



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS CENTRO DE AGROECOLOGÍA

**MARCADORES MOLECULARES COMO INDICADORES DEL
USO DE CARBOFURAN EN SISTEMAS TRADICIONALES,
CONVENCIONALES Y AGROECOLÓGICOS**

TESIS PRESENTADA
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
EN: MANEJO SOSTENIBLE DE AGROECOSISTEMAS

PRESENTA

ING. AMBIENTAL JESSICA PÉREZ NAVA

ASESOR
DR. JOSÉ ANTONIO RIVERA TAPIA

Julio 2017



BUAP

La presente tesis, titulada: “**Marcadores moleculares como indicadores del uso de carbofuran en sistemas tradicionales, convencionales y agroecológicos**”, realizada por la alumna **Ing. Jessica Pérez Nava**, bajo la dirección del Comité Tutorial indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN
MANEJO SOSTENIBLE DE AGROECOSISTEMAS

COMITÉ TUTORAL:

DIRECTOR: _____ Dr.
José Antonio Rivera Tapia

ASESOR: _____
Dr. Omar Romero Arenas

ASESOR: _____
Dr. Fernando Hernández Aldana

ASESOR EXTERNO: _____
Dra. Lilia Cedillo Ramírez

REVISOR EXTERNO: _____
Dr. Primo Sánchez Morales

Puebla, Pue., Agosto de 2017.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Marcadores moleculares.....	1
1.2 Plaguicidas.....	2
1.3 Sistemas tradicionales, convencionales y agroecológicos.....	5
1.4 Agricultura en México.....	6
2. Antecedentes.....	9
3. Justificación.....	13
4. Objetivos.....	13
4.1 Objetivo General.....	13
4.2 Objetivos Particulares.....	13
5. Hipótesis.....	13
6. Materiales y Métodos.....	14
6.1 Áreas y técnicas de muestreo.....	14
6.2 Aislamiento e identificación bacteriana.....	16
6.3 Cuantificación de Biopelícula.....	16
6.4 Determinación de micronúcleos y otras anomalías nucleares.....	17
6.5 Extracción de ADN y PCR.....	17
6.6 Determinación del perfil proteico.....	18
6.7 Procesamiento muestras Primera Dimensión de proteínas.....	19
6.8 Cromatografía de gases.....	19

6.9 Determinación cualitativa y cuantitativa de carbofuran en las muestras de suelo por espectroscopia UV-vis.....	20
6.10 Caracterización físico-química de las muestras de suelo.....	21
7. Resultados.....	26
8. Discusión.....	44
9. Conclusiones.....	52
10. Referencias.....	53

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de ubicación de Vicente Guerrero, Tlaxcala.....	14
Figura 2. Mapa de ubicación Tezonapa, Veracruz.....	15
Figura 3. Mapa de ubicación San Pedro Cholula, Puebla.....	15
Figura 4. Mapa de las parcelas muestreadas en Vicente Guerrero.....	27
Figura 5. Mapa de la parcela muestreada en San Pedro Cholula.....	27
Figura 6. Mapa de la parcela muestreada en Xochitlán Todos Santos.....	28
Figura 7. Mapa del invernadero muestreado en Tezonapa.....	28
Figura 8 -10. Medio cromogénico para identificación bacteriana.....	29 y 30
Figura 11. Células que muestran micronúcleos y anomalías nucleares.....	33
Figura 12. Electroforesis de poliacrilamida de muestras concentradas.....	34
Figura 13. Electroforesis de poliacrilamida de muestras sin concentrar.....	35
Figura 14-20. Secuenciaciones aminoacídicas de los productos.....	36-38
Figura 21. Cromatograma del control impregnado con carbofuran.....	39
Figura 22. Espectro de masas de productos de degradación de carbofuran.....	40
Figura 23. Curva de calibración de carbofuran.....	41
Figura 24. Espectro UV-vis de las muestras M1-M7.....	42
Figura 25. Espectro UV-vis de la muestra M8.....	42

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas.....	3
Tabla 2. Superficie sembrada de cultivos por hectárea.....	7
Tabla 3. Unidades de producción en las localidades muestreadas.....	8
Tabla 4. Características de los campos de cultivo estudiados.....	26
Tabla 5. Identificación de géneros bacterianos de los suelos muestreados.....	28
Tabla 6. Clasificación de los cultivos para formar biopelículas.....	31
Tabla 7. Frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares.....	32
Tabla 8. Productos de degradación del carbofuran en muestra control.....	40
Tabla 9. Características fisicoquímicas de las muestras de suelo.....	43

Resumen

Determinar la presencia de carbofuran en agroecosistemas es importante, ya que este plaguicida tiene repercusiones negativas en el ambiente y la salud pública; las cifras en México reflejan alto consumo en producción agrícola. El identificar diversos marcadores moleculares, indica la actividad de los microorganismos y su relación con la degradación del carbofuran. Con el desarrollo de esta investigación se pretende realizar un diagnóstico capaz de identificar los agroecosistemas que están sumergidos en una problemática ambiental por el uso de plaguicidas, aun cuando en la actualidad no los usen directamente; generando de este modo un reconocimiento de suelo libre de carbamatos o resiliente a ellos por el buen uso de las tierras gracias a las prácticas agroecológicas que se lleven a cabo. A las muestras se les realizó el aislamiento e identificación bacteriana, cuantificación de formación de biopelículas, amplificación por PCR del gen *mcd*, determinación enzimática por perfiles proteicos, determinación de residuos de carbofuran por cromatografía de gases y espectro de masas, espectroscopia UV-vis con un máximo de absorbancia en 276 nm y caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo para medir fertilidad agrícola; además se realizó el ensayo de micronúcleos y otras anomalías nucleares en células de descamación del epitelio bucal de los productores. Los resultados obtenidos muestran a *Pseudomonas* sp., como el aislamiento más común, solo tres aislamientos mostraron ser formadores débiles de biopelículas, la amplificación del gen *mcd* fue negativa, sin embargo siete muestras presentaron la banda en el rango 70-85 kDa para la determinación enzimática, destacando en la secuenciación aminoacídica a las muestras M5 con un emparentamiento idéntico en la base de datos con *Acromobacter* sp. y *Klebsiella pneumoniae*. La presencia de residuos de carbofuran por cromatografía de gases fue negativa, pero por espectroscopia UV-vis cuatro muestras presentaron un máximo de absorbancia en 276 nm. La muestra M6 indicó tener los mejores niveles de nutrición. Ninguno de los productores muestreados genotóxicológicamente tuvo más de 6 micronúcleos.

Palabras clave: Carbofuran, agroecosistema, gen *mcd*, carbofuran hidrolasa, México.

Abstract

Determining the presence of carbofuran in agroecosystems is important, since this pesticide has negative repercussions on the environment and public health; the statistics in Mexico reflect high consumption in agricultural production. The identification of diverse molecular markers indicates the activity of the microorganisms and their relationship to the degradation of carbofuran. With the development of this research it is intended to make a diagnosis capable of identifying the agroecosystems that are involved in an environmental problem due to the use of pesticides, even though they are not used directly at present; thus generating a recognition of soil free of carbamates or resilient to them for the good use of the lands thanks to the agroecological practices that are carried out. The total of the samples were identified, biofilm formation was quantified, PCR amplification of the *mcd* gene, enzymatic determination by protein profiles, determination of carbofuran residues by gas chromatography and mass spectrum, UV-vis spectroscopy with a maximum absorbance at 276 nm and physicochemical characterization of soil samples to measure agricultural fertility; plus the micronucleus test and other nuclear abnormalities in exfoliated cells of oral epithelium of the producers was made. The results obtained show that *Pseudomonas* sp., as the most common isolate, only three isolates showed to be weak formers of biofilms, the amplification of the gene *mcd* was negative, however seven samples presented the band in the range 70-85 kDa for the determination enzymatic, emphasizing in amino acid sequencing the M5 samples with an identical linkage in the database with *Acromobacter* sp. and *Klebsiella pneumoniae*. The presence of carbofuran residues by gas chromatography was negative, but by UV-vis spectroscopy four samples showed a maximum absorbance at 276 nm. The sample M6 indicated to have the best levels of nutrition. None of the genotoxicologically sampled producers had more than 6 micronucleus.

Key words: Carbofuran, agro-ecosystem, *mcd* gen, carbofuran hydrolase, Mexico.

1. Introducción

1.1 Marcadores moleculares

Estudios realizados a nivel mundial indican que la capacidad de degradación de la mayoría de los microorganismos se debe a la presencia de plásmidos que codifican enzimas permitiendo así degradar xenobióticos, plaguicidas N-metilcarbamatos y otros, identificándose plásmidos con tamaños circulares pequeños de <50 - >400 kilobases (Kb) y grandes >500, 240 y 180 kb conteniendo genes que codifican enzimas para la degradación de compuestos aromáticos (Basta *et al.*, 2004). Por otra parte, los plásmidos presentan modificaciones genéticas masivas, como ha sido descrito para bacterias degradadoras de carbofuran, estas principales modificaciones fueron observadas en la transferencia por conjugación del plásmido pNL1 a *Sphingomonas* sp. HH69 y pBN6 a *Sphingomonas* sp., SS3, donde el plásmido recibido experimentó alteraciones significativas en el tamaño (Basta *et al.*, 2004).

Los plásmidos bacterianos, por tanto, son importantes en la naturaleza por su diversidad genética, debido a que contribuyen a la degradación de agentes químicos recalcitrantes, producción de antibióticos, resistencia y factores de virulencia.

Dentro de los principales factores que influyen en la degradación de los residuos de plaguicidas a compuestos biológicamente inactivos destacan las abundantes poblaciones de microorganismos (Kuhr *et al.*, 1974); por otro lado los distintos indicadores microbiológicos de esta actividad enzimática nos ayudan a conocer la calidad del suelo, teniendo que los indicadores deben ser fácilmente medibles, sensibles al estrés, tener una baja variabilidad, ser anticipatorios y responder de forma predecible; sin embargo este paso es sumamente complicado por el dinamismo del suelo debido a los procesos geológicos y geoquímicos que muestran una elevada heterogeneidad espacial-temporal haciendo los mecanismos altamente cambiables, por lo que la apropiada selección de estos indicadores será clave para lograr el éxito en las prácticas de manejo con el suelo en particular (Ochoa *et al.*, 2007). Es muy importante reconocer que los indicadores microbiológicos del suelo son aquellos relacionados de forma directa o

indirecta con la estructura y función de los microorganismos; las enzimas son marcadores genéticos que presentan interacción con diversos agroquímicos, jugando un papel importante en el funcionamiento de los ecosistemas por su participación en los procesos enzimáticos, además de su respuesta eficaz a perturbaciones por su rápida adaptación a las condiciones ambientales.

1.2 Plaguicidas

El uso de plaguicidas en los últimos años han desencadenado eventos de importancia epidemiológica, estudios realizados durante el siglo pasado revelaron que el uso de estos productos causó cerca de 375000 intoxicaciones y 10000 muertes anuales solo en agricultores a nivel mundial (Portilla *et al.*, 2014), y aunque en los últimos años los consumidores de esos agroquímicos conocen las consecuencias derivadas de su uso, prefieren simplemente ignorarla por no contar con la protección adecuada para la realización de la fumigación. Desde la perspectiva de la sociedad es importante conocer la relación entre el uso de los agroquímicos y sus actores, para lograr determinar quién debe analizar los casos de contaminación en las personas, ya sea por especialistas en sustancias tóxicas o por profesionales del área de la salud y de este modo establecer quien asumirá los costos de las afectaciones en la salud por el uso de agroquímicos (Mora, 2014); desafortunadamente y a pesar de las regulaciones sobre el uso de plaguicidas, y de que estos representan un grave problema de salud para los agricultores y las poblaciones expuestas en general. Actualmente las afectaciones ambientales predominantes en los rubros de suelos y aguas han sido tomadas en cuenta como resultado de una mayor conciencia ambiental (Devine *et al.*, 2008), sin embargo las afectaciones del uso de los plaguicidas seguirá teniendo un efecto negativo si las regulaciones de estos usos siguen evadiéndose de forma exponencial (Ortiz *et al.*, 2013), además representan un grave problema de salud para los trabajadores y poblaciones expuestas. Puede decirse, que la vida media de gran parte de los plaguicidas aplicados en la actualidad es relativamente corta; sin embargo sus residuos o subproductos pueden mantenerse en los productos hasta el momento de ser consumidos, esto se debe a que cuando el plaguicida es

liberado este interacciona con los componentes bióticos y abióticos del ambiente, teniendo transformaciones en su estructura capaces de modificar su acción biológica, esta degradación del plaguicida da lugar a nuevos compuestos no necesariamente menos tóxicos que el original, de este modo se deriva una activación y por lo tanto un nivel de toxicidad mayor (Kuhr *et al.*, 1974).

Los plaguicidas se dividen en orgánicos, inorgánicos y biológicos, los que presentan una estructura molecular orgánica pueden dividirse en organoclorados, organofosforados, piretroides y carbamatos (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas

Organismo que controlan	Usos al que se destinan	Modo de acción	Composición química
Insecticida	Agrícolas	Por contacto	Orgánicos
Acaricida	Forestales	Por ingestión	Organofosforados
Fungicida	Urbanos	Sistémico	Carbamatos
Bactericida	Jardinería	Fumigante	Organoclorados
Antibiótico	Pecuarios	Repelente	Piretroides
Herbicida	Domésticos	Defoliante	Inorgánicos
Rodenticida	Industriales		Biológicos
Molusquicida			

Fuente: (Ortiz *et al.*, 2013)

Estos compuestos son catalogados en general como contaminantes orgánicos persistentes por su resistencia a la fotodegradación y degradación biológica y química (Ortiz *et al.*, 2013) presentando efectos crónicos por su capacidad de bioacumulación.

Los plaguicidas organoclorados fueron de los primeros con el fin de ser utilizados en la agricultura durante los años 40's (Devine *et al.*, 2008), sin embargo la capacidad para acumularse en los tejidos adiposos es considerablemente alta por lo que debían ser sustituidos por compuestos menos persistentes como los organofosforados los cuales entraron al mercado en los años 50's (Devine *et al.*, 2008) con el mismo fin que los organoclorados además de adoptarlos a nivel doméstico; a pesar de su baja capacidad de acumulación, sus propiedades en el control de plagas, los sitios de disposición cercanos a los campos de cultivo así

como los sitios de almacenamiento, representan un grave problema de contaminación (Ortiz y Sánchez, 2010), por todas estas complicaciones se llevó a la tarea de utilizar compuestos de fácil degradación que no representaran una problemática grave en todo su ciclo de acción, por lo que el uso de carbamatos a mediados de los años 50's fue una excelente sustitución de los mencionados previamente, estos compuestos son derivados del ácido carbámico, el cual puede ser degradado por exposición al sol de forma rápida, además de que no son bioacumulables a pesar de ser liposolubles y la gran mayoría de estos presenta un nivel de toxicidad mediana y baja, con excepción del aldicarb y el carbofuran, temik y furadan por su nombre comercial respectivamente, los cuales representan una elevada toxicidad para el hombre (Ortiz *et al.*, 2013), causando en la mayoría de los casos depresión respiratoria combinada con edema pulmonar provocando la muerte por el envenenamiento de estos compuestos, a pesar de que no penetren eficazmente al sistema nervioso central (Lifshitz *et al.*, 1997); además de estar relacionado con parámetros de infertilidad en hombres (Paparella *et al.*, 2011) por ser los principales trabajadores del campo. En los sistemas tradicionales y agroecológicos el uso de estos compuestos no representa ningún inconveniente por su mínimo o nulo uso de los mismos, esto se debe a que dichos ecosistemas se desarrollaron dentro del concepto útil en una disciplina de productividad (Turrent, 1980) sin tener impactos negativos, gracias a que este tipo de agricultura existía desde antes del desarrollo de paquetes tecnológicos (Borlaug y Dowswell, 2005), considerándose como una agricultura biológica, pero a medida que progresa el conocimiento y se modernizan los sistemas de producción agrícola, los principios ecológicos son fácilmente ignorados, lo que provoca que los sistemas principalmente tradicionales se vean vulnerables, aumentando la expansión de los sistemas convencionales, generando inestabilidad que se ve reflejada en el surgimiento de plagas agrícolas y enfermedades en los cultivos (Altieri, 1994), incentivando al productor al aumento en el uso de plaguicidas, ocasionando importantes reducciones en el rendimiento y pérdidas económicas millonarias a nivel mundial (Sarmiento, 1974).

1.3 Sistemas tradicionales, convencionales y agroecológicos

Un sistema tradicional es aquel que no depende de las compras externas, utilizando los recursos disponibles locales y renovables de modo que acentúa el reciclaje de nutrientes, adaptándose a las condiciones locales tomando las ventajas totales de los microambientes, este maximiza la producción a la vez que sostiene la capacidad productiva por la diversidad espacial y temporal para resolver primero las necesidades locales, conservando la diversidad genética local y el conocimiento de las culturas indígenas (Gliessman, 2002), a diferencia de un sistema convencional el cual intensifica la agricultura con el fin de incrementar el rendimiento de los cultivos, de modo que el sistema agroecológico se sitúa en una producción intermedia logrando abastecer las necesidades alimentarias sin dejar de lado la importancia del ecosistema (Altieri y Toledo, 2011) de forma que no se realiza el aumento de producción con la simplificación de los sistemas agrícolas, como en el caso de los sistemas convencionales generando monocultivos además de una mayor dependencia de los aportes externos, por el uso extensivo e intensivo de plaguicidas y fertilizantes que provocan la contaminación de los ecosistemas naturales asociados a los sistemas agrícolas, disminuyendo el área de distribución y la abundancia de animales y plantas que habitan en ellos, así como de especies y variedades cultivadas (Sans, 2007); generándose entonces la pregunta en cuanto a si la agricultura tradicional será capaz de sacar a la agricultura convencional del estado de crisis en que se encuentra (Rosset, 1989), partiendo de dos opciones que existen al interior del movimiento agrícola alternativo; la sustitución de insumos y la transformación agroecológica de los sistemas de producción, generando que los principios agroecológicos den una respuesta acertada logrando que las enseñanzas tradicionales retomen la importancia para una agricultura sustentable (Boege, 2008), evitando de esta forma el uso intensivo de agrotóxicos en los suelos agrícolas.

1.4 Agricultura en México

En la actualidad México se encuentra inmerso en una problemática debido al tipo de uso de suelo, en particular la agricultura del país se centra en la siembra intensiva; en la cual los cultivos predominantes son cereales; destacando al maíz, leguminosas, frutales y hortalizas. Este tipo de agricultura se organiza en relación al espacio y tipo de desarrollo tecnológico, puesto que para su producción es necesario el uso de paquetes tecnológicos a gran escala, así como las grandes extensiones de tierra manipuladas por la maquinaria en ausencia de poblaciones circundantes; provocando la pérdida de productividad del suelo (Xolocotzi, 1988), por la producción de un solo cultivo (monocultivo). Sin embargo este tipo de agricultura depende principalmente de la demanda del mercado mundial, ocupando las mejores tierras en cultivos que no son básicos para la alimentación nacional, destinando los productos a la exportación principalmente. La agricultura en el estado de Tlaxcala corresponde a la tercera actividad económica más importante del estado; siendo esta de temporal gracias a que el clima de la región con lluvias regulares durante los meses de julio a septiembre favorecen el desarrollo efectivo de importantes cultivos destacando: maíz, haba, frijol, lechuga, espinaca, amaranto, alfalfa, ajo, cebolla y col; en Puebla por el contrario la agricultura representa tan solo el 6.5% de la economía del estado en combinación con la ganadería y la pesca, generando tan solo el 3.7% de la producción nacional de estos sectores, provocando un retroceso en este ramo en comparación a otros años; la superficie sembrada de aproximadamente 100 mil ha representa la cuarta parte de la superficie del estado, y comprende principalmente agricultura de temporal, destacando los cultivos de: maíz, café cereza, caña de azúcar, alfalfa y tomate verde entre otros. Actualmente el estado de Veracruz presenta una producción agrícola alta y variada, ligada principalmente al temporal. Ocupa un lugar destacado por el número que genera de productos básicos, entre ellos arroz, chile verde, haba y papa; de frutales, naranja, plátano y mango; y de productos industrializables como caña de azúcar, café y tabaco. La agricultura de temporal es la dominante, su producción se consigue al sembrar en ciclos cortos (especialmente el de primavera-verano). Los cultivos agrícolas principales son:

maíz, frijol, sorgo, arroz palay, café oro, naranja, mango, plátano, piña, limón agrio, mandarina, papaya, toronja, ciruela de almendra y coco, además de tabaco, hule hevea, vainilla, chile verde, papa y sandía (INEGI, 2011). La alta productividad de la agricultura de temporal se debe, primeramente, a la buena precipitación y a que los suelos en llanuras, lomeríos y valles cuentan con las condiciones apropiadas para el buen desarrollo de los cultivos.

De acuerdo a datos con el SIAP (2015), las hectáreas producidas en los estados antes mencionados se distribuyen en relación a su productividad económica de modo que las cifras de producción estatal no siempre representan la productividad de unidad de producción por convicción si no la necesidad de lograr un status dentro de la productividad agrícola desde la percepción económica, en las Tablas (2 y 3), se presentan los datos de producción por estado así como las unidades de producción de las localidades que fungieron como sitios de muestreo.

Tabla 2. Superficie sembrada de cultivos por hectárea

Estado	Cultivo	Superficie en ha			Producción obtenida (ha)	Rendimiento obtenido (Ton/ha)
		Sembrada	Cosechada	Siniestrada		
Tlaxcala	Maíz	137,177	137,177	0	419,505	3.058
	Tomate verde	1252	1252	0	22616	18.064
	Tomate rojo	66	66	0	4941	74.864
	Trigo	19295	19295	0	51860	2.688
Puebla	Maíz	565618	556794	885	1049.111	1.884
	Frijol	57209	57208	1	45691	0.799
	Alfalfa	135	57	78	1715	29.935
	Frutales*	16090				
	Cebada grano	30129	30129	0	72388	2.403
	Avena forrajera	8497	8497	0	103970	12.237
	Caña de azúcar	197325	107024	90301	6955867	64.993
Veracruz	Café	144537	104437	40137	142793	1.367
	Plátano	15429	7161	8268	30351	4.239
	Maíz	585392	580243	5149	1271294	2.191
	Limón	37844	17354	20490	26025	1.5

* Árboles frutales no cítricos (aguacate, durazno, manzana, nuez y pera)

Fuente: Pérez-Nava J, con datos obtenidos del SIAP (2015)

Tabla 3. Unidades de Producción en las localidades muestreadas

Localidad	Cultivo	Unidades de Producción (UP) Agrícola	Total de UP para actividad agrícola	Total de UP para actividad agropecuaria	Total de UP
Vicente Guerrero	Maíz	12	16	9	25
	Tomate verde	1			
	Tomate rojo	1			
	Trigo	2			
Cholula	Maíz	19	19	8	27
Xochitlán	Maíz	632	875	268	1143
	Frijol	162			
	Alfalfa	66			
	Frutales no cítricos	7			
	Cebada grano	2			
Avena forrajera	1				
Tezonapa	Caña de azúcar	76	113	14	127
	Café	25			
	Plátano	9			
	Maíz	2			
	Limón	1			

Fuente: Pérez-Nava J, con datos obtenidos de INEGI (2011).

2. Antecedentes

En la naturaleza existe una diversidad microbiana con capacidad de degradar plaguicidas del tipo carbamatos por medio de vías de degradación oxidante y/o hidrolítica. Siendo necesario identificar algunos marcadores moleculares y sus productos de degradación relacionados a los plaguicidas carbamatos, que son desconocidos y su impacto que pueden implicar desde el punto de vista de sus efectos negativos en los agroecosistemas y en salud pública.

Estudios al respecto se han centrado en las enzimas carbamato hidrolasas, encontrando diferencias en los aislados microbianos de donde se han estudiado, permitiendo identificar genes ubicados en diversos plásmidos, los cuales pueden ser transferidos entre diferentes especies o sólo entre la misma especie (Castellanos y Rache 2013).

Topp *et al.*, (1993) y Desaint *et al.*, (2000) caracterizaron 55 bacterias con historiales de tratamiento con N-metilcarbamatos con perfiles plasmídicos diferentes, con un tamaño entre 84 y 438 kb; sin embargo el 60% de los plásmidos tuvieron perfiles plasmídicos similares con tamaños mayores a 330 kb.

Recientemente se reportó la transformación de *Sphingomonas* sp CDS-1, que degrada carbofuran, con el gen paration metil hidrolasa (*mpd*) que le confería además a este microorganismo, la capacidad de degradar simultáneamente paratión metílico (PM), de este se han identificado y clonado alrededor de 300 genes que se han encontrado en los plásmidos y que están involucrados en el catabolismo de aromáticos (Xu *et al.*, 2011).

Otro ejemplo importante se encuentra en *Achromobacter* sp WM111, en donde se identificó y clono el gen (*mcd*), que codifica la enzima metilcarbamato hidrolasa encargada de degradar el plaguicida carbofuran. El gen *mcd* fue localizado en un plásmido (pPDL11) de 100 kb encontrándose que bacterias encargadas de degradar carbofuran tienen secuencia homóloga con el gen *mcd* (Parekh *et al.*, 1996) realizando una comparación entre la proteína recombinante de 77 kDa de *Pseudomonas putida* y la proteína purificada carbofuran hidrolasa de *Achromobacter* cepa WM111 observando bandas idénticas (Hashimoto *et al.*,

2006), determinando que los genes clonados codificaban la enzima carbofuran hidrolasa responsable de la hidrólisis primaria del carbofuran.

Tomasek y Karns (1989) clonaron el gen *mcd* de *Achromobacter* sp WM111, el cual codifica para carbofuran hidrolasa, encontrándose en un plásmido de 100 kb nombrado pPDL11.

Parekh *et al.*, (1996) determinaron la homología entre 24 plásmidos de suelos geográficamente diferentes que degradaban carbofuran, utilizando el plásmido pPDL11 como una sonda de ADN.

Algunos microorganismos como *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacterium* y *Burkholderia* son conocidos como degradadores de carbofuran (Chapalamadugu *et al.*, 1992; Chaudhry *et al.*, 1988), sin embargo el crecimiento de la población microbiana capaz de lograr la degradación aumenta en proporción al incremento de la concentración de los plaguicidas en los suelos (Head *et al.*, 1992; Karpouzas *et al.*, 2000).

Shin *et al.*, (2011), aislaron 37 bacterias degradadoras de carbofuran en suelos de arroz, los cuales han sido tratados en los últimos años por plaguicidas; estas bacterias fueron analizadas en una secuencia de 16S ADNr y por sus patrones de cromosomas mediante REP-PCR, describiendo de esta forma su diversidad genética y fisiológica.

Ogram *et al.*, (2000) aislaron dos cepas de *Sphingomonas* de suelos con diferentes concentraciones de exposición a carbofuran, encontrando que ambas cepas metabolizan carbofuran así como el desarrollo de la degradación del carbofuran por las bacterias del suelo y las relaciones entre los plásmidos que se encuentran en dichas bacterias.

Hashimoto *et al.*, (2002) clonaron el gen *cehA* de *Rhizobium* sp., AC100, la cual es capaz de degradar carbaryl identificando la secuencia de nucleótidos en la región de 10 kb, donde se identificó que el gen *cehA* posee dos copias de la inserción similar, determinando que el gen es un transposon compuesto.

Hayatsu *et al.*, (1999 y 2001), caracterizaron la cepa RC100 de *Arthrobacter* sp., capaz de degradar carbaryl, utilizándolo como única fuente de carbón, identificando además que la degradación del carbaryl esta codificada por dos

plásmidos distintos, posterior a esta caracterización la purificaron de la enzima carbaryl hidrolasa de la misma cepa, la cual tiene la capacidad de iniciar el proceso de degradación en los suelos contaminados por el uso de carbaryl como plaguicida.

Recientemente, Seffernick *et al.*, (2001) determinaron de que la enzima deaminasa de melamina (TriA) obtenida de *Pseudomonas* sp., NRLLB-12227 es 98% idéntica a la enzima cloro-hidrolasa atrazina (AtzA) obtenida de *Pseudomonas* sp., ADP, identificando que los genes capaces de degradar atrazina de ambas cepas se encuentran en un único plásmido transmisible PADP-1.

3. Justificación

El uso indiscriminado de productos químicos utilizados como plaguicidas en plantíos de diversas especies, causa un impacto negativo en el ambiente, favoreciendo el deterioro del mismo; en la actualidad se han aprobado nuevas reglamentaciones que pretenden discontinuar el uso de estos productos; sin embargo no se toman cartas en el asunto por la gran necesidad existente entre los productores de controlar ciertas plagas con la finalidad de evitar pérdidas en la producción y por consiguiente que sus ingresos se vean afectados. Es importante conocer que el singular uso de estos productos no solo tiene repercusiones a corto plazo por lo que en muchas ocasiones los daños se observan con el paso del tiempo siendo persistentes en la salud humana, debido a que la agricultura sigue siendo aún una de las actividades productivas con menor grado de restricción ambiental, aun comparado con las grandes industrias y el transporte, lo que genera el aumento de agrotóxicos utilizados en la actualidad.

Es de conocimiento universal que México es uno de los países denominados Megadiversos por la gran diversidad encontrada en él; con el uso intensivo de plaguicidas se ha logrado disminuir la calidad del suelo, la extinción exponencial de especies y por si fuera poco genera la contaminación de alimentos con residuos de estos productos, evitando que el sistema agrario logre la agricultura ecológica por la incapacidad de generar alimentos de calidad, sin mencionar el deterioro al ambiente.

Es por estas razones que con el desarrollo de este trabajo se pretende realizar un diagnóstico capaz de identificar los agroecosistemas que se encuentren sumergidos en la problemática de residuos de plaguicidas, aun cuando en la actualidad no se estén utilizando, generando así un reconocimiento de un suelo libre de carbamatos o resiliente a ellos por el buen uso de las tierras gracias a las prácticas agroecológicas que se lleven a cabo, o en caso contrario proponer el desuso de plaguicidas por los efectos causados por los residuos generados.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar el uso de carbofuran por medio de marcadores moleculares en muestras de suelos a partir de sistemas tradicionales, convencionales y agroecológicos de los estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz.

4.2 Objetivos particulares

4.2.1. Aislar e identificar géneros bacterianos a partir de suelos de sistemas tradicionales, convencionales y agroecológicos.

4.2.2. Determinar la formación de biopelículas de los aislamientos bacterianos.

4.2.3. Identificar y cuantificar la presencia de micronúcleos y otras anomalías nucleares en células de descamación del epitelio bucal de productores.

4.2.4. Monitorear la presencia del gen *mcd* y/o la enzima carbofuran hidrolasa (85 kDa) a partir de los aislamientos bacterianos en los sistemas.

4.2.5. Determinar por cromatografía de gases la presencia de residuos e intermediarios de degradación de carbofuran.

4.2.6. Determinar espectrofotométricamente la presencia de carbofuran en las muestras de suelos.

4.2.7. Caracterizar físico-químicamente las muestras de suelos.

5. Hipótesis

El uso de carbofuran en sistemas tradicionales, convencionales y agroecológicos puede ser determinado por la detección de marcadores moleculares, tanto en la carga bacteriana del suelo y/o directamente en el suelo.

6. Materiales y Métodos

6.1 Áreas y técnicas de muestreo

Las parcelas donde se realizó el muestreo de suelo se encuentran ubicadas en Vicente Guerrero, perteneciente al municipio de Españaíta, Tlaxcala (Fig. 1), cuyas coordenadas GPS son las siguientes: longitud (dec): -98.489722, latitud (dec): 19.422500 y altitud 2520 msnm; Tezonapa perteneciente al municipio de Veracruz (Fig. 2), en las coordenadas GPS: longitud (dec): -96.78840, latitud (dec): 18.53048 y altitud 219 msnm; Xochitlán Todos Santos (Fig. 3), ubicado en las coordenadas GPS: longitud (dec): -97.775833, latitud (dec): 18.705278 y altitud 1860 msnm y San Pedro Cholula (Fig. 4), localizado en las coordenadas GPS: longitud (dec): -98.31655, latitud (dec): 19.09833 y altitud 2250 msnm; ambos municipios pertenecientes al estado de Puebla. Las muestras fueron tomadas de 8 parcelas de sistemas tradicionales, agroecológicos y convencionales distribuidas entre las poblaciones antes mencionadas, se colectaron 2 Kg de suelo; el muestreo se realizó de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000, en la cual se indica que la toma de muestra para suelos agrícolas debe ser de 0-15 cm de profundidad.

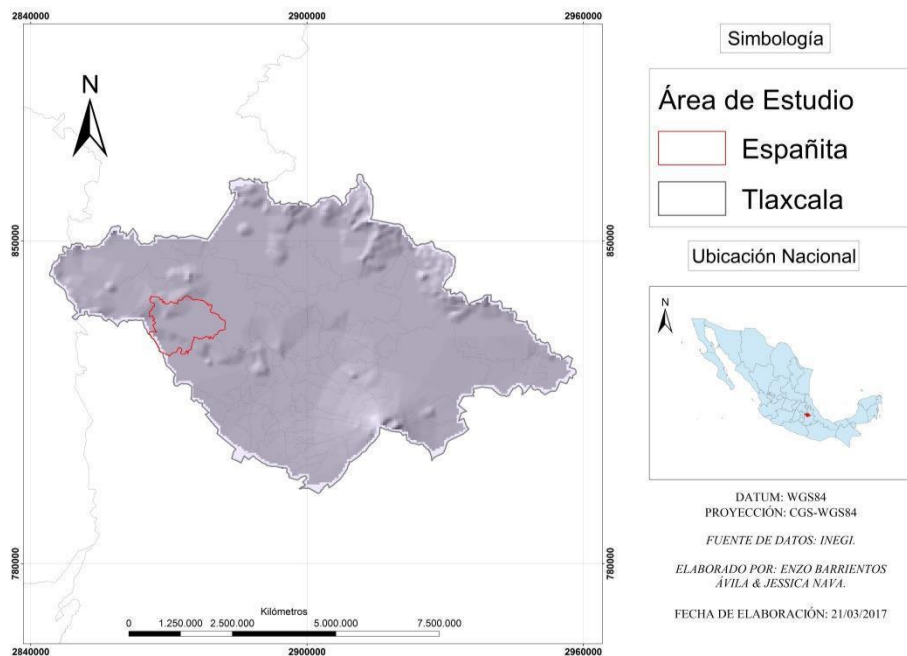


Figura 1. Mapa de ubicación de Vicente Guerrero, Españaíta-Tlaxcala, México.

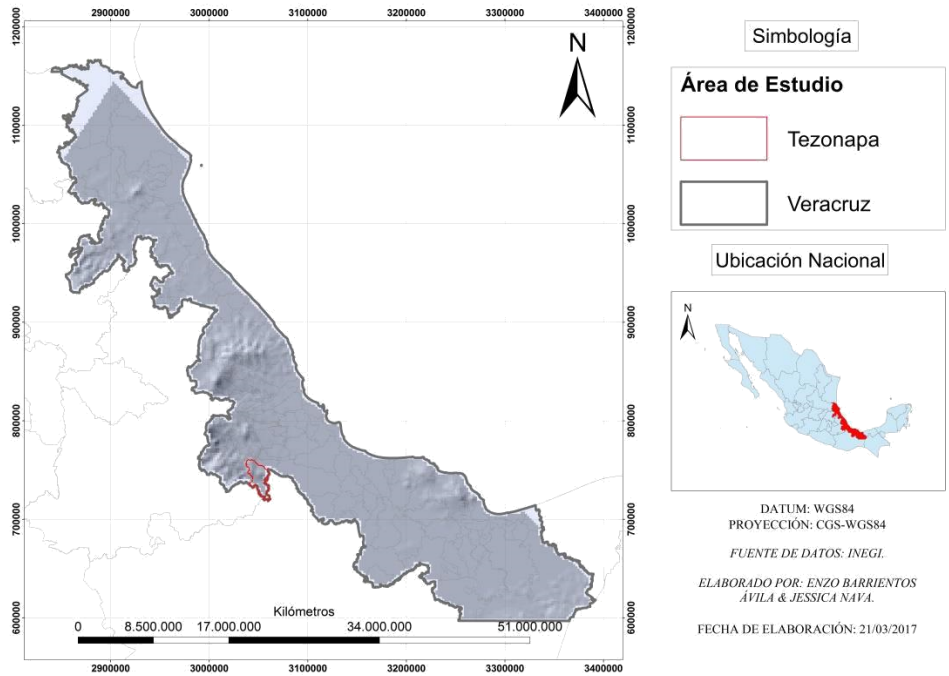


Figura 2. Mapa de ubicación de Tezonapa, Veracruz, México.

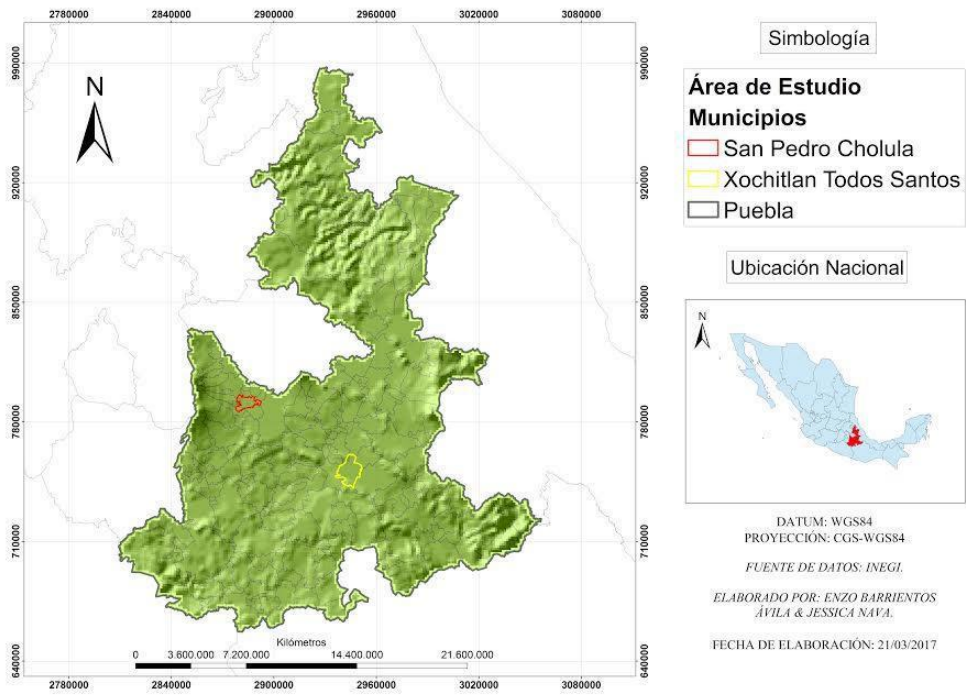


Figura 3. Mapa de ubicación Xochitlán Todos Santos y San Pedro Cholula, Puebla, México.

6.2 Aislamiento e identificación bacteriana

A partir de las muestras de suelo colectadas, se realizó el aislamiento bacteriano bajo el siguiente esquema: 5 g de cada una de las muestras de suelo se resuspendieron en 50 mL del medio de sales minerales (MM) (Yan *et al.*, 2007), adicionado con carbofuran [100 ppm] pH 7 como única fuente de carbono, dejando en agitación a 180 rpm/48 h. Posteriormente de los caldos resultantes se sembraron 10 µL por estría en agar MM (Tomasek y Karns, 1989) adicionado con carbofuran [100 ppm] pH 7, incubándose a 35°C/48 h. Este mismo esquema de trabajo se realizó utilizando el medio Luria-Bertani (LB) suplementado. Las colonias aisladas, tanto del medio MM y LB, se identificaron con el medio cromogénico Compact Dry “Nissui” EC.

6.3 Cuantificación de biopelícula

Se crecieron cada uno de los aislamientos bacterianos en caldo nutritivo a 37°C durante 24 horas, en microplacas de 96 pozos se colocaron 100 µL de caldo nutritivo más 100 µL del cultivo, por triplicado, además de incluir el control negativo (200 µL de caldo nutritivo libre de cultivo bacteriano en cada pozo por triplicado), incubándose a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a eliminar el contenido de las placas, lavando con agua desionizada. Seguidamente se agregaron a cada pozo 250 µL de cristal violeta al 1% durante 5 min. Se eliminó el exceso de colorante enjuagándolo con agua desionizada, posteriormente se agregaron a cada pozo 250 µL de etanol al 99%. Se leyó la densidad óptica a 630 nm utilizando un lector de placas Poweam WHYM201.

El punto de corte (DOC) y la clasificación de los aislamientos fueron definidos en base a las recomendaciones de Stephanovic *et al.* (2004), el DOC está conformado por el promedio de las densidades ópticas obtenidas en los controles negativos más tres desviaciones estándar. Se consideran como no productoras de biopelícula aquellos aislamientos con una DO inferior al DOC, productores débiles aquellas con una DO superior a DOC e inferior a 2DOC, moderadas aquellas que presentan una DO entre 2DOC y 4DOC y fuertemente productoras aquellas que presentan una DO superior a 4DOC.

6.4 Determinación de micronúcleos (MN) y otras anomalías nucleares (AN)

La toma de muestra se realizó de acuerdo a la técnica estandarizada por Fenech (2000); se humedecieron abatelenguas para realizar un raspado de las paredes internas de la cavidad bucal de los productores, estas muestras fueron extendidas en portaobjetos, dejándose secar a temperatura ambiente durante 10 min. Las muestras fueron fijadas con una solución de metanol-ácido acético (3:1) y posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente.

Hidrólisis

Las laminillas fueron colocadas durante 10 min en agua a temperatura ambiente, posteriormente se colocaron dentro de una solución de ácido clorhídrico (HCl) 1N a temperatura ambiente, y la misma solución a 60°C, ambas durante 10 min, enseguida se colocaron en agua desionizada por 10 min, finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente. Las laminillas fueron colocadas en una caja Koplin con reactivo de Schiff durante 90 min en refrigeración con el objetivo de realizar la tinción, una vez transcurrido el tiempo las laminillas se enjuagaron y secaron a temperatura ambiente. Para realizar la cuantificación las laminillas fueron observadas en el microscopio con objetivo de 40 aumentos contabilizando 1000 células, identificando las que presentaran MN y AN.

6.5 Extracción de ADN y PCR

Las muestras bacterianas aisladas se crecieron en los medios MM y LB con la finalidad de obtener crecimientos masivos y someterlos a extracción de ADN, utilizando el kit ZR Fungal/bacterial DNA MiniPrep D6005.

Para realizar la amplificación del gen *mcd* que codifica para carbofuran (Parekh *et al.*, 1996), se utilizaron los oligos *mcdL1* (5' CAA GAA CTC AAA TCC ATC TAC CTT GCC C 3') y *mcdR1* (5' ATC CTT CCC TCG GAA TGA ATC GTC TCG 3') que amplifican un fragmento de 561 pares de bases (Shin *et al.*, 2012).

La mezcla de reacción para realizar la amplificación del fragmento del gen *mcd* por PCR contiene un volumen final de 50 μ L (incluyendo 10 μ L de Pyro StartTM Fast PCR Master Mix 2X, 32 μ L de agua, 1.5 μ L del primer *mcd*L1, 1.5 μ L del primer *mcd*R1, y 5 μ L del ADN a analizar). La amplificación se realizó en un termociclador Techne TC-412 bajo el siguiente esquema: un ciclo de preamplificación a 94°C/ 5 min para la desnaturalización del ADN, seguido de un ciclo 65°C/ 1 min y 74°C/ 1 min respectivamente, para la amplificación se realizaron 29 ciclos de 94°C/ 1 min, 65°C/ 1 min y una extensión a 74°C/ 1 min, seguido de una extensión final a 74°C/ 5 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1.5% en una cámara de electroforesis durante 40 min a 100 V en una solución buffer TBE (Parekh *et al.*, 1996), los geles se tiñeron con bromuro de etidio y fueron visualizados a través de un fotodocumentador.

6.6 Determinación del perfil protéico

La determinación del perfil protéico se realizó una vez obtenidas las colonias aisladas, corriendo las muestras en geles desnaturalizados de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), a una concentración del 10% y utilizando un marcador de peso molecular All Blue (BioRad). Se obtuvo un concentrado de cada uno de los extractos hidratados con 1 mL de agua especializada agregándoles el colorante azul de bromofenol, enseguida se introdujeron en un baño a 100°C/3 min. La muestra se cargó en un gel de SDS-PAGE al 10% (34.5:1 acrilamida-bisacrilamida) y se corrió a 40 mV durante 30 min para permitir el alineamiento de la muestra y posteriormente 150 min a 80 mV. El gel se tiñó en una solución 50% (v/v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético glacial y 0.25% de azul de Comassie durante 120 min. El colorante no fijado se eliminó con una solución al 15% (v/v) de ácido acético glacial y 20% (v/v) de metanol. Los geles obtenidos se someten a un analizador de imágenes BioImaging Systems, MiniBisPro, secándose y almacenándose.

6.7 Procesamiento muestras Primera Dimensión de proteínas

Las bandas fueron cortadas manualmente y reducidas con DTT 10 mM, alquiladas con yodoacetamida 100 mM y desteñidas con ACN: NH_4HCO_3 50 mM (50:50 v/v), La digestión proteica se llevó a cabo durante 18 horas a 37°C con tripsina grado masas (Promega V528A). Se extrajeron los péptidos obtenidos de la digestión (ACN: H_2O : ácido fórmico 50:45:5 v/v), se disminuyó el volumen de la muestra en un concentrador (Eppendorf 5301) y se desaló la muestra utilizando columna C18 (ZipTipC18).

Las muestras se colocaron por sextuplicado en la placa utilizando como matriz α -ciano, y se analizaron en un MALDI TOF/TOF 4800.

Con los espectros MS/MS obtenidos se realizó una búsqueda con el algoritmo de búsqueda Paragón del software ProteinPilot, con un porcentaje de confianza del 66%.

6.8 Determinación de residuos de carbofuran por cromatografía de gases

Extracción de la muestra

La muestra se llevó a peso constante y se tamizó a través de una malla de 2 mm, posteriormente se realizó el respectivo cuarteo para tomar una porción analítica de 5 g de suelo, la cual se sometió al proceso de extracción mediante agitación mecánica durante tres horas, empleando 10 mL de etanol como solvente (Bravo *et al.*, 2010; Okomura *et al.*, 1995).

Derivatización con anhídrido trifluoroacético (reacción de acilación)

A 500 μL de muestra se adiciona 600 μL de anhídrido trifluoroacético (TFAA), y 58 μL de piridina como catalizador más 3000 μL de acetato de etilo se lleva a calentamiento a 50°C durante dos horas, se enfría y se lava con 6 mL de solución de bicarbonato de sodio al 2%, se extrae la fase orgánica con 5 mL de hexano-éter (95:5), concentrar en rotavapor a 1 mL (Barrera, 2005; Okomura *et al.*, 1995). Se inyecta 1 μL al cromatógrafo por inyección directa.

Derivatización con alcohol alcalinizado

La metilación de los compuestos se hizo tomando una muestra de extracto (2 mL) se disolvió en 3 mL de etanol alcalinizado con hidróxido de sodio (10:2) y tratamiento con ultrasonidos durante 20 min. Se lleva a reflujo a 100°C por 1 hora, después de enfriar en hielo. Se añadió agua (1 mL) que contiene 4 mM/L se agregó Na₂S₂O₃ para detener la reacción de metilación. La solución de etilado se extrajo cuatro veces con 0.5 mL de cloroformo. La fracción de cloroformo se filtra con sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua y concentra a 1 mL (Okomura *et al.*, 1995; Method EPA 507 USA N & P Pesticides).

Condiciones analíticas cromatográficas

Cromatógrafo de gases HP 7890 Agilent Technologies equipado con un espectrómetro de masas MSD Agilent serie 5975. Las condiciones de operación del cromatógrafo fueron las siguientes: Detector de espectrómetro de masas, columna 30 m x 0.5 µm x 0.25 µm DI, temperatura del puerto de inyección 180°C, temperatura del detector 270°C, temperatura del horno (inicial 50°C/4 min, incrementar 12°C hasta 194°C/5 min, 10°C a 270°C/10 min, 10°C 295°C/10 min), helio como gas portador con flujo de 1.7 mL/min (Okomura *et al.*, 1995).

Una vez obtenidos los cromatogramas, se compararon con la biblioteca NIST08.

6.9 Determinación cualitativa de carbofuran en las muestras de suelo por espectroscopia UV-vis

Se realizó una curva de calibración con ayuda de una muestra simulada con una concentración 10 ppm de carbofuran (furan) adicionados en 100 g de suelo.

Las muestras de suelo se llevaron a peso constante en una mufla a 100°C durante 1 h, posteriormente se pesaron 100 g de suelo y se colocaron en una columna cromatográfica, para realizar la lixiviación utilizando como eluyente 100 mL de acetona, una vez obtenido el lixiviado de cada muestra; se determinaron los espectros UV-vis correspondientes, al completar los espectros y con ayuda de la curva de calibración se determinó la ausencia o presencia de carbofuran presente

en cada muestra, midiendo la absorbancia a 276 nm, que corresponde al coeficiente de extinción (IUPAC, 2010), extrapolando en la curva de calibración para obtener la concentración de cada muestra lixiviada.

6.10 Caracterización Físicoquímica de las muestras de suelo

Se tomaron 1.6 Kg de cada una de las muestras, donde 1.5 Kg se colocaron sobre papel bond para secarlas completamente, una vez tenido el suelo seco se tomó 1 kg y se procedió con el análisis (Fernández *et al.*, 2006; NOM-021-RECNAT-2000), el suelo restante se utilizó para determinar la humedad de las muestras.

Determinación de pH

Se pesó 1 g de suelo, agregándole 10 mL de agua destilada sin dejar de agitar, posteriormente se dejó reposar la muestra 10 min y durante este tiempo se ajustó el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras para realizar la lectura de la muestra pasado este tiempo.

Humedad

Se pesó 1 g de cada una de las muestras hasta llevarlas a peso constante, para ser colocadas en la estufa a 80°C/24 h, una vez seca la muestra se pesó para poder realizar el cálculo de la diferencia de humedad por la diferencia de pesos con base en la siguiente fórmula: $[(PI-PF)/PI]*100$ siendo PI el peso inicial de la muestra y PF el peso final de la misma; obteniendo así el porcentaje de humedad.

Conductividad Eléctrica

Se preparó una pasta de saturación, pesando 40 g de suelo seco y agregándole agua destilada, una vez obtenida una textura pastosa se dejó reposar durante 24 h, posteriormente la pasta de saturación se filtró hasta obtener 50 mL de extracto para ser medidos con un conductímetro calibrado previamente con dos soluciones estándar de KCl al 0.1 N y 0.01 N.

Carbono orgánico total

Pesar de 0.1 a 0.3 g de suelo dentro de una cápsula de porcelana encendiendo el analizador de carbono a 900°C, incluyendo la curva patrón, para que el resultado se proporcione con base a ésta. Una vez calentado el horno se corrieron las muestras durante 5 min, presentando en el software la cantidad de carbono (mg/kg suelo o en %) contenido en el suelo.

La curva patrón se realizó con biftalato de potasio ($C_8H_5KO_4$) en un rango de concentraciones de 0 a 25 mg (0 a 0.025 g) de carbono contenido en este compuesto. El biftalato fue secado en la estufa durante 12 h a 60°C antes de ser analizado, haciendo la medición de carbono orgánico total en el analizador, como se indicó para las muestras.

Fósforo soluble

Pesar 1 g de suelo seco y molido, y colocarlo en un tubo para centrífuga de 15 mL agregando 7 mL de solución extractora agitando con un vórtex, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 6 000 rpm tomándose 1 mL del sobrenadante agregándole 6 mL de agua destilada y 2 mL de la solución de molibdato, una vez mezclada esta solución se le adiciono 1 mL de solución de cloruro estañoso diluido mezclando nuevamente la solución y dejándola reposar 10 min para continuar con la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm. Se realizó un blanco de 1 mL de agua destilada y 1 mL de solución extractora, posteriormente se agregaron 5 mL de agua destilada y 2 mL de solución de molibdato de amonio, mezclando bien y agregando 1 mL de solución de cloruro estañoso, finalmente se mezcló otra vez. Para construir la curva de calibración se hicieron diluciones correspondientes a la concentración (ppm) y los mL de solución tipo fosfatos, llevando el volumen a 100 mL.

Nitrógeno total

Para la digestión se pesaron de 0.25 a 1 g de suelo, que dependió de la materia orgánica contenida en el suelo; colocando la muestra de suelo en un matraz Kjeldahl seco adicionando 2 g de mezcla de catalizadores y 5 mL de ácido

sulfúrico concentrado, colocando la muestra en un digestor a temperatura media hasta obtener un color claro, esta temperatura estaba regulada de forma que los vapores del ácido sulfúrico se condensaron en el tercio inferior del cuello del matraz Kjeldahl, hirviendo la muestra por una hora a partir de ese momento.

Posteriormente a la muestra ya fría se le colocaron 25 mL de agua destilada y se mezcló hasta obtener una disolución completa transfiriéndola a un matraz Erlenmeyer, agregándole 15 mL de la solución de hidróxido de sodio 10 N, en el aparato de destilación se colocó a la salida un vaso de precipitados que contenía 10 mL de la solución de ácido bórico más indicador y en este momento se inició la destilación cuando el volumen alcanzó la marca de 20 mL en el vaso de precipitados, el nitrógeno amoniacal se tituló con la solución de ácido sulfúrico 0.01 N hasta que viró de verde a rosado fuerte.

Capacidad de Intercambio Catiónico

Para la preparación de la solución A se pesan 5 g de suelo y se tamizan por una malla de abertura de 2 mm, adicionándole 33 mL de solución de acetato de amonio, agitándola durante 10 min para posteriormente ser centrifugada a 2 500 rpm durante 5 min decantando el líquido en un matraz, este paso se repitió dos veces más; se aforó con acetato de amonio para determinar las bases intercambiables. Enseguida se agregaron 30 mL de cloruro de amonio 1 N centrifugando a 2500 rpm durante 5 min desechando el sobrenadante, se le adicionaron 30 mL de cloruro de amonio 0.25 N y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min desechando el sobrenadante, la muestra fue lavada con 30 mL de alcohol centrifugando a 2500 rpm durante 5 min, eliminando el sobrenadante en cada ocasión terminando el lavado cuando la prueba de cloruros en el decantado fue negativa. Para la prueba de cloruros se pipetearon 10 mL del sobrenadante alcohólico en un tubo de ensaye y se agregaron 4 o 5 gotas de nitrato de plata, se observó un ligero precipitado blanco, por lo que la reacción fue positiva y se continuó el lavado hasta que la prueba de cloruros fue negativa, el amonio adsorbido con tres porciones de 33 mL de cloruro de sodio al 10%, fue centrifugado cada vez hasta completar un volumen de 10 mL el cual se transfirió a

un matraz Kjeldahl adicionándole 8 mL de NaOH al 40% conectándolo al aparato de destilación microkjeldahl, una vez terminada la destilación, se recogió el producto adicionándole 10 mL de mezcla de indicador y ácido bórico para determinar el amonio adsorbido por titulación con HCl 0.01N.

Para la determinación de Ca y Mg intercambiables se pipetearon 0.5 mL de la solución A en un tubo de ensaye añadiendo 9.5 mL de la solución diluida de lantano, midiendo la concentración de Ca y Mg por espectrofotometría de absorción atómica a una longitud de onda de 422.7 y 285.2 nm respectivamente, usando una flama de aire-acetileno.

Para la determinación de Na y K intercambiables se pipetearon 1.0 mL de la solución A en un tubo de ensaye añadiendo 1.0 mL de la solución de cloruro de cesio acidificada añadiendo 8 mL de agua mezclando la solución para medir la concentración de Na y K por espectrofotometría de emisión de flama.

Determinación de textura

Se pesaron 5 g de suelo y se tamizaron a través de una malla de diámetro menor a 2 mm colocando la muestra en una probeta, agregando 10 mL del dispersante hexametáfosfato de sodio, llevando aproximadamente a 50 mL con agua destilada, agitando la muestra durante 5 min dejándola reposar 12 h, posterior a esto la suspensión fue agitada por 30 min para ser pasada por un tamiz de 300 mallas, recogiendo el filtrado en cápsulas de porcelana, quedando la arcilla y el limo en la suspensión y la arena en la malla; el filtrado se pasó a una probeta de 250 mL adicionándole agua destilada hasta obtener un volumen de 200 mL agitando durante 2 min dejando reposar 1.5 h para tomar una alícuota de 25 mL a la profundidad de 2 cm para secarla a 105°C hasta peso constante y pesar. Las arenas retenidas en el tamiz de 300 mallas se secaron a 105°C hasta peso constante, determinando por diferencia de pesos los porcentajes de arena, limo y arcilla.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la formación de biopelícula fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis con su prueba múltiple de Dunn's, y para los datos obtenidos de las frecuencias de micronúcleos y otras anomalías nucleares, se realizó la prueba U de frecuencias, ambas pruebas con un nivel de confianza del 95% (Software IBM SPSS).

7. Resultados

Áreas de muestreo

En cada una de las áreas de muestreo que presentan diferentes características (Tabla 4), se obtuvieron 2 Kg de suelo, a partir de las cuales se realizaron las diferentes técnicas de laboratorio.

Tabla 4. Características de los campos de cultivo estudiados.

Parcela	Cultivo	Agroecosistema	Ubicación	Coordenadas
1 (M1)	Monocultivo de maíz, aledaño con haba	Tiende a Convencional	Vicente Guerrero Españita, Tlaxcala	19°24'55.88" LN 98°29'41.31" LO 2,454 msnm
2 (M2)	Policultivo de maíz, calabaza, haba y frijol	Agroecológico	Vicente Guerrero Españita, Tlaxcala	19°25'24.69" LN 98°28'56.75" LO 2,550 msnm
3 (M3)	Policultivo de maíz, frijol, calabaza, haba, tomate y chícharo	Agroecológico	Vicente Guerrero Españita, Tlaxcala	19°25'38.59" LN 98°29'14.10" LO 2,546 msnm
4 (M4)	Monocultivo de tomate	Convencional	Vicente Guerrero Españita, Tlaxcala	19°25'37.15" LN 98°29'46.22" LO 2,514 msnm
5 (M5)	Policultivo de maíz, frijol, avena y calabaza	Agroecológico	Vicente Guerrero Españita, Tlaxcala	19°25'34.92" LN 98°29'40.26" LO 2,519 msnm
6 (M6)	Policultivo de maíz, calabaza y frijol	Tradicional	Xochitlán Todos Santos, Puebla	18°67'96.19" LN 97°78'33.18" LO 1,876 msnm
7 (M7)	Monocultivo de frijol	Convencional	Cholula, Puebla	19° 3' 27.34" LN 98°18'48.48" LO 2,190 msnm
8 (M8)	Monocultivo en invernadero de plántulas de café	Convencional	Tezonapa, Veracruz	18°31' 02.7" LN 96°45'43.6" LO 180 msnm

LN= latitud norte, LO= longitud oeste y msnm= metros sobre el nivel del mar

En las siguientes Figuras (4-8) se muestra la localización de las parcelas muestreadas en los diferentes sitios.



Figura 4. Mapa de las parcelas muestreadas en Vicente Guerrero, España-Tlaxcala.

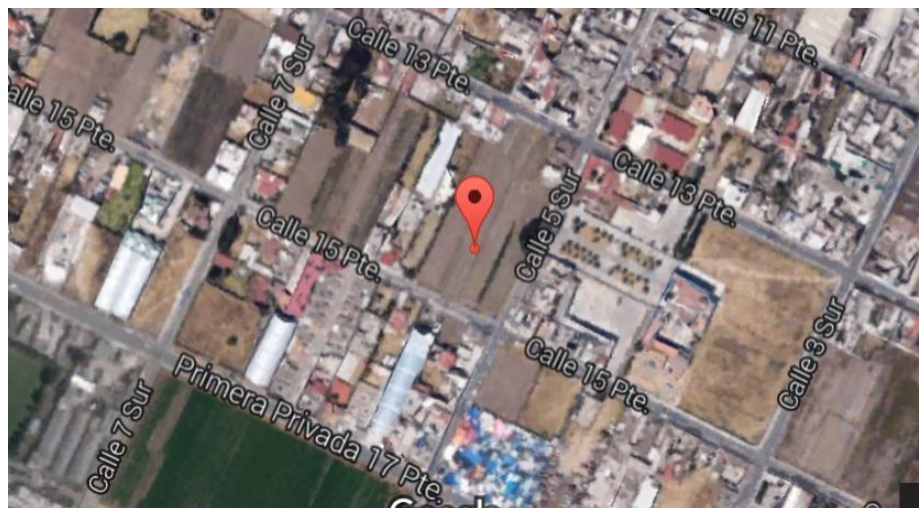


Figura 5. Mapa de las parcelas muestreadas en Vicente Guerrero, España-Tlaxcala.



Figura 6. Mapa de la parcela muestreada en Xochitlán Todos Santos, Puebla.



Figura 7. Mapa del invernadero muestreado en Tezonapa, Veracruz.

Aislamiento e identificación de géneros bacterianos

A partir del aislamiento bacteriano de las muestras de suelo se identificaron los géneros *Pseudomonas* sp., *Coliformes* y *E. coli*. (Tabla 5), con sus respectivas identificaciones con el medio Cromogénico Nissui, (Figuras 9 y 10).

Tabla 5. Identificación de géneros bacterianos de los suelos muestreados

Muestra	Microorganismos identificados
M1	<i>Pseudomonas</i>
M2	<i>Pseudomonas</i> , <i>E. coli</i> y <i>Coliformes</i>
M3	<i>Pseudomonas</i>
M4	<i>Pseudomonas</i> y <i>Coliformes</i>
M5	<i>Coliformes</i> y <i>Pseudomonas</i>
M6	<i>Coliformes</i> y <i>Pseudomonas</i>
M7	<i>Pseudomonas</i> y <i>Coliformes</i>
M8	<i>Coliformes</i> y <i>Pseudomonas</i>

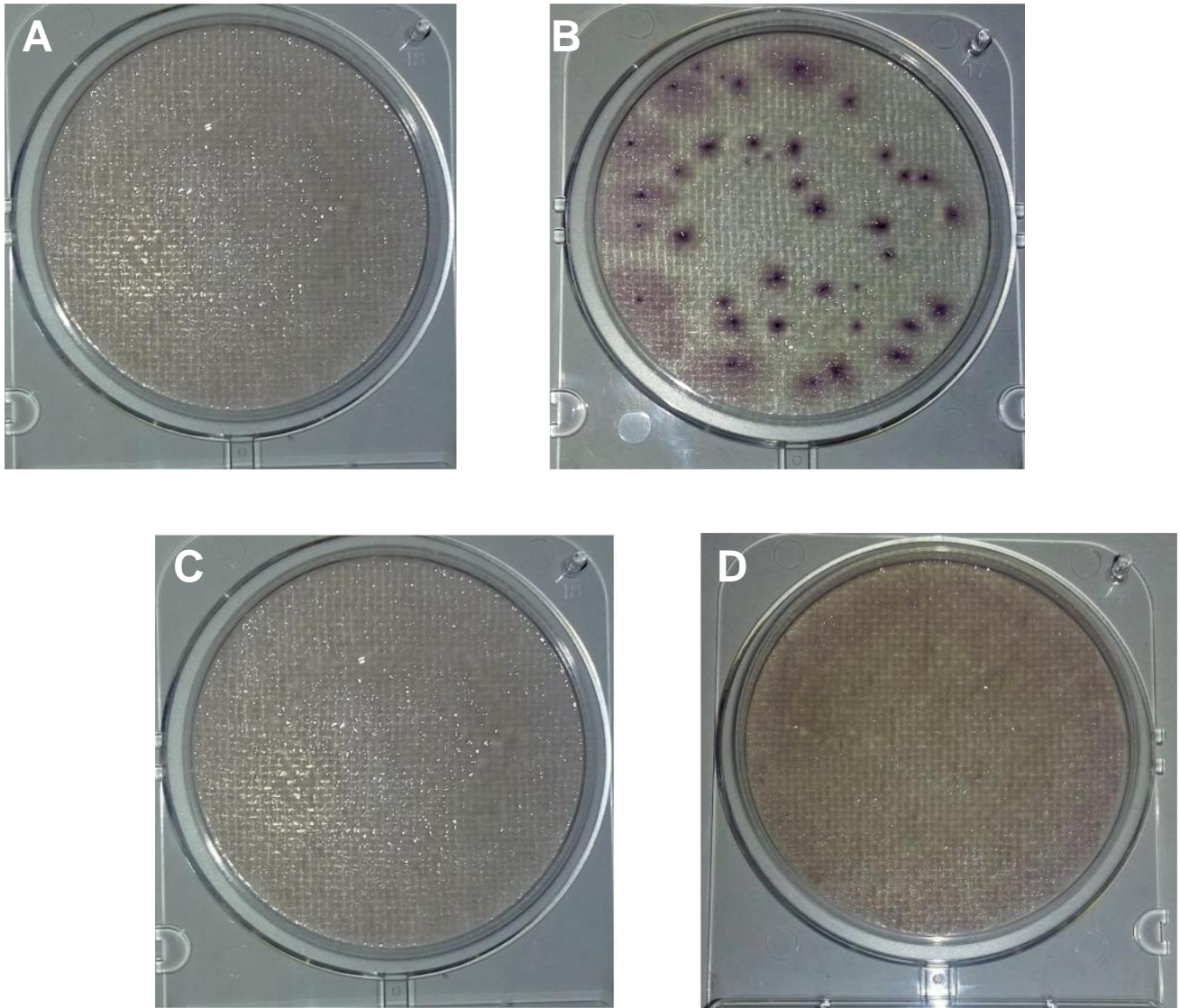


Figura 9. Interpretación del Medio Cromogénico Nissui, (A) *Pseudomonas* sp. (Beige) correspondiente a M1, (B) *Pseudomonas* sp. (Beige), Coliformes (rojo) y *E. coli* (azul) correspondiente a M2, (C) *Pseudomonas* sp. (Beige) correspondiente a M3, (D) *Pseudomonas* sp. (Beige) y Coliformes (rojo) correspondiente a M4.

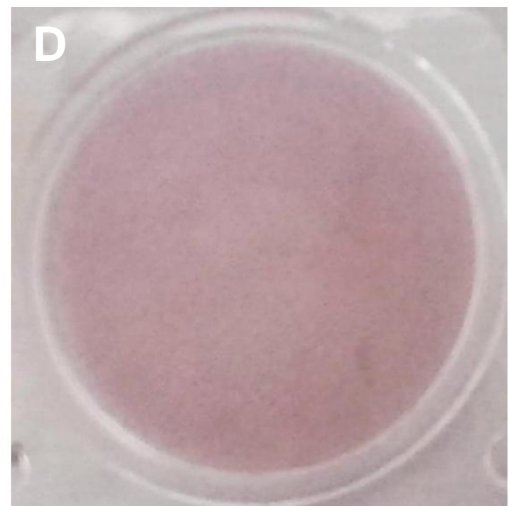
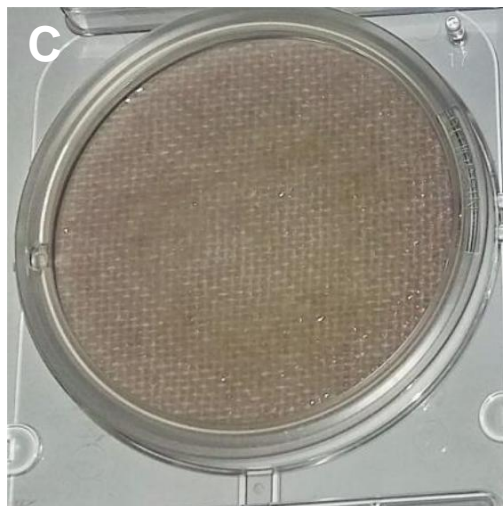
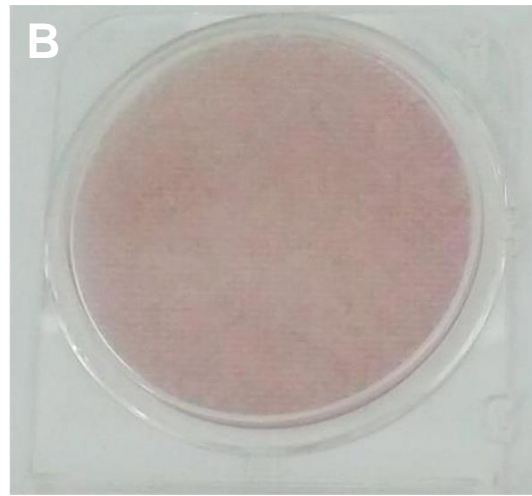
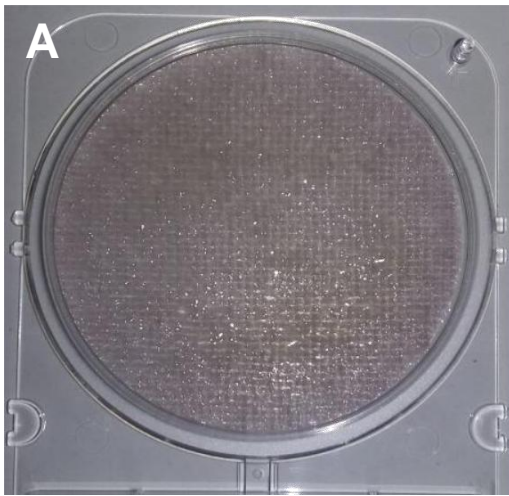


Figura 10. Interpretación del Medio Cromogénico Nissui, (A) Coliformes (rojo) y *Pseudomonas* sp. (Beige) correspondiente a M5, (B) Coliformes (rojo) y *Pseudomonas* sp. (Beige) correspondiente a M6, (C) *Pseudomonas* sp. (Beige) y Coliformes (rojo) correspondiente a M7, (D) Coliformes (rojo) y *Pseudomonas* sp. (Beige) correspondiente a M8.

Determinación de las biopelículas

En la Tabla 6 se muestran los promedios de las DO obtenidos de cada uno de los cultivos, los cuales representan el aislamiento bacteriano de cada una de las parcelas muestreadas, así como el D.O.C. del control negativo.

Tabla 6. Clasificación de los cultivos bacterianos de acuerdo a su capacidad para formar biopelículas

Muestra	Promedio DO	Valor P	Clasificación
M1	0.0885	P=0.056	Formador débil
M2	0.0747		No formador
M3	0.0862		No formador
M4	0.122*	P=0.041	Formador débil
M5	0.059		No formador
M6	0		No formador
M7	0.147*	P=0.038	Formador débil
M8	0.0617		No formador
Control negativo	0.064		D.O.C.= 0.0865

*Presentan diferencia significativa con una $P < 0.05$

De acuerdo a los resultados obtenidos, ninguno de los cultivos bacterianos presento formación moderada o fuerte de biopelículas, sin embargo las muestras M1, M4 y M7, demostraron ser formadoras débiles de biopelículas. Al comparar estadísticamente las densidades ópticas obtenidas a partir de cada cultivo bacteriano, se observó una diferencia significativa con una $P=0.0343$ entre las muestras M4 y M6.

Identificación de micronúcleos y anormalidades nucleares

Para la determinación del daño genotoxicológico presente en los productores de los tres tipos de sistemas agrícolas, se encontró que aun cuando no todos están directamente expuestos a plaguicidas presentan ciertas anormalidades nucleares; las cuales pueden estar relacionadas además del uso de sustancias peligrosas; el tipo de alimentación, antecedentes de cáncer en la familia, diversos tipos de adicciones, entre otras. En la Tabla 7 puede apreciarse las frecuencias de micronúcleos y anormalidades nucleares en los productores de los diversos sistemas agrícolas. La comparación estadística de las frecuencias de las células que presentaron condensación y rompimiento de huevo en el núcleo mostraron

diferencia significativa ($P < 0.05$), entre las muestras de los productores de sistemas agroecológicos y convencionales.

Tabla 7. Frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares en productores

P	Micronúcleos	Picnosis	Condensadas	Rompimiento de huevo	Cariólisis	Binucleadas
A*	1 (0.1%)	12 (1.2%)	33 (3.3%)	42 (4.2%)	1 (0.1%)	29 (2.9%)
A	1 (0.1%)	18 (1.8%)	38 (3.8%)	0 (0%)	3 (0.3%)	107 (10.7%)
A	2 (0.2%)	10 (1%)	45 (4.5%)	47 (4.7%)	3 (0.3%)	116 (11.6%)
C*	1 (0.1%)	2 (0.2%)	23 (2.3%)	3 (0.3%)	3 (0.3%)	120 (12%)
C*	2 (0.2%)	4 (0.4%)	267 (26.7%)	4 (0.4%)	2 (0.2%)	122 (12.2%)
C	2 (0.2%)	29 (2.9%)	275 (27.5%)	3 (0.3%)	2 (0.2%)	52 (5.2%)
T*	1 (0.1%)	0 (0%)	10 (1%)	1 (0.1%)	0 (0%)	88 (8.8%)

*Productores no expuestos directamente, A= agroecológico, C= convencional y T= tradicional

La presencia de anormalidades nucleares y micronúcleos en las células identificadas se clasificó en relación a su forma nuclear (Figura 11), observando cambios nucleares degenerativos relacionados con toxicidad celular.

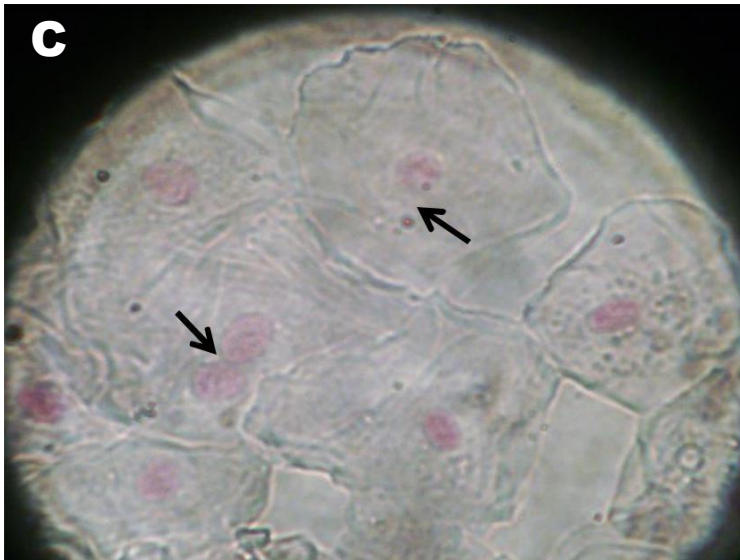


Figura 11. Células que muestran presencia de anomalías nucleares presentes en los productores estudiados: (A) cariólisis, (B) condensada, (C) binucleada y micronucleada; y (D) picnosis y célula normal.

Determinación de la presencia del gen *mcd* y/o la enzima carbofuran hidrolasa.

Con respecto a la amplificación del gen *mcd*, en el total de las muestras resultó negativa. Sin embargo, en la determinación de la presencia de la enzima carbofuran hidrolasa, se detectó la presencia de una banda (70-85 kDa), que corresponde al rango del peso molecular de las ya reportadas (Figura 12), en este caso solo se observan bandas en dos de las siete muestras.

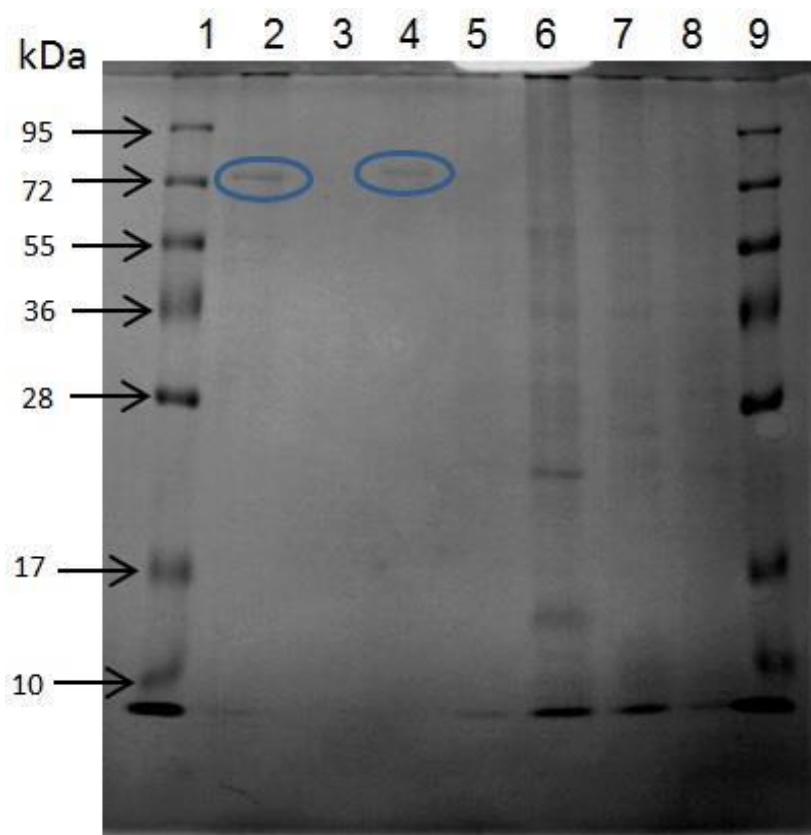


Figura 12. Electroforesis de poliacrilamida. Carril 1 y 9 marcador de peso molecular (PageRuler™ Plus Prestained). Carril 2 y 4 (M7 y M5 respectivamente) muestran la banda de un rango 70-85 kDa. Carriles 3, 5, 6, 7 y 8 (M6, M4, M3, M2 y M1 respectivamente) no presentaron la banda del rango 70-85 kDa.

Sin embargo utilizando los lixiviados de las colonias sin concentrar como en el caso anterior se observaron bandas para todas las demás muestras incluyendo las detectadas en el concentrado (Figura 13); además, se agregó una cepa control ya

identificada de *Pseudomonas putida* K2440, donada por el Dr. Jesus Muñoz Rojas, con la finalidad de realizar la extracción para buscar el gen *mcd* o en su lugar la enzima carbofuran hidrolasa, teniendo negativa la búsqueda del gen pero acertando en la presencia de la banda correspondiente a carbofuran hidrolasa.

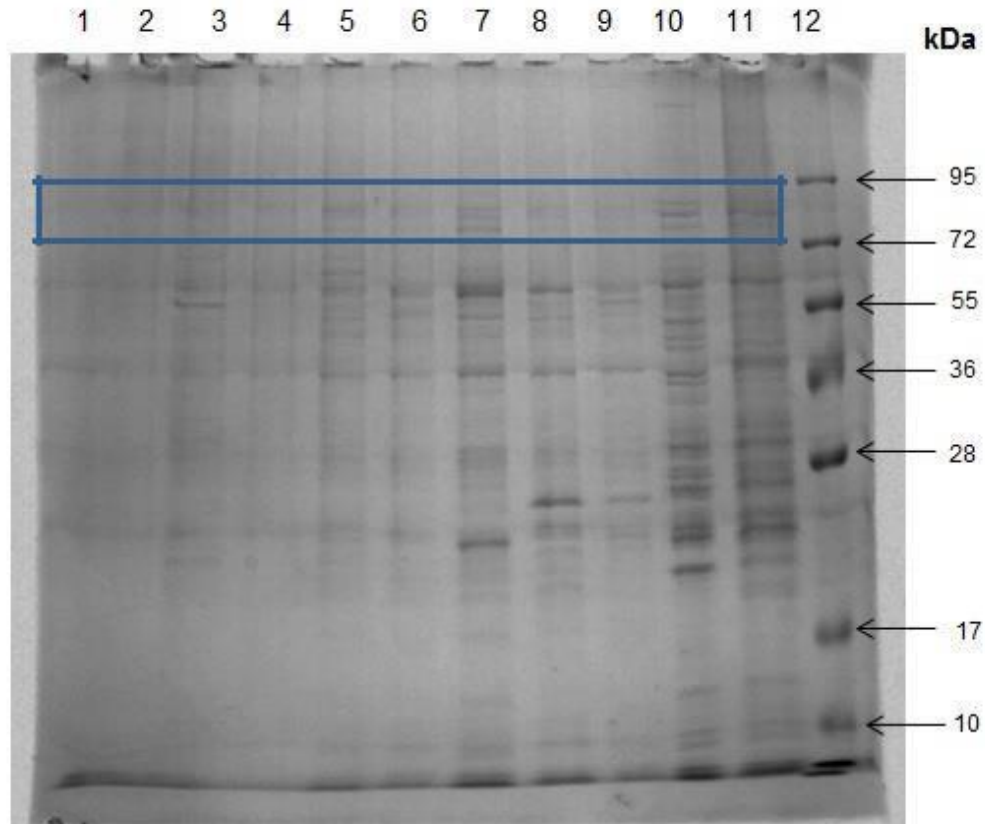


Figura 13. Electroforesis de poliacrilamida. Carril 12 marcador de peso molecular (PageRuler™ Plus Prestained). Carril 10 y 11 (cepa control concentrada), carril 9 (cepa control sin concentrar) carriles 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 8 (M8, M7, M5, M4, M3, M2 y M1 respectivamente) muestran la banda de un rango 70-85 kDa. Carril 3 (M6), no presenta la banda del rango 70-85 kDa.

Procesamiento muestras Primera Dimensión de proteínas

Una vez obtenidas las bandas por medio de electroforesis, que coincidieron con el peso molecular (77 kDa), reportado para *Pseudomonas putida* y la proteína purificada carbofuran hidrolasa de *Achromobacter* cepa WM111 (85 kDa), se realizó la secuenciación aminoacídica en el Instituto Mexicano de Medicina Genómica-unidad de Proteómica, en la Ciudad de México; obteniéndose similitudes relevantes entre las muestras (M5 y M7), respecto a las reportadas en antecedentes. De color verde se muestra el péptido encontrado en la muestra digerida, que tiene una coincidencia exacta con la secuencia de la base de datos utilizada (Figura 14 y 15). Cuando se observan tres o más péptidos identificados en verde, se cuenta con un mayor porcentaje de cobertura y en consecuencia mayor certeza en la identificación.

La parte de la secuencia que se encuentra de color amarillo indica que para que la secuencia del péptido determinado en la muestra analizada por masas, coincida con la secuencia de la base de datos, es necesario considerar un cambio en la secuencia, tal como: sustitución de un aminoácido (Figuras 16-20).

N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	1.70	1.70	8.5	tr A0A0M7N...	Phosphatase yihX OS=Achromobacter sp. GN=yihX PE=...	9BURK
2	0.59	0.59	4.9	tr H0F2I6JH...	LysR family transcriptional regulator OS=Achromobacter...	9BURK
3	0.59	0.59	5.1	tr A0A0Q8...	Diguanylate cyclase OS=Achromobacter sp. Root83 GN=...	9BURK
4	0.51	0.51	2.1	tr J4P8E6J...	Aconitate hydratase OS=Achromobacter piechaudii HLE...	9BURK

Protein Sequence Coverage

HL Y I P D L V N V I V D I D F H R V L G A W S D L T R I P L A S L K K S F H M G E A F H Q H E R G E I S D E A F A E A L C H E M A L P L S Y E Q F S H G W Q A V F V A L R P E V I A I M H K L R E Q G H R V V V L S N T N R L H T T F W P E E Y P E I R D A A
D H I Y L S Q D L G H R K P E A R I Y Q H V L Q A E G F S P S D T V F F D N A D N I E G A N Q L G I T S I L V K D K T T I P D Y F A R V L C

Figura 14. Para la muestra M5 se presenta el resultado de la identificación de la muestra analizada con Protein Pilot utilizando una base de datos de la página UniProt (<http://www.uniprot.org>), que corresponde a *Achromobacter* sp. Al 66%.

N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	1.52	1.52	8.9	tr A0A0J3VI...	Glutathione S-transferase OS=Klebsiella pneumoniae GN...	KLEPN
2	0.80	0.80	6.7	tr Z5DP84 Z...	DeoR family transcriptional regulator OS=Klebsiella pneu...	KLEPN
3	0.49	0.49	13.9	tr C8T847 C...	Uncharacterized protein OS=Klebsiella pneumoniae subs...	KLEPR

Protein Sequence Coverage

MKLVGSYTSPPFVRKLSILLLEKGITFEF INELPYNADNGVAQFNPLGKVPVLVTEEGECWFDSPITAEYIELMNVAPAMHLPDPLESLRVRKIEALADGINDAGLVSVREQARPAQQSEDELLRQRE
KINRSLDVLLEGYLDGTLKTDVNLATIAIACAVGYLNFRRVAPGWCVDPRHLVKLVENLFSRESFARTEPPKA

Figura 15. Para la muestra M5 se presenta el resultado de la identificación de la muestra analizada con Protein Pilot utilizando una base de datos de la página UniProt (<http://www.uniprot.org>), que corresponde a *Klebsiella* al 66%.

N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	1.00	1.00	6.0	tr M9T1V2 ...	rRNA methyltransferase OS=Pseudomonas sp. BAY1663 GN=rrmA PE=4 SV...	9PSED
2	0.48	0.48	6.2	tr A0A0F0F...	GDP-L-fucose synthase OS=Pseudomonas sp. 2(2015) GN=fcl PE=3 SV=1	9PSED

Protein Sequence Coverage

HLICPICQAPLSAVDNGVACPAHGRFDRARQQYLNLPLVQHKNSRDPGDNQAMVEARRRFLDAGHYAPLAKRLAELATERAPORULDIGCGEGYTAQLAALPNAEGYALDISREAVKRACKRAPQL
EWLVAASHARVPLADASCDLLASVFSPLDQWEARELLAPGGGLLRHGPTRHELWELRARLYDEVDRDRKHLSLIPDGMHLAHESETLTYELQLNDTOARADLLAMTPHGWRASAEERRAAVIDAPLNV
VAIRYDWIQORDA

Figura 16. Para la muestra M5 se presenta el resultado de la identificación de la muestra analizada con Protein Pilot utilizando una base de datos de la página UniProt (<http://www.uniprot.org>), que corresponde a *Pseudomonas* sp. Al 66%.

N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	1.05	1.05	8.9	tr X7P0D3 ...	Glutathione S-transferase OS=Escherichia coli BW410 G...	ECOLX
2	0.82	0.82	2.3	tr I2RHP5 j...	Pertactin OS=Escherichia coli 1.2741 GN=EC12741_154...	ECOLX

Protein Sequence Coverage

MKLVGSYTSPPFVRKLSILLLEKGITFEF INELPYNADNGVAQFNPLGKVPVLVTEEGECWFDSPITAEYIELMNVAPAMHLPDPLESLRVRKIEALADGINDAGLVSVREQARPAQQSEDELLRQRE
KINRSLDVLLEGYLDGTLKTDVNLATIAIACAVGYLNFRRVAPGWCVDPRHLVKLVENLFSRESFARTEPPKA

Figura 17. Para la muestra M5 se presenta el resultado de la identificación de la muestra analizada con Protein Pilot utilizando una base de datos de la página UniProt (<http://www.uniprot.org>), que corresponde a *E. coli* al 66%.

N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	1.05	1.05	2.9	tr A0A0M7K...	UvrABC system protein B OS=Achromobacter sp. GN=uv...	9BURK

Protein Sequence Coverage

HSTGMFILHSNYTPAGDQPEAIAIRLLSDIEEGATHQTLKGITGSKFTTHANVIHRLKRPTLILAPNKTLTAQLYSEKHFPPENAVEYFVSYDYFQPEIYNPGTDRFIPKDSAINDHLERLRLSTT
KSLIERRDVIIVASVSIYGLGDDPDRALQIALSPGVKLNQRELRLLALQYDRTERTLKRATFRVQGDVIDIFPADSEYRAVRVLSDDTVASVQWMDPVTGKTLGEIDHYLVSFKTLFAPPTNK
IDSASKKILADHEERVAELNRRNRLVEANRLYERITHDVEHMRVGVCSGHENYSCYFSDRDAASPPITLLDYLPRKDGLLFVDESHVHVQISANRYRGOARKDLDYGFRLPSSKINRPLNDFE
RVKPKQITFVSATPGDYELRVSKGRVVEQVIRPTGLLDPKVEVRKADGYIDDLAEISKVVRKRVNVLVTTTKVSAEELTDFLTDNGIRARYMHSDIKAEDRVEIINLRAGEFDVLLIGISLLREGLD
IPEASLVAILDADRAGFLRSAAHALIQMIGRVARNENKAILYADAVTPAMRQAIDETNRRRQLQIAFNEENGISPASSVRKLAGETNTTEPTVHSEAFPCENLSDLCQITAEQQLLEFDTDGEQR
VEDIRHQDGLYRQFIYI

Figura 18. Para la muestra M7 se presenta el resultado de la identificación de la muestra analizada con Protein Pilot utilizando una base de datos de la página UniProt (<http://www.uniprot.org>), que corresponde a *Achromobacter* sp. Al 66%.

N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	1.00	1.00	2.9	tr A0A0D5...	UvrABC system protein B OS=Klebsiella michiganensis G...	9ENTR

Protein Sequence Coverage

```
MSTGHFILHSNYTPAGDQPEAIARLLSDIEDGATHQTLKGITGSGKTFTHANVIHRLKRPTLILAPNKTLTAQLYGEMKHFPPENAVEYFVSYDYFQPEIYMPGDRFIPKDSAINDHLERLRLSTT
KSLIERRDVIIVASVSSIYGLGDDPAYRALQIALSPGVKLNQRELIRRLALLQYDRTERTLKRATFRVQGDVIDIFPADSEYRAVRVELLDDTVASVQVHMDPVTGKTLGEIDHYLVSPKTLFAPPTNK
IDSASKKILADHEERVAELNRNRLVEANRLYERITHDVEHMRVGVYCSGHEHYSCYFSDRDAASPPITLLDYLPKDGLLFVDESHVHVPQISAHYRGDQARKDRLIDYGFRLPSSKWRPLNFDEFE
KVKPQTFVSAATPGDYELRVSKGRVVEQVIRPTGLLDPKVEVRKADGYIDDLAEISKCVKRKNRVLVTTLTKVSAEELTDFLTDNGIRARVYHSDIKAEDRVEIINGLRAGEFDVLIGISLLREGLD
IPEASLVAILDADRAGFLRSAHALIQMIGRVARNENGAAILYADAVTPAMKQAIIDETNRRRQLQIAFNEENGISPASSVRKLAGEETNTEEPTVHSEAFCENLSDLCQITAKEQQLLEFDTGDEQR
VEDIRRQLDGLYRQFIYI
```

Figura 19. Para la muestra M7 se presenta el resultado de la identificación de la muestra analizada con Protein Pilot utilizando una base de datos de la página UniProt (<http://www.uniprot.org>), que corresponde a *Klebsiella* al 66%.

N	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species
1	0.80	0.80	2.3	tr I2RHP5 ...	Pertactin OS=Escherichia coli 1.2741 GN=EC12741_154...	ECOLX

Protein Sequence Coverage

```
MHHSQSVSLCRSAISVLVATALYSPIALASTVEYGTIVDGVVLEKD IQLVYGTANNKTIPTSGEQHIKECGVSNNAEINGGYQYIEAYGSAEYSVLNDGYQIVQLGGAANQTTINNGVLQVYGAANE
TIKGGRLLVETEGIAIFAVIEKGGLEVKDGLAFVNDQKAGGAIKTTTRVMEVFGTNRGQFDIKDGVANNMLENGGSLRVEENDFYNTTVDSGGLLEVMDGGTATGVDKAGGKLIIVSTNALEV
SGTNSKQGFSIKDVSKNYELDDGSLIVHECTQAIDTILDEHATHQSLGRDGTGRVQAHAVYDLGRSVQNGSIKYSSNAISENHVIDNGRANVWTGTHVNVTVRGNEGIIDAHALELNFYTPATLLG
DVVVS DGASLRTHGAVDTSKADVSIIEESFWAIADINNINQNTRLNLANLVHSDGTVVHMAEPVTRSSVTASAENFTLLTNTLSGNGNFYHRTDMANHQSDQLNVTDQATGNFKIFVTDTGASPAAG
DSLTLVTTGGGDAAFTLGNAGGVVDIGTYEYILQDNGNHSUSLAENRTQITPSTTDVLNHAQAQPLVDAELDTVRERLGSVKGVNYDTANVSSAINTRNNVTTDAGAGFEQTLTGLTLGIDSRFSRE
ESSTIRGLFFGYSHSDIGFDRGGKGNVDSYTLGAYAGWEHQNGAYVDGVVVDVRFSTNTHGKHSNGATAFGDYNSNGAGAHVESGFRWEGLVNVRPFLSFTGFTTDGQDYTLNNGHRADVGNTRILR
AEAGTAVSYHMDLQNGTLEPWLKAAVRQEXADSHQVWVHDDGKFNNDVAGTRGVYQAGIRSSFTPTLSGHLVSVYGNAGVESPWNTQAGVVWTF
```

Figura 20. Para la muestra M7 se presenta el resultado de la identificación de la muestra analizada con Protein Pilot utilizando una base de datos de la página UniProt (<http://www.uniprot.org>), que corresponde a *E. coli* al 66%.

residuos de carbofuran por cromatografía de gases

Determinación de relación de los productos de degradación del realizar carbofuran, se
obtener una un gráfico de calibración del plaguicida productos de
utilizó control para degradación en las áreas de picos se encuentran
relación de los entre los picos 4, 5, 9-27 (Tabla estructuras químicas
se (Figura 21), los de los productos de degradación 8), también
cuales muestran las (Figura 22).

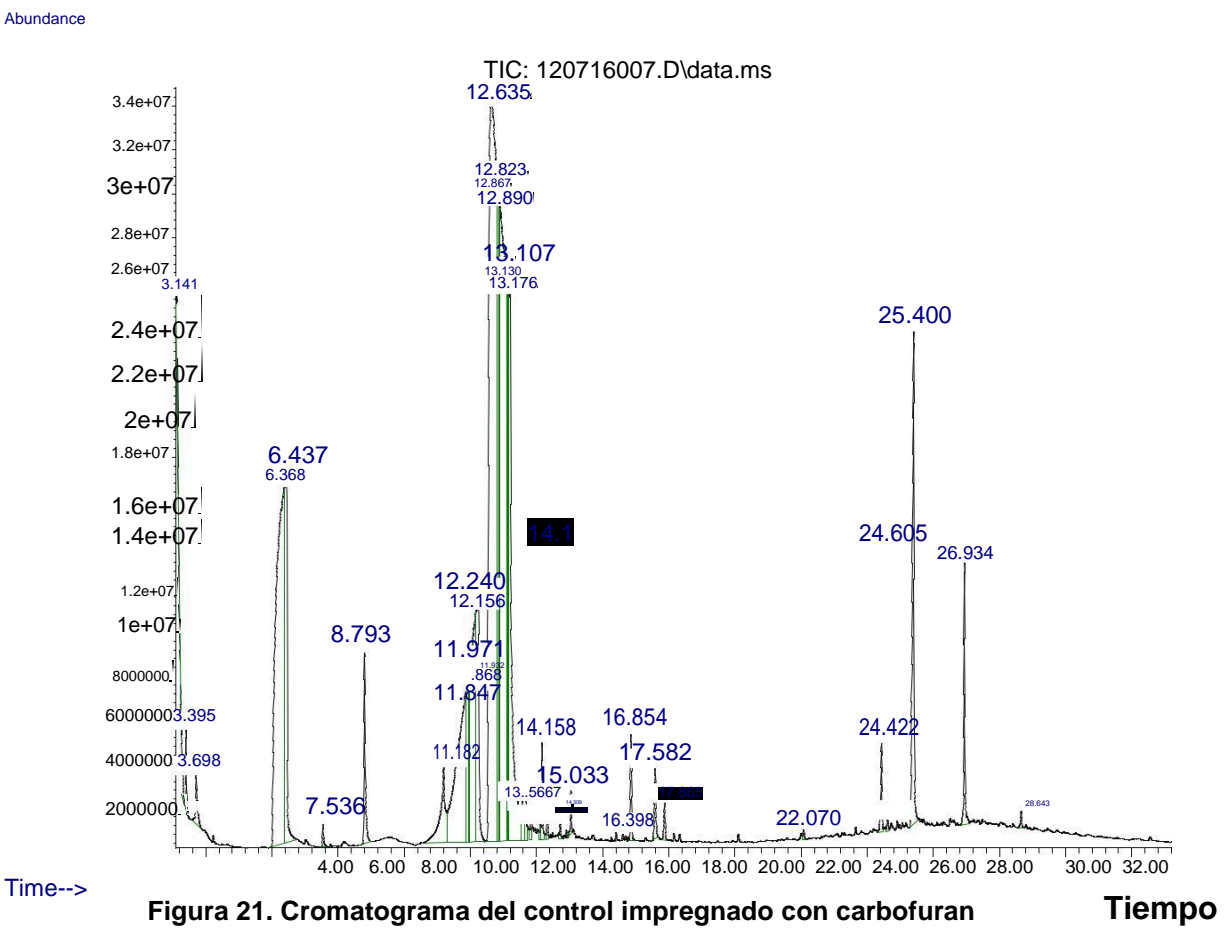


Figura 21. Cromatograma del control impregnado con carbofuran

Tabla 8. Productos de degradación del carbofuran en muestra control

Productos de degradación	Pico	Porcentaje detectado %
metilcarbamato de etilo	4 y 5	16.17
dioxano	9-14	16.01
2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol	15-26	57.42
hexametilbenceno	27	0.17

Nota: Los picos 15-22 y 25 mostraron además presencia de carbofuran con un porcentaje de detección del 56.62%.

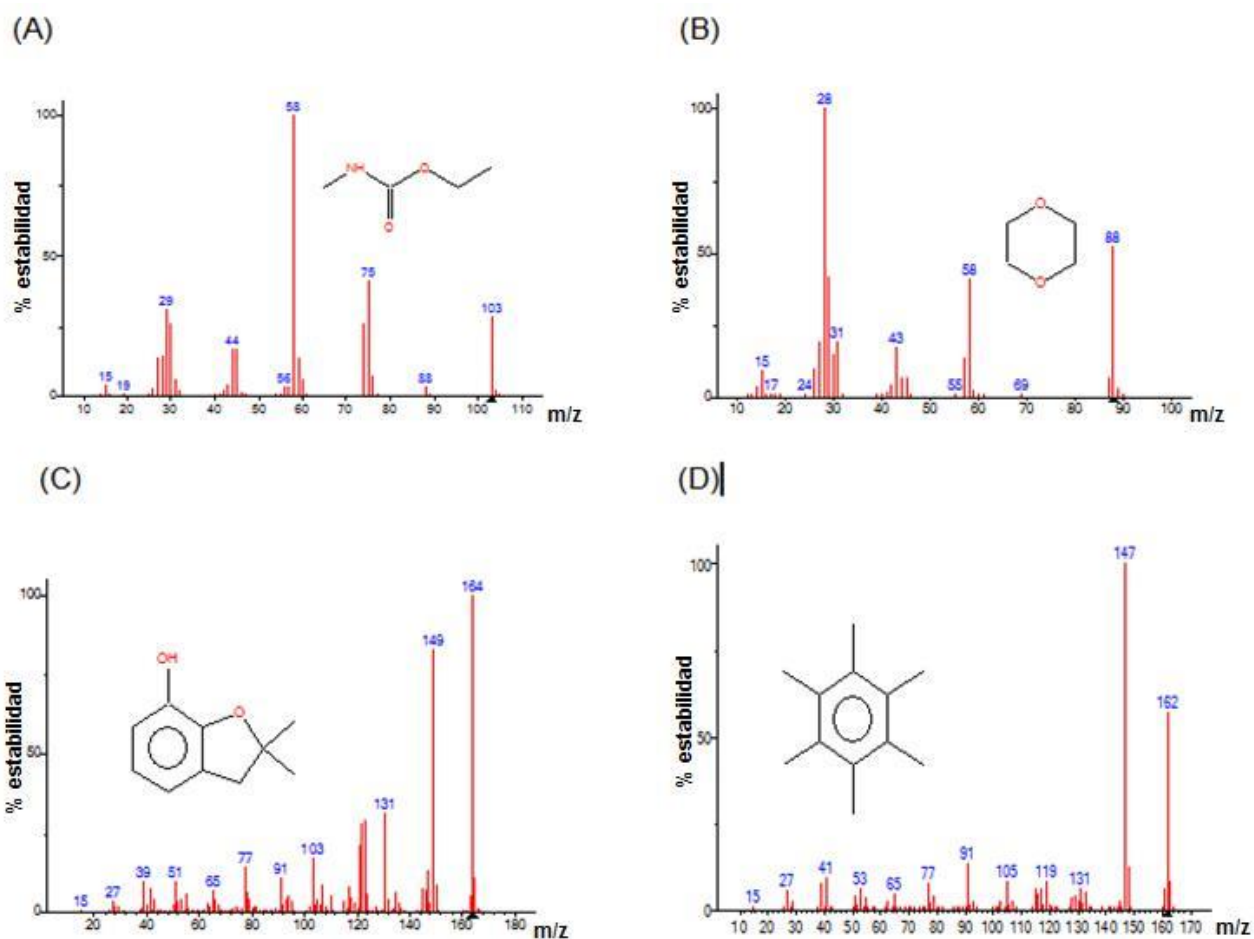


Figura 22. Espectro de masas de los productos de degradación del carbofuran:

(A) metilcarbamato de etilo, (B) dioxano, (C) 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol y (D) hexametilbenceno.

Con respecto a la determinación de los residuos de carbofuran en el total de las muestras resultó negativa, obteniendo unicamente los residuos de los solventes utilizados en la columna del cromatógrafo de gases.

Determinación de la presencia de carbofuran en las muestras de suelo por espectroscopia UV-vis

El espectro UV-vis de carbofuran en las muestras se determinó con el apoyo de una curva de calibración, la cual fue preparada por una serie de soluciones de concentración conocida de carbofuran (2, 4, 5, 6, 8 y 10 ppm), realizándose las mediciones en un rango de 200-400 nm con una longitud de onda máxima en 276 nm (Figura 23).

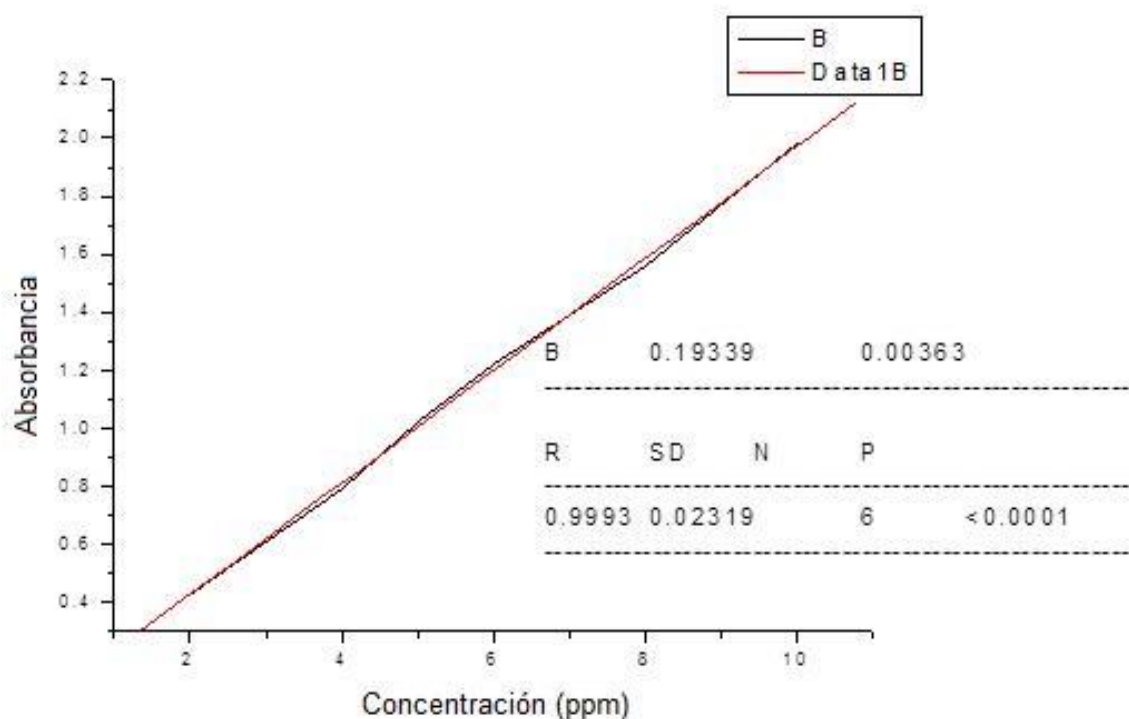


Figura 23. Curva de calibración de carbofuran en agua destilada.

El espectro UV-vis de las muestras de suelo se determinó a 276 nm, el cual corresponde al coeficiente de extinción del carbofuran (Figura 24).

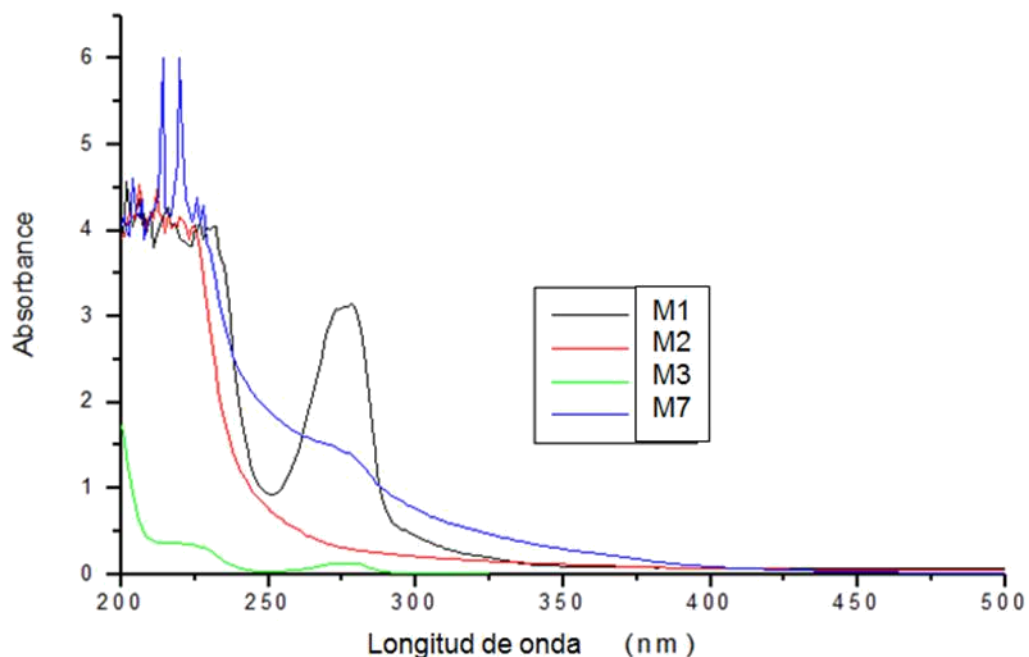


Figura 24. Espectro UV-vis donde se muestra el pico de absorbancia correspondiente a carbofuran (276 nm) en las muestras M1, M3 y M7. La muestra M2 no presenta absorbancia a esa longitud de onda.

Con respecto a la muestra M8 el espectro UV-vis mostró absorbancias en el rango 230-280 nm, donde se incluye el máximo de absorbancia del carbofuran y otros compuestos no determinados (Figura 25).

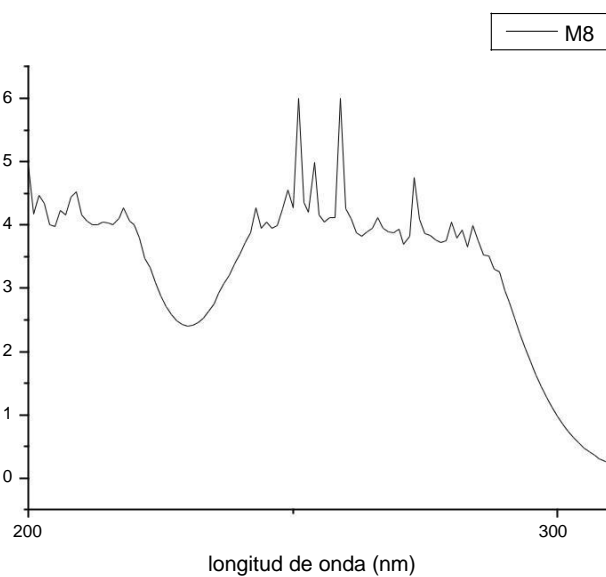


Figura 25. Espectro UV-vis donde se muestra el área de absorbancia para el carbofuran además de otros compuestos que no son objeto de esta investigación.

Caracterización físico-química de las muestras de suelo

El análisis fisicoquímico de las muestras presentó las siguientes características (Tabla 9); las muestras M1-M5 presentaron un pH moderadamente ácido, M8 fuertemente ácido, mientras que las M6 y M7 son neutras. La materia orgánica y nitrógeno total presente en las muestras es baja a excepción de la muestra M6 que corresponde a un valor medio y alto respectivamente y M8 valores altos en ambas características. La textura de las muestras M1, M2, M3 y M5 es Franca, la M4 es Franco-Arcillosa, la M6 Franca-Arcillosa-Arenosa y la M7 y M8 corresponden a Franca-Arenosa. La capacidad de intercambio catiónico es baja para todas las muestras a excepción de la muestra M2 y M8 con valores altos y medios respectivamente. El fósforo presente en las muestras M1, M2, M3, M5, M6 es bajo a diferencia de las muestras M4, M7 y M8 donde la cantidad es media y alta para las dos últimas descritas. El efecto de salinidad es nulo para todas las muestras, el análisis estadístico no exhibió diferencia significativa con una $P > 0.05$.

Tabla 9. Características fisicoquímicas de las muestras de suelo.

Parámetro	pH	M O %	N Total %	Textura	CIC cmol/Kg	P mg/kg	CE dS/m	Humedad %
M1	5.7	0.93	0.054	Franca	10.4	12.0	0.10	1.97
M2	5.6	1.24	0.055	Franca	17.4	7.0	0.13	2.04
M3	5.6	1.24	0.070	Franca	9.4	8.0	0.12	2.00
M4	5.2	1.37	0.067	Franco Arcillosa	14.2	17.0	0.10	2.09
M5	5.6	0.88	0.040	Franca	9.6	5.0	0.13	1.98
M6	7.5	1.66	0.24	Franco Arcilloso Arenoso	11.75	1.94	1.8	2.04
M7	7.1	1.19	0.065	Franco Arenosa	7.2	33.0	0.34	1.21
M8	4.8	4.7	0.175	Franco Arenosa	15.2	64.5	0.43	2.12

MO= materia orgánica, N= nitrógeno, CIC=capacidad de intercambio catiónico, P= fósforo y CE=conductividad eléctrica

8. Discusión

La mayoría de los pesticidas utilizados en la actualidad permanecen presentes dentro de la biósfera por más de 40 años; lo que representa un problema ambiental grave, afortunadamente la mayor parte de estos compuestos se degrada de forma biológica, por la gran cantidad de microorganismos presentes en el suelo; que de acuerdo al trabajo de Ogram *et al.* (2000), en el cual describen que las bacterias del suelo poseen mecanismos eficientes para la adición de nuevas vías bioquímicas de degradación, debido a la constante interacción de estas con los pesticidas. En este estudio se analizaron las muestras del suelo desde el punto de vista fisicoquímico, microbiológico, análisis de la presencia del gen *mcd* y la enzima carbofuran hidrolasa de los aislamientos bacterianos; incluyendo además el diagnóstico genotoxicológico a partir de muestras de descamación del epitelio bucal de productores expuestos o no al carbofuran.

En el total de las muestras *Pseudomonas* sp. mostró ser el género predominante de los aislamientos, seguido de *Coliformes* y por último *E. coli*, cabe señalar que el medio cromogénico utilizado solo identifica los géneros antes mencionados. Debido a que existe una amplia gama de relaciones entre especies de microorganismos en los ecosistemas, tales como sinérgicas, antagónicas, de competencia física y bioquímica, moduladas por diferentes y complejos factores bióticos y abióticos. Siendo el suelo el sitio donde se presentan microorganismos específicamente funcionales como fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, promotores del crecimiento vegetal, biocontroladores y especies patogénicas, que normalmente compiten por espacio y por nutrientes. Estas relaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente y repercuten en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales. De tal manera los frecuentes aislamientos de *Pseudomonas* en el presente trabajo justifican su presencia ya que son catalogadas como agentes de control biológico y promotores del crecimiento vegetal ya que pueden presentar efectos que potencialicen los beneficios o por el contrario efectos antagónicos o simplemente que no condicionen ningún efecto en el crecimiento y en el desarrollo de las plantas, de tal forma la búsqueda de marcadores

moleculares permitió conocer un rasgo de estas bacterias con potencial beneficio en las prácticas agroecológicas (Cano, 2011; Marrero *et al.*, 2015).

Debido a que los suelos constituyen un entorno heterogéneo con numerosos parámetros de fluctuación que pueden afectar el crecimiento microbiano y supervivencia, algunas bacterias han desarrollado mecanismos para aprovechar este nicho, ya que algunas tienen la capacidad de adherirse a las raíces donde destacan las proteínas de membrana externa, polisacáridos de la pared, lipopolisacáridos y exopolisacáridos. Esto no solo proporciona ventajas a las bacterias sino que además mejora la agregación del suelo a su vez mejora la estabilidad del agua, lo cual es crítico para la supervivencia de la planta, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que las muestras M1, M4, y M7 presentan formación débil de biopelículas, destacándose que las tres muestras corresponden a agroecosistemas convencionales; esto tiene relación con trabajos realizados en diferentes sitios en donde se han obtenido aislamientos formadores de biopelículas de lugares donde la aplicación de plaguicidas es muy constante (Rogers *et al.*, 2010; Tien *et al.*, 2013; Plyuta *et al.*, 2016). Por consiguiente la cuantificación de biopelículas contribuye a remediar lugares impactados por sustancias contaminantes, utilizando de manera natural microorganismos que desarrollan la capacidad de trabajar en agregados y se adapten a un ambiente específico, tales como: cuerpos de agua y/o suelos (Echevarría, 2013).

La amplificación del gen *mcd* por PCR en el total de las muestras fue negativo; sin embargo en la determinación del perfil protéico, siete de las ocho muestras mostraron una banda en el rango de peso molecular 70-85 kDa, destacando que las muestras positivas a esta banda son aislamientos tomados de agroecosistemas convencionales y agroecológicos; sin embargo, el aislamiento del agroecosistema tradicional no reveló esta banda. En la secuenciación aminoacídica de las muestras positivas se presenta el emparentamiento idéntico de la muestra M5 con *Acromobacter* sp. Y *Klebsiella pneumoniae*.

La identificación del gen *mcd* se realizó con las secuencias de los primers para la detección específica del gen en las cepas bacterianas aisladas mediante PCR bajo condiciones específicas de amplificación. Aun cuando los primers estén

secuenciados correctamente, la no presencia del gen *mcd* en las cepas aisladas se debe a la diferencia en el tamaño teórico y real del producto de PCR debido a la información de secuencia incompleta como es reportado en trabajos anteriormente documentados. En un trabajo realizado por Parekh *et al.* (1996) se reportó que a partir de 29 aislamientos realizados de suelos agrícolas, no se detectó la presencia del gen *mcd* por PCR; sin embargo, estas cepas se obtuvieron a partir de aislados degradadores de carbofuran, que en teoría deberían haber dado positivo a la amplificación del gen; por lo que de esta forma se responde la incógnita en relación al trabajo realizado, acerca del por qué no presentó ninguna amplificación de las cepas aisladas, aun cuando algunas de ellas se aislaron de sitios en donde el uso del carbofuran se realiza con frecuencia. Topp *et al.* (1993) y Desaint *et al.* (2000) caracterizaron 55 bacterias con historiales de tratamiento con N-metilcarbamatos en donde se encontraron 10 perfiles plasmídicos diferentes, con un tamaño entre 84 y 438 kb, de los cuales 60% de los plásmidos tuvieron perfiles plasmídicos similares con tamaños mayores a 330 kb y el 40% restante tuvo perfiles plasmídicos de 100, 105, 115 y 124 kb.

La presencia bacteriana más representativa dentro de las muestras analizadas corresponde a *Pseudomonas* sp., que en relación a trabajos realizados revela que los genes que codifican las carbofuran hidrolasas se encuentran en plásmidos de los géneros *Pseudomonas* (Hayatsu *et al.*, 2001), *Achromobacter* (Karns and Tomasek, 1991) entre otros; destacando a *Pseudomonas* sp., con una amplia variedad de especies.

Las bandas de proteínas observadas en los carriles de las cepas analizadas, corresponden a los tamaños de las bandas publicadas por Tomasek and Karns (1991), las cuales fueron analizadas en geles SDS-poliacrilamida, en donde se presentan los análisis proteicos tanto de *Pseudomonas* como de *Acromobacter*, con sus diferencias en el tamaño de las bandas; destacando aun con estos diferentes kDa (Mulbry y Eaton, 1991), la similitud de la acción de las enzimas codificadas por cada grupo bacteriano y su acción para la degradación del carbofuran. Aun cuando se tienen bacterias del mismo género es difícil que las

bandas sean idénticas debido a que estos genes son transposones (Hashimoto *et al.*, 2002) y su secuencia está modificándose continuamente provocando que los segmentos originales donde se localizaban los genes en un inicio haya cambiado, sólo en el caso en que se trate de un gen clonado es como las bandas podrían, porque de igual modo existen variables que provocan un margen de error, estar presentes aun tratándose de dos géneros diferentes pero tienen el gen que codifica a la enzima en el mismo fragmento de ADN (Tomasek y Karns, 1989).

Este esfuerzo puede conducir a una mejor comprensión de la evolución del medio ambiente y la difusión de nuevos genes catabólicos en los ecosistemas del suelo. En el estudio de Chaudhry y Ali (1988) se demostró esta evolución de modo que se aislaron un gran número de cepas *Pseudomonas* y *Flavobacterium* capaces de hidrolizar la cadena lateral N-metilcarbamato de carbofuran, de modo que estas bacterias ocupaban al pesticida como una fuente de nitrógeno o de carbono, provocando después de cierto número de nuevas generaciones la expresión de la enzima carbofuran hidrolasa sin poseer dentro de su estructura al gen *mcd*, generando de este modo que la identificación del gen no precisamente nos va a indicar la presencia de una enzima que degrada al carbofuran, es cierto que la constante interacción de dichos microorganismos con las fuentes origina una adaptación para la generación de nuevas vías de degradación.

La diversidad genética en todo el mundo de los genes de degradación de carbofuran debe ser estudiado con más detalle. Ambientes contaminados con carbofuran son considerados extremadamente peligrosos debido a que el pesticida es un producto químico que inhibe la acetil colinesterasa (Lifshitz *et al.*, 1997), provocando afectaciones en el sistema nervioso central. Por lo tanto, se requiere una técnica para la rápida descomposición del compuesto. La eficacia de la biorremediación puede ser medida por factores tales como la supervivencia del microorganismo introducido, la estabilidad de los genes que codifican las funciones catalíticas apropiadas, y el grado de eliminación de contaminantes.

La determinación de enzimas para identificar el uso de plaguicidas es importante debido a que de esta forma se pueden caracterizar las enzimas útiles para la destoxificación y eliminación de residuos de una forma fácil y económicamente

viable; por otro lado la utilización de estas enzimas como marcadores puede conducir al desarrollo de métodos para inhibir su acción durante diversos periodos de tiempo, ayudando a prevenir dificultades económicas causadas por la pérdida de cultivos debido a la inadecuada acción de los plaguicidas en los sitios de interés (Karns y Tomasek 1991), además de reducir las cantidades adicionadas al suelo y de este modo contribuir en la regeneración del suelo conservando la diversidad de los agroecosistemas y su equilibrio ecológico (Ramón y Rodas 2007; Sans 2007). Los carbofuranos y otros insecticidas de N-metilcarbamato representan un peligro inminente en dosis pequeñas por su alto grado de toxicidad y modo de acción (Ortiz *et al.*, 2013); determinar la presencia de la enzima carbofuran hidrolasa tiene como objetivo siguiente su utilización para tratar los residuos del plaguicida que no se integraron de manera correcta en el suelo de los agroecosistemas reduciendo en gran medida la toxicidad aguda del compuesto produciendo la división del enlace carbamato generando la disminución de la actividad del plaguicida original. Esta inactivación del carbofuran juega un papel importante en los suelos problemáticos; debido a que por estas razones la actividad del plaguicida no persiste de modo que las cantidades de carbofuran añadidos no es tan elevado para poder controlar los gusanos de la raíz del maíz provocando la resistencia al plaguicida (Felsot *et al.*, 1981). La comprensión de los mecanismos por los cuales la carbofuran hidrolasa degrada el enlace carbamato del carbofuran puede proponer el diseño de inhibidores específicos que eviten la degradación del plaguicida durante el tiempo necesario para el control de las plagas (Karns y Tomasek, 1991). Aun cuando se ha reportado que la enzima carbofuran hidrolasa es codificada por el gen *mcd* localizado en *Acromobacter* sp. WMIII (Tomasek y Karns, 1989), la cantidad del gen obtenida en otras bacterias asciende a cantidades mayores a las reportadas en *Acromobacter* sp. (Naqvi *et al.*, 2009), esto por las condiciones de adaptabilidad de las bacterias en los suelos tratados con carbofuran (Öztürk *et al.*, 2016). La evidencia genética ha demostrado que la cantidad de ADN que codifica a una carbofuran hidrolasa activa es demasiado, expresando una proteína en el intervalo de 70-77 kDa, demostrando además que estas bandas de polipéptidos están presentes en

extractos de *Pseudomonas putida* que contiene este gen clonado (Tomasek y Karns, 1989). Mendoza *et al.* (2011) estudiaron cepas de *Pseudomona putida*, observando que esta especie presenta una mayor capacidad de biodegradación de los plaguicidas permetrina y cipermetrina con eficiencia del 65% a 5 días de su aplicación en los suelos de los agroecosistemas problemáticos. La enzima carbofuran hidrolasa se ha purificado y biocaracterizado a partir de aislamientos de *Pseudomona* (Mulbry y Eaton, 1991; Chaudhry *et al.*, 2002), encontrando pesos moleculares entre 72-77 kDa (Tomasek y Karns, 1989; Karns y Tomasek, 1991; Öztürk *et al.*, 2016), en el presente estudio se reporta similitud en 87% de los aislamientos bacterianos, los cuales corresponden a *Pseudomonas* seguidos por *E. coli*, esta última presenta en la secuenciación aminoacídica un porcentaje elevado de similitud con el péptido emparentado en la base de datos, a la cual se debe realizar un cambio en la secuencia del péptido. Naqvi *et al.* (2009) cuantificaron la cantidad del gen *mcd* contenido en diversos aislamientos bacterianos de agroecosistemas encontrado montos mayores a los reportadas en *Acromobacter* sp. WMIII (Tomasek y Karns, 1989) en los aislamientos identificados de *E. coli*; por otro lado Öztürk *et al.* (2016), realizaron el cambio de aminoácido en la cadena peptídica de una enzima correspondiente a *E. coli* generándose con este cambio que el péptido de dicha cepa correspondiera idénticamente a la enzima carbofuran hidrolasa. Una de las bandas de la muestra M5 (Tabla 2), presentó una similitud idéntica con la enzima *Klebsiella pneumoniae* la cual codifica una glutathion transferasa; sin embargo estudios realizados por Kadakol *et al.*, (2011) indican que en cepas de *Klebsiella* específicamente especie *pneumoniae* como en este estudio; se determinó que dicho aislamiento bacteriano era eficaz en el uso como biodegradador de carbofuran en agroecosistemas, lo que indica que las cepas obtenidas de la parcela referente a la muestra M5, pueden fungir como biorremediadoras de los suelos contaminados con restos de carbofuran.

Aun cuando no se tienen registros del uso de plaguicidas en agroecosistemas tradicionales o agroecológicos se puede identificar la presencia de su aplicación (carbofuran en particular) como es descrito por Derbyshire *et al.* (1987) donde

informaron de la detección, purificación parcial y caracterización de una enzima a partir de una bacteria capaz de hidrolizar el enlace N-metilcarbamato de carbofuran para producir productos que ya no tienen actividad insecticida, lo cual demostraba que cierta enzima indicaba el uso del plaguicida en el suelo donde se obtuvo la bacteria.

En el total de las muestras la presencia de residuos de carbofuran por cromatografía de gases fue negativa; sin embargo para corroborar la ausencia de estos residuos se incluyó un control adicionado con carbofuran (furadan), para conocer los espectros de masas de los residuos del plaguicida y tener de esta forma las estructuras para poder compararlas con las muestras en el caso de que hubieran existido residuos. Castillo *et al.* (2003) mencionan que los métodos con mayor precisión de análisis de carbamatos son los cromatográficos, en especial el HPLC; sin embargo, en el presente estudio los resultados obtenidos pueden estar relacionados al tiempo de almacenamiento de las muestras, debido a que el carbofuran se hidroliza rápidamente. Otros estudios de residualidad de carbofuran en diferentes tipos de suelos sugieren un transporte variado del carbofuran y su movimiento a través de los macroporos, con el arrastre del agua, independientemente de otras propiedades del suelo como contenido de materia orgánica, composición mineralógica, pH, profundidad de la muestra y de su capacidad de volatilización (Castillo *et al.*, 2005).

Moreno (2002) desarrolló un inmunoensayo que fue validado frente a HPLC para la determinación de carbofuran en frutas y hortalizas, teniendo en cuenta el procedimiento para la extracción de la muestra, la dilución requerida y el rango operativo del inmunoensayo se pudo considerar que el límite de cuantificación del método es de 3.4 ppb, sugiriéndose como una opción sobre los métodos que requieren un tratamiento previo de la muestra como es el caso del HPLC. De tal forma sugerimos considerar la estandarización y aplicación de estos inmunoensayos en insectos relacionados con los cultivos de los agroecosistemas. En relación a la espectroscopia UV-vis, únicamente las muestras M1, M3, M7 y M8 presentan un máximo de absorbancia en una longitud de onda de 276 nm la cual corresponde al máximo de absorbancia del carbofuran, destacando que tres de

estas son de agroecosistemas convencionales, lo que indica el uso del carbofuran como plaguicida; así como el uso intensivo del mismo, de acuerdo con Mohammend *et al.* (2014), uno de los métodos con mayor sensibilidad corresponde a la espectroscopia, método que puede determinar en partes por millón las cantidades de carbofuran utilizadas en los agroecosistemas, midiendo los residuos del mismo, tanto en muestras de suelo y en agua, siendo un método simple y económicamente viable.

Ninguno de los productores muestreados para la técnica de micronúcleos presentó más de 6 micronúcleos en el total de células contabilizadas, sin embargo, la mayor cantidad de células con anormalidades nucleares se concentran en los productores convencionales, además se destaca al productor tradicional como el menor dañado genotóxicológicamente; muchas de las sustancias químicas presentes en los plaguicidas representan peligros potenciales para el ser humano directa e indirectamente expuesto, pudiendo con esto desarrollar alteraciones en el material genético; desarrollando algunos tipos de tumores (Matheus y Bolaños, 2014). En consecuencia, se ha hecho necesaria la búsqueda de métodos que permitan cuantificar el grado de inestabilidad que estos productos puedan causar al material genético, entre ellos, el ensayo de micronúcleos, el cual permite detectar el daño en el ADN, permitiendo tomar medidas preventivas para el control de los riesgos genéticos asociados con la exposición a agentes tóxicos contenidos en los plaguicidas, se ha determinado que la presencia de más de seis micronúcleos denota un daño genotóxicológico casi irreversible (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007), sin embargo en el presente estudio ninguno presentó una cantidad mayor a esta por lo cual aún se pueden tomar las medidas preventivas necesarias para revertir el daño que se encuentra presente en los productores con un nivel alto de anormalidades nucleares que presentan sus células. Siendo de relevancia el incluir este tipo de técnicas en estudios agroecológicos debido a que los productores son parte fundamental para el equilibrio en el agroecosistema.

9. Conclusiones

1. Las ocho muestras analizadas en este estudio fueron tomadas de áreas que reúnen las características de un agroecosistema; teniendo cuatro agroecosistemas convencionales, tres agroecológicos y uno tradicional.
2. En el total de las muestras *Pseudomonas* sp. fue el género predominante de los aislamientos, seguido de *Coliformes* y *E. coli*.
3. Las muestras M1, M4, y M7 presentaron formación débil de biopelículas.
4. Ninguno de los productores muestreados para la técnica de micronúcleos presentó más de seis micronúcleos en el total de células contabilizadas.
5. La búsqueda del gen *mcd* por PCR fue negativa; y para la determinación del perfil protéico, siete de las ocho muestras mostraron una banda en el rango de peso molecular 70-85 kDa.
- 6.- En la secuenciación aminoacídica de las muestras positivas se presenta el emparentamiento idéntico de la muestra M5 con *Acromobacter* sp. y *Klebsiella pneumoniae*.
7. En el total de las muestras la presencia de residuos de carbofuran por cromatografía de gases fue negativa.
8. En la determinación espectroscópica UV-vis, únicamente las muestras M1, M3, M7 y M8 presentan un máximo de absorbancia a 276 nm.
9. El análisis fisicoquímico indicó que la muestra M6 (agroecosistema tradicional) tiene el mejor nivel de fertilidad.

10. Referencias

1. Altieri MA, Toledo VM. 2011. The agroecological revolution of Latin America: rescuing nature, securing food sovereignty and empowering peasants. *The Journal of Peasant Studies*. 38: 587–612.
2. Altieri MA. 1994 Bases agroecológicas para una producción agrícola sustentable. *Agricultura Técnica*. 54: 371-386.
3. Barrera PMI. 2005. Implementación de una técnica de análisis cromatográfico para determinar N-metilcarbamatos y sus productos de degradación en muestras de agua. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias. Proyecto de grado.
4. Basta T, Keck A, Klein J, Stolz A. 2004. Detection and characterization of conjugative degradative plasmids in xenobiotics degrading *Sphingomonas* strains. *Journal of Bacteriology*. 186: 3862–3872.
5. Boege SE. 2008. El patrimonio biocultural de los pueblos indígenas de México. Hacia la conservación *in situ* de la biodiversidad y agrobiodiversidad en los territorios indígenas. México: Instituto Nacional de Antropología e Historia: Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas. 344 p.
6. Borlaug NE, Dowsell C. 2015. La Inacabada Revolución Verde – El Futuro Rol de la Ciencia y la Tecnología en la Alimentación del Mundo en Desarrollo. www.agbioworld.org/biotech-info/articles/spanish/desarrollo.
7. Bravo RI, Valencia LYA, Valencia CEM, Potosí RSF. 2010. Validación de una metodología para la determinación de carbofuran en suelos mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detección ultravioleta (CLAR-UV). *Revista Colombiana de Química*. 39: 359-370.
8. Cano MA. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad Y Divulgación Científica*. 14: 15-31.
9. Castellanos RJ, Rache CLY. 2013. Microorganismos, enzimas, plasmidos y genes involucrados en la degradación de plaguicidas N-Metilcarbamatos. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*. 29: 105-119.
10. Castillo AE, Oggero RM, Subovsky MJ, Rodríguez SC. 2005. Residualidad de carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato) en suelos arenosos. *Revista Científica Agropecuaria*. 9: 113-118.
11. Castillo AE, Rojas JM, Monteros SRI, Nardelli JS, Guasch G. 2003. Métodos para determinar carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato). *Agrotecnia*. 10: 15-20.
12. Chapalamadugu S, Chaudhry GR. 1992. Microbial and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates. *Critical Review in Biotechnology*. 12: 357–389.

13. Chaudhry GR, Ali AN. Bacterial metabolism of carbofuran. 1988 *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 1414-1419.
14. Chaudhry GR, Mateen A, Kaskar B, Bloda M, Riazuddin S. 2002. Purification and biochemical characterization of the carbamate hydrolase from *Pseudomonas* sp. 50432. *Biotechnology Applied Biochemistry*. 36: 63-70.
15. Derbyshire MK, Karns JS, Kearney PC, Nelson JO. 1987. Purification and Characterization of an N-Methylcarbamate Pesticide Hydrolyzing Enzyme. *Journal Agriculture Food Chemical*. 35: 871-877.
16. Desaint S, Hartmann A, Parekh NR, Fournier JC. 2000. Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 34: 173-180.
17. Devine GJ, Eza D, Oigusuku E, Furlong MJ. 2008. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Perú Medicina Experimental Salud Publica*. 25: 74-100.
18. Diario Oficial de la Federación (DOF). NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis.
19. Echevarría GL. 2013. Técnicas y métodos de uso de las biopelículas en la búsqueda de procesos de biorremediación. *Scientific International Journal*. 10: 32-43.
20. Felsot A, Maddox JV, Bruce W. 1981. Enhanced microbial degradation of carbofuran in soils with histories of Furadan use. *Bulletine Environmental Contamination Toxicology*. 26: 781-788.
21. Fenech M. 2000. The invitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 455: 81-95.
22. Fernández LLC, Rojas ANC, Roldán CTG, Ramírez IME, Zegarra MHG, Hernández RU, Reyes ÁRJ, Flores HD, Arce OJM. 2006. Capítulo 4. Análisis físicos y químicos en suelo. Tomado de: Manual de técnicas de análisis de suelos aplicados a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. México, D.F.
23. Gliessman SR. 2002. Agroecología: procesos ecológicos en la agricultura sostenible. CATIE: Turrialba, Costa Rica. 33: 359 p.
24. Hashimoto M, Fukui M, Hayano K, Hayatsu M. Nucleotide sequence and genetic structure of a novel carbaryl hidrolasa gene (*cehA*) from *Rhizobium* sp. Strain AC100. 2002. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1220-1227.
25. Hashimoto M, Mizutani A, Tago K, Kameyama MO, Shimojo T, Hayatsu M. Cloning and nucleotide sequence of carbaryl hydrolase gene (*cahA*) from *Arthrobacter* sp. RC100. 2006. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101: 410-414.

26. Hayatsu M, Hirano M, Nagata T. Involment of a two plasmids in the degradation of carbaryl by *Arthrobacter* sp. strain RC100. 1999. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1015-1019.
27. Hayatsu M, Mizutani A, Hashimoto M, Sato K, Hayano K. 2001. Purification and characterization of carbaryl hidrolase from *Arthrobacter* sp. RC100. *FEMS Microbiology Letters*. 201: 99-103.
28. Head IM, Cain RB, Suett DL. 1992. Characterization of a carbofuran-degrading bacterium and investigation of the role of plasmids in catabolism of the insecticide carbofuran. *Archives Microbiology*. 158: 302-308.
29. INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2011. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Consultado: 15 de marzo de 2017 en la dirección: <http://www.inegi.gob>
30. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). 2010. Consultado: 16 de noviembre de 2015 en la dirección: <http://carbofuran.htm>
31. Kadakol JC, Kamanavalli CM, Shouche Y. 2011. Bodegradation of Carbofuran phenol by free and immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883T. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 27: 25-29.
32. Karpouzias DG, Morgan JAW, Walker A. 2000. Isolation and characterization of 23 carbofuran-degrading bacteria from soils from distant geographical areas. *Letters Applied Microbiology*. 31: 353-358.
33. Kuhr RJ, Davis AC, Bourke JB. 1974. DDT residues in soil, water and fauna from New York apple orchards. *Pesticide Monitoring Journal*. 7: 200-204.
34. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
35. Lifshitz M, Shahak E, Bolotin A. 1997. Carbamate poisoning in early childhood and in adults. *Clinical Toxicology*. 35: 25-27.
36. Marrero MA, Agaras B, Wall LG, Valverde C. 2015. Enriquecimiento diferencial de *Pseudomonas* spp. en rizoplano de distintas especies cultivadas. *Revista Argentina de Microbiología*. 47: 132-137.
37. Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 4: 185-200.
38. Matheus LT, Bolaños A. 2014. Micronúcleos: biomarcador de gonotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud*. 18: 18-26.
39. Method EPA 507 USA N & P Pesticides.
40. Mohammed NJ, Khalaf KD, Dhahir SA. 2014. Spectrophotometric determination of Carbofuran in neutral and alkaline medium of environmental water samples. *Global Journal for Research Analysis*. 3: 92-95.

41. Mora SS. 2014. Agroquímicos y sufrimiento ambiental: reflexiones desde las ciencias sociales. *Revista Reflexiones*. 93: 199-206.
42. Moreno TMJ. 2002. Desarrollo de un inmunoensayo multianalito, basado en anticuerpos monoclonales, para la determinación de plaguicidas N-metilcarbamatos en frutas y hortalizas. Tesis Doctoral En Ciencias Químicas. Universidad Politécnica de Valencia-España. Pp. 230.
43. Naqvi T, Cheesman MJ, Williams MR, Campbell PM, Ahmed S, Russell RJ, Scott C, Oakeshott JG. 2009. Heterologous expression of the methyl carbamate-degrading hydrolase MCD. *Journal of Biotechnology*. 144: 89-95.
44. Ochoa V, Hinojosa B, Gomez-Muñoz B, Garcia-Ruiz R. 2007. Actividades enzimáticas como indicadores de calidad del suelo en agroecosistemas ecológicos. *Revista Electronica Universidad de Jaén*. 2: 1-10.
45. Ogram AV, Duan Y-P, Trabue SL, Feng X, Castro H, Ou L-T. 2000. Carbofuran degradation mediated by three related plasmid systems. *FEMS Microbiology Ecology*. 32: 197-203.
46. Okumura T, Imamura K, Nishikawa Y. 1995. Determination of Carbamate Pesticides in Environmental Samples as Their Trifluoroacetyl or Methyl Derivatives by Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analyst*. 120: 2675-2681.
47. Ortiz HMA, Sánchez SE. 2010. Biodegradation of the organophosphate pesticide tetrachlorvinphos by bacteria isolated from agricultural soils in México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 26: 27-38.
48. Ortiz I, Avila-Chavez MA, Torres LG. 2013. Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 4: 26-46.
49. Öztürk B, Ghequire M, Nguyen TPO, Mont DeR, Wattiez R, Springael D. 2016. Expanden insecticide catabolic activity gained by a single nucleotide substitution in a bacterial carbamate hydrolase gene. *Environmental Microbiology*. 18: 4878-4887.
50. Paparella CV, Pavesi AB, Feldman RN, Bouvet BR. 2011. El efecto de los agroquímicos en la espermatogénesis. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 10: 190-200.
51. Parekh NR, Hartmann A, Fournier JC. 1996. PCR detection of the mcd gene and evidence of sequence homology between the degradative genes and plasmids from diverse carbofuran-degrading bacteria. *Soil Biology Biochemistry*. 28: 1797-1804.
52. Plyuta V, Lipasova V, Popova A, Koksharova O, Kuznetsov A, Szegedi E, Chernin L, Khmel I. 2016. Influence of volatile organic compounds emitted by *Pseudomonas* and *Serratia* strains on *Agrobacterium tumefaciens* biofilms. *Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica*. 1-9.

53. Portilla-Portilla A, Pinilla-Monsalve GD, Caballero-Carvajal AJ, Gómez-Rodríguez E, Marín-Hernandez LR, Manrique-Hernández EF, Prieto-Serrano HJ, Sierra-Avenida JA, Oviedo-Pastrana DF, Gamboa-Tolosa N. 2014. Prevalencia de signos y síntomas asociados a la exposición directa a plaguicidas neurotóxicos en una población rural colombiana en 2013. *Revista de los Estudiantes de Medicina de la Universidad Industrial de Santander*. 27: 41-49.
54. Ramón VA, Rodas F. 2007. El control orgánico de plagas y enfermedades de los cultivos y la fertilización natural del suelo. *Naturaleza y Cultura Internacional*. Perú y Ecuador. Pp. 35.
55. Rogers SA, Whitehead DC, Mullikin T, Melander C. 2010. Synthesis and bacterial biofilm inhibition studies of ethyl N-(2-phenethyl) carbamate derivatives. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 8: 3857:3859.
56. Rosset PM. 1989. Cuba: alternative agriculture during crisis. In *New Partnerships for Sustainable Agriculture*. Ed. Lori Ann Thrupp. Washington, DC: World Resources Institute.
57. Sans FX. 2007. La diversidad de los Agroecosistemas. *Ecosistemas*. 16: 44-49.
58. Sarmiento MJ. 1974. Pérdidas directas ocasionadas por los insectos a la agricultura nacional. *Anales. Segundo Congreso Nacional de Investigadores Agrarios*. 1: 143-152.
59. Sefernick JL, deSouza ML, Sadowsky MJ, Wackett LP. 2001. Melamine deaminase and atrazine chlorohydrolase: 98 percent identical but functional different. *Applied Environmental Microbiology*. 183: 2405-2410.
60. Shin DH, Kim DU, Seong CN, Song HG, Ka JO. Genetic and phenotypic diversity of carbofuran-degrading bacteria isolated from agricultural soils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012. 22: 448-456.
61. SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera). Producción anual agrícola. 2015. Consultado en la dirección: www.gob.mx/siap. Día de consulta 15 de marzo de 2017.
62. Stephanovic S, Cirkovic I, Raning L, Svabic-Vlahovic M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters Applied Microbiology*. 38: 428-432.
63. Tien C-J, Lin M-C, Chiu W-H, Chen CS. 2013. Biodegradation of carbamate pesticides by natural river biofilms in different seasons and their effects on biofilm community structure. *Environmental Pollution*. 179: 95-104.
64. Tomasek PH, Karns JS. 1989. Cloning of a carbofuran hidrolase gene from *Achromobacter* sp. strain WM111 and its expression in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*. 171: 4038-4044.

65. Topp E, Hanson RS, Ringelberg DB, White DC, Wheatcroft R. 1993. Isolation and characterization of an N-methylcarbamate insecticide-degrading methylotrophic bacterium. *Applied Environmental Microbiology*. 59: 3339-3349.
66. Turrent FA. 1980. El agrosistema, un concepto útil dentro de la disciplina de productividad. Colegio de Posgraduados, Chapingo.
67. Xolocotzi HE. 1988. La agricultura tradicional en México. *Comercio Exterior*. 38: 673-678.
68. Xu J, Hong Q, Hong Y, Li S. 2011. Isolation, identification and degradation of carbofuran-degrading Strain CFDS-1. *Chinese Journal Applied Environmental Biology*. 17: 237-242.
69. Yan QX, Hong Q, Han P, Dong XJ, Shen YJ, Li SP. 2007. Isolation and characterization of a carbofuran-degrading strain *Novosphingobium* sp. FND-3. *FEMS Microbiology Letters*. 271: 207-214.

