente los datos, estos primero se tabularon en hojas electrónicas del programa computacional Excel de Microsoft, posteriormente los datos se analizaron mediante el uso del paquete estadístico Prisma 6.0; a partir del cual se identificó el modelo de mejor ajuste, al tipo de crecimiento que presentaron las bacterias, así como también se realizó una comparación del porcentaje de reducción de Clorpirífos en los medios experimentales, mediante un análisis de varianza (ANOVA), unifactorial (Cepa bacteriana).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de OPs en muestras de suelo de cultivo y leche de ganado bovino

Una vez las muestras de suelo fueron sometidas a extracción Soxhlet por un periodo de 18 horas, concentradas a 1 mL y sometidas a GC/FID se obtuvo como resultado que estos suelos de cultivo presentan un compuesto organofosforado identificado como Demeton – S – Metilsulfón utilizado para el control de ciertos insectos, este insecticida fue detectado en la zona de estudio en concentraciones de 272,9 ppm y 1793,3 ppm. En las figuras 10, 11 y 12 se muestran la curva de calibración para el Demeton – S – Metilsulfón y los cromatogramas de las muestras de suelo respectivamente.

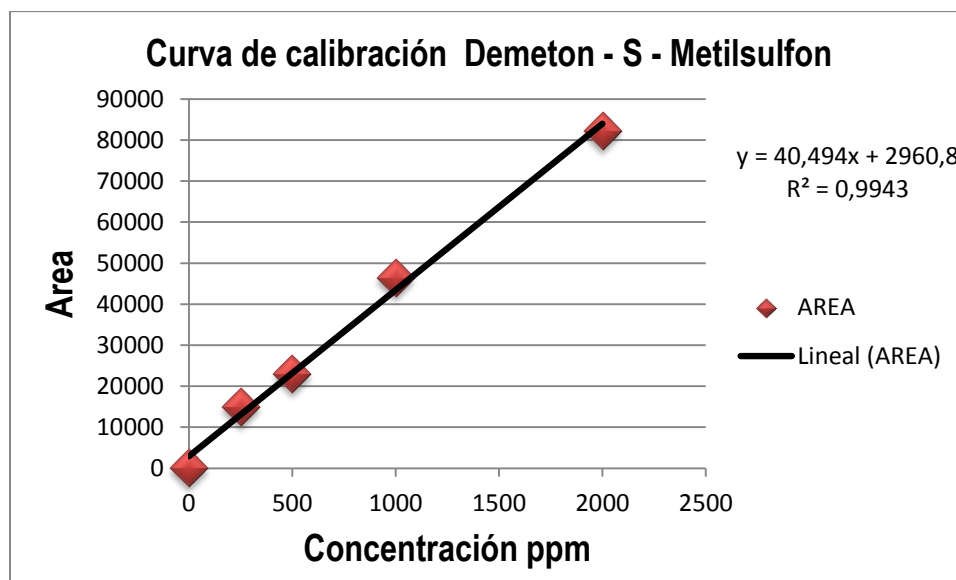


Figura 10. Curva de calibración de Demeton – S – Metilsulfón

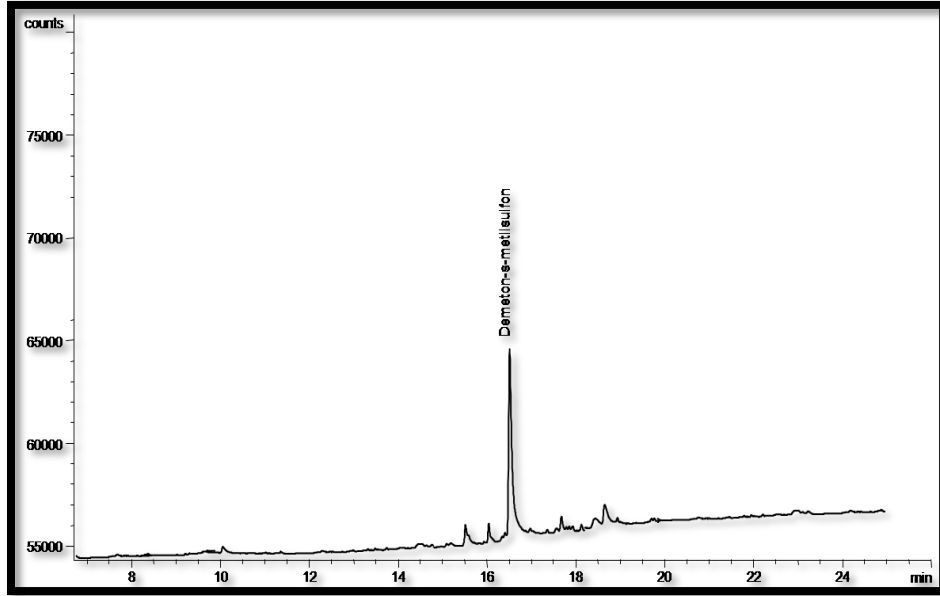


Figura 11. Cromatograma de suelo de cultivo, presencia de Demeton – S – Metilsulfon 272,9 ppm

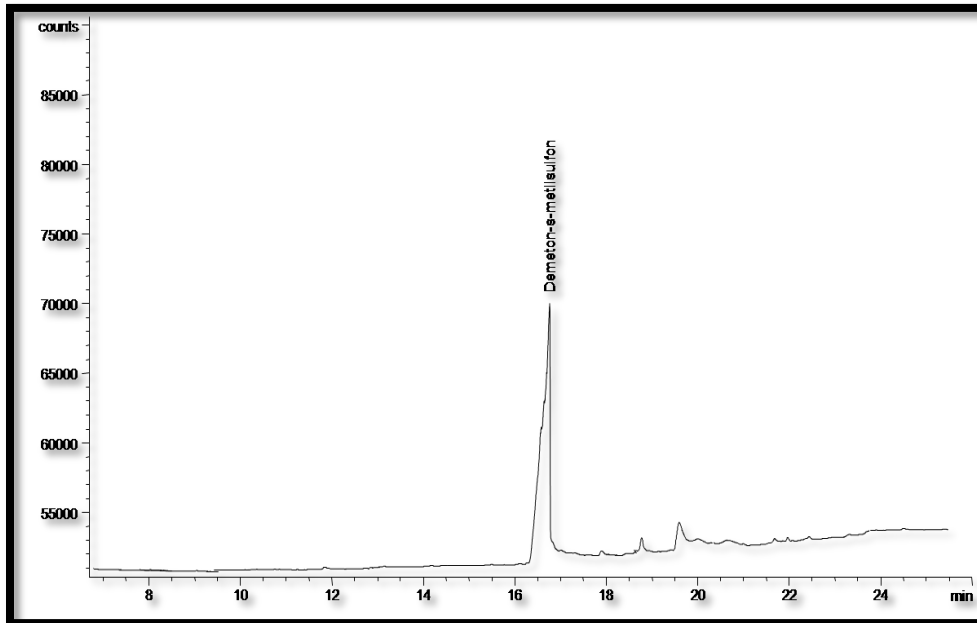


Figura 12. Cromatograma de suelo de cultivo, presencia de Demeton – S – Metilsulfon 1793,3 ppm

De acuerdo con los resultados obtenidos en los suelos de cultivo, podemos observar dos valores muy diferentes en las concentraciones del compuesto organofosforado Demeton-S-Metil Sulfón, los cuales pueden ser atribuidos a la morfología de la zona de cultivo, la cual mostraba una inclinación, permitiendo escorrentías o transporte de estos compuestos a las zonas más bajas logrando su respectiva acumulación durante el periodo de cultivo, dando como resultado que esta zona más baja presente una concentración más elevada del compuesto organofosforado determinado. Lo relevante es que estos suelos al ser usados como zona de pastoreo de ganado bovino y de futuras siembras se convierte en una posible amenaza desde el punto de vista de la dinámica ambiental de estos compuestos organofosforados ya que podrían ser encontrados en las cosechas posteriores y en los productos derivados como carne y leche de los animales ubicados en esas zonas para pastoreo. Esto último es evidenciado en la determinación de la sustancia Demeton – S – Metil Sulfón en la leche de ganado bovino con un valor de concentración de 12,9 ppm después de cinco días de que estos animales ingresaran a la zona de cultivo (Figura 13 y Figura 14), la presencia de pesticidas en este tipo de matrices como la leche cobra importancia debido al creciente uso de estos compuestos que si bien son menos persistentes que sus homólogos organoclorados, poseen ciertas propiedades fisicoquímicas como su variable liposolubilidad que les permite pasar de una matriz a otra llegando a ocasionar desequilibrios desde el punto de vista ambiental y sobre todo a la hora de ser consumidos por el ser humano debido a la toxicidad que estas sustancias poseen (Wu L et al. 2014, Gazzotti et al. 2009, Morales et al. 2010, Lein et al. 2012, Tsiplakou et al. 2010, Selvi et al. 2012).

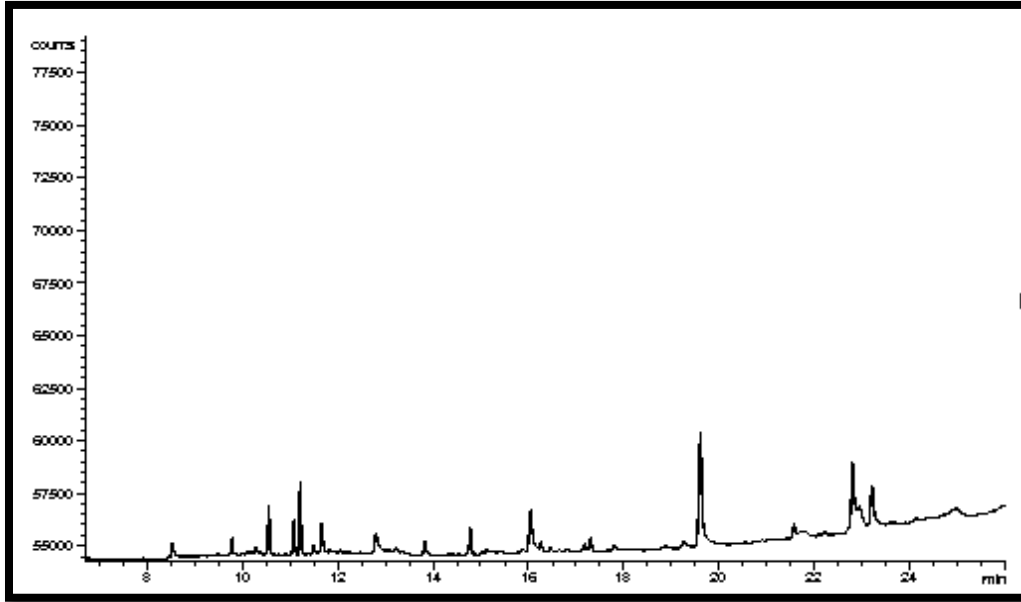


Figura 13. Cromatograma de leche de ganado bovino por HS – SPME en el día cero (0) de pastoreo

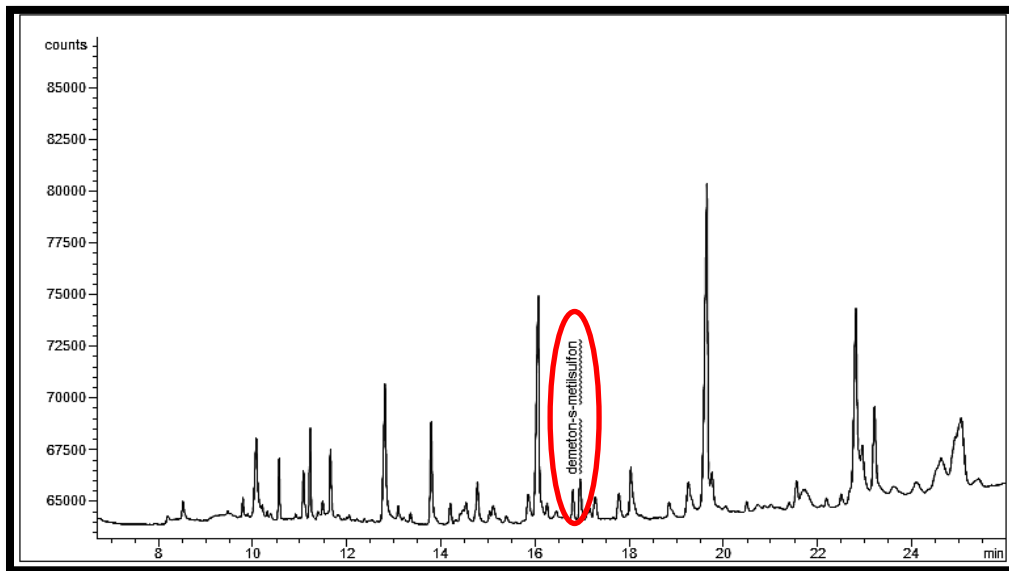


Figura 14. Cromatograma de OPs determinado (Demeton – S – Metilsulfon) en leche de ganado bovino por HS – SPME en el día cinco (5) de pastoreo

4.2. Validación de método de extracción de OPs por HS – SPME

Para validar la metodología de HS – SPME se tuvieron en cuenta parámetros de linealidad, precisión y exactitud (Ministerio de Salud, 1998), se prepararon 9 concentraciones de Demeton – S – Metilsulfon por duplicado en el rango de 100 a 200 mg/kg. También se tuvo en cuenta el tiempo de exposición de la fibra de PDMS/DVB en Tiempos de 15, 30, 45 y 60 minutos para determinar el mejor tiempo de equilibrio del analito.

4.2.1. Linealidad, precisión y exactitud

La linealidad del método se realizó por regresión lineal, generando una curva con relación de áreas de analito estándar versus concentraciones de analito encontrados, para generar la ecuación de la curva $y = mx + b$, donde y es la relación del área, x la concentración, m la pendiente y b el intercepto, para su cálculo se analizaron 3 diluciones del estándar (Demeton – S – Metilsulfon) por triplicado, se demostró respuesta lineal en el rango de 100 a 200 mg/kg. El coeficiente de correlación fue superior a 0.995 lo que demuestra una buena linealidad del método (Ministerio de Salud, 1998) (figura 15).

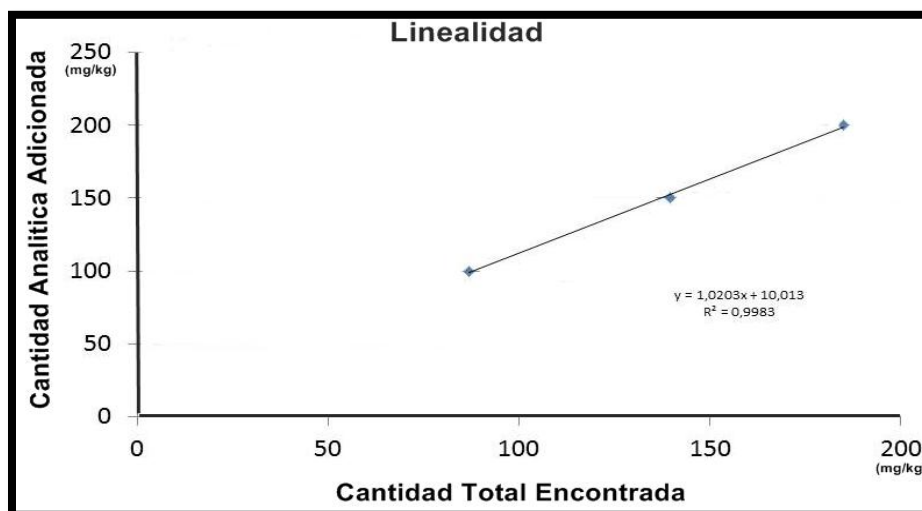


Figura 15. Gráfico de Linealidad Demeton – S – Metilsulfon

La precisión se evaluó mediante nueve determinaciones con tres niveles de concentración 100, 150 y 200 mg/kg. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 4. Los valores de desviación estándar relativa fueron inferiores al 2%, lo que confirma la precisión del método analítico según los criterios de validación (Ministerio de Salud, 1998).

Tabla 4. Precisión del método analítico según desviación estándar relativa

Concentración (mg/kg)	Día	Media X	Desviación Estándar	Desviación Estándar Relativa
100	1			
	2	87.10	0.66697	0.77%
	3			
150	1			
	2	139.55	0.7207	0.52%
	3			
200	1			
	2	184.41	1.7271	0.93%
	3			

La exactitud fue medida con base al porcentaje de recuperación, en la Tabla 5 podemos observar los datos obtenidos para este parámetro donde se evidencia que estos porcentajes se encuentran dentro del rango establecido para la validación cuyos valores están estipulados entre 86 y 95% (Ministerio de Salud, 1998).

Tabla 5. Resultados de exactitud para la validación del método

Concentración	
Demeton – S – Metilsulfon (mg/kg)	Porcentaje Recuperación (%)
87.10	87.10
139.55	93.03
184.41	92.47

4.2.2. Determinación del tiempo de exposición de la fibra de PDMS/DVB por HS – SPME

A continuación en la Figura 16 se muestra la relación de las áreas de los picos cromatográficos de tres pesticidas OPs respecto al tiempo de exposición de la fibra de PDMS/DVB en el espacio de cabeza (HS), podemos observar que el tiempo donde existió mayor absorción de los analitos fue el correspondiente a los 45 minutos de exposición y por tal motivo este tiempo fue el utilizado para la determinación de OPs en leche de ganado bovino.

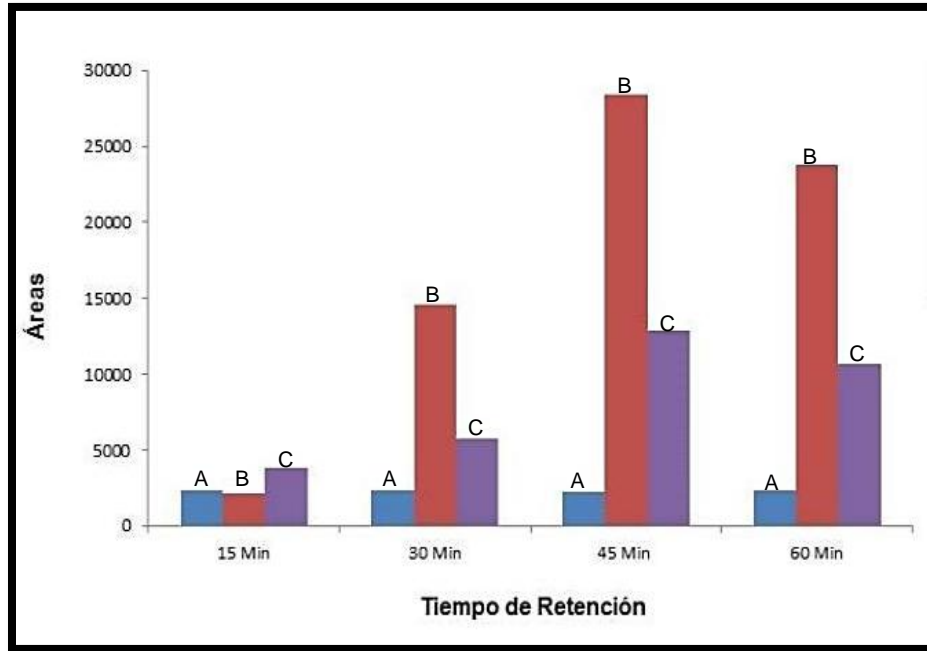


Figura 16. Tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB en el espacio de cabeza (HS), A: Disulfoton, B: Demeton – S – Metilsulfon, C: Clorpirifos

4.3. Aislamiento, purificación e identificación de bacterias nativas del suelo de cultivo

En la figura 17 podemos observar las características macroscópicas de las dos cepas bacterianas obtenidas en los suelos de cultivo de San Bernardo Del Viento.

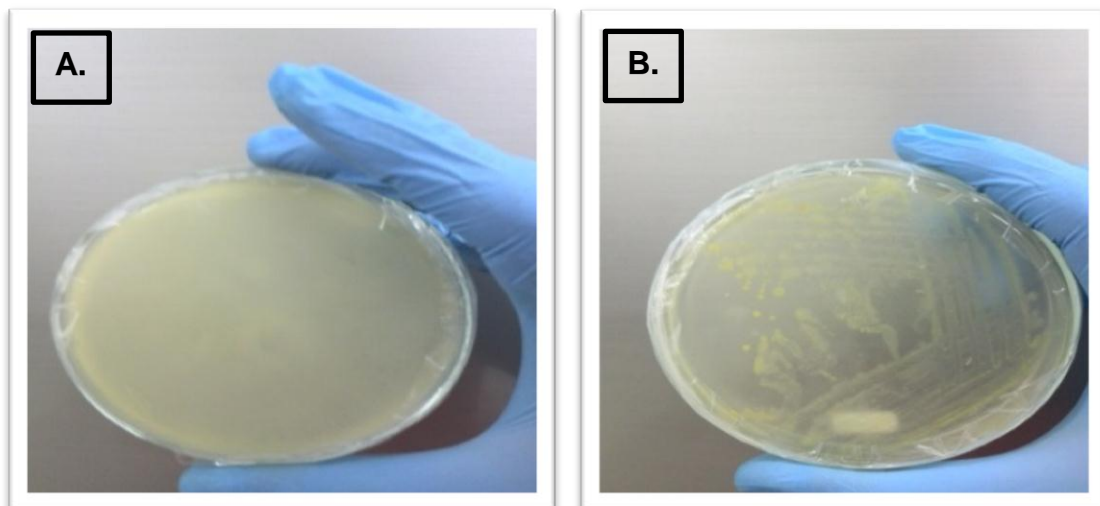


Figura 17. Cepas aisladas en suelos de cultivo, A: cepa 1, B: cepa 2

Las colonias aisladas de la cepa 1 (Figura 17 A) macroscópicamente presentaron las siguientes características: Blancas, sin aroma notable, cremosas y lisas; Microscópicamente son bacilos Gram positivos esporulados (Figura 18), relativamente cortos y gruesos. La cepa 2 (Figura 17 B) macroscópicamente son amarillas, presentaron aroma desagradable, secas y rugosas; microscópicamente son bacilos Gram negativos (Figura 19) no esporulados, relativamente cortos y delgados.

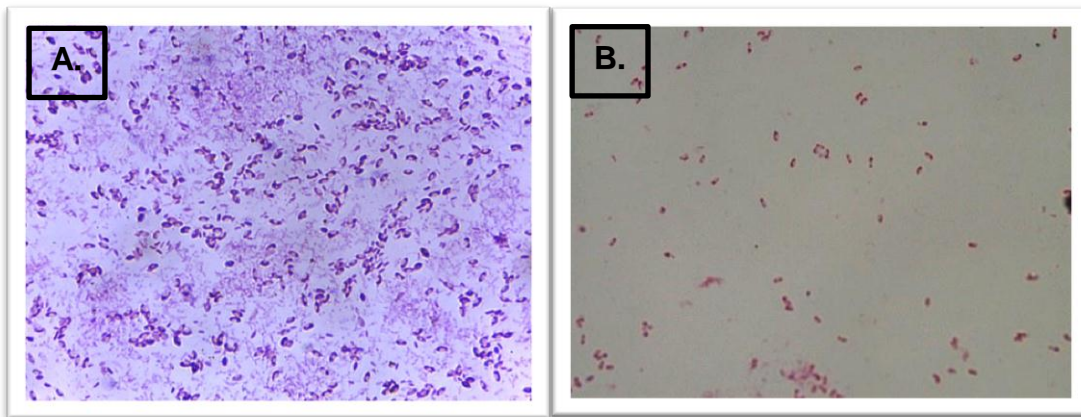


Figura 18. Tinción de Gram en objetivo de inmersión 100x de Cepa 1 aislada

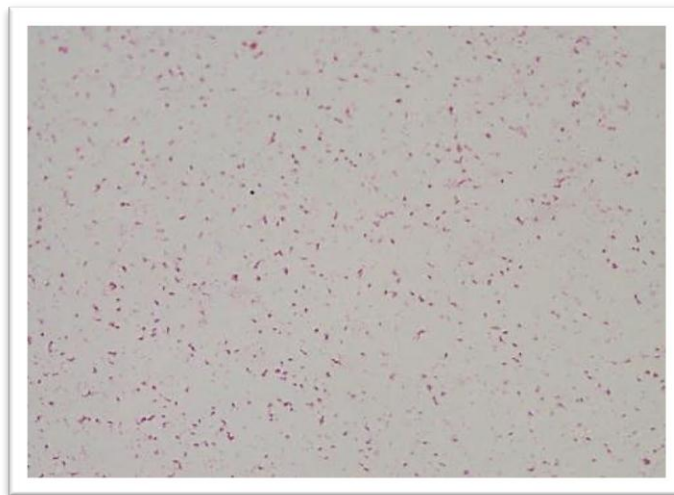


Figura 19. Tinción de Gram en objetivo de inmersión 100x de Cepa 2 aislada

Para la identificación de las cepas bacterianas se llevaron a cabo otra serie de pruebas bioquímicas tales como: Oxidasa, catalasa y hemolisis (Konneman et al. 2001). En las Figuras 20 y 21 se muestran los resultados de estas pruebas para la Cepa 1, dando como resultado que estas bacterias presentan Gamma Hemolisis, oxidasa (-) negativa y catalasa (+) positiva.

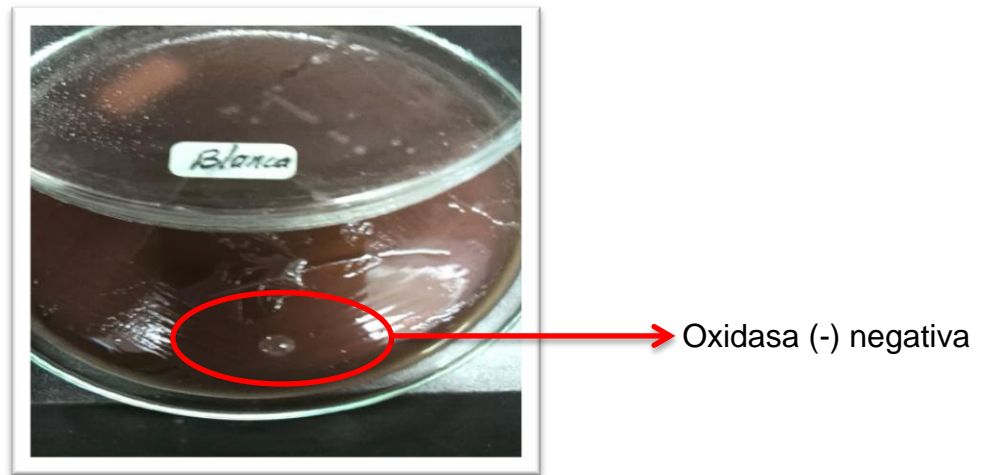


Figura 20. Prueba de Agar sangre (Gamma hemolisis) – Oxidasa (-) para cepa 1



Figura 21. Prueba de catalasa (+) positiva para cepa 1

Las Figuras 22 y 23 muestran los resultados para las pruebas antes mencionadas pero con respecto a la cepa 2.

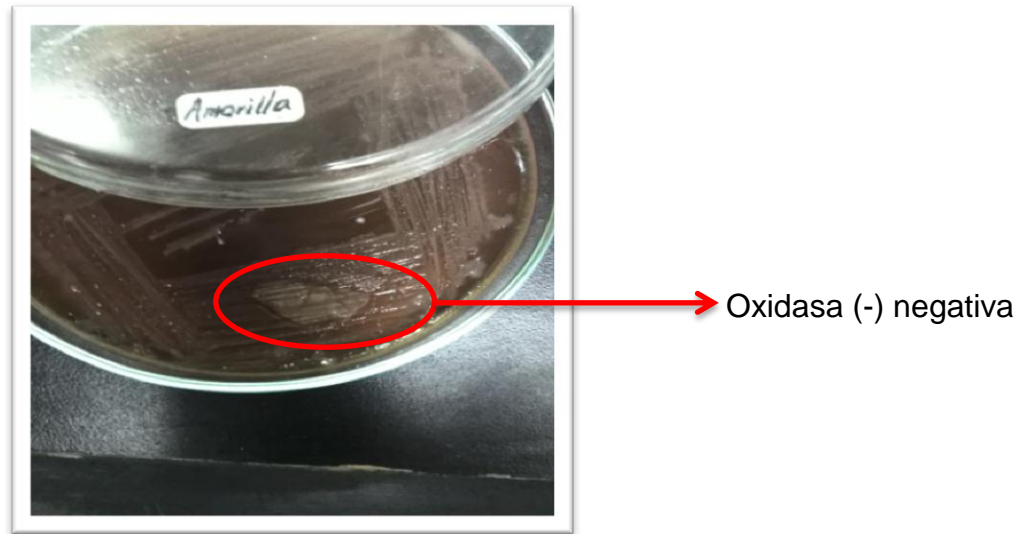


Figura 22. Prueba de Agar sangre (Gamma hemolisis) – Oxidasa (-) para cepa 2



Figura 23. Prueba de catalasa (+) positiva para cepa 2

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas podemos resaltar que la cepa 1 fue identificada en el género *Bacillus sp*, este género de bacterias se caracteriza y diferencia de las demás bacterias Gram positivas por la presencia de esporas y prueba de catalasa negativa, además este género en su primera etapa de crecimiento presenta Tinción de Gram de resultado positivo (+) y

pasado este tiempo su Tinción de gram cambia a un resultado negativo (-) (ver Figura 18 A y 18 B) (Forbes et al. 2009).

Por su parte la cepa 2 por sus características observadas a través de su tinción gram negativa fue sembrada en BBL CRYSTAL para su identificación (Figura 24) sugiriendo con un porcentaje de confiabilidad del 94% la presencia de *pantoea agglomerans*, un bacilo gram negativo de la familia Enterobacteriaceae, es un tipo de bacterias que se encuentra en diferentes matrices ambientales tales como suelo (Feng et al. 2006).

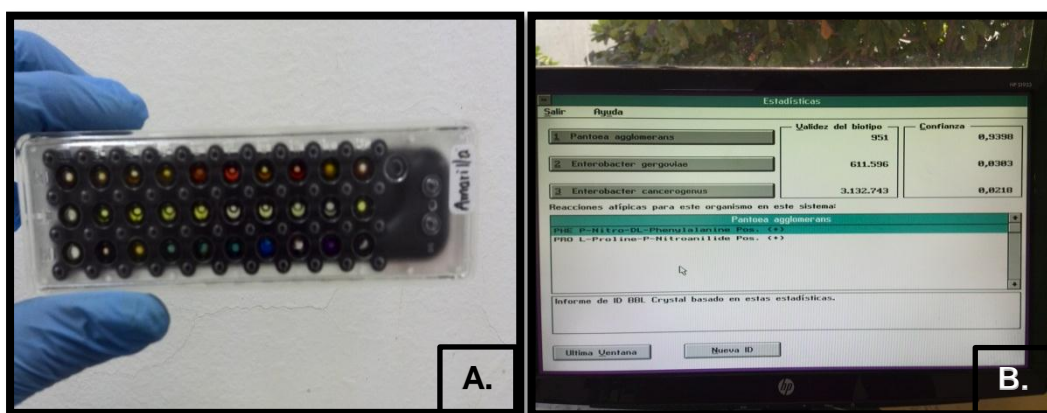


Figura 24. Identificación bioquímica de cepa 2

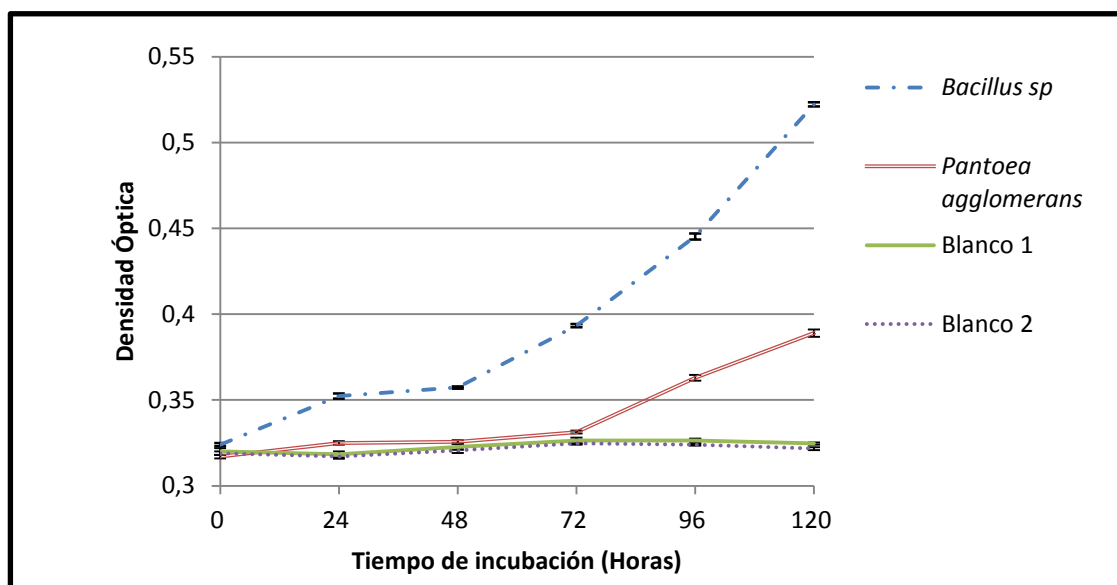
4.4. Crecimiento de bacterias aisladas y verificación de su capacidad degradadora en presencia de OPs

Las colonias de estudio fueron sembradas en medio mínimo M9 con una concentración de clorpirifos de 200 ppm, se incubaron a $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$ y cada 24 horas fue monitoreado el crecimiento bacteriano midiendo su densidad óptica por medio de un espectrofotómetro UV-VIS a 600 nm. La Tabla 6 y la Figura 25 muestran que las dos cepas bacterianas pueden crecer en este medio selectivo usando como única fuente de carbono el pesticida organofosforado; este resultado puede ser comparado al realizado por Acuña et al. (2010) y Tirado (2014) donde obtuvieron crecimiento exponencial similar al presente trabajo donde el proceso de crecimiento fue de 20 y 4 días respectivamente (Acuña et al. 2010, Tirado 2014).

Tabla 6. Crecimiento bacteriano de cepas de estudio en presencia de OPs (Clorpirifos)

Tiempo de incubación (Horas)	Densidad óptica*			
	Blanco Cepa 1	Blanco Cepa 2	Cepa 1	Cepa 2
0	0,32±0,002	0,319±0,001	0,324±0,001	0,317±0,001
24	0,318±0,002	0,317±0,001	0,352±0,001	0,325±0,001
48	0,323±0,002	0,321±0,001	0,357±0,001	0,326±0,001
72	0,326±0,002	0,325±0,001	0,393±0,001	0,331±0,001
96	0,326±0,001	0,324±0,001	0,445±0,002	0,363±0,002
120	0,325±0,001	0,322±0,001	0,522±0,001	0,389±0,002

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



Datos presentados como densidad óptica ± error estandar

Figura 25. Crecimiento bacteriano de cepas de estudio en presencia de OPs (Clorpirifos), Blanco 1: *Bacillus sp*, Blanco 2: *Pantoea agglomerans*.

Para la verificación de la disminución del compuesto organofosforado por parte de las cepas bacterianas, los medios de cultivo líquido fueron sometidos a GC/FID en

intervalos de 24 horas. Para tal fin se elaboró una curva de calibración del compuesto organofosforado clorpirifos (Figura 26) y se procedió a inyectar cada una de las muestras de cada cepa bacteriana y se evaluó la concentración del pesticida presente, a su vez se evaluó un blanco como control negativo para garantizar que la degradación de OPs no sea atribuido a otros factores tales como la temperatura de incubación de las muestras.

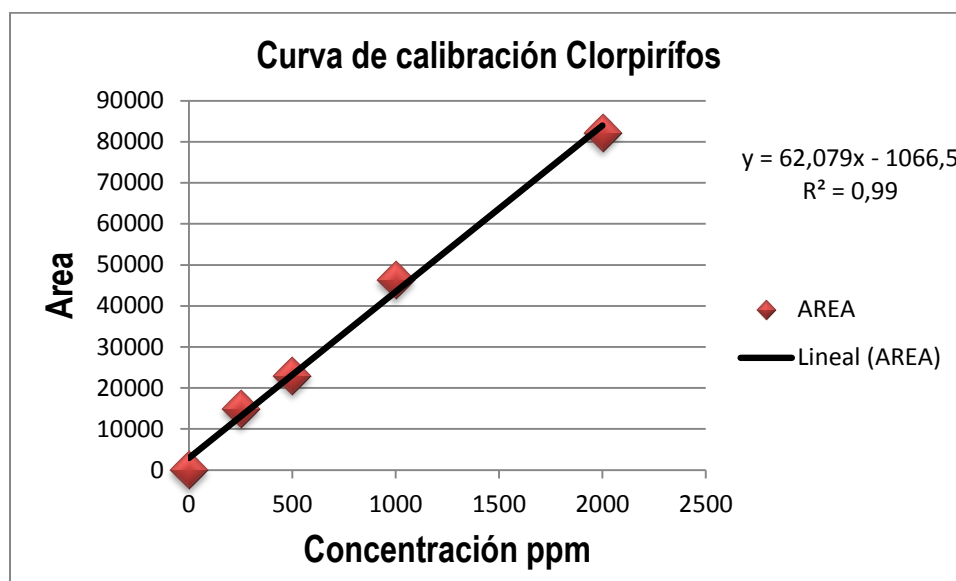
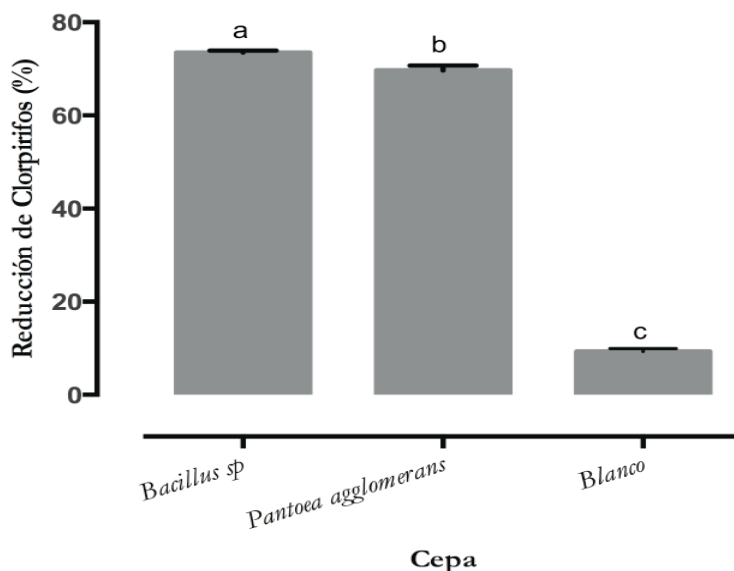


Figura 26. Curva de calibración para Clorpirifos

El comportamiento del crecimiento bacteriano de las dos cepas, *Bacillus sp* y *Pantoea agglomerans* mostró que ambas presentaban un ajuste significativo al modelo exponencial (P-valor < 0.001), con valores del coeficiente de determinación (R^2), iguales a 0.94 y 0.87 para las cepas *Bacillus sp* y *Pantoea agglomerans* respectivamente. Sin embargo al comparar graficamente las dos cepas, se aprecia que la primera presenta mayor concentración, con respecto a la segunda. Al comparar el porcentaje de reducción de los Clorpirifos mediante el ANOVA, se pudo comprobar que existen diferencias estadísticamente significativas ($P \ll 0.05$), entre los tratamientos, como se observa en la Tabla 7; además, mediante las múltiples comparaciones pareadas efectuadas por el método de Tukey, se encontró que la especie *Bacillus sp* fue quien tuvo mayor porcentaje de reducción (Figura 27).

Tabla 7. Análisis de Varianza para el porcentaje de reducción de Clorpirifos en cada tratamiento, incluido el blanco.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	7782,7	2	3891,35	6829,85	0,0000
Intra grupos	3,41854	6	0,569756		
Total (Corr.)	7786,12	8			



Nota: Letras diferentes en la figura 26, indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias, con P-valor <0.05.

Figura 27. Porcentajes de reducción de OPs (Clorpirifos) por parte de las cepas de estudio.

Al observar la degradación del clorpirifos, notamos que los tratamientos que poseen las cepas bacterianas *Bacillus sp* y *Pantoea agglomerans* lograron una mayor reducción con respecto al Blanco, se aprecia que transcurrido un tiempo de

24 horas la concentración del pesticida disminuyó de 148,4 ppm hasta 39.34, 45.02 y 134.6 ppm para las cepas *Bacillus sp*, *Pantoea agglomerans* y el Blanco respectivamente, lo que equivale a una reducción de 73.50%, 69.67% y 9.28% del clorpirifos respectivamente para las cepas mencionadas con anterioridad; denotándose mayor degradación por parte de la primera especie (Tabla 8) y (Figura 28).

Tabla 8. Porcentaje de degradación de clorpirifos por parte de cepas bacterianas aisladas y Blanco

<i>Muestra</i>	<i>Tiempo de incubación (Horas)</i>	<i>Área del pico cromatográfico</i>	<i>Concentración OPs (ppm)</i>	<i>% degradación</i>
<i>Bacillus sp</i>	0	8148,4	148,44	0
<i>Bacillus sp</i>	24	2454,58	56,72	61,79
<i>Bacillus sp</i>	48	2077	50,64	65,89
<i>Bacillus sp</i>	72	1798,91	46,16	68,90
<i>Bacillus sp</i>	96	1375,52	39,34	73,50
<i>Bacillus sp</i>	120	NA	-	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	0	8148,4	148,44	0
<i>Pantoea agglomerans</i>	24	2377,5	55,48	62,63
<i>Pantoea agglomerans</i>	48	2245	53,34	64,06
<i>Pantoea agglomerans</i>	72	1974,7	48,99	67,00
<i>Pantoea agglomerans</i>	96	1728,3	45,02	69,67
<i>Pantoea agglomerans</i>	120	NA	-	-
<i>Blanco</i>	0	8148,4	148,44	0
<i>Blanco</i>	24	8067,17	147,13	0,88
<i>Blanco</i>	48	8045,37	146,78	1,12
<i>Blanco</i>	72	7687	141,01	5,01
<i>Blanco</i>	96	7293,23	134,66	9,28
<i>Blanco</i>	120	7012,7	130,14	12,32

NA: El equipo de GC/FID no detectó la presencia del compuesto OPs

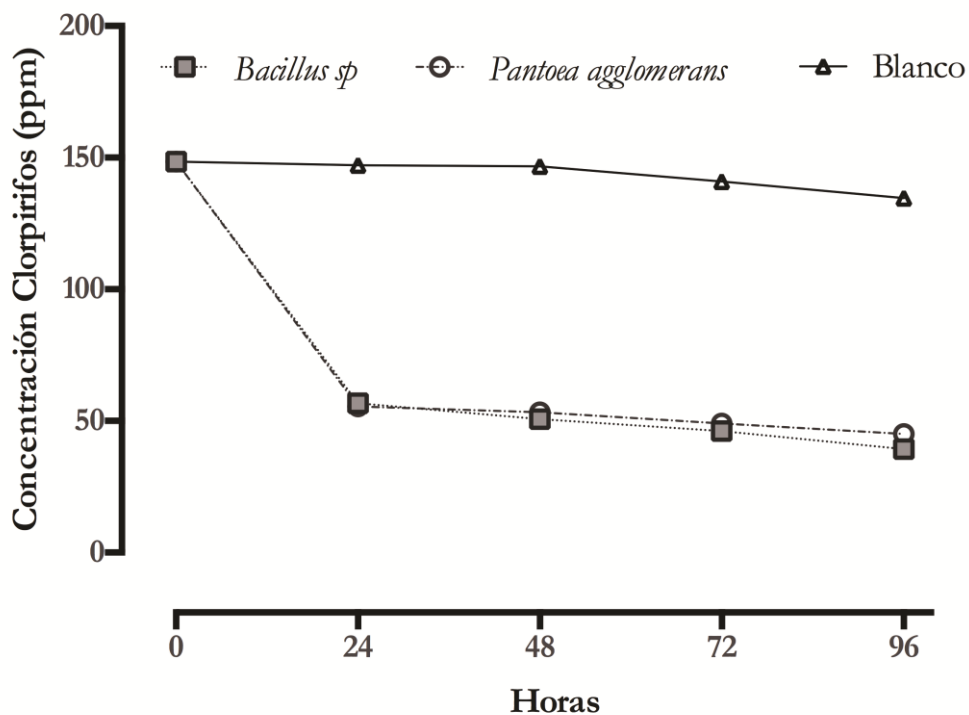


Figura 28. Capacidad degradadora de cepas bacterianas

Podemos inferir a partir de la poca disminución del pesticida en el Blanco y que este fué detectado durante el periodo del ensayo, que la disminución de la concentración de clorpirifos se debe al proceso metabólico por parte de las cepas bacterianas y no a las condiciones de temperatura presentadas durante la incubación de dichos microorganismos, estudios similares con otro tipo de OPs como el monocrotofós han mostrado que suelos autoclavados tuvieron más persistencia por parte del pesticida, lo que afirma que si bien la temperatura potencia la degradación del pesticida, esta velocidad de degradación no es significativa al compararse con el proceso metabólico (Tirado 2014). Los resultados obtenidos tanto para la cepa de *Bacillus sp* como para *Pantoea agglomerans* son productos del metabolismo de dichos microorganismos con respecto a este tipo de

compuestos ya que para la degradación de pesticidas OPs como para otro tipo de sustancias utilizan enzimas especializadas, que para este caso, es conocida como Fosfotriesterasa, la cual puede influir de manera muy significativa en los procesos de biorremediación (Jokanovic 2001).

Otros estudios han evaluado la degradación de clorpirifos por parte de muchos microorganismos nativos de diferentes suelos y se ha encontrado que la cepa *Bacillus sp* ha mostrado gran importancia en este proceso, obteniendo porcentajes de degradación de hasta 97% en periodos de 120 horas (Pino y Peñuela. 2011), que comparados con los resultados obtenidos en este estudio, muestran la capacidad degradadora por parte de esta especie. También cabe resaltar que el porcentaje de degradación de 73.50% y 69.67% por parte de las cepas bacterianas es apenas en un periodo de 96 horas y que no se pudo estimar en un rango mayor de tiempo debido a que la concentración de clorpirifos no pudo ser detectada por el equipo de cromatografía de gases, pero la tendencia muestra que el porcentaje de degradación aumenta con el transcurrir del tiempo.

La especie *Pantoea agglomerans*, conocida también como *Enterobacter agglomerans* es una especie que obtuvo un resultado muy significativo en cuanto a la degradación del clorpirifos en relación con la especie *Bacillus sp*, si bien esta última ha sido encontrada en la gran mayoría de suelos y se ha demostrado su capacidad degradadora de sustancias como los OPs (Pino y Peñuela. 2011, Cycón et al. 2013, Ohshiro et al. 1996), la especie *Pantoea agglomerans* ha mostrado su capacidad para otro tipo de sustancias como arsénico y derivados del petróleo (Khleifat 2006, Bhatia y Sharma 2010, Leon et al. 2009, Moreira et al. 2011) permitiéndonos ser uno de los primeros trabajos en el que se evidencia la capacidad degradadora de esta especie para compuestos del tipo organofosforados, utilizando como base el hecho de que esta clase de microorganismos utiliza enzimas especializadas para degradar cierta clase de sustancias.

5. CONCLUSIONES

En los suelos de cultivo del municipio de San Bernardo Del Viento en el departamento de Córdoba se detectó la presencia del pesticida organofosforado Demeton – S – Metil Sulfón en concentraciones de 272,9 y 1793,3 ppm el cual es utilizado para el control de plagas en los principales cultivos de la región.

La metodología de HS-SPME permitió la extracción de Demeton – S – Metil Sulfón en concentraciones de 12,9 ppm en leche de ganado bovino en condiciones de 600 rpm durante 45 minutos para una fibra de polidimetilsiloxano divinilbenceno (PDMS-DVB).

En los suelos de cultivo se detectó la presencia de cepas bacterianas con capacidad degradadora de pesticidas organofosforados, estos microorganismos fueron capaces de desarrollarse en medios de cultivo con presencia de estos compuestos en concentraciones de 200 ppm.

Los microorganismos aislados fueron identificados por medio de sus características morfológicas y bioquímicas como *Bacillus sp*, un bacilo gram positivo perteneciente a la familia *Bacillaceae*, y *pantoea agglomerans*, un bacilo gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*.

Las cepas de *Bacillus sp* y *pantoea agglomerans*, muestran resultados satisfactorios en la degradación del compuesto Clorpirifos en valores de **73,5%** y **69,67%** respectivamente en un periodo de 96 horas de tratamiento en comparación con la degradación natural del pesticida a las mismas condiciones, el cual arrojó un **12,32%**.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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): 29-36

Anon., 2012. *BESTechnologies.inc. 2012. Bioremediation cycle*. [En línea] Available at: 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.

Aquihuatl M, Pérez M (2004). Manual de Prácticas del Laboratorio de Microbiología: Pruebas de diferenciación Bioquímica. Editorial Casa Abierta al Tiempo, Iztapalapa, Mexico.

Baird, C., 2001. Substancias Tóxicas, Pesticidas. En: *Química Ambiental*. 2° 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.

Bhatia S, Sharma DK (2010). Biodesulfurization of dibenzothiophene, its alkylated derivatives and crude oil by a new isolated strain pantoea agglomerans D23W3. *Biochemical Engineering Journal*, 50(3):104-109.

Blanco J (2003). Manejo Integral de Suelos con énfasis en el Cultivo del Arroz. Editorial Pronatia. Colombia.

Bonanseña RI, Amé MV, Wunderlin DA (2012). Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). *Chemosphere*. Disponible online 20 Noviembre de 2012.

Boonchan S, Britz M, Stanley G (2000). Degradation and mineralization of high-molecularweight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Journal of Applied Environmental Microbiology*. 66:1007-1019.

Brady N, Weil R. (1999). The nature and properties of soils. Editorial Prentice Hall, Upper Saddle River. NJ, USA.

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[Último acceso: 20 05 2012].

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*, 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.

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

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.

Cycón M, Zmijowska A, Wójcik M, Piotrowska Z (2013). Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils. *Journal of Environmental Management*. 117: 7–16.

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.

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

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

Elbing E, Brent R (2002). Media preparation and bacteriological tools. *Current Protocols in Molecular Biology*, 57:111-117 doi: 10.1002/0471142727.mb0101s59.

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

Ezezika, O. & Singer, P. (., 2010. Gentically 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].

Feng Y, Shen D, Song W (2006) Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal of Applied Microbiology*, 100 (5): 938–945.

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

Fernandez D, Mancipe L, Fernandez D (2010). Intoxicación por organofosforados. *Revista Med*, 18 (1): 84-92.

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.

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..

Forbes B. Sahm D. Weissfeld A. (2009). Bailey & Scott: Diagnostico Microbiologico. Ed Panamericana. Buenos Aires, Argentina, p 281.

Gazzotti T, Sticca P, Zironi E, Lugoboni B, Serraino A, et al. (2009). Determination of 15 Organophosphorus Pesticides in Italian Raw Milk. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82: 251–254.

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].

Heno S, Nieto O (2014). Plaguicidas de tipo organofosforados y carbamatos. *Publicacion INCAP MDE-025*. www.bvsde.ops-oms.org/bvsacd/eco/034059/034059-03.pdf. Consultado Abril 5 2014.

Hua Y, Xu D, Qi J, Huai X (2014). Enhanced degradation of five organophosphorus pesticides in skimmed milk by lactic acid bacteria and its potential relationship with phosphatase production. *Food Chemistry*. 164: 173-178.

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.

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.

Jokanovic M (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166(1):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.

Kuranchie-Mensah H, Manukure S, Maud L, Blankson S, Osei A, et al. (2012). Determination of organochlorine pesticides residue in sediment a water from the Densu river basin, Ghana. *Chemosphere*.86 (3): 286-292.

Khleifat K (2006). Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by a two member facultative anaerobic bacterial consortium. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5):1030-1035.

Konneman E (2001). *Konneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

Lacasaña M. (2010). Association between organophosphate pesticides exposure and thyroid hormones in floriculture workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 19-26.

Lein P, Bonner M, Farahat F, Olson J, Rohlman D, et al. (2012). Experimental strategy for translational studies of organophosphorus pesticides neurotoxicity based on real-world occupational exposures to chlorpyrifos. *Neuro Toxicology*, 33(4): 660-668.

León Y, Sisto A, Inojosa Y, Malaver N, Naranjo L (2009). Identificación de biocatalizadores potenciales para la remediación de desechos petrolizados de la faja petrolífera del Orinoco. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2):12-25.

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.

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.

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

Luque, L., 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique. *Analytica Chimica Acta*, 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
[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
[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
[Último acceso: 15 04 2011].

Mackenzie S, Brewin C, Curran H, Furlong C, Abraham-Smith K, Harrison V (2010). Neuropsychological and psychiatric functioning in sheep farmers exposed to low levels of organophosphate pesticides. 8 páginas.

Martínez JL, Plaza P, Romero R, Garrido A (2009). Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods. *Journal of Chromatography A*, 1216: 6767–6788.

Matthaios P, Kavvalakis A, Tsatsakis M (2012). The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides' exposure. *Forensic Science International*, 218 (1–3):111–122.

Menezes A, Neves F, Pereira P (2010). Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC–MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. *Microchemical Journal*. 96 (1):139–145.

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

Morales VC, Rodriguez ON, Restrepo BLF, Lopez CC (2010). Relación entre residuos de clorpirifos en leche y sangre de vacas Holstein y niveles séricos de estradiol y tiroxina. *Revista electrónica de Veterinaria*, 11 (1): 1-22.

Moreira M, Queiroz S, Teixeira MC (2013). Identificación de un consorcio bacteriano con potencial biotecnológico para la biorremediación de arsénico. *Materiales Avanzados de Investigación*, 825:540-543.

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.

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.

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

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

Nápoles J, Abalos A. (2010) *Biorremediación de ecosistemas contaminados con xenobióticos*. Monografía. Registro No. La Habana, Cuba.

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

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.

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

Ohshiro K, Kakuta T, Sakai T, Hirota H, Hoshino T, et al. (1996). Biodegradation of organophosphorus insecticides by bacteria isolated from turf green soil. *Journal of fermentation and bioengineering*. 82(3): 299 – 305.

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 isolated bacterial consortium from a contaminated site. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65:827-831.

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.

Rodriguez F, Mesquita P, De Oliveira L, Oliveira F, Menezes A, et al. (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): 56-61.

Rona, E. & Rosenmerg, E., (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Biotechnology*. *Biotechnology*, 13(3): pp. 249-252.

Sang ZY, Wang YT, Tsoi YK, Leung KS (2013). CODEX-compliant eleven organophosphorus pesticides screening in multiple commodities using headspace-solid phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*. 136(2): 710-717.

Schummer C, Tuduri L, Briand O, Appenzeller B, Millet M. (2012). Application of XAD-2 resin-based passive samplers and SPME–GC–MS/MS analysis for the monitoring of spatial and temporal variations of atmospheric pesticides in Luxembourg. *Environmental Pollution.*, 170: 88–94.

Selvi C, Paramasivam M, Rajathi DS, Chandrasekaran S (2012). Multiresidue Analysis of Organochlorine Pesticides in Milk, Egg and Meat by GC–ECD and Confirmation by GC–MS. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89 (5): 1051-1056 doi: 10.1007/s00128-012-0789-2.

Shaoqin Liu, L. Y. (2008). Recent Advances in Nanosensors for Organophosphate. *Advanced Powder Technology* , 419–44.

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.

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*, 68: pp. 18-23.

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

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

Tankiewicz M, Fenik J, Biziuk M (2010). Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples. *TrAC trends in Analytical Chemistry*, 29(9): 1050-1063.

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.

Tsiplakou E, Anagnostopoulos CJ, Liapis K, Haroutounian SA, Zervas G (2010). Pesticides residues in milks and feedstuff of farm animals drawn from Greece. *Chemosphere*, 80 (5): 504-512

Vargas P, Cuéllar R, Dussán J (2014). Biorremediación de residuos del petróleo. Colombia.
www.hipotesis.uniandes.edu.co/hipotesis/images/stories/ed04pdf/Biorremediacion.pdf. Consultado Abril 5 2014.

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>.

Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem*, 73(7): 1163-1172.

Wu L, Song Y, Xu X, Li N, Shao M, et al. (2014). Medium-assisted non-polar solvent dynamic microwave extraction for determination of organophosphorus pesticides in cereal using gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 162: 253-260.2

www.sanbernardodelviento-cordoba.gov.co. Consultado Abril 5 2014.

www.sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/milla_c_o/generalidades.pdf.

Consultado Abril 5 2014.

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

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

Zawiyah S, Y. C. (2007). Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using SAX/PSA clean-up column. *Food Chemistry*, 98-103.

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.

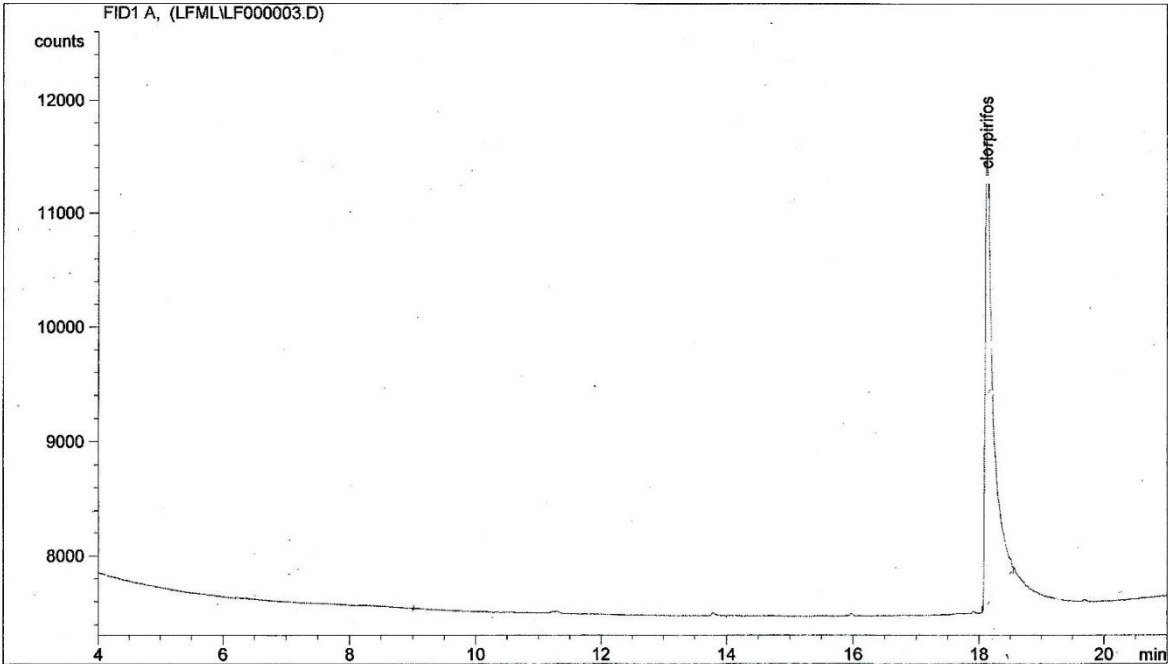
Zhen, X. y otros, (2012). Monitoring of Organophosphorus pesticides in vegetables using monoclonal antibody-based direct competitive ELISA followed by HPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 131(4): pp. 1569-1576.

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

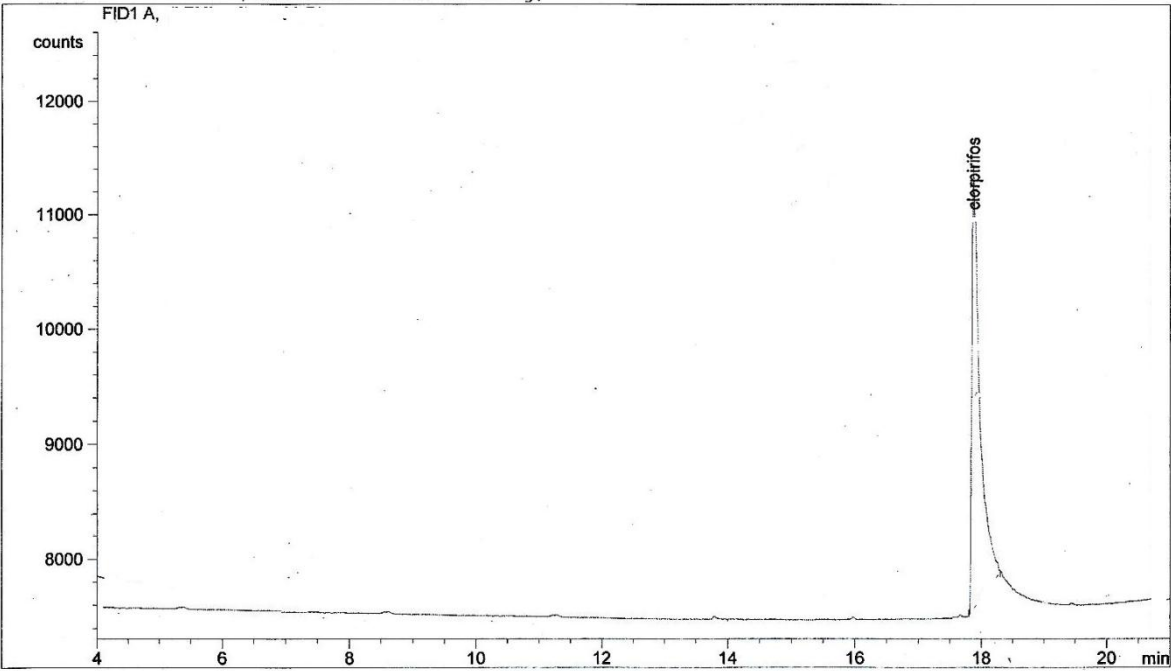
Zygler A, Słomińska M, Namieśnik J (2012). Soxhlet Extraction and New Developments Such as Soxtec. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*. 2: 65–82.

ANEXOS

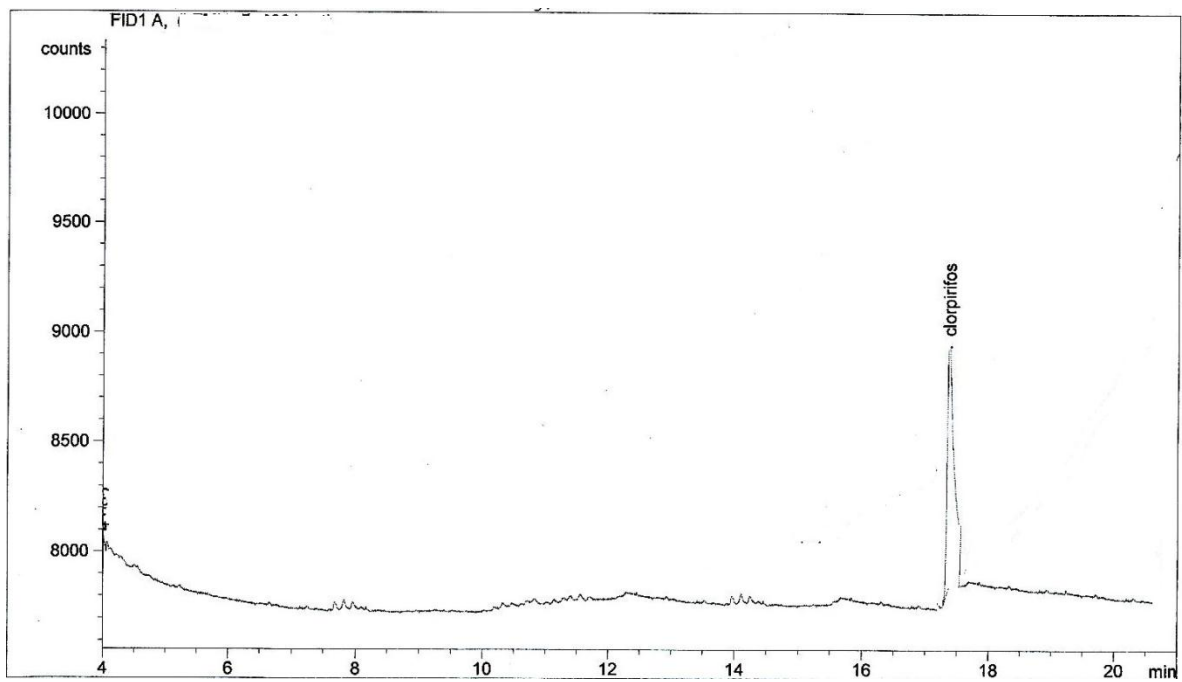
Anexo 1. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para Blanco día 1



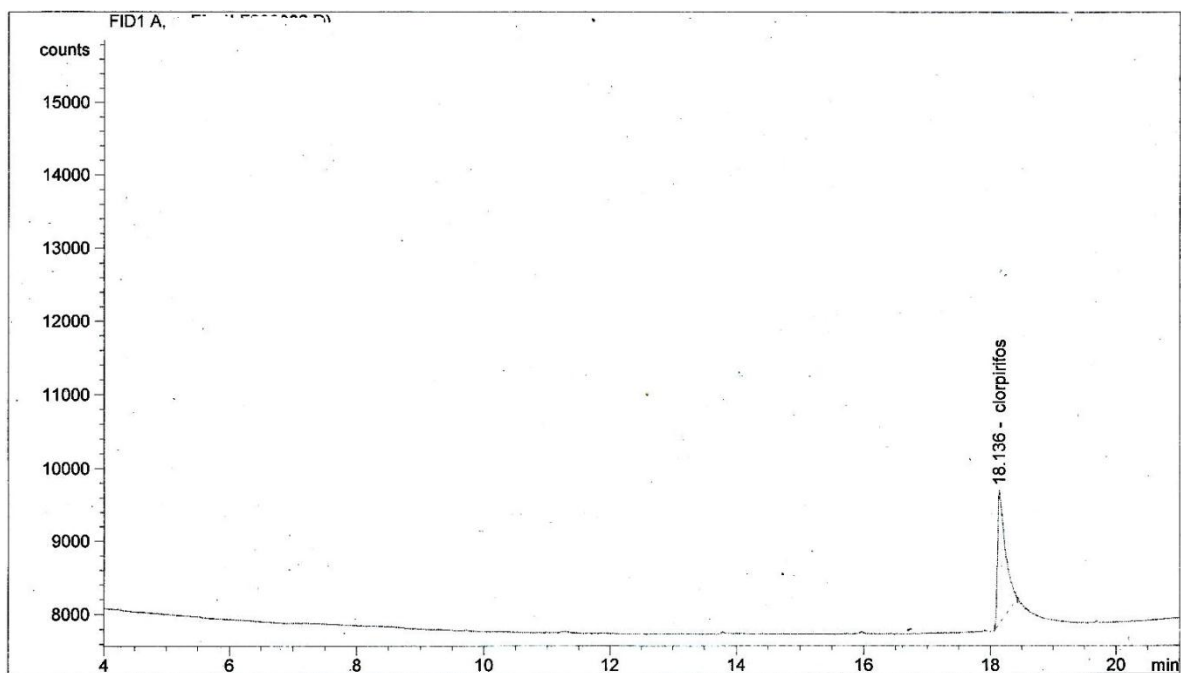
Anexo 2. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para Blanco día 2



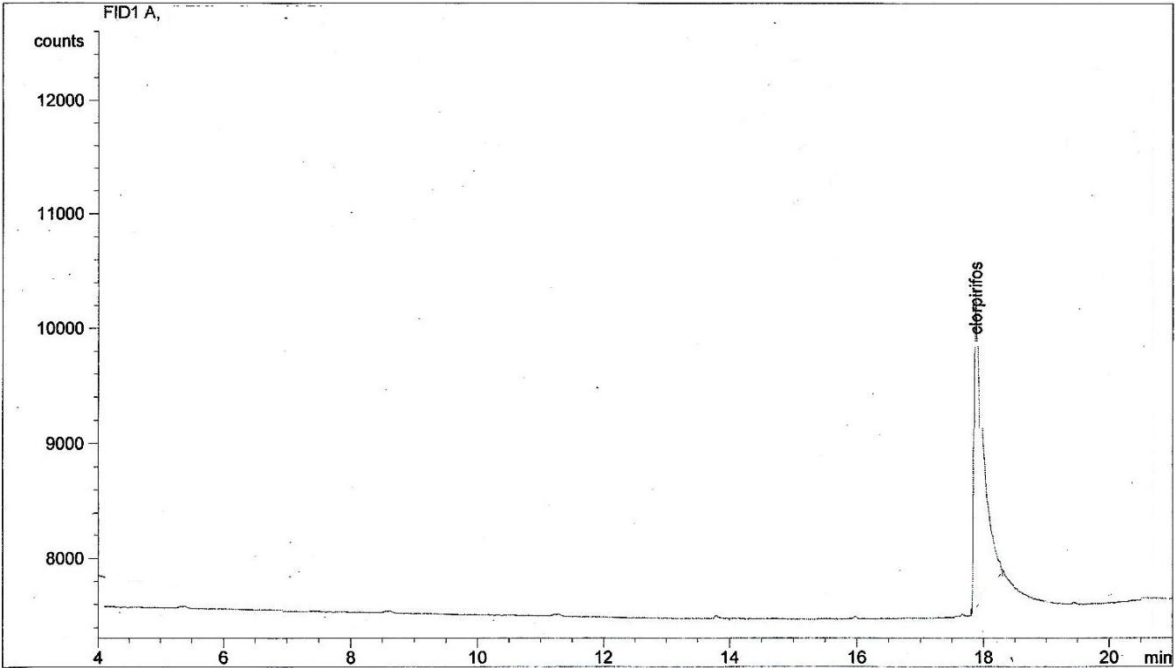
Anexo 3. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para Blanco día 3



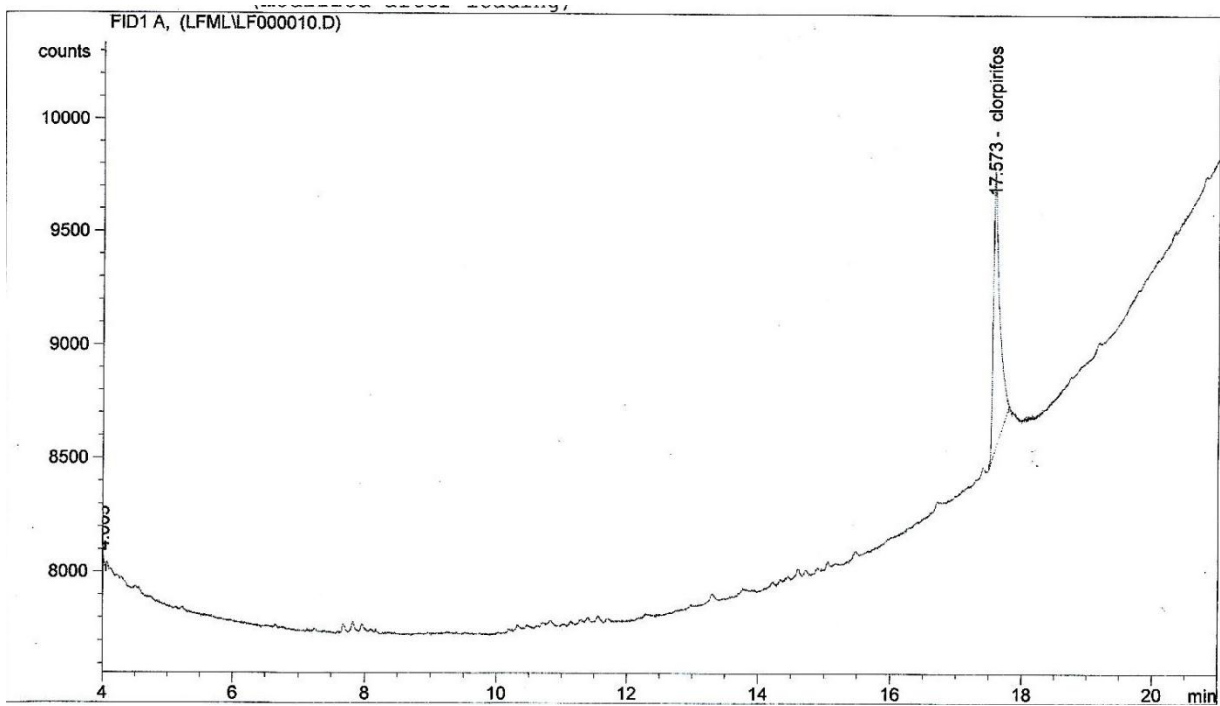
Anexo 4. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para Blanco día 4



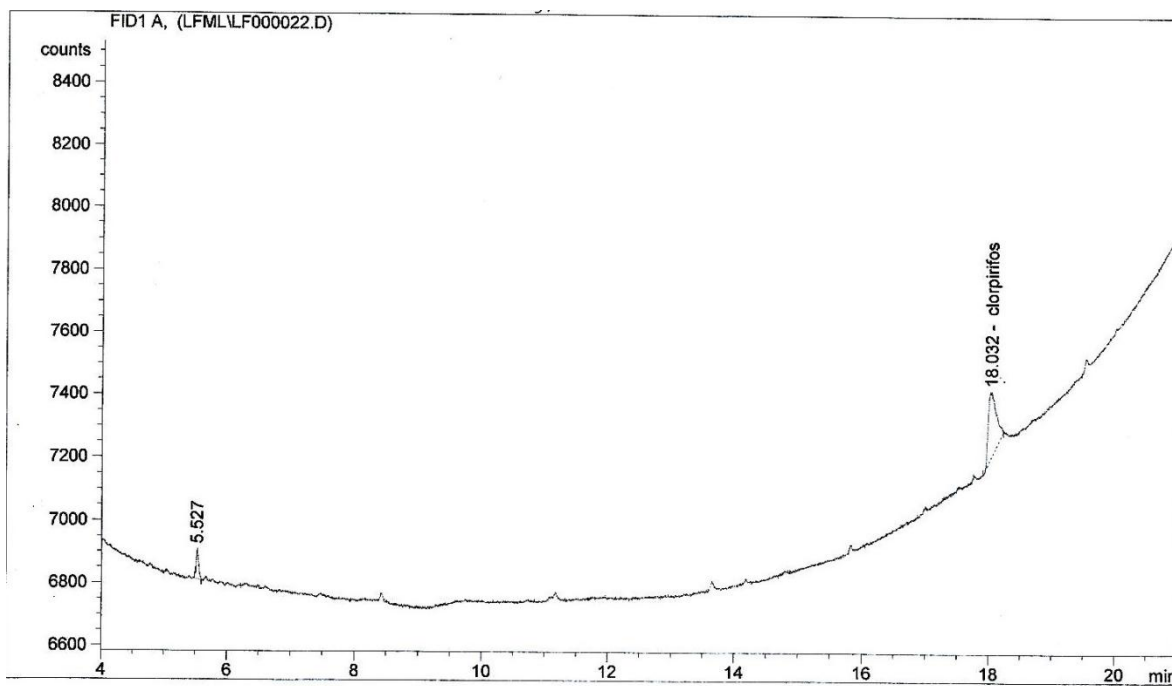
Anexo 5. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para Blanco día 5



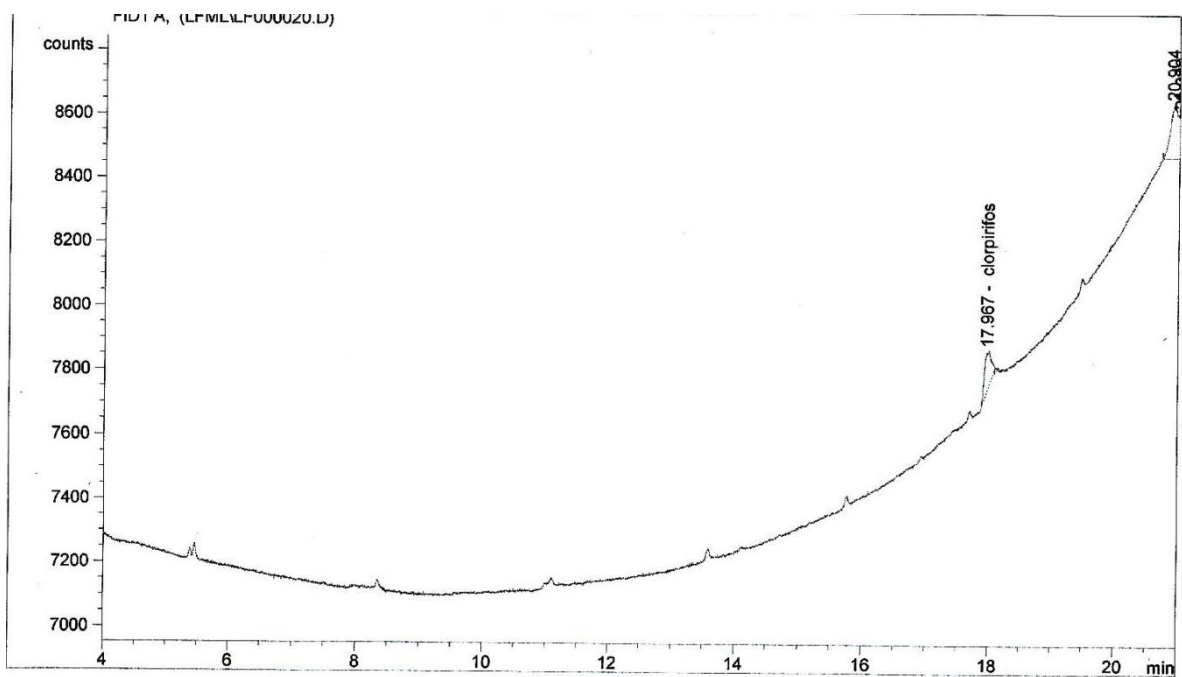
Anexo 6. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para *Bacillus sp.* Día 1



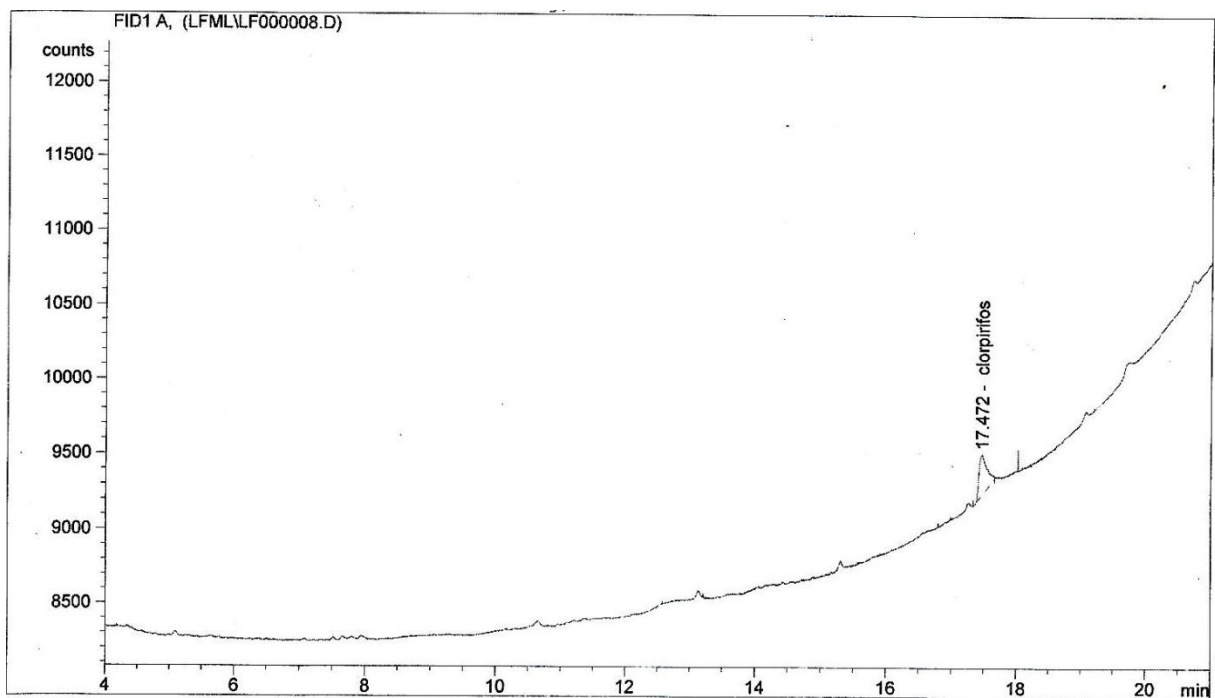
Anexo 7. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para *Bacillus* sp. Día 2



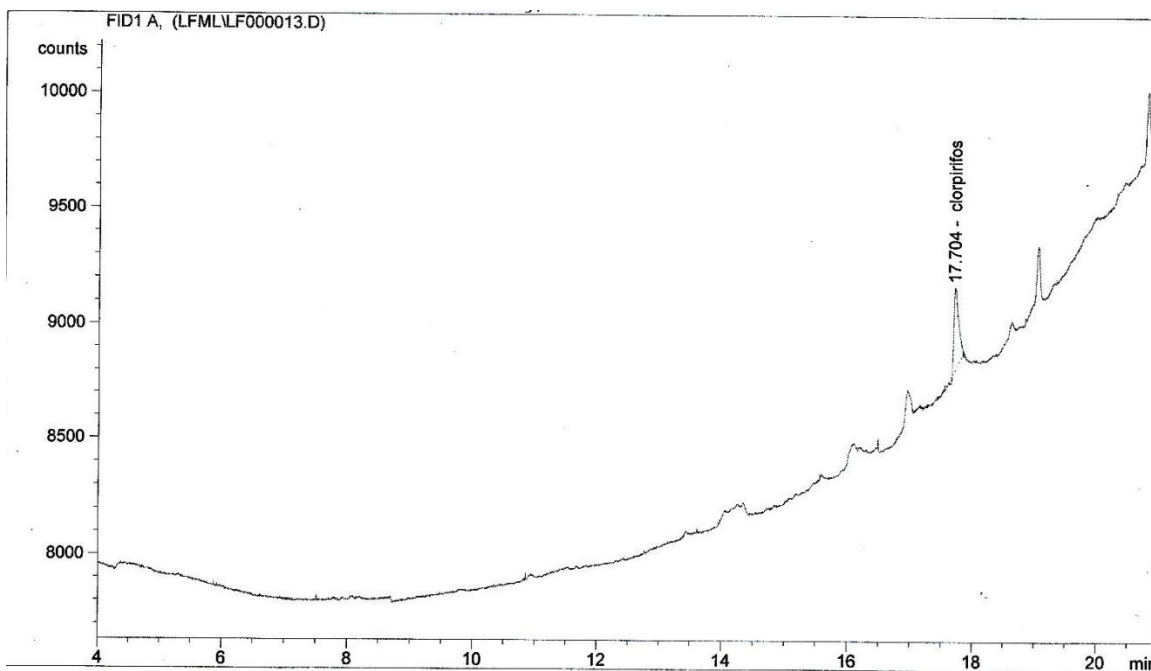
Anexo 8. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para *Bacillus sp.* Día 3



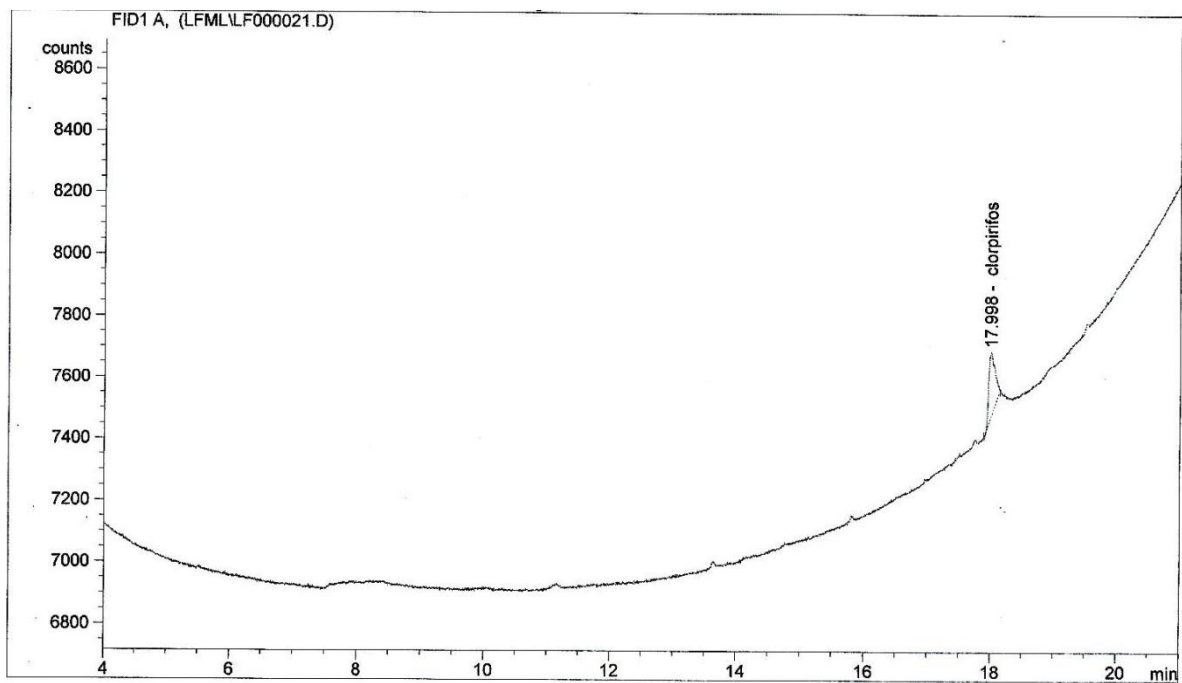
Anexo 9. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para *Bacillus* sp. Día 4



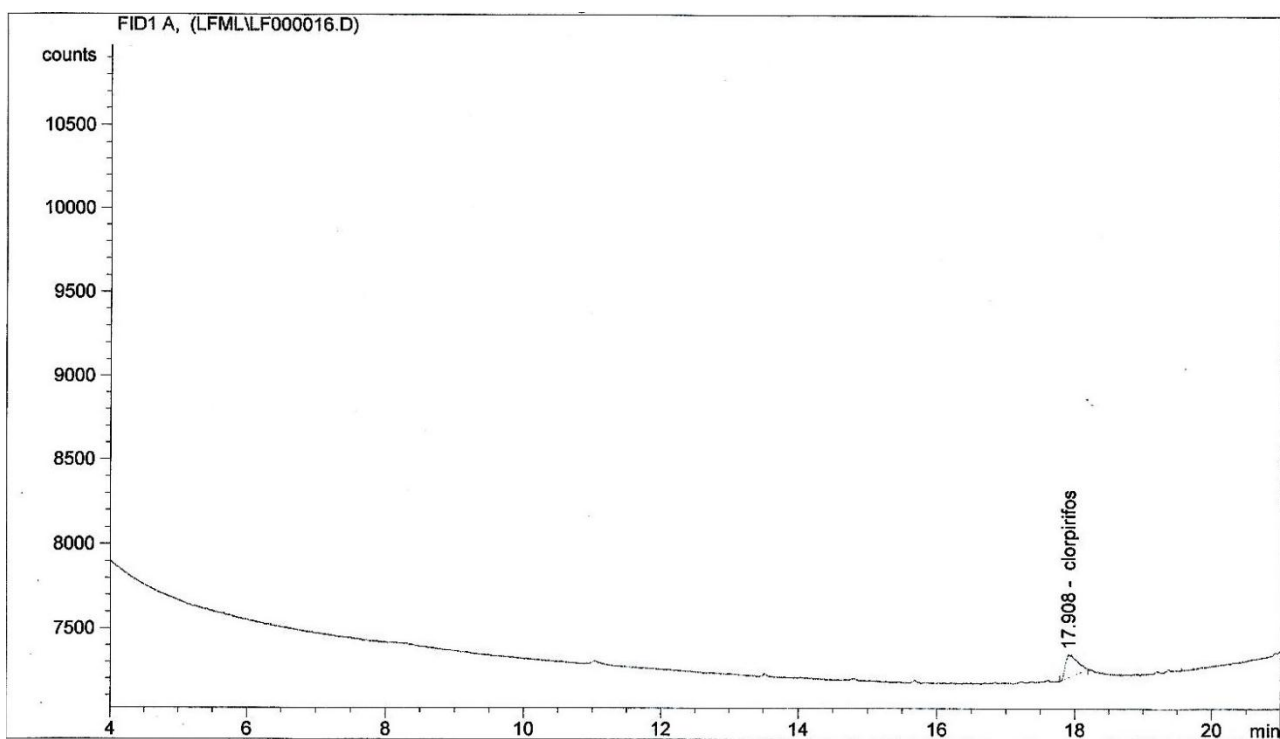
Anexo 10. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para *Pantoea agglomerans*. Día 1



Anexo 11. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para *Pantoea agglomerans*. Día 2



Anexo 12. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para *Pantoea agglomerans*. Día 3



Anexo 13. Cromatograma de concentración de Clorpirifos para *Pantoea agglomerans*. Día 4

