



**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**

**CAMPUS GUANAJUATO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**

**POSGRADO EN QUÍMICA**

**“ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DEL  
PESTICIDA ORGANOCLORADO DDT POR  
BACTERIAS AISLADAS DE SITIOS  
CONTAMINADOS EN SALAMANCA, MEDIANTE  
DESARROLLO Y APLICACIÓN DE  
PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS BASADOS EN  
EL USO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN QUÍMICA**

**PRESENTA:**

**M.C.Q. BIANEY GARCÍA LARA**

**GUANAJUATO, GTO.**

**AGOSTO, 2020**



**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**  
CAMPUS GUANAJUATO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS  
**POSGRADO EN QUÍMICA**

Guanajuato, Gto., agosto, 2020.

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título: “ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DEL PESTICIDA ORGANOCOLORADO DDT POR BACTERIAS AISLADAS DE SITIOS CONTAMINADOS EN SALAMANCA, MEDIANTE DESARROLLO Y APLICACIÓN DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS BASADOS EN EL USO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.” Realizado por la M.C.Q. Bianey García Lara en el departamento de química sede Pueblito de Rocha de la división de ciencias Naturales y Exactas del Campus Guanajuato, que para obtener el grado de Doctora en Química presenta bajo la dirección del Dr. Kazimierz Wrobel Zasada, la Dra. Katarzyna Wrobel Kaczmarzyc y la Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa.

---

Dr. Kazimierz Wrobel Zasada.

---

Dra. Katarzyna Wrobel Kaczmarzyc.

---

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa.

Miembros del jurado asignados para el examen de obtención de grado de Doctora en química que presenta la M.C.Q. Bianey García Lara:

---

Dr. Armando Gómez Ojeda  
Presidente.

---

Dra. Eunice Yáñez Barrientos  
Secretario.

---

Dra. Alejandra Sarahí Ramírez Segovia  
Vocal.

---

Dr. Alan Alexander González Ibarra  
Vocal.

---

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar  
Vocal.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	XIV
Abreviaturas y estructuras de congéneres de DDT y sus metabolitos. ....	XIX
RESUMEN.....	1
Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	4
I.1    Contaminación medio ambiental en el estado de Guanajuato.....	4
I.2    Problemática de compuestos organoclorados. ....	5
I.3    Biodegradación de pesticidas en el medio ambiente.....	9
I.3.1.    Biorremediación como una estrategia de tratamiento de ambientes contaminados con DDT.....	17
I.3.2.    Uso de microorganismos en la biorremediación de ambientes contaminados con DDT.....	18
I.4    Espectrometría de masas como herramienta analítica utilizada en el presente proyecto. ....	23
I.4.1    Caracterización/identificación de microorganismos por MALDI-TOF MS y Biotyper.....	24
I.4.2    Técnicas instrumentales utilizadas en el análisis de compuestos organoclorados con enfoque en DDT y productos de su degradación.....	27
I.5    Desarrollo de procedimiento analítico utilizando GC-MS, AMDIS e índice de retención de Kováts para la identificación de metabolitos de DDT en medios de cultivo <sup>[95,96]</sup> .....	37
Capítulo II. OBJETIVOS.....	40
II.1.    Objetivo general. ....	40
II.2.    Objetivos particulares.....	40
Capítulo III. PARTE EXPERIMENTAL.....	41
III.1.    Disolventes. ....	41
III.2.    Estándares .....	41

III.3. Reactivos .....	42
III.4. Instrumentación Analítica. ....	43
III.5. Software. ....	44
Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
IV.1 Determinación de pesticidas organoclorados por GC-TQMS y GC-ECD en muestras sólidas recolectadas de terrenos industriales, en la ciudad de Salamanca. ....	45
IV.1.1 Introducción.....	45
IV.1.2 Objetivos particulares.....	48
IV.1.3 Condiciones experimentales.....	48
IV.1.3.1 Muestras.....	48
IV.1.3.2 Soluciones estándar para la calibración por GC-MS.....	49
IV.1.3.3 Calibración para el análisis por GC-ECD.....	49
IV.1.3.4 Protocolo de extracción aplicado a las muestras R1-R4.....	50
IV.1.3.5 Protocolo de extracción aplicado a las muestras S1-S4.....	50
IV.1.3.6 Métodos cromatográficos.....	51
IV.1.4 Resultados y discusión.....	52
IV.1.4.1. Determinación de congéneres de DDT por GC-MS en el modo Full Scan.....	52
IV.1.4.2. Importantes consideraciones en el análisis de DDT en diferentes matrices.....	58
IV.1.4.3. Determinación de compuestos organoclorados por GC-ECD. ....	60
IV.1.5 Conclusión.....	67
IV.2 Aislamiento de microorganismos del sitio industrial contaminado y su caracterización morfológica. ....	68
IV.2.1 Introducción. ....	68
IV.2.2 Objetivos particulares.....	69
IV.2.3 Condiciones experimentales.....	69
IV.2.3.1. Protocolo de selección y aislamiento de microorganismos.....	69
IV.2.3.2. Protocolo de preparación de soluciones, medio mínimo, LB y PDA. 70	
IV.2.4 Resultados y discusión. ....	71
IV.2.5 Conclusión.....	75
IV.3 Identificación de microorganismos por MALDI-TOF-MS Biotyper.....	76

IV.3.1	Introducción. ....	76
IV.3.2	Objetivo particular. ....	78
IV.3.3	Condiciones experimentales.....	78
IV.3.3.1.	Soluciones preparadas.....	78
IV.3.3.2.	Protocolos para identificación de microorganismos por MALDI-TOF MS con sistema Biotyper™.....	78
IV.3.3.2.1.	Método de transferencia directa (bacterias) <sup>[107]</sup> .....	78
IV.3.3.2.2.	Lisis celular con ácido fórmico <sup>[108]</sup> . ....	79
IV.3.3.2.3.	Lisis celular con ácido fórmico (hongos filamentosos) <sup>[110,111]</sup> .....	80
IV.3.3.2.4.	Lisis celular con perlas de circonio y ácido fórmico para hongos filamentosos. ....	81
IV.3.3.2.5.	Calibración de espectrómetro de masas MALDI-TOF para el uso de Biotyper <sup>[114]</sup> . ....	82
IV.3.3.2.6.	Protocolo de generación de nueva biblioteca de espectros de masas de hongos filamentosos expuestos a DDT <sup>[109,115,116]</sup> . ....	83
IV.3.4	Resultados y discusión. ....	85
IV.3.4.1	Análisis de hongos filamentosos: creación de una nueva base de datos a partir de los hongos aislados de suelos contaminados en Salamanca, Gto. ....	85
IV.3.4.2	Identificación de bacterias.....	92
IV.3.5	Conclusiones. ....	99
IV.4	Pruebas microbiológicas de crecimiento de las cepas individuales en presencia de DDT técnico. ....	101
IV.4.1	Introducción. ....	101
IV.4.2	Objetivo particular. ....	103
IV.4.3	Condiciones experimentales.....	103
IV.4.3.1.	Protocolo de preparación de soluciones. ....	103
IV.4.3.2.	Ensayo de viabilidad celular por diluciones y cuenta en placa. ....	103
IV.4.3.3.	Ensayo de viabilidad celular bacteriana por método de MTT <sup>[132]</sup> ....	104
IV.4.3.4.	Pruebas de crecimiento celular en medio mínimo sólido (MMS) fortificado con DDT técnico. ....	105
IV.4.3.5.	Cultivos celulares expuestos a DDT en medio mínimo líquido, obtenidos para estudiar biodegradación del DDT.....	106
IV.4.4	Resultados y discusión. ....	106
IV.4.4.1	Evaluación de crecimiento bacteriano en presencia de DDT.....	106

IV.4.4.2	Resultados de evaluación de viabilidad celular.....	108
IV.4.5	Conclusión.....	112
IV.5	Estudio de degradación de DDT y análisis de sus metabolitos utilizando GC-ECD y GC-MS. ....	114
Capítulo V.	CONCLUSIONES GENERALES .....	133
Capítulo VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	136
Capítulo VII.	ANEXOS .....	146
ANEXO I.	Artículos publicados.....	146



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Abreviaturas y estructuras de congéneres de DDT.....	XIX
Tabla II. Abreviaturas y estructuras de metabolitos de DDT.....	XIX
Tabla 1. Tipos de cáncer atribuidos a la intoxicación por DDT proveniente de fuentes medioambientales <sup>[7]</sup> .....	6
Tabla 2. Microorganismos con demostrada capacidad de degradar DDT, condiciones de crecimiento y productos de degradación obtenidos (AE – vía aerobia, AN- anaerobia, F-facultativo). .....	19
Tabla 3. Características fisicoquímicas y capacidad de biodegradabilidad predicha y calculada utilizando EPIWIN: Estimation Programme Interface EPI Suite™ de DDT y algunos de sus metabolitos anaerobios. <sup>[53]</sup> .....	22
Tabla 4. Ejemplos de aplicaciones de SPE, SPME y LLE en sus diferentes versiones aplicadas en el análisis de compuestos organoclorados. ....	31
Tabla 5. Revisión bibliográfica de procedimientos de determinación de DDT y sus productos de degradación por GC-MS.....	32
Tabla 6. Etiquetado de muestras recolectadas en Fertimex, Salamanca Guanajuato.....	47
Tabla 7. Preparación de las soluciones stock de estándares individuales de pesticidas organoclorados. ....	49
Tabla 8. Diluciones de los extractos de S1-S4 con ciclohexano para el análisis por GC-ECD.....	50
Tabla 9. Condiciones instrumentales para el análisis de pesticidas organoclorados por GC-MS.....	51
Tabla 10. Condiciones cromatográficas de GC-ECD aplicadas en la determinación de pesticidas organoclorados. ....	52
Tabla 11. Tiempos de retención obtenidos a partir del método cromatográfico propuesto, se muestra la asignación de los picos marcados en el cromatograma de la figura 9. ....	54
Tabla 12. Funciones de calibración de pesticidas organoclorados obtenidas por método GC-MS en el modo Full Scan, se muestran valores de regresión lineal y porcentaje de desviación estándar relativa (%DER). ....	55
Tabla 13. Concentraciones de compuestos organoclorados encontrados en muestras de residuos (R1-R4) por el método GC-MS en el modo Full Scan. Se presentan valores promedio para cada residuo con sus respectivas DE, obtenidos con base en dos réplicas independientes.....	57

Tabla 14. Tiempos de retención y su desviación estándar (DE) obtenidos a partir del método cromatográfico propuesto (DE obtenidos en base a tres replicas). .....	61
Tabla 15. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración por GC-ECD.....	62
Tabla 16. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) evaluados en el procedimiento de calibración y en el análisis de muestras reales (Suelos Salmantinos) en el método GC-ECD propuesto. ....	64
Tabla 17. Concentraciones de pesticidas organoclorados en muestras sólidas recolectadas de sitio industrial contaminado en la ciudad de Salamanca, determinados por GC-ECD (promedio $\pm$ DE (DER), n=3). .....	66
Tabla 18. Composición de medio mínimo de cultivo. ....	70
Tabla 19. Relación de concentraciones de micronutrientes para medio mínimo de cultivo. Cada solución se preparó en un volumen de 45 mL de agua deionizada. ....	71
Tabla 20. Características morfológicas de los aislados bacterianos obtenidos de las muestras S1-S4. ....	71
Tabla 21. Características morfológicas de los aislados de hongos obtenidos de las muestras S1-S4. ....	72
Tabla 22. Efecto de la concentración del DDT técnico en medio LB sólido sobre el crecimiento de los aislados de bacterias obtenidas de muestras S1-S4 (A) formación de colonias, (B) disminución de formación de colonias, (C) poca formación de colonias, (X) sin colonias. ....	73
Tabla 23. Efecto de la concentración de DDT técnico en medio mínimo sólido sobre el crecimiento de los aislados de bacterias obtenidos de muestras S1-S4.(A) formación de colonias, (B) disminución de formación de colonias, (C) poca formación de colonias, (X) sin colonias. ....	74
Tabla 24. Descripción de espectros de masas contenidos en las bases de datos y correspondencia a tipo de microorganismo. ....	76
Tabla 25. Relación entre volumen de ácido fórmico y masa de material biológico – condiciones recomendadas en manual de equipo <sup>[109]</sup> . ....	80
Tabla 26. Valores <i>m/z</i> utilizados para calibración de MALDI-TOF MS con Biotyper utilizando el estándar BTS, aplicando un límite de tolerancia de masa de $\pm 300$ ppm. ....	83
Tabla 27. Especies y/o géneros de bacterias identificadas en colonias aisladas de cuatro sitios (S1-S4) usando el sistema MALDI-TOF MS y programa Biotyper con la base de datos MALDI Biotyper. (Los códigos de colonias de acuerdo con la tabla 20, entre paréntesis se indica la puntuación de concordancia). ....	93
Tabla 28. Valores de las variables para cada uno de los sitios utilizados para el análisis PCA. Los valores “0” y “1” indican ausencia o presencia de la cepa en cada una de las muestras; para compuestos organoclorados se tomaron concentraciones promedio determinados por GC-ECD. ....	98
Tabla 29. Relación de volúmenes de cultivo y buffer para curva de calibración en el ensayo de MTT. ....	105

Tabla 30. Determinación de densidad óptica de cultivos de <i>S. fonticola</i> en medio LB líquido utilizando placa de 96 pocillos. ....	109
Tabla 31. Conteo de células viables en matraz 3 y 4. ....	109
Tabla 32. Resultados de cuantificación y viabilidad celular utilizando MTT como método colorimétrico. ....	110
Tabla 33. Lista de metabolitos identificados en base a análisis en GC-MS de cultivos bacterianos después de 14 días de incubación en MLM conteniendo 200 mg/L de DDT. ....	122

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posibles transformaciones de pesticidas en suelos. Modificado de referencia [16] et al.....	8
Figura 2. Condiciones de decloración inicial del DDT y productos. ....	10
Figura 3. Ruta metabólica de biodegradación de DDT. a) Con flechas amarillas se muestra la degradación aerobia de DDT. b) En flechas verdes se muestra la degradación aerobia de DDE. c) En flechas azules se muestra la degradación anaerobia de DDD y DDE <sup>[41]</sup> . ....	12
Figura 4. Representación gráfica de las vías de degradación microbiana propuestas para <i>p,p'</i> -DDT. Las flechas punteadas representan las reacciones de dehidrocloración y las flechas remarcadas en negro representan las reacciones por decloración reductiva <sup>[17]</sup> . ....	13
Figura 5. Ruta de degradación aerobia del <i>p,p'</i> -DDT. En este caso, DDD y DDE pueden seguir la misma ruta sintética aerobia debido a que la reacción se efectúa sobre los anillos aromáticos <sup>[22,23]</sup> . ....	15
Figura 6. Etapas de identificación de microorganismos por MALDI-TOFMS con Biotyper <sup>TM</sup> <sup>[59]</sup> . ....	26
Figura 7. Esquema general de un espectrómetro de masas en tándem espacial. (MS <sup>1</sup> primer cuadrupolo separador de masas, CID, MS <sup>3</sup> segundo cuadrupolo separador de masas) <sup>[94]</sup> . ....	37
Figura 8. Distribución de sitios en antiguo Fertimex donde se recolectaron las muestras para su análisis de contenido de pesticidas organoclorados <sup>[101]</sup> . ....	46
Figura 9. Típico cromatograma obtenido en el análisis por GC-MS en modo TIC de la solución de estándares de pesticidas organoclorados (10 mg/L de cada uno de los compuestos). ....	53
Figura 10. Comparación de espectros experimentales (rojo) y NIST (azul) del <i>p,p'</i> -DDT obtenido a partir del cromatograma TIC de la figura 9. ....	53
Figura 11. Comparación de espectro de masas experimental (rojo) con espectro de masas de biblioteca NIST (azul) el cual confirma la identidad del pico (*) de la figura 9 como DDMU. ....	54
Figura 12. Cromatogramas de la curva de calibración de 10 pesticidas organoclorados obtenidos por Full Scan en un intervalo de <i>m/z</i> de 50-500. ....	55

Figura 13. Picos cromatográficos de la curva de calibración de <i>p,p'</i> -DDE, <i>p,p'</i> -DDD y <i>p,p'</i> -DDT. ....	55
Figura 14. Cromatograma de residuo R1 donde se muestra los picos del <i>p,p'</i> -DDT (11), <i>p,p'</i> -DDD(10), <i>p,p'</i> -DDE(7) y DDMU(*). Adicionalmente se presentan las estructuras de los compuestos orgánicos clorados (a, b, c) que se asignaron comparando sus espectros de masas con la biblioteca NIST. ....	57
Figura 15. Evaluación de la degradación de <i>p,p'</i> -DDT a <i>p,p'</i> -DDD en el análisis cromatográfico (GC-MS Full Scan), basado en el método USEPA 8081B <sup>[104]</sup> . ....	59
Figura 16. Representación de método cromatográfico obtenido utilizando plataforma Pro EZGC <sup>®</sup> Chromatogram Modeler <sup>BETA</sup> de RESTEK para análisis por GC-ECD. ....	60
Figura 17. a) la rampa cromatográfica propuesta inicialmente parte de 100 °C a 130 °C (30 °C/min) hasta 300 °C (5 °C/min), se observó la co-elución de <i>p,p'</i> -DDE y <i>p,p'</i> -DDD. En b) utilizando las condiciones cromatográficas de la tabla 16 se logró la correcta elución de todos los analitos. ....	61
Figura 18. Típicos cromatogramas GC-ECD de las soluciones de calibración (50, 100, 500, 1000, 2500 y 5000 µg/L) de cada uno de los compuestos. En la parte inferior de la figura se aprecia una ampliación de las regiones de cromatogramas correspondientes a la elución de <i>p,p'</i> -DDE, <i>p,p'</i> -DDD y <i>p,p'</i> -DDT, respectivamente. ....	63
Figura 19. Cromatograma de extracto de muestra S4 etiquetado como “Comedor” obtenido por GC-ECD. ....	66
Figura 20. Fotos de los pocillos con co-cristales de muestra y HCCA. A) Co-cristalización correcta. B) Ejemplo de una mala aplicación de matriz producto de un contenido excesivo de material biológico. ....	79
Figura 21. Espectros de masas procesados (eliminación de línea base y suavizado) para la creación de un espectro principal en MALDI-Biotyper. Las flechas rojas señalan picos anómalos (espectro amarillo) que no corresponden con los picos principales, por lo que el espectro amarillo no es adecuado para formar al espectro principal (se elimina). ....	85
Figura 22. Espectros principales generados para aislados de hongos del sitio contaminado en Salamanca (panel izquierdo) junto con fotografías de los respectivos cultivos (panel derecho). ....	87
Figura 23. Dendograma del análisis multivariante por método de componentes principales (PCA), obtenidos a partir de los espectros principales de 14 colonias de hongos filamentosos aislados de los sitios S1-S4. ....	89
Figura 24. Espectros MALDI-TOF MS adquiridos para micelio de hongo 1.2B (arriba) y para medio PDB (abajo). El procedimiento de extracción fue el IV.3.2.2.3 para ambos. ....	90
Figura 25. Espectros MALDI-TOF MS obtenidos para extractos del aislado 2.3, que fueron obtenidos mediante el protocolo estándar (arriba) y el procedimiento basado en lisis celular con perlas de circonio y ácido fórmico. ....	91

Figura 26. Espectros MALDI-TOF MS obtenidos para extractos de aislados 1.1, que fueron obtenidos mediante el protocolo estándar (arriba) y el procedimiento basado en lisis celular con perlas de circonio y ácido fórmico (abajo).....	92
Figura 27. Algunos ejemplos de espectros de masas adquiridos para aislados que corresponden a diferentes géneros y especies diferentes de un mismo género. ....	95
Figura 28. Diferencias entre espectros adquiridos para diferentes aislados identificados dentro de la especie <i>Bacillus</i> . ....	95
Figura 29. Capturas de pantalla de Biotyper que muestran la comparación entre espectros experimentales con los de referencia para tres aislados con diferentes valores de concordancia ( <b>puntuación</b> ). (Espectro superior - experimental; espectro inferior en azul - referencia; señales en verde - iones concordantes; señales en rojo - iones en espectros experimentales que no concuerdan en la referencia).....	96
Figura 30. Gráfico circular que muestra la distribución relativa de géneros y/o especies bacterianas identificadas en los sitios contaminados S1-S4.....	97
Figura 31. Análisis de PCA obtenido para aislados bacterianos en relación con concentración de congéneres de DDT presente en sitios en contaminados S1-S4: (a) gráfico de puntuación que muestra la distribución de congéneres acorde con sitios contaminados (S1-S4) y (b) gráfico de distribución de aislados, ambos en el espacio bidimensional de los primeros dos componentes principales que describen 54 y 33% del total de la variabilidad, respectivamente. ....	98
Figura 32. Mecanismo por el cual el MTT es reducido a formazán por células vivas.....	102
Figura 33. Diagrama de diluciones seriadas para conteo de UFC.....	104
Figura 34. Placas Petri con MMS fortificado con 200 mg/L de DDT técnico y las ocho cepas de interés: H1.4 - <i>Bacillus pumilus</i> , suelo S1; A3.2 - <i>Bacillus megaterium</i> , suelo S2; 1.2 - <i>Bacillus marisflavi</i> , suelo S1; F3.2 - <i>Bacillus mycoides</i> , suelo S1; A1.1- <i>Leclercia adecarboxylata</i> , suelo S1; F3.3 - <i>Lysinobacillus fusiformis</i> , suelo S2; A3.1 - <i>Serratia fonticola</i> , suelo S2; F4.1 - <i>Bacillus cereus</i> , suelo S2. ....	107
Figura 35. Foto de las soluciones de calibración para el cultivo de <i>Serratia fonticola</i> con reactivo MTT.....	110
Figura 36. Comparación de resultados de conteo en placa entre control (matraz sin DDT-izquierda) y matraz fortificado con 200 mg/L (derecha) inoculados con <i>S. fonticola</i> cultivada por 5 días.....	111
Figura 37. Porcentajes de degradación de DDT por los ocho aislados bacterianas después de 14 días de crecimiento en MLM fortificado con 50 mg/L de DDT técnico (gris oscuro) y 200 mg/L (gris claro). Datos obtenidos por GC-ECD al final del periodo de cultivo y extracción según protocolo IV.5.3.2.....	119
Figura 38. Parámetros de GC-MS para la adquisición de señales de metabolitos de DDT en modo SIM. ....	121
Figura 39. Cromatogramas GC-MS adquiridos en modo SIM para <i>L.fusiformis</i> – aislado F3.3 (—), cultivo en consorcio (-·-·-) y control abiótico (----) después de 14 días de	

incubación con 200 mg/L de DDT técnico. El cromatograma muestra la suma de las intensidades de los iones cuantificadores correspondientes a diez compuestos..... 124

Figura 40. Evaluación comparativa de las abundancias de *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD y *p,p'*-DDD en los extractos obtenidos para cepas individuales después de dos semanas de crecimiento en presencia de 200 mg/L de DDT. Panel izquierdo: intensidades de las señales adquiridas por GC-MS en modo SIM; Panel derecho: concentraciones de estos compuestos determinadas por GC-ECD. Los valores medios se presentan con desviaciones estándar respectivas basadas en tres replicas ..... 126

Figura 41. Evaluación comparativa de las abundancias de metabolitos de DDT (DBP; DDNU; *o,p'*-DDMU; DBH; *p,p'*-DDMU), representando intensidad de las respectivas señales adquiridas por GC-MS (SIM) en los extractos de medios de cultivos individuales de las cepas después de 14 días de exposición a 200 mg/L de DDT. Se presentan valores promedio con sus respectivas desviaciones estándar basadas en tres réplicas..... 127

Figura 42. Propuesta de ruta de degradación de DDT por bacterias nativas y aisladas de sitios S1-S4. (Línea sólida indica las conversiones directas, la línea punteada se usó para indicar conversiones que podrían ocurrir no directamente; el número indica el aislado participante en cada transformación; los signos de interrogación son usados para aquellas transformaciones que no se puede atribuir a un aislado específico..... 130

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>2,3,5-T</b>	<b>Ácido 2, 4, 5-triclorofenoxiacético</b>	
<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	
<b>4-CBA</b>	ácido 4-clorobenzoico	4-Chlorobenzoic acid
<b>ACN</b>	Acetonitrilo	
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo	
<b>ADN (DNA)</b>	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
<b>AE</b>	Aerobia	
<b>AN</b>	Anaerobia	
<b>ARN (RNA)</b>	Ácido Ribonucleico	Ribonucleic acid
<b>ASE</b>	Extracción acelerada de solvente	Accelerated Solvent Extraction
<b>ATSDR</b>	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (por sus siglas en ingles)	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
<b>BHC</b>	Beta-Hexaclorociclohexano	
<b>BSTFA</b>	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
<b>C</b>	Ion calificador	
<b>CAR/PDMS</b>	Carboxen-polidimetilsiloxano	
<b>CFE</b>	Comisión Federal de Electricidad	
<b>CI</b>	Ionización Química	Chemical Ionization
<b>CID</b>	Ionización inducida por colisiones	
<b>COPs (POP)</b>	Compuestos orgánicos persistentes	Persistent organic pollutants
<b>CPE</b>	Extracción en punto de nube	Cloud Point Extraction
<b>CW/DVB</b>	Carbowax-divinilbenceno	
<b>DAD</b>	Detector espectrofotométrico por arreglo de diodos	Diod array detector
<b>DBP</b>	Diclorobenzofenona	
<b>DCM</b>	Diclorometano	
<b>DDA</b>	ácido 2,2-bis(p-clorofenil)acético	
<b>DDCN</b>	2,2-bis(clorofenil)acetonitrilo	
<b>DDD</b>	1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano	
<b>DDE</b>	2,2-bis(p-clorofenil)etano	
<b>DDMS</b>	2,2-bis(p-clorofenil)-1-cloroetano	
<b>DDMU</b>	2,2-bis(p-clorofenil)-1-cloroetileno	
<b>DDNU</b>	2,2-bis(p-clorofenil)etileno	
<b>DDOH</b>	2,2-bis(p-clorofenil)etanol	
<b>DDT</b>	1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano	
<b>DE (SD)</b>	Desviación Estándar	Standard deviation



<b>DER (RSD)</b>	Desviación Estándar Relativa	Relative standard deviation
<b>DLLME-SFO</b>	Solidificación de gota del extractante en la superficie de la mezcla de extracción.	Dispersive liquid-liquid microextraction on solidification of floating organic
<b>DLLME</b>	Microextracción líquido-líquido dispersiva	Dispersive liquid-liquid microextraction
<b>DR</b>	Declorinación reductiva	
<b>DVB/CAR/PDMS</b>	Divinilbenceno-carboxen-polidimetilsiloxano	
<b>EC</b>	Energía de colisión	
<b>ECD</b>	Detector por captura de electrones	Electron capture detector
<b>EDCs</b>	Disruptor Endocrino Químico	Endocrine disrupting chemicals
<b>EI</b>	Ionización por impacto de electrones	Electron ionization
<b>EPIWIN</b>	Programa de estimación por Interface EPI Suite™	Estimation program Interface EPI Suite™
<b>ESI-ITMS</b>	Espectrómetro de masas con ionización por electronebulización y separador de masas de trampa iónica	Electrospray ionization ion trap mass spectrometry
<b>FID</b>	Detector por ionización en flama	Flame ionization detector
<b>FW-152</b>	2,2-dicloro-1,1-bis(p-clorofenil)etanol	
<b>GC</b>	Cromatografía de Gases	Gas chromatography
<b>GCB</b>	Carbón negro grafitizado	Graphitized carbon black
<b>GC-FID</b>	Cromatografía de gases con detección con ionización en llama	Gas chromatography with flame ionization detector
<b>GC-IT/MS</b>	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas por trampa iónica	Gas chromatography with ionic trap mass spectrometer
<b>GC-MS</b>	Cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas	Gas chromatography with mass spectrometer
<b>GC-MS(TQ)</b>	Cromatografía de gases con detector de masas de triple cuadrupolo	Gas chromatography with Triple Quadrupole mass spectrometer
<b>GPC</b>	Cromatografía de permeación en gel	Gel permeation chromatography
<b>HLB</b>	Copolimero hidrofílico-lipofílico balanceado	
<b>HPLC-FLD</b>	Cromatografía líquida de alta resolución con detector fluorométrico	High performance liquid chromatography with fluorometric detector
<b>HPLC-DAD</b>	Cromatografía líquida de alta resolución con detector espectrofotométrico de arreglo de diodos	High performance liquid chromatography with diode array detector

<b>HSME</b>	Microextracción por sorción en fase sólida o en película de solutos gaseosos	Headspace solvent microextraction
<b>HSSE</b>	Extracción-sorción en headspace	Headspace sorptive extraction
<b>Hx</b>	Hexano	
<b>HCCA</b>	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hydroxycinnámico	2-Cyano-3-(4-hydroxyphenyl) acrylic acid
<b>IARC</b>	Agencia internacional para la investigación sobre el cáncer (por sus siglas en inglés)	International agency for research on cancer
<b>ID</b>	Diámetro Interno	Internal diameter
<b>IP</b>	Ion Precursor	
<b>Ip</b>	Ion Producto	
<b>KEGG</b>	Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (por sus siglas en inglés)	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
<b>LC (QL)</b>	Límite de cuantificación	Quantifier limit
<b>LC-MS</b>	Cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas	Liquid chromatography with mass spectrometer
<b>LD (DL)</b>	Límite de detección	Detection limit
<b>LDS-USAEME</b>	Microextracción por emulsificación con solvente de baja densidad asistido por ultrasonido	Low-density solvent based ultrasound-assisted emulsification microextraction
<b>LLE</b>	Extracción líquido-líquido	Liquid-liquid extraction
<b>Log Kow (log P)</b>	Coeficiente de reparto Octano-Agua	
<b>LPE</b>	Extracción en fase líquida	Liquid phase extraction
<b>LPME</b>	Microextracción en fase líquida	Liquid phase microextraction
<b>LSE</b>	Extracción líquido-sólido	Liquid-solid extraction
<b>MA-CPE</b>	Extracción por punto de nube asistido por microondas	Microwave assisted cloud point extraction
<b>MAE</b>	Extracción asistida por energía de microondas	Microwave assisted extraction
<b>MALDI-MS</b>	Espectrometría de masas con desorción/ionización laser asistida por matriz	Matrix-assisted laser desorption/ionization Mass spectrometer
<b>MASE</b>	Microextracción con solvente soportado en membranas	Membrane-assisted solvent extraction
<b>MIP</b>	Impresión molecular en polímero	Molecularly imprinted polymer
<b>MISPE</b>	Impresión molecular en fase sólida	Molecularly imprinted solid phase extraction
<b>mPC-CE-MS/MS</b>	Preconcentración por membrana y electroforesis capilar en tándem con espectrometría de masas	Membrane preconcentration-capillary electrophoresis tandem mass spectrometry
<b>MRM</b>	Monitoreo de reacciones múltiples	

<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio	
<b>MSTFA</b>	N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
<b>NHL</b>	Linfoma Non Hodgkin (por sus siglas en ingles)	Non Hodgkin Linfoma
<b>NIOSH</b>	Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional (por sus siglas en ingles)	National Institute of Occupational Safety and Health
<b>NIST</b>	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (por sus siglas en ingles)	National Institute of Standards and Technology
<b>NPD</b>	Detector de Nitrógeno-fosforo	Nitrogen-phosphorus detector
<b>OMS (WHO)</b>	Organización Mundial de la Salud	World Health Organization
<b>OSHA</b>	Administración de seguridad y salud ocupacional (por sus siglas en ingles)	Occupational Safety and Health Administration
<b>PA</b>	Poliacrilato	
<b>PAH</b>	Hidrocarburos Poliaromáticos	Poliaromatic hydrocarbon
<b>PCBs</b>	Bifenilos policlorados	Polychlorinated biphenyls
<b>PCNB</b>	Pentacloronitrobenceno	
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano	
<b>PDMS/DVB</b>	Polidimetilsiloxano y divinilbenceno	
<b>PDR</b>	Porcentaje de diferencia relativa	
<b>PE</b>	Polietileno	
<b>PEMEX</b>	Petroleos Mexicanos	
<b>PID</b>	Detector por fotoionización	Photoionization Detector
<b>PIB</b>	Producto Interno Bruto	
<b>PPMS</b>	Polifenilmetilsiloxano	
<b>Q</b>	Cuadrupolo	
<b>Q'</b>	Ion cuantificador	
<b>QuEChERS</b>	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe	
<b>S/N</b>	Relación señal-ruido	
<b>SBSE</b>	Extracción en barra magnética	Stir bar sorptive extraction
<b>SDME</b>	Micro extracción en una gota	Single drop microextraction
<b>SEMARNAT</b>	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales	
<b>SFE</b>	Extracción por fluidos supercríticos	Supercritical fluid extraction
<b>SIM</b>	Monitoreo de ion selectivo	Selective ion monitoring
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida	Solid phase extraction
<b>SPE-CE</b>	Extracción en fase sólida acoplada a Electroforesis capilar	Solid phase microextraction-Capillary electrophoresis

<b>SPME</b>	Microextracción en fase sólida	Solid phase microextraction
<b>SRM</b>	Monitoreo de reacción seleccionado	
<b>TIC</b>	Conteo total de iones	Total ion count
<b>TOF</b>	Tiempo de vuelo	Time of flight
<b>TR</b>	Tiempo de retención	
<b>UHPLC</b>	Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento	Ultra-high performance liquid chromatography
<b>USE</b>	Extracción asistida por ultrasonido	Ultrasound extraction
<b>USEPA</b>	Agencia de protección al Ambiente de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés)	United States Enviromental Protection Agency

## Abreviaturas y estructuras de congéneres de DDT y sus metabolitos.

Tabla I. Abreviaturas y estructuras de congéneres de DDT.

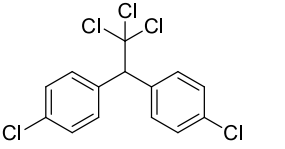
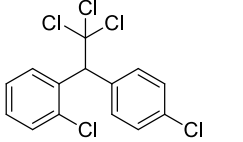
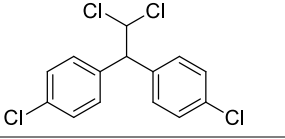
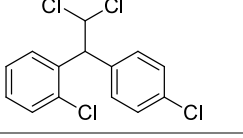
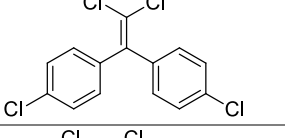
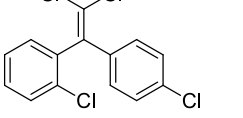
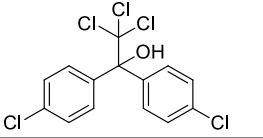
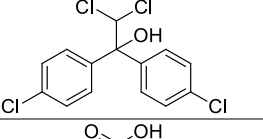
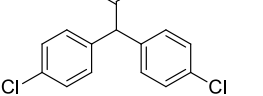
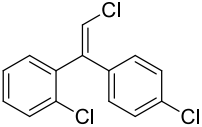
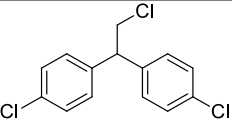
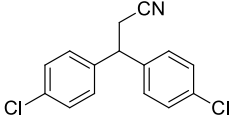
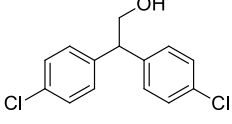
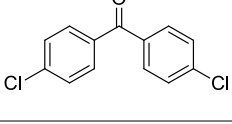
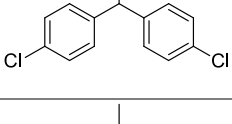
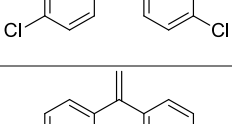
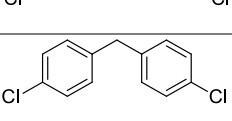

Compuesto	Estructura	Nombre genérico	Nomenclatura IUPAC
<b><i>p,p'</i>-DDT</b>		Diclorodifeniltricloroetano	1-cloro-4-[2,2,2-tricloro-1-(4-clorofenil)etil]benceno
<b><i>o,p'</i>-DDT</b>			1-cloro-2-[2,2,2-tricloro-1-(4-clorofenil)etil]benceno
<b><i>p,p'</i>-DDD</b>		Diclorodifenildicloroetano	1,1-dicloro-2,2-bis-(4-clorofenil)etano
<b><i>o,p'</i>-DDD</b>			1-cloro-4-[2,2-dicloro-1-(4-clorofenil)etil]benceno.
<b><i>p,p'</i>-DDE</b>		Diclorodifenildicloroetileno.	1-cloro-4-[2,2-dicloro-1-(4-clorofenil)etenil]benceno
<b><i>o,p'</i>-DDE</b>			1-cloro-2-(2,2-dicloro-1-(4-clorofenil)vinil)benceno

Tabla II. Abreviaturas y estructuras de metabolitos de DDT.

Compuesto	Estructura	Nombre genérico	Nomenclatura IUPAC
<b>Dicofol</b>		Keltano	2,2,2-tricloro-1,1-bis(4-clorofenil)etanol
<b>FW-152</b>		Diclorometil-dicofol	2,2-dicloro-1,1-bis(4-chlorofenil)etanol
<b>DDA</b>		Ácido bis( <i>p</i> -clorofenil)acético	Ácido 2,2-bis(4-clorofenil)acético

<b>DDMU</b>		1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etileno	1,1-(2-cloro-1,1-etenedil)-bis-(4-clorobenceno)
<b>DDMS</b>		-	1-cloro-4-[2-cloro-1-(4-clorofenil)etil]benceno
<b>DDCN</b>		-	2,2-bis(4-clorofenil)acetone nitrilo
<b>DDOH</b>		-	2,2-bis(4-clorofenil)etanol
<b>DBP</b>		-	Bis-(4-clorofenil)metanona
<b>DBH</b>		-	Bis(4-clorofenil)metanol
<b>DDNS</b>		-	2,2-bis(4-clorofenil)etano
<b>DDNU</b>		-	2,2-bis(4-clorofenil)etileno
<b>DDM</b>		-	Bis(4-clorofenil)metano



## RESUMEN

La contaminación medioambiental es un serio problema a nivel mundial difícil de estimar. Dependiendo de la actividad desarrollada en la región y del tipo de tratamiento de desechos, diversos compuestos son emitidos y pueden distribuirse en el aire, suelos y en sistemas acuíferos entrando en la cadena alimenticia del hombre. Un ejemplo representativo es el uso de diferentes pesticidas. Los pesticidas son sustancias destinadas a prevenir, controlar o destruir cualquier plaga, son ampliamente utilizados en el sector agrícola, industrial y doméstico. Se han utilizado toneladas de estos compuestos por décadas, provocando su acumulación en diferentes compartimientos del medio ambiente y efectos dañinos en los organismos vivos, por lo cual, a lo largo de los años, algunos productos han sido prohibidos gradualmente. Tal es el caso del pesticida organoclorado DDT (Diclorodifeniltricloroetano) ampliamente utilizado desde 1940 para el control de pestes en la agricultura, y para combatir el mosquito portador de la malaria en zonas tropicales. Prohibido en 1972 por la USEPA (United States Environmental Protection Agency), el DDT fue ampliamente utilizado por varios países desde Europa hasta la India. México no fue la excepción y a partir de 1959 se convirtió en el principal productor a nivel regional con dos empresas quienes sintetizaron el pesticida en forma integral: Diamond Shamrock de México y Montrose Mexicana, esta última, cambio su razón social a Fertilizantes Mexicanos, Velpol S. A. de C. V. y Tekchem, S.A. de C.V. La producción de Fertimex, empresa paraestatal única en su tipo y ubicada en Salamanca, Gto., representó en 1975 el 73% y para 1984 el 56% de la producción de insecticidas organoclorados y organofosforados en México, fabricando todos los insumos intermediarios para generar el DDT grado técnico logrando producir en este periodo hasta 60 000 toneladas.

Tekchem (Fertimex) fue clausurada por la Profepa (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente) en el 2007 a raíz del siniestro ocurrido el 12 de septiembre del año 2000, quedando en manos del Gobierno de Guanajuato. Actualmente, la superficie del terreno alberga aproximadamente treinta mil toneladas de desechos abandonados.



En el capítulo I de esta investigación abordaremos la contaminación medio ambiental provocada por el DDT residual presente en los campos abiertos de la vieja Fertimex. Se dará una breve explicación de la biodegradación de este pesticida fomentada por diversos microorganismos nativos de la región, su mecanismo de acción y sus productos finales.

Además, se describen las herramientas y procedimientos analíticos, las cuales permitan caracterizar/identificar y cuantificar diferentes tipos de contaminantes medioambientales, incluyendo aquellos cuyo uso ha sido prohibido, los contaminantes emergentes, así como sus metabolitos en organismos vivos y productos de su degradación. Entre las herramientas utilizadas en este campo de investigación, destaca espectrometría de masas (MS) especialmente en acoplamiento con sistemas de separación tales como cromatografía de gases (GC-MS) o líquidos (LC-MS).

En el capítulo II se exponen los objetivos del trabajo. La tesis ha sido enfocada en el desarrollo de procedimientos analíticos de relevancia medioambiental, aislamiento e identificación de microorganismos nativos de los sitios contaminados, examinando así, su utilidad como potenciales degradadores de DDT utilizando espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases y líquidos como principal herramienta analítica en la identificación de intermediarios y/o productos finales de la degradación.

En el capítulo III presenta la lista de equipos, materiales, estándares, reactivos y programas de análisis de datos empleados durante este proyecto.

El capítulo IV incluye cinco secciones de estudios realizados para cumplir con los objetivos planteados, cada una de ellas puntualiza de manera específica el estudio realizado con una breve introducción, objetivo particular, condiciones experimentales, discusión de resultados y sus correspondientes conclusiones. En la sección IV.1 se describe el análisis de pesticidas en depósitos industriales provenientes de Salamanca, Gto. Para este estudio, se utilizó la técnica analítica de GC-ECD debido a su alta sensibilidad en la detección de compuestos halogenados, con el fin de cuantificar compuestos organoclorados presentes en 4 diferentes muestras sólidas recolectadas en sitio contaminado. La sección IV.2 puntualiza los protocolos y procedimientos en el aislamiento de microorganismos endémicos de la región contaminada (aislados de las cuatro muestras sólidas) y su caracterización morfológica. Además, en la sección IV.3 se describe su identificación a nivel de género y/o

especie empleando MALDI-TOFMS Biotyper. En la sección IV.4 describe las pruebas microbiológicas de tolerancia/resistencia en las cepas endémicas. Inicialmente, cada una de las cepas identificadas fue expuesta a diferentes concentraciones de DDT técnico en el medio de crecimiento, observando así, diferentes comportamientos como inhibición de formación de colonias, así como pruebas de viabilidad celular. A partir de los resultados obtenidos en los apartados anteriores, la sección IV.5 describe el proceso de biodegradación de DDT por las cepas nativas resistentes cultivadas individualmente y en consorcio, asimismo, el desarrollo de un procedimiento analítico para analizar y caracterizar por GC-MS los productos de degradación y con GC-ECD el porcentaje de degradación en los medios.

Los estudios realizados generaron una serie de conclusiones particulares que se presentan al final de cada sección. Las conclusiones generales se presentan en el capítulo V y las referencias bibliográficas en el VI.

Finalmente, en el capítulo VII, se presentan los artículos publicados durante la realización del proyecto de doctorado.

## **Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL.**

### **I.1 Contaminación medio ambiental en el estado de Guanajuato.**

La contaminación en el estado de Guanajuato se encuentra enfocada en el llamado “Corredor Industrial” que comprende principalmente los municipios de León, Silao, Irapuato y Salamanca. Esta última presenta severos daños al ambiente debido a las industrias que ahí laboran, tal es el caso de PEMEX, CFE y algunas antiguas como por ejemplo Fertimex, empresa que cambio su razón social y después pasó a llamarse Tekchem. Las emisiones de estas empresas han afectado la calidad del aire, contaminaron el agua de pozos, lagos y ríos como el Lerma que de hecho ha sido declarado como “el río muerto”<sup>[1]</sup>. Los desechos generados por las refinerías como Pemex son lodos aceitosos, lodos plomizos, lodos blancos, catalizadores agotados, aceites gastados, carbón desactivado, escorias de calentadores y calderas, lodos biológicos, bifenilos policlorados, lana mineral, sosa gastada, entre otros. La termoeléctrica perteneciente a CFE emplea combustóleo para calentar agua en una caldera provocando emisiones de dióxido de azufre, dióxido de carbono, metales pesados como vanadio, cromo, zinc, níquel, plomo y manganeso. Por su parte, las empresas de industrias químicas han generado residuos entre los cuales se encuentran plaguicidas. En particular, la desaparecida Fertimex, que permanece cerrada desde el 2007, ha dejado en sus terrenos depósitos de residuos tóxicos. La empresa comenzó a principios del año 1950 con la producción de DDT en México. Para 1960, México se posicionó como el principal productor de DDT en América Latina, aumentando su capacidad para la producción de otros insecticidas como el BHC (hexacloruro de benceno) y el toxafeno; herbicidas como el 2, 4-D y 2, 3, 5-T y fungicidas como el PCNB (pentacloronitrobenceno)

toneladas de estos productos, cubriendo el 72% de la producción de insecticidas organoclorados del país. Actualmente, estos terrenos albergan 84 000 toneladas de suelo contaminado de plaguicidas caducos, siendo el DDT junto con los compuestos acompañantes los de mayor preocupación<sup>[2,3]</sup>.

## **I.2 Problemática de compuestos organoclorados.**

Los pesticidas organoclorados abarcan al DDT (1-cloro-4-[2,2,2-tricloro-1-(4-clorofenil)etil]benceno), endosulfán, aldrina, endrina, lindano, heptacloro, entre otros; la lista incluye además diferentes productos de degradación de estos compuestos. Los organoclorados son compuestos apolares, persistentes en el medio ambiente, bioacumulables y de alta toxicidad. Por su liposolubilidad se acumulan en organismos vivos y entran en la cadena alimenticia del hombre. A pesar de que el uso de la mayoría de estos pesticidas ha sido prohibido, la problemática de contaminación medioambiental sigue siendo actual. El DDT, como un pesticida organoclorado es un contaminante medioambiental persistente y altamente tóxico. Su uso ha sido permitido casi durante medio siglo y, aunque ahora está prohibido en la agricultura, el DDT sigue siendo utilizado contra los mosquitos que transmiten la malaria. Todos estos aspectos (residuos industriales, residuos de las emisiones antiguas y contaminación por el uso en la actualidad) hacen que la problemática relacionada con la presencia de DDT en el medio ambiente no desaparezca. Con base en la información sobre residuos de pesticidas en Salamanca, este trabajo se enfoca en el grupo de compuestos derivados del DDT.

El DDT técnico, la formulación más comúnmente usada como insecticida, contiene 85% de *p,p'*-DDT, 15% *o,p'*-DDT (1-cloro-2-[2,2,2-tricloro-1-(4-clorofenil)etil]benceno) y trazas de *o,o'*-DDT entre otros compuestos, incluyendo isómeros de DDD (1,1-dicloro-2,2-bis-(4-clorofenil)etano) y DDE (1,1-dicloro-2,2-bis-(4-clorofenil)etileno), generalmente llamados congéneres<sup>[4]</sup> de DDT, que pueden ser detectados en el medio ambiente, junto con sus productos de degradación.

El DDT y otros pesticidas hidrocarbonados clorados fueron desarrollados con el fin de proteger cultivos principalmente de algodón, cereales y papa, también se utilizó en productos ya cosechados como son los frutos y vegetales percederos. En 1960, Rachel

Carson demostró el potencial de bioacumulación de DDT representando una seria amenaza para la biodiversidad<sup>[5]</sup>. Hoy en día, el DDT está prohibido en la mayoría de los países, pero aún sigue siendo utilizado en algunas naciones en vías de desarrollo para prevenir la malaria y otras enfermedades tropicales, siguiendo el criterio de riesgo/beneficio al usar este pesticida. Algunas de estas naciones son Botswana, Eritrea, Madagascar, Marruecos, Islas Marshall, Mozambique, Senegal, Sudáfrica, Etiopía e India, estos dos últimos países siguen produciendo DDT bajo el Convenio de Estocolmo, anexo B, parte II, párrafo 1. Todos los pesticidas organoclorados son muy persistentes y ampliamente prohibidos por sus propiedades que ponen en riesgo la salud de los seres vivos. Específicamente, el DDT es lipofílico y neurotóxico provocando la abertura de los canales de sodio dentro de los axones de la neurona, por ello, una transmisión de impulso continuo se relaciona con estados de hiperexcitación<sup>[6]</sup>. Una intoxicación grave provoca sacudidas mioclónicas y convulsiones tónico-clónicas generalizadas seguidas de coma y depresión respiratoria. También existe evidencia de su potencial carcinogénico como se muestra en la tabla 1. La IARC lo ha clasificado en el grupo 2B como “probablemente carcinogénico para humanos” desde 1987.

Tabla 1. Tipos de cáncer atribuidos a la intoxicación por DDT proveniente de fuentes medioambientales<sup>[7]</sup>.

<b>Tipo de cáncer</b>	<b>EPA<sup>a</sup></b>	<b>Evidencia Epidemiológica</b>	<b>Evidencia Toxicológica</b>
Próstata	No registrado	Positivamente asociado con cáncer de próstata.	DDE (metabolito de DDT) puede enlazar al receptor andrógeno en cultivos de células de próstata <sup>[8]</sup> .
Non Hodgkin lymphoma (NHL)	No registrado	No concluyente.	No existe evidencia directa <sup>[9]</sup> .
Seno	No registrado	No concluyente	El aumento de <i>p,p'</i> -DDT en suero es asociado positivamente con cáncer de seno, pero solo si el individuo fue expuesto durante la adolescencia (14 años aprox.) <sup>[10]</sup>
Páncreas	No registrado	No concluyente	El DDT, DDD y DDE no están directamente correlacionados al cáncer de páncreas, pero no se descarta su participación en este <sup>[11]</sup> .

<sup>a</sup>Estatus de regulación obtenida de Pesticide Action Network Pesticides Database (pesticideinfo.org [accessed October 20, 2012]).

Las propiedades carcinogénicas de los pesticidas pueden ser influenciadas por una serie de factores que incluyen la edad, sexo, susceptibilidad individual, cantidad y tiempo de exposición, y contacto simultáneo con otras sustancias que causen cáncer. Los mecanismos de carcinogenicidad de los pesticidas pueden ser atribuidos a su potencial para afectar directamente al material genético por medio de un daño estructural o funcional en los cromosomas, ADN, histonas, o interrumpiendo indirectamente la expresión de un perfil de genes a través del deterioro de los organelos celulares como la mitocondria y retículo endoplásmico, también en receptores nucleares, endocrinos, y otros factores que involucren el mantenimiento de la homeostasis celular<sup>[12,13]</sup>.

La exposición a pesticidas puede ser un riesgo para la reproducción humana reduciendo consistentemente la fertilidad y fecundidad. La exposición en etapa gestacional parece resultar en un elevado riesgo generando abortos espontáneos. Evidencias epidemiológicas han permitido asociar elevados niveles de exposición a DDT y sus congéneres con un desarrollo desfavorable en el feto y con partos prematuros; cabe señalar que, cualquier sustancia que induce defectos de nacimiento es llamada “teratógeno”. Un gran número de pesticidas pertenecen a un grupo importante de sustancias químicas llamadas “disruptores endócrinos” (EDCs), de ellos se sabe que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, enlace, acción, o eliminación de hormonas en el cuerpo responsables de la homeostasis y regulación de procesos de desarrollo<sup>[14]</sup> con efectos estrogénicos sobre el sistema reproductor femenino alterando la producción hormonal en los ovarios.

Hay estudios en los que utilizan células granulosas porcinas que confirman la alteración sobre la síntesis de progesterona provocada tanto por DDT como por DDE. Es interesante que, en bajas concentraciones (10 ng/mL), el DDE incrementa la síntesis de progesterona activando la proteína quinasa A, mientras que en presencia de DDT, la síntesis de progesterona se inhibe. Aunque se sabe que efectos nocivos de DDT y/o sus isómeros/congéneres son diferentes, dependiendo de la dosis y de las condiciones de exposición, los mecanismos moleculares subyacentes no se conocen aún con exactitud. Se ha propuesto que observadas discrepancias podrían atribuirse a las diferencias entre

afinidades receptor/enzima, al aplicar diferentes dosis de compuestos que presentan estructuras químicas diferentes y también dependiendo del tiempo de exposición<sup>[15]</sup>.

Una vez en el ambiente, los pesticidas persisten por tiempos prolongados, pero también sufren transformaciones mediante procesos abióticos (principalmente reacciones redox, hidrólisis, fotólisis) y/o mediante procesos asistidos por la actividad metabólica de diversos organismos vivos (figura 1).

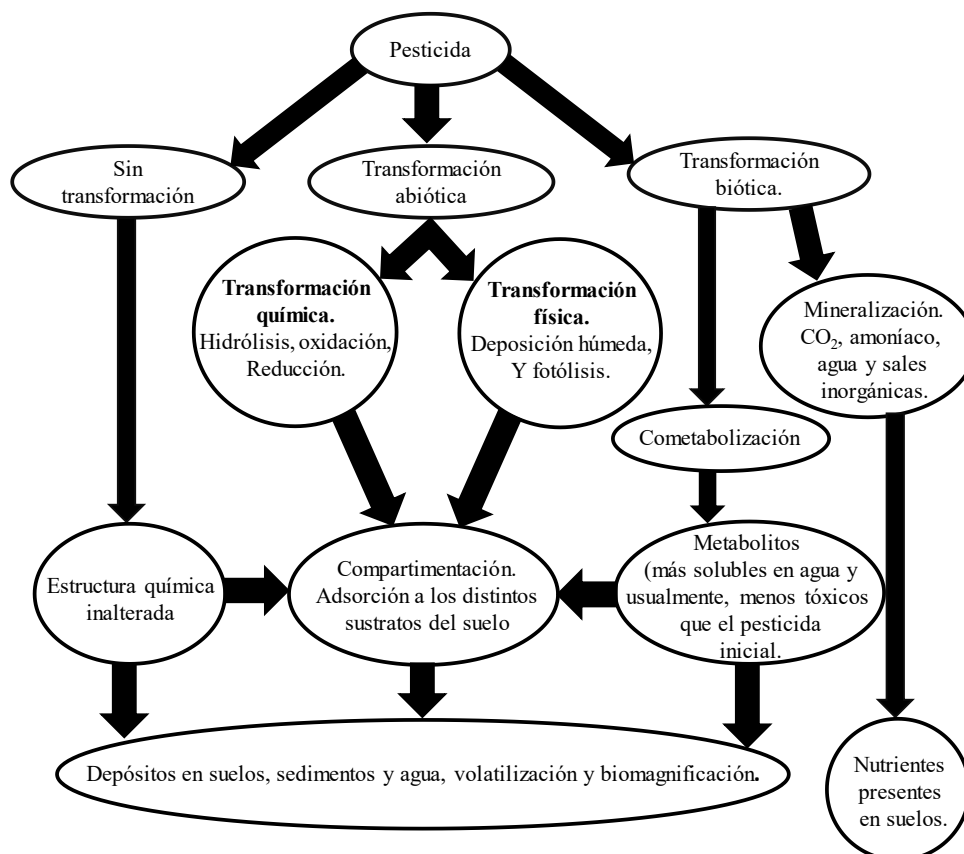


Figura 1. Posibles transformaciones de pesticidas en suelos. Modificado de referencia [16] et al.

En el caso de DDT, su degradación y detoxificación requiere la eliminación de cloro; debido a que su estructura contiene un enlace covalente C-Cl, en esta etapa existe una mayor contribución de procesos asistidos por la biota, mientras que la participación de procesos abióticos es mucho menor. La biodegradación de pesticidas se lleva a cabo gracias a la adaptación de organismos que viven en un ambiente contaminado y es posible gracias al desarrollo de mecanismos de defensa, tolerancia y sobrevivencia en estos organismos. Por lo general, la biodegradación de un xenobiótico orgánico involucra varias etapas,

conduciendo a los productos finales que pueden ser utilizados por el organismo como fuente de elementos vitales y de energía (co-metabolización).

El uso de organismos vivos para procesos de remediación medioambiental ha ido en aumento y este tema pertenece al dominio de biorremediación. Sin embargo, siempre es necesario asegurar que los productos obtenidos de la biodegradación sean menos tóxicos que el contaminante mismo; lo ideal, aunque lejos del alcance real, es lograr una mineralización completa.

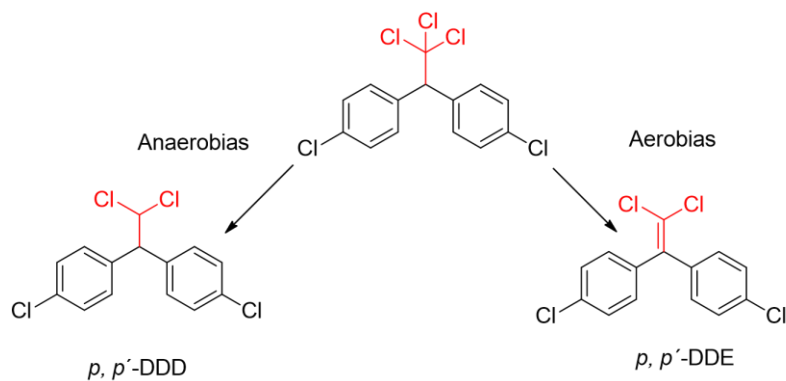
La biodegradación de compuestos tales como DDT (lipofílico, semi volátil) es de interés en el contexto de remediación de suelos. La estrategia común en estudios de biorremediación basada en microorganismos consiste en; (i) el aislamiento de hongos y/o bacterias que habitan sitios contaminados para evaluar su capacidad de biodegradación del(los) contaminante(s), (ii) estudios enfocados en el entendimiento de rutas metabólicas responsables de la biodegradación y (iii) estudios enfocados en lograr alta eficacia de biodegradación utilizando a menudo, las herramientas de la biotecnología.

Es muy importante enfatizar la complejidad de la problemática relacionada con el DDT en el medio ambiente. Es un compuesto persistente, pero susceptible a una degradación lenta en el medio ambiente. Debido a que sus emisiones ocurrieron hace décadas, actualmente nos enfrentamos con la presencia no solo de DDT y sus isómeros, también con una variedad de productos de degradación que son tóxicos y presentan diferente polaridad y solubilidad. La contaminación afecta entonces diferentes compartimentos del medio ambiente y es necesario considerar varios compuestos contaminantes.

### **I.3 Biodegradación de pesticidas en el medio ambiente.**

Los procesos de degradación del DDT han sido estudiados extensivamente; se han considerado para ello los procesos bióticos y abióticos que ocurren tanto en condiciones anaerobias como aerobias. Específicamente, el primer paso crítico de declorinación se lleva a cabo bajo diferentes condiciones tal como se muestra en la figura 2.





1. Condiciones reductoras.
2. Degradación biótica anaerobia.

1. Degradación abiótica.
2. Degradación biótica aerobia.
3. Degradación fotoquímica

Figura 2. Condiciones de dechlorinación inicial del DDT y productos.

Es importante que, debido a la alta electronegatividad del cloro, el DDT es mucho más vulnerable a los procesos de reducción que de oxidación. Como producto de la dechlorinación reductiva del DDT en primera instancia se forma DDD que presenta una mayor biodisponibilidad respecto al DDT y por ello es más susceptible a biodegradación formando compuestos polares. Esta reacción de dechlorinación es de hecho el mecanismo principal para la conversión de ambos isómeros de DDT (*o,p'*-DDT y *p,p'*-DDT) generalmente bajo condiciones anaerobias<sup>[17]</sup>. Por su parte, en las condiciones aerobias, el primer paso consiste en la dehidroclorinación con la formación de DDE, el cual es un compuesto recalcitrante y menos susceptible a su metabolización por microorganismos. Cabe resaltar que todos los isómeros de DDT, DDE y DDD han sido clasificados por USEPA como contaminantes prioritarios y son considerados como objetivos en los procesos de remediación medioambiental (como ya se ha mencionado antes, DDT, DDE, DDD y sus respectivos isómeros son llamados congéneres del DDT). A partir del DDD y DDE, la biodegradación del pesticida es un proceso muy complejo, como se puede observar en la figura 3, que muestra la ruta KEGG para el DDT. Cabe señalar que un gran número de compuestos intermediarios pueden formarse durante la metabolización del DDT por organismos vivos.

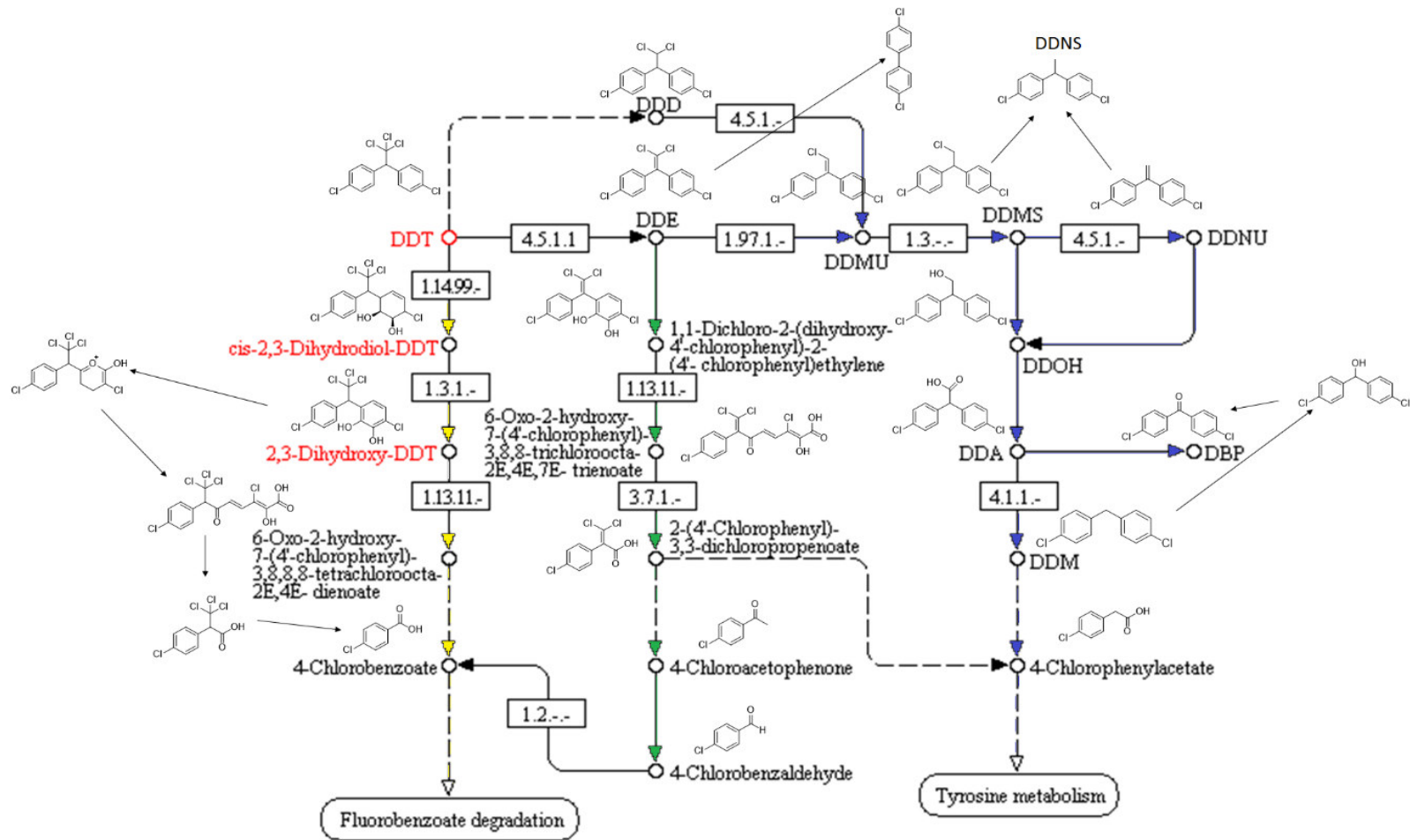


Figura 3. Ruta metabólica de biodegradación de DDT. a) Con flechas amarillas se muestra la degradación aerobia de DDT. b) En flechas verdes se muestra la degradación aerobia de DDE. c) En flechas azules se muestra la degradación anaerobia de DDD y DDE<sup>[41]</sup>.

En la biodegradación de pesticidas organoclorados contribuyen comunidades microbianas mutualistas, aunque los mecanismos moleculares responsables de dicha degradación no se conocen con exactitud. Las etapas de biodegradación propuestas para el caso particular de *p,p'*-DDT se presentan esquemáticamente en la figura 4<sup>[17]</sup>. El punto clave de este proceso es la declorinación, en la que cada uno de los átomos de cloro en carbono alifático es sustituido por hidrógeno. Se han sugerido dos rutas de declorinación, una es la sustitución directa formando *p,p'*-DDD (declorinación reductiva, DR) y la otra, llamada dehidroclorinación, que ocurre en dos pasos. En el primer paso, se lleva a cabo la reducción mediante la formación de enlace doble entre carbonos alifáticos formando *p,p'*-dicloro-difenil-dicloroetil (*p,p'*-DDE) y liberando una molécula de HCl. En la segunda etapa, el enlace doble se rompe con sustitución de dos hidrógenos. La declorinación resulta en una mayor susceptibilidad de la molécula a la oxidación y a la formación de productos menos tóxicos. Efectivamente, se ha observado que sistemas anaeróbicos son capaces de degradar contaminantes clorados por DR, pero los productos generados en esta degradación pueden ser más rápidamente degradados por procesos aeróbicos<sup>[18]</sup>.

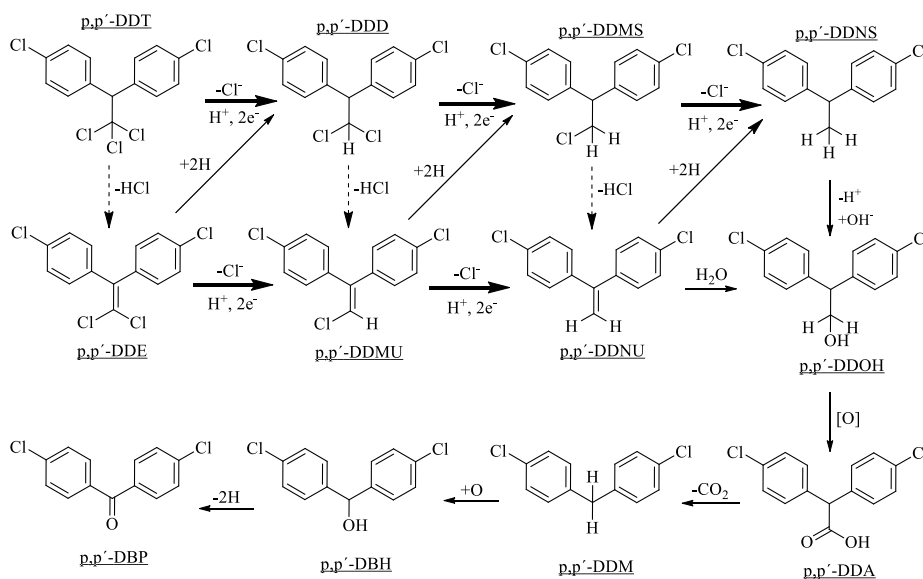


Figura 4. Representación gráfica de las vías de degradación microbiana propuestas para *p,p'*-DDT. Las flechas punteadas representan las reacciones de dehidrocloración y las flechas remarcadas en negro representan las reacciones por declorinación reductiva<sup>[17]</sup>.

La formación de DDE durante el rompimiento de DDT fue considerado como el punto final sin que ocurra degradación posterior. Aunque se han identificado varios microorganismos (*Methylosinus trichosporium*, *Mycobacterium vaccae*, *Acetobacterium woodii* y *Clostridium butyricum*) que poseen sistemas enzimáticos con potencial de degradar al DDE, al exponer cultivos a este compuesto, no se observó su transformación. Más recientemente, se han aislado microorganismos habitantes de sedimentos marinos, con demostrada capacidad de transformar DDE a DDMU<sup>[19]</sup> (figura 4).

Aunque la participación de microorganismos en la degradación de DDT ha sido confirmada y es de interés en los procesos de remediación de ambientes contaminados, es necesario mencionar que los procesos abióticos, como la fotólisis química también participan en la degradación del DDT, principalmente por vía de dehidroclorinación. Posteriormente, la reducción del doble enlace formado vía hidrogenación da paso al *p,p'*-DDNS que a su vez es degradado a *p,p'*-DDOH por reacciones enzimáticas y/o de deshidratación en el caso del *p,p'*-DDNU, y consecutivamente reacciones de oxidación sobre estas moléculas son efectuadas hasta la obtención de DBP, tal como se muestra en la figura 4.

En estudios de biodegradación por reacciones de oxidación, se han utilizado compuestos análogos al DDT, principalmente difenilmetano. Es importante que, en estudios recientes se han identificado microorganismos capaces de metabolizar DDT aerobicamente sin necesitar compuestos con estructuras análogas a este. La primera degradación aerobia de DDT fue reportada por Nadeau (1994) usando *Alcaligenes eutrophus* A5 en un medio mínimo salino complementado con 0.005% de extracto de levadura<sup>[20]</sup>. El estudio mostró que *A. eutrophus* A5 biotransforma ambos isómeros de DDT (*o,p'*-DDT y *p,p'*-DDT) en un producto color amarillo después de 30 días de incubación, observando como producto final de degradación al ácido 4-clorobenzoico (4-CBA).

Se propuso la ruta de degradación oxidativa involucrando enzimas dioxigenasas, mediante formación de intermediarios que se muestran en la figura 5.

En ambientes aerobios, la persistencia de DDD puede ser una preocupación en sitios contaminados y se han dedicado considerables esfuerzos para lograr su degradación; esto se llevó a cabo ya sea por hidroxilación o monoxigenación. La ruta propuesta por Hay y Focht<sup>[21]</sup> utilizando *Ralstonia eutropha* cepa A5, fue mediante dioxigenasas y por meta fisión, mediante la substitución en la posición orto y meta se generó un intermediario

dihydrodiol-DDD y eventualmente, produciendo monohidroxi-DDD tanto en posición *meta*- como en posición *para*-<sup>[21,22]</sup>. También se ha demostrado que el DDE es sujeto a las dioxigenasas y posteriormente sufre una apertura de anillo por *Pseudomonas acidovorans* M3GY, una bacteria capaz de degradar bifenilos clorados<sup>[23]</sup>.

Por otro lado, se ha reportado que la presencia de una fuente de carbono adicional como glicerol, peptona, extracto de levadura y caldo de tripton de soya, favorece la degradación de DDT. Bacterias Gram-positiva estrictamente aerobias, como la especie *Pseudomonas* han demostrado una eficiencia de degradación de 51.6% después de 8 días de incubación a 30 °C<sup>[24]</sup>. La degradación de DDT por hongos ha recibido menor atención respecto a las bacterias, la biorremediación asistida por estos microorganismos depende de su habilidad de colonizar los sitios contaminados y producir enzimas lignolíticas relacionadas con las velocidades de degradación. El DDT es metabolizado bajo condiciones aerobias por las enzimas P450 a DDD, dicofol, FW-152, DDA y DBH (tabla I y II). Una ruta diferente al uso de enzimas lignolíticas es por medio de la generación de radicales hidroxilo utilizando la reacción de Fenton extracelular<sup>[25]</sup>.

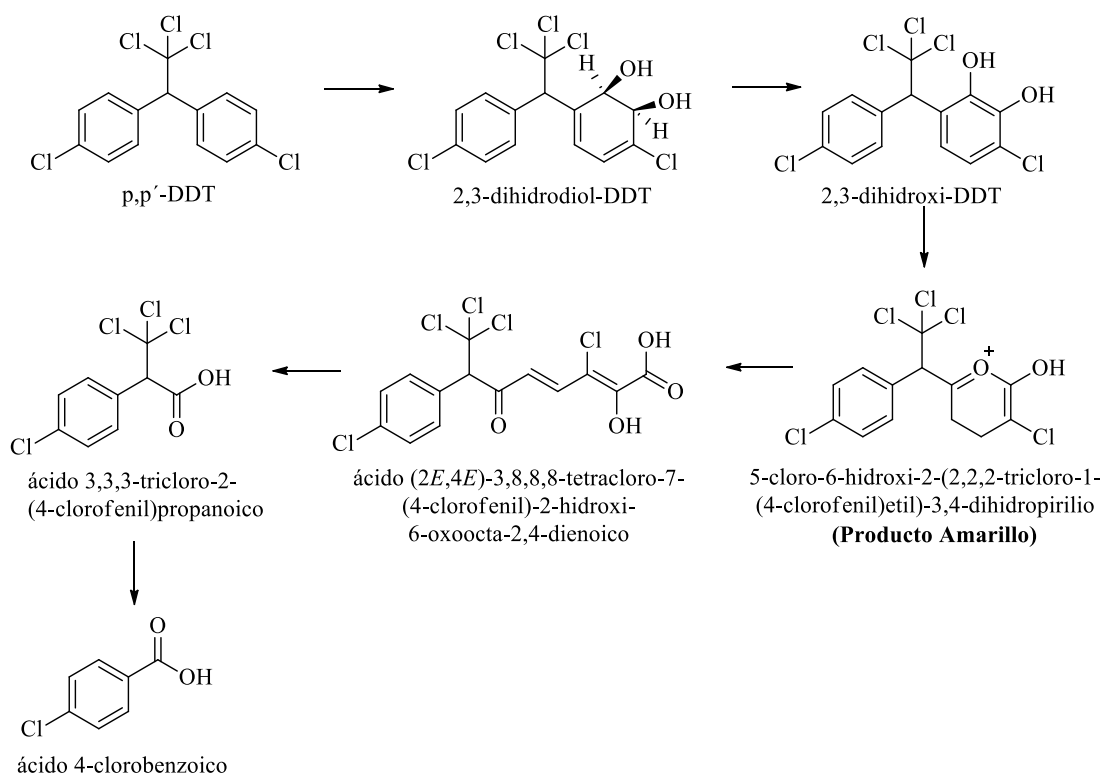


Figura 5. Ruta de degradación aerobia del p,p'-DDT. En este caso, DDD y DDE pueden seguir la misma ruta sintética aerobia debido a que la reacción se efectúa sobre los anillos aromáticos<sup>[22,23]</sup>.

De la discusión presentada queda claro que durante la biodegradación de DDT se forman compuestos intermediarios de diferente estabilidad, solubilidad/biodisponibilidad y que algunos de ellos ejercen efectos adversos en los organismos vivos. En este sentido, la declorinación causa incremento en la polaridad de los metabolitos respecto al DDT lo que los hace más solubles en agua (DDA 11-390 mg/L, rango de concentraciones encontradas en agua) y más biodisponibles.

La dosis y tiempo de exposición a estos metabolitos (DDMU, DDMS, DDNU, DDCN, entre otros) que presentan propiedades fisicoquímicas diferentes respecto a DDT, deciden sobre los efectos endocrinos y su citotoxicidad cruzada en los organismos<sup>[26]</sup>. De manera de ejemplo, se ha demostrado que los metabolitos de DDT provocan daños en el sistema reproductivo de organismos acuáticos en el siguiente orden de decreciente toxicidad: *o,p'*-DDT > *p,p'*-DDMS > *p,p'*-DDMU > *p,p'*-DDCN.

Las mismas propiedades de polaridad/solubilidad deciden sobre la distribución de metabolitos del DDT en diferentes compartimentos del medio ambiente. De esta manera, los compuestos apolares principalmente se quedan adsorbidos a las partículas de suelo y presentan baja movilidad, mientras que metabolitos polares por su solubilidad en agua pueden penetrar hasta llegar a aguas profundas.

En este sentido, se reportó más altas concentraciones de metabolitos del DDT de relativamente baja polaridad (DDMU, DDMS, DDNU) en aguas superficiales (50 – 100 ng/L) respecto a las aguas profundas (0.2 – 97 µg/L)<sup>[27]</sup>. En cambio, el metabolito DDA (tabla II) de mayor polaridad ha sido encontrado en aguas profundas en el intervalo de concentraciones 2 – 190 µg/L; otros compuestos polares como el DBP y DDCN (tabla II) fueron encontrados en concentraciones mayores a 40 µg/L<sup>[28]</sup>.

Debido a los aspectos que se acaban de presentar, existe demanda sobre la determinación no solo de congéneres del DDT en ambientes contaminados, pero también de sus productos de degradación más avanzada (metabolitos de microorganismos), lo que se refleja incluso en la existencia de diversas normas acerca de la contaminación de suelos<sup>[29,30,31]</sup>.

Así mismo es importante conocer mecanismos moleculares responsables de biodegradación del DDT con el fin de proponer estrategias de remediación efectivamente descontaminantes (evitando la acumulación de metabolitos potencialmente tóxicos). Desde el punto de vista de una metodología analítica, bajas concentraciones de pesticida y de sus metabolitos

imponen retos sobre todo en la etapa de tratamiento de muestra para lograr la extracción y preconcentración de manera efectiva y sin usar grandes cantidades de muestra.

### **I.3.1. Biorremediación como una estrategia de tratamiento de ambientes contaminados con DDT.**

Para tratar ambientes contaminados, se cuenta con diversas estrategias de remediación cuya selección en un caso específico dependerá de los parámetros fisicoquímicos del sitio a tratar y de las propiedades del(los) contaminante(s) ya que estos aspectos definen la factibilidad y el costo del tratamiento. Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, con base en los siguientes principios:

1. Lugar en el que se realiza el proceso de remediación: puede ser *in situ* es decir, se realizan en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación o *ex situ*, involucra excavar, dragado o cualquier proceso de remoción del suelo contaminado. En el caso de la biorremediación, las técnicas *in situ* son de mayor interés y buscan estimular y crear un ambiente favorable para el crecimiento microbiano a partir de los contaminantes. Este objetivo generalmente puede lograrse con el suministro de aire u oxígeno (bioventeo), nutrientes (bioestimulación), microorganismos (bioaumentación) y/o humedad, además del control de temperaturas<sup>[32]</sup>.
2. Estrategia de remediación: la remediación puede basarse en procesos de degradación-modificación de la estructura química convirtiendo el contaminante mediante una extracción selectiva (aprovechamiento de las propiedades fisicoquímicas o químicas), una sorción y/o inmovilización del contaminante en un soporte que puede ser removido del medio o que estabiliza el contaminante previniendo su movilidad y biodisponibilidad.
3. Proceso empleado para el tratamiento, donde se incluyen tratamientos biológicos o fisicoquímicos.

El término biorremediación se refiere a procesos de remediación medioambientales basados en el uso de organismos vivos como plantas, hongos, bacterias, etc., obteniéndose la degradación y/o remoción del(los) contaminante(s).

Para que un organismo (o consorcio) pueda ser aprovechado en biorremediación, es importante asegurar la eliminación efectiva del contaminante formando estructuras estables y de baja toxicidad en tiempo razonable y en condiciones económicamente fiables. Con base en lo descrito en la sección anterior, la estrategia de biorremediación basada en microorganismos autóctonos de los sitios contaminados parece especialmente adecuada en el caso del DDT.

Al emplear la técnica de biorremediación *in situ* es necesario estimular y crear un ambiente propicio para el crecimiento de los organismos seleccionados favoreciendo la metabolización del DDT. Este objetivo generalmente puede lograrse mediante condiciones adecuadas de temperatura, humedad, pH y con el suministro de algunos nutrientes<sup>[32,33,34]</sup>. Al tratarse de biodegradación, lo más deseable es obviamente la biomineralización, o sea la conversión del contaminante orgánico a dióxido de carbono y agua.

El presente proyecto se enfoca en el estudio de degradación del DDT mediante la actividad metabólica de microorganismos nativos de los sitios contaminados en Salamanca, Gto., buscando factibilidad de estos organismos para biorremediación.

### **I.3.2. Uso de microorganismos en la biorremediación de ambientes contaminados con DDT.**

En las secciones anterior se enfatizó que la degradación de los dos isómeros del DDT comienza por la etapa de declorinación y, que en caso del proceso reductivo (DR), dicha degradación es facilitada por la producción de enzimas de los microorganismos anaerobios<sup>[17]</sup>. También se mencionó que la biorremediación puede realizarse *in situ* o *ex situ*. En ambos casos, es necesario asegurar condiciones amigables de crecimiento favoreciendo el co-metabolismo del DDT en los microorganismos<sup>[33]</sup>. En la Tabla 2, se resumen brevemente los resultados de la búsqueda bibliográfica de los organismos y condiciones de crecimiento empleadas en la biodegradación del DDT.



Tabla 2. Microorganismos con demostrada capacidad de degradar DDT, condiciones de crecimiento y productos de degradación obtenidos (AE – vía aerobia, AN- anaerobia, F-facultativo).

Bacteria	AE/AN/F	Condiciones de crecimiento	Productos (eficacia de degradación en %)	Ref.
<i>Alcaligenes eutrophus A5</i>	AE	Medio mínimo con 0.005% de extracto de levadura. ( <sup>14</sup> C)DDT 1 mg/L por cada 5x10 <sup>7</sup> células en 1 mL de medio.	DDE DDD 4-CBA (100 %)	[20]
<i>Burkholderia xenovorans</i>	AE	Medio mínimo líquido con 35 mg/L de DDT. Incubadas 18 h a 29 °C, en agitación.	DDT-2,3-dihydrodiol (4 diferentes isómeros) (80%)	[35]
<i>Pandoraea pnomenusa</i>				
<i>Eubacterium limosum</i>	AN	Medio BHI. 100 N <sub>2</sub> a 37°C, 35.5 mg/L de DDT.	DDD	[36]
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AN	Medio líquido rico, pH 7, α-FeOOH, Fe (II), 13.3 µg/L de DDT a 30 °C.	DDD (mayoritario), DDE, DDMU, DDNU, DBP (56-73%).	[37]
<i>Serratia marcescens</i>	F	Medio mínimo líquido, medio líquido con extracto de levadura, peptona, glicerol y triptona de soya. 50 mg/L de DDT. Incubación de 26 – 30 °C y pH de 6 - 8.	No reportan productos de degradación.	[38]
<i>Sphingobacterium</i>	AN	Medio mínimo líquido, pH 7, 30°C. DDT 20 - 50 mg/L.	DDD, DDE, DDMU, DDNS, DDA, DBP (<20%).	[39]
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	AE	Medio mínimo líquido con 0.005% de extracto de levadura. 100 mg/L de DDE con 200 mg/L de 1,1-difeniletileno.	Metabolitos de la ruta aerobia (figura 3, ruta verde). 40%.	[23]
<i>Hydrogenomonas</i>	AE	Medio con difenilmetano (fuente de carbono).	p-clorofenil acetato, DDA, DBP, DDM. Co-metabolismo.	[22]
<i>Chryseobacterium</i>	AN	10 g de suelo contaminado en 100 mL de medio líquido (mínimo o enriquecido). DDT a 50 mg/L incubado 5 días a 30 °C, agitación.	DDD, DDE, DDMU, DDMS, DBP, 4-CBA, 4-CPA. (57 a 80 %)	[40]

<i>Stenotrophomonas</i>	AN	Medio mínimo líquido, 20 mg/L DDT, pH 7, 30 °C agitación (150 rpm). Incubado 7 días.	DDE, DDD, DDOH, DDMU y DDA. (100%)	[41]
<i>Bacillus</i>	AN	Medio líquido con extracto de levadura y manitol. 30 °C por 57 h.	DDE, DDA	[42]
<i>Terrabacter</i>	AE	Medio mínimo con bifenilos y 250 mg/L de DDE. Incubado a 28 °C, 200 rpm.	Metabolitos de la ruta aerobia (figura 3, ruta verde). (30 %)	[43]
<i>A. aerogenes</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Clostridium michiganense</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Nocardia sp.</i> , <i>Streptomyces annomoneus</i> , <i>Xanthomonas sp.</i>	AN	No se reportan condiciones de análisis.	DDD (90%) DDE.	[44,45]
		No se reportan condiciones de análisis.	DDE, DDD, DDMU, DDNU	
<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus</i>	AN	Reducción de Fe(II) por citocromo oxidasa.	DDD, DDMU, DDMS, DDNU, DDA, DPM, DBH, DBP	[46]
<b>Hongos</b>	<b>AE/AN</b>	<b>Condiciones de crecimiento</b>	<b>Productos (eficacia de degradación en %)</b>	<b>Ref.</b>
<i>Fusarium solani</i>	AE	Medio líquido, 20 días de incubación.	Sin productos de degradación.	[47]
<i>Fusarium oxysporum</i>				
<i>Fusarium moniliforme</i>				
<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus sydowi</i>	AE	No se reportan condiciones de análisis.	DDM	[48]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Phellinus weirii</i> <i>Polyporus versicolor</i>	AN	Medio líquido papa-dextrosa. 1.0 % de glucosa, deficiente de Nitrógeno. Incubados a 30 °C por 5 días.	DDD, dicofol, FW-152, DBP. (50 %)	[25,49]
<i>Gloeophyllum trabeum</i>			DDD, DDE, DBP (87 %)	

<i>Cladosporium</i>	AN	Medio líquido papa/dextrosa con 100 mg de DDT	DDD (21 %)	[50]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AN	Medio líquido con extracto de levadura	DDD	[51]
<i>Phlebia lindtneri</i> , <i>Phlebia brevispora</i>	AN	Medio líquido a pH 4.5, con 1 % de glucosa, 1.2 nM de tartrato de amonio y 20 nM de acetato de sodio. Incubado a 30 °C estático.	DDD, DDA, DBP, DBH (30 – 70 %)	[52]
<i>Phlebia strigosozonata</i> <i>Basidiomycetes</i>	AE	No se reportan condiciones de análisis.	Dicofol	[51]

Como se muestra en la tabla 2, se han explorado una considerable variedad de hongos y bacterias como posibles candidatos para la biorremediación de DDT; sin embargo, en ninguno de los casos se logró la mineralización del contaminante. Se han utilizado organismos aerobios y anaerobios, examinando dos rutas de decloración con generación de DDE y DDD, respectivamente. En la mayoría de los casos, se encontraron estos dos primeros productos de decloración (en varios casos fueron los únicos). En cuanto a los metabolitos con mayor grado de transformación, se reportaron varios compuestos; la lista completa se presenta en la tabla 3 junto con algunas de sus propiedades relevantes para el proceso de biorremediación. Los metabolitos “tempranos” de biodegradación del DDT son los más frecuentemente reportados y por lo general presentan baja solubilidad en agua (excepto 4-CBA) por lo que persisten en el medio ambiente principalmente en suelos y lodos. El desafío primordial en la biorremediación es lograr la degradación “avanzada” del DDT, formando compuestos de baja toxicidad. Para ello, dependiendo del organismo, se utilizaron medios de cultivo de diferente composición, pero siempre con una clara preferencia a estimular la co-metabolización del DDT. Los resultados de la revisión bibliográfica afirman que el uso de microorganismos para la degradación del DDT es un área de estudio actual y que aún no se ha llegado a las condiciones que permitirían la degradación del DDT hasta los metabolitos amigables al medio ambiente. Por otro lado, parece muy adecuado enfocarse en estudio de los organismos nativos de los sitios contaminados y conocer las rutas metabólicas participantes en biodegradación del DDT.

Los resultados obtenidos formarían las bases para la manipulación genética o más general, el uso de herramientas de biotecnología para lograr mayor eficacia de tratamiento con posibilidad de su aplicación *in situ* en sitios contaminados.

Tabla 3. Características fisicoquímicas y capacidad de biodegradabilidad predicha y calculada utilizando EPIWIN: Estimation Programme Interface EPI Suite™ de DDT y algunos de sus metabolitos anaerobios.<sup>[53]</sup>

<b>Molécula</b>	<b>Masa molecular (g/mol)</b>	<b>Punto de Ebullición (°C)</b>	<b>Potencial de biodegradación</b>	<b>Solubilidad en agua (25 °C mg/L)</b>	<b>Log K<sub>ow</sub></b>	<b>Vida media en ríos/lagos (días)</b>
DDT	354.49	367.95	Biodegradación lenta	0.007	6.91	5.6/67.7
DDD	320.05	366.75	Recalcitrante Biodegradación lenta	0.067	6.02	6.7/79
DDE	318.03	363.29	Recalcitrante Biodegradación lenta	0.026	6.51	1.12/18.5
DDOH	267.16	367.71	Biodegradación lenta	24.77	3.97	3115/3.4e <sup>4</sup>
DDMU	283.59	349.05	Biodegradación lenta	0.305	5.50	0.91/15.8
DDMS	285.60	355.33	Biodegradación lenta	0.205	5.69	0.41/10.3
DDA	281.14	395.09	Biodegradación lenta	5.852	4.48	2.1e <sup>4</sup> /2.3e <sup>5</sup>
DDM	237.13	317.44	Biodegradación lenta	0.821	5.30	0.61/12
DBP	251.11	342.22	Biodegradación lenta	3.796	4.44	36/400
4-CBA	156.57	276.56	Rápida Biodegradación	387.1	2.65	786/8587
Dicofol	370.49	397.63	Recalcitrante Biodegradación lenta	0.777	5.02	194/2124

#### **I.4 Espectrometría de masas como herramienta analítica utilizada en el presente proyecto.**

Los microorganismos que habitan ambientes contaminados son de interés primordial en procesos de biorremediación. Como se discutió en secciones anteriores, estos organismos, participan en la transformación del DDT formando una gama de compuestos con estructuras y propiedades diferentes. La biodegradación puede llevarse a cabo bajo condiciones aeróbicas y/o anaerobias, siendo la ruta reductiva más efectiva y de mayor interés. Se buscan organismos con capacidad de metabolizar DDT de manera eficiente, hasta compuestos sin actividad adversa en el medio ambiente. En este sentido, los organismos seleccionados como potencialmente útiles pueden ser manipulados mediante ingeniería genética para aumentar su capacidad de biorremediación.

En la tabla 2 se presenta la variedad de organismos estudiados en el contexto de biorremediación del DDT; estos abarcan desde hongos facultativos como *Phanerochaete chrysosporium* hasta bacterias aerobias como *Alcaligenes eutrophus* A5<sup>[20,54]</sup>. La selección de organismos y su efectividad depende fuertemente de las propiedades específicas del sitio contaminado y de la variedad/concentración de los contaminantes.

Los puntos clave para proponer un tratamiento de biorremediación basado en el uso de microorganismos nativos del sitio contaminado son (i) aislamiento de los organismos del sitio contaminado; (ii) su identificación; (iii) evaluación de su capacidad para metabolizar DDT; (iv) elucidación de los mecanismos de degradación del DDT a nivel molecular; (v) establecer las condiciones fisicoquímicas del medio que aseguren un buen crecimiento del(los) microorganismo(s) y faciliten la metabolización de DDT; (vi) empleo de herramientas biotecnológicas.

En cuanto al aislamiento e identificación de microorganismos, estas etapas tradicionalmente se llevan a cabo mediante técnicas microbiológicas establecidas. En particular, la identificación es una tarea tediosa, que involucra evaluación de características morfológicas, pruebas de actividad de ciertas enzimas, detección de ciertos metabolitos, enfoques genéticos (ADN-ADN o hibridación ARN-ADN, determinación de porcentaje de guaninas y citosina presentes en su ADN) o bien en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las técnicas moleculares para la identificación de microorganismos poseen un auge

muy importante debido a su especificidad (pueden detectar solo la molécula o microorganismo de interés), sensibilidad (son capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo) y pueden ser automatizadas.

Aunque algunas de estas pruebas son realizadas en minutos, llevar a cabo una identificación completa puede tardar horas en el mejor de los casos o tomar hasta días. Una alternativa a los métodos tradicionales es el uso de espectrometría de masas con desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI-MS) utilizando un software especializado llamado BIOTYPER. Esta estrategia se basa en la obtención de perfiles de proteínas ribosomales abundantes, las cuales constituyen la “huella digital” del organismo. Para la identificación se cuenta con una biblioteca de espectros de una serie de organismos caracterizados.

En cuanto a las siguientes etapas de un estudio de biorremediación, la identificación/confirmación de los productos de degradación (co-metabolismo) del DDT así como su cuantificación, requiere de los procedimientos analíticos confiables, muchos de ellos basados en el uso de espectrometría de masas.

#### **I.4.1. Caracterización/identificación de microorganismos por MALDI-TOF MS y Biotyper.**

El uso de espectrometría de masas para identificación de microorganismos comenzó desde el año 1975; sin embargo, el punto clave para el avance en esta área fue el aprovechamiento de perfiles de proteínas ribosomales intactas registrados mediante MALDI-TOF MS. Actualmente, esta herramienta, junto con un software especializado y librerías espectrales de una amplia variedad de microorganismos, son usadas en diferentes áreas de estudio y en aplicaciones rutinarias (por ejemplo, en el diagnóstico clínico) para una identificación de bacterias y hongos rápida, precisa y relativamente barata en cultivos puros<sup>[55]</sup>. La ventaja más importante consiste en el mínimo tratamiento de muestra; una pequeña porción de células se deposita directamente en la placa de MALDI agregando una matriz química adecuada; alternativamente (especialmente en el caso de los hongos), se realiza una extracción etanol-ácido fórmico previa al mezclado con matriz.

Una vez en la placa, la muestra se seca en la oscuridad y es colocada en el instrumento. Con ayuda del láser, se obtiene la desorción y ionización de las moléculas en fase gaseosa.

Estos iones son acelerados y transferidos a un analizador (típicamente de tiempo de vuelo, TOF), donde son separadas y posteriormente detectadas con base en su relación masa/carga ( $m/z$ ).

Existen varias ventajas de MALDI-TOF MS, entre las cuales hay que destacar que la ionización es muy suave, que los espectros de masas contienen principalmente iones de moléculas no fragmentadas y que pueden ser adquiridos muy rápido y en un amplio intervalo de  $m/z$  en condiciones de alta resolución y con pocas interferencias de matriz por parte de la muestra. En el caso de depositar células de microorganismos directamente en la placa, durante la ionización ocurre una lisis celular (en el caso de bacterias) liberando los componentes intracelulares, entre los cuales las proteínas más abundantes son de mayor interés. Los espectros de masas adquiridos contienen señales intensas de estas proteínas, formando una huella digital del microorganismo<sup>[56]</sup>. En el caso de los hongos; es necesaria una lisis celular previa, la que se logra mediante tratamiento con extracción etanol-ácido fórmico.

Los espectros adquiridos son procesados y comparados con los incluidos en las librerías, logrando la identificación de microorganismos a nivel de género o especie (basándose en criterios estadísticos). Una importante limitación, es la insuficiente cantidad de microorganismos cuyos espectros de referencia son disponibles actualmente en bases de datos. El sistema utilizado en este trabajo para la identificación de microorganismos es el espectrómetro de masas MALDI-TOFMS modelo Autoflex Speed (Bruker Daltonics) junto con el paquete de Software Biotyper<sup>TM</sup> Compass 4.1 y la base de datos versión 3.3.1.0 (con 9 045 organismos).

En cuanto a los criterios de interpretación, el Biotyper evalúa la concordancia entre espectro experimental y el espectro de bases de datos tomando en cuenta los valores de  $m/z$  e intensidades de las señales, calculando la probabilidad de que estos espectros pertenezcan al mismo organismo. El resultado se reporta en unidades arbitrarias en escala logarítmica con valores en intervalos de 0 – 3. Típicamente, los valores  $\geq 2.0$  permiten la identificación a nivel de especie biológica, los valores entre 1.7 y 2.0 se consideran suficientes para identificación a nivel de género biológico, mientras que los valores  $\leq 1.7$  no permiten una asignación confiable.

Otro criterio de consistencia en identificación se expresa en letras A, B, y C, donde A corresponde a confiabilidad a nivel de especie, B a nivel de género y C indica falta de confiabilidad<sup>[57,58]</sup>. Las etapas de análisis se presentan esquemáticamente en la figura 6.



Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Figura 6. Etapas de identificación de microorganismos por MALDI-TOFMS con Biotyper<sup>TM</sup> [59].

Hay que señalar la buena selectividad de esta herramienta que se debe principalmente al intervalo de  $m/z$  de 2 000 – 20 000, empleado para la adquisición de espectros. Las señales intensas de las proteínas más abundantes (ribosomales) que aparecen en este intervalo son fácilmente detectadas, independientemente de la composición del medio de crecimiento y sin interferencias de los metabolitos del organismo. Por otro lado, los espectros obtenidos para un organismo en diferente estado de crecimiento (fase de latencia, fase estacionaria o cercana a la muerte) son muy parecidos en cuanto a la distribución e intensidad de las señales, esto le confiere robustez al análisis<sup>[60]</sup>. Es necesario también mencionar la etapa



de “calibración”, en la que se utiliza un estándar bacteriano que contiene proteínas de un organismo conocido (BTS – *Escherichia coli*) y se realiza el ajuste de las condiciones de adquisición/procesamiento del espectro que asegure una buena calidad del espectro experimental y una identificación de microorganismos con alta confiabilidad. Debido a estas características que se acaban de describir, el espectrómetro de masas MALDI-TOFMS con paquete Biotyper han sido seleccionados en este trabajo para la identificación de microorganismos nativos aislados de sitios contaminados en Salamanca.

#### **I.4.2. Revisión de técnicas instrumentales y métodos de tratamiento de muestra utilizadas en el análisis de compuestos organoclorados, DDT y productos de degradación.**

Debido a la toxicidad de compuestos organoclorados, su persistencia en el medio ambiente y su capacidad de acumulación en organismos vivos, su determinación ha sido el foco de investigación durante los últimos 50 años. En el caso de pesticidas y sus típicos/conocidos productos de degradación, existen métodos estandarizados, aprobados por organismos o agencias gubernamentales tales como USEPA, NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) y OSHA<sup>[61]</sup>. Mencionando algunos métodos, EPA establece los siguientes: 508.1, 608, 608.1, 612, 8081 A y 8270 D, enfocados principalmente en la determinación de compuestos organoclorados en desechos medioambientales. Las muestras reales de interés incluyen desde alimentos como frutas, verduras, legumbres hasta suelos, sedimentos, materiales biológicos y clínicos con relativamente alto contenido de lípidos; también se analizan en aguas naturales y residuales<sup>[62]</sup>.

De manera general, el pretratamiento tiene como objetivo adecuar la composición de la muestra para su introducción a un sistema de análisis instrumental, donde se realiza la separación, detección y cuantificación confiable de los analitos. Típicamente, el pretratamiento se basa en la extracción selectiva de(los) analito(s) logrando su preconcentración y al mismo tiempo, eliminando la matriz química de la muestra<sup>[63]</sup>. Tradicionalmente, en el caso de muestras sólidas y líquidas contaminadas con pesticidas, se lleva a cabo la extracción en sistema Soxhlet con dietil éter, ACN, hexano o acetona-hexano (1:1), AcOEt, DCM o la convencional extracción líquido-líquido (LLE). La

destilación por arrastre de vapor ha sido usada para extraer pesticidas organoclorados de alimentos para animales, generalmente empleando DCM. Para las matrices lipídicas<sup>[64]</sup> como son los productos cárnicos, se utiliza n-hexano para la extracción. LLE es una técnica de separación/preconcentración clásica aplicada en metodologías analíticas estandarizadas y desarrolladas para el análisis de rutina de pesticidas frecuentemente usada sobre muestras líquidas como aguas naturales y de desecho, pero requiere grandes cantidades de solventes y es una técnica lenta y laboriosa<sup>[65]</sup>. Las desventajas comunes de emplear técnicas tradicionales de extracción incluyen el manejo de grandes volúmenes de solventes, relativamente largos tiempos de extracción, baja selectividad, incompatibilidad con sistemas automatizados de análisis, etc. En años recientes, ha ido incrementando la demanda por nuevas técnicas de extracción que permitan contrarrestar estas desventajas y realizar el procedimiento de acuerdo a los principios de la química verde<sup>[66,67]</sup>.

Una de las estrategias para aumentar la eficacia y acortar los tiempos de extracción, es someter la mezcla de extracción a energía de microondas (MAE), aplicar agitación por ultrasonido (USE), llevar el proceso a presiones elevadas (ASE – accelerated solvent extraction), utilizar fluidos supercríticos para la extracción (SFE), etc<sup>[68]</sup>. Por otro lado, ha ido creciendo el uso de extracción en fase sólida (SPE) con importantes avances en cuanto a tipos de sorbentes, tamaño y tipos de dispositivos que contienen fase sólida, estos diseños permiten llevar a cabo múltiples extracciones de manera simultánea y automatizada, etc. Cabe mencionar que SPE puede ser utilizado con el fin de extraer/preconcentrar compuestos de interés logrando eliminar los componentes de la muestra que podrían interferir en las etapas posteriores en el análisis (clean up)<sup>[69,70]</sup>. En cuanto a los formatos para llevar a cabo SPE, el sorbente puede ser empacado en cartuchos, en discos, en placas de 96 pocillos o en puntas de pipetas (Omix). Para una aplicación específica, la selección del dispositivo depende del volumen, composición de la muestra y de la concentración esperada de los analitos. Obviamente, el punto clave es la selección del tipo de sorbente. En este sentido, para la extracción de pesticidas organoclorados se ha reportado el uso de los sorbentes de fase inversa basados en sílica, carbón grafitizado y poliméricos<sup>[64]</sup>.

La principal complicación de usar SPE es la presencia de partículas. Estas partículas pueden impedir o bloquear el flujo durante la carga de muestra y durante la elución, ocupando los espacios entre el material soporte de la fase sólida o las fibras del disco. Por lo tanto, las

muestras líquidas deben ser libres de partículas y lo menos viscosas posible. El analista debe buscar modificar el pH, la fuerza iónica u optar por realizar un fraccionamiento preliminar de la muestra utilizando otras técnicas<sup>[71]</sup>. Estas observaciones son importantes no solo por el efecto sobre la velocidad de flujo, sino porque las variables mencionadas tienen impacto en la recuperación del (los) analito(s) en el procedimiento analítico.

Como una alternativa a SPE, en 1989 Pawliszyn<sup>[72]</sup> propuso una nueva técnica de microextracción en fase sólida (SPME) con el fin de remediar las limitaciones inherentes en SPE y LLE. En esta técnica, el analito se deposita sobre una fibra que se suspende en una solución o, se coloca en el “headspace”. SPME integra el muestreo, extracción, preconcentración e introducción de muestra en una sola etapa. Específicamente, una vez completada la sorción de solutos, la fibra es depositada directamente en el sistema de introducción de muestra del cromatógrafo de gases o de líquidos. El acoplamiento SPME-HPLC<sup>[73]</sup> requiere una interfase con una cámara de desorción térmica similar a un puerto de inyección de GC en la que ocurre la desorción de los analitos a la fase móvil (aplicación para compuestos térmicamente lábiles y poco volátiles). Entre las ventajas de SPME hay que mencionar la eliminación de solventes, rapidez, sin necesidad de re-equilibrar entre corridas, transferencia directa de los solutos retenidos al sistema de separación/detección y alta eficacia. Es importante que SPME produce extractos relativamente limpios y concentrados, ideales para aplicaciones en MS<sup>[74]</sup>. Los parámetros SPME a considerar son: el tamaño de la fibra, tipo y grosor del recubrimiento (desde unos pocos micrómetros hasta 100 µm) y el ambiente en el que se coloca<sup>[75]</sup>.

Debido a las diferentes propiedades de los compuestos formados durante la degradación del DDT, la etapa de tratamiento representa un reto si se pretende la determinación de todos los compuestos en una sola corrida analítica. Tal como ya se ha descrito en secciones anteriores, los isómeros del DDT, DDD, DDE son apolares, mientras que los metabolitos como 4-CBA, DDOH, DDA presentan cierta polaridad, por lo que la extracción de todos ellos bajo las mismas condiciones es problemática. En la tabla 4 se describen algunas metodologías de tratamiento de muestra y las técnicas de análisis.

Después de la limpieza de muestra, la extracción y/o preconcentración de analitos, su separación preferentemente se lleva a cabo utilizando una técnica cromatográfica con un

sistema de detección que puede ser elegido entre una amplia variedad de los disponibles comercialmente. El DDT y sus principales productos de degradación son semivolátiles y termoestables (temperatura de ebullición del DDT es 260 °C); por lo tanto, la mejor opción parece realizar su análisis por medio de cromatografía de gases acoplada a un detector másico (MS) o un detector de captura de electrones (ECD). En cromatografía de gases se presentan relativamente pocas interferencias de matriz, se obtiene muy buena repetibilidad y alta resolución de picos, permitiendo la separación de isómeros *p,p'*- y *o,p'*- DDT y de sus productos de degradación en tiempos relativamente cortos y sin requerimiento de derivatización pre-columna. Gracias a la presencia de átomos de cloro en las moléculas de compuestos derivados del DDT, el detector ECD es muy adecuado, desde tempranas aplicaciones ha permitido lograr bajos límites de detección instrumentales del orden inferior a una parte por billón. Sin embargo, hay que señalar que ECD es susceptible a interferencias y requiere el uso de estándares auténticos. Por su parte, detectores másicos son muy útiles en estudios donde existe la necesidad de confirmar/identificar los compuestos; entre sus ventajas hay que mencionar la alta selectividad, capacidad de análisis isotópico, flexibilidad en cuanto a la selección de condiciones de ionización y/o fragmentación de iones y varias opciones de detección/cuantificación.

En conjunto, hoy en día los detectores másicos permiten contrarrestar errores por co-elución de solutos en el proceso cromatográfico, eliminar las posibles interferencias de matriz y maximizar la relación señal/ruido asegurando de esta manera la determinación confiable de compuestos presentes en muy bajos niveles de concentración empleando cortos tiempos de separación cromatográfica. Aunado a esto, la capacidad del análisis isotópico en MS permite el uso de estrategia de dilución isotópica, logrando límites de detección instrumentales del orden de partes por trillón. En la tabla 5 se presentan algunos ejemplos de estudios recientes, basados en el análisis de DDT por GC-MS y de sus productos de degradación. En esta tabla se indica el tipo de muestra, sistema cromatográfico empleado y algunos parámetros de MS.

Tabla 4. Ejemplos de aplicaciones de SPE, SPME y LLE en sus diferentes versiones aplicadas en el análisis de compuestos organoclorados.

Analito	Tipo de muestra	Técnica de preconcentración	Técnicas de análisis instrumental	Observaciones
Clorofenoles, pesticidas, tetraciclinas, biomarcadores.	Orina y suero humano, aguas de río, superficiales y de grifo.	SPE-CE SPME-CE	mPC-CE-MS/MS	Filtración, Ajuste de pH, Hidrolisis ácida con HCl. LD: 0.08–0.46 µg/mL (muestras biológicas) LD: 2–6 µg/L (muestras de agua) <sup>[76]</sup> .
Pesticidas organoclorados, carbamatos y organofosforado	Vegetales: pepino, col, pimiento, repollo	SPE	GC-IT/MS	LD: 0.02–0.1 mg/kg. Cartuchos de 500 mg con diferentes sorbentes (florisil, GCB, dióxido de silicio, GCB con alúmina ácida) <sup>[77]</sup> .
Pesticidas organoclorados	Arena	SPME	HS-SPME-GC-ECD	Fibras de PDMS y PDMS-DVB. LD: 0.06 – 0.65 ng/g. Temperatura de extracción: 70 °C. Solvente de extracción: Agua. Desorción entre 260 – 280 °C <sup>[78]</sup> .
<i>p,p'</i> -DDD, Dieldrin, <i>p,p'</i> -DDT, <i>o,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDE, Aldrina	Suelos agrícolas	MA-CPE	HPLC-UV	Mezcla de surfactantes no iónicos (POLE/polioxietilen 10 cetil éter y POLE/polioxietilen 10 estearil éter). Rango lineal: 80-800 µg/kg LD: 86.4 – 806.4 µg/kg <sup>[79]</sup> .
<i>p,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDD, <i>p,p'</i> -DDE.	Suelos y germinado de trigo	ASE	GC-ECD	Extracción con agua destilada a 60°C, 1500 psi por 6 min de calentamiento, 1 min de extracción <sup>[80]</sup> .

Tabla 5. Revisión bibliográfica de procedimientos de determinación de DDT y sus productos de degradación por GC-MS.

Analitos	Muestra real	Parámetro de GC	Detección en MS	Cuantificación	Ref.
DDT, DDE, DDD (isómeros <i>p,p'</i> - y <i>o,p'</i> -)	Pescado	Columna BP-1 - SGE Australia (30m, 0.25mm, 0.25 µm), gas de arrastre: He, 2.25 ml/min, gradiente 70-320°C, 30 min. Inyección splitless	Ionización EI, analizador cuadrupolo, <sup>13</sup> C- <i>p,p'</i> -DDT as IS	SIM LC 0.5 – 10 ng/g	[81]
<i>p,p'</i> -DDE, <i>p,p'</i> -DDD, <i>p,p'</i> -DDT (entre otros POCs)	Azúcar refinada	Columna DB-5 MS – Varian (30m, 0.25mm, 0.25 µm), gas de arrastre: He, 1 ml/min, gradiente 80-250°C, 37.14 min, inyección 1 µl splitless	EI (70eV), trampa iónica, MS/MS	En definidos sectores del cromatograma: m/z 318 para DDT, 235 → 165 para DDE y DDD. Método DL 0.1 ng/g	[82]
<i>p,p'</i> -DDT, <i>o,p'</i> -DDT, DDE, entre otros POC's	Grasa animal	Columna HP-5MS – Agilent (30m, 0.25mm, 0.25 µm), gas de arrastre: He, 1.2 ml/min, gradiente 42-290°C, 45 min, 10 inyecciones de 4 µl, en modo PTV (programmable temperature vaporizing)	EI (70ev), analizador por cuadrupolo.	4,4'-DDT-D8 como IS, SIM.	[83]
<i>p,p'</i> -DDE, <i>p,p'</i> -DDD, <i>p,p'</i> -DDT entre otros POCs	Estándares	Columna HP-5MS – Agilent (30m, 0.25mm, 0.25 µm), gas de arrastre: He, 1.2 ml/min, gradiente 50-330°C, 22 min, 2 µl inyección splitless	Analizador de triple cuadrupolo Ar en zona CID	MRM: m/z 246 → 176 para DDE; 235 → 165 para DDD y DDT	[84]
DDT, DDE, DDE, DDMU, DDOH, DDA, DBP	Agua de río	Columna DB-5MS – J&W (30m, 0.25mm, 0.25 µm), gas de arrastre: He, 28 cm/s, gradiente 100-230°C, 40 min, 2 µl inyección splitless	Isómeros polares DDA derivatizados con bromuro de pentafluorobencilo (PFBBBr)	SIM, MS/MS	[85]
DDT, DDD, DDE, DDOH, DDMU, DDA	Cultivo microbiológico.	Columna 1701MS – Agilent (30m 0.25mm, 0.25 µm) Orden de elución: DDE, DDOH, DDMU, DDD, DDA, DDT (varios compuestos no identificados)	Analizador de cuadrupolo	TIC, identificación con base en estándares m/z: 318, 266, 284, 320, 282	[41]

Continuación de tabla 5.

Analitos	Muestra real	Parámetro de GC	Detección en MS	Cuantificación	Ref.
216 pesticidas y sus metabolitos ( <i>p,p'</i> -DDT fue el más frecuente)	Suelos (QuEChERS)	Columna HP-5MS – Agilent (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm). Gas de arrastre: He 2.1 mL/min Gradiente: 70 °C (2min duración) a 150 °C (25 °C/min) a 200 °C (3 °C/min) a 280 °C (8 °C/min, 10 min)	GC-MS/MS, EI (70 eV), analizador por triple cuadrupolo con nitrógeno en CID a 1.5 mL/min. GC-µECD/NPD	MRM LC 0.005 mg/kg	[86]
DDT DDD DDE	Agua marina	Columna: DB-5 Agilent J&W, (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm). TDU-inicial:30 a 275 °C (60°C/min, 10 min). GC: 60 °C (5 min) a 100 °C (15 °C/min), 285 °C (3 °C/min, 10 min). SPME	TD-GC/MS(Agilent 6890 Plus GC, Gerstel® cooled injection system.	Full Scan (50-500 amu), EI (70 eV) LD: 1.39-1.66, 0.42-0.26, 0.14-0.16 (µg/mL)	[87]
DDT DDD DDE	Agua y suelo	Columna: HP-5MS capilar (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm). He 1 mL/min. Horno 100 °C por 1 min a 280 °C (15 °C/min) 280 °C por 3 min. Inyector y detector a 270 y 290 °C, respectivamente. Extracción: MAE y SCF.	GC-MS	SIM, EI (70 eV) DDE (176, 246,318), DDD (165, 199, 235), DDT (165, 199, 235). LD <sub>agua</sub> : 0.04 µg/L. LD <sub>suelo</sub> : 5 µg/kg.	[88]
DDT y sus metabolitos	Cultivo microbiológico	Columna: HP-5 Agilent (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm), gas de arrastre: He 1 mL/min. GC: 80 a 200 °C (15 °C/min, 10 min), inyector:250 °C.	GC-MS (Agilent equipado con inert XL MSD)	FS	[39]
Pesticidas ( <i>p,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDE)	Tés chinos	Columna: DB-5 Agilent (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm), gas de arrastre: He 1 mL/min. Inyector: 250 °C. GC: 50 °C (2 min) a 100 °C (25 °C/min), 260 °C (5 °C/min, 25 min)	GC-MS (Agilent equipado con inert XL MSD) IS ( <sup>13</sup> C <sub>12</sub> - <i>p,p'</i> -DDE)	SIM EI (70 eV) DDE (246, 318, 248) DDT (235, 246, 165) IS (258, 330, 320)	[89]
<i>o,p'</i> -DDE <i>p,p'</i> -DDE	Agua	Columna: HP-5 Agilent (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm), gas de arrastre: He 1 mL/min. Inyector: 250 °C. GC: 50 °C (3 min) a 160 °C (15 °C/min), 280 °C (3 °C/min, 9 min)	GC-MS	SIM (0.1 - 4.5) ng/L (SPME) (0.05 - 1.0) ng/L (SBSE)	[90]

Como se observa en esta tabla, en muchos trabajos se llevó a cabo la determinación de residuos de pesticidas organoclorados en muestras medioambientales y en comida con el fin de evaluar el grado de contaminación y observar el cumplimiento de normas.

Este tipo de análisis ha sido centrado sobre los isómeros de DDT y sus dos principales productos de degradación (DDE y DDD), a menudo incluyendo otros contaminantes persistentes tales como compuestos organoclorados, PCB's, ftalatos, etc. Los sistemas de separación cromatográfica han sido similares, prácticamente en todos los estudios se utilizaron columnas capilares de bajo sangrado, con dimensiones de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de grosor de película. Los gradientes de temperatura se reportan en un intervalo de 40 – 350 °C con tiempos de separación de unos 15 hasta 60 minutos (dependiendo de la variedad y cantidad de compuestos). La ionización típicamente se lleva a cabo mediante impacto de electrones (EI) empleando energía de 70 eV.

En cuanto a detectores másicos, se han utilizado simple cuadrupolo, trampa iónica o sistemas de triple cuadrupolo. El uso de detectores de un simple cuadrupolo permite adquirir espectros en modo TIC y SIM, mientras que otros detectores cuentan con ventajas de espectrometría en tándem (MS-MS) y ofrecen una identificación-confirmación y cuantificación de especies más confiable en el modo MRM y SRM. Sin embargo, cabe mencionar que la mayoría de los procedimientos de determinación de isómeros de DDT, DDD y DDE, han sido basados en modo SIM.

Por otra parte, en varios estudios se han incluido un mayor número de metabolitos del DDT, especialmente en aquellos enfocados en la elucidación de las rutas de degradación biótica y abiótica. Ya se ha mencionado antes que, conforme avanza la degradación, los metabolitos del DDT presentan una mayor polaridad, lo que obliga a afinar las condiciones tanto de tratamiento de muestra como las condiciones de análisis. En este sentido, Heberer y col.,<sup>[85]</sup> utilizaron bromuro de pentafluorobencilo como agente derivatizante para DDA, pudiendo separar isómeros de este metabolito junto con los típicos compuestos apolares. Smart y col.<sup>[91]</sup> utilizaron metilclorofornato para la derivatización de grupos amino, ácidos orgánicos, ácidos orgánicos fosforilados e intermediarios de ácidos grasos en metabolitos intra y extracelular de diversos microorganismos usando GC-MS.

Si bien, una alternativa muy utilizada en el análisis metabolómico por GC-MS es la silylación usando BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) o MSTFA (N-metil-N-



(trimetilsilil)trifluoroacetamida) y dependiendo de la estructura molecular del metabolito se puede emplear hidrocloreto de metoxamina para eliminar las reacciones de conversión durante la sililación<sup>[92]</sup>.

En relación con la revisión bibliográfica, como herramienta en el análisis de DDT y de sus metabolitos, en este trabajo de tesis se elige el cromatógrafo de gases con detector ECD (modelo Clarus 500, Perkin Elmer) y un cromatógrafo de gases con detector másico de triple cuadrupolo (GC-TQMS modelo SCION 456-GC TQ de Bruker Daltonics) sustentando la confirmación/identificación de compuestos en bases de datos disponibles: NIST/EPA/NIH versión 2.0, 2011 y Wiley, 2011.

El GC-TQMS permite adquirir los datos en las siguientes modalidades: barrido completo (FULL SCAN) en el que se obtiene un cromatograma total de iones (TIC), monitoreo selectivo de iones (SIM), monitoreo de productos de fragmentación de iones precursores (PRODUCT), monitoreo de iones precursores (PRECURSOR) y monitoreo de reacciones múltiples (MRM).

En el modo de barrido completo (FULL SCAN) se lleva a cabo una adquisición continua y virtualmente simultánea de todos los valores  $m/z$  en el intervalo establecido inicialmente; el cromatograma TIC obtenido permite detectar la presencia de compuestos esperados/conocidos y también permite asignar los picos cromatográficos que corresponden a la elución de cada uno de ellos. En este caso, solamente un cuadrupolo es utilizado como filtro de masa, mientras que los otros sirven para transmisión/enfocamiento de iones. Este tipo de adquisición carece de selectividad y presenta bajos valores S/N. Para solventar dichas limitaciones, se puede utilizar el modo SIM donde solamente se adquieren señales de iones de los compuestos de interés. Técnicamente, en el primer cuadrupolo de TQMS se selecciona un solo ion para cada uno de los compuestos (el más abundante) y este ion es posteriormente filtrado en dos cuadrupolos subsecuentes. A menudo se adquieren en este modo fragmentos de cromatograma correspondientes a los tiempos de elución de cada uno de estos compuestos (ventana de tiempo). Aunque para cada uno de los compuestos se utiliza solamente un ion, el modo SIM ayuda mejorar la selectividad respecto TIC y permite eliminar ruido obteniéndose un aumento de los valores S/N. Es de resaltar sin embargo que la técnica más potente para la cuantificación de trazas de analitos es el monitoreo de reacciones múltiples.

En esta modalidad, para cada uno de los compuestos se selecciona un par de iones, uno de los cuales es el precursor y el segundo es producto de su fragmentación (producto). En este caso, el primer cuadrupolo sirve para seleccionar el(los) ion(es) precursor(es) formados por la ionización EI, mientras que el segundo cuadrupolo funciona como zona CID (cámara de fragmentación de iones inducida por colisiones) y en el tercer cuadrupolo se pueden filtrar y monitorear selectivamente los iones productos.

En otras palabras, en el modo MRM se lleva a cabo la ionización de compuestos (EI) y posteriormente la fragmentación de iones (CID - segundo cuadrupolo), mientras que los cuadrupolos 1 y 3 filtran iones de diferentes  $m/z$ , lo que conduce al aumento de selectividad hacia el compuesto de interés y, que es muy importante, permite disminuir de manera substancial el ruido. En la zona CID, la fragmentación del precursor ocurre mediante su disociación por colisiones con el gas helio o argón. En el proceso de colisión, la energía cinética del ion precursor se convierte en su energía interna lo que provoca división y reorganización de enlaces y también pérdida de especies neutras. En el tercer cuadrupolo, a menudo se adquieren señales de dos iones provenientes de un solo compuesto, uno de ellos es cuantificador y otro(s) denominado(s) calificador(es) se usan para confirmar la identidad del compuesto. El uso de MRM en el detector de triple cuadrupolo se presenta esquemáticamente en la figura 7. Obviamente, MRM puede llevarse a cabo para varios compuestos al mismo tiempo, lo que es muy útil cuando la separación cromatográfica no es efectiva y ocurren co-eluciones.

Un punto clave en MRM es la selección del ion precursor y ion producto para todos los compuestos de interés. Esta selección se realiza utilizando la modalidad PRODUCT, en la que todos los iones obtenidos en la ionización (EI) del compuesto se dejan pasar a la zona CID registrando espectros de masa que incluyen todos los iones generados. A partir de estos espectros se elige el ion cuantificador que tenga la intensidad más alta posible. En esta etapa se examinan diferentes energías aplicadas en zona CID (5-100 eV) buscando aumentar la sensibilidad al máximo. Hay que resaltar que la excepcional selectividad del método MRM es debida al uso de la transición ion precursor – ion producto (cuantificador) que es única para un compuesto dado. Dicha transición permite también disminuir de manera drástica el ruido aumentando la relación S/N, como ya se mencionó antes en este texto. En la cuantificación MRM, la curva de calibración se construye tomando la

intensidad del ion cuantificador para cada uno de los compuestos de interés que se eluyen de la columna. En resumen, el uso de GC-MS(TQ) con ionización por impacto de electrones y detector másico de triple cuadrupolo proporciona una confirmación/identificación de compuestos mucho más confiable respecto un GC-MS con un simple cuadrupolo. Asimismo, el uso de MRM no solamente aumenta la selectividad, pero sobre todo aumenta el poder de detección haciendo posible la cuantificación de solutos a nivel de ultra traza<sup>[93]</sup>.



Figura 7. Esquema general de un espectrómetro de masas en tándem espacial. (MS<sup>1</sup> primer cuadrupolo separador de masas, CID, MS<sup>3</sup> segundo cuadrupolo separador de masas)<sup>[94]</sup>.

En resumen, las características del sistema GC-MS que se acaban de describir permitirán el desarrollo de procedimientos para la determinación de DDT y sus principales conocidos metabolitos en desechos y suelos de Salamanca y también en cultivos microbiológicos, mediante SIM y/o MRM. Por otro lado, el mismo sistema permitirá detectar y confirmar/identificar otros metabolitos y proponer procedimientos para su determinación.

### **1.5 Desarrollo de procedimiento analítico utilizando GC-MS, AMDIS e índice de retención de Kováts para la identificación de metabolitos de DDT en medios de cultivo<sup>[95,96]</sup>.**

La cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica de separación la cual, con el uso de estándares auténticos y un detector adecuado, permite la asignación y cuantificación de compuestos. Como ya se mencionó antes, el uso de espectrometría de masas y de masas en tándem (GC-MS, GC-MS/MS), permite además la confirmación y/o identificación de compuestos nuevos o inesperados en la muestra. La separación ocurre debido a las diferencias entre constantes de equilibrio gas/líquido que a su vez depende de la polaridad y volatilidad de los analitos. El tiempo de retención puede ser usado como un parámetro de

la asignación de compuestos, debido a que, bajo condiciones cromatográficas constantes, el tiempo de retención es característico para cada compuesto individual. Por lo tanto, si se utilizan estándares auténticos para anotar los compuestos, estos deben ser separados bajo condiciones cromatográficas idénticas a las de la muestra; cualquier variación en la temperatura, aumento o disminución en la presión del gas de acarreo por algunos segundos durante la adquisición de datos puede causar errores en la anotación de compuestos en la muestra. Es también importante señalar que, compuestos de estructura, polaridad y volatilidad similares, son difíciles de separar cromatográficamente, pero pueden ser distinguidos y cuantificados al utilizar la detección por espectrometría de masas. Para facilitar la identificación/asignación de compuestos separados por GC se utiliza el parámetro denominado índice de retención, o índice de Kovats (RI). Este parámetro corresponde a un valor normalizado de tiempo de retención, basándose en los tiempos de retención de alcanos con conocido, creciente número de átomos de carbono (escalera C20-C40).

A pesar del proceso de normalización, cabe mencionar que los valores de RI experimentales dependen del tipo de fase estacionaria y diferentes fases estacionarias dan lugar a un RI diferente del mismo compuesto, pero otros parámetros del sistema, tales como dimensiones de la columna, la presión del gas portados, la velocidad de flujo y el programa de temperatura durante la separación, no tienen efecto fuerte.

Respecto a la reproducibilidad de los índices de retención, para las columnas comerciales de polisiloxanos como DB-1 (100% polidimetilsiloxano) se permiten variaciones de aproximadamente  $\pm 5$  de valores RI comparando los valores en bibliotecas de referencia. Para columnas más polares como DB-5 (95% polidimetilsiloxanos-5% polidifenilsiloxane) usualmente se permite una tolerancia mayor:  $\pm 10$  del valor RI para compuestos apolares y  $\pm 20$  RI para compuestos polares.

El uso de índices de retención en GC-MS aumenta significativamente la confiabilidad de la identificación de compuestos por GC-MS. Para una correcta identificación de los compuestos de interés, se necesita elaborar un método para el procesamiento de datos en GC-MS basado en el uso de RI y en espectros de masas adquiridos; para ello a menudo se utiliza el programa AMDIS (por sus siglas en inglés: Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System). En este programa, el procesamiento de datos es

automático e incluye remoción de interferencias de picos sobrepuestos y su purificación para la obtención de su espectro de masas, permitiendo encontrar automáticamente cualquier compuesto en un conjunto de datos provenientes de un GC-MS. El programa desconvoluciona los datos para encontrar iones pertenecientes a un solo compuesto (con base en coincidencia de tiempos de retención y simetría de picos). Los espectros desconvolucionados (de compuestos individuales) son comparados con los guardados en la librería para compuestos conocidos. Adicionalmente, se compara el RI experimental con aquel incluido en la librería para la misma fase estacionaria. AMDIS aplica criterios estadísticos en la comparación, reportando valores de coincidencia como “score”.<sup>[97]</sup>.

Para una identificación más eficiente, AMDIS puede ser configurado para crear un archivo de calibración de índices de retención para usarse en conjunto con su espectro de masas, o trabajar sin referencia alguna de RI. Además, AMDIS puede ser usado para construir una biblioteca definida por el usuario, ya sea desde los archivos del GC-MS, o desde los archivos en la base de datos de la biblioteca espectros de masas de NIST<sup>[98,99]</sup>.

En este trabajo, se utilizó AMDIS como estrategia para identificar o confirmar los productos de biodegradación del DDT asistida por microorganismos aislados de los sitios contaminados. El esquema de trabajo se basó en tres pasos principales: el primero consta del desarrollo de un método cromatográfico que permita una adecuada resolución de compuestos, utilizando para ello estándares auténticos de compuestos esperados. El segundo paso es la identificación preliminar de metabolitos a partir de cromatogramas registrados en modo full scan y basándose en bases de datos que contengan valores de RI y espectros de masas de un amplio rango de compuestos. En esta etapa es necesaria la calibración para la asignación de RI experimentales, realizando el análisis de los alcanos (escalera de alcanos). La tercera y final etapa consta en realizar el análisis GC-MS en modo SIM, estableciendo adecuadas condiciones (valores  $m/z$  de iones cuantificadores y calificadores así como ventanas de tiempo para cada soluto de interés). La ventaja de este método es que se alcanzan tanto alta sensibilidad y se reduce el ruido permitiendo la evaluación comparativa de las abundancias de diferentes iones entre diferentes muestras.

## Capítulo II. OBJETIVOS.

### II.1. Objetivo general.

Contribuir en el conocimiento sobre la capacidad de bacterias nativas de sitios contaminados con DDT para la biodegradación de este pesticida organoclorado, empleando diferentes herramientas de análisis instrumental con el enfoque en espectrometría de masas. Aislar los microorganismos habitantes del sitio contaminado con DDT en Salamanca, realizar su identificación mediante el sistema MALDI-TOF MS, examinar y desarrollar nuevos procedimientos para el análisis de contaminantes de relevancia regional en muestras medioambientales y en cultivos de microorganismos aislados de los sitios contaminados, utilizando diversas técnicas de separación cromatográficas y espectrometría de masas en acoplamiento.

### II.2. Objetivos particulares.

- Evaluar la contaminación de terrenos dentro de Fertimex, mediante la determinación de compuestos organoclorados por GC-ECD.
- Aislar e identificar microorganismos de sitios contaminados utilizando como herramienta analítica MALDI-TOF MS Biotyper.
- Desarrollar nuevas bibliotecas en MALDI Biotyper de microorganismos procedentes de sitios contaminados, pero no incluidos en bibliotecas espectrales disponibles.
- Examinar de forma individual el crecimiento de las bacterias en presencia del DDT.
- Adaptar el procedimiento por GC-ECD para evaluar porcentaje de degradación de DDT en medios de cultivo de bacterias resistentes a DDT.
- Desarrollar un procedimiento basado en el uso de sistemas GC-MS, para el análisis de productos de la biodegradación de DDT en cultivos de bacterias.

### Capítulo III. PARTE EXPERIMENTAL.

#### III.1. Disolventes.

- ❖ Ciclohexano, grado ACS, Karal.
- ❖ Acetonitrilo, grado HPLC, Karal.
- ❖ Acetona, grado ACS.
- ❖ Acetato de etilo, grado ACS, Karal.
- ❖ Diclorometano, grado HPLC, Karal.
- ❖ Dimetilformamida, grado ACS, Karal.
- ❖ Etanol absoluto, Karal.

#### III.2. Estándares

- ❖ Se utilizó el producto *Appendix IX Organochlorine Pesticides Mix* (certified reference material) que contiene:  $\alpha$ -BHC,  $\delta$ -BHC, lindano ( $\gamma$ -BHC), dieldrín, endosulfán I, endosulfán II, sulfato de endosulfán, endrina, endrina aldehído, heptacloro, epóxido de heptacloro isómero B, metoxicloro, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE y aldrina. La concentración de cada uno de ellos es de 2 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en hexano:tolueno (1:1) en ampula de 1 mL, número de referencia: 46960-U, cad: abril, 2018.
- ❖ Se utilizaron estándares sólidos por separado de endosulfán I, *p,p'*-DDD, endrina, lindano, metoxicloro, dieldrín, BHC (mezcla de isómeros), aldrín, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDE, heptacloro y clordano. Grado cualitativo, PolyScience Corp. Niles, IL.
- ❖ Ácido 4-Clorobenzóico (lote: MKBX0771V), 4,4'-Diclorobenzofenona (lote: MKBN8261V), ácido 4-Clorofenilacético (lote: MKBX0771V). Marca Aldrich.
- ❖ 4,4'-DDOH (lote: SZBF005XV), 4,4'-DDA (lote: SZBD69XV), 4,4'-DDM (lote: SZBD302XV), 4,4'-DDMU (lote: SZBC313XV), 4,4'-DDE (lote: BCBS5816V), 4,4'-DDT (lote: BCBS5338V). Marca Sigma-Aldrich.

- ❖ Matriz HCCA (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico). Tubo con 2.5 mg, lote: 0000233295, ref: 8255344, cad: 09, 2017 Bruker Daltonics.
- ❖ Estándar de calibración BTS (extracto proteico de *Escherichia coli*  $\alpha$  DH5 y proteínas adicionales) para cubrir un rango de masas de 3.6 a 17 kDa. (lote: 0000260476, ref: 8255343, cad: 10, 2017 Bruker Daltonics).
- ❖ Estándar de alcanos: Alkane standard mixture for the assay of the system efficiency of GC's (C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub>), marca: Fluka, lote: 1154412, concentración: 50 mg/L en heptano.

### III.3. Reactivos

- ❖ Fosfato de sodio dibásico anhidro, Sigma.
- ❖ Fosfato de potasio monobásico, J. T. Baker.
- ❖ Cloruro de amonio, Sigma.
- ❖ Sulfato de sodio anhidro, Sigma Aldrich.
- ❖ Sulfato de magnesio, Karal.
- ❖ Cloruro de calcio, J. T. Baker.
- ❖ Sulfato de cobre pentahidratado, Sigma.
- ❖ Sulfato de zinc heptahidratado, Karal.
- ❖ Sulfato ferroso heptahidratado, Karal.
- ❖ Agua destilada.
- ❖ Dextrosa, Karal.
- ❖ Agar dextrosa papa, BDBIOXON.
- ❖ Agar bacteriológico, BDBIOXON.
- ❖ Peptona Biotriptasa, BDBIOXON.
- ❖ Extracto de levadura, BDBIOXON.
- ❖ Cloruro de sodio, Karal.
- ❖ Ácido fórmico al 96%, Karal.
- ❖ Ácido trifluoroacético, SIGMA-ALDRICH.
- ❖ Agar dextrosa papa, BDBIOXON.
- ❖ Agar bacteriológico, BDBIOXON.
- ❖ Peptona Biotriptasa, BDBIOXON.
- ❖ Extracto de levadura, BDBIOXON.



- ❖ Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio, MTT, marca: SIGMA ALDRICH.

#### III.4. Instrumentación Analítica.

1. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo 1200 de Agilent Technologies equipado con automuestreador, detector espectrofotométrico de arreglo de diodos y fluorométrico.
2. Cromatógrafo de líquidos modelo UltiMate 3000 de Dionex Thermo Scientific equipado con bomba binaria, desgasificador, compartimento con termostato para columna y automuestreador.
3. Espectrómetro de masas con trampa iónica modelo AmaZon SL de Bruker Daltonics equipada con una fuente de ionización por electronebulización ESI-ITMS (Bruker Daltonics).
4. Espectrómetro de masas de alta resolución MaXis Impact: ionización ESI y cuadrupolo-tiempo de vuelo ESI-QTOF-MS (Bruker Daltonics).
5. Espectrómetro de Masas MALDI-TOFMS modelo Autoflex Speed, equipado con láser smartbeam<sup>TM</sup>-II Nd:Y AG (Bruker Daltonics).
6. Cromatógrafo de gases equipado con detector por captura de electrones (GC-ECD). Modelo Clarus 500 de Perkin Elmer.
7. Cromatógrafo de gases con detección de masas de triple cuadrupolo. Modelo Bruker Scion TM, GC-MS(TQ).
8. Espectrofotómetro UV-Vis, MULTISKAN GO, Thermo Scientific.
9. Purificador de agua Milli Q Labconco Water PRO PS.
10. Centrífuga Legend Micro17, Thermo Scientific.
11. Speed Vac Vacufuge plus, Eppendorf.
12. Potenciómetro 3200P, Agilent technologies.
13. Balanza analítica modelo CX220, Citizen.
14. Sonificador Kendal.
15. Incubadora modelo 211, Labnet.
16. Campana de flujo laminar vertical, Ecoshell.
17. Homogeneizador modelo D1030, Bead Bug.
18. Autoclave modelo 50x, All American.

19. Placa MALDI modelo MTP 384 polished steel TF target.

NOTA: *Las condiciones cromatográficas se muestran en Resultados y Discusión.*

### III.5. Software.

- ❖ Microsoft Office 2010
- ❖ TotalChrom Navigator, versión 6.2.1 para controlar el cromatógrafo de gases modelo Clarus 500 de Perkin-Elmer.
- ❖ Programa Grams 8.0 para conversión de formato de datos de GC-ECD.
- ❖ ChemStation, Agilent Technologies.
- ❖ Hystar V3.2.
- ❖ MS WorkStation, Method Builder versión 8.2, Bruker Daltonics para SCION MS 45X-GC.
- ❖ MS WorkStation, MS Data Review versión 8.2, Bruker Daltonics para SCION MS 45X-GC.
- ❖ Data Analysis 4.1, Bruker Daltonics.
- ❖ Chromeleon™ de Dionex.
- ❖ ChemDraw Ultra 12.0, para modelar moléculas químicas.
- ❖ AMDIS versión 2.73.
- ❖ Flex Analysis 3.4, Bruker Daltonics.
- ❖ FlexControl 3.0, Bruker Daltonics.
- ❖ Biotyper Compass 4.1, Bruker Daltonics.
- ❖ Base de datos Biotyper™ Reference database (versión 3.3.1.0), Bruker Daltonics.

## **Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **IV.1 Determinación de pesticidas organoclorados por GC-TQMS y GC-ECD en muestras sólidas recolectadas de terrenos industriales, en la ciudad de Salamanca.**

#### **IV.1.1 Introducción**

La ex unidad industrial Fertimex se encuentra localizada al este de la ciudad de Salamanca, Gto., en el kilómetro 314.5 de la carretera federal No. 45, Colonia San Juan de la presa, c.p. 36700. El predio se encuentra dividido a la derecha por una vía férrea que cruza de oriente a poniente originando dos polígonos: el polígono de la planta (polígono norte) con una superficie de 21.68 ha y el polígono del Vivero (polígono sur) con una superficie de 5.00 ha. Para el análisis de compuestos organoclorados se obtuvieron dos series de muestras del sitio contaminado en Salamanca. Las muestras R1-R4 fueron tomadas del área de residuos en el extremo oriente dentro de la desaparecida Fertimex y fueron proporcionadas dentro del Programa de Gestión Ambiental Urbana en Salamanca. En estas muestras se buscó encontrar el perfil de compuestos organoclorados esperando altas concentraciones de ellos (principalmente DDT y sus congéneres). La segunda serie de muestras se tomaron directamente de diferentes áreas del terreno de la misma empresa que comprenden la zona poniente, centro y sur como se aprecia en la figura 8 y en la tabla 6. La zona poniente y sur fueron previamente tratadas por diferentes empresas bajo la autorización de Secretaria de medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT)<sup>[100]</sup> para su disposición final en confinamiento controlado, estos sitios fueron marcados como S2, S3 y S4. Estos puntos se eligieron debido a que en un periodo comprendido entre el 2003 y 2012 se removieron mediante excavación 24 000 toneladas de suelo contaminado descrito como suelo con concentraciones mayores de 10 000 mg/kg de DDT y sus congéneres en el libro blanco de la SEMARNAT<sup>[100]</sup>. En este caso, dependiendo de la localización se esperaban relativamente menores concentraciones de compuestos organoclorados y también una mayor variedad de compuestos (posibles metabolitos).

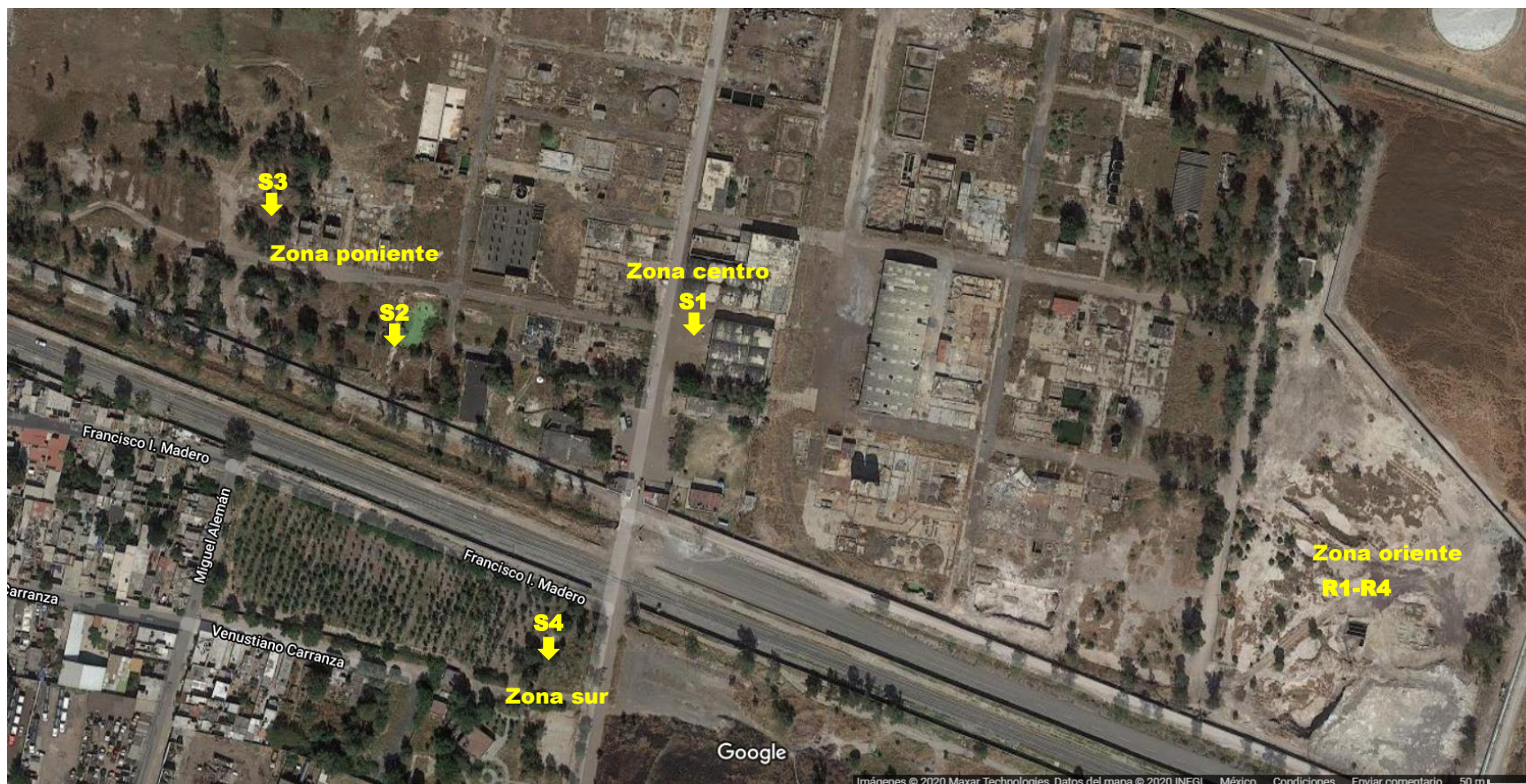


Figura 8. Distribución de sitios en antiguo Fertimex donde se recolectaron las muestras para su análisis de contenido de pesticidas organoclorados<sup>[101]</sup>.

El sitio identificado como S2 fue excavado a una profundidad de 2.0 m y relleno con suelo pretratado mediante procesos de cribado y homogeneizado, por consiguiente en la muestra se observaron dos capas que se separaron en 2a y 2b, respectivamente. Respecto a la zona centro identificada como S1 comprende un antiguo almacén de residuos peligrosos contenidos en tambos en su mayoría en mal estado conteniendo DDT técnico principalmente.

Tabla 6. Etiquetado de muestras recolectadas en Fertimex, Salamanca Guanajuato.

Identificación de suelos		Ubicación
Lindanos		S3
Comedor		S4
Antiguo almacén		S1
Lodo	Lodo 2a	S2
	Lodo 2b	

En cuanto a los detalles de muestreo para los sólidos S1-S4, la superficie de cada sitio no superó los 400 m<sup>2</sup>. Todas las muestras fueron recolectadas el mismo día en octubre del 2016, después de la eliminación de la capa superior de aproximadamente 10 cm, se tomaron muestras de cinco porciones de aproximadamente 100 g en cada sitio utilizando recipientes de plástico estériles y se transportaron al laboratorio. Para la determinación de pesticidas, las muestras agrupadas S1-S4 se secaron a temperatura ambiente y se tamizaron (<0,64 mm).

Como las herramientas analíticas, se utilizaron dos cromatógrafos de gases con diferentes detectores, el primero de ellos fue un Clarus 500 de Perkin Elmer con detector ECD y el segundo fue un Scion TQ con detector másico de triple cuadrupolo. El detector ECD es selectivo y ofrece buena sensibilidad para compuestos que contienen en su molécula átomos con electrones libres como halógenos, grupos funcionales como peróxidos, nitro y anillos aromáticos. Al mismo tiempo, ECD es más simple y económicamente viable respecto a MS. En este trabajo, nos enfocaremos en aquellas moléculas orgánicas en cuya estructura posean átomos de cloro, mejor conocidas como organoclorados. Puesto que ECD pertenece a los detectores selectivos, la respuesta para los compuestos con diferente número de átomos de cloro es distinta (sensibilidad depende del número de átomos de Cl en la molécula). La

desventaja de ECD es su susceptibilidad a las interferencias respecto a MS, además podría presentar peores valores de señal/ruidos (S/N).

En esta sección se presentan los resultados para diez compuestos organoclorados por GC-MS obteniéndose las funciones de calibración en modo full scan analizando las cuatro muestras R1-R4. Por su parte, el análisis de S1-S4, se llevó a cabo por GC-ECD, las condiciones de separación cromatográficas se obtuvieron mediante el uso de la plataforma electrónica Pro EZGC<sup>®</sup> Chromatogram Modeler<sup>BETA</sup> de RESTEK<sup>[102]</sup>. En este caso se consideraron 16 compuestos incluidos en la mezcla de estándares EPA.

#### **IV.1.2      Objetivos particulares.**

- ✓ Evaluar la contaminación del terreno industrial en Salamanca con compuestos organoclorados, mediante la aplicación de procedimientos en GC-ECD y GC-MS.

#### **IV.1.3      Condiciones Experimentales.**

##### **IV.1.3.1.      Muestras.**

Muestras R1-R4 e identificados como S1, S2, S3 y S4. Los sitios de muestreos de los últimos se marcaron en la figura 8 y las muestras fueron etiquetadas como se señala en la tabla 6. El material identificado como “Lodo” mostró una mezcla heterogénea de dos diferentes limos, uno más arcilloso que el otro, se separaron en las muestras identificadas como “Lodo 2a” (S2a) y “Lodo 2b” (S2b). Los suelos fueron liofilizados y triturados en mortero para su posterior análisis. Cada análisis se realizó por triplicado.

#### IV.1.3.2. Soluciones estándar para la calibración por GC-MS.

Se prepararon los estándares individuales de pesticidas organoclorados en ACN de la siguiente manera: en viales de vidrio de 25 mL se pesaron con precisión aproximadamente 0.010 g de cada estándar. Estos estándares se disolvieron en 10 mL de ACN. Para el cálculo de concentración, se pesaron de nuevo los viales y el volumen se calculó tomando en cuenta la densidad del ACN ( $\rho=0.786 \text{ g/cm}^3$ ). En la tabla 7 se muestra la relación de masas y concentración final de cada estándar.

Tabla 7. Preparación de las soluciones stock de estándares individuales de pesticidas organoclorados.

Compuesto	Masa (g)	Masa de ACN (g)	Concentración (mg/L)
BHC (mezcla de isómeros)	0.0107	7.725	1086
Lindano	0.0065	7.741	660.0
<i>p,p'</i> -DDT	0.0108	7.719	1100
<i>p,p'</i> -DDE	0.0100	7.748	1014
Endrina	0.0182	7.751	1846
Aldrina	0.0114	7.751	1156
Metoxicloro	0.0155	7.756	1571
Heptacloro	0.0130	7.739	1320
<i>p,p'</i> -DDD	0.0123	7.750	1247
Endosulfán	0.0106	7.745	1074
Dieldrín	0.0120	7.725	1221

A partir de estas soluciones, se preparó una solución stock mixta que contenía 10 mg/L de cada uno de los compuestos en ACN. A partir de esta solución, se preparaban a diario las soluciones de calibración: 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0 y 10 mg/L. Para el estudio de las condiciones de análisis se empleó una solución con una concentración de 10 mg/L. Esta última solución stock no contiene el estándar de BHC debido a que este compuesto posee los 4 isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  – hexaclorociclohexano en diferentes proporciones de masa, además de que el espectrómetro de masas no puede discriminar entre isómeros.

#### IV.1.3.3. Calibración para el análisis por GC-ECD.

Se tomaron 30  $\mu\text{L}$  de la solución stock del estándar EPA y se diluyeron en 1 mL de ciclohexano obteniendo una concentración de 6.0 mg/L de cada uno de los compuestos. Esta solución se utilizó para la preparación de la curva de calibración de la siguiente

manera: 50, 100, 500, 1000, 2500 y 5000 µg/L de cada uno de los pesticidas organoclorados presentes en el estándar. Para el estudio de las condiciones de análisis se empleó una solución con una concentración de 100 µg/L.

#### IV.1.3.4. Protocolo de extracción aplicado a las muestras R1-R4

Las muestras se secaron en estufa a 60 °C por 24 h, y se trituraron en mortero; se pesó en tubo eppendorf aproximadamente 20 mg de cada muestra, el análisis se realizó por duplicado. Se agregó 1 mL de una solución 1:10 de DCM:ACN y se agitó en vórtex por 1 minuto. La extracción se realizó en baño de ultrasonido durante 2 ciclos de 8 minutos. Se centrifugó a 10 000 g durante 10 minutos. Se tomaron 100 µL del sobrenadante y se agregaron 100 µL de ACN para su posterior análisis en GC-MS(TQ).

#### IV.1.3.5. Protocolo de extracción aplicado a las muestras S1-S4.

Se pesó en tubo eppendorf aproximadamente 200 mg de cada material, el análisis se realizó por triplicado. Se agregó 1 mL de una solución 1:10 de DCM:AcOEt y se agitó en vortex por 1 minuto. La extracción se realizó en baño de ultrasonido utilizando 4 ciclos de 8 minutos. Se centrifugó a 10 000 g durante 10 minutos. Se eliminó el agua agregando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. En la tabla 8 se muestra la relación de dilución en ciclohexano (el cual es un solvente totalmente hidrocarbonado ideal para usar en ECD) para cada una de las muestras después de la extracción, el solvente de inyección fue ciclohexano y el análisis se realizó por GC-ECD.

Tabla 8. Diluciones de los extractos de S1-S4 con ciclohexano para el análisis por GC-ECD.

<b>Muestra</b>	<b>Dilución</b>
S2	1:10
S2A	1:100
S2B	1:100
S1	1.100
S4	Sin dilución
S3	1:100



#### IV.1.3.6. Métodos cromatográficos.

Para el análisis GC-MS, se utilizó una columna capilar BP5-MS de bajo sangrado, apta para amplio intervalo de temperaturas (-40 a 330 °C), con grosor de película 0.25 µm y carácter apolar (5%- polisilfenilensiloxano). Se optó por la inyección con división (split) y adquisición en el modo Full Scan ( $m/z$  50-500). Se examinaron diferentes gradientes de temperatura y flujos de gas de arrastre (He) buscando la separación de todos los compuestos de la mezcla en un tiempo razonable. Las condiciones seleccionadas de esta manera manual se presentan en la tabla 9. El tiempo total en el cromatograma fue de 18.3 min.

Tabla 9. Condiciones instrumentales para el análisis de pesticidas organoclorados por GC-MS.

Condiciones	Bruker SCION TQ MS		
Inyección	1 µL Split 1:5		
Temp. de inyector	250 °C		
Flujo de gas acarreador	1 mL/min He		
Columna	BP5-MS; longitud de 30 m, 0.25 mm ID; 0.25 µm de recubrimiento.		
Programa de temperatura del horno	°C/min	Temperatura (°C)	Permanencia (min)
	-	70	1.0
	15	250	2.0
	30	290	2.0
Tiempo total	18.3 min		
Temp. de fuente de ionización	250 °C		
Modo de adquisición	Full Scan		
Temp. de línea de transferencia	290 °C		
Intervalo de $m/z$	50-500		

Para el análisis por GC-ECD, se utilizó el cromatógrafo de gases Clarus 500 con detector ECD (Perkin Elmer), la columna capilar fue Elite-XLB de bajo sangrado (Perkin-Elmer) e hidrógeno como gas de arrastre. Las condiciones instrumentales se presentan en la tabla 10 y se lograron utilizando la plataforma Pro EZGC<sup>®</sup> Chromatogram Modeler<sup>BETA</sup> de RESTEK para la obtención de metodologías cromatográficas *in silico*. Se utilizó estándar EPA a una concentración de 100 µg/L para establecer condiciones cromatográficas.

Tabla 10. Condiciones cromatográficas de GC-ECD aplicadas en la determinación de pesticidas organoclorados.

<b>Condiciones: Perkin Elemer Clarus 500 – ECD</b>			
Inyector	250 °C		
	Split 5:1		
Flujo	H <sub>2</sub> : 1.2 mL/min		
	N <sub>2</sub> : 30 mL/min		
Columna	PE-XLB, 30 m, 0.25 mm ID; 0.25 µm de recubrimiento.		
Horno	°C/min	°C	Permanencia
	0	100	0
	30	130	0
	5	190	10
	10	280	2
Detector	ECD		
Atenuación	32		
Temp. de Detector	310 °C		

#### IV.1.4 Resultados y discusión.

##### IV.1.4.1. Determinación de congéneres de DDT por GC-MS en el modo Full Scan.

Para el desarrollo del procedimiento cromatográfico utilizando como detector MS, se utilizó una solución mixta de 10 pesticidas organoclorados (incluyendo sus isómeros) a una concentración de 10 mg/L en ACN. En la figura 9 se presenta un ejemplo de cromatograma TIC; los picos fueron asignados a los compuestos individuales con base a sus tiempos de retención y espectros de masas (biblioteca de NIST/EPA/NIH versión 2.0, 2011).

En la figura 10 se muestra, a manera de ejemplo, un espectro de masas de DDT que es uno de los componentes de la mezcla de calibración y su comparación con el respectivo espectro de la biblioteca NIST. La lista de compuestos junto con sus respectivos tiempos de retención se presenta en la tabla 11.

Cabe señalar que, en la figura 9 se observa la elución de un compuesto adicional que no coincide con ninguno de los estándares utilizados, con tiempo de retención 13.53 min

(marcado con asterisco). Este compuesto se identificó como 2,2-bis(*p*-clorofenil)-1-cloroetileno (DDMU); en la figura 10 se presenta su espectro experimental junto con el de la biblioteca NIST.

El DDMU puede presentarse como contaminación de uno de los estándares o como un producto de su degradación.

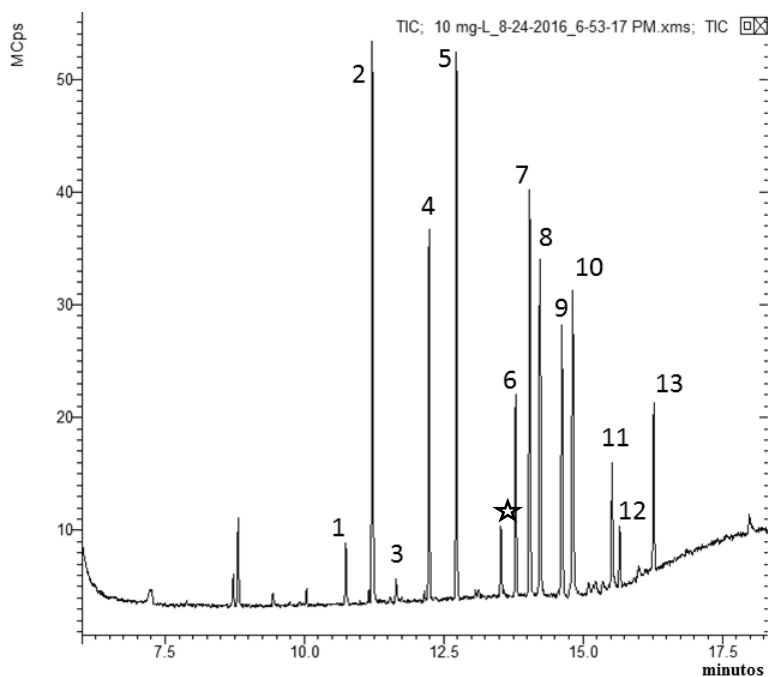


Figura 9. Típico cromatograma obtenido en el análisis por GC-MS en modo TIC de la solución de estándares de pesticidas organoclorados (10 mg/L de cada uno de los compuestos).

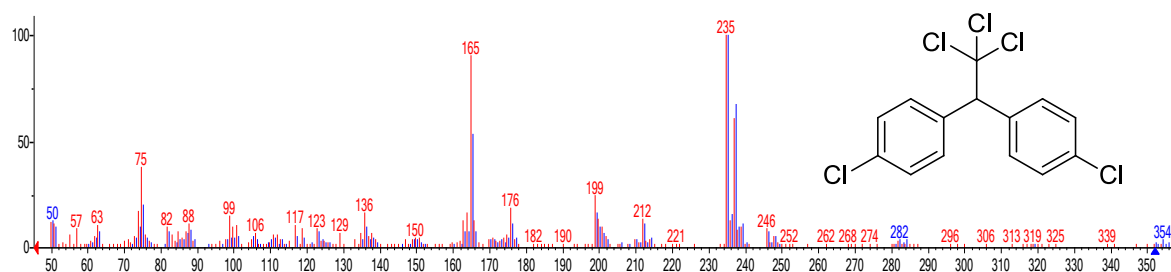


Figura 10. Comparación de espectros experimentales (rojo) y NIST (azul) del *p,p'*-DDT obtenido a partir del cromatograma TIC de la figura 9.

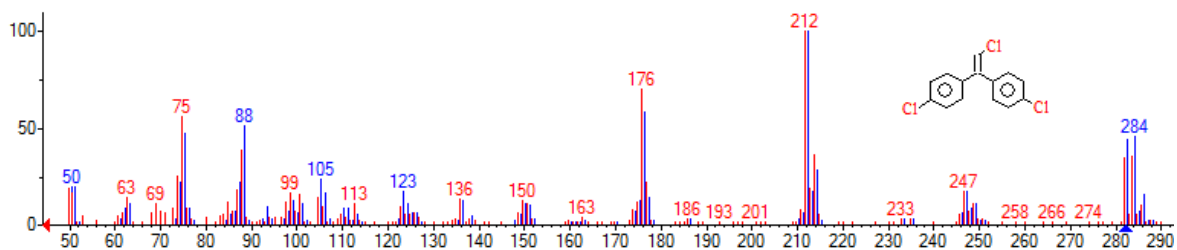


Figura 11. Comparación de espectro de masas experimental (rojo) con espectro de masas de biblioteca NIST (azul) el cual confirma la identidad del pico (\*) de la figura 9 como DDMU.

Tabla 11. Tiempos de retención obtenidos a partir del método cromatográfico propuesto, se muestra la asignación de los picos marcados en el cromatograma de la figura 9.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Número de pico
BHC (mezcla de isómeros)	10.7, 11.2, 11.64	1,2,3
Lindano	11.2	2
Heptaclor	12.2	4
Aldrina	12.7	5
Endosulfán	13.8	6
<i>p,p'</i> -DDE	14.0	7
Dieldrín	14.2	8
Endrina	14.6	9
<i>p,p'</i> -DDD	14.8	10
<i>p,p'</i> -DDT	15.5	11
Metoxicloro ( <i>o,p'</i> y <i>p,p'</i> )	15.7, 16.3	12, 13
DDMU	13.53	*

Para el proceso de calibración, se obtuvieron cromatogramas en Full Scan de seis soluciones estándar que contenían 0, 0.25, 0.50, 1.0, 2.5, 5.0 y 10 mg/L de cada uno de los compuestos, mismos que de manera de ejemplo se presentan en la figura 12. Para mayor claridad, en la figura 13 se muestran los cromatogramas de las soluciones de calibración para *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD y *p,p'*-DDT. Se tomó el área de los picos cromatográficos como señal analítica, utilizando la plataforma MS Workstation, de Bruker. Las funciones de calibración se obtuvieron por el método de regresión lineal y los resultados se presentan en la tabla 12.

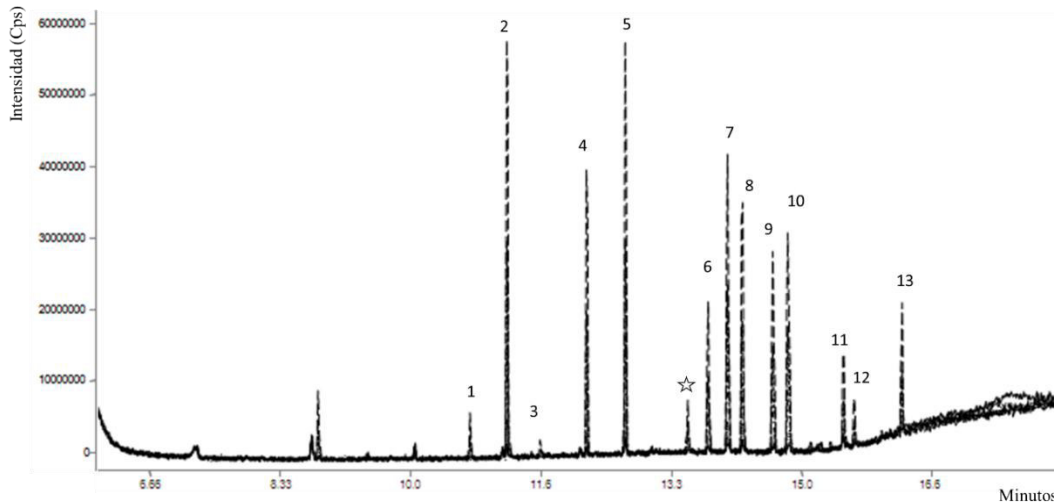


Figura 12. Cromatogramas de la curva de calibración de 10 pesticidas organoclorados obtenidos por Full Scan en un intervalo de  $m/z$  de 50-500.

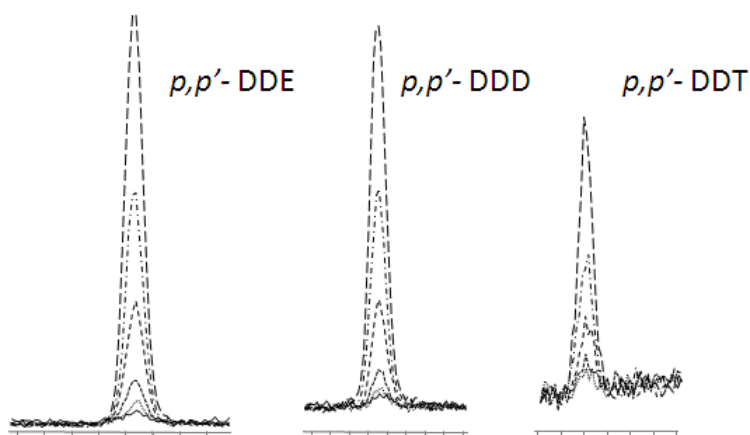


Figura 13. Picos cromatográficos de la curva de calibración de  $p,p'$ -DDE,  $p,p'$ -DDD y  $p,p'$ -DDT.

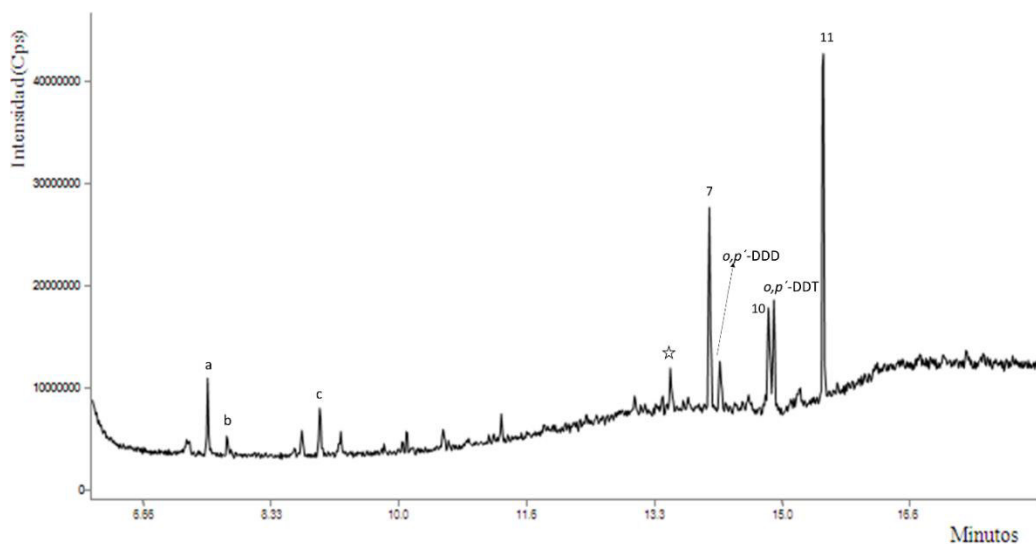
Tabla 12. Funciones de calibración de pesticidas organoclorados obtenidas por método GC-MS en el modo Full Scan, se muestran valores de regresión lineal y porcentaje de desviación estándar relativa (%DER).

Compuesto	Ecuación	R <sup>2</sup>	%DER
Lindano	$y = 7.96e^6x - 8.17e^4$	0.9989	5.4
Heptaclor	$y = 4.81e^6x - 5.78e^5$	0.9996	7.2
Aldrina	$y = 6.95e^6x - 5.41e^5$	0.9996	4.3
Endosulfán	$y = 3.32e^6x - 7.24e^3$	0.9984	6.5
$p,p'$ -DDE	$y = 7.71e^6x - 5.77e^5$	0.9946	7.0
Dieldrín	$y = 6.60e^6x - 1.44e^5$	0.9976	6.7
Endrina	$y = 5.25e^6x - 1.44e^5$	0.9970	5.1
$p,p'$ -DDD	$y = 6.49e^6x - 3.68e^5$	0.9966	7.0

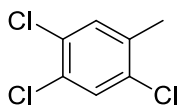
<i>p,p'</i> -DDT	$y = 1.40e^6x - 4.97e^5$	0.9963	4.2
<i>p,p'</i> -Metoxicloro	$y = 8.86e^5x - 2.68e^4$	0.9927	13

El cálculo de regresión genera un coeficiente de regresión o determinación ( $R^2$ ) que es una medida del grado de linealidad (calidad) en el ajuste de la función lineal respecto a los datos experimentales. Un valor de 1.00 indica un ajuste perfecto. De acuerdo con las indicaciones USEPA en el área del análisis cromatográfico, para fines cuantitativos,  $R^2$  debe ser mayor que o igual a 0.99; así mismo, la desviación estándar relativa de los factores de respuesta individuales (DER(CF)) para los estándares en una curva de calibración no debe ser más alto que 20%<sup>[103]</sup>. El factor de respuesta se calcula para cada punto de calibración y corresponde a la señal analítica dividida por la masa o concentración del analito ( $CF=S/x$ ), de esta manera CF representa la pendiente de línea entre el origen de coordenadas y la señal obtenida para un estándar dado. De ahí, el parámetro DER(CF) se calcula como  $DER(CF) = (DE(CF)/mCF)*100$ , donde mCF es el promedio de los valores CF para todos los estándares en la curva de calibración y DE (CF) es la desviación estándar de los valores CF individuales del valor promedio. Bajo los criterios que se acaban de mencionar y con base en los resultados de tres replicas independientes de proceso de calibración (tabla 12), se puede concluir que las funciones de calibración cumplen con los criterios EPA para los análisis cromatográficos.

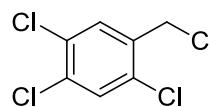
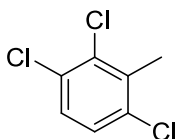
Se puede observar que la pendiente de la función de regresión lineal para el *p,p'*-DDT es menor respecto a otros compuestos y en particular, respecto a *p,p'*-DDE y *p,p'*-DDD. Como continuación del trabajo se buscó posibles causas de este efecto, como se describe en la siguiente sección IV.1.4.2. Utilizando las funciones de calibración, se determinaron compuestos organoclorados en muestras de residuos (R1, R2, R3 y R4). En la figura 14, a manera de ejemplo, se muestra cromatograma obtenido en el análisis de R1 y los resultados de la cuantificación se presentan en la tabla 13 (como mg del compuesto por un kg de masa seca de la muestra). Cabe señalar que en este análisis se han detectado *o,p'*-DDD y *o,p'*-DDT, además de algunos compuestos no incluidos entre los estándares. Específicamente los compuestos a, b, y c fueron asignados tentativamente comparando sus espectros de masas con biblioteca NIST (sus estructuras se presentan en la figura 14).



1,2,4-tricloro-3-metilbenceno (b)



1,2,4-tricloro-5-metilbenceno (a)



1,2,4-tricloro-5-(clorometil)benceno (c)

Figura 14. Cromatograma de residuo R1 donde se muestra los picos del *p,p'*-DDT (11), *p,p'*-DDD(10), *p,p'*-DDE(7) y DDMU(\*). Adicionalmente se presentan las estructuras de los compuestos orgánicos clorados (a, b, c) que se asignaron comparando sus espectros de masas con la biblioteca NIST.

Tabla 13. Concentraciones de compuestos organoclorados encontrados en muestras de residuos (R1-R4) por el método GC-MS en el modo Full Scan. Se presentan valores promedio para cada residuo con sus respectivas DE, obtenidos con base en dos réplicas independientes.

Compuesto	Promedio $\pm$ DE, mg/kg (DER %)			
	R1	R2	R3	R4
<i>p,p'</i> -DDE	524 $\pm$ 10.5 (4.0)	371 $\pm$ 39.6 (21)	640 $\pm$ 4.30 (1.0)	504 $\pm$ 10.2 (4.0)
<i>p,p'</i> -DDD	295 $\pm$ 4.31 (3.0)	209 $\pm$ 18.4 (18)	338 $\pm$ 5.83 (3.0)	300 $\pm$ 7.53 (5.0)
<i>p,p'</i> -DDT	1113 $\pm$ 34.8 (6.0)	526 $\pm$ 91.6 (32)	1491 $\pm$ 3.53 (1.0)	1144 $\pm$ 54.7 (10)

Los resultados obtenidos indican el siguiente orden decreciente de los contenidos de tres compuestos encontrados  $R3 > R4 \approx R1 > R2$ . De acuerdo con lo esperado, entre los tres compuestos, el *p,p'*-DDT resultó ser el más abundante, mientras que el *p,p'*-DDE y el *p,p'*-

DDD fueron encontrados en concentraciones más bajas. Esto sugiere cierto avance de degradación del pesticida en los residuos analizados.

#### IV.1.4.2. Importantes consideraciones en el análisis de DDT en diferentes matrices.

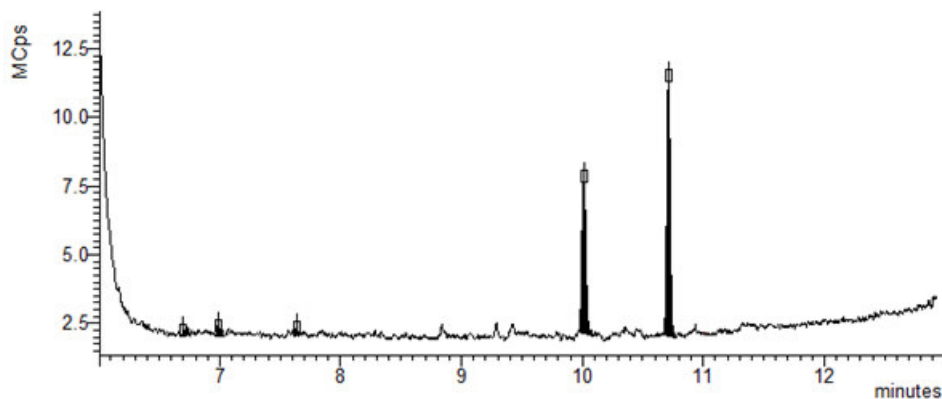
En el proceso de calibración, se obtuvo más baja pendiente para el *p,p'*-DDT en comparación con sus congéneres *p,p'*-DDD y *p,p'*-DDE, aunque los datos para cada uno de ellos fueron obtenidos de la misma corrida cromatográfica. La primer causa probable de este efecto podría deberse a que el *p,p'*-DDT utilizado como estándar individual fue grado técnico, por lo que contenía tres isómeros y presentaba cierto grado de degradación. Es por ello, que se decidió utilizar el estándar certificado *Appendix IX Organochlorine Pesticide 2 mg/mL, toluene/hexane (1:1)* descrito en el punto IV.1.1.1, diluido en 10 mL de AcOEt, para corroborar la calidad y cantidad del estándar cualitativo de *p,p'*-DDT en los análisis cromatográficos.

Debido a que este estándar USEPA contiene un mayor número de compuestos (16) respecto a la mezcla de estándares individuales con la que se trabajó hasta ahora, era necesario adecuar las condiciones de separación cromatográficas. Sin embargo, esta tarea no era trivial ya que para la columna DB-5MS utilizada en el estudio, el método USEPA 8081B<sup>[104]</sup> se menciona en el apartado 4.9, el *p,p'*-DDT se co-eluye con sulfato de endosulfán.

En el mismo método USEPA (punto 9.3.3) se alerta sobre la baja sensibilidad para el *p,p'*-DDT debido a su degradación en el puerto de inyección. Esta degradación ocurre cuando el liner empleado se contamina de residuos con alta temperatura de ebullición provenientes de la misma muestra inyectada, o cuando el inyector contiene partes metálicas que entran en contacto con la muestra. De acuerdo con el método USEPA, cuando la degradación del *p,p'*-DDT excede el 15 %, se debe eliminar el problema (cambio y/o limpieza de liner) o evaluar el porcentaje promedio de degradación del *p,p'*-DDT para introducir la corrección en los resultados de su cuantificación. Para evaluar el porcentaje de degradación del *p,p'*-DDT, se inyectó al sistema cromatográfico una solución del *p,p'*-DDT de 5.0 mg/L en AcOEt y se registró el cromatograma en Full Scan observándose las señales correspondientes al *p,p'*-DDT y *p,p'*-DDD, pero no del *p,p'*-DDE (figura 15). En la misma



figura se muestra el cálculo del porcentaje de degradación del *p,p'*-DDT que resulto ser demasiado alto respecto a los criterios USEPA (40.4%).



#	Retention Ti...	Area	% of Total	Signal/Noise	Scan Description
Plot 1	DDT_10-19-...	Local Para...		Peak-to-Pea...	
1.	6.700	621792	1.930	2.5	Merged
2.	6.986	953899	2.961	4.99	Merged
3.	7.635	337696	1.048	3.766	Merged
4.	10.012	1.223e+7	37.959	75.12	Merged
5.	10.712	1.807e+7	56.102	115.8	Merged

$$\% \text{degradación de DDT} = \frac{\text{Suma de las áreas de pico de degradación (DDD + DDE)}}{\text{Suma de todas las áreas de picos (DDT + DDE + DDD)}} \times 100$$

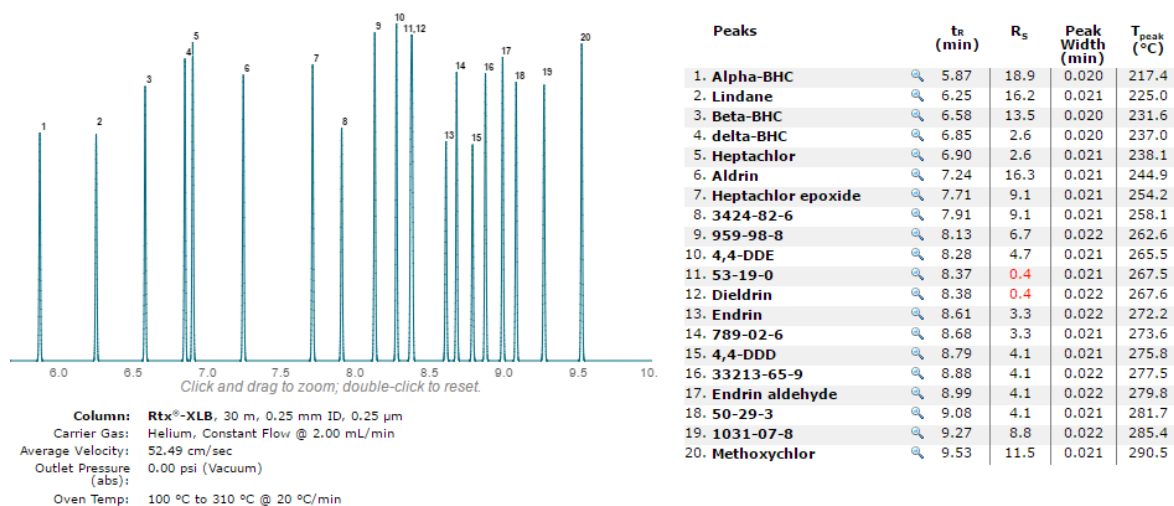
$$\% \text{degradación de DDT} = \frac{1.223e^7 (DDD)}{1.223e^7 (DDD) + 1.807e^7 (DDT)} \times 100 = 40.4\%$$

Figura 15. Evaluación de la degradación de *p,p'*-DDT a *p,p'*-DDD en el análisis cromatográfico (GC-MS Full Scan), basado en el método USEPA 8081B<sup>[104]</sup>.

Con base en estos resultados y la necesidad de usar un estándar certificado, se optó por emplear la técnica GC-ECD. Esta técnica no solo es muy sensible para aquellos compuestos que en sus moléculas contengan átomos ricos en electrones como el caso de los halógenos, también el instrumento cuenta con una columna cromatográfica capilar PE-XLB, que nos asegura una mejor resolución cromatográfica en los analitos presentes en el estándar certificado. En el siguiente punto se trata a más profundidad el tema.

#### IV.1.4.3. Determinación de compuestos organoclorados por GC-ECD.

Los compuestos considerados en esta parte del trabajo fueron los incluidos en el estándar *Organochlorine Pesticide Mix*. Se utilizó el cromatógrafo de gases Clarus 500 con detector ECD (Perkin Elmer), las condiciones de separación se establecieron mediante la plataforma RESTEK (figura 16). Como se presenta en la figura 17, en el primer intento (figura 17a), el programa obtenido no permitió la resolución de todos los compuestos, por lo que se tuvo que realizar algunas modificaciones en la rampa de temperatura. Las condiciones finales se reportan en la tabla 10. Se logró la resolución de todos los compuestos del estándar certificado EPA, como se muestra en la figura 17b.



#CAS 3424-82-6: *o,p'*-DDE, 959-98-8: endosulfán I, 53-19-0: *o,p'*-DDD, 33213-65-9: Endosulfán II, 789-02-6: *o,p'*-DDT, 1031-07-8: sulfato de Endosulfán, 50-29-3: *p,p'*-DDT.  $R_s$ : resolución cromatográfica.

Figura 16. Representación de método cromatográfico obtenido utilizando plataforma Pro EZGC® Chromatogram Modeler<sup>BETA</sup> de RESTEK para análisis por GC-ECD.

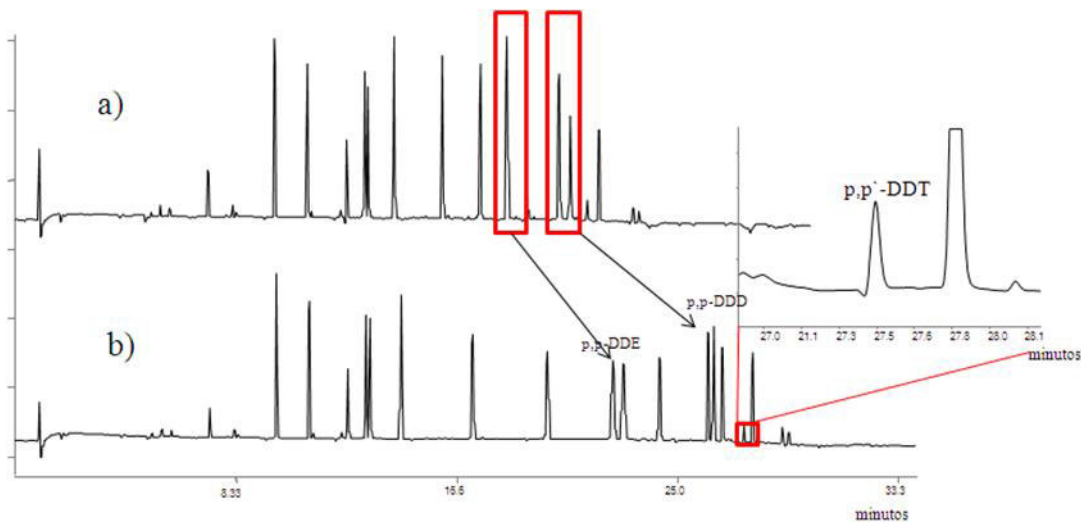


Figura 17. a) la rampa cromatográfica propuesta inicialmente parte de 100 °C a 130 °C (30 °C/min) hasta 300 °C (5 °C/min), se observó la co-elución de *p,p'*-DDE y *p,p'*-DDD. En b) utilizando las condiciones cromatográficas de la tabla 16 se logró la correcta elución de todos los analitos.

En la tabla 14 se muestran los tiempos de retención de cada analito en el método cromatográfico finalmente establecido, en el cual se asegura la separación de todos los compuestos presentes en el estándar *Organochlorine Pesticides Mix* (figura 18) en una columna capilar PE-XLB.

Tabla 14. Tiempos de retención y su desviación estándar (DE) obtenidos a partir del método cromatográfico propuesto (DE obtenidos en base a tres replicas).

Analito	Tiempo de retención ± DE (min)	Asignación del compuesto (figura 25)
α-BHC	9.79 ± 0.03	1
γ-BHC	11.0 ± 0.03	2
δ-BHC	12.5 ± 0.03	3
Heptaclor	13.2 ± 0.03	4
Aldrina	13.3 ± 0.03	5
Epoxi-heptaclor	14.5 ± 0.04	6
Endosulfán I	17.1 ± 0.05	7
Dieldrín	19.9 ± 0.06	8
Endrina	22.4 ± 0.08	9
<i>p,p'</i> -DDE	22.8 ± 0.08	10
Endosulfán II	24.2 ± 0.03	11
Endrina aldehído	26.1 ± 0.04	12
<i>p,p'</i> -DDD	26.3 ± 0.03	13
Sulfato de endosulfán	26.6 ± 0.03	14
<i>p,p'</i> -DDT	27.4 ± 0.03	15

Metoxicloro	27.8 ± 0.02	16
-------------	-------------	----

Las funciones de calibración y la cuantificación en muestras reales se realizaron mediante la aplicación off-line de software ChemStation (Agilent Technologies), tomando el área del pico cromatográfico como señal analítica. El mejor ajuste de los resultados de calibración se obtuvo empleando función cuadrática, obteniéndose en cada uno de los casos el coeficiente  $R^2 > 0.998$ . Para evaluar la calidad del ajuste, se calculó la desviación estándar relativa (DER) de los factores de respuesta para cada uno de los puntos de calibración. El límite de aceptación del DER para un modelo cuadrático debe ser de  $\leq 20\%$  para cada uno de los compuestos analizados, aceptando valores de  $\leq 30\%$  para compuestos inestables, no termoestables, etc. En el orden de aceptar una calibración no lineal, el coeficiente de regresión ( $R^2$ ) debe ser  $\geq 0.99$ . Las funciones de regresión junto con respectivos  $R^2$  y el DER de los factores de respuesta se presentan en la tabla 15. De acuerdo con los criterios USEPA, los parámetros de calibración cumplieron con los requisitos aceptados para el análisis cromatográfico ( $R^2 > 0.99$ ;  $DER \leq 20\%$ )<sup>[103]</sup>.

Tabla 15. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración por GC-ECD.

Compuesto	Ecuación	Coefficiente de Regresión ( $R^2$ )	DER, %*
$\alpha$ -BHC	$y = -1.52e^{-1}x^2 + 953x + 3.15e^4$	0.9991	9.82
$\gamma$ -BHC	$y = -1.42e^{-1}x^2 + 839x + 2.33e^4$	0.9993	10.6
$\delta$ -BHC	$y = -8.37e^{-2}x^2 + 408x + 1.99e^4$	0.9994	13.6
Heptaclor	$y = -1.57e^{-1}x^2 + 878x + 1.64e^4$	0.9993	12.8
Aldrina	$y = -1.41e^{-1}x^2 + 839x + 2.02e^4$	0.9991	13.4
Epoxi-heptaclor	$y = -2.30e^{-1}x^2 + 1154x + 3.47e^4$	0.9987	10.2
Endosulfán I	$y = -2.52e^{-1}x^2 + 1131x + 2.91e^4$	0.9989	11.8
Dieldrín	$y = -2.83e^{-1}x^2 + 1205x + 3.17e^4$	0.9986	11.0
Endrina	$y = -3.08e^{-1}x^2 + 1310x + 3.36e^4$	0.9986	12.0
<i>p,p'</i> -DDE	$y = -3.08e^{-1}x^2 + 1337x + 3.37e^4$	0.9986	11.6
Endosulfán II	$y = -2.13e^{-1}x^2 + 974x + 2.63e^4$	0.9995	11.0
Endrina aldehído	$y = -1.92e^{-1}x^2 + 877x + 2.42e^4$	0.9988	12.0
<i>p,p'</i> -DDD	$y = -2.01e^{-1}x^2 + 869x + 2.79e^4$	0.9984	15.2
Sulfato de endosulfán	$y = -1.42e^{-1}x^2 + 692x + 2.61e^4$	0.9980	22.9
<i>p,p'</i> -DDT	$y = 1.76e^{-2}x^2 + 279x - 8.72e^3$	0.9992	11.5
Metoxicloro	$y = -1.05e^{-1}x^2 + 615x + 1.40e^4$	0.9992	14.2

\*DER - desviación estándar relativa del factor de respuesta; x – concentración en  $\mu\text{g/L}$ .

En la figura 18 a manera de ejemplo, se muestran los cromatogramas de las seis soluciones de calibración, y específicamente se muestran los picos de *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD y *p,p'*-DDT. Con base en el proceso de calibración, se evaluaron los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC). En cromatografía, se define el límite de detección como la cantidad inyectada que resulta en un pico con una altura al menos dos o tres veces mayor del ruido de la línea base. El LC es el límite bajo del intervalo de linealidad de procedimiento y es recomendado como el más bajo estándar de calibración utilizando un método no lineal.

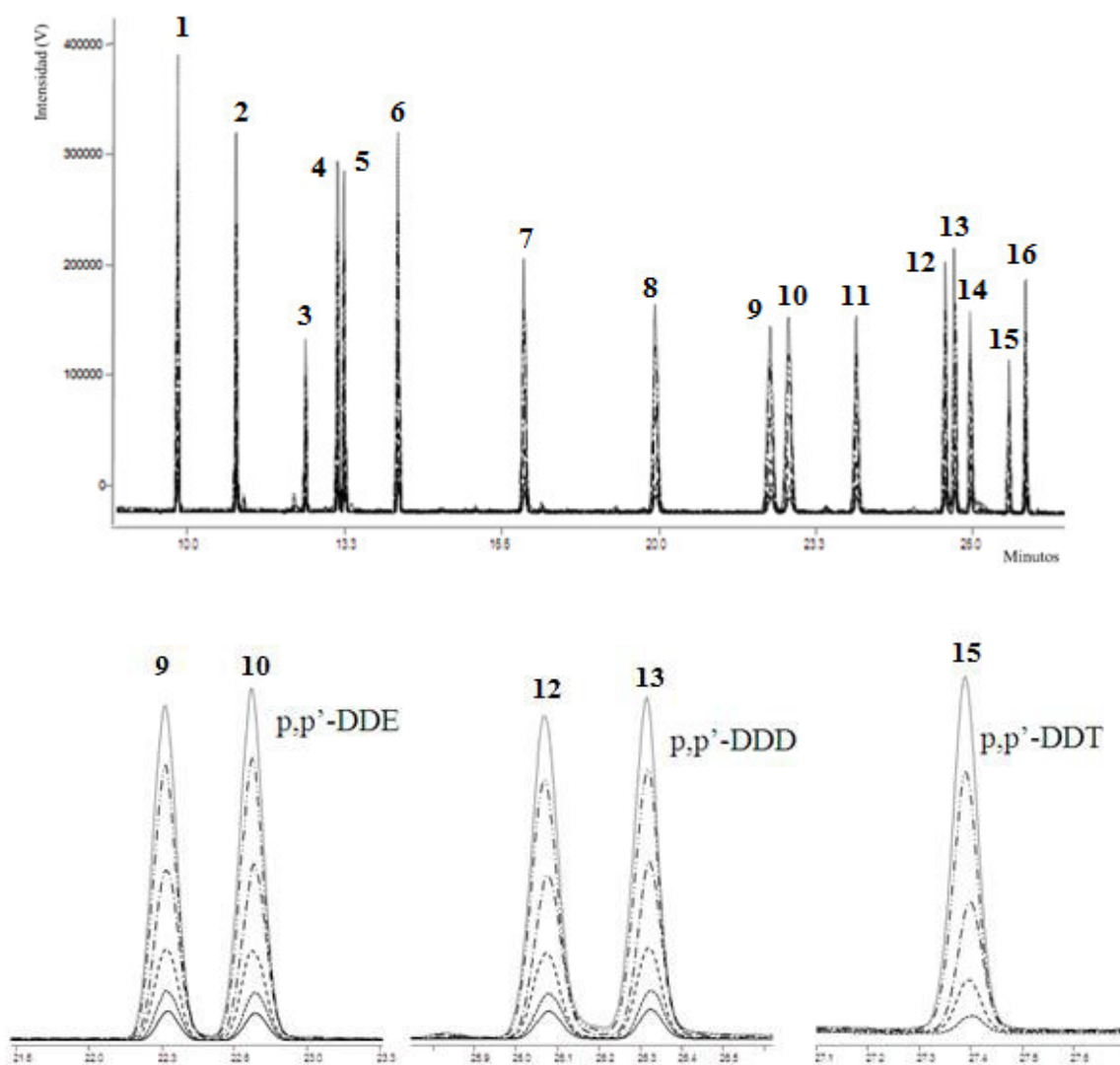


Figura 18. Típicos cromatogramas GC-ECD de las soluciones de calibración (50, 100, 500, 1000, 2500 y 5000  $\mu\text{g/L}$ ) de cada uno de los compuestos. En la parte inferior de la figura se aprecia una ampliación de las regiones de cromatogramas correspondientes a la elución de *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD y *p,p'*-DDT, respectivamente.

El límite de detección se expresa como:

$$LD = \frac{3 \sigma}{S} \dots (1)$$

En esta ecuación,  $\sigma$  corresponde a la desviación estándar de la respuesta instrumental en la región de la elución del analito y  $S$  la pendiente de la función lineal que relaciona la respuesta del instrumento con la concentración del analito. Sin embargo, la presente metodología proporciona curvas de calibración cuadráticas y dependiendo del modo de adquisición de la señal, no se puede llevar a cabo una determinación de LD y LC como comúnmente se propone. En este caso, para el LD se tomó a  $\sigma$  como la desviación estándar de la respuesta instrumental de un punto a concentraciones bajas de la curva de calibración (para fines prácticos se tomó la concentración de 100  $\mu\text{g/L}$ ,  $n=3$ ) y  $S$  se calculó la relación señal/concentración en este mismo punto, cuya respuesta es cercana al límite de cuantificación<sup>[105]</sup>. Para la determinación de LC se sigue el mismo procedimiento que para el LD utilizando la ecuación:

$$LC = \frac{10 \sigma}{S} \dots (2)$$

Ambos parámetros, LD y LC deben ser calculados para el proceso de calibración y también en condiciones de análisis de muestras reales, los cuales se muestran en la tabla 16. Para el LD y LC del método, las soluciones de calibración se prepararon agregando el extracto de la muestra S4, diez veces diluido.

Tabla 16. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) evaluados en el procedimiento de calibración y en el análisis de muestras reales (Suelos Salmantinos) en el método GC-ECD propuesto.

Analito	Calibración, $\mu\text{g/L}$		Análisis de suelos*, $\text{mg/kg}$	
	LD	LC	LD	LC
$\alpha$ -BHC	3.02	10.1	0.02	0.05
$\gamma$ -BHC	3.80	12.7	0.02	0.06
$\delta$ -BHC	19.3	64.4	0.09	0.32
Heptaclor	20.0	66.6	0.10	0.33
Aldrina	28.2	93.9	0.14	0.47
Epoxi-heptaclor	30.2	101	0.15	0.51
Endosulfán I	24.0	80.0	0.12	0.40

Dieldrín	23.5	78.4	0.12	0.39
Endrina	28.6	95.4	0.14	0.48
<i>p,p'</i> -DDE	3.55	11.8	0.02	0.06
Endosulfán II	22.5	75.1	0.11	0.38
Endrina aldehído	41.4	138	0.21	0.69
<i>p,p'</i> -DDD	9.77	32.6	0.05	0.16
Sulfato de endosulfán	31.8	106	0.16	0.53
<i>p,p'</i> -DDT	39.4	131	0.20	0.66
Metoxicloro	17.3	57.7	0.09	0.29

\*Para el cálculo de LD y LC del método, se utilizó el extracto del suelo.

Cabe señalar que los límites de detección reportados en otros métodos utilizando GC-ECD con métodos de extracción basados en LLE y ultrasonido cubren el intervalo de 1.6 – 3.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[106]</sup>, pero estos métodos incluyeron etapas de limpieza y preconcentración con alúmina o florisil. Los resultados obtenidos en este trabajo corresponden al análisis directo de extracto de suelo y podrán mejorarse mediante un adecuado procedimiento de preconcentración. En esta etapa de trabajo, sin embargo, el objetivo fue analizar los suelos contaminados sin necesidad de alto poder de detección al tratarse de sitios contaminados. En total, se analizaron 6 muestras sólidas recolectadas en sitio industrial contaminado, el suelo etiquetado como “Lodo” (S2) se dividió en 3 muestras diferentes, quedando identificadas como “Lodo”(S2), Lodo 2A” (S2A) y “Lodo 2B” (S2B) como se describen en la tabla 17.

El proceso de extracción se llevó a cabo como se especifica en el puto IV.1.3.5. De manera de ejemplo, en la figura 19 se muestra el cromatograma obtenido para la muestra etiquetada como “Comedor” (S4). Se puede observar que los compuestos encontrados en las muestras de Salamanca fueron principalmente  $\delta$ -BHC, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDT y *p,p'*-DDT. Los resultados de cuantificación, como miligramo de pesticida organoclorado por un kilogramo de muestra liofilizada (promedio  $\pm$  DE, n=3) se presentan en la tabla 16.

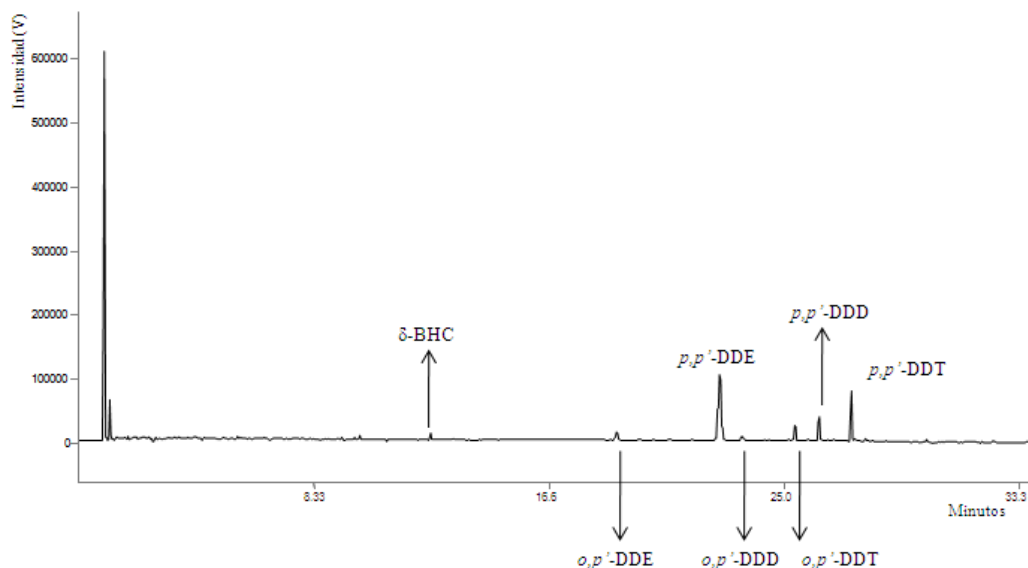


Figura 19. Cromatograma de extracto de muestra S4 etiquetado como “Comedor” obtenido por GC-ECD.

Tabla 17. Concentraciones de pesticidas organoclorados en muestras sólidas recolectadas de sitio industrial contaminado en la ciudad de Salamanca, determinados por GC-ECD (promedio  $\pm$  DE (DER), n=3).

Muestra	Etiqueta	$\delta$ -BHC (mg/kg)	<i>p,p'</i> -DDE (mg/kg)	<i>p,p'</i> -DDD (mg/kg)	<i>p,p'</i> -DDT (mg/kg)
Lodo	S2	ND	58.1 $\pm$ 1.42 (2.5)	58.3 $\pm$ 1.0 (1.7)	32.9 $\pm$ 12.9 (39)
Antiguo Almacén	S1	ND	197 $\pm$ 11 (5.7)	228 $\pm$ 19 (8.1)	873 $\pm$ 18 (2.1)
Lodos2A	S2A	ND	713 $\pm$ 22 (3.1)	789 $\pm$ 8.7 (1.1)	1320 $\pm$ 27 (2.0)
Lodos2B	S2B	ND	372 $\pm$ 62 (17)	446 $\pm$ 64 (14)	762 $\pm$ 183 (24)
Comedor	S4	0.52 $\pm$ 0.15 (29)	6.77 $\pm$ 0.83 (12)	1.43 $\pm$ 0.16 (11)	9.19 $\pm$ 1.12 (12)
Antiguo depósito de Lindano	S3	1298 $\pm$ 20 (1.5)	49.6 $\pm$ 2.1 (4.2)	ND	75.8 $\pm$ 2.4 (3.2)

ND: No Detectable.

Los resultados obtenidos claramente demuestran la presencia en altas cantidades de *p,p'*-DDT y sus congéneres *p,p'*-DDE y *p,p'*-DDD, también se detectó y cuantificó  $\delta$ -BHC en las muestras etiquetadas como comedor (S4) y antiguo depósito de lindano (S3). Este análisis se realizó con el fin de conocer las concentraciones a las cuales se encuentran



expuestos los microorganismos en estos suelos. Dichos organismos serán el objeto de estudio, en el contexto de su posible capacidad de biodegradación de compuestos organoclorados existentes en su hábitat natural. En la siguiente sección, se presentan los resultados obtenidos en el aislamiento y caracterización de microorganismos. Estos resultados permitirán plantear nuevos experimentos enfocados al cultivo de microorganismos en presencia de adecuadas concentraciones de DDT (DDT técnico o *p,p'*-DDT) para monitoreo de sus metabolitos y evaluación como posible herramienta de biorremediación o en su defecto, demostrar posible toxicidad de metabolitos de DDT.

#### **IV.1.5 Conclusiones.**

Los resultados por GC-TQMS obtenidos en la primera etapa de trabajo permitieron detectar una serie de retos que tienen que ser atendidos para poder utilizar dicha técnica en análisis de congéneres de DDT; estos fueron: (i) resolver el problema de la degradación del *p,p'*-DDT en el inyector mediante un correcto mantenimiento (cambio de liner, septa, entre otros), (ii) obtener la separación de compuestos de interés utilizando la plataforma Pro EZGC<sup>®</sup> Chromatogram Modeler<sup>BETA</sup> de RESTEK; (iii) establecer las condiciones de análisis (SIM o MRM) y (iv) establecer el procedimiento de tratamiento de muestras para el análisis de suelos y cultivos microbiológicos. Para evitar el problema de co-elución de *p,p'*-DDT con sulfato de endosulfán en la columna BP5-MS (EPA 8081<sup>[104]</sup>), se optó por el uso del sistema GC-ECD y la columna Elite-XLB (Perkin-Elmer) donde no se observó el problema de co-elución.

Los resultados obtenidos en el análisis de muestras S1-S4 por GC-ECD indican dos puntos importantes en este trabajo; el primero de ellos es el indiscutible problema de contaminación del sitio industrial elegido para el estudio mientras que el segundo punto es la confirmación de una transformación del DDT a DDE y DDD en sitios contaminados con pesticida. Todos los congéneres son igualmente tóxicos, pero la presencia del DDE y DDD sugiere la actividad de la biota en el proceso de degradación del DDT. Siguiendo esta línea, a continuación, se aislaron los microorganismos nativos de los sitios contaminados (S1-S4) y se evaluó su tolerancia a DDT. Este tema se tratará en los puntos IV.2, IV.3 y IV.4.

## **IV.2 Aislamiento de microorganismos del sitio industrial contaminado y su caracterización morfológica.**

### **IV.2.1 Introducción.**

En los ambientes naturales los microorganismos se encuentran usualmente como poblaciones mixtas, si se desea estudiarlos, caracterizarlos e identificarlos, necesitamos aislarlos en forma de cultivos puros. Un cultivo puro es aquel en el que todos los microorganismos provienen de un solo tipo de célula. Los métodos de aislamiento de bacterias pueden ser generalmente clasificados en dos partes:

1. Métodos de cultivo.
  - Sobre medio sólido.
  - En medio líquido.
  - Sistemas automatizados.
2. Métodos sin cultivo.

En los métodos de cultivo, el medio es seleccionado dependiendo del tipo de bacteria que se está esperando. Las siguientes precauciones necesitan ser tomadas a consideración cuando los métodos de cultivo son procesados:

1. Condiciones atmosféricas (en presencia o ausencia de oxígeno).
2. Temperatura de crecimiento.
3. Requerimientos de crecimiento del microorganismo (Agar específico, composición de nutrientes).

Las colonias de bacterias son suficientemente grandes después de 18-24 h de incubación (usualmente a 37°C), pero para algunas bacterias, se requieren más largos tiempos de incubación (de 2 días a varias semanas). Diferentes bacterias tienen diferentes requerimientos de crecimiento y su morfología es la primera característica de fácil identificación en cultivos mixtos.

Los métodos más comúnmente usados para obtener cultivos aislados son la disolución sucesiva y el estriado. En el método de disolución sucesiva se hacen diluciones de aproximadamente 1:1000 de los microorganismos y a partir de esta solución se realiza el estriado sobre las placas de Petri. Después de 24 h de incubación, los microorganismos son

identificados por su morfología y cada uno de ellos se aísla en cajas de Petri con un asa de platino estéril tomando una pequeña cantidad de material biológico y diseminándolo de manera lineal y de lado a lado. Posteriormente, se esteriliza el asa de platino y se repite este procedimiento perpendicularmente al estriado inicial y así sucesivamente hasta cubrir en su totalidad las orillas de la caja de Petri, este último paso puede repetirse las veces necesarias hasta obtenerse así, un cultivo puro de un solo tipo de células en cada una de las placas Petri.

En el presente trabajo, se aislaron diversos microorganismos de las cuatro muestras S1-S4 obtenidos de los terrenos del viejo Fertimex, con el objetivo de examinar la micro biota existente en estos ambientes contaminados, con la capacidad potencial de biodegradar los contaminantes (pesticidas organoclorados-DDT). En el desarrollo de los experimentos, se hicieron medios de cultivos líquidos y sólidos fortificados con DDT grado técnico. Su composición consta de 85.4% de *p,p'*-DDT, 10.8 % de *o,p'*-DDT, 1.28% de *p,p'*-DDD y 2.57% de *p,p'*-DDE.

#### **IV.2.2           Objetivos particulares.**

- ✓ Aislar los microorganismos nativos del sitio industrial contaminado en la ciudad de Salamanca y evaluar las características morfológicas de cada uno de ellos.

#### **IV.2.3           Condiciones experimentales**

##### **IV.2.3.1.   Protocolo de selección y aislamiento de microorganismos.**

Se tomó 10 g de cada una de las muestras sólidas (S1, S2, S2A, S2B, S3 y S4) descritos en la tabla 6, se suspendieron en 90 mL de solución salina 0.9% m/v. Se realizaron tres diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000, posteriormente se tomaron 100 µL de cada una de las suspensiones microbianas de estos suelos y se depositaron en placas Petri con medio LB sólido y PDA enriquecidas con 5 mg/L de DDT técnico. Se diseminaron las muestras haciendo estrías con el asa de platino (estéril) sobre el agar y se incubaron en posición invertida y en condiciones aerobias a 37 °C por 24 h. Las colonias fueron purificadas por medio de varias transferencias sobre medio LB sólido en el caso de las bacterias y PDA

para los hongos, ambos fortificados con 5 mg/L de DDT técnico. Cultivados los microorganismos sobre medios de cultivo sólidos, las células aisladas se multiplican sucesivamente hasta dar un crecimiento visible conocido como colonia, las características morfológicas de estas colonias se describen utilizando nomenclatura armonizada y se usan en la identificación de las especies.

Posteriormente, se inocularon los microorganismos sobre placas Petri conteniendo medio mínimo y LB sólidos fortificados con 5 y 50 mg/L de *p,p'*-DDT, se incubaron con el mismo procedimiento descrito con el fin de evaluar el efecto del pesticida sobre el crecimiento de dichos organismos.

#### IV.2.3.2. Protocolo de preparación de soluciones, medio mínimo, LB y PDA.

1. Se preparó solución de *p,p'*-DDT (estándar sólido de *p,p'*-DDT, grado cualitativo, PolyScience Corp. Niles, IL) en acetona. Se pesó en un vial de vidrio de 25 mL 0.024 g de *p,p'*-DDT y se diluyó en 3.894 g ( $\rho=0.791$  g/mL) de acetona obteniendo una concentración final de 4 916 mg/L.
2. Se preparó solución salina al 0.9 % (w/v): se pesó 3.60 g de cloruro de sodio y se disolvió en 400 mL de agua deionizada.
3. Medio PDA: se pesó 19.5 g de agar dextrosa papa en 500 mL de agua desionizada.
4. Medio LB: se pesó 10 g de peptona biotriptasa, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio y 15 g de agar-agar en 1 L de agua deionizada.
5. Se preparó 250 mL de medio mínimo de cultivo líquido como se muestra en la tabla 18 en agua desionizada, sin fuente de carbono adicional; se agregaron los micronutrientes que se presentan en la tabla 19, las concentraciones finales corresponden a un volumen final de 250 mL. El pH del medio mínimo fue de 7.4.

Tabla 18. Composición de medio mínimo de cultivo.

Nutriente	MM (g/mol)	Masa (g)	Concentración final en el medio [mM]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	141.96	1.500	42.3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	0.750	22.0
NaCl	58.44	0.125	8.55
NH <sub>4</sub> Cl	53.49	0.250	18.7

Tabla 19. Relación de concentraciones de micronutrientes para medio mínimo de cultivo. Cada solución se preparó en un volumen de 45 mL de agua deionizada.

Micronutriente	MM (g/mol)	Masa (g)	Concentración [M]	Concentración final en el medio [mM]
MgSO <sub>4</sub>	246.47	11.1	1.0	1.0
CaCl <sub>2</sub>	110.99	4.99	1.0	0.1
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	249.70	0.11	0.01	1.0e <sup>-5</sup>
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	287.56	0.13	0.01	1.0e <sup>-5</sup>
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	278.01	0.06	5.0e <sup>-3</sup>	1.0e <sup>-3</sup>

Posteriormente, se agregó al medio mínimo de cultivo líquido 3.5 g de agar. Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

#### IV.2.4 Resultados y discusión.

Se cultivaron microorganismos a partir de muestras S1-S4 recolectadas de los terrenos del desaparecido Fertimex. Posterior a la obtención de los microorganismos, cada uno de ellos se estrío en cajas de Petri con medio de cultivo sólido (LB o PDA) para purificar las cepas, realizando replicas sucesivas para asegurar la pureza del microorganismo. Se obtuvieron 25 tipos de bacterias diferentes utilizando medio LB sólido, cuyas morfologías se describen en la tabla 20. Los códigos en la primer columna se refieren al aislado individual obtenido para una muestra “S” dada.

Tabla 20. Características morfológicas de los aislados bacterianos obtenidos de las muestras S1-S4.

Colonia	Muestra	Color	Forma	Elevación	Margen
A1.1	S1	Beige	Puntiforme	Elevada	Entera
A1.2	S1	Beige	Circular	Plana	Entera
A1.4	S1	Beige	Irregular	Plana	Ondulada
A1.5	S1	Amarillenta	Irregular	Irregular	Lobulado
F1.1	S1	Amarillenta	Circular	Plana	Entera
F1.2	S1	Amarillenta	Circular	Elevada	Ondulada
F1.3	S1	Crema	Filamentosa	Umbonada	Entera
H1.4	S1	Beige opaca	Circular	Irregular	Lobulado
H1.6	S1	Beige	Irregular	Plana	Ondulada
A1.7	S1	Beige	Irregular	Umbonada	Ondulada
F3.2	S1	Beige	Circular	Plana	Entera
A2.1	S2	Beige	Irregular	Convexa	Ondulada

A3.1	S2	Naranja	Circular	Plana	Entera
A3.2	S2	Beige	Circular	Convexa	Entera
A4.1	S2	Beige pálido	Irregular	Umbonada	Ondulada
F2.2	S2	Amarillento	Circular	Elevada	Ondulada
F2.4	S2	Beige	Circular	Plana	Entera
F3.3	S2	Beige	Puntiforme	Plana	Entera
F3.5	S2	Beige opaco	Circular	Irregular	Lobulada
F4.1	S2	Beige	Circular	Plana	Entera
A5.1	S3	Crema	Circular	Elevada	Entera
F5.1	S3	Beige	Puntiforme	Plana	Entera
A6.1	S4	Beige	Irregular	Plana	Ondulada
A7.1	S4	Beige	Circular	Plana	Entera
A7.2	S4	Beige	Irregular	Plana	Ondulada

En medio PDA, después de 24 h de crecimiento a 28 °C, se obtuvieron 14 diferentes hongos cuyas morfologías se describen en la tabla 21.

Tabla 21. Características morfológicas de los aislados de hongos obtenidos de las muestras S1-S4.

<b>Colonia</b>	<b>Color</b>	<b>Forma</b>	<b>Superficie</b>	<b>Borde</b>
1.1	Amarilla	Circular	Plano convexa	Redondeado
1.2	Verde	Circular	Convexa	Redondeado
1.2B	Blanco	Circular	Acuminada	Redondeada
2.1	Blanco	Circular	Convexa	Filamentoso
2.3	Verde	Circular	Acuminada	Redondeada
2.4	Blanca	Circular	Elevada	Redondeada
2.4B	Rojo	Irregular	Papilada	Filamentosa
3.2	Verde	Circular	Acuminado	Espiculado
3.3	Blanca	Circular	Planoconvexa	Redondeado
3.4	Verde	Circular	Convexa	Filamentoso
3.5	Verde	Irregular	Papilada	Espiculada
4.1	Verde	Circular	Acuminada	Espiculada
4.2	Café	Irregular	Planoconvexa	Filamentosa
5.1	Amarillo	Irregular	Planoconvexa	Redondeada

Los cultivos puros se resguardaron a -20°C en una solución al 50% de glicerol/agua desionizada (estéril) y se conservaron en tubos eppendorf para posteriores experimentos. A continuación, para examinar la viabilidad de los microorganismos en presencia de DDT, se preparó medio mínimo y LB sólidos fortificados ambos con 5 y 50 mg/L de DDT grado técnico, inoculando por separado cada una de las cepas; todos los cultivos se incubaron por 24 h a 37°C. Este procedimiento se realizó únicamente para las bacterias aisladas, aunque

no se observaron cambios importantes en la morfología de estos organismos, el desarrollo de las colonias fue afectado por la presencia de DDT 50 mg/L, en algunos casos el crecimiento fue totalmente inhibido por DDT a esta concentración. En las tablas 22 y 23 se resumen datos sobre crecimiento de cada uno de los aislados indicando las concentraciones del DDT en el medio.

Tabla 22. Efecto de la concentración del DDT técnico en medio LB sólido sobre el crecimiento de los aislados de bacterias obtenidas de muestras S1-S4 (A) formación de colonias, (B) disminución de formación de colonias, (C) poca formación de colonias, (X) sin colonias.

Aislado de bacterias	Medio LB sólido		
	Concentraciones de DDT en medio		
	Control (0 mg/L)	5 mg/L	50 mg/L
A1.1	A	A	B
A1.2	A	A	A
A1.4	A	B	B
A1.5	A	C	C
A1.7	A	C	C
A2.1	A	A	B
A3.1	A	A	A
A3.2	A	A	A
A4.1	A	B	C
A5.1	A	C	C
A6.1	A	B	C
A7.1	A	A	A
A7.2	A	B	B
F1.1	A	B	A
F1.2	A	B	C
F1.3	A	A	A
F2.2	A	A	A
F2.4	A	B	A
F3.2	A	B	A
F3.3	A	A	A
F3.5	A	A	B
F4.1	A	A	A
F5.1	A	A	A
H1.4	A	A	B
H1.6	A	B	B

Tabla 23. Efecto de la concentración de DDT técnico en medio mínimo sólido sobre el crecimiento de los aislados de bacterias obtenidos de muestras S1-S4.(A) formación de colonias, (B) disminución de formación de colonias, (C) poca formación de colonias, (X) sin colonias.

Identificación	Medio mínimo sólido		
	Concentraciones de DDT en medio		
	Control (0 mg/L)	5 mg/L	50 mg/L
A1.1	C	C	C
A1.2	B	C	X
A1.4	C	C	X
A1.5	B	C	X
A1.7	B	B	C
A2.1	C	X	X
A3.1	A	A	B
A3.2	A	B	B
A4.1	B	C	C
A5.1	C	X	X
A6.1	C	X	X
A7.1	C	X	X
A7.2	B	B	X
F1.1	C	C	C
F1.2	A	B	C
F1.3	B	B	C
F2.2	A	B	C
F2.4	C	C	C
F3.2	C	C	C
F3.3	C	X	X
F3.5	B	C	X
F4.1	C	X	X
F5.1	C	X	X
H1.4	X	X	X
H1.6	X	X	X

Posteriormente, se tomaron los microorganismos que crecieron tanto en el medio control (sin DDT agregado) como en medios fortificados (5 y 50 mg/L de DDT técnico) para ambos medios (mínimo y LB). Basándose en una comparación visual entre los cultivos control y los cultivos expuestos, no se observó inhibición de crecimiento a bajas concentraciones de DDT (5 mg/L) para ninguna cepa. En presencia de 50 mg/L de DDT, el número de colonias claramente disminuyeron para aislados A1.7 (S1), A4.1 (S2), A5.1 (S3), A1.5 (S1) y A6.1 (S4).



#### **IV.2.5 Conclusión.**

Se aislaron microorganismos nativos de suelos obtenidos de los terrenos del antiguo Fertimex, Salamanca. Se obtuvieron alrededor de 25 aislados de bacterias, 14 aislados de hongos (entre los cuales por su morfología probablemente se encuentra una levadura). Todos los aislados fueron resguardados a -20°C para su posterior identificación y uso como potenciales biodegradadores del DDT.

Si bien, los datos presentados en las tablas 22 y 23 indican diferente efecto del DDT sobre los microorganismos aislados, algunos de los aislados podrían ser considerados como posibles degradadoras del pesticida. El siguiente paso en el trabajo ha sido lograr la identificación de organismos mediante MALDI-TOF MS empleando el software Biotyper. En el apartado IV.3 se describen los protocolos y resultados de la identificación de los aislados obtenidos.

### IV.3 Identificación de microorganismos por MALDI-TOF-MS Biotyper.

#### IV.3.1 Introducción.

Para la identificación de los microorganismos aislados y caracterizados morfológicamente, se utilizó el equipo MALDI-TOF MS con el software Biotyper Compass 4.1, que cuenta con la base datos Biotyper™ Reference database (versión 3.3.1.0) de Bruker Daltonics. Esta base de datos contiene 9 045 espectros principales los cuales se dividen en 3 secciones Archaea, Bacteria y Eukaryota, además también se cuenta con una biblioteca de hongos filamentosos, en la tabla 24 se explica el contenido específico de los microorganismos presentes en ambas bibliotecas.

Tabla 24. Descripción de espectros de masas contenidos en las bases de datos y correspondencia a tipo de microorganismo.

<b>Biotyper™ Reference database (versión 3.3.1.0)</b>	No. de espectros
<b>Archaea</b>	
Euryarchaeota	7
<b>Bacteria</b>	
Actinobacteria	1606
Bacteroidetes	657
Chlamydiae	1
Deinococcus	12
Fimicutes	2536
Fusobacteria	81
Proteobacteria	2680
Spirochaetes	14
Unclassified	1
<b>Eukaryota</b>	
Fungi/Metazoa group	1449
Viridiplantae	1
<b>Bruker Library</b>	
Hongos filamentosos	364

Biotyper™ realiza una evaluación comparativa de espectros experimentales con los incluidos en bases de datos, lo que incluye un cálculo de las puntuaciones de concordancia. Cabe mencionar que los espectros en las bases de datos se denominan “principales” debido

a que fueron generados a partir de al menos 20 espectros individuales condensados y procesados bajo ciertos criterios estadísticos de calidad. También es de notar que las librerías utilizadas en este trabajo se elaboraron principalmente para el diagnóstico clínico por lo que los espectros principales corresponden en gran medida a especies infecciosas bacterianas aisladas de muestras clínicas. Falta de bibliotecas espectrales para organismos habitantes de diferentes compartimientos del medio ambiente es una importante limitación en las aplicaciones del MALDI-TOF MS en estudios ambientales. Como una solución, Biotyper ofrece la opción de elaborar bibliotecas con espectros principales para organismos analizados en el laboratorio. Estas bases de datos “caseras” deben ser creadas con altos estándares de calidad en la generación de espectros principales, el requisito primordial para asegurar una buena fidelidad de identificación.

Es importante señalar que los intervalos de valor de puntuación definidos en MALDI Biotyper corresponden a la probabilidad de que el microorganismo desconocido coincida con el incluido en la base de datos. Es prioritario que toda la información pertinente disponible para la muestra deba ser considerada en el proceso de evaluación e interpretación junto con el resultado de MALDI Biotyper.

Recientemente, MALDI-TOF MS se ha establecido como un método de referencia en la identificación principalmente de bacterias con interés clínico en forma rutinaria. Ha logrado ser una metodología robusta y confiable para determinar de forma específica, microorganismos a partir de su espectro de masas. En el caso de hongos y levaduras la técnica también tiene alto potencial, sin embargo, en esta área la disponibilidad de bases de datos es limitada. La generación de las bibliotecas espectrales para este tipo de organismos no es trivial ya que, estos pueden modificar su morfología y fisiología debido a cambios de diversos factores como humedad, pH, temperatura y sobre todo, factores exógenos como presencia de contaminantes.

En este trabajo, se obtuvieron catorce aislados de hongos filamentosos de sitios S1-S4. Se intentó su identificación por MALDI-TOF MS, sin embargo, el factor de comparación entre los hongos aislados y la biblioteca precargada arrojó una puntuación muy por debajo de 1.7, dando resultados ambiguos. Para lograr la identificación, una parte de este proyecto fue enfocada en la construcción de una nueva biblioteca de referencia para hongos aislados de suelos contaminados con DDT combinando el aislamiento selectivo (purificación de las

cepas) con MALDI-TOF MS. Cabe mencionar que es de vital importancia la caracterización biológica de las cepas, es decir, se necesita la secuenciación genómica para conocer el tipo de microorganismo y poder asignar su género y especie al espectro principal generado en la biblioteca. Sin embargo, en este trabajo solo abordaremos el uso de protocolos de extracción de proteínas y la creación de los espectros principales mediante el software Biotyper.

En el caso de los aislados de bacterias, la identificación se llevó a cabo por MALDI-TOFMS utilizando la base de datos Biotyper™ Reference database (versión 3.3.1.0).

#### **IV.3.2 Objetivo particular.**

- ✓ Identificar microorganismos aislados de muestras S1-S4 utilizando como herramienta analítica MALDI-TOF MS Biotyper.
- ✓ Desarrollar una nueva biblioteca espectral (MSP's) para microorganismos aislados en este trabajo pero no incluidos en las bases de datos disponibles (hongos).

#### **IV.3.3 Condiciones experimentales.**

##### IV.3.3.1. Soluciones preparadas.

*Solución de matriz química HCCA:* Se mezcló en un frasco de 25 mL, 12.5 ml de ACN (grado HPLC), 11.9 mL de agua desionizada y 0.6 ml de ácido trifluoroacético, se tomaron 250 µL de esta solución, se agregaron 2.5 mg de HCCA y la mezcla se agitó en vórtex a temperatura ambiente hasta la disolución total de los cristales contenidos en el tubo. Concentración final de HCCA: 10 mg/mL.

##### IV.3.3.2. Protocolos para identificación de microorganismos por MALDI-TOF MS con sistema Biotyper™.

###### IV.3.3.2.1. Método de transferencia directa (bacterias)<sup>[107]</sup>.

Se tomó una colonia única con el palillo de madera y se diseminó sobre un pocillo de la placa MALDI de acero inoxidable, se realizó una dilución de la colonia sobrante en el

palillo sobre el pocillo posterior al primero. Entre menor sea la cantidad diseminada en el pocillo por transferencia directa será mejor el análisis. Se cubrió el material biológico con 1  $\mu$ L de solución de HCCA y se dejó secar a temperatura ambiente. La mezcla de material biológico y matriz debe tener una apariencia homogénea evitando la formación de “costras” de matriz provocadas por exceso de bacteria. En la figura 20, se muestra como la formación correcta de los cristales puede apreciarse desde el FlexControl utilizando la cámara. El análisis se realizó exclusivamente sobre cultivos frescos (cultivo no mayor a 24 h).

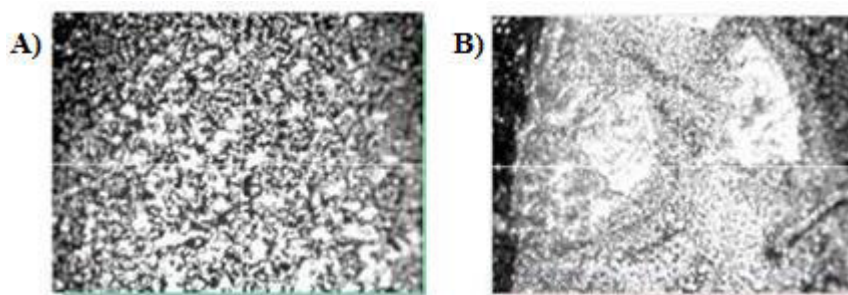


Figura 20. Fotos de los pocillos con co-cristales de muestra y HCCA. A) Co-cristalización correcta. B) Ejemplo de una mala aplicación de matriz producto de un contenido excesivo de material biológico.

Las condiciones de medio de cultivo y crecimiento prácticamente no afectan la identificación. Generalmente los espectros de masas son reproducibles sin importar medio o condiciones de crecimiento. Sin embargo, en este trabajo se observaron interferencias de los medios de cultivo principalmente en los hongos filamentosos.

#### IV.3.3.2.2. Lisis celular con ácido fórmico <sup>[108]</sup>.

Para la extracción con ácido fórmico (lisis celular), se cultivaron las colonias en 1 mL de medio LB líquido por 24 h, el contenido de material biológico en el tubo eppendorf debe ser entre 5 – 10 mg de cultivo puro, se centrifugó por 2 min a 13 000 rpm y se retiró el medio LB. Se siguió el siguiente protocolo:

1. Se introdujo 300  $\mu$ L de agua desionizada al tubo eppendorf con material biológico.
2. Se mezcló en vórtex por 1 min.
3. Se adicionó 900  $\mu$ L de etanol y se mezcló en vórtex.

4. Se centrifugó a 10 000 g por 2 min, se decantó el sobrenadante, y nuevamente se centrifugó y retiró el sobrenadante (con precaución se retira el sobrenadante para evitar pérdida de material biológico).
5. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente por 2 o 3 minutos.
6. Se adicionó 20  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico al 70% (v/v) y se mezcló en vórtex. El volumen adicionado de ácido fórmico debe ser conforme a la masa de material biológico contenida. En la tabla 25 se muestra una relación entre volumen de ácido fórmico y masa de material biológico.

Tabla 25. Relación entre volumen de ácido fórmico y masa de material biológico – condiciones recomendadas en manual de equipo<sup>[109]</sup>.

	<b><math>\leq 5</math> mg de material biológico</b>	<b><math>&gt;5</math> mg de material biológico</b>
Ácido fórmico 70%	1-5 $\mu\text{L}$	10-20 $\mu\text{L}$
ACN	1-5 $\mu\text{L}$	10-20 $\mu\text{L}$

7. Se adicionó el mismo volumen de ACN comparado con el punto 6. Se centrifugó por 2 min a 10 000 g. Si no se formó adecuadamente la pastilla en el fondo, se repitió la centrifugación.
8. Se pipeteó 1  $\mu\text{L}$  de sobrenadante sobre la placa MALDI de acero pulido y se dejó secar a temperatura ambiente.
9. Se cubrió el material biológico con 1  $\mu\text{L}$  de solución de HCCA y se dejó secar a temperatura ambiente.

#### IV.3.3.2.3. Lisis celular con ácido fórmico (hongos filamentosos)<sup>[110,111]</sup>.

Los hongos filamentosos encontrados en los suelos Salmantinos se cultivaron en 1 mL de medio líquido PDA<sup>[112]</sup> durante 16 h. Asegurando que el hongo no esporule debido a que un alto contenido de esporas en el material biológico impide la correcta obtención del espectro de masas de sus proteínas ribosomales. Obtenido el material biológico, este se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó por 10 minutos a 10 000 g, se decantó el medio PDA líquido y se siguió el siguiente protocolo:

1. Se adicionó 1 mL de agua deionizada a la pastilla y se mezcló en vórtex. (Si la pastilla no se forma correctamente por la naturaleza del micelio, se repite el paso 1 cuidando de no perder material biológico).
2. Se centrifugó a 10 000 g por 2 minutos.
3. Se removió el sobrenadante y se repitió nuevamente el paso 1 y 2.
4. Se adicionó 300  $\mu$ L de agua deionizada y 900  $\mu$ L de etanol, se mezcló en vórtex.
5. Se centrifugó por 2 minutos a 10 000 g.
6. Se retiró el sobrenadante con micropipeta con la precaución de no perder material biológico. Se centrifugó por 1 minuto para retirar el etanol restante, al ser necesario.
7. Se secó la pastilla en speedVac a 30 °C de 5 – 10 minutos.
8. Se adicionó ácido fórmico al 70% (v/v) proporcional al tamaño de la pastilla. Si esta es pequeña, se adicionan de 10-20  $\mu$ L, si es una pastilla grande, requiere 100  $\mu$ L de ácido fórmico.
9. Se adicionó la misma cantidad de ACN descrita en el punto 8.
10. Se centrifugó por 2 minutos a 10 000 g.
11. Se pipeteó 1  $\mu$ L de sobrenadante sobre la placa de acero pulido y se secó a temperatura ambiente.
12. Se cubrió con 1  $\mu$ L de solución de HCCA, y se secó a temperatura ambiente.

El análisis por MALDI-TOF se realizó el mismo día en que se preparó la placa de acero pulido cargada con material biológico.

#### IV.3.3.2.4. Lisis celular con perlas de circonio y ácido fórmico para hongos filamentosos.

Se cultivaron cada una de las cepas de hongos en 10 mL de medio líquido Sabouraud durante 24 a 42 h. El hongo no debe esporular. Obtenido el material biológico se filtró y se lavó tres veces con abundante agua destilada utilizando magitel como material filtrante con el objetivo de eliminar cualquier residuo de medio de crecimiento. Se eliminó el exceso de humedad con magitel y se siguió el siguiente protocolo:

1. Se tomó aproximadamente 0.1 g de micelio y se colocó en tubos de 2 mL con perlas de circonio<sup>[113]</sup> de 1.0 mm de diámetro.
2. Se agregó 0.5 mL de ácido fórmico al 70% y se homogenizó por 1 min en 2 segmentos de 30 s empleando el homogeneizador Bead Bug.
3. Se recuperó el micelio licuado en un eppendorf de 1.5 mL y se lavaron las perlas con 0.5 mL de ACN.
4. Se recuperó el ACN juntándolo con la fracción de ácido fórmico.
5. Se agregó 16 µL de PMSF 63 mM.
6. Se centrifugó por 15 min a 8 000 g.
7. Se pipeteó 1 µL de sobrenadante sobre la placa de acero pulido y se secó a temperatura ambiente.
8. Se cubrió con 1 µL de solución de HCCA el material biológico y se secó a temperatura ambiente.

#### IV.3.3.2.5. Calibración de espectrómetro de masas MALDI-TOF para el uso de Biotyper<sup>[114]</sup>.

La calibración se llevó a cabo utilizando el estándar de test bacteriano BTS. Este proceso consistió en la calibración de  $m/z$  (tabla 26), el ajuste de intensidad de láser y del error de masa. El adecuado rendimiento del sistema queda confirmado cuando la identificación de *E. coli* (BTS) es satisfactoria de acuerdo con los criterios preestablecidos, estos se muestran en la tabla 26.

Como resultado de la calibración, la frecuencia del láser se ajustó a 500 Hz; voltaje de primera fuente de ionización: 19.5 kV; voltaje de segunda fuente de ionización: 18.0 kV; voltaje de lente: 70 kV. La calibración debe ser preferentemente cuadrática y ninguna masa mostrada en la tabla 26 debe descartarse ya sea por salir fuera de rango o por ausencia de la señal. Si se llega a dar el caso, se debe preparar un nuevo BTS.



Tabla 26. Valores  $m/z$  utilizados para calibración de MALDI-TOF MS con Biotyper utilizando el estándar BTS, aplicando un límite de tolerancia de masa de  $\pm 300$  ppm.

Proteína	$m/z$ de iones calibrados (promedio en Da)	Rango de tolerancia de $\pm 300$ ppm (Da)
RL29 [M+2H] <sup>2+</sup>	3637.8	3636.7 - 3638.8
RS32 [M+H] <sup>+</sup>	5096.8	5095.3 - 5098.3
RS34 [M+H] <sup>+</sup>	5381.4	5379.8 - 5383.0
RS33meth [M+H] <sup>+</sup>	6255.4	6253.5 - 6257.3
RL29 [M+H] <sup>+</sup>	7274.5	7272.3 - 7276.7
RS19 [M+H] <sup>+</sup>	10300.1	10297.0 - 10303.2
RNAse A [M+H] <sup>+</sup>	13683.2	13679.1 - 13687.3
Myoglobin [M+H] <sup>+</sup>	16952.3	16947.2 - 16957.4

#### IV.3.3.2.6. Protocolo de generación de nueva biblioteca de espectros de masas de hongos filamentosos expuestos a DDT<sup>[109,115,116]</sup>.

Las condiciones de cultivo dependen del microorganismo a tratar, sin embargo, es de suma importancia que los cultivos se mantengan puros y se desarrollen bajo las mismas condiciones de tiempo de crecimiento (24 h), temperatura, medio de crecimiento, humedad, etc. Solo cultivos frescos se emplean para la generación de espectros principales (MSP's).

1. La extracción de las muestras se realizó con los protocolos IV.3.2.2.3 y IV.3.2.2.4.
2. Se preparó solución de BTS y se dividió en 6 porciones. Una vez descongelado, no se recomienda congelar y reusar. La matriz HCCA se preparó en volúmenes precisos por día de análisis. El BTS se cargó por duplicado en la placa de acero pulido.
3. Por cada extracción de cepa, se cargaron de 8 a 10 pocillos con 1  $\mu$ L de sobrenadante. De cada pocillo se deben obtener como mínimo 24 espectros.
4. En el instrumento, se empleó el método "MBT\_AutoX": La frecuencia de laser se estableció a 2000 Hz, el voltaje de las fuentes de iones 1 y 2 fue 19.6 kV y 18.3 kV, respectivamente. El voltaje de los lentes se ajustó a 6.65 kV. El rango de masas fue de 2000 a 20000  $m/z$ , los espectros de masas fueron obtenidos en modo lineal y con una ionización positiva. La calibración externa de masas se realizó con el estándar BTS (Bruker Daltonics) con un promedio de tolerancia de masa de alrededor de 300

ppm. Es importante nombrar a detalle la muestra con la cual se va a crear un espectro de referencia. El procedimiento es completamente automatizado.

5. Obtenido el paquete de datos de los espectros, se procesaron mediante software flexAnalysis 3.4, aplicando el algoritmo Centroides para detección de picos, los criterios para control de calidad aplicados fueron los siguientes: un mínimo de 400 Da como resolución de pico base, 5 como límite mínimo para relación señal-ruido de pico base, intensidad relativa mínima de 5%. A cada espectro se ajustó línea base y se aplicó suavizado (SavitzkyGolay).
6. Posteriormente, se sobrepusieron los espectros y se revisó pico por pico la coincidencia de  $m/z$  que no debió superar  $\pm 500$  ppm. Se eliminaron aquellos espectros que presentaban picos fantasmas o ausencia de picos, con errores de masa mayores a 500 ppm o con cualquier anomalía. En la figura 21 se muestra un ejemplo de espectros anómalos.
7. Se eliminaron espectros anómalos. Se creó un nuevo archivo con los espectros seleccionados para la creación del espectro principal.
8. Este nuevo archivo se abrió en el software MALDI Biotyper Compass Explorer (versión 4.1.1.4). Se necesita un mínimo de 20 espectros de buena calidad (criterios presentados en puntos anteriores) para crear un espectro principal. Automáticamente, el software genera una lista de picos a partir del espectro completo y extrae aquellos típicos picos que se presentan en un cierto número de espectros de una especie
9. Se seleccionaron todos los espectros y, mediante activar el menú con clic derecho, se eligió la opción “Create MSP” asignando al nuevo espectro principal el nombre.
10. El nuevo espectro principal aparece en la ventana del árbol taxonómico con la leyenda “unassigned”.

Siguiendo las recomendaciones del fabricante (Bruker Daltonics), una de las muestras se utilizó para “control de calidad”. En concreto, se escogió aleatoriamente un microorganismo obteniéndose su extracto y espectro principal el mismo día de la creación del archivo y, para fines comparativos, en días posteriores siempre junto con otros microorganismos.

El criterio empleado en la comparación de esta muestra entre días debe ser igual o mayor a 2.7, este valor indica que hay una frecuencia de picos mayor al 75%, de no ser el caso, se debe repetir el procedimiento de extracción para todos microorganismos analizados este día. Además, se comparó el “control de calidad” con la biblioteca entera precargada, este solo debe coincidir con la entrada de espectro principal precargado con un facto de comparación mayor a 2.7.

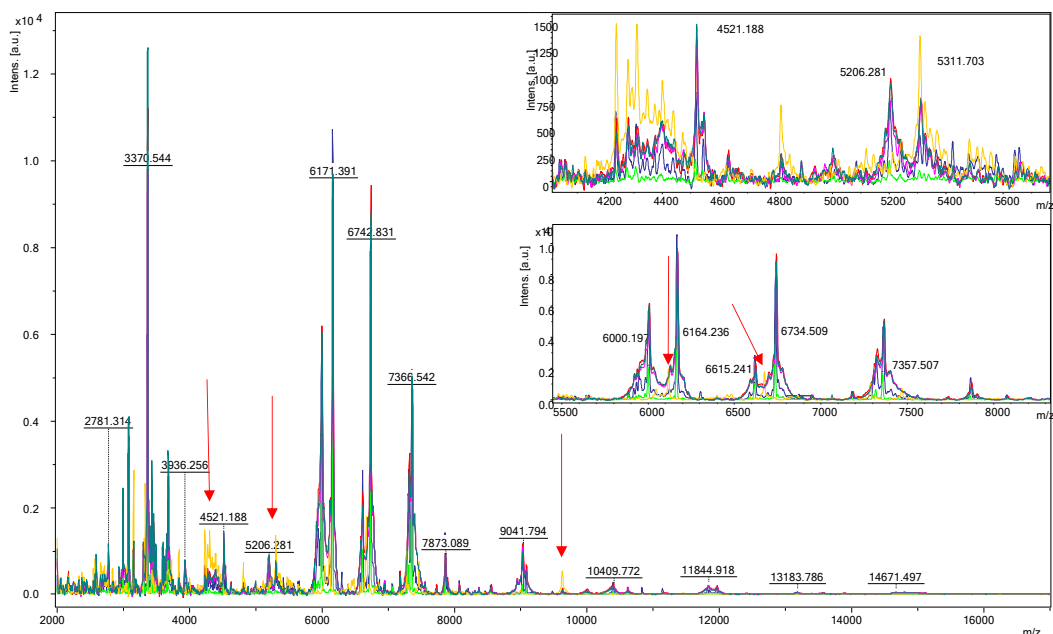


Figura 21. Espectros de masas procesados (eliminación de línea base y suavizado) para la creación de un espectro principal en MALDI-Biotyper. Las flechas rojas señalan picos anómalos (espectro amarillo) que no corresponden con los picos principales, por lo que el espectro amarillo no es adecuado para formar al espectro principal (se elimina).

#### IV.3.4 Resultados y discusión.

##### IV.3.4.1 Análisis de hongos filamentosos: creación de una nueva base de datos a partir de los hongos aislados de suelos contaminados en Salamanca, Gto.

Se analizaron 14 aislados de hongos filamentosos presentadas en la tabla 21 del presente trabajo. Cada aislado se transfirió y creció en dos medios sólidos ricos distintos, PDA y Sabouraud, después de 24 horas de crecimiento, se llevó a cabo el análisis por MALDI-

TOF MS. Se siguió el método con ácido fórmico convencional descrito en el punto IV.3.2.2.3 para la obtención del perfil de proteínas ribosomales de cada uno de los hongos pero, utilizando biblioteca precargada en el software Biotyper, para ninguno de ellos se obtuvo el valor mayor a 1.7, por lo que no se logró la identificación.

Debido a que la biblioteca espectral disponible carece de información de cepas medioambientales, se decidió crear una base de datos propia con espectros principales de los hongos aislados del sitio contaminado con pesticidas organoclorados provenientes de Salamanca, Gto.

Para la creación de la base de datos de espectros principales se siguió el protocolo descrito en el punto IV.3.2.2.6 y se utilizó el método de extracción convencional descrito por el fabricante (IV.3.2.2.3). Adicionalmente, se propuso un protocolo basado en el uso de perlas de circonio esperando que este favorezca la liberación de las proteínas del micelio descrito en el punto IV.3.2.2.4. Esta nueva metodología de extracción es una propuesta para aquellos hongos filamentosos difíciles de procesar con el método convencional.

Respecto a la obtención de espectros principales, en la figura 22 se muestran fotografías de los cultivos 14 aislados y sus respectivos espectros obtenidos, de los cuales se crearon espectros principales mismos que fueron cargados para formar la nueva base de datos. Una parte integral de este proceso incluye el análisis por el método de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés), en el cual se obtiene un dendograma.

Dicho dendograma organiza los aislados en base a las similitudes entre sus espectros, mostrando el grado de concordancia entre los microorganismos y presentando el nivel de distancia con base en criterios estadísticos. El árbol de distancias entre espectros de diferentes hongos permite establecer una relación entre el género y/o familia al que pertenece el microorganismo.

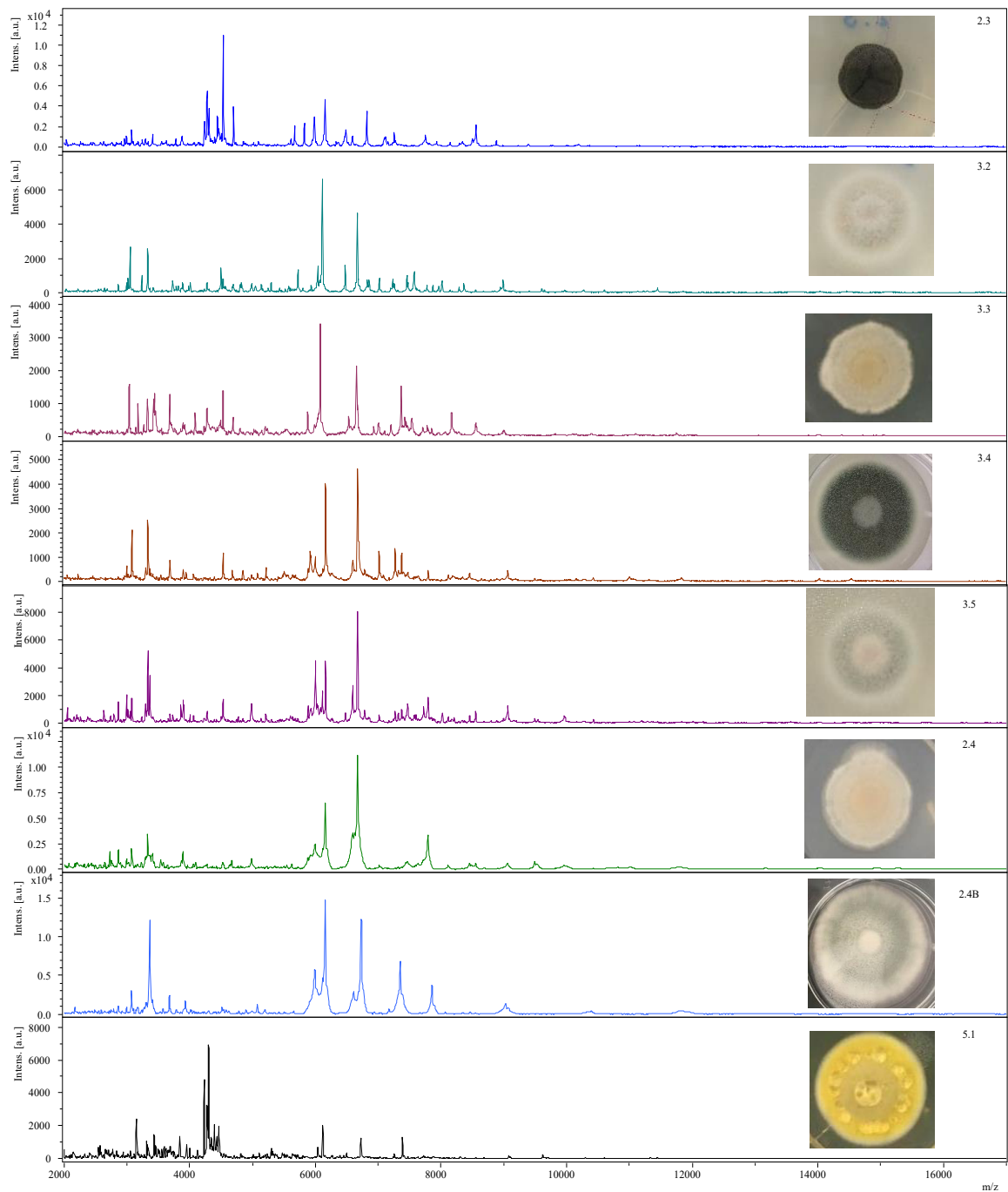
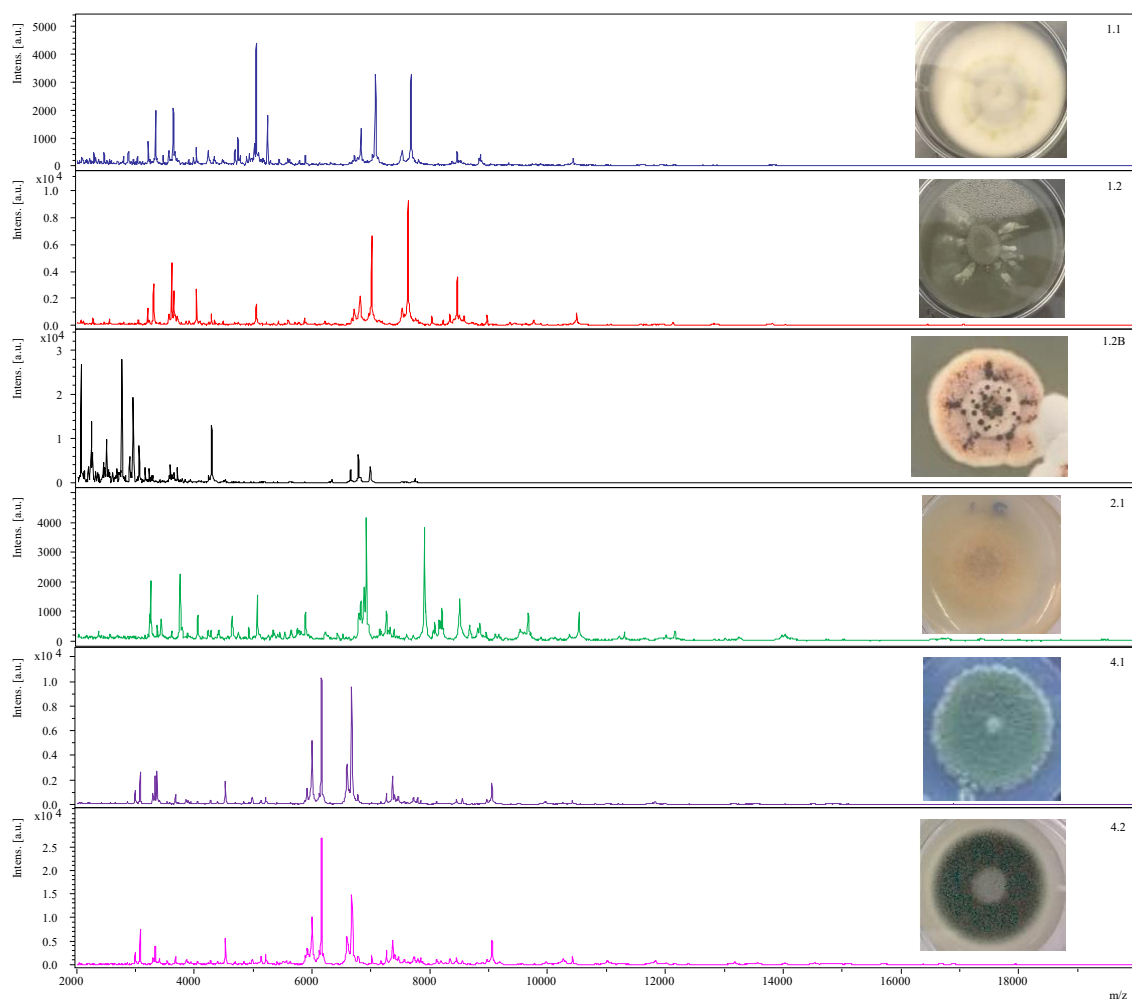


Figura 22. Espectros principales generados para aislados de hongos del sitio contaminado en Salamanca (panel izquierdo) junto con fotografías de los respectivos cultivos (panel derecho).



Continuación de figura 22. Espectros principales generados para aislados de hongos del sitio contaminado en Salamanca (panel izquierdo) junto con fotografías de los respectivos cultivos (panel derecho).

En la figura 23, se muestra el dendograma obtenido a partir de los espectros de la figura 22.

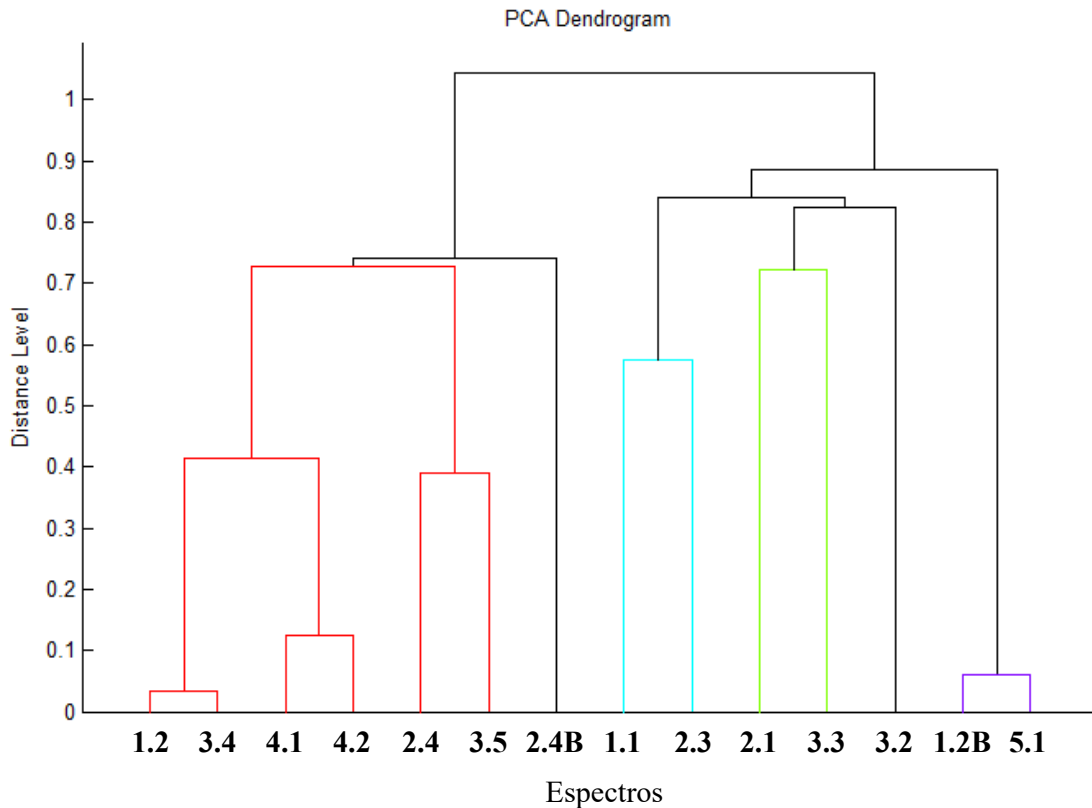


Figura 23. Dendrograma del análisis multivariante por método de componentes principales (PCA), obtenidos a partir de los espectros principales de 14 colonias de hongos filamentosos aislados de los sitios S1-S4.

En el dendrograma se aprecia que los aislados 1.2 y 3.4 tienen un nivel de distancia menor a 0.1, lo que indica similitud de sus espectros además de similar morfología (figura 23, tabla 21) y ambos probablemente pertenecen al mismo género. De la misma manera, los hongos 1.2B y 5.1 poseen entre sí, un nivel de distancia menor a 0.1, sin embargo, su morfología es completamente diferente entre sí, aunque cabe resaltar que ambos excretan líquidos por encima de sus esporas y, eventualmente, pueda ser una característica propia del género al que pertenecen. Además de estos dos pares de aislados, de los cuales cada par podría pertenecer a un género de hongos, para el resto de los espectros, la distancia entre ellos era menor de 0.4. Estos resultados sugieren que los aislados obtenidos del sitio contaminado pertenecen al menos a diferentes géneros. Como ya se mencionó antes, la asignación de los aislados a especies fúngicas específicas requiere del análisis de su DNA y que esta parte está fuera del enfoque de este trabajo de tesis. Por otro lado, en el desarrollo de esta parte

del trabajo se obtuvieron algunos resultados relevantes. La compañía Bruker reporta que los espectros principales no son afectados por cambios de medio de crecimiento ya que se trabaja en un rango de masas entre 3 000 y 17 000 Da, y que un poco de medio de cultivo adherido a las colonias no afecta sobre el patrón de picos. En este trabajo, sin embargo, se observaron interferencias provocadas por medio PDB, el cual es un medio altamente nutritivo y ciertamente muy adecuado para el cultivo de hongos y levaduras. Dichas interferencias, se muestran en la figura 24, donde el espectro de arriba corresponde al cultivo del hongo 1.2B en medio PDB y el espectro de abajo fue adquirido para el mismo medio sin micelio presente (en ambos casos se siguió el protocolo de extracción/deposición recomendado por el fabricante).

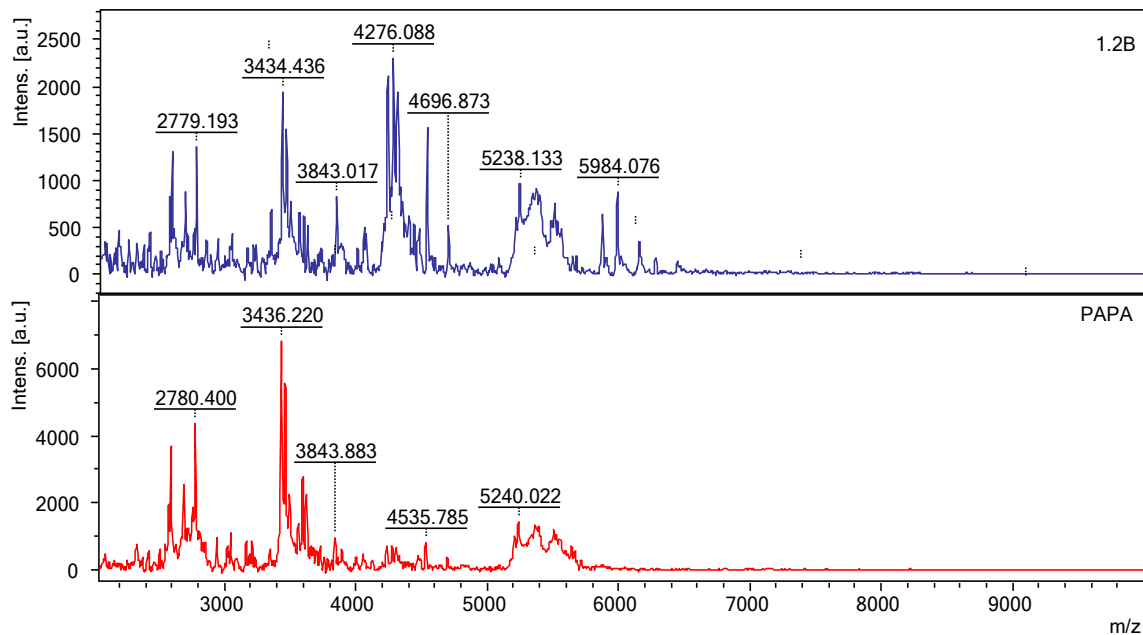


Figura 24. Espectros MALDI-TOF MS adquiridos para micelio de hongo 1.2B (arriba) y para medio PDB (abajo). El procedimiento de extracción fue el IV.3.2.2.3 para ambos.

Los errores en la identificación provocados por interferencias podrían ser, al menos parcialmente eliminados, mediante una filtración más efectiva del medio antes de usarse y mediante un exhaustivo lavado del micelio antes de la extracción; sin embargo, en este trabajo se decidió cambiar el medio de crecimiento al medio Sabouraud. Este medio es un producto comercial, lo que asegura su composición constante en todos los cultivos además



de un buen grado de pureza. Para la mayoría de los aislados, se observó un buen crecimiento de micelio en este medio y los espectros no presentaban interferencias; sin embargo, para el aislado 2.3, el crecimiento fue lento tardando en ocasiones más de 48 h y se observó la esporulación *in situ*; en este caso específico, se utilizó el medio PDB preparado a partir de papas hervidas, al cual se hace referencia en este trabajo como medio “PDB casero”. Trabajando con el aislado 2.3 como “problemático” al utilizar el protocolo descrito en la sesión IV.3.2.2.3, se propuso un protocolo basado en lisis celular con perlas de circonio y ácido fórmico, descrito en la sección IV.3.2.2.4. Este protocolo permitió mejorar considerablemente la calidad de espectros en términos de una mayor sensibilidad (mayor cantidad de señales de proteínas) y un menor ruido, así como obtener extractos y generar espectros con buena repetibilidad. En las figuras 25 y 26 se presentan espectros obtenidos para el aislado 2.3 y para el aislado 1.1, respectivamente. En estas dos figuras, el espectro de arriba se obtuvo utilizando el protocolo estándar de Bruker (sección IV.3.2.2.3) y el espectro de abajo corresponde al procedimiento propuesto (sección IV.3.2.2.4).

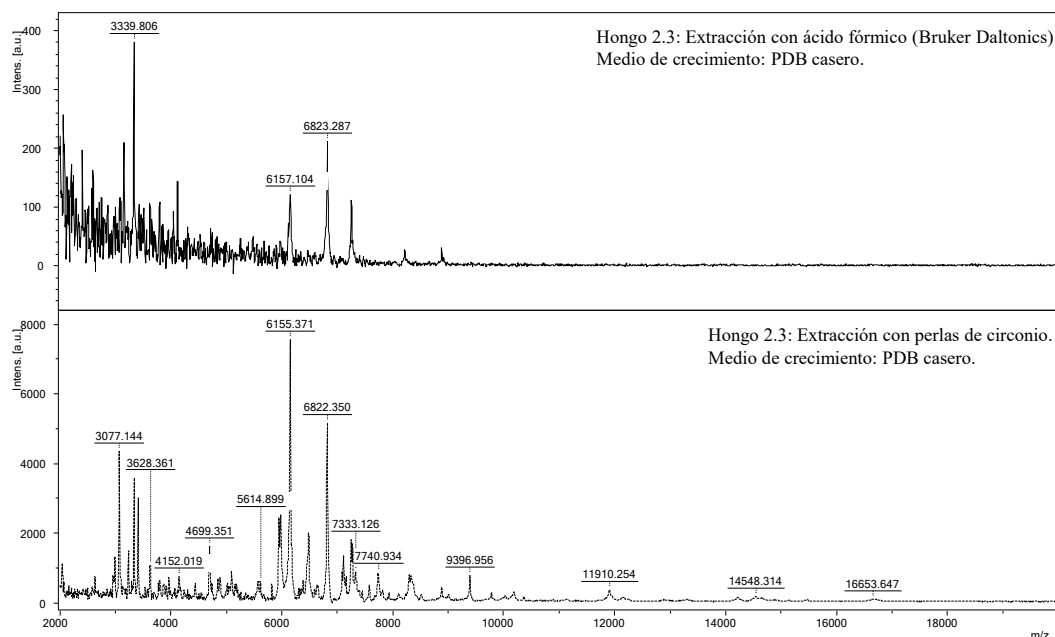


Figura 25. Espectros MALDI-TOF MS obtenidos para extractos del aislado 2.3, que fueron obtenidos mediante el protocolo estándar (arriba) y el procedimiento basado en lisis celular con perlas de circonio y ácido fórmico.

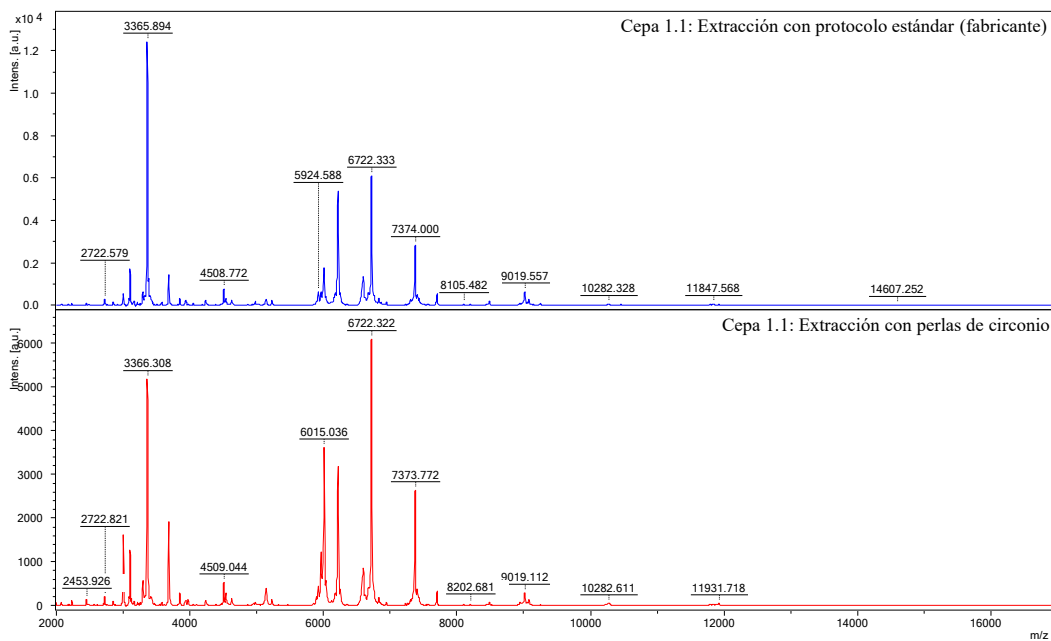


Figura 26. Espectros MALDI-TOF MS obtenidos para extractos de aislados 1.1, que fueron obtenidos mediante el protocolo estándar (arriba) y el procedimiento basado en lisis celular con perlas de circonio y ácido fórmico (abajo).

#### IV.3.4.2 Identificación de bacterias.

Gracias a las bibliotecas espectrales disponibles para este trabajo, la identificación de las bacterias era menos problemática respecto a los aislados fúngicos. A partir de las colonias obtenidas de los suelos S1-S4 (tabla 20), se transfirieron los inóculos bacterianos a nuevas cajas Petri con medio LB sólido y después de 24 horas de crecimiento, se llevó a cabo el análisis por MALDI-TOF MS. Las células se transfirieron directamente a la placa de acero inoxidable y, si no se obtuvo la identificación de la bacteria, se llevó a cabo lisis celular con el ácido fórmico. Una vez calibrado el sistema, se obtuvieron los espectros de masas utilizando el programa de adquisición de espectros para Biotyper.

Para asignación de microorganismos, se tomaron en cuenta todos aquellos aislados cuyo score fuese  $>1.7$ . Entre las 25 muestras, para cinco aislados se obtuvieron resultados con score  $>1.7$  pero  $<2.0$ , por lo que estas cepas fueron asignadas a respectivo género (*Bacillus* o *Pseudomonas*). Para el resto de las colonias (20), las bacterias fueron identificadas a nivel de especies ya que en comparación de sus espectros con los incluidos en la base de datos de obtuvieron scores  $>2$ . En la tabla 27 se muestran los resultados de la identificación de

microorganismos provenientes de cuatro sitios S1-S4. Para cada suelo, se indica la colonia (de acuerdo con la tabla 20), la especie o género asignados y, entre paréntesis, el score que arrojó el programa Biotyper.

Tabla 27. Especies y/o géneros de bacterias identificadas en colonias aisladas de cuatro sitios (S1-S4) usando el sistema MALDI-TOF MS y programa Biotyper con la base de datos MALDI Biotyper. (Los códigos de colonias de acuerdo con la tabla 20, entre paréntesis se indica la puntuación de concordancia).

Muestra	Aislado	Género/especie	Puntuación
S2	A2.1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2.64
S1	F1.1	<i>Bacillus spp.</i>	1.97
S2	F2.4	<i>Bacillus spp.</i>	1.85
S1	F3.2	<i>Bacillus mycoides</i>	2.03
S1	A1.2	<i>Bacillus cereus</i>	2.33
S2	F4.1	<i>Bacillus cereus</i>	2.28
S4	A7.1	<i>Bacillus cereus</i>	2.22
S2	A3.2	<i>Bacillus megaterium</i>	2.34
S1	F1.2	<i>Bacillus marisflavi</i>	2.26
S2	F2.2	<i>Bacillus marisflavi</i>	2.08
S1	H1.4	<i>Bacillus pumilus</i>	2.12
S2	F3.5	<i>Bacillus pumilus</i>	2.07
S1	A1.7	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.40
S2	A4.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	2.31
S1	A1.1	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	2.09
S2	F3.3	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2.25
S3	F5.1	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2.20
S2	A3.1	<i>Serratia fonticola</i>	2.38
S3	A5.1	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2.14
S1	A1.5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.07
S1	A1.4	<i>Pseudomonas spp.</i>	1.92
S4	A6.1	<i>Pseudomonas spp.</i>	1.79
S1	F1.3	<i>Pseudomonas balearica</i>	2.48

S1	H1.6	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	2.24
S4	A7.2	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	2.04

Acorde con los protocolos de Bruker (instrucciones para el uso de MALDI0 Biotarget 48, 2011), las bacterias intactas o lisados de células pueden ser depositados sobre la placa y cubiertas con matriz química adecuada; en este trabajo, ambos procedimientos fueron probados obteniendo mejores resultados con extracción etanol/ácido fórmico y usando ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico como matriz química.

Los espectros de masas obtenidos se enviaron para su identificación y, como resultado, siete aislados presentaron niveles de concordancia (puntaje) superiores a 2.30 asegurando la identificación de especies con alta fidelidad, catorce se asignaron con los valores de concordancia (puntaje) entre 2.00 y 2.29 que también permitió su asignación a nivel de especie y cuatro aislados restantes solo pudieron asignarse a nivel de género ya que sus valores de concordancia (puntaje) estaban entre 1.70 y 1.99.

La lista de aislados de las muestras S1-S4 identificadas como especie y/o género bacteriano, junto con los valores de concordancia (puntuación) respectivos se presentan en la tabla 27. Para mostrar las diferencias entre los espectros de masas obtenidos para diferentes géneros y los existentes entre especies de este mismo género, los espectros adquiridos para cinco aislados asignados a especies de *Bacillus*, *Leclercia adecarboxylata*, *Lycinibacillus fusiformis* y para aislados de *Serratia fonticola* se presentan en las figuras 27 y 28.

La capacidad de Biotyper<sup>TR</sup> para la identificación de especies se demuestra aún más en la figura 29, donde se puede observar una buena concordancia entre el espectro experimental y el espectro de referencia respectivo incluido en la biblioteca para aislamientos identificados con tres valores diferentes de concordancia (puntuación).

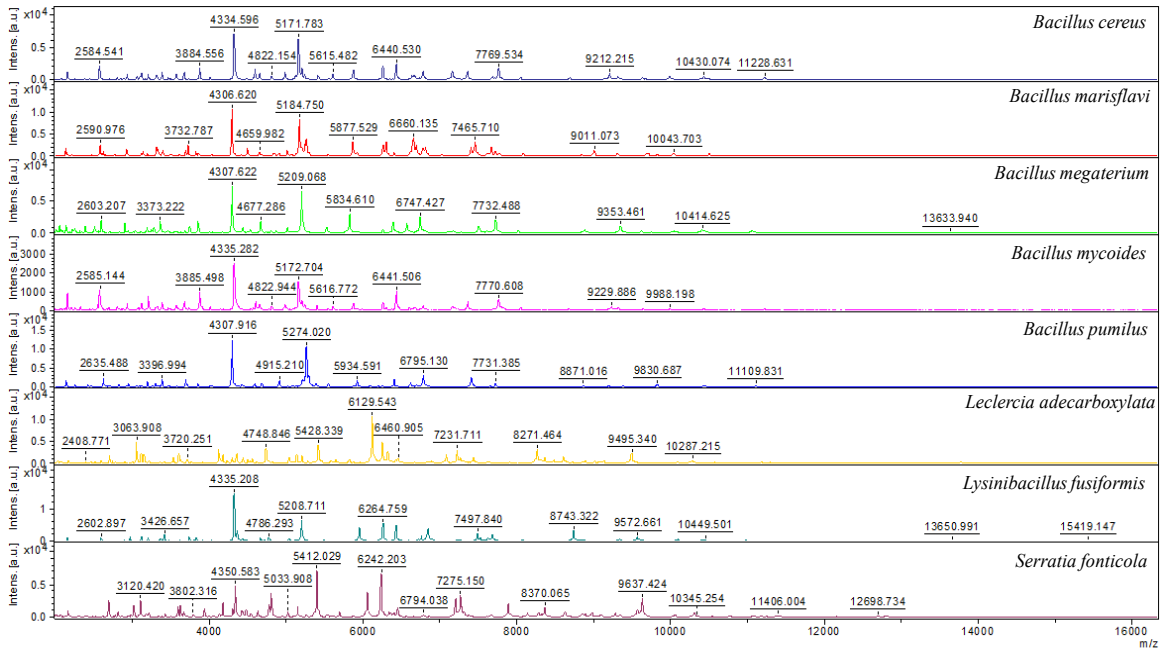


Figura 27. Algunos ejemplos de espectros de masas adquiridos para aislados que corresponden a diferentes géneros y especies diferentes de un mismo género.

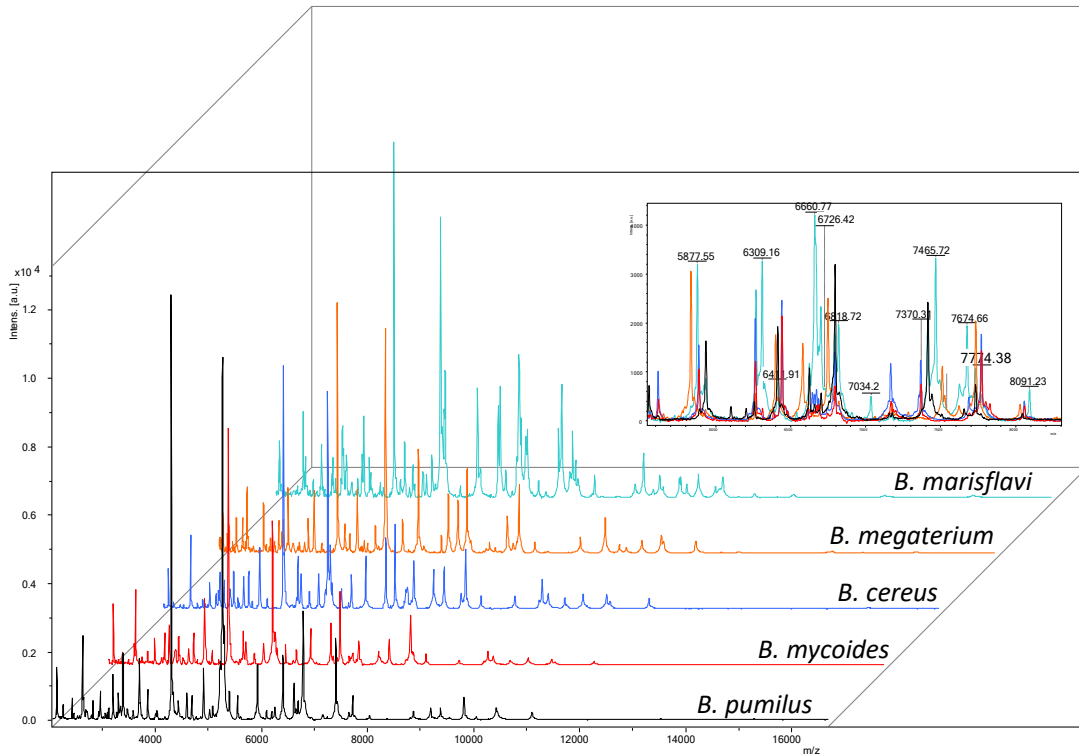


Figura 28. Diferencias entre espectros adquiridos para diferentes aislados identificados dentro de la especie *Bacillus*.

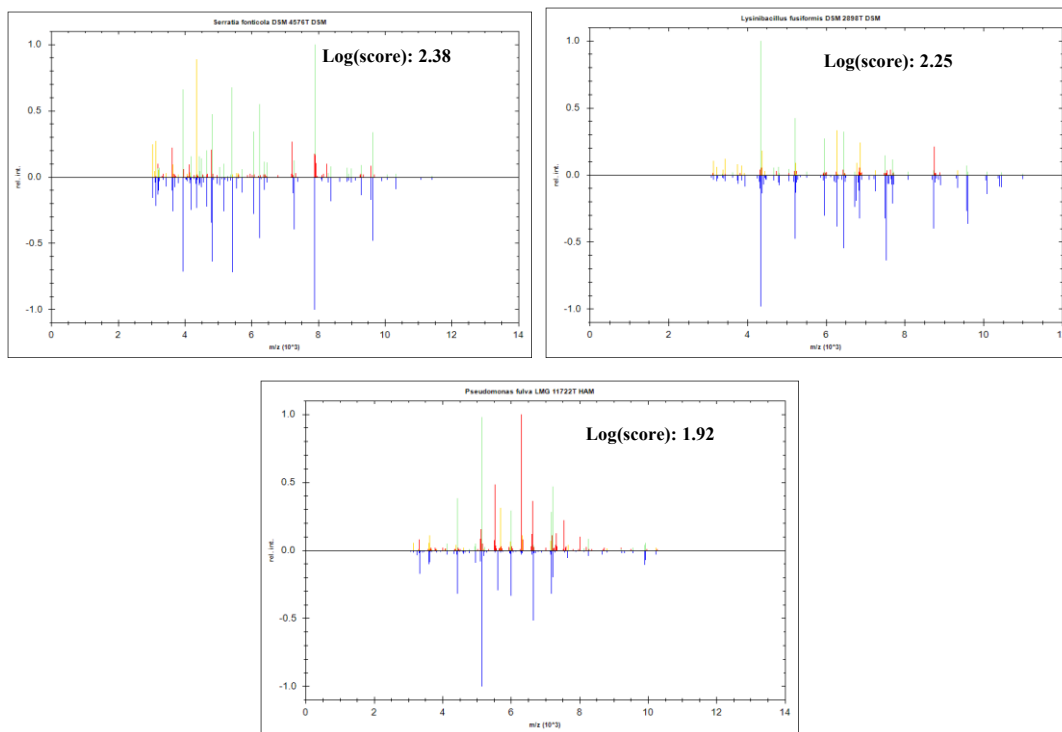


Figura 29. Capturas de pantalla de Biotyper que muestran la comparación entre espectros experimentales con los de referencia para tres aislados con diferentes valores de concordancia (**puntuación**). (Espectro superior - experimental; espectro inferior en azul - referencia; señales en verde - iones concordantes; señales en rojo - iones en espectros experimentales que no concuerdan en la referencia)

La distribución relativa de los aislados identificados se presenta en forma de gráfico circular en la Figura 30. Como se puede observar, las especies de *Bacillus* fueron las más abundantes y representaron el 44% de todas las bacterias; las especies de este género fueron asignadas a once aislados de los sitios S1, S2 y S4 (Tabla 27). El segundo género más abundante correspondió a *Pseudomonas* (20% de todos los aislamientos) con cinco bacterias en los sitios S1 y S4 identificadas a nivel de especie; Además, dos aislados de S2 y S3 se identificaron como *Lysinibacillus fusiformis* (8% de todas las bacterias) y otros dos obtenidos de S1 y S2 fueron *Enterobacter cloacae* (8% de todas las bacterias). La distribución más baja con un solo aislado asignado (4% de todas las bacterias) correspondió a: *Aeromonas hydrophila* en S2, *Leclercia adecarboxylata* en S1, *Serratia fonticola* en S2, *Staphylococcus haemolyticus* en S3 y *Stenotrophomonas maltophilia* en S1.

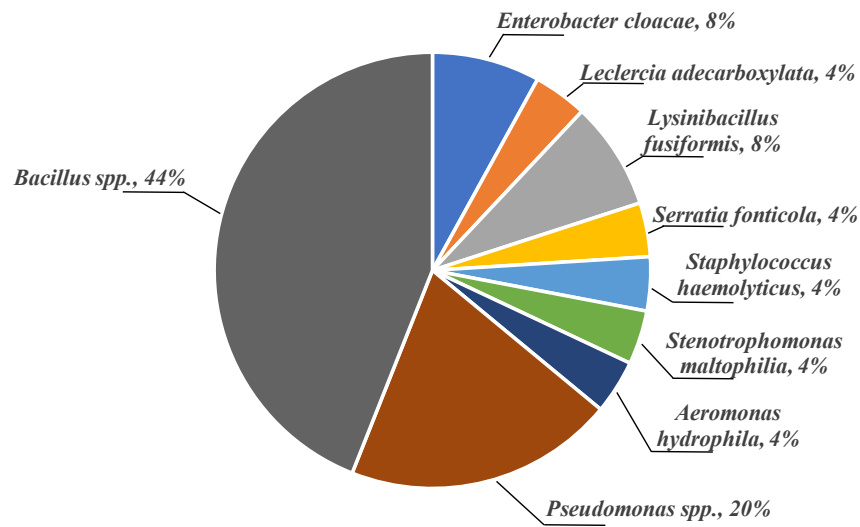


Figura 30. Gráfico circular que muestra la distribución relativa de géneros y/o especies bacterianas identificadas en los sitios contaminados S1-S4.

Todos los géneros bacterianos encontrados en el sitio contaminado de la ciudad de Salamanca habían sido reportados previamente en el contexto de ambientes contaminados con pesticidas organoclorados<sup>[117,118,119,120,121,122,123,124]</sup>. En el contexto de este trabajo, se esperaba que las bacterias correspondientes a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, que abundaban en los sitios S1 y S2 con altas concentraciones de DDT, presentaran capacidad para la metabolización del DDT, como se había informado previamente en varios estudios<sup>[120,125,126,127]</sup>.

Una vez realizada la identificación de bacterias, se llevó a cabo el análisis PCA con el fin de hallar bacterias que preferencialmente habitan sitios contaminados. En la tabla 28 se presentan variables utilizadas para cada uno de los sitios contaminados S1-S4 en la construcción del modelo PCA. El modelo obtenido se muestra en la figura 31, es de notar que los dos primeros componentes principales describen 87% de la total variabilidad de los datos, lo que es indicativo de significancia estadística de este modelo.

Tabla 28. Valores de las variables para cada uno de los sitios utilizados para el análisis PCA. Los valores “0” y “1” indican ausencia o presencia de la cepa en cada una de las muestras; para compuestos organoclorados se tomaron concentraciones promedio determinados por GC-ECD.

Variables	Muestras			
	S1	S2*	S3	S4
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	1	0	0
<i>Bacillus</i> spp.	1	1	0	0
<i>Bacillus mycoides</i>	1	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	1	1	0	1
<i>Bacillus megaterium</i>	0	1	0	0
<i>Bacillus marisflavi</i>	1	1	0	0
<i>Bacillus pumilus</i>	1	1	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1	0	0
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1	0	0	0
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	0	1	1	0
<i>Serratia fonticola</i>	0	1	0	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	0	1	0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	0	0	1
<i>Pseudomonas balearica</i>	1	0	0	0
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	1	0	0	1
$\delta$ -BHC	0	0	1298	0.52
<i>p,p'</i> -DDE	197	1085	49.6	6.77
<i>p,p'</i> -DDD	228	1235	0	1.43
<i>p,p'</i> -DDT	873	2082	75.8	9.19

\*Para el suelo S2 se consideraron la sumatoria de los valores de “Lodo2A” y “Lodo2B”.

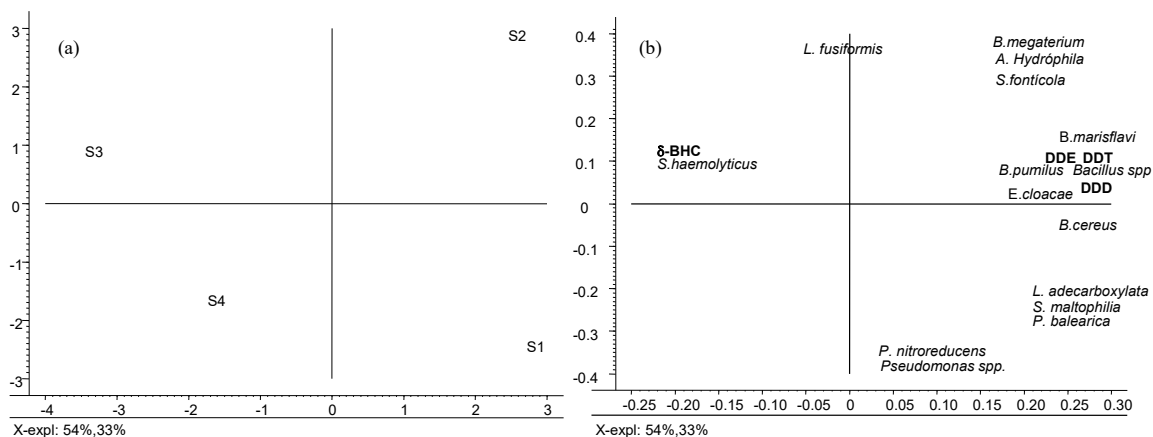


Figura 31. Análisis de PCA obtenido para aislados bacterianos en relación con concentración de congéneres de DDT presente en sitios en contaminados S1-S4: (a) gráfico de puntuación que muestra la distribución de congéneres acorde con sitios contaminados (S1-S4) y (b) gráfico de distribución de aislados, ambos en el espacio bidimensional de los primeros dos componentes principales que describen 54 y 33% del total de la variabilidad, respectivamente.



En la gráfica de score (figura 31a) se observa una clara separación de los sitios S1-S4 en las coordenadas de los dos primeros componentes principales, dependiendo de niveles de la contaminación con compuestos organoclorados, siendo el más contaminado es el sitio S2 etiquetado como “Lodo” y menos contaminado el sitio S4 (comedor). Cabe mencionar que en el sitio S3 se encontraron bajas concentraciones del DDT, pero este fue el antiguo depósito de lindano. En la figura 31b, se observa la distribución de las variables en el espacio de las mismas coordenadas PC1 y PC2. Al comparar las dos gráficas se observa la agrupación de algunas bacterias junto con los compuestos organoclorados en el espacio correspondiente al suelo S2. Dicho suelo es el más contaminado con DDT y sus congéneres DDD y DDE, aun así, las bacterias *S. fonticola*, *A. hydrophila* y *B. megaterium*, prevalecieron en estas condiciones adversas. La cuarta especie presente en el espacio de valores positivos de PC1 y PC2 es la *L. fusiformis*, aunque un poco alejada del clúster principal. Los resultados del PCA están en concordancia con las pruebas de tolerancia realizadas para las colonias aisladas en el apartado IV.2. Efectivamente, las colonias aisladas del suelo S2 fueron las que presentaron un buen crecimiento en presencia del pesticida (tablas 22 y 23). Los resultados en el PCA indican que las cepas *S. fonticola*, *L. fusiformis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. marisflavi*, *B. pumilus*, y *A. hydrophila* presentes en el S1 y S2 podría ser potenciales degradadores de DDT. Parece también interesante que el aislado identificado como *S. haemolyticus* está agrupado junto con el lindano en el espacio correspondiente a la muestra S3, lo que sugiere probable potencial de esta bacteria de al menos resistir altas concentraciones del lindano. Este trabajo de tesis sin embargo se enfoca en la biodegradación de DDT; para obtener evidencias más directas sobre bacterias encontradas en sitios S2, S1, en el capítulo IV.4 se describen las pruebas de tolerancia de todos aislados bacterianos obtenidos en este trabajo, empleando diferentes concentraciones del DDT técnico agregado al medio de cultivo (200 y 1000 mg/L).

#### **IV.3.5 Conclusiones.**

MALDI-TOF MS es una poderosa y versátil herramienta para la identificación de microorganismos a partir perfiles de sus proteínas ribosomales registrados en espectros de

masas, sin embargo, como una importante limitante es necesario mencionar la relativamente baja cobertura de microorganismos medioambientales en bibliotecas espectrales actuales. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo para hongos, la extracción eficiente de las proteínas (lisis celular) y obtención de espectros de buena calidad (alto S/N) son dos requisitos necesarios para lograr la identificación, o para generar una biblioteca espectral nueva. Así mismo, es importante la selección del medio de crecimiento ya que este debe permitir la obtención de un número suficiente de células para el análisis, sin introducir interferencias espectrales indeseables.

En el presente trabajo, al utilizar el medio Sabouraud e incubación de 24 h, los espectros de masas fueron libres de interferencias comparando con espectros registrados utilizando el medio PDB. Así mismo, se propuso el uso de perlas de circonio para la lisis celular con ácido fórmico, obteniéndose espectros de aislados fúngicos de una mejor calidad respecto al protocolo estándar del fabricante.

El hongo 2.3 fue una excepción del cual, el perfil proteínico se obtuvo a partir de la lisis celular con perlas de circonio y el medio de crecimiento fue PDB casero. No obstante, los hongos faltantes se obtuvieron sus perfiles con el protocolo del fabricante satisfactoriamente y se recomienda para futuros proyectos emplear en primer lugar este protocolo por cuestiones de reproducibilidad. En el caso de aislados bacterianos, la mayoría de los organismos fueron identificados a nivel de especie, entre ellas 44% pertenecieron al género *Bacillus* y 20 al género de *Pseudomonas*; en menor proporción se encontraron *Enterobacter*, *Leclercia*, *Lysinibacillus*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Stenotrophonas* y *Staphylococcus*.

Es obvia la predominación de especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* en sitios S1-S4; sin embargo, para estudiar el potencial de las bacterias individuales en la degradación del DDT, se seleccionaron aquellos aislados que preferencialmente habitan los sitios de mayor contaminación con DDT (S2). En el siguiente apartado, se presentan los resultados de crecimiento de los aislados individuales en presencia de diferentes concentraciones del DDT técnico.

## **IV.4 Pruebas microbiológicas de crecimiento de las cepas individuales en presencia de DDT técnico.**

### **IV.4.1 Introducción.**

Los mecanismos de resistencia en bacterias a cualquier tipo de biocida pueden ser clasificados como: (i) intrínsecos, una propiedad natural de un organismo; (ii) adquiridos, resultado de cambios genéticos en una célula bacteriana y surgiendo ya sea por mutación o por adquisición de plásmidos o transposones. La respuesta a biocidas es determinada esencialmente por la naturaleza del agente químico y el organismo involucrado. Otros factores, como la temperatura, pH, composición del medio, la presencia de materia orgánica, puede influir sobre la actividad de la célula contra el biocida.

El conteo celular es un paso necesario cuando se efectúan siembras o subcultivos celulares o cuando se preparan experimentos para ensayos basados en células. Los conteos celulares pueden ser usados principalmente en:

1. Monitoreo de la salud de los cultivos.
2. Monitoreo de los niveles de proliferación.
3. Caracterización de líneas celulares.

Es importante que los conteos celulares sean precisos, consistentes y rápidos. A pesar de la necesidad de velocidad y precisión, la gran mayoría de los conteos celulares se efectúan por medio de cámara de Neubauer o hemocitómetro aplicando tinción para diferenciar entre células vivas y muertas.

En este trabajo, se utilizaron dos métodos para el conteo de células viables para la realización de los experimentos de crecimiento de bacterias en presencia del DDT. El primero es el método para la cuenta de bacterias aerobias por diluciones y conteo en placa<sup>[128]</sup>, el fundamento de la técnica consiste en contar “ las unidades formadoras de colonia” (UFC) presentes en un gramo o mililitro de muestra, las colonias que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación, suponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo. El criterio para seguir es que

debe haber de 25 a 250 UFC por placa de Petri. El medio de crecimiento puede ser nutritivo o específico. El procedimiento se aprecia en la figura 32. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores. El segundo método es el de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)<sup>[129,130,131]</sup>. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción del MTT por deshidrogenasas mitocondriales de células viables, formando (E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano de color púrpura e insoluble en agua. La reacción se presenta en la figura 32.

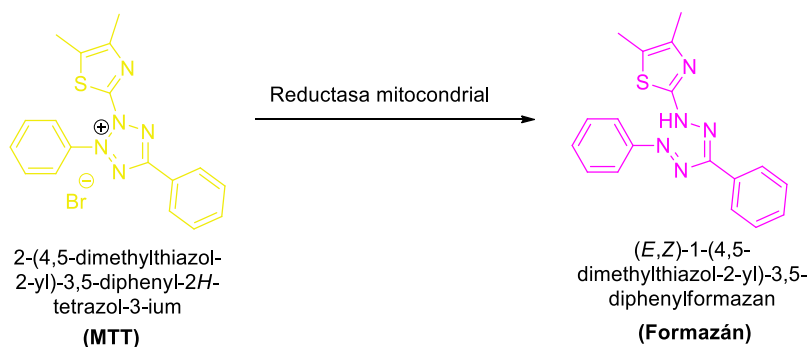


Figura 32. Mecanismo por el cual el MTT es reducido a formazán por células vivas.

Los ensayos con colorante de tetrazolio también se pueden usar para medir la citotoxicidad (pérdida de células viables) o la actividad citostática (cambio de proliferación) de posibles agentes medicinales y materiales tóxicos.

Previamente, se realizaron pruebas de tolerancia (apartado IV.2), en el cual se expusieron al DDT grado técnico, las colonias aisladas de los sitios S1-S4. Una vez seleccionadas las cepas de bacterias en esta parte del trabajo es necesario continuar con estos experimentos, enfocándose en los siguientes puntos: (i) selección de las condiciones para crecimiento óptimo, (ii) selección de la concentración de DDT técnico para asegurar viabilidad de los microorganismos, (iii) pruebas de viabilidad en la suspensión del cultivo con DDT, al inicio y finalización del experimento.

#### **IV.4.2 Objetivo particular.**

- ✓ Cultivar y seleccionar aquellas cepas bacterianas cuyo crecimiento no sea inhibido por altas concentraciones de DDT técnico, para posteriores experimentos de biodegradación.

#### **IV.4.3 Condiciones experimentales.**

##### IV.4.3.1. Protocolo de preparación de soluciones.

*Buffer de PBS:* El buffer se preparó a partir de las siguientes sales, 4.03 g de NaCl, 0.11 g de KCl, 0.58 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.10 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en un volumen final de 500 mL de agua destilada. El pH fue de 7.2.

*Estándar de MTT:* se disolvieron 5 mg de MTT en 1.0 mL de buffer de fosfatos. La solución se protegió de la luz y se resguardó a -20 °C.

*0.1 N HCl en isopropanol:* en 200 mL de isopropanol se adicionaron 2 mL de HCl concentrado y se llevó a un volumen final de 250 mL con isopropanol.

##### IV.4.3.2. Ensayo de viabilidad celular por diluciones y cuenta en placa.

1. Se cultivó *Serratia fonticola* en 200 mL de medio LB líquido a 30 °C y 180 rpm, 24 h después se tomó 1 mL del medio el cual se nombró como “cultivo stock”.
2. Se centrifugó a 4000 g por 10 min y se decantó el medio LB. Las células se suspendieron en 1.0 mL de PBS.
3. Se realizaron diluciones seriadas de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-7}$  de la cepa como se muestra en la figura 33 y se sembró por triplicado en placas Petri con medio LB sólido depositando 100  $\mu$ L de cada una de las soluciones sobre el agar.
4. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h y posteriormente, se realizó el conteo de las UFC.

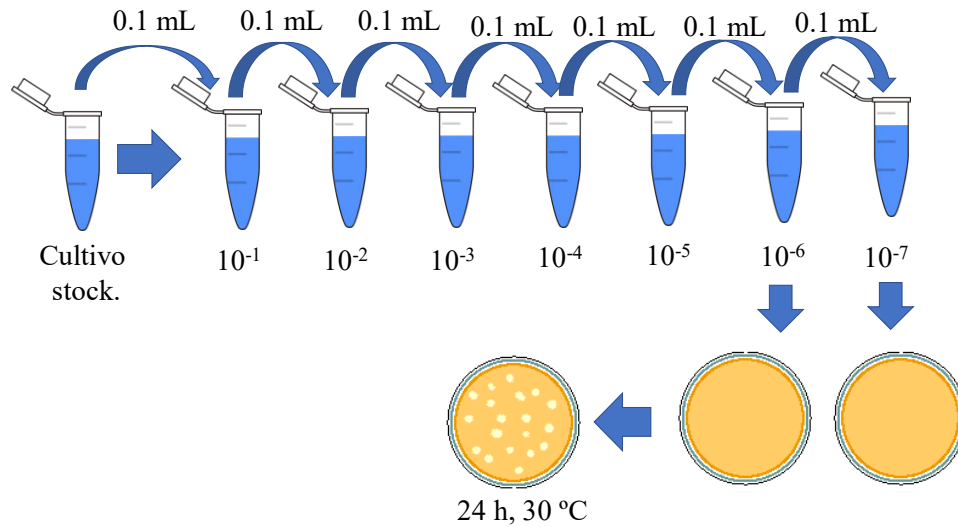


Figura 33. Diagrama de diluciones seriadas para conteo de UFC.

5. Se toman en cuenta únicamente aquellas cajas Petri que tengan de 25 a 250 colonias (este número de colonias es estadísticamente representativo). Aquellas placas que contengan más de 250 colonias se reportan como “incontables”.
6. Utilizando la fórmula que se muestra a continuación, se calcularon las UFC/mL de cultivo, el cultivo stock se empleó para la preparación de la curva de calibración en el método de MTT. Este método disminuye el margen de error y garantiza la calidad de las pruebas.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{(No. de colonias por placa) \times (1/F. dilución)}{(mL de muestra sembrada)}$$

#### IV.4.3.3. Ensayo de viabilidad celular bacteriana por método de MTT<sup>[132]</sup>.

1. A partir del “cultivo stock”, se tomaron alícuotas en tubos eppendorf como se muestra en la tabla 29. Se llevaron a un volumen final de 500  $\mu$ L con PBS y se agregó a cada tubo 50  $\mu$ L de solución de MTT.

Tabla 29. Relación de volúmenes de cultivo y buffer para curva de calibración en el ensayo de MTT.

Punto de curva	Volumen de “cultivo stock” (μL)	Volumen de MTT [5 mg/mL] (μL)	Volumen de PBS (μL)
1	30	50	470
2	62.5		437.5
3	125		375
4	250		250
5	375		125
6	0		500

2. Los tubos se incubaron por 2 h a 37 °C y 180 rpm.
3. Posteriormente, se agregaron 500 μL de isopropanol ácido y se agitó la solución manualmente por un minuto.
4. Se realizó el mismo procedimiento para las muestras problema.
5. Se centrifugó a 10 000 g por 10 minutos.
6. Se colocaron 200 μL de cada solución en placa de 96 pocillos, la lectura de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro UV/Vis (sección III.4, 8).
7. Para corroborar la curva de calibración , se tomó la dilución 10<sup>-1</sup> como control de curva de calibración, se muestra en la figura 32.

#### IV.4.3.4. Pruebas de crecimiento celular en medio mínimo sólido (MMS) fortificado con DDT técnico.

Cada una de las cepas aisladas mencionadas en la tabla 27 fueron inoculada en MMS conteniendo 0.5% v/v de glicerol y fortificado con 5, 50, 200 y 1000 mg/L de DDT técnico; todas las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h bajo condiciones aerobias. En paralelo, se prepararon cultivos control bajo las mismas condiciones sin DDT en el medio.

#### IV.4.3.5. Cultivos celulares expuestos a DDT en medio mínimo líquido, obtenidos para estudiar biodegradación del DDT.

Los ocho aislados (F3.2, F4.1, A3.2, F1.2, H1.4, A1.1, F3.3, A3.1) fueron individualmente inoculados de cultivos sólidos a porciones de 5 mL de medio mínimo líquido con 5 mg/L de DDT y 0.5 % de glicerol (MLM) y después de 24 h, se tomaron 100 µL de cada cultivo para preparar el cultivo mixto (co-cultivo). Los cultivos individuales y el co-cultivo fueron propagados en 50 mL de el mismo medio por 24 h; posteriormente, las cepas fueron transferidas a MLM conteniendo altas concentraciones de DDT (50 mg/L) y después de 24 h de incubación, las muestras fueron centrifugadas (4 000 g), las células fueron suspendidas en porciones de 1 mL de MLM. Cantidades iguales de células (alrededor de  $10^8$  UFC)<sup>[133]</sup> fueron cultivadas por 14 días en 50 mL de MLM fortificados con 50 mg/L o 200 mg/L de DDT y después de dos semanas de cultivo, se tomaron las alícuotas de medios de cada uno de los matraces. Estas muestras fueron utilizadas para evaluar los porcentajes de biodegradación del DDT y los medios enriquecidos inicialmente con 200 mg/L de DDT fueron utilizados para el análisis de sus metabolitos. Los controles abióticos fueron preparados a partir de las mismas cantidades de MLM con sus respectivas concentraciones de DDT sin presencia de células.

### IV.4.4 Resultados y discusión.

#### IV.4.4.1. Evaluación de crecimiento bacteriano en presencia del DDT.

Los cultivos de las 25 bacterias aisladas fueron fortificados con DDT técnico usando diferentes concentraciones de pesticida adicionadas al MMS. Acorde a reportes previos<sup>[134,135]</sup>, glucosa, sacarosa (0.1% - 1.0% m/v), glicerol, fenol, tolueno, hexano y etanol (0.1% - 1.0% v/v) fueron probados como fuente de carbono para estimular el crecimiento en cultivos de bacterias; entre ellos, el glicerol a una proporción de 0.5 % v/v fue seleccionado para posteriores estudios donde se observó la relativa rapidez y eficiencia en el crecimiento de los microorganismos. La comparación visual de las células expuestas a DDT contra las células en el cultivo control puso de manifiesto que, a bajas concentraciones (5 mg/L) el DDT no causa inhibición de crecimiento de ninguno de los



aislados. Todas las bacterias crecieron también en la presencia de 50 mg/L de DDT, aunque para esta concentración se observó un peor crecimiento para *Enterobacter cloacae* (aislado A1.7, S1 y A4.1, S2), *Staphylococcus haemolyticus* (aislado A5.1, S3), *Stenotrophomonas maltophilia* (aislado A1.5, S1) y *Pseudomonas* ssp. (aislado A61, S4) en comparación con otras cepas aisladas. Una vez incrementada la concentración de DDT técnico a 200 mg/L, se observó crecimiento celular evidente en las ocho cepas siguientes: *Lysinibacillus fusiformis* (aislado F3.3, S2), *Bacillus marisflavi* (aislado F1.2, S1; F2.2, S2), *Bacillus pumilus* (aislado H1.4, S1; F3.5, S2), *Bacillus megaterium* (aislado A3.2, S2), *Bacillus mycoides* (aislado F3.2, S1), *Bacillus cereus* (aislado F4.1, S2; A1.2, S1), *Leclercia adecarboxylata* (aislado A1.1, S1) y *Serratia fonticola* (aislado A3.1, S2). Finalmente, *Bacillus mycoides* (aislado F3.2, S1) y *Bacillus pumilus* (aislado H1.4, S1; F3.5, S2) fueron los únicos dos aislados que crecieron en presencia de 1000 mg/L de DDT. Los ocho microorganismos capaces de crecer en presencia de 200 mg/L de DDT fueron seleccionados para posteriores experimentos enfocados en la degradación de este pesticida, en la figura 34 se muestra una fotografía de los ocho microorganismos escogidos.

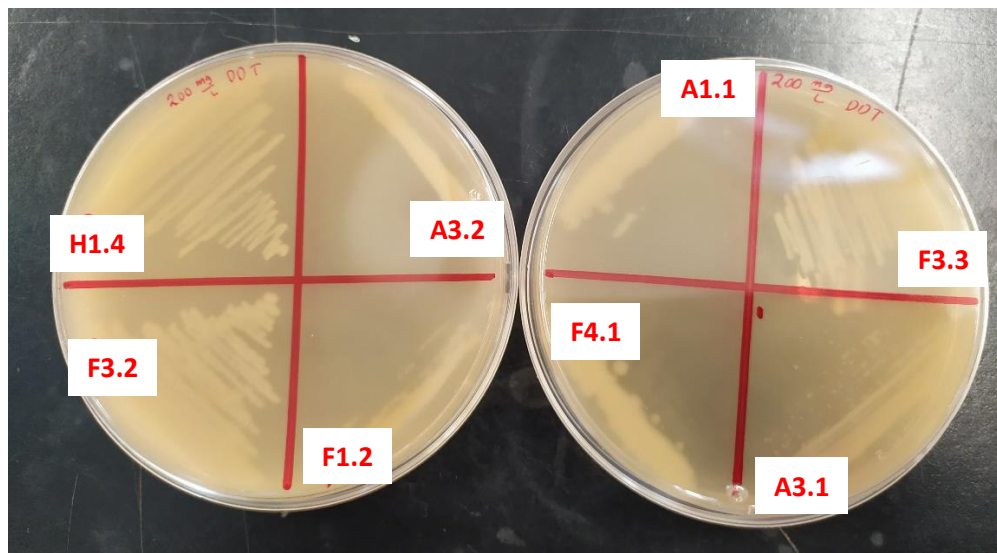


Figura 34. Placas Petri con MMS fortificado con 200 mg/L de DDT técnico y las ocho cepas de interés: H1.4 - *Bacillus pumilus*, suelo S1; A3.2 - *Bacillus megaterium*, suelo S2; F1.2 - *Bacillus marisflavi*, suelo S1; F3.2 - *Bacillus mycoides*, suelo S1; A1.1 - *Leclercia adecarboxylata*, suelo S1; F3.3 - *Lysinibacillus fusiformis*, suelo S2; A3.1 - *Serratia fonticola*, suelo S2; F4.1 - *Bacillus cereus*, suelo S2.

#### IV.4.4.2. Resultados de evaluación de viabilidad celular.

Para sustentar la selección de los ocho aislados bacterianos y para estudiar su potencial en la biodegradación del DDT, era necesario realizar experimentos de viabilidad celular, para asegurar que existe actividad metabólica en los organismos asistiendo la degradación del DDT. En este apartado, se presentan los resultados del uso de métodos de conteo y viabilidad celular al comienzo y finalización de los experimentos sobre los ocho microorganismos creciendo en presencia de 200 mg/L DDT técnico.

En este trabajo, el método de cuenta en placa se utilizó para dos fines. El primero para la cuantificación de células viables en el protocolo de determinación de viabilidad celular empleando MTT y el segundo para conteo de células viables al final del periodo de estrés de las cepas frente a DDT. Para iniciar un cultivo y realizar un seguimiento del mismo, se debe conocer la densidad celular en número de células/ml. Las células contadas deben estar vivas, por lo que también debemos de comprobar su viabilidad. Ambos procesos se realizan simultáneamente mediante métodos colorimétricos como el descrito con MTT.

A manera de ejemplo, a continuación se describen los resultados obtenidos para el aislado identificado como *Serratia fonticola*.

Se prepararon seis matraces con 200 mL de medio líquido LB, de los cuales cinco se inocularon con las células de dicho aislado, se cultivaron por 24 h, 37 °C a 200 rpm en condiciones aerobias. Se tomaron 200 µL de cada cultivo y se depositaron en una placa de 96 pocillos, se realizó la lectura a 540 nm para determinar densidad óptica de cada medio, las cuales se muestran en la tabla 30. Se tomaron los cultivos 3 y 4 por tener una densidad óptica similar para llevar a cabo el protocolo por MTT. Para determinar el número de células viables en estos cultivos se llevó a cabo el protocolo IV.4.3.2 por duplicado de muestra. La dilución ( $10^{-5}$ ) dio un conteo de células satisfactorio según el protocolo, los resultados se aprecian en la tabla 31.

Tabla 30. Determinación de densidad óptica de cultivos de *S. fonticola* en medio LB líquido utilizando placa de 96 pocillos.

Matraz	Densidad óptica (540 nm)	*2.9
Control	0.156	0.452
1	0.506	1.468
2	0.516	1.496
3	0.462	1.310
4	0.467	1.354
5	0.705	2.044

Tabla 31. Conteo de células viables en matraz 3 y 4.

Matraz	Densidad óptica (540 nm)*2.9	Conteo de células dilución 10 <sup>-5</sup> .	UFC (prom±desvest)
M3	1.3104	86	4.30x10 <sup>9</sup>
		93	4.65x10 <sup>9</sup>
M4	1.3543	96	5.30x10 <sup>9</sup>
		98	4.90x10 <sup>9</sup>

En los matraces 3 y 4 hay un promedio de  $4.79 \times 10^9$  UFC, a partir de estos “cultivos stock” se llevó a cabo el protocolo IV.4.3.3 para la determinación de viabilidad y conteo celular, ahora por método colorimétrico. La conversión de MTT a cristales de formazán por la actividad mitocondrial se relaciona directamente al número de células vivas, este análisis es ampliamente usado para medir efectos citotóxicos in vitro<sup>[131,132]</sup>.

En la figura 35 se muestra foto de las soluciones de calibración preparadas a partir de los cultivos en los matraces 3 y 4, la curva de calibración se realizó por duplicado. Se utilizó una segunda dilución 10<sup>-1</sup> (figura 33) de ambos matraces para determinar la concentración total de UFC/mL en los medios de cultivo y se comparó el resultado obtenido con el método de conteo en placa.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de células vivas utilizando MTT como método colorimétrico se muestran en la tabla 32.

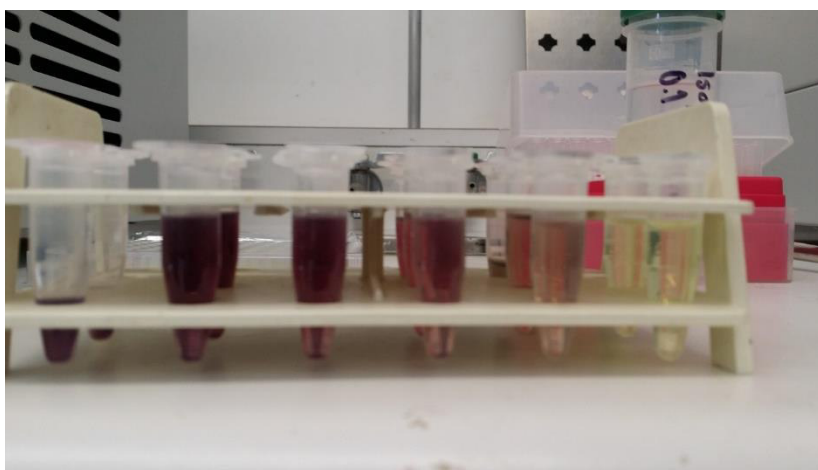
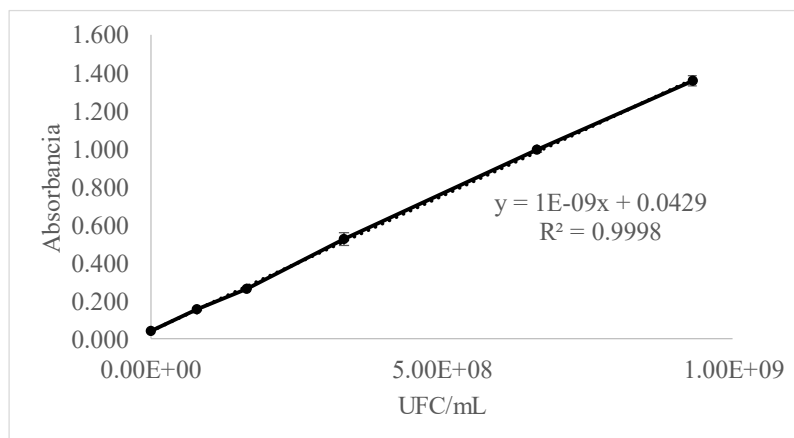


Figura 35. Foto de las soluciones de calibración para el cultivo de *Serratia fonticola* con reactivo MTT.

Tabla 32. Resultados de cuantificación y viabilidad celular utilizando MTT como método colorimétrico.

Lectura de absorbancia (570 nm)		UFC/mL		Prom±SD
M3	M4	M3	M4	
0.506	0.520	$4.64 \times 10^9$	$4.77 \times 10^9$	$(4.71 \pm 0.07) \times 10^9$
0.465	0.502	$4.22 \times 10^9$	$4.59 \times 10^9$	$(4.41 \pm 0.19) \times 10^9$

Se obtuvo un promedio de  $4.56 \times 10^9$  UFC/mL por el método colorimétrico de MTT. En comparación con el método de conteo en placa se calculó el porcentaje de diferencia relativa entre ambos resultados obteniendo 4.92%, es decir, existe congruencia entre ambas mediciones.

Posteriormente, se realizó un experimento de viabilidad celular frente a tres concentraciones diferentes de DDT técnico (50, 200 y 1000 mg/L) empleando MLM como medio de crecimiento, inoculación con *S. fonticola* como un ejemplo de los aislados obtenidos en este trabajo, se cultivaron a 37°C y 200 rpm, en condiciones aerobias. Se inocularon ocho matraces con *S. fonticola* en 30 ml de MLM, la cantidad de células presentes en cada matraz fue de  $7.5 \times 10^8$  UFC, se prepararon por duplicado control (presencia de cepa, sin DDT técnico) y matraces fortificados con 50, 200 y 1000 mg/L de DDT técnico. Las pruebas de viabilidad se realizaron cinco días después utilizando el protocolo de MTT, sin embargo, al realizar el análisis en los cultivos fortificados con DDT, no se observó el tono púrpura del formazán, probablemente debido a la presencia de algún componente del sistema que interfiere en la reducción enzimática del MTT. Por lo tanto, se llevó a cabo el protocolo de viabilidad por conteo en placa. Después de cinco días, todos los cultivos (el control y los expuestos a 50 y 200 mg/L de DDT) presentaron células vivas; por otro lado, el cultivo fortificado con 1000 mg/L de DDT mostró un conteo menor a las 25 UFC y por lo tanto se descartó debido a la falta de viabilidad celular. En la figura 36 se muestra a manera de ejemplo las fotos del cultivo control y del cultivo fortificado con 200 mg/L de DDT. En este caso, el control contenía  $6.65 \times 10^9$  UFC/mL y el cultivo fortificado con 200 mg/L de DDT contenía  $2.10 \times 10^9$  UFC/mL, tres veces menos que el cultivo control, ambos bajo el mismo periodo de incubación.

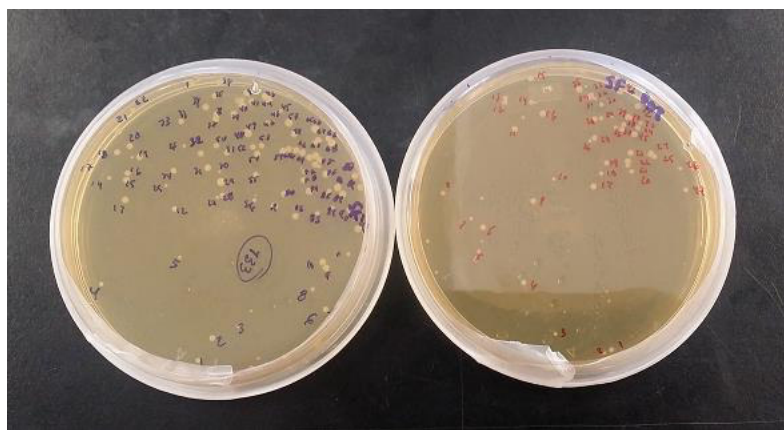


Figura 36. Comparación de resultados de conteo en placa entre control (matraz sin DDT-izquierda) y matraz fortificado con 200 mg/L (derecha) inoculados con *S. fonticola* cultivada por 5 días.

#### IV.4.5 Conclusión.

Notablemente, el género *Pseudomonas* ha sido reportado muy a menudo como microorganismo degradador de DDT<sup>[17,23,124,125,136]</sup>. En este trabajo, bacterias de este género fueron abundantes en los sitios S1 y S2; sin embargo, ninguno de estos aislados toleró concentraciones mayores a 50 mg/L de DDT en el MMS. Por lo tanto, los aislados de *Pseudomonas* no fueron considerados para futuros experimentos, aunque una composición diferente del medio de cultivo con respecto a su hábitat natural podría ser una razón de la poca tolerancia observada al DDT. Por otro lado, en el mismo medio, varias bacterias asignadas al género *Bacillus* presentaron crecimiento a concentraciones relativamente altas de pesticida, en concordancia con otros estudios<sup>[120,133,137]</sup>. En cuanto a *Lysinibacillus fusiformis*, hasta donde se sabe, esta especie solo ha sido reportada una vez, y al igual que en este trabajo, los estudios se realizaron en sitios contaminados con compuestos organoclorados<sup>[138]</sup>, se menciona también en algunos otros relacionados con efluentes contaminados con metales pesados<sup>[139,140]</sup>. Mientras que *Leclercia adecarboxylata* se reporta como degradadora de hidrocarburos poliaromáticos<sup>[141]</sup>, *Serratia fonticola* no se reporta en trabajos relacionados a la degradación de compuestos tipo “POP’s” (compuestos orgánicos persistentes, por sus siglas en inglés). Sin embargo, existen reportes de microorganismos pertenecientes al género *Serratia* spp. involucrados directamente en la degradación de DDT<sup>[122,142]</sup>.

Respecto a los análisis y ensayos de conteo y viabilidad celular, se concluye que el mejor protocolo para nuestro estudio fue conteo por placa, mientras que en el método colorimétrico con MTT no se obtuvieron resultados satisfactorios, probablemente por presencia de algunos interferentes que afectaban el proceso de reducción del MTT a formazán. Cabe señalar que se han encontrado reportes de falsos positivos de formación de formazán debido a la reducción del MTT por factores ajenos a la respiración celular y actividad mitocondrial. Sin embargo, en este trabajo, simplemente no hay formación del colorante purpúreo. Quizás el proponer otro ensayo colorimétrico con sulforhodamina B (SRB) sea mejor opción. Este método se basa en la propiedad de SRB, que se une estequiométricamente a las proteínas en condiciones ácidas leves y luego se puede extraer utilizando condiciones básicas; por lo tanto, la cantidad de colorante unido puede usarse

como un aproximado de la masa celular, que luego puede extrapolarse para medir proliferación celular. Generalmente, se utiliza en células expuestas a drogas, moléculas pequeñas y tiene aplicaciones en evaluar los efectos de la modulación de la expresión génica<sup>[143]</sup>. El ensayo con SBR se ha utilizado ampliamente para investigar la citotoxicidad en estudios basados en células y es el método de elección para exámenes de alta confiabilidad, ya que este procedimiento no se basa en medir actividad metabólica como el MTT<sup>[144]</sup>.

El resultado más importante de esta parte del trabajo es la selección de ocho aislados con un probable potencial para biodegradación del DDT; estos fueron: *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus marisflavi*, *Bacillus pumilu*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*, *Leclercia adecarboxylata* y *Serratia fonticola*. De manera preliminar utilizando *S.fonticola* en MLM fortificados con DDT como organismo representativo de los ocho aislados, se mostró la viabilidad celular en las condiciones de exposición. Estos experimentos sirvieron para poder asegurar la misma cantidad de células tomadas de cada uno de los aislados para experimentos de biodegradación. Dichos experimentos se describen en la sección siguiente.

## **IV.5 Estudio de degradación de DDT y análisis de sus metabolitos utilizando GC-ECD y GC-MS.**

### **IV.5.1 Introducción.**

En este apartado se describen los resultados obtenidos en los análisis de GC-ECD y GC-MS, enfocados en la biodegradación del DDT técnico por cada uno de los ocho microorganismos aislados de suelos contaminados.

Los pasos importantes en la determinación de productos de degradación son la extracción de los mismos a partir de la muestra, su separación, detección e identificación; existen varios métodos analíticos que pueden proporcionar información sobre metabolitos en muestras biológicas. Las dos plataformas de mayor potencial en estudios metabolómicos se basan en espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, de las cuales, la segunda es más adecuada para el análisis de muestras reales con bajas concentraciones de compuestos de interés. En particular, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) ha sido ampliamente usada en metabolómica por su alto poder de separación y capacidad de identificación de cientos de moléculas orgánicas dentro de una sola corrida analítica. El sistema de GC-MS es robusto, confiable, muy sensible y, lo más importante, fácil de usar. Adicionalmente, la ionización por impacto electrónico empleado convencionalmente en sistemas GC-MS genera espectros de masas altamente reproducibles, permitiendo tanto la generación como el uso de bibliotecas espectrales para la identificación de metabolitos a partir de datos generados en diferentes modelos de instrumentos y de diferentes condiciones cromatográficas<sup>[145,146,147]</sup>. Sin embargo, como es bien sabido, GC-MS solo analiza compuestos volátiles, aquellos térmicamente estables, y en ocasiones es necesaria la implementación de metodologías de derivatización. En el último caso, al derivatizar y modificar la estructura de las moléculas de interés pueden crearse bibliotecas propias (“in house”) con la ayuda de softwares como AMDIS, debido a que hay pocas bibliotecas de espectros de masas disponibles para metabolitos derivatizados en base a índices de retención<sup>[148]</sup>. En el presente trabajo, no fue necesario derivatizar los extractos, ya que los metabolitos producto de la degradación del DDT son semi-volátiles y térmicamente estables.



En este trabajo, el análisis por GC-MS proporcionó una identificación inequívoca de metabolitos del DDT, basado en la combinación de índices de retención y espectros de masas. Por otro lado, el análisis por GC-ECD se realizó para la cuantificación de los congéneres del DDT al inicio y al término del experimento de biodegradación<sup>[149]</sup>.

#### **IV.5.2      Objetivo particular.**

- ✓ Evaluar comparativamente el potencial de los ocho aislados individuales y de su co-cultivo en la biodegradación y metabolización del DDT técnico en medio mínimo líquido, mediante el análisis por GC-ECD y GC-MS.

#### **IV.5.3      Condiciones experimentales.**

##### **IV.5.3.1.    Cultivo de aislados bacterianos en presencia de DDT técnico.**

Los ocho aislados bacterianos (F3.2, F4.1, A3.2, F1.2, H1.4, A1.1, F3.3, A3.1) fueron inoculadas individualmente en cultivos sólidos, después de 24 h a 37°C. Se preparó el preinóculo tomando varias colonias de células y se inocularon en porciones de 5 mL de medio líquido mínimo con 0.5% de glicerol (MLM). Los preinóculos se cultivaron por 24 h, 37 °C y 200 rpm. Cada uno de los preinóculos fue propagado en 50 mL de MLM fortificados con 0.5 mg/L de DDT. Después de 24 h, las muestras fueron centrifugadas (4000 g, 10 min) y colocadas en 50 mL de MLM fresco conteniendo más alta concentración de DDT (50 mg/L) y después de 24 h de incubación, las muestras fueron centrifugadas, y las pastillas fueron resuspendidas en porciones de 1 mL de MLM fresco. Posteriormente, iguales cantidades de células (alrededor de 10<sup>8</sup> UFC) fueron cultivadas por 14 días, 37 °C y 200 rpm, en matraces de 50 mL con 10mL de MLM conteniendo 50 y 200 mg/L de DDT técnico. El control abiótico fue preparado por duplicado tomando las mismas porciones de MLM con sus respectivas concentraciones de DDT sin la presencia de células.

#### IV.5.3.2. Extracción de productos de degradación del DDT en medios de cultivo.

Se evaluó la degradación de DDT en todas las muestras, mientras que el análisis de metabolitos se llevó a cabo en medios líquidos tomados de cultivos recién preparados fortificados con 200 mg/L de DDT y después de dos semanas de crecimiento.

Para la determinación de congénere del DDT en los cultivos bacterianos, se tomaron alícuotas de 2 mL del medio de cultivo recién preparados y después de 14 días de incubación. Las muestras fueron acidificadas con 100 µL de ácido fórmico al 50% v/v y la extracción se llevó a cabo con dos porciones de 1 mL de acetato de etilo. Cada muestra fue transferida a un tubo Falcon nuevo y centrifugados a 2000 g por 10 min; la fase orgánica fue recuperada, colocada en tubos de vidrio y se evaporó a temperatura ambiente. Finalmente, los extractos fueron reconstituidos con 2 mL de acetonitrilo y adecuadamente diluidos con acetato de etilo para su análisis por GC-MS y con ciclohexano para GC-ECD.

El análisis de metabolitos ha sido enfocado en compuestos de relativamente baja polaridad (metabolitos “tempranos” del DDT). Para ello, se utilizó el mismo protocolo de extracción que para congéneres del DDT. Específicamente, se extrajeron alícuotas de 2 ml de medio de los cultivos recién preparados y después de 14 días de incubación (blanco abiótico en paralelo). Las muestras se acidificaron con 100 µL de ácido fórmico al 50% v/v y la extracción se realizó con dos porciones de un ml de acetato de etilo. Cada mezcla se transfirió a un nuevo tubo Falcon y se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos; luego se recuperó la fase orgánica, se colocó en un tubo de vidrio y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente. Finalmente, los extractos se reconstituyeron con 2 ml de acetato de etilo y se diluyeron adecuadamente con ciclohexano antes de GC-ECD y ACN para inyección en GC-MS.

#### IV.5.3.3. Protocolos de métodos cromatográficos.

1. Para evaluar el porcentaje de degradación de DDT se empleó GC-ECD (III.4, punto 6). Se utilizó columna cromatográfica capilar de bajo sangrado PE Elite-XLB (30

m, 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ) con velocidad de flujo de hidrógeno de 1.2 mL/min. El inyector se programó a una temperatura de 200 °C, inyección por división con relación 5:1, el volumen de inyección fue de 1  $\mu\text{L}$ . La temperatura de horno se programó con diferentes rampas de temperatura empezando de 100 °C, seguido de un aumento de temperatura a 200 °C, velocidad de 10 °C/min con 4 minutos de permanencia, aumento de temperatura en relación de 10 °C/min hasta 280 °C con 2 minutos de permanencia. Las condiciones del detector de ECD fueron: 320 °C, con flujo de  $\text{N}_2$  a 30 mL/min.

2. Respecto al monitoreo de productos de degradación de DDT se utilizó cromatógrafo de gases modelo 456-GC acoplado a espectrómetro de masas de triple cuadrupolo modelo SCION TQ (III.4, punto 7). Se dispuso de columna cromatográfica capilar BP-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de película, SGE Analytical Science). Se utilizó helio como gas de acarreo a una velocidad de flujo de 1 mL/min; el puerto de inyección fue programado con temperatura de 200 °C, en modo de división con una relación de 5:1 y volumen de inyección de 1  $\mu\text{L}$ . El horno fue programado con las siguientes rampas de temperatura: temperatura inicial de 100 °C con 0.5 min de permanencia, aumento a 200 °C en relación de 10 °C/min y 4 minutos de permanencia, y finalmente aumento a 280 °C en relación de 10 °C/min y 2 minutos de permanencia, tiempo total de corrida cromatográfica de 24.5 minutos. Ajustes de temperatura para línea de transferencia y fuente de ionización fueron de 280 y 250 °C, respectivamente. La energía de ionización por impacto electrónico fue de 70 eV y los espectros de masas fueron adquiridos en modo full-scan dentro de un rango de  $m/z$  de 50-500. Se llevó a cabo calibración externa con estándar de alcanos de C10-C40 para obtención de valores de índice de retención (RI). Se utilizó el software AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) versión 2.73, con bibliotecas NIST/EPA/NIH versión 2.3, 2017 y Wiley 2011 para búsqueda e identificación de compuestos basándose en los espectros adquiridos y los valores del índice de retención (RI).

#### IV.5.3.4. Parámetros para búsqueda e identificación de productos de degradación de DDT empleando el software AMDIS como herramienta de desconvolución de cromatogramas.

Los parámetros de desconvolución fueron ajustados a un factor mínimo de comparación de 90, anchura de componente de 12 escaneos, alta resolución y sensibilidad, con bajo perfil. Los valores m/z excluidos fueron 41 y 207 y correspondieron a los iones de solvente y sangrado de columna, respectivamente. Adicionalmente, la fuente de ionización se apagó al minuto 20 de la corrida cromatográfica para eliminar la ionización de *p,p'*-DDT debido a su muy alta concentración en las muestras.

### IV.5.4 Resultados y discusión.

#### IV.5.4.1. Degradación de DDT técnico en cultivos individuales de los ocho aislados bacterianos.

Los ocho aislados seleccionados fueron gradualmente aclimatados a crecientes concentraciones de DDT y después expuestos a 50 y 200 mg/L de DDT técnico en MLM por 14 días, como se describe en la sección IV.5.3.1. Los extractos de medios recién preparados y con dos semanas de crecimiento bacteriano fueron analizados por GC-ECD para cuantificar congéneres del DDT. Para la determinación de *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD y *p,p'*-DDE en los cultivos líquidos, se prepararon soluciones de calibración conteniendo los compuestos individuales en un intervalo de concentración de 0.05 – 5.0 mg/L de cada uno. Las funciones de regresión lineal presentaron un  $r^2 > 0.998$  y un DER(CF) < 21.9%. Los límites de detección y cuantificación del método se encontraron en un rango de 0.028 – 0.036 mg/L y 0.09 – 0.12 mg/L respectivamente, ambos se evaluaron realizando la calibración en presencia del medio de cultivo líquido<sup>[150,151]</sup>. El porcentaje de degradación de *p,p'*-DDT en los medios de cultivo líquidos durante el crecimiento bacteriano (D) fue calculado en base a la concentración encontrada en el cultivo fresco inicial ( $c_i$ ) y después de dos semanas de cultivo ( $c_f$ ), ambos corregidos por sus respectivos blancos, usando la fórmula siguiente:  $D = [(c_i - c_f / c_i)] \times 100$ . El porcentaje de degradación de DDT correspondiente al crecimiento de 2 semanas se presenta en la figura 37.

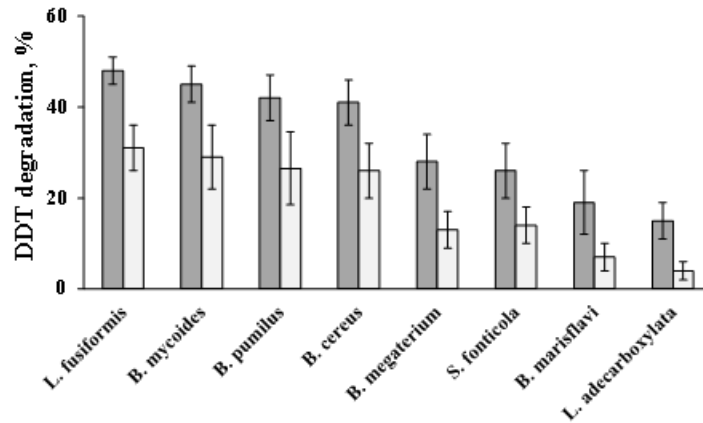


Figura 37. Porcentajes de degradación de DDT por los ocho aislados bacterianas después de 14 días de crecimiento en MLM fortificado con 50 mg/L de DDT técnico (gris oscuro) y 200 mg/L (gris claro). Datos obtenidos por GC-ECD al final del periodo de cultivo y extracción según protocolo IV.5.3.2.

Se puede observar que la degradación tuvo lugar en todos los cultivos; sin embargo, las tasas más altas de degradación fueron obtenidas por *Lysinibacillus fusiformis* - aislado F3.3, *Bacillus mycoides* - aislado F3.2, *Bacillus pumilus* - aislado H1.4 y *Bacillus cereus* - aislado F4.1 (41 - 48% y 26 - 31% de DDT a 50 mg/L y 200 mg/L, respectivamente). Para los primeros cuatro aislados, cuyo crecimiento no fue afectado por altas concentraciones de DDT (200 mg/L, figura 36), se observaron proporciones similares entre la degradación a dos diferentes concentraciones de DDT, mientras que, en las otras cinco cepas la degradación fue menor en general y relativamente menos efectiva en presencia de 200 mg/L comparada con 50 mg/L. La disminución de la biodegradación de DDT a concentraciones más altas de pesticidas se había observado previamente en *Serratia marcescens* y para la mezcla compuesta de *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp<sup>[152]</sup>, *Pseudomonas* sp., y *Flavobacterium* sp. Entre otras cosas, la capacidad del género para reducir DDT a DDD (declorinación reductiva) ha sido demostrada usando en experimentos ya sea de manera individual o en combinación con otras cepas de bacterias o fúngicas<sup>[44,138,153,154,155]</sup>. Más específicamente, la cepa *Bacillus* sp. BHD-4 aislada de suelos contaminados, removió 51% de DDT en medio líquido fortificado con 50 mg/L de este pesticida en solo siete días de incubación<sup>[153]</sup>. En otro estudio ya mencionado que evalúa bacterias en suelos contaminados con pesticidas organoclorados y metales pesados, durante diez días de cultivo de *B. cereus* y *B. pumilus* en medio líquido conteniendo 50 mg/L de DDT, se encontró que solo

removieron de 12.8 – 36.6% de DDT. En el mismo estudio, *L.fusiformis* fue aislado e identificado, demostrando capacidad de degradar hasta 19.4% de DDT con concentración inicial de 50 mg/L<sup>[138]</sup>. También es relevante mencionar que en medio fortificado con 50 mg/L de DDT y después de diez días de incubación, *Serratia marcescens* NCIM 2919 degradó el 42% de la concentración inicial del pesticida<sup>[122]</sup>; los estudios mencionados respaldan los resultados obtenidos en este trabajo.

Para tener una idea sobre la ruta de degradación de DDT, los metabolitos fueron extraídos del medio de cultivo después de dos semanas de incubación, cada cepa se cultivó por separado en presencia de 200 mg/L de DDT y fue analizada por GC-MS en modo full-scan.

Es necesario puntualizar que el enfoque fue sobre las especies de baja polaridad, correspondientes a relativamente “tempranos” metabolitos del DDT, mismos que han sido reportados en diferentes trabajos anteriores<sup>[117,118,126,138,142]</sup>. En este experimento, los compuestos identificados fueron los siguientes: *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDMU, *o,p'*-DDMU, DDMS, DDNU, DBP y DBH; los primeros cuatro se presentaron en todos los extractos, los demás fueron encontrados solo para algunas bacterias. La lista de metabolitos identificados junto con sus respectivos tiempos de retención, índices de retención experimentales ( $RI_{exp}$ ) y teóricos ( $RI_t$ ), y los puntajes de identificación (valor de coincidencia, NIST) se presentan en la tabla 33. En esta misma tabla, se muestra el espectro experimental del metabolito, adquirido analizando el extracto de *Lysinibacillus fusiformis* junto con respectivo espectro de base de datos (excepto para *p,p'*-DDMS cuyo espectro experimental corresponde al cultivo en consorcio, apartado IV.5.4.2). Los porcentajes de concordancia entre espectro experimental y el de referencia para todos los metabolitos fueron en el intervalo de 81.3 - 99.7% mientras que los porcentajes de diferencia entre los índices de retención teórico y experimental fueron por debajo de 2.6% (excepto para DBH con 5.0% y 12.3% para *p,p'*-DDNU); estos resultados son indicativos de una identificación confiable de los compuestos. Cabe señalar la notable similitud que tiene ésta lista de compuestos con previos reportes sobre biodegradación asistida por organismo tales como *Aeromonas hydrophila*<sup>[119]</sup>, *Chryseobacterium* sp. PYR2<sup>[40]</sup>, *Stenotrophomonas* sp.<sup>[118]</sup>, *Serratia marcescens* NCIM 2919<sup>[122]</sup>; incluso varias especies de *Bacillus*<sup>[156]</sup>. En estudios que se acaban de mencionar los principales metabolitos reportados fueron DDD, DDE y de

manera menos frecuente el DDMU<sup>[51,117,120,153,154]</sup>. En el caso específico de *Lysinibacillus fusiformis* solo fue reportado porcentaje de degradación de DDT<sup>[138]</sup>. Una vez identificados los metabolitos de DDT, los extractos de los medios de cultivo fortificados con 200 mg/L de DDT y con 14 días de exposición fueron analizados por GC-MS en modo SIM. Para este modo de adquisición, se establecieron las condiciones de detección, seleccionando los iones específicos para cada uno de los metabolitos (ión cuantificador y calificadores) así como ventanas de tiempo del cromatograma para adquisición de cada uno de estos iones.

En la figura 38, se presentan gráficamente las condiciones establecidas. Por su parte, en la figura 39, a manera de ejemplo, se muestran los cromatogramas obtenidos para *L. fusiformis* y control abiótico. Se observa claramente la presencia de ocho metabolitos en el extracto de cultivo bacteriano; en el orden de elución, estos fueron: DBP, *o,p'*-DDMU, DBH, *p,p'*-DDMU, DDMS, *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD y *p,p'*-DDD. Para cada compuesto, se adquirió la altura máxima del ion cuantificador en el tiempo de retención respectivo (*m/z* 139 para DBP y DBH, 212 para isómeros de DDMU, 235 para isómeros de DDD y DDMS, 246 para DDE).

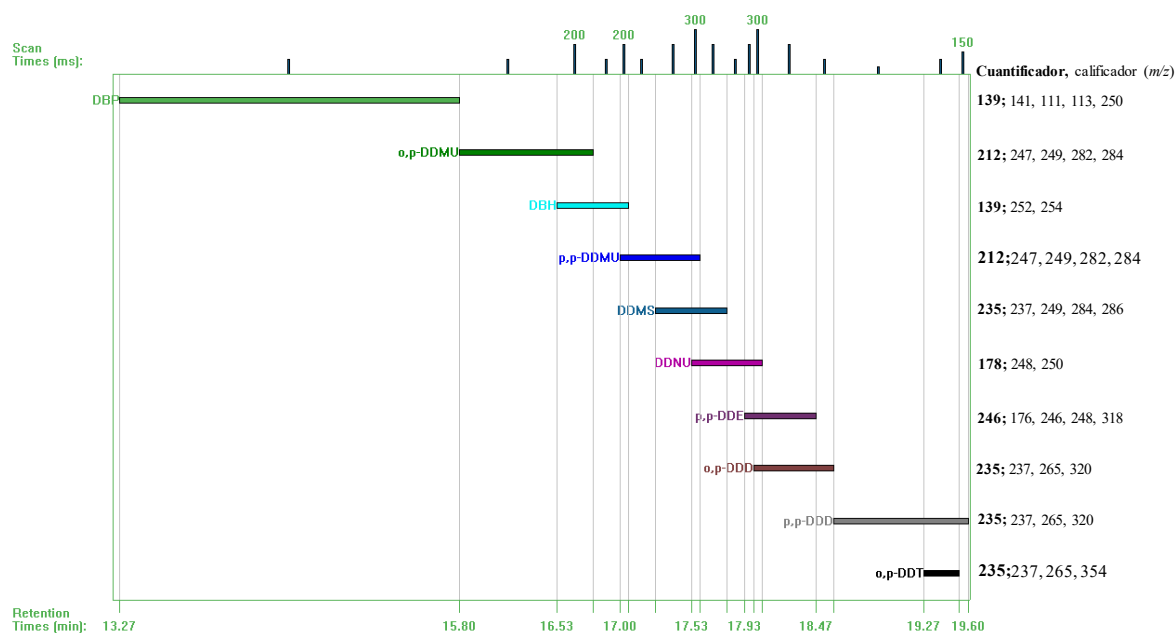
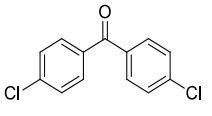
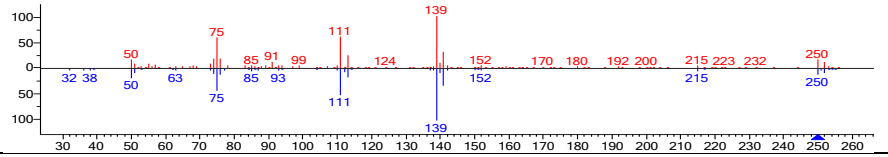
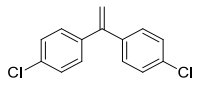
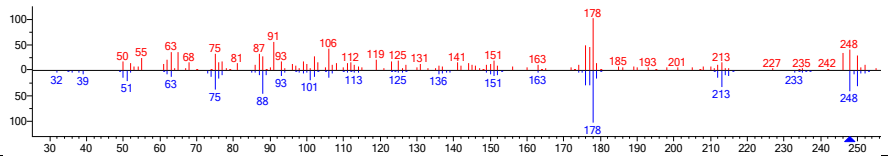
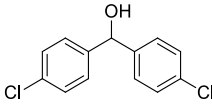
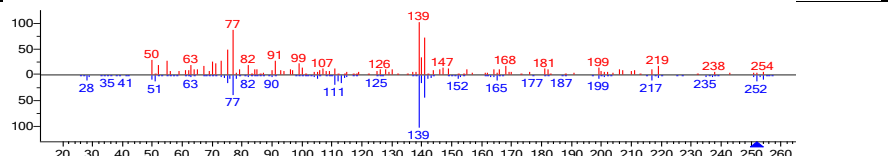
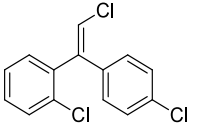
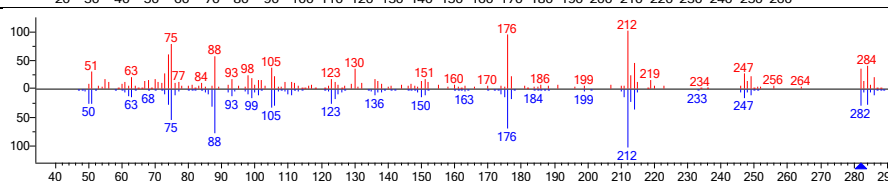
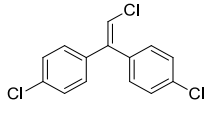
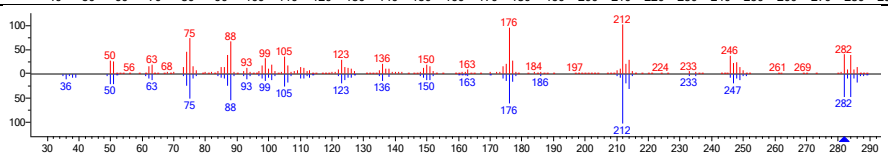
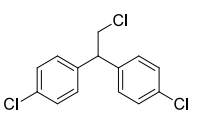
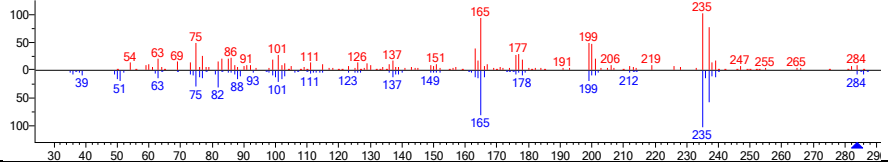
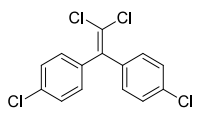
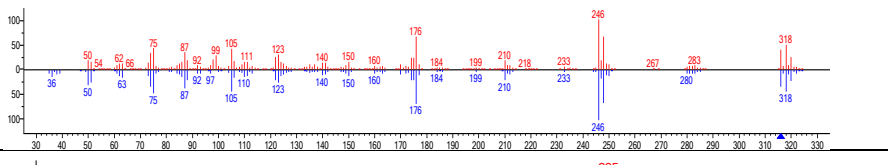
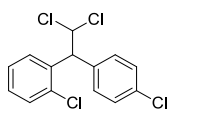
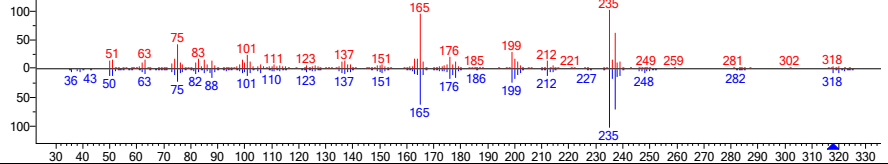
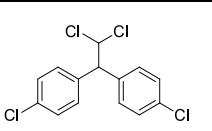
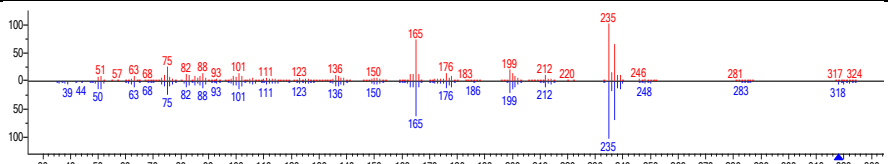


Figura 38. Parámetros de GC-MS para la adquisición de señales de metabolitos de DDT en modo SIM.

Tabla 33. Lista de metabolitos identificados en base a análisis en GC-MS de cultivos bacterianos después de 14 días de incubación en MLM conteniendo 200 mg/L de DDT.

Compuesto	Nombre	RT (min)	RI <sub>t</sub>	RI <sub>exp</sub>	Δ	Comparación entre espectro de masas	(%) NIST
	DBP	15.5	1962	2005	2.2		83.1
	DDNU	16.3	1893	2063	8.6		82.5
	DBH	16.8	1989	2088	5.0		81.3
	<i>o,p'</i> -DDMU	16.6	2087	2074	0.6		89.6
	<i>p,p'</i> -DDMU	17.2		2120	1.6		96.0



	<i>p,p'</i> - DDMS	17.5	2087	2137	2.4		81.3
	<i>p,p'</i> - DDE	18.2	2240	2182	2.6		96.8
	<i>o,p'</i> - DDD	18.4	2170	2193	1.1		99.7
	<i>p,p'</i> - DDD	19.4	2257	2256	0.1		99.7

Continuación de tabla 33. (RT – tiempo de retención;  $RI_t$  – índice de retención teórico de biblioteca NIST;  $RI_{exp}$  – índice de retención experimental;  $\Delta = (|RI_t - RI_{exp}|/RI_t)100$ ; espectros de masas: superior rojo - experimental; inferior azul - referencia)

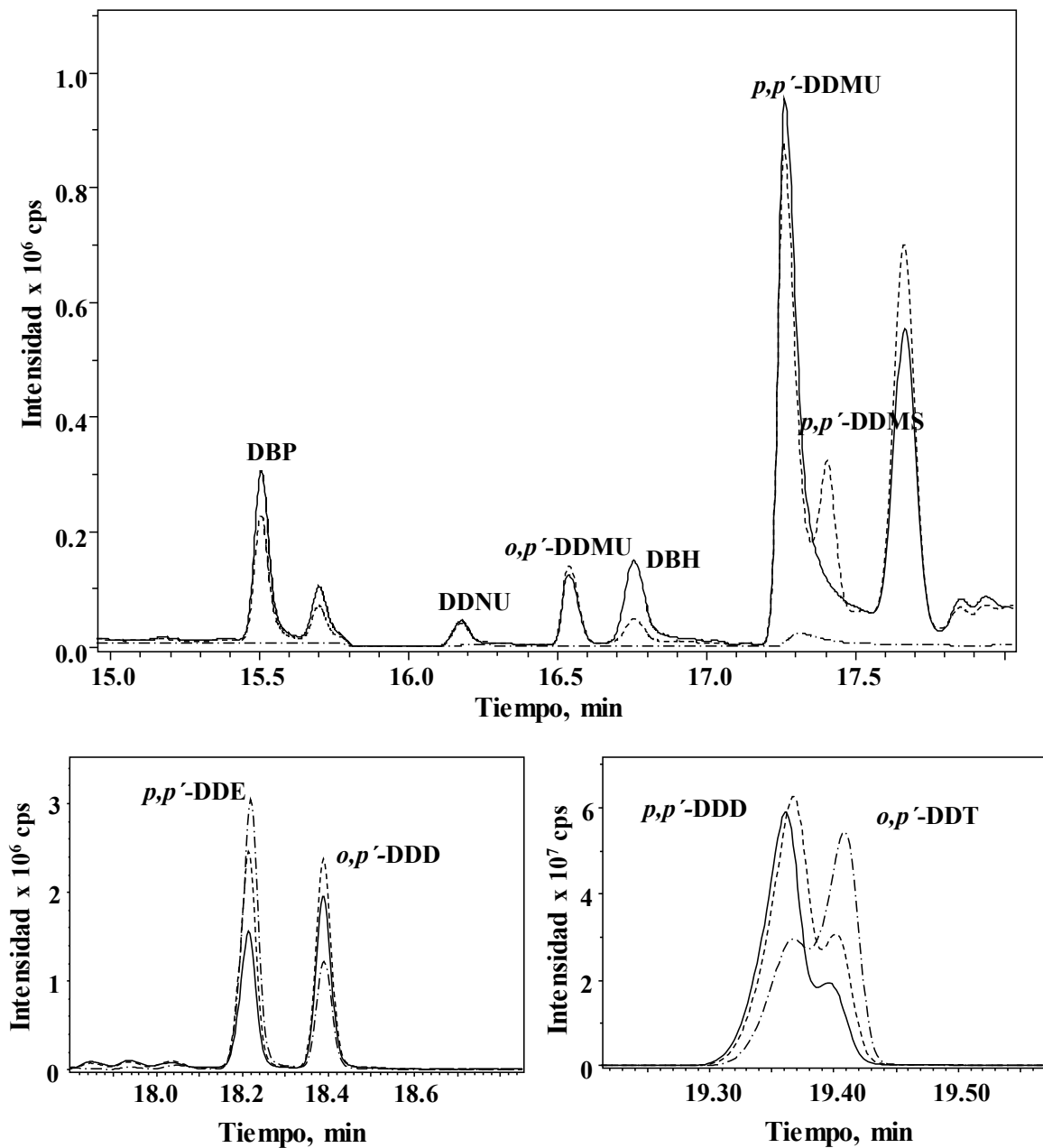


Figura 39. Cromatogramas GC-MS adquiridos en modo SIM para *L.fusiformis* – aislado F3.3 (—), cultivo en consorcio (---) y control abiótico (----) después de 14 días de incubación con 200 mg/L de DDT técnico. El cromatograma muestra la suma de las intensidades de los iones cuantificadores correspondientes a diez compuestos.

Hay que resaltar que para el experimento de biodegradación del DDT, se tomaron cantidades iguales de células de cada uno de los ocho aislados (aproximadamente  $10^8$  UFC), entonces, las abundancias de metabolitos adquiridos en modo SIM podrían usarse para la evaluación comparativa de la degradación de DDT asistida por los organismos individuales. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 40 para *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD y en la figura 41 para DBP, DDNU, *o,p'*-DDMU, DBH y *p,p'*-DDMU.

En la figura 40, también se incluyen los resultados cuantitativos obtenidos para los congéneres de DDT determinados por GC-ECD en estas mismas muestras. Como una evidencia de la congruencia de resultados analíticos obtenidos en este trabajo por GC-ECD y GC-MS, se puede observar una buena concordancia de los perfiles *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD en ocho cultivos entre el panel izquierdo (intensidades de iones adquiridas por GC-MS en modo SIM) y en el panel derecho (concentraciones determinadas por GC-ECD). Así mismo, dicha congruencia es notable en la figura 40.

Respecto a la biodegradación de DDT, los datos presentados en las figuras 40, 41 y la tabla 33, confirman que para todos los aislados, el proceso comenzó con una dechlorinación reductiva a DDD, como a menudo se reporta<sup>[51,117,126,157]</sup>. De hecho, el DDD se encontró en concentraciones relativamente altas en los sitios contaminados S1 y S2 (tabla 17), además fue encontrado como el metabolito más abundante en el análisis de cultivos expuestos a 200 mg/L de DDT.

Cabe mencionar que isómeros de DDD también fueron presentes en el control abiótico; sin embargo, la degradación de DDT a DDD fue apreciada inequívocamente en presencia de *L. fusiformis*, *B. mycoides*, *B. pumilus* y *B. cereus*, todos ellos presentando tolerancia a altas concentraciones de DDT. Para las otras cuatro bacterias restantes, los niveles de *p,p'*-DDD fueron similares a los observados en el control abiótico (más bajo para *o,p'*-DDD), lo que confirma una menor capacidad de estos microorganismos para degradar DDT pero también sugiere el carácter intermediario del DDD en estos cultivos.

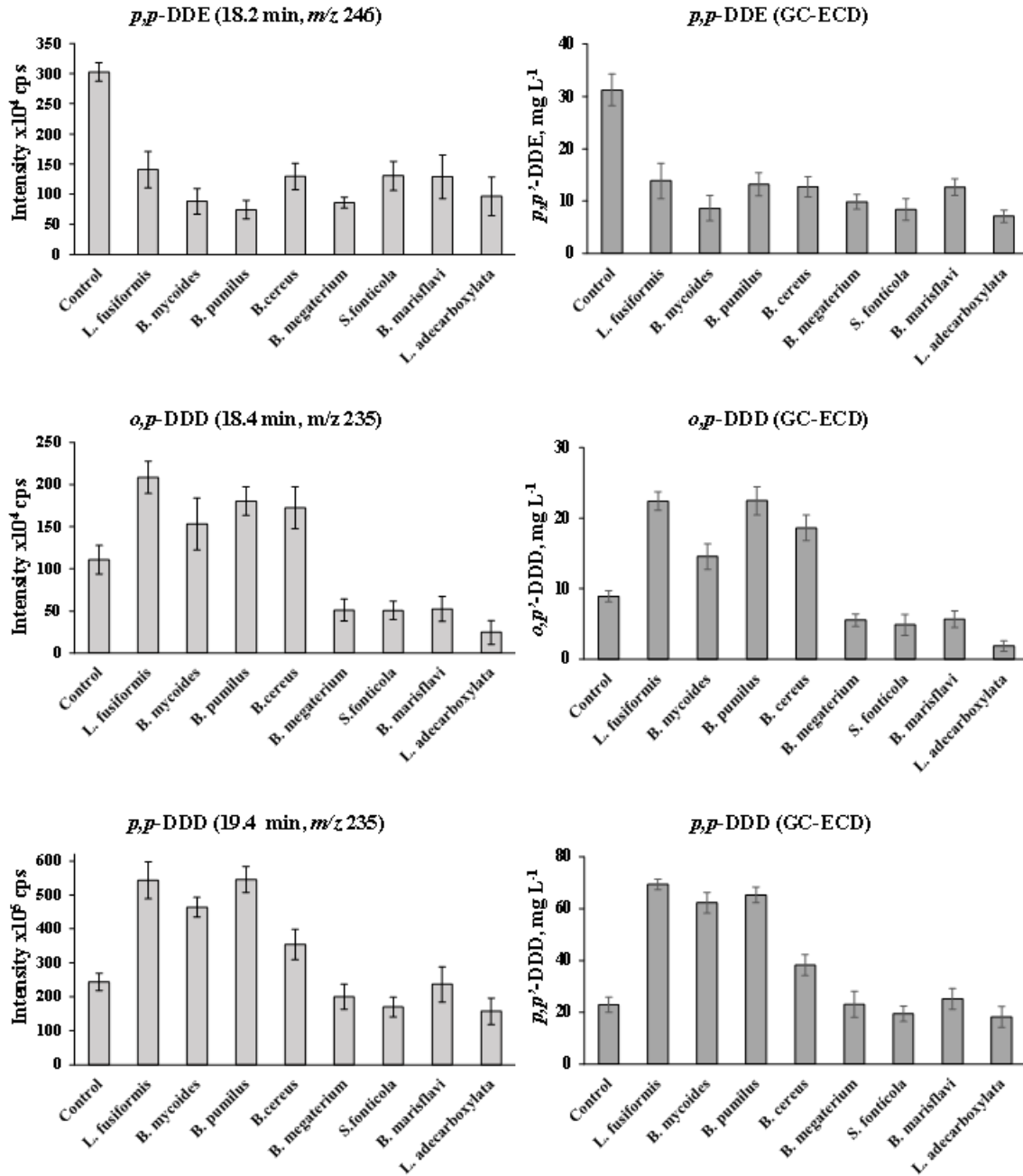


Figura 40. Evaluación comparativa de las abundancias de *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDD y *p,p'*-DDD en los extractos obtenidos para cepas individuales después de dos semanas de crecimiento en presencia de 200 mg/L de DDT. Panel izquierdo: intensidades de las señales adquiridas por GC-MS en modo SIM; Panel derecho: concentraciones de estos compuestos determinadas por GC-ECD. Los valores medios se presentan con desviaciones estándar respectivas basadas en tres replicas

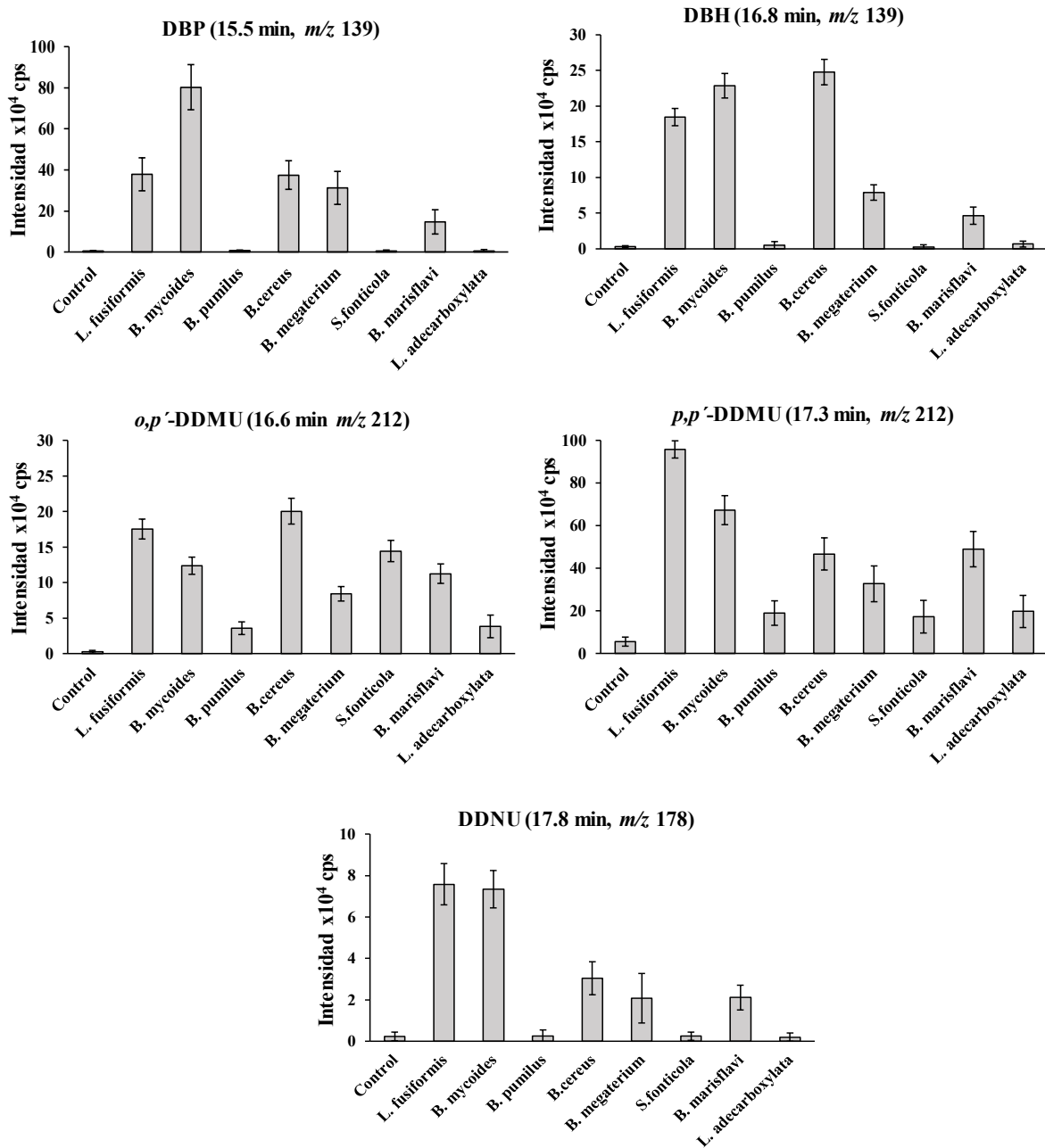


Figura 41. Evaluación comparativa de las abundancias de metabolitos de DDT (DBP; DDNU; *o,p'*-DDMU; DBH; *p,p'*-DDMU), representando intensidad de las respectivas señales adquiridas por GC-MS (SIM) en los extractos de medios de cultivos individuales de las cepas después de 14 días de exposición a 200 mg/L de DDT. Se presentan valores promedio con sus respectivas desviaciones estándar basadas en tres réplicas.

Cabe recordar que, el DDT técnico contiene alrededor de 2.57 % de DDE y, por lo tanto, no es sorpresa que este compuesto fuera relativamente abundante en el control abiótico (figura 40). La cantidad de DDE en el medio de cultivo (14 días) fue menor comparado con el control abiótico y similar para todas las cepas de bacterias, indicando capacidad de estos organismos para metabolizar DDE. Estos resultados son intrigantes debido a que el DDE es considerado como un producto de degradación de DDT particularmente persistente y altamente recalcitrante; sin embargo, su conversión a DDMU por bacterias nativas ya ha sido observadas anteriormente<sup>[17,51,158]</sup>.

Ciertamente, la declorinación reductiva de DDD y, en menor medida, la deshidrocloración de DDE con formación de DDMU han sido evidenciados en varias investigaciones previas<sup>[159,160,161,162]</sup> y ambos procesos tuvieron lugar en los ocho cultivos bacterianos analizados en este trabajo.

Tres productos de degradación más avanzados en comparación con DDMU fueron encontrados en cinco bacterias (*L. fusiformis* - aislado F3.3, *B. mycooides* - aislado F3.2, *B. cereus* - aislado F4.1, *B. megaterium* - aislado A3.2, *B. marisflavi* - aislado F1.2); el más abundante de ellos fue DBP, seguido por DBH y DDNU (figura 41).

En el capítulo I, se destacó que la ruta de biodegradación de DDT depende de varios factores y principalmente de la identidad de los microorganismos involucrados; sin embargo, DDNU ha sido a menudo apuntada como un intermediario formado a partir de DDMU por declorinación reductiva<sup>[17,158,163,164]</sup>. La baja abundancia de DDNU observada en este trabajo, apoya la suposición de que sea un compuesto con carácter intermediario.

En cuanto a DBP<sup>[25,165]</sup>, generalmente se considera como un producto de biodegradación más allá de DDMU y se han propuesto diferentes rutas de transformación de DDMU a DBP a través de reacciones de hidroxilación, carboxilación y oxidación; dependiendo de los microorganismos y de las condiciones experimentales. DDMS, DDNS, DDNU, DDOH, DDA y DBH fueron asignados como intermediarios que preceden al DBP<sup>[166,167,168]</sup>.

Entre estos compuestos, solo DDNU y DBH fueron encontrados en este trabajo y solamente en cinco cepas aisladas con demostrada capacidad de degradación de DDT más allá de

DDMU; en particular, la detección de DBH sugiere que reacciones de hidroxilación podrían contribuir en la ruta de degradación<sup>[34,51,169]</sup>.

Acumulando la evidencia experimental, en la figura 42 se propone ruta de degradación de DDT; las cepas que participan se enumeran en cada paso y las conversiones que pueden ocurrir no directamente, están marcadas con una línea punteada. Cabe destacar que ninguna evidencia en este trabajo, apunta a la capacidad de las bacterias aisladas para la deshidrocloración de DDT a DDE, mientras que se observó degradación de DDT a DDD para las ocho bacterias.

#### **IV.5.4.2. Prueba de capacidad de los ocho aislados bacterianos en co-cultivo para la degradación de DDT.**

El uso de co-cultivos bacterianos o de consorcios de diferentes organismos es una estrategia muy común en biorremediación y ha sido también explorado para DDT<sup>[120,135]</sup>. Para examinar un posible incremento en la biodegradación de DDT en comparación con la observada para bacterias individuales, se preparó un co-cultivo conteniendo cantidades iguales de las ocho bacterias y expuestas como se describió en la sección anterior (ver sección IV.4.3.5).

El análisis por GC-ECD reveló una degradación de solo 23.7% de DDT después de dos semanas de crecimiento, es decir, ligeramente menor comparado con los resultados obtenidos para *L. fusiformis* (aislado F3.3), *B. mycoides* (aislado F3.2), *B. pumilus* (aislado H1.4), y *B. cereus* (aislado F4.1). El análisis por GC-MS en modo SIM del extracto del co-cultivo es incluido en la figura 38, en ella se puede observar que el extracto contiene los mismos ocho metabolitos encontrados en los cultivos individuales y fue muy similar al obtenido para *L. fusiformis*- aislado F3.3, excepto por DDE.

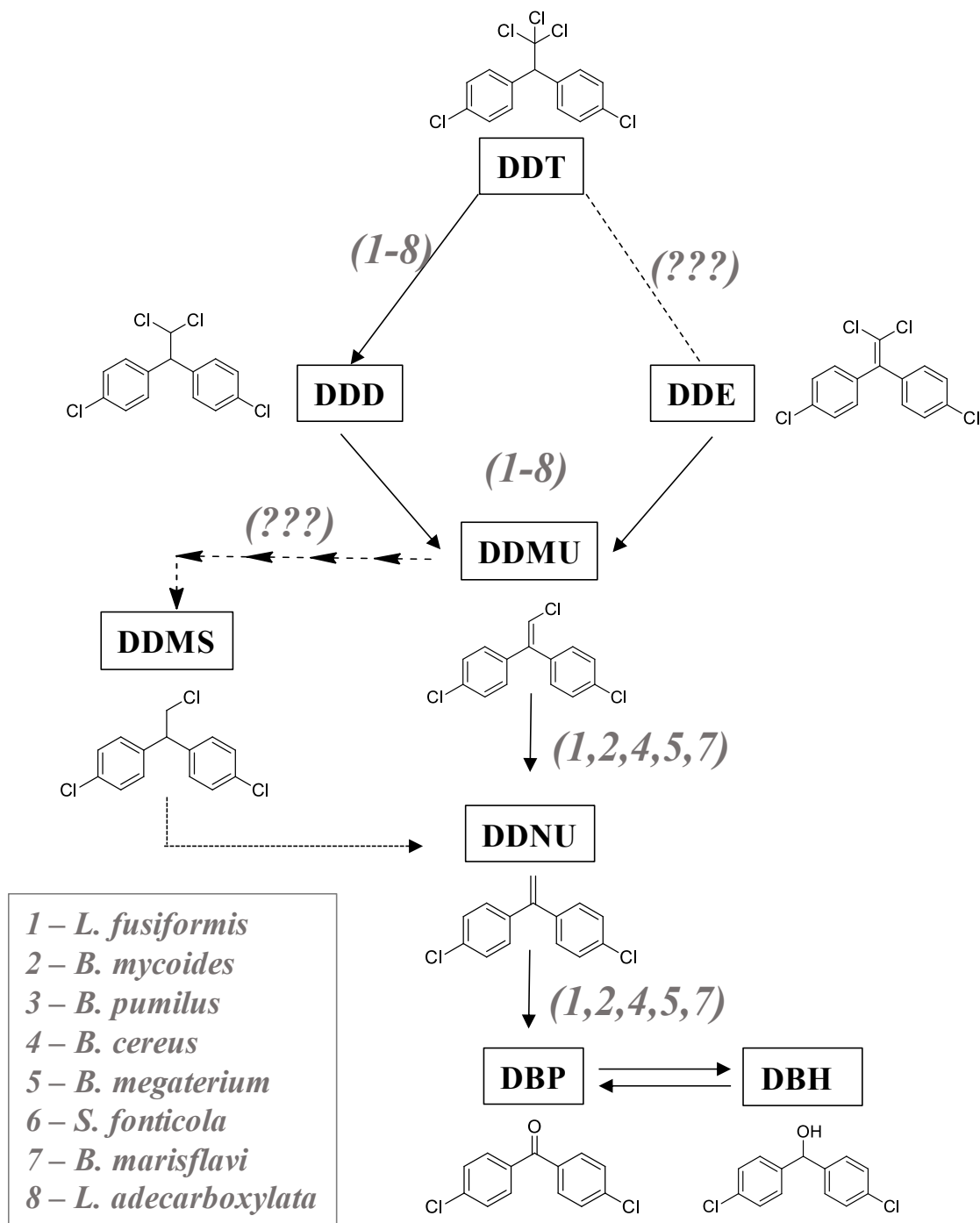


Figura 42. Propuesta de ruta de degradación de DDT por bacterias nativas y aisladas de sitios S1-S4. (Línea sólida indica las conversiones directas, la línea punteada se usó para indicar conversiones que podrían ocurrir no directamente; el número indica el aislado participante en cada transformación; los signos de interrogación son usados para aquellas transformaciones que no se puede atribuir a un aislado específico.



Por otra parte, el cultivo consorcio fue el único en el que se encontró un metabolito adicional, el DDMS. Este resultado es muy relevante ya que indica que las bacterias aisladas en este estudio tienen la capacidad de biodegradar el DDT más allá de DDMU. Cabe señalar que, para DDMS y *p,p'*-DDMU, la biblioteca NIST provee el mismo índice de retención (tabla 33); sin embargo, la separación cromatográfica de estos dos compuestos ha sido previamente reportada. La separación de los dos metabolitos y altos valores de coincidencia NIST (score) (96.0% para *p,p'*-DDMU y 81.3% para DDMS, tabla 33), demuestran que se logró la identificación correcta de AMDIS. Es por ello que el DDMS ha sido incluido como un posible intermediario en la ruta de biodegradación propuesta en la figura 42; sin embargo, este compuesto solo fue observado en el cultivo consorcio.

Una posible razón para ello es indudablemente la presencia de varios organismos en un solo cultivo. Se ha reportado una mejor extracción de metabolitos no polares formados por una cepa específica en presencia de otra que produce moléculas biosurfactantes. De hecho, los beneficios potenciales del uso de consorcios dependen de la combinación de diferentes sistemas enzimáticos degradativos específicos para cada cepa, pero también comprenden la exudación de biosurfactantes que contribuyen a una mejor solubilización y biodisponibilidad de contaminantes no polares para la degradación de microorganismos<sup>[170,171,172,173]</sup>. De todos modos, en un trabajo futuro sería necesario emplear otras condiciones de extracción, que aseguren la detección de metabolitos más avanzados, esperando encontrar DDMS (y posiblemente otros metabolitos) en los cultivos de al menos algunas de las ocho bacterias seleccionadas.

#### **IV.5.5 Conclusión**

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo demuestran que los ocho aislados bacterianos presentaron capacidad de crecer en medio mínimo líquido (enriquecido con 0.5% de glicerol) en presencia de altas concentraciones de DDT (200 mg/L). Estas bacterias fueron capaces de degradar al pesticida formando una serie de metabolitos “tempranos”.

Basados sobre el análisis de GC-MS de los medios extraídos después de dos semanas de cultivo, las ocho bacterias fueron capaces de degradar DDT, DDD y DDE a DDMU; sin

embargo, descomposición más avanzada con formación de DDNU, DBP y DBH fue encontrado solo para *L.fusiformis* – aislado F3.3, *B. mycoides* – aislado F3.2, *B. cereus* – aislado F4.1, *B. marisflavi* – aislado F1.2 y *B. megaterium* – aislado A3.2.

Dentro del contexto de posible utilidad para biodegradación de DDT, el análisis de metabolitos por GC-MS en modo SIM, señaló el potencial mayor para *L. fusiformis* - F3.3, *B. mycoides* - F3.2 y *B. cereus* - F4.1. Es digno de mención que se han encontrado previamente diferentes especies de *Bacillus* como capaces de degradar pesticidas organoclorados; sin embargo, no se reportaron metabolitos más avanzados que DDMU. Además, *Lysinibacillus fusiformis* se mencionó solo en un estudio previo y solo se proporcionó el porcentaje de degradación de DDT. Dado que los congéneres de DDT y los productos de degradación “temprana” son persistentes y tóxicos, encontrar los productos de descomposición más avanzada en este trabajo es importante para la posible aplicación futura de bacterias en la biorremediación.

También se ha investigado la viabilidad de la biodegradación del DDT por cultivo mixto compuesto por ocho bacterias; el DDMS se detectó como un metabolito adicional que confirma aún más la descomposición del DDT más allá del DDMU, aunque no se obtuvo un aumento del porcentaje de degradación del pesticida. Finalmente, en base a los resultados obtenidos, se ha propuesto una vía de biodegradación, asignando cepas individuales que participan en cada paso de conversión. Se están realizando más estudios con el objetivo de optimizar el proceso de biodegradación del DDT con el uso de tres bacterias indígenas seleccionadas: *L. fusiformis* - aislado F3.3, *B. mycoides* – aislado F3.2 y *B. cereus* - aislado F4.1, incluyendo la detección/identificación de metabolitos polares avanzados.

## Capítulo V. CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo de tesis fue centrado en la selección de bacterias nativas del sitio contaminado con DDT, ubicado en terrenos industriales en la ciudad de Salamanca, Gto., como potenciales candidatos para procesos de biorremediación. Para ello, se han utilizado diferentes herramientas de química analítica, principalmente cromatografía de gases con diferentes tipos de detectores.

En la primera parte de trabajo, se determinó los congéneres del DDT en cuatro diferentes muestras recolectadas del sitio contaminado, basándose en el uso de cromatografía de gases con detector ECD y detector másico de triple cuadrupolo. Debido a altas concentraciones del DDT en las muestras y problemas de su co-elución observados en el sistema GC-MS, la determinación se realizó por GC-ECD. Cabe mencionar que la plataforma Pro EZGC<sup>®</sup> Chromatogram Modeler<sup>BETA</sup> de RESTEK resultó muy útil en la selección de las condiciones cromatográficas.

En la siguiente parte de la tesis, se aislaron los microorganismos nativos del sitio contaminado, obteniéndose 14 aislados fúngicos y 25 aislados de bacterias. Se utilizó el sistema MALDI-TOF MS con Biotyper para la identificación de estos aislados. Dada la escasez de bibliotecas “caseras”, se obtuvieron espectros principales, siguiendo en cada una de las etapas, las estrategias de aseguramiento de calidad. Se modificó el protocolo de extracción de proteínas, en el que la lisis células con el ácido fórmico se combinó con homogeneización con perlas de circonio. El dendograma generado del análisis PCA mostró ciertas similitudes entre los espectros, sugiriendo que algunos aislados pertenecieron al mismo género; sin embargo, para la identificación contundente, es necesario realizar el análisis de ADN de estos microorganismos. En el caso de bacterias, se obtuvo identificación de veinte aislados a nivel de especie y cuatro fueron asignados a nivel de género. La mayoría de los aislados pertenecieron al género *Bacillus* (44%) y *Pseudomonas* (20%), respectivamente.

Mediante experimentos de crecimiento de las bacterias en diferentes medios y en presencia de diferentes concentraciones de DDT, se demostró que ocho aislados fueron capaces de tolerar concentraciones de al menos 200 mg/L de DDT en el medio de crecimiento MML: *L. fusiformis* - aislado F3.3, *B. mycoides* - aislado F3.2, *B. pumilus* - aislado H1.4, *B. cereus* -

aislado F4.1, *B. marisflavi* - aislado F1.2, *B. megaterium* - aislado A3.2, *L. adecarboxylata* - aislado A1.1 y *S. fonticola* - aislado A3.1.

Se obtuvieron cultivos de los ocho aislados seleccionados y, mediante las herramientas de GC-ECD y GC-MS se estudió su capacidad de biodegradar/metabolizar el DDT. Para ello, se analizaron los medios de cultivo enriquecidos con 50 y 200 mg/L DDT frescos y después de dos semanas de crecimiento bacteriano. Las condiciones de extracción aplicadas a dichos medios de cultivo fueron apropiadas para lograr la extracción de congéneres y metabolitos relativamente “tempranos” del pesticida. En cuanto a los porcentajes de degradación del DDT, con base en los resultados de GC-ECD, se encontró el siguiente orden decreciente de la capacidad de los ocho organismos: *L. fusiformis* > *B. mycooides* > *B. pumilus* ≈ *B. cereus* > *B. megaterium* ≈ *S. fonticola* > *B. marisflavi* > *L. adecarboxylata*. Por su parte, el análisis de extractos de los medios de cultivo por GC-MS en el modo full scan permitió identificar los siguientes metabolitos: DDMU, DDNU, DBP y DBH, basándose en el programa AMDIS, valores de los índices de retención y usando bibliotecas de espectros disponibles en el laboratorio. Para estos compuestos y para congéneres del DDT, se establecieron las condiciones de detección en modo SIM y, a partir del análisis de medios obtenidos creciendo bacterias en presencia de 200 mg/L DDT, se evaluaron comparativamente las abundancias de estos metabolitos en cada uno de los cultivos. En primer lugar, se observó que los ocho aislados fueron capaces de degradar DDT a DDD y DDE a DDMU; sin embargo, la formación de compuestos de descomposición más avanzada como DDNU, DBP y DBH se observaron solamente para *L. fusiformis* - aislado F3.3, *B. mycooides* - aislado F3.2, *B. cereus* - aislado F4.1, *B. marisflavi* - aislado F1.2 y *B. megaterium* - aislado A3.2.

Los resultados por GC-MS en modo SIM, revelaron que *L. fusiformis* - F3.3, *B. mycooides* - F3.2 y *B. cereus* - F4.1, son bacterias con mayor potencial de biodegradación. De la búsqueda bibliográfica realizada, aparentemente, metabolitos de degradación más avanzados como DDMU no fueron reportados aun en cultivos bacterianos. Además, *L. fusiformis* fue mencionada solo en un estudio previo y únicamente se reportó porcentaje de degradación de DDT.

Para examinar posible sinergia entre los ocho microorganismos en la biodegradación del DDT, se obtuvo su co-cultivo el cual se expuso al DDT 200 mg/L durante dos semanas. El medio gastado de este co-cultivo se analizó por GC-ECD y GC-MS en modo SIM. Aunque

no se observó ningún incremento del porcentaje de degradación de DDT, este experimento permitió detectar un metabolito adicional (DDMS), sugiriendo que la sinergia entre organismos puede ocurrir mediante exudación de biosurfactantes (u otros agentes) que potencialmente afectan la solubilidad/disponibilidad de los metabolitos del DDT.

El DDT y sus productos de degradación “temprana” son persistentes y tóxicos, por ello, los resultados de este trabajo y específicamente, la detección de los metabolitos más avanzados que DDMU es de suma importancia para la posible aplicación futura de bacterias en la biorremediación. La detección de DDMS en el co-cultivo confirma aún más la descomposición del DDT más allá del DDMU por los aislados bacterianos nativos del sitio contaminado. Hay que enfatizar que estos resultados forman una aportación novedosa en el área de la biodegradación del DDT por bacterias nativas de los sitios contaminados con este pesticida. En base a los resultados obtenidos, se ha propuesto una vía de biodegradación, asignando cepas individuales que participan en cada paso de conversión.

De manera general, los resultados de este trabajo de tesis permiten recomendar las siguientes bacterias aisladas, como potenciales candidatas en la biodegradación del DDT en sitio industrial contaminado en la ciudad de Salamanca: *L. fusiformis* - aislado F3.3, *B. mycoides* - aislado F3.2 y *B. cereus* – aislado F4.1.

Como perspectiva para un estudio futuro, para hallar el alcance de biodegradación del DDT por las bacterias seleccionadas, es necesario realizar el análisis de medios gastados utilizando las condiciones de extracción enfocadas en metabolitos más avanzados, es decir, de mayor polaridad respecto a los encontrados en este trabajo. Además de detectar/identificar otros metabolitos, el estudio futuro debe centrarse en la optimización de las condiciones de crecimiento para lograr eficientemente la biodegradación del DDT directamente en el sitio contaminado.

## Capítulo VI. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] N. García, 'Muerto', el río Lerma; el Turbio, 6° más sucio, Correo, [periodicocorreo.com.mx](http://periodicocorreo.com.mx), 2015.
- [2] R.S. BENAVIDES, "Fertimex-Tekchem: Un desastre ambiental en Salamanca" Un caso de políticas públicas, ITESO, Universidad Jesuita de Guadalajara, Jalisco, Mexico, 2019.
- [3] D.E.D.G. López, DEMANDA 2: ESTUDIO DE LA MIGRACIÓN DE CONTAMINANTES EN EL SUELO Y AGUA SUBTERRÁNEA DE SALAMANCA, GTO., <https://www.conacyt.gob.mx>.
- [4] M. Aamir, S. Khan, G. Li, Dietary exposure to HCH and DDT congeners and their associated cancer risk based on Pakistani food consumption, *Environ Sci Pollut Res Int* 25 (2018) 8465-8474.
- [5] C. Mallén Rivera, RACHEL CARSON, 50 AÑOS DE ROMPER EL SILENCIO, *Revista mexicana de ciencia forestal* 3 (2012) 6.
- [6] C. Bolognesi, F.D. Merlo, Pesticides: Human Health Effects A2 - Nriagu, J.O, *Encyclopedia of Environmental Health*, Elsevier, Burlington, 2011, pp. 438-453.
- [7] M.C. Alavanja, M.K. Ross, M.R. Bonner, Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure, *CA Cancer J Clin* 63 (2013) 120-142.
- [8] L.I.L. Wong, M.P. Labrecque, N. Ibuki, M.E. Cox, J.E. Elliott, T.V. Beischlag, p,p'-Dichlorodiphenyltrichloroethane (p,p'-DDT) and p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) repress prostate specific antigen levels in human prostate cancer cell lines, *Chemico-Biological Interactions* 230 (2015) 40-49.
- [9] P. Cocco, N. Kazerouni, S.H. Zahm, Cancer mortality and environmental exposure to DDE in the United States, *Environmental Health Perspectives* 108 (2000) 1-4.
- [10] B.A. Cohn, M.S. Wolff, P.M. Cirillo, R.I. Sholtz, DDT and Breast Cancer in Young Women: New Data on the Significance of Age at Exposure, *Environmental Health Perspectives* 115 (2007) 1406-1414.
- [11] D.H. Garabrant, J. Held, B. Langholz, J.M. Peters, T.M. Mack, DDT and Related Compounds and Risk of Pancreatic Cancer, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 84 (1992) 764-771.
- [12] J. Beard, DDT and human health, *Science of The Total Environment* 355 (2006) 78-89.
- [13] S.H.Z. Jan Dich, Annika Hanberg, Hans-Olov Adami, Pesticides and cancer, *Cancer Causes and Control* 8 (1997) 420-443.
- [14] R.R. Dietert, Chapter 18 - Transgenerational Epigenetics of Endocrine-Disrupting Chemicals, in: T. Tollefsbol (Ed.), *Transgenerational Epigenetics*, Academic Press, Oxford, 2014, pp. 239-254.
- [15] A. Mlynarcikova, M. Fickova, S. Scsukova, Impact of endocrine disruptors on ovarian steroidogenesis, *Endocrine Regulations* 48 (2014) 201-224.
- [16] M. Laura, E. Snchez-Salinas, E. Dantn Gonzalez, M. Luisa, Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process, (2013).
- [17] S. Sudharshan, R. Naidu, M. Mallavarapu, N. Bolan, DDT remediation in contaminated soils: a review of recent studies, *Biodegradation* 23 (2012) 851-863.
- [18] A. Corona-Cruz, G. Gold-Bouchot, M. Gutierrez-Rojas, O. Monroy-Hermosillo, E. Favela, Anaerobic-Aerobic Biodegradation of DDT (Dichlorodiphenyl Trichloroethane) in Soils, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63 (1999) 219-225.
- [19] M.M. Häggblom, I.D. Bossert, *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*, Springer US, 2007.

- [20] L.J. Nadeau, F.M. Menn, A. Breen, G.S. Sayler, Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5, *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1994) 51.
- [21] A.G. Hay, D.D. Focht, Transformation of 1,1-dichloro-2,2-(4-chlorophenyl)ethane (DDD) by *Ralstonia eutropha* strain A5, *FEMS Microbiology Ecology* 31 (2000) 249-253.
- [22] D.D. Focht, M. Alexander, DDT Metabolites and Analogs: Ring Fission by *Hydrogenomonas*, *Science* 170 (1970) 91-92.
- [23] A.G. Hay, D.D. Focht, Cometabolism of 1,1-Dichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl)Ethylene by *Pseudomonas acidovorans* M3GY Grown on Biphenyl, *Applied and Environmental Microbiology* 64 (1998) 2141.
- [24] J. Niu, J. Wang, D. Cui, X. Liu, H. Guang, Study on the isolation, identification and degradation characterization of a DDT-degrading bacteria, *Advanced Materials Research*, 2012, pp. 2030-2033.
- [25] A.S. Purnomo, I. Kamei, R. Kondo, Degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by brown-rot fungi, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105 (2008) 614-621.
- [26] B. Wetterauer, M. Ricking, J.C. Otte, A.V. Hallare, A. Rastall, L. Erdinger, J. Schwarzbauer, T. Braunbeck, H. Hollert, Toxicity, dioxin-like activities, and endocrine effects of DDT metabolites—DDA, DDMU, DDMS, and DDCN, *Environmental Science and Pollution Research* 19 (2012) 403-415.
- [27] P. Wycisk, H. Weiss, A. Kaschl, S. Heidrich, K. Sommerwerk, Groundwater pollution and remediation options for multi-source contaminated aquifers (Bitterfeld/Wolfen, Germany), *Toxicology Letters* 140–141 (2003) 343-351.
- [28] K. Frische, J. Schwarzbauer, M. Ricking, Structural diversity of organochlorine compounds in groundwater affected by an industrial point source, *Chemosphere* 81 (2010) 500-508.
- [29] S.D.M.A.Y.R. NATURALES, NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-021-SEMARNAT-2000 QUE ESTABLECE LAS ESPECIFICACIONES DE FERTILIDAD, SALINIDAD Y CLASIFICACIÓN DE SUELOS, ESTUDIO, MUESTREO Y ANÁLISIS., in: S.D.M.A.Y.R. NATURALES (Ed.), Segunda edición, Diario Oficial de la Federación, 2002.
- [30] S.D.M.A.Y.R. NATURALES, NORMA Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación., in: SEMARNAT (Ed.), DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN, 2013.
- [31] SEMARNAT, NORMA Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo Hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio., 2004.
- [32] K.T. Semple, B.J. Reid, T.R. Fermor, Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants, *Environmental Pollution* 112 (2001) 269-283.
- [33] W.J.W. Peter J. Marks, Amy F. Loncar, REMEDIATION TECHNOLOGIES SCREENING MATRIX AND REFERENCE GUIDE, in: U.S.A.E. Center (Ed.), 1994.
- [34] J.M. Aislabie, N.K. Richards, H.L. Boul, Microbial degradation of DDT and its residues—A review, *New Zealand Journal of Agricultural Research* 40 (1997) 269-282.
- [35] J.-B. L'Abbée, Y. Tu, D. Barriault, M. Sylvestre, Insight into the metabolism of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by biphenyl dioxygenases, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 516 (2011) 35-44.

- [36] Y.-J. Yim, J. Seo, S.-I. Kang, J.-H. Ahn, H.-G. Hur, Reductive Dechlorination of Methoxychlor and DDT by Human Intestinal Bacterium *Eubacterium limosum* Under Anaerobic Conditions, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54 (2008) 406-411.
- [37] F. Cao, T.X. Liu, C.Y. Wu, F.B. Li, X.M. Li, H.Y. Yu, H. Tong, M.J. Chen, Enhanced Biotransformation of DDTs by an Iron- and Humic-Reducing Bacteria *Aeromonas hydrophila* HS01 upon Addition of Goethite and Anthraquinone-2,6-Disulphonic Disodium Salt (AQDS), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (2012) 11238-11244.
- [38] R. Bidlan, H.K. Manonmani, Aerobic degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT-1P, *Process Biochemistry* 38 (2002) 49-56.
- [39] H. Fang, B. Dong, H. Yan, F. Tang, Y. Yu, Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil, *J Hazard Mater* 184 (2010) 281-289.
- [40] J. Qu, Y. Xu, G.-M. Ai, Y. Liu, Z.-P. Liu, Novel *Chryseobacterium* sp. PYR2 degrades various organochlorine pesticides (OCPs) and achieves enhancing removal and complete degradation of DDT in highly contaminated soil, *Journal of Environmental Management* 161 (2015) 350-357.
- [41] X. Pan, D. Lin, Y. Zheng, Q. Zhang, Y. Yin, L. Cai, H. Fang, Y. Yu, Biodegradation of DDT by *Stenotrophomonas* sp. DDT-1: Characterization and genome functional analysis, *Scientific Reports* 6 (2016) 21332.
- [42] K.C. Patil, F. Matsumura, G.M. Boush, Degradation of Endrin, Aldrin, and DDT by Soil Microorganisms, *Applied Microbiology* 19 (1970) 879-881.
- [43] J. Aislabie, A.D. Davison, H.L. Boul, P.D. Franzmann, D.R. Jardine, P. Karuso, Isolation of *Terrabacter* sp. Strain DDE-1, Which Metabolizes 1,1-Dichloro-2,2-Bis(4-Chlorophenyl)Ethylene when Induced with Biphenyl, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999) 5607-5611.
- [44] R.C. Kuhad, A.K. Johri, A. Singh, O.P. Ward, Bioremediation of Pesticide-Contaminated Soils, in: A. Singh, O.P. Ward (Eds.), *Applied Bioremediation and Phytoremediation*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2004, pp. 35-54.
- [45] *Textbook of Environmental Microbiology*.
- [46] *Microbiological Decomposition of Chlorinated Aromatic Compounds*, Taylor & Francis, 1986.
- [47] G. Kulshrestha, A. Kumari, Simultaneous Degradation of Mixed Insecticides by Mixed Fungal Culture Isolated from Sewage Sludge, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2010) 11852-11856.
- [48] A. Mansouri, M. Cregut, C. Abbes, M.-J. Durand, A. Landoulsi, G. Thouand, The Environmental Issues of DDT Pollution and Bioremediation: a Multidisciplinary Review, *Applied Biochemistry and Biotechnology* (2016) 1-31.
- [49] J.A. Bumpus, R.H. Powers, T. Sun, Biodegradation of DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethene) by *Phanerochaete chrysosporium*, *Mycological Research* 97 (1993) 95-98.
- [50] A.L. Juhasz, R. Naidu, Apparent degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) by a *Cladosporium* sp, *Biotechnology Letters* 21 (1999) 991-995.
- [51] J. Foght, T. April, K. Biggar, J. Aislabie, Bioremediation of DDT-Contaminated Soils: A Review, *Bioremediation Journal* 5 (2001) 225-246.
- [52] P. Xiao, T. Mori, I. Kamei, R. Kondo, A novel metabolic pathway for biodegradation of DDT by the white rot fungi, *Phlebia lindtneri* and *Phlebia brevispora*, *Biodegradation* 22 (2011) 859-867.
- [53] EPA, EPI Suite™-Estimation Program Interface, 2016.



- [54] Z. Erdem, T.J. Cutright, Biodegradation Potential of 1,1,1-Trichloro-2,2-Bis(p -Chlorophenyl) Ethane (4,4'-DDT) on a Sandy-Loam Soil Using Aerobic Bacterium *Alcaligenes eutrophus* A5, *Environmental Engineering Science* 33 (2016) 149-159.
- [55] P. Seng, M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P.E. Fournier, J.M. Rolain, D. Raoult, Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, *Clin Infect Dis* 49 (2009) 543-551.
- [56] M.F. Mazzeo, A. Sorrentino, M. Gaita, G. Cacace, M. Di Stasio, A. Facchiano, G. Comi, A. Malorni, R.A. Siciliano, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Discrimination of Food-Borne Microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2006) 1180-1189.
- [57] A. Álvarez-Buylla, E. Culebras, J.J. Picazo, Identification of *Acinetobacter* species: Is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques?, *Infection, Genetics and Evolution* 12 (2012) 345-349.
- [58] B. Daltonics, MALDI Biotyper CA System, Clinical Application for Identification of Microorganisms, Billerica, MA USA, 2014.
- [59] B. Daltonics, Training MALDI Biotyper/ IVD MALDI Biotyper, in: M.o.s. value (Ed.), Training MALDI Biotyper/ IVD MALDI Biotyper, Bruker Daltonics, 2012.
- [60] T. Maier, S. Klepel, U. Renner, M. Kostrzewa, Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification, *Nature Methods* 3 (2006).
- [61] [https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH\\_233375.html](https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_233375.html).
- [62] G.R. van der Hoff, P. van Zoonen, Trace analysis of pesticides by gas chromatography, *Journal of Chromatography A* 843 (1999) 301-322.
- [63] A. Beyer, M. Biziuk, Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food, *Food Chemistry* 108 (2008) 669-680.
- [64] J.G. Martins, A. Amaya Chávez, S.M. Waliszewski, A. Colín Cruz, M.M. García Fabila, Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk, *Chemosphere* 92 (2013) 233-246.
- [65] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review, *Anal Bioanal Chem* 389 (2007) 1663-1683.
- [66] V.K.A. Kidwai, (Ed.), *Basic Principles of Green Chemistry*, Springer, Dordrecht, New Delhi, India, 2004.
- [67] Z. Wang, (Ed.), *Green Chemistry: Recent Advances in Developing Catalytic Processes in Environmentally-Benign Solvent Systems*, 2008.
- [68] D. Muir, E. Sverko, Analytical methods for PCBs and organochlorine pesticides in environmental monitoring and surveillance: a critical appraisal, *Anal Bioanal Chem* 386 (2006) 769-789.
- [69] EPA, METHOD 3610B : ALUMINA CLEANUP, (1996).
- [70] EPA, METHOD 3620C: FLORISIL CLEANUP, (July 2014).
- [71] S.A. Barker, Matrix solid-phase dispersion, *Journal of Chromatography A* 885 (2000) 115-127.
- [72] S. Magdic, J.B. Pawliszyn, Analysis of organochlorine pesticides using solid-phase microextraction, *Journal of Chromatography A* 723 (1996) 111-122.
- [73] Gaurav, V. Kaur, A. Kumar, A.K. Malik, P.K. Rai, SPME-HPLC: A new approach to the analysis of explosives, *Journal of Hazardous Materials* 147 (2007) 691-697.
- [74] E.Y. Zeng, *Persistent Organic Pollutants (POPs): Analytical Techniques, Environmental Fate and Biological Effects*, Elsevier Science, 2015.
- [75] G. Vas, K. Vekey, Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis, *J Mass Spectrom* 39 (2004) 233-254.

- [76] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Sorbent preconcentration procedures coupled to capillary electrophoresis for environmental and biological applications, *Analytica Chimica Acta* 616 (2008) 1-18.
- [77] C.J. Tao, J.Y. Hu, J.Z. Li, S.S. Zheng, W. Liu, C.J. Li, Multi-residue determination of pesticides in vegetables by gas chromatography/ion trap mass spectrometry, *Bull Environ Contam Toxicol* 82 (2009) 111-115.
- [78] R.-A. Doong, P.-L. Liao, Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction, *Journal of Chromatography A* 918 (2001) 177-188.
- [79] H.F.a.S.D. Çekiç, (Ed.), *Cloud Point Extraction of Pesticide Residues*, Istanbul University, Faculty of Engineering, Department of Chemistry, Istanbul Turkey, 2011.
- [80] S. Tao, L.Q. Guo, X.J. Wang, W.X. Liu, T.Z. Ju, R. Dawson, J. Cao, F.L. Xu, B.G. Li, Use of sequential ASE extraction to evaluate the bioavailability of DDT and its metabolites to wheat roots in soils with various organic carbon contents, *Sci Total Environ* 320 (2004) 1-9.
- [81] V.A. Santhi, T. Hairin, A.M. Mustafa, Simultaneous determination of organochlorine pesticides and bisphenol A in edible marine biota by GC–MS, *Chemosphere* 86 (2012) 1066-1071.
- [82] S.N. Sinha, V.K. Bhatnagar, P. Doctor, G.S. Toteja, N.P. Agnihotri, R.L. Kalra, A novel method for pesticide analysis in refined sugar samples using a gas chromatography–mass spectrometer (GC–MS/MS) and simple solvent extraction method, *Food Chemistry* 126 (2011) 379-386.
- [83] M. Castillo, C. González, A. Miralles, An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC-MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (2011) 1315-1328.
- [84] W.L. Brahm Prakash, *Determination of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls Using GC/MS/MS Operated in the MRM Mode*, SHIMADZU Corporation, 7102 Riverwood Drive, Columbia, MD 21046, USA, 2016.
- [85] T. Heberer, U. Dünnebier, DDT Metabolite Bis(Chlorophenyl)acetic Acid: The Neglected Environmental Contaminant, *Environmental Science & Technology* 33 (1999) 2346-2351.
- [86] B. Łozowicka, E. Rutkowska, M. Jankowska, Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD, *Environmental Science and Pollution Research* (2017) 1-15.
- [87] R.P. Eganhouse, E.L. DiFilippo, Determination of 1-chloro-4-[2,2,2-trichloro-1-(4-chlorophenyl)ethyl]benzene and related compounds in marine pore water by automated thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry using disposable optical fiber, *Journal of Chromatography A* 1415 (2015) 38-47.
- [88] M.N. Al Mahmud, F. Khalil, M.M. Rahman, M.I. Mamun, M. Shoeb, A.M. Abd El-Aty, J.H. Park, H.C. Shin, N. Nahar, J.H. Shim, Analysis of DDT and its metabolites in soil and water samples obtained in the vicinity of a closed-down factory in Bangladesh using various extraction methods, *Environ Monit Assess* 187 (2015) 743.
- [89] J. Feng, H. Tang, D. Chen, L. Li, Monitoring and Risk Assessment of Pesticide Residues in Tea Samples from China, *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 21 (2015) 169-183.
- [90] P. Popp, C. Bauer, B. Hauser, P. Keil, L. Wennrich, Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine compounds from water: A comparison between solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction, *Journal of Separation Science* 26 (2003) 961-967.
- [91] K.F. Smart, R.B.M. Aggio, J.R. Van Houtte, S.G. Villas-Boas, Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Nat. Protocols* 5 (2010) 1709-1729.

- [92] F. Xu, L. Zou, C.N. Ong, Multioriginatation of Chromatographic Peaks in Derivatized GC/MS Metabolomics: A Confounder That Influences Metabolic Pathway Interpretation, *Journal of Proteome Research* 8 (2009) 5657-5665.
- [93] D.K.W. M. C. Q. Bianey García, Dra. Katarzyna Dorota Wrobel, Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa, Uso de cromatografía de gases con detector másico para la determinación de ftaltatos en muestras medioambientales y en alimentos, Departamento de Química, Universidad de Guanajuato, 2016.
- [94] <http://what-when-how.com/proteomics/quadrupole-mass-analyzers-theoretical-and-practical-considerations-proteomics/>, Triple quadrupole mass spectrometer (TQMS).
- [95] I.A. Fowles, *Gas chromatography* Second ed., University of Greenwich: John Wiley & Sons., Newcastle, 1995.
- [96] D.D. Hochmuth, *Retention\_index\_guide*, MassFinder, Germany, 2008-2012.
- [97] P.D.A.a.W.G. Mallard, *AMDIS User Guide*, National Institute of Standards and Technology (NIST), 2004.
- [98] P. Tan, X. Wei, H. Zhang, M. Niu, D. Zhang, A practical method for rapid screening and quantitative analysis of 130 pesticide residues in herbal medicines based on the Kovats retention index principle: an exemplary study using *Panacis quinquefolii radix*, *Analytical Methods* 11 (2019) 4868-4874.
- [99] F. Zhang, H. Wang, L. Zhang, J. Zhang, R. Fan, C. Yu, W. Wang, Y. Guo, Suspected-target pesticide screening using gas chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry with high resolution deconvolution and retention index/mass spectrum library, *Talanta* 128 (2014) 156-163.
- [100] SEMARNAT, Libro Blanco: ACCIONES Y OBRAS REALIZADAS Y EN PROCESO, PARA EL MANEJO AMBIENTALMENTE ADECUADO DE RESIDUOS Y REMEDIACIÓN DEL SITIO CONTAMINADO EN LA EX UNIDAD INDUSTRIAL FERTIMEX-TEKCHEM, SALAMANCA, GUANAJUATO., 2018.
- [101] G. maps, Tekchem maps, in: C.S.J.d.I.P. kilómetro 314.5 de la Carretera Federal No. 45, 36700 (Ed.), Imágenes © 2020 Maxar Technologies, Datos del mapa © 2020 INEGI, 220.
- [102] RESTEK, Pro EZGC<sup>R</sup> Chromatogram Modeler <sup>BETA</sup>, Pure Chromatography, [http://www.restek.com/proezgc/?accept\\_disclaimer=yes](http://www.restek.com/proezgc/?accept_disclaimer=yes).
- [103] EPA, 8000D-DETERMINATIVE CHROMATOGRAPHIC SEPARATIONS.
- [104] EPA, METHOD 8081B, ORGANOCHLORINE PESTICIDES BY GAS CHROMATOGRAPHY, 2007.
- [105] EPA, METHOD 8000D - DETERMINATIVE CHROMATOGRAPHIC SEPARATIONS, 2014.
- [106] A. Tor, M.E. Aydin, S. Özcan, Ultrasonic solvent extraction of organochlorine pesticides from soil, *Analytica Chimica Acta* 559 (2006) 173-180.
- [107] B. Daltonik, SOP-Direct Transfer (DT) Method, 2013.
- [108] B. Daltonik, SOP-Formic Acid Extraction (EX) Method, 2013.
- [109] Folkhalsomyndigheten, Generating new MSP with Bruker Microflex LT.
- [110] C. Cassagne, S. Ranque, A.C. Normand, P. Fourquet, S. Thiebault, C. Planard, M. Hendrickx, R. Piarroux, Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, *PLoS One* 6 (2011) e28425.
- [111] B. Daltonik, MALDI Biotyper<sup>R</sup> Protocol Guide, Bremen Germany, 2015.
- [112] M.A. Reeve, D. Bachmann, A method for filamentous fungal growth and sample preparation aimed at more consistent MALDI-TOF MS spectra despite variations in growth rates and/or incubation times, *Biology Methods and Protocols* 4 (2019).
- [113] J.M. Hettick, B.J. Green, A.D. Buskirk, M.L. Kashon, J.E. Slaven, E. Janotka, F.M. Blachere, D. Schmechel, D.H. Beezhold, Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting, *Rapid Commun Mass Spectrom* 22 (2008) 2555-2560.

- [114] B. Daltonics, Bruker Bacterial Test Standard, Product information, 2011.
- [115] H.N. Shah, S.E. Gharbia, MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology, Wiley, 2017.
- [116] B. Daltonics, CUSTOM MSP AND LIBRARY CREATION, 2014.
- [117] A. Mansouri, M. Cregut, C. Abbes, M.J. Durand, A. Landoulsi, G. Thouand, The Environmental Issues of DDT Pollution and Bioremediation: a Multidisciplinary Review, *Appl Biochem Biotechnol* 181 (2017) 309-339.
- [118] X. Pan, D. Lin, Y. Zheng, Q. Zhang, Y. Yin, L. Cai, H. Fang, Y. Yu, Biodegradation of DDT by *Stenotrophomonas* sp. DDT-1: Characterization and genome functional analysis, *Sci Rep* 6 (2016) 21332.
- [119] F. Cao, T.X. Liu, C.Y. Wu, F.B. Li, X.M. Li, H.Y. Yu, H. Tong, M.J. Chen, Enhanced biotransformation of DDTs by an iron- and humic-reducing bacteria *Aeromonas hydrophila* HS01 upon addition of goethite and anthraquinone-2,6-disulphonic disodium salt (AQDS), *J Agric Food Chem* 60 (2012) 11238-11244.
- [120] A. Sariwati, A.S. Purnomo, I. Kamei, Abilities of Co-cultures of Brown-Rot Fungus *Fomitopsis pinicola* and *Bacillus subtilis* on Biodegradation of DDT, *Curr Microbiol* 74 (2017) 1068-1075.
- [121] B. Betancur-Corredor, N.J. Pino, S. Cardona, G.A. Peñuela, Evaluation of biostimulation and Tween 80 addition for the bioremediation of long-term DDT-contaminated soil, *Journal of Environmental Sciences* 28 (2015) 101-109.
- [122] J. Grewal, A. Bhattacharya, S. Kumar, D.K. Singh, S.K. Khare, Biodegradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) by using *Serratia marcescens* NCIM 2919, *J Environ Sci Health B* 51 (2016) 809-816.
- [123] G.-l. Wang, M. Bi, B. Liang, J.-d. Jiang, S.-p. Li, *Pseudoxanthomonas jiangsuensis* sp. nov., a DDT-degrading bacterium isolated from a long-term DDT-polluted soil, *Current microbiology* 62 (2011) 1760-1766.
- [124] B. Wang, W. Liu, X. Liu, A.E. Franks, Y. Teng, Y. Luo, Comparative analysis of microbial communities during enrichment and isolation of DDT-degrading bacteria by culture-dependent and -independent methods, *Sci Total Environ* 590-591 (2017) 297-303.
- [125] C.M. Kamanavalli, H.Z. Ninnekar, Biodegradation of DDT by a *Pseudomonas* Species, *Current Microbiology* 48 (2004) 10-13.
- [126] H. Fang, B. Dong, H. Yan, F. Tang, Y. Yu, Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil, *Journal of Hazardous Materials* 184 (2010) 281-289.
- [127] Q. Liang, M. Lei, T. Chen, J. Yang, X. Wan, S. Yang, Application of sewage sludge and intermittent aeration strategy to the bioremediation of DDT- and HCH-contaminated soil, *Journal of Environmental Sciences* 26 (2014) 1673-1680.
- [128] S.d. Salud, NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa., SECRETARIA DE SALUD, Estados Unidos Mexicanos, 1995.
- [129] D. Gerlier, N. Thomasset, Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *Journal of Immunological Methods* 94 (1986) 57-63.
- [130] D.M.L. Morgan, Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity, in: D.M.L. Morgan (Ed.), *Polyamine Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 1998, pp. 179-184.
- [131] J. van Meerloo, G.J.L. Kaspers, J. Cloos, Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay, in: I.A. Cree (Ed.), *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 2011, pp. 237-245.
- [132] P. Terry L Riss, \* Richard A Moravec, Andrew L Niles, Sarah, H.A.B. Duellman, Tracy J Worzella and Lisa Minor, *Cell Viability Assays*, 2016.

- [133] E.G. Biesta-Peters, M.W. Reij, H. Joosten, L.G. Gorris, M.H. Zwietering, Comparison of two optical-density-based methods and a plate count method for estimation of growth parameters of *Bacillus cereus*, *Appl Environ Microbiol* 76 (2010) 1399-1405.
- [134] A. Velasco, A. Aburto-Medina, E. Shahsavari, S. Revah, I. Ortiz, Degradation mechanisms of DDX induced by the addition of toluene and glycerol as cosubstrates in a zero-valent iron pretreated soil, *J Hazard Mater* 321 (2017) 681-689.
- [135] I. Ortiz, A. Velasco, S. Le Borgne, S. Revah, Biodegradation of DDT by stimulation of indigenous microbial populations in soil with cosubstrates, *Biodegradation* 24 (2013) 215-225.
- [136] A.J. Francis, R.J. Spanggord, G.I. Ouchi, R. Bramhall, N. Bohonos, Metabolism of DDT analogues by a *Pseudomonas* sp, *Applied and Environmental Microbiology* 32 (1976) 213.
- [137] B.E. Langlois, J.A. Collins, K.G. Sides, Some Factors Affecting Degradation of Organochlorine Pesticides by Bacteria<sup>1</sup>, *Journal of Dairy Science* 53 (1970) 1671-1675.
- [138] P. Lovecka, I. Pacovska, P. Stursa, B. Vrchotova, L. Kochankova, K. Demnerova, Organochlorinated pesticide degrading microorganisms isolated from contaminated soil, *N Biotechnol* 32 (2015) 26-31.
- [139] M. He, X. Li, H. Liu, S.J. Miller, G. Wang, C. Rensing, Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1, *Journal of Hazardous Materials* 185 (2011) 682-688.
- [140] S. Gupta, R. Goyal, J. Nirwan, S.S. Cameotra, N. Tejoprakash, Biosequestration, transformation, and volatilization of mercury by *Lysinibacillus fusiformis* isolated from industrial effluent, *J Microbiol Biotechnol* 22 (2012) 684-689.
- [141] P.M. Sarma, D. Bhattacharya, S. Krishnan, B. Lal, Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly discovered enteric bacterium, *Leclercia adecarboxylata*, *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2004) 3163-3166.
- [142] H.K.M. Rajkumar Bidlan, Aerobic degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT-1P *Process Biochemistry* 38 (2002) 49-56
- [143] E.A. Orellana, A.L. Kasinski, Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation, *Bio Protoc* 6 (2016).
- [144] V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nat Protoc* 1 (2006) 1112-1116.
- [145] S.G. Villas-Boas, S. Mas, M. Akesson, J. Smedsgaard, J. Nielsen, Mass spectrometry in metabolome analysis, *Mass Spectrom Rev* 24 (2005) 613-646.
- [146] W.B. Dunn, N.J. Bailey, H.E. Johnson, Measuring the metabolome: current analytical technologies, *Analyst* 130 (2005) 606-625.
- [147] M.M. Koek, B. Muilwijk, M.J. van der Werf, T. Hankemeier, Microbial Metabolomics with Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 1272-1281.
- [148] H. Choi, J.-K. Moon, J.-S. Seo, J.-H. Kim, Establishment of retention index library on gas chromatography-mass spectrometry for nontargeted metabolite profiling approach, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 56 (2013) 87-90.
- [149] M.C. Pablos-Espada, F.J. Arrebola-Liébanas, A. Garrido-frenich, J.L. Martínez-Vidal, Analysis of Pesticides in Water Samples Using GC-ECD and GC-MS/MS Techniques, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 75 (1999) 165-179.
- [150] ICH, Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2/R1). [http://www.ish.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ish.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf), 2012.
- [151] EPA, 8000 D- DETERMINATIVE CHROMATOGRAPHIC SEPARATIONS, 2014.

- [152] S. Gangola, P. Bhatt, P. Chaudhary, P. Khati, N. Kumar, A. Sharma, Bioremediation of Industrial Waste Using Microbial Metabolic Diversity, (2018) 1-27.
- [153] D. Kantachote, I. Singleton, N. McClure, R. Naidu, M. Megharaj, B.D. Harch, DDT Resistance and Transformation by Different Microbial Strains Isolated from DDT-Contaminated Soils and Compost Materials, *Compost Science & Utilization* 11 (2003) 300-310.
- [154] S. Kanta Sharma, K.V. Sadasivam, J.M. Dave, DDT degradation by bacteria from activated sludge, *Environment International* 13 (1987) 183-190.
- [155] H.I.B. Kinuthia Mwangi, Anne W. Muigai, Ciira Kiiyukia and Muniru K. Tsanuo, Degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by bacterial isolates from cultivated and uncultivated soil, *African Journal of Microbiology Research* 4 (2010) 185-196.
- [156] S.K.M. Geetika Pant, G. Sibi, Isolation, Identification and Characterization of p, p'-DDT Degrading Bacteria from Soil, *Journal of Environmental Science and Technology* 6 (2013) 130-137.
- [157] C. Abbes, A. Mansouri, N. Werfelli, A. Landoulsi, Aerobic Biodegradation of DDT by *Advenella Kashmirensis* and Its Potential Use in Soil Bioremediation, *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 27 (2018) 455-468.
- [158] H. Huang, Y. Zhang, W. Chen, W. Chen, D.A. Yuen, Y. Ding, Y. Chen, Y. Mao, S. Qi, Sources and transformation pathways for dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and metabolites in soils from Northwest Fujian, China, *Environmental Pollution* 235 (2018) 560-570.
- [159] R.P. Eganhouse, C.R. Sherwood, J. Pontolillo, B.D. Edwards, P.J. Dickhudt, Reductive dechlorination rates of 4,4'-DDE (1-chloro-4-[2,2-dichloro-1-(4-chlorophenyl)ethenyl]benzene) in sediments of the Palos Verdes Shelf, CA, *Marine Chemistry* 203 (2018) 10-21.
- [160] R.P. Eganhouse, E. DiFilippo, J. Pontolillo, W. Orem, P. Hackley, B.D. Edwards, DDT and related compounds in pore water of shallow sediments on the Palos Verdes Shelf, California, USA, *Marine Chemistry* 203 (2018) 78-90.
- [161] J.E. Thomas, L.T. Ou, A. All-Agely, DDE remediation and degradation, *Rev Environ Contam Toxicol* 194 (2008) 55-69.
- [162] A.S. Purnomo, D. Maulianawati, I. Kamei, *Ralstonia pickettii* Enhance the DDT Biodegradation by *Pleurotus eryngii*, *J Microbiol Biotechnol* 29 (2019) 1424-1433.
- [163] B. Wetterauer, M. Ricking, J.C. Otte, A.V. Hallare, A. Rastall, L. Erdinger, J. Schwarzbauer, T. Braunbeck, H. Hollert, Toxicity, dioxin-like activities, and endocrine effects of DDT metabolites--DDA, DDMU, DDMS, and DDCN, *Environ Sci Pollut Res Int* 19 (2012) 403-415.
- [164] T. Eggen, A. Majcherczyk, Effects of zero-valent iron (Fe<sup>0</sup>) and temperature on the transformation of DDT and its metabolites in lake sediment, *Chemosphere* 62 (2006) 1116-1125.
- [165] Y. Huang, J. Wang, Degradation and mineralization of DDT by the ectomycorrhizal fungi, *Xerocomus chrysenteron*, *Chemosphere* 92 (2013) 760-764.
- [166] R.V. Subba-Rao, M. Alexander, Bacterial and fungal cometabolism of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) and its breakdown products, *Applied and Environmental Microbiology* 49 (1985) 509.
- [167] J.A. Bumpus, S.D. Aust, Biodegradation of DDT [1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Applied and environmental microbiology* 53 (1987) 2001-2008.
- [168] G. Wedemeyer, Dechlorination of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane by *Aerobacter aerogenes*. I. Metabolic products, *Applied microbiology* 15 (1967) 569-574.
- [169] A.S. Purnomo, T. Mori, R. Kondo, Involvement of Fenton reaction in DDT degradation by brown-rot fungi, *International Biodeterioration & Biodegradation* 64 (2010) 560-565.

- [170] G. Odukkathil, N. Vasudevan, Biodegradation of endosulfan isomers and its metabolite endosulfate by two biosurfactant producing bacterial strains of *Bordetella petrii*, *J Environ Sci Health B* 50 (2015) 81-89.
- [171] K. Patowary, R. Patowary, M.C. Kalita, S. Deka, Development of an Efficient Bacterial Consortium for the Potential Remediation of Hydrocarbons from Contaminated Sites, *Front Microbiol* 7 (2016) 1092.
- [172] G.W. Walters, M.D. Aitken, Surfactant-enhanced solubilization and anaerobic biodegradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane (DDT) in contaminated soil, *Water Environ Res* 73 (2001) 15-23.
- [173] J. Chakraborty, S. Das, 7 - Biosurfactant-Based Bioremediation of Toxic Metals, in: S. Das (Ed.), *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, Elsevier, Oxford, 2014, pp. 167-201.

## **Capítulo VII. ANEXOS**

### **ANEXO I. Artículos publicados.**



## Determination of Six Priority Phthalates and Di(Ethylhexyl) Adipate in Maize Tortilla by Gas Chromatography - Tandem Mass Spectrometry in Multiple Reaction Monitoring Mode

Bianey Garcia Lara, Israel Enciso Donis, Katarzyna Wrobel, Kazimierz Wrobel\*

Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, L. de Retana 5, 36000 Guanajuato, Gto., México.

\*Corresponding author: phone +52 473 7327555; e-mail: [kazimier@ugto.mx](mailto:kazimier@ugto.mx)

Received November 17<sup>th</sup>, 2017; Accepted January 10<sup>th</sup>, 2018.

DOI: <http://dx.doi.org/10.29356/jmcs.v62i2.359>

**Abstract.** The term “phthalates” refers to a group of esters of benzene-1,2-dicarboxylic acid, widely used as plasticizers therefore ubiquitous in food and in the environment. Several phthalates have been cataloged as endocrine disruptors and that is why there is a strong demand for their reliable determination, especially in food matrices. In the present work, gas chromatography - tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) procedure is proposed for the determination of six priority phthalates (dimethyl phthalate DMP, diethyl phthalate DEP, di(n-butyl) phthalate DBP, benzyl butyl phthalate BBP, di(2-ethylhexyl) phthalate DEHP, di(n-octyl) phthalate DnOP) and di(2-ethylhexyl) adipate DEHA, in maize tortillas and flour. Fresh tortilla sample was homogenized with acetonitrile/water (1:1) and after salting out (NaCl), hexane extract was obtained and dried by addition of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydride. Finally, solvent was evaporated and the residue was reconstituted in isooctane for the injection to GC-MS/MS system; a model SCION GC-TQMS from Bruker Daltonics was used for the analysis. Quantification was carried out by multiple reaction monitoring (MRM) with the following time segments and m/z values of the precursor/product ion transitions: 0-7.90 min, 163/133 DMP; 7.47-8.53min, 149/121 DEP; 8.53-9.93 min, 149/121 DBP; 9.93-12.39 min, 149/93 BBP; 11.40-12.44 min, 129/111 DEHA; 12.20-13.22 min, 149/121 DEHP; 13.13-14.20 min, 149/121 DnOP. The evaluated method detection limits for seven compounds were in the range 0.11-1.84 µg kg<sup>-1</sup> (tortilla dry mass). The results obtained for fifteen tortilla samples purchased in Guanajuato state were as follows: 71.6-420 µg kg<sup>-1</sup> DEHP > not detected (nd)-274 µg kg<sup>-1</sup> DBP > nd-197 µg kg<sup>-1</sup> DEHA > nd-73.2 µg kg<sup>-1</sup> DEP > nd-10.6 µg kg<sup>-1</sup> DnOP. It was observed that prolonged storage and elevated temperature favored the accumulation of phthalates in tortillas.

**Key words:** phthalates; food; tortilla; gas chromatography- mass spectrometry; multiple reaction monitoring.

**Resumen.** El término “ftalatos” se refiere a los ésteres del ácido benceno-1,2-dicarboxílico; debido a su amplio uso como plastificantes, compuestos de este grupo son ubicuos tanto en el medio ambiente como en alimentos. Algunos ftalatos actúan como disruptores endocrinos químicos por lo que existe una fuerte demanda de los procedimientos analíticos adecuados para su cuantificación en matrices variadas. En el presente trabajo se propone un procedimiento por cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS/MS) para la determinación de seis ftalatos prioritarios (dimetil ftalato DMP, dietil ftalato DEP, di(n-butil) ftalato DBP, bencilbutil ftalato BBP, di(2-etilhexil) ftalato DEHP, di(n-octilftalato DnOP) y de di(etilhexil) adipato (DEHA) en tortillas y harinas de maíz. El tratamiento de muestra consistió en la homogeneización con acetonitrilo/agua (1:1), seguida por la saturación con NaCl y extracción con hexano. Para eliminar el agua, al sobrenadante se agregó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y después de evaporación a sequedad, se re-disolvió en isooctano e introdujo al sistema GC-MS/MS (modelo SCION GC-TQMS de Bruker Daltonics). Para la cuantificación por monitoreo de reacciones múltiples (MRM), los segmentos de tiempo y los pares de iones precursor/producto fueron: 0-7.90 min, 163/133 DMP; 7.47-8.53min, 149/121 DEP; 8.53-9.93 min, 149/121 DBP; 9.93-12.39 min, 149/93 BBP; 11.40-12.44 min, 129/111 DEHA; 12.20-13.22 min, 149/121 DEHP; 13.13-14.20 min, 149/121 DnOP. Los límites de detección del método fueron en un intervalo de 0.11-1.84 µg kg<sup>-1</sup> en masa seca en tortilla. En el análisis de 15 diferentes muestras de tortillacompradas en el estado de Guanajuato, se obtuvieron los siguientes resultados: 71.6-420 µg kg<sup>-1</sup>

DEHP > no detectado (nd)-274  $\mu\text{g kg}^{-1}$  DBP > nd-197  $\mu\text{g kg}^{-1}$  DEHA > nd-73.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  DEP > nd-10.6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  DnOP. Largos tiempos de almacenamiento y temperatura elevada favorecieron la acumulación de los ftalatos en tortilla.

**Palabras clave:** ftalatos; alimentos; tortilla de maíz; cromatografía de gases – espectrometría de masas; monitoreo de reacciones múltiples.

## Introduction

Phthalates (PAEs) form a large group of compounds that are obtained by esterification of benzene-1,2-dicarboxylic acid; more than sixty different PAEs have industrial applications where they confer flexibility, workability and durability to a wide range of products. As plasticizers, PAEs can be found in coated textiles, flexible hoses, construction articles and finishing, in various products of personal care and in food packing materials. Due to their extensive and widespread uses, phthalates are ubiquitous environmental contaminants and they are also present in foods [1, 2]. Several phthalates have been classified as endocrine disruptors [3] and the following six are considered priority pollutants by the United States Environmental Protection Agency (USEPA): dimethyl phthalate DMP, diethyl phthalate DEP, di(n-butyl) phthalate DBP, benzyl butyl phthalate BBP, di(2-ethylhexyl) phthalate DEHP, di(n-octyl) phthalate DnOP [4]. In an effort to decrease the use of PAEs, different non-phthalate plasticizers have been introduced, among them di(ethylhexyl) adipate (DEHA) as a substitute for DEHP [5].

Determination of plasticizers, especially PAEs, is an analytical task important in the field of food control with a variety of analytical procedures available. The great majority of studies have been devoted to the assessment of PAEs in water and in beverages whereas analysis of the solid foods, presenting more complex chemical composition, has been less common [6-8]. Of note, much attention has also been paid on the migration of PAEs from the packing materials [6, 9]. As often highlighted, a special care is needed to avoid/control sample contamination by phthalates potentially present in air, laboratory material, reagents, solvents and even coming from laboratory personnel [10, 11]. The actual state-of-the art in sample preparation has been presented in few comprehensive reviews [6, 8, 12] yet this is still an active field of methodological development driven by the requirement of selective and efficient extraction of PAEs. While analyzing solid foods, liquid extraction is a convenient approach in which water-acetonitrile mixtures are typically used; other mixtures based on hexane, dichloromethane, chloroform, acetone or acetonitrile may be needed for highly non-polar PAEs in fatty foods; to achieve better efficiency, magnetic stirring, microwave assisted extraction or shaking in the ultrasonic bath have been reported [1, 13-19]. As to the instrumental techniques, coupling gas (GC) or liquid (LC) chromatography with mass spectrometry (MS) has been preferentially used [1, 8, 12, 15, 16, 20]; since the USEPA priority PAEs are semi-volatile and thermostable compounds, gas chromatography seems to be the most appropriate technique for their separation [12, 16, 21, 22]. The use of capillary columns with non-polar phases (polydimethylsiloxane or polymethylphenylsiloxane) has been recommended because they provide good resolution of PAEs thanks to relatively high temperatures and lower bleeding as compared to the polar columns [16, 23]. Liquid samples or sample extracts not containing low-volatile interferences can be introduced directly, preferably in splitless mode if determination of low concentrations is required; for more complex matrices, solid phase micro-extraction with headspace has been reported [7, 8]. Finally and in relevance with the present work, a triple quadrupole mass spectrometry detector (TQMS) offers advantages of excellent selectivity and high detection power through the use of multiple reaction monitoring (MRM), yet this quantification mode has only recently been introduced to the analysis of phthalates in solid foods [15, 16].

In Mexico, maize tortilla is a staple food and this product is also gaining international acceptance. The accumulation of PAEs in maize grain has been demonstrated [17] and additionally, tortillas may become contaminated during their elaboration and during short- or long-term storage. Noteworthy, for consumption on the same day, fresh and hot tortillas are wrapped in paper or in plastic and are often maintained warm for hours; for longer storage, plastic bags are used and the product is left at room temperature with expiration period from weeks up to one year (if vacuum-packed).

In the present work, a GC-MS/MS procedure with MRM quantification is set-up and then applied for the determination of six priority phthalates and DEHA in maize tortillas and flours. Some of the analyzed products contained relatively high concentrations of PAEs (total concentration > 300  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and the rest were moderately contaminated (total phthalates between 50 and 300  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dry mass) [24]. The

results obtained strongly suggest that migration of PAEs from packing materials contributes to their content in tortilla.

## Experimental

### Reagents and samples

Deionized water (18.2 MΩ cm, Labconco, USA), HPLC-grade acetonitrile, hexane and isooctane as well as analytical reagent grade sodium chloride and sodium sulfate anhydride, were from Sigma.

The EPA 506 mix containing six phthalates (dimethyl phthalate DMP, diethyl phthalate DEP, dibutyl phthalate DBP, benzyl butyl phthalate BBP, di(2-ethylhexyl) phthalate DEHP, di(n-octyl) phthalate DnOP) and di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) in isooctane, at 1000 µg mL<sup>-1</sup> each, was used for calibration. Specification of the lot number LC05856 purchased from Sigma, are provided in Electronic Supplementary Material (Table 1S).

Maize tortilla (T1 - T15) were purchased during summer 2016 at randomly selected markets in Guanajuato city and its vicinity (Guanajuato State, Mexico). These products included long shelf-life tortillas packed in plastic bags, fresh tortillas commercialized this same day still warm or at ambient temperature and wrapped in plastic or paper (Table 1). In each case, three tortillas were pooled after eliminating the first one which was in a direct contact with the packing material. Additionally, three commercial maize flours (F1, F2, F3) were also purchased in the local supermarket.

**Table 1.** Descriptive variables of the analyzed tortilla samples.

Brand	PM <sup>1</sup>	t <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	Brand	PM <sup>1</sup>	t <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>
1	-1	-1	1	9	-1	-1	1
2	1	1	-1	10	-1	-1	1
3	1	1	-1	11	1	1	-1
4	-1	-1	1	12	1	-1	1
5	-1	-1	1	13	-1	-1	1
6	-1	-1	1	14	1	1	-1
7	1	1	-1	15	1	1	-1
8	-1	-1	1				

<sup>1</sup> PM – packing material: (-1) - paper wrap, (1) - plastic bag; <sup>2</sup> storage time: (-1) maximum one day, (1) longer than one day; <sup>3</sup> - storage temperature: (-1) ambient temperature, (1) warmed.

### Sample pretreatment

A fresh mass was cut into small pieces, three portions per sample (5 g each) were taken and homogenized independently with 7 mL of acetonitrile:water 1:1 mix (T18 Ultra-Turrax<sup>®</sup> polytron, IKA<sup>®</sup>); then 3 mL of saturated sodium chloride solution were added and the extraction with 10 mL of hexane was carried out (vortex, 3 min). The mixtures were centrifuged at 3150 g for 10 min and the upper, organic phase of each sample was transferred to 25 mL glass vial. Traces of water were eliminated by addition of sodium sulfate anhydride (0.5 g), the solvent was evaporated under nitrogen stream and the extract was reconstituted in 500 µL of isooctane. In order to report phthalate concentrations with respect to the dry mass, humidity was assessed by drying 20 g aliquot of each brand of tortilla at 80 °C [25]; of note, mean water content calculated for all samples was 44.1 ± 1.2%.

For the analysis of maize flour, 1 g of the sample was taken and processed as described above.

### GC-MS/MS analysis

A model Bruker 456-GC gas chromatograph coupled to a SCIION TQ mass spectrometer (Bruker Daltonics) with a column BP-5 MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm film thickness, SGE Analytical Science), were used. The flow rate of helium as a carrier gas was maintained at 1 mL min<sup>-1</sup>; the injection port was set to splitless with 1 µL injection and 45 s, and maintained at a temperature of 250 °C. The column oven temperature program was: 70 ° initial temperature holding for 2.5 min, then ramping to 250 °C at 30 °C min<sup>-1</sup> and holding for 2.5 min and finally ramping to 300 °C at 30 °C min<sup>-1</sup> and holding for 2.5 min (total run 15.2 min). Temperature settings for the transfer-line heater and ion source of the MS were 290 °C and 250 °C, respectively. Spectra were acquired in the *m/z* range 50-500. The energy of electron impact

ionization was 70 eV; collision cell was operated at 2 mtorr of argon. For quantification in MRM mode, the conditions are detailed in Table 2; for each compound, the  $m/z$  window  $\pm 1$  was applied and peak area was acquired as analytical signal. A Bruker MS Workstation 8.0 was used for data collection, processing and GC-MS/MS control. The assignment of individual phthalates was carried out by comparing both, mass spectrum and retention time with those obtained for external standards. Calibration solutions were prepared by appropriate dilution of EPA mix with isooctane to obtain concentrations 25, 50, 100, 250, 500 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for each compound (blank was always run in parallel). Detection and quantification limits (DL, QL) were evaluated based on signal-to-noise ratio; the criterions of three and ten standard deviations were adopted for DL and for QL, respectively [26]. For each analyte, the signal was obtained for the lowest calibration standard and the noise was evaluated as standard deviation of five MRM blank replicates. Method quantification limit was obtained in the same manner but in the presence of sample matrix (20 times diluted T1 extract).

For recovery experiments, 200  $\mu\text{L}$  and 1000  $\mu\text{L}$  of standard mix (500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) were added to the T1 sample yielding the concentration of standard in tortilla 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of each compound, respectively.

**Table 2.** Summary of multiple reaction monitoring (MRM) conditions selected for the determination of six phthalates and for and di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA).

Analyte	$t_{\text{ret}} \pm \text{SD}$ , min	Time segment, min	Ion transitions <sup>1</sup> $m/z$	CID energy, eV
DMP	7.40 $\pm$ 0.08	6.0 - 7.90	163/133 (194/163)	10
DEP	7.98 $\pm$ 0.07	7.47 - 8.53	149/121 (177/149)	15
DBP	9.43 $\pm$ 0.08	8.53 - 9.93	149/121 (205/149)	15
BBP	11.89 $\pm$ 0.09	9.93 - 12.39	149/121 (206/149)	15
DEHA	11.94 $\pm$ 0.08	11.40 - 12.44	129/111 (129/57)	5
DEHP	12.72 $\pm$ 0.06	12.20 - 13.22	149/121 (167/149)	15
DnOP	13.69 $\pm$ 0.09	13.13 - 14.20	149/121 (279/149)	15

<sup>1</sup>  $m/z$  values for precursor and quantifier ions (precursor/quantifier ions)

### Contamination control

All standards and solutions were prepared and kept in flasks or vials made of glass. Glassware and metal scissors (for cutting tortillas) were washed with a soap and warm water and always wrapped in aluminum foil. Deionized water was extracted with hexane prior to its use. It was intended to perform all operations in a short time and to keep all sample/solutions containers closed or under nitrogen stream; the personnel used disposable phthalate-free vinyl gloves. Polypropylene micropipette tips were rinsed with hexane upon the use. Blank was always run in parallel and analyses were repeated if high concentrations of PAEs in blank were found. The obtained results were blank-corrected.

### Statistical analysis

The results presented are means obtained for three independent replicates, standard deviations were calculated using Microsoft Excel 2010. Principal component analysis (PCA) was carried out using Unscrambler 7.0 software package (Camo, Norway). Significance level was established at  $p < 0.05$ .

## Results and Discussion

### Set-up of GC-MS/MS procedure

For the selection of GC-MS and MRM conditions, EPA 506 mix was diluted with isooctane yielding  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  of each compound in working solution. Typical capillary column for GC-MS was used; specifically, BP5-MS column presents low bleeding, its 5% phenyl polysilphenylene-siloxane film provides non-polar character and, it can be used in a wide temperature range ( $-40 - 330 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Separation conditions were tested in a full scan mode for  $m/z$  range 50-500, by varying temperature gradient and He flow rate with the intent to obtain baseline separation of seven compounds in a relatively short time. Finally, selected conditions are presented in the Experimental section and the retention times for individual solutes are listed in Table 2 (total chromatographic run 15.2 min). The chromatographic signals were assigned based on mass spectra of individual compounds (NIST library, version 2.0, 2011). The experimental and library spectra are shown in Fig. 1S (Electronic Supplementary Material, ESM). Using 70 eV energy for electron-impact ionization, the most intense ions were selected as precursors for MRM quantification; these were:  $m/z$  149 for DEP, DBP, BBP, DEHP and DnOP,  $m/z$  163 for DMP and  $m/z$  129 for DEHA. The second, qualifier precursor ion for each compound was that of the second most intense signal in respective mass spectrum (Table 2, Fig. 1S). A range of collision energies (5-25 eV) was examined in search to attain the highest possible abundance of suitable for MRM product ions; the selected ions and CID energies are summarized in Table 2. In this Table, time segments of chromatogram used for signal acquisition of individual compounds are also listed. As already commented in the Introduction, MRM technique has not been in common use in the analysis of phthalates in solid foods [15, 16] and, to the best of our knowledge, it was only recently applied for GC-MS/MS determination of DBP, BBP and DEHP [16]. In the cited work, precursor ions applied for DBP and BBP were the same as listed in Table 2; however, for DEHP  $m/z$  149 was not considered due to the co-elution problem which was not observed in the present work. On the other hand, the US Consumer Safety Commission, establishes the GC-MS procedure for the determination of phthalates in selective ion monitoring mode (SIM), recommending the sum of several signals, in order to increase the detection power ( $m/z$  194, 135, 77 for DMP; 177, 76, 105 for DEP, 149, 167, 205, 223 for DBP, 149, 167, 279 for DEHP; 149, 167, 261, 279 for DnOP) [27]. The clear benefit of MRM is that the transition between precursor and product ions provides significant improvement of S/N value with respect to SIM, especially when SIM integrates several signals for one compound.

Using the established conditions, calibration was carried out as described in the Experimental section. The linear regression functions, linearity and repeatability parameters are presented in Table 3. As can be observed,  $R^2 > 0.999$  was always obtained and repeatability for slope and intercept were in the range 1.4 - 3.8% and 3.4 - 16%, respectively, based on three independent replicates of calibration process. Furthermore, relative standard deviation of the calibration factors (CF: signal-to-concentration ratio) was calculated based on all replicates of individual calibration standard for each analyte and the obtained values (2.1 - 6.9%) were lower than 20%, in agreement with USEPA indication for chromatographic analyses [28]. To evaluate possible effect of chemical matrix on ionization efficiency, calibration was also performed in the presence of sample matrix (2-fold diluted T1 extract). In Table 3, signal suppression/enhancement (SSE) calculated as the ratio between slopes of linear regression functions obtained in the presence and in the absence of sample matrix is presented for each compound; the obtained values were in the range 82.9 - 104%, indicating that the sample matrix had only minor effect on the analyte ionization efficiency [29]. The evaluated detection limits of calibration were as follows:  $2.62 \mu\text{g L}^{-1}$  DMP,  $2.56 \mu\text{g L}^{-1}$  DEP,  $3.16 \mu\text{g L}^{-1}$  DBP,  $2.78 \mu\text{g L}^{-1}$  BBP,  $1.33 \mu\text{g L}^{-1}$  DEHA,  $2.45 \mu\text{g L}^{-1}$  DEHP,  $5.31 \mu\text{g L}^{-1}$  DnOP. The quantification limit of the method for tortilla were computed based on calibration performed in the presence of the sample matrix (20-fold diluted extract of T1) [26] with the following values obtained:  $1.47 \mu\text{g kg}^{-1}$  DMP,  $1.55 \mu\text{g kg}^{-1}$  DEP,  $1.92 \mu\text{g kg}^{-1}$  DBP,  $1.72 \mu\text{g kg}^{-1}$  BBP,  $0.94 \mu\text{g kg}^{-1}$  DEHA,  $1.49 \mu\text{g kg}^{-1}$  DEHP,  $3.21 \mu\text{g kg}^{-1}$  DnOP. Of note, in the recent studies focused on the determination of PAEs in solid foods by GC-MS or MS/MS with integrated solid phase extraction, solid phase microextraction or QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe) approaches, the quantification limits in the range 0.06 -  $43 \mu\text{g kg}^{-1}$  were reported [8, 16, 30], which clearly supports the fit-per-purpose suitability of the proposed here procedure.

**Table 3.** Calibration parameters evaluated in the absence and in the presence of sample matrix.

Analyte	Linear regression <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	RSD(CF) <sup>2</sup> , %	SSE <sup>3</sup> , %
DMP	$Y = 7.37 \times 10^5(2.10 \times 10^4) c + 1.71 \times 10^3(2.88 \times 10^2)$	0.9998	4.7	95.1
DEP	$Y = 1.33 \times 10^7(1.78 \times 10^5) c + 278(41.3)$	0.9998	2.1	97.2
DBP	$Y = 1.72 \times 10^6(2.44 \times 10^4) c + 2.65 \times 10^4(1.19 \times 10^3)$	0.9999	2.7	98.5
BBP	$Y = 7.12 \times 10^5(2.24 \times 10^4) c + 4.41 \times 10^3(1.60 \times 10^2)$	0.9991	5.9	93.9
DEHA	$Y = 1.47 \times 10^7(5.01 \times 10^5) c + 3.28 \times 10^4(1.97 \times 10^3)$	0.9993	6.9	82.9
DEHP	$Y = 6.73 \times 10^6(2.55 \times 10^4) c + 754(30.1)$	0.9997	3.7	102
DnOP	$Y = 6.75 \times 10^5(1.79 \times 10^3) c + 6.56 \times 10^3(2.66 \times 10^2)$	0.9994	5.3	104

<sup>1</sup> Matrix-free calibration function based on three independent replicates : Y - signal measured as the peak area in MRM mode; c - analyte concentration,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; in the parentheses standard deviation for slope and intercept are given [28].

<sup>2</sup> Relative standard deviation of the calibration factors (CF = Y/c) obtained for all replicates of individual calibration standards [28].

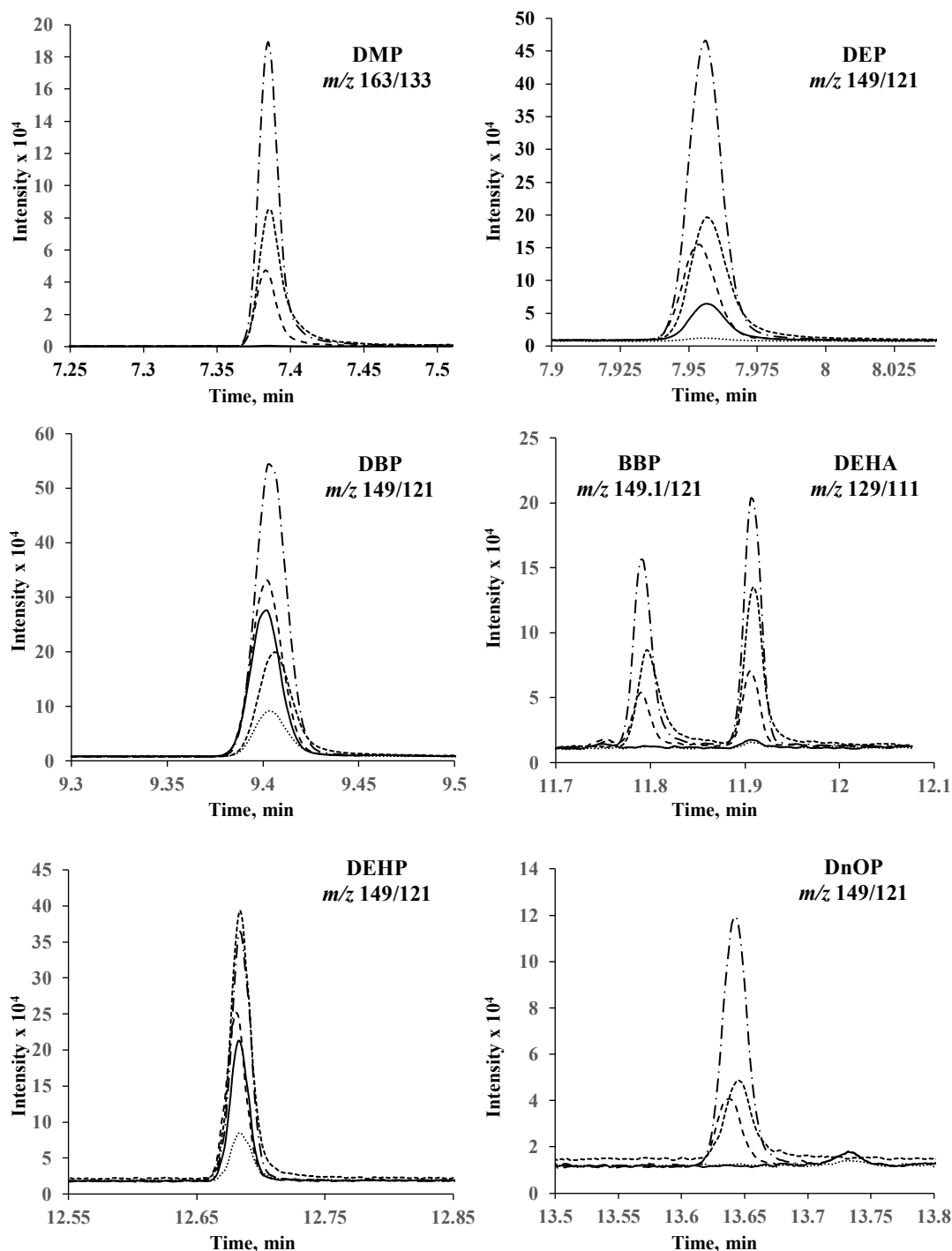
<sup>3</sup> Signal Suppression/Enhancement calculated as the ratio between slopes of linear functions obtained in the presence of sample matrix and for matrix-free calibration [37].

For accuracy testing, T1 sample was analyzed using two-point standard addition. As described in the Experimental section, standard mix was added directly to the sample yielding 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of each compound (100  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively, in the solution introduced to GC-MS/MS system). The MRM chromatograms obtained in this experiment are presented in Fig. 1. For each analyte, the signals obtained in the sample without standard addition and this same sample spiked with two different concentrations are presented. Additionally, the signal obtained for matrix-free calibration solution (250  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each compound, except 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  DEHP) and for blank, are also included. The respective quantitative results are presented in Table 4; percentage recoveries in the range 75.5 - 129% for 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  standard addition and 74.0 - 100% for 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , are indicative of acceptable accuracy [28]. Noteworthy, similar or poorer recovery results had been previously reported for phthalate determination in foods [15, 16, 31].

**Table 4.** Results of recovery experiment carried out for T1 sample.

Analyte	Mean concentration $\pm$ SD, $\mu\text{g kg}^{-1}$			Recovery, %	
	No standard added	20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ added	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ added	20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ added	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ added
DMP	nd	22.3 $\pm$ 0.9	100 $\pm$ 8	111	100
DEP	17.8 $\pm$ 1.9	32.9 $\pm$ 1.8	108 $\pm$ 10	75.5	90.2
DBP	56.2 $\pm$ 2.0	72.5 $\pm$ 3.1	136 $\pm$ 7	81.5	79.8
BBP	nd	18.9 $\pm$ 1.5	90.6 $\pm$ 6.5	94.5	90.6
DEHA	nd	19.3 $\pm$ 1.2	81.2 $\pm$ 2.9	96.9	81.2
DEHP	24.9 $\pm$ 2.1	50.7 $\pm$ 1.7	120 $\pm$ 4	129	95.1
DnOP	nd	16.9 $\pm$ 1.6	74.0 $\pm$ 2.3	84.5	74.0

nd - not detected, means and standard deviations based on three replicates.



**Fig. 1.** Typical GC-MS/MS chromatograms obtained in MRM mode for individual compounds in: (.....) standard solution containing 250 µg L<sup>-1</sup> of each compound, except 500 µg L<sup>-1</sup> DEHP; (—) T1 sample; (---) T1 spiked with 20 µg kg<sup>-1</sup> of each compound (100 µg L<sup>-1</sup> in the on-column injected solution); (-.-) T1 spiked with 100 µg kg<sup>-1</sup> of each compound (500 µg L<sup>-1</sup> in the on-column injected solution); (\*\*\*\*) blank.

### Determination of phthalates in maize tortillas and flours

The results obtained for fifteen commercial samples, are presented in Table 5. Beyond any doubt, DEHP (71.6 - 420  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dry mass), DBP (nd - 274  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and DEP (nd - 73.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) were found as the most abundant phthalates and this finding is in agreement with studies performed on other food items in Europe (Belgium, UK, Portugal), Asia (China, Korea) and North America (Canada, USA) [24]. On the other hand, DMP was not detected in any sample, while BBP was found only in one type of tortilla and DnOP in two samples. As for total phthalates, the decreasing order of contamination was as follows: T13 (604  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) > T4 (551  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )  $\approx$  T8 (544  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) > T3 (494  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) > T2 (449  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )  $\approx$  T12 (436  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) > T11 (334  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) > T5 (227  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )  $\approx$  T10 (215  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) > T7 (202  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )  $\approx$  T15 (202  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) > T9 (169  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )  $\approx$  T14 (165  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) > T6 (144  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) > T1 (98.9  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). It should also be mentioned that DEHA, which is another type of plasticizer, has been found and determined in nine samples, covering the concentration range of 2.92 - 197  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dry mass. Among the analyzed samples, the first six could be classified as foods of high total phthalate content (> 300  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), according to the recent classification proposed by Serrano et al. [24]. In the cited review article, total PAEs concentration < 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  corresponded to low phthalate content, 50 - 300  $\mu\text{g kg}^{-1}$  range was assigned to medium contamination and food containing more than 300  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of total PAEs, was considered highly contaminated. Fatty food products such as poultry, cheese, cream or vegetable oil were reported as susceptible for accumulation of relatively high PAEs concentrations whereas for plants and grains - derived foods, lower concentrations were informed [24]. It should be stressed however that the determination results varied not only among different food items, but also among different geographical regions; as an example, DMP and DEP were the most common PAEs reported in China food [18] whereas in USA the most abundant phthalates were DEP and DEHP [32].

**Table 5.** Determination of phthalates and di(2-ethylhexyl) adipate in tortilla (T1-T15) and maize flour (F1-F3) samples. Mean values of concentrations are given with respective standard deviation based on three independent replicates. DMP was not detected in any sample.

Brand	Mean value $\pm$ SD, $\mu\text{g kg}^{-1}$ (dry mass)							$\Sigma$
	DEP	DBP	BBP	DEHA	DEHP	DnOP		
T1	17.8 $\pm$ 1.9	56.2 $\pm$ 2.0	nd	nd	24.9 $\pm$ 2.1	nd	98.9	
T2	73.2 $\pm$ 4.5	41.1 $\pm$ 2.5	nd	57.1 $\pm$ 2.3	277 $\pm$ 21	nd	449	
T3	62.4 $\pm$ 2.9	44.4 $\pm$ 1.9	21.3 $\pm$ 1.6	nd	365 $\pm$ 25	nd	494	
T4	12.1 $\pm$ 0.8	92.8 $\pm$ 7.7	nd	197 $\pm$ 14	249 $\pm$ 14	nd	551	
T5	15.6 $\pm$ 1.2	29.3 $\pm$ 1.4	nd	15.7 $\pm$ 0.9	166 $\pm$ 13	nd	227	
T6	4.60 $\pm$ 0.07	27.2 $\pm$ 3.1	nd	nd	112 $\pm$ 9	nd	144	
T7	6.12 $\pm$ 0.44	55.1 $\pm$ 1.4	nd	56.4 $\pm$ 1.7	84.1 $\pm$ 5.7	nd	202	
T8	62.8 $\pm$ 3.8	231 $\pm$ 17	nd	nd	250 $\pm$ 21	nd	544	
T9	4.90 $\pm$ 0.59	nd	nd	nd	164 $\pm$ 9	nd	169	
T10	12.3 $\pm$ 0.5	131 $\pm$ 11	nd	nd	71.6 $\pm$ 2.7	nd	215	
T11	6.06 $\pm$ 0.16	22.4 $\pm$ 0.18	nd	191 $\pm$ 10	104 $\pm$ 7	10.6 $\pm$ 0.5	334	
T12	3.38 $\pm$ 0.61	5.44 $\pm$ 0.23	nd	3.33 $\pm$ 0.21	420 $\pm$ 30	3.99 $\pm$ 0.79	436	
T13	nd	274 $\pm$ 11	nd	61.5 $\pm$ 3.8	268 $\pm$ 18	nd	604	
T14	12.4 $\pm$ 0.4	58.3 $\pm$ 2.9	nd	11.8 $\pm$ 0.8	82.3 $\pm$ 3.5	nd	165	
T15	17.6 $\pm$ 2.1	74.1 $\pm$ 4.3	nd	2.92 $\pm$ 0.23	107 $\pm$ 8	nd	202	
F1	11.4 $\pm$ 1.3	35.9 $\pm$ 1.8	nd	nd	28.1 $\pm$ 1.6	nd	79.0	
F2	11.0 $\pm$ 0.9	30.8 $\pm$ 1.1	nd	nd	23.4 $\pm$ 1.2	nd	65.2	
F3	nd	31.8 $\pm$ 1.9	nd	20.7 $\pm$ 2.1	31.3 $\pm$ 2.0	nd	83.8	

nd – not detected

Since this is the first study determining phthalate concentrations in maize tortilla, it seemed interesting to compare the results obtained here with PAEs concentrations reported elsewhere for foods elaborated from grains; as can be observed in Table 6, relatively few data were found and these included products based on wheat, buckwheat, rice and maize [16-18, 24, 32-35]. As already highlighted before, in all cited studies DEHP presented the highest concentrations among PAEs and was followed by DBP and DEP. Tortillas analyzed in the present work contained higher concentrations of PAEs with respect to PAEs estimated in maize grain using algorithm that considered different sources of contamination [35]; however,



our results were lower than those reported for maize grain under irrigation with wastewater [17]. In addition to the demonstrated uptake of PAEs by maize plant [17], grain-derived food items may become contaminated during elaboration process and due to migration of phthalates from packing materials [6, 9].

### Tortilla making and storage as potential sources of PAEs contamination

Nowadays, practically all commercialized tortillas are prepared from maize flour. The PAEs concentrations found in three major brands of flour (F1-F3) are presented in Table 5. Overall, the results for the three samples were similar, with DBP (30.8 - 35.9  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and DEHP (23.4 - 31.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) found as the most abundant phthalates; DMP and DnOP were not detected, DEP was found in two samples (11.0 - 11.4  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and DEHA only in F3 brand (20.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Most importantly, total PAEs were generally lower in flour (65.2 - 83.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) than in tortillas (98.9 - 604  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and these products could be classified as medium contaminated, according to Serrano et al. [24]. Concentrations found in the flour samples were similar to those estimated in grain by mathematical modelling (Table 6) [35]. Certainly, maize flour should be considered as one of the PAEs sources related to their content in grain; however, due to the higher concentration and higher variability of total and individual phthalates in tortillas as compared to flour, tortilla making, and storage should be considered as additional sources of contamination. During elaboration, a dough may capture PAEs from the containers and from the surrounding environment, especially when exposed on the conveyor belt. As to the storage conditions, variables such as the type of packing material, time and temperature might affect migration of phthalates from the wrap. As shown in Table 1, these three variables were varying in fifteen samples analyzed. Taking the values of descriptive variables from Table 1 and the concentrations of individual PAEs determined in each tortilla, principal component analysis (PCA) was carried out. This multivariate method is generally considered an unrestricted tool useful to present the structure of data while reducing their dimensionality and it can be applied to any data matrix (independently of physical dimensions of variables) [36]. We performed PCA to detect possible relationships between storage conditions and PAEs content in tortilla. The obtained model is presented in Fig. 2; after elimination of two outliers (T2, T7), two first principal components accounted for 61% of total data variability. The scores and X-loading plots show the distribution of tortilla samples (Fig. 2a) and the distribution of variables (Fig. 2b), respectively, in the bi-dimensional space of two first PCs. As can be observed, PCA model ordered samples according to their PAEs content: from low contaminated T1, T6, T9 to heavily contaminated T3, T13. Indeed, a cluster of three most abundant and total PAEs on X-loading plot is located in the same space as contaminated samples on the scores plots. Considering PC1, variables of time (t) and packing material (PM) are grouped with PAEs concentrations, indicating that long storage time and plastic bags (see Table 1, where plastic bags are annotated as 1 and paper wrap as -1) contribute to tortilla contamination with phthalates. It was expected that keeping tortillas warm in plastic bags should facilitate migration of phthalates; however, temperature seems to be inversely related to other variables (Fig. 2b). As indicated in Table 1, tortillas are kept warm only if they are to be sold at the same day (short time) and if so, they are wrapped in paper (-1 value for PM); that is why PCA model related inversely temperature with time and package. In further studies, the effect of temperature on PAEs migration from packing material to tortilla should be studied in more detail; this aspect is important because for consumption, tortillas are usually heated wrapped. It is also important to emphasize that PCA results are preliminary, and larger series of samples characterized by different descriptive variables (storage time, temperature and packing material) should be included in future work.

### Conclusions

In this work, phthalate determination in maize tortilla was carried out for the first time. A procedure based on gas chromatography separation and mass spectrometry detection in multiple reaction monitoring mode was set up, yielding method detection limits for six priority PAEs and for di(2-ethylhexyl) adipate in the range 0.94 - 3.21  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Baseline chromatographic separation of the analytes allowed for using these same ion transitions for quantification of DEP, DBP, BBP, DEHP and DnOP providing the highest possible signals magnitude. Fifteen commercial tortilla samples were analyzed and the obtained results indicated medium-to-high contamination with PAEs. The obtained results indicate the following contamination sources: (i) PAEs contained in maize flour; (ii) exposure to phthalates during tortilla making and (iii) migration from packing material which is favored by storage time and usage of plastic bags. Further studies should clarify effect of temperature on PAEs migration from wrap to tortilla.

**Table 6.** Selected examples of concentrations reported for priority PAEs in grain-derived foods in comparison with the results of this work.

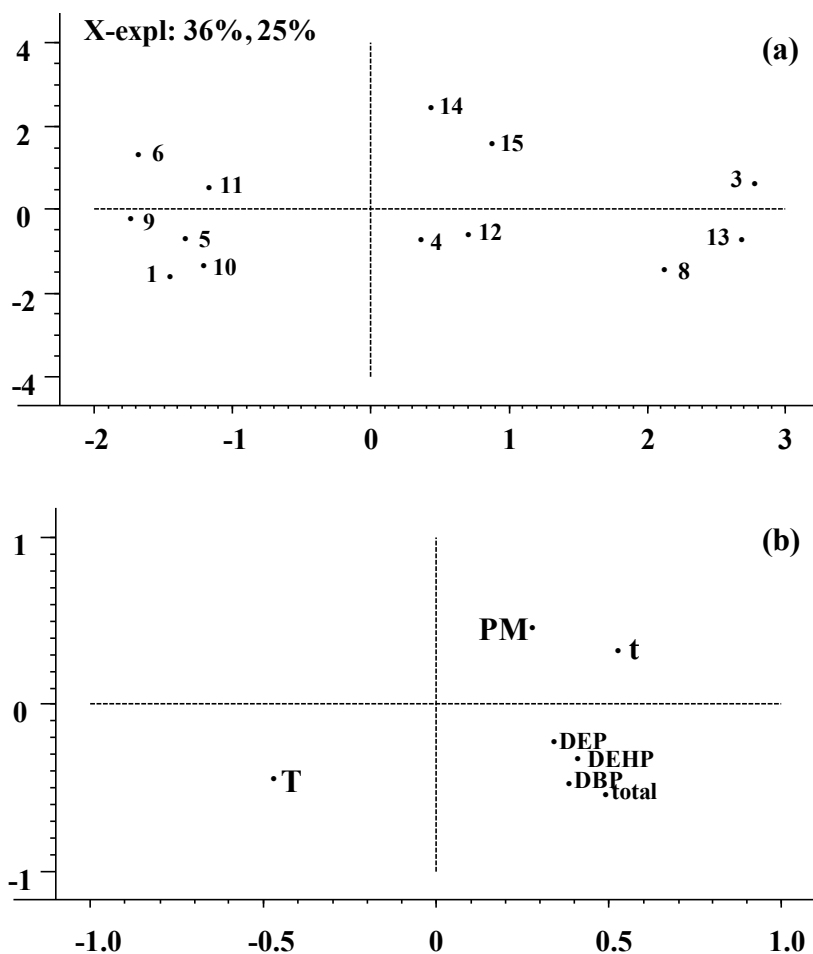
Food items	DMP	DEP	DBP	BBP	DEHA	DEHP	DnOP	ref
Wheat, bread and bread products	3.27-58.9	0.35-1.97	13.7-572	NA	NA	45.7-750	nd	[18]
	NA	NA	1.9-41	0.6-1.9	NA	12-536	NA	[16]
	NA	NA	93.0-232	NA	NA	111-386	NA	[38]
	nd-3.2	nd-50	nd-5130	nd-440	NA	nd-3400	nd-33.4	[24]
Cereals and cereal products	NA	40-2200	30-1900	480	100-2200	20-3400	NA	[33]
	nd-58.9	nd-2200	nd-2100	nd-530	NA	nd-4400	nd-61.4	[24]
	NA	NA	7.5-152.4	NA	NA	5.0-270.4	NA	[38]
Buckwheat pancakes	NA	NA	1.0	nd	NA	9.8	NA	[16]
Pasta, noodles and rice	nd-0.41	0.02-1.45	1.48-99.0	NA	NA	14.0-378	nd	[18]
	nd-90.8	nd-22.4	nd-360	nd-63	NA	nd-761.6	nd-6.1	[24]
	NA	NA	3.6	0.6	NA	53.1	NA	[16]
Total diet	nd	9.63	23.2	12.4	1.4-6010	14.4-714	nd	[34]
Maize-containing products	NA	NA	54.2	0.7	NA	114	NA	[16]
Maize grain	958*	538*	3099*	528*	NA	2072*	4866*	[17]
	NA	7.7**	21**	4.7**	NA	209**	NA	[35]
Maize tortilla	nd	nd-73.2	nd-274	nd-21.3	nd-197	23.4-420	nd-10.6	***
Maize flour	nd	nd-11.4	30.8-39.5	nd	nd-20.7	23.4-31.3	nd	***

\* cultivates irrigated with wastewater;

\*\* concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  fresh mass) estimated by mathematical modelling;

\*\*\* results obtained in this work;

NA - not analyzed; nd - not detected.



**Fig. 2.** Principal component analysis (PCA) of data characterizing tortilla samples T1-T15: (a) scores plot showing the distribution of tortilla samples and (b) X-loadings plot showing distribution of variables (DEP, DBP, DEHP and total PAEs concentrations; t - storage time; T - storage temperature; PM - packing material, see Table 1), both in the reduced dimensionality of PC1 and PC2.

## Acknowledgements

The financial support from National Council of Science and Technology, Mexico (CONACYT), project 123732 is gratefully acknowledged. The authors also thankfully acknowledge the support from the University of Guanajuato, projects 800/2016 and 721/2016.

## References

1. Cao, X. L. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safe.* **2010**, *9*, 21-43.
2. Bergé, A.; Cladière, M.; Gasperi, J.; Coursimault, A.; Tassin, B.; Moilleron, R. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20*, 8057-8076.
3. Chen, X.; Xu, S.; Tan, T.; Lee, S. T.; Cheng, S.H.; Lee, F. W. F.; Xu, S. J. L.; Ho, K. C. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 3156-3168.
4. Keith, L.; Telliard, W. *Environ. Sci. Technol.* **1979**, *13*, 416-423.
5. Bernard, L.; Décaudin, B.; Lecoeur, M.; Richard, D.; Bourdeaux, D.; Cueff, R. *Talanta* **2014**, *129*, 39-54.
6. Salazar-Beltrán, D.; Hinojosa-Reyes, L.; Ruiz-Ruiz, E.; Hernández-Ramírez, A.; Guzmán-Mar, J. L. *Food Anal. Methods* **2017**, <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0961-8>.

7. Haji Harunarashid, N. Z. I.; Lim, L.H.; Harunsani, M.H. *Food Anal. Methods* **2017**, <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0938-7>.
8. Yang, J.; Li, Y.; Wang, Y.; Ruan, J.; Zhang, J.; Sun, C. *Trend. Anal. Chem.* 2015, 72, 10-26.
9. Arvanitoyannis, I. S.; Kotsanopoulos, K. V. *Food Bioprocess. Technol.* **2014**, 7, 21-36.
10. Serodio, P.; Nogueira, J. M. *Water Res.* **2006**, 40, 2572-2582.
11. Marega, M.; Grob, K.; Moret, S.; Conte, L. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1273, 105-110.
12. Russo, M. V.; Avino, P.; Perugini, L.; Notardonato, I. *RSC Adv.* **2015**, 5, 37023-37043.
13. Ostrovsky, I.; Cabala, R.; Kubinec, R.; Gorova, R.; Blasko, J.; Kubincova, J.; Rinnacova, L.; Lorenz, W. *Food Chem.* **2011**, 93, 315-322.
14. Ranjbari, E.; Hadjmohammadi, M. R. *Talanta* **2012**, 100, 447-453.
15. Xu, D.; Deng, X.; Fang, E.; Zheng, X.; Zhou, Y.; Lin, L.; Chen, L.; Wu, M.; Huang, Z. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1324, 49-56.
16. Cariou, R.; Larvor, F.; Monteau, F.; Marchand, P.; Bichon, E.; Dervilly-Pinel, G.; Antignac, J. P.; Le Bizec, B. *Food Chem.* **2016**, 196, 211-219.
17. Tan, W.; Zhang, Y., He, X.; Xi, B.; Gao, R.; Mao, X.; Huang, C.; Zhang, H.; Li, D.; Liang, Q.; Cui, D.; Alshwabkeh, A. N. *Sci Reports* **2016**, 6, 31987.
18. Guo, Y.; Zhang, Z.; Liu, L.; Li, Y.; Ren, N.; Kannan, K. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 6913-6919.
19. Shen, H. Y. *Talanta* **2005**, 66, 734-739.
20. Net, S.; Delmont, A.; Sempéré, R.; Paluselli, A.; Ouddane, B. *Sci. Tot. Environ.* **2015**, 515:162-180.
21. Liu, Y.; Wang, S.; Wang, L. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61, 1160-1164.
22. Guo, Z.; Wang, S.; Wei, D.; Wang, M.; Zhang, Z.; Gai, P.; Duan, J. *Meat Sci.* **2010**, 84, 484-490.
23. Gimeno, P.; Thomas, S.; Bousquet, C.; Maggio, A. F.; Civade, C.; Brenier, C.; Bonnet, P. A. *J. Chromatogr. B* **2014**, 949-950, 99-108.
24. Serrano, S. E.; Braun, J.; Trasande, L.; Dills, R.; Sathyanarayana, S. *Environ. Health* **2014**, 13, 43-56.
25. NMX-F-083-1986. Alimentos. determinacion de humedad en productos alimenticios.
26. United States Consumer Safety Commission: Test Method CPSC-CH-C1001-09.3, **2010**. [https://www.cpsc.gov/s3fs-public/pdfs/blk\\_media\\_CPSC-CH-C1001-09.3.pdf](https://www.cpsc.gov/s3fs-public/pdfs/blk_media_CPSC-CH-C1001-09.3.pdf).
27. United States Environmental Protection Agency (USEPA): Method 8000D Determinative chromatographic separations. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8000d.pdf>.
28. Gonzalez Ibarra, A. A.; Wrobel, K.; Corrales Escobosa, A. R.; Torres Elguera, J. C.; Garay Sevilla, M. E.; Wrobel, K. *J. Chromatogr. B* **2015**, 1002, 176-184.
29. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2/R1), **2012**. [http://www.ish.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ish.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf).
30. Dong W.; Sun B.; Sun J.; Zheng F.; Sun X.; Huang M.; Li H., *Food Anal. Methods* **2017**, 10, 3166-3180.
31. Guo, Y.; Kannan, K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 404, 2539-2554.
32. Schechter, A.; Lorber, M.; Guo, Y.; Wu, Q.; Yun, S. H.; Kannan, K.; Hommel, M.; Imran, N.; Hynan, L. S.; Cheng, D.; Colacino, J. A.; Birnbaum, L.S. *Environ. Health Perspect.* **2013**, 121, 473-479.
33. Page, B.D.; Lacroix, G. M. *Food Addit. Contam.* **1995**, 12, 129-151.
34. Cao, X. L.; Zhao, W.; Dabeka, R. *Food Addit. Contam.* 2015, 32, 1893-1901.
35. Fierens, T.; Standaert, A.; Cornelis, C.; Sioen, I.; De Henauw, S.; Willems, H.; Bellemans, M.; De Maeyer, M.; Van Holderbeke, M. *Environ. Int.* **2014**, 73, 117-127.
36. Wold, S.; Esbensen, K. Geladi, P. *Chemom. Intell. Systems* **1987**, 2:37-52.
37. Sagratini, G.; Fernandez-Franzon, M.; De Berardinis, F.; Font, G.; Vittori, S.; Mañes, J. *Food Chem.* **2012**, 132, 537-543.
38. Cirillo, T.; Fasano, E.; Castaldi, E.; Montuori, P.; Amodio Cocchieri, R. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 10532-10538.

## Identification by MALDI-TOF MS of Environmental Bacteria with High Potential to Degrade Pyrene

Hortencia Silva-Jiménez<sup>2</sup>, Cynthia Lizzeth Araujo-Palomares<sup>2</sup>, José Vinicio Macías-Zamora<sup>2</sup>, Nancy Ramírez-Álvarez<sup>2</sup>, Bianey García-Lara<sup>1</sup>, Alma Rosa Corrales-Escobosa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universidad de Guanajuato, Lascrain de Retana 5, 36000 Guanajuato, México

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Carretera Tijuana-Ensenada, No. 3917, Fraccionamiento Playitas, 22860, Ensenada, Baja California, México.

\*Corresponding author: phone +52 4737327555; e-mail: [alma\\_rce@ugto.mx](mailto:alma_rce@ugto.mx)

Received November 30<sup>th</sup>, 2017; Accepted January 11<sup>th</sup>, 2018.

DOI: <http://dx.doi.org/10.29356/jmcs.v62i2.411>

**Abstract.** An alternative to remove polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of the environment is using hydrocarbonoclastic bacteria. The aim of this work was to study the bacterial diversity of indigenous isolates with potential to degrade pyrene. We used MALDI-Biotyper (Bruker Daltonics) as a powerful analytical tool for identification. Bacteria were isolated from surface seawater and marine sediments samples of three sites from the coast of Rosarito Port, B.C., Mexico. Total concentration of PAHs in collected samples was quantified by GC-MS, showed values ranged 0.461-0.525 ng mL<sup>-1</sup> and of 74 -266 ng g<sup>-1</sup> in seawater and sediments samples, respectively. A total of 52 bacteria with capacity to grow in 25 mg L<sup>-1</sup> pyrene as sole carbon and energy source were taxonomically identified and classified by MALDI-Biotyper system by comparing the mass spectra with library and/or to use chemometric tools as Principal Components Analysis (PCA) and Composite Correlation Index (CCI) to evaluate possible differences to isolate level. The identified isolates were represented by three phylogenetic groups: Firmicutes, Actinobacteria and Proteobacteria. Of these isolates, *Kocuria* strains appear to be excellent candidates to continue PAHs degradation studies.

**Key words:** PAHs; hydrocarbonoclastic bacteria; identification; MALDI-Biotyper; principal component analysis.

**Resumen.** Una alternativa para remover los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) del ambiente es usando bacterias hidrocarbonoclastas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la diversidad bacteriana de aislados nativos con potencial para degradar el pireno empleando al sistema MALDI-Biotyper (Bruker Daltonics) como una potente herramienta analítica de identificación y clasificación. Para ello, las bacterias fueron aisladas de muestras de agua superficial de mar y sedimento de tres sitios de la costa del Puerto de Rosarito, B.C., México. La concentración total de HAP en las muestras colectadas fue cuantificada por GC-MS, observándose valores en un rango de 0.461 – 0.525 ng mL<sup>-1</sup> en agua de mar superficial y de 74 -266 ng g<sup>-1</sup> en las muestras de sedimentos. Un total de 52 bacterias con capacidad de crecer en 25 mg L<sup>-1</sup> de pireno como única fuente de carbono y energía fueron clasificados taxonómicamente por el sistema MALDI-Biotyper mediante la comparación de los espectros de masas con una librería y/o mediante la utilización de herramientas quimiométricas como Análisis de Componentes Principales (PCA; por sus siglas en inglés) y Coeficiente de Correlación de Concordancia (CCI; por sus siglas en inglés) para evaluar posibles diferencias a nivel de aislado. Los aislados identificados fueron representados por tres grandes grupos filogenéticos: Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria. De estos aislados, las cepas del género de *Kocuria* parece ser excelentes candidatas continuar los estudios de degradación de HAP.

**Palabras clave:** HAP; bacterias hidrocarbonoclastas; identificación; MALDI-Biotyper; Análisis de Componentes Principales.

## Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are well known contaminants mostly originating from natural and anthropogenic combustion processes. The US Environmental Protection Agency (EPA) have catalogued 16 PAHs as priority contaminants to their toxicity and have mutagenic or carcinogenic effects in organisms [1]. In addition to being recalcitrant and persistent in the environment [2].

PAHs in marine environments are likely to increase due to anthropogenic activities in the coastal zones, such as sewage discharges, marine traffic of ships, fuel loading and unloading and this represents a long-term environmental risk. For instance, considerable amounts of PAHs have been reported in marine sediments of several points of the Coast of Baja California, including Todos Santos Bay and Rosarito Port area in Baja California, Mexico, and high molecular weight (HMW) PAHs, as phenanthrene and pyrene, were the most abundant [3, 4].

The use of native hydrocarbonoclastic marine bacteria is a feasible alternative to reduce PAHs from the marine environment. Usually, the presence of PAHs pollutants promotes the growth in these kinds of bacteria through the activation of integrated specialized machinery that consists of an enzymatic battery and mechanisms such as chemotaxis, biofilm formation, biosurfactant production, among others, which facilitate the biodegradation process. Many marine members of *Bacteria* domain, like *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Ochrobactrum*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, among others, have been reported to degrade PAHs [5-7].

On the other hand, the isolation and typing of indigenous bacterial strains are important tasks for the selection of the microbial community suitable for bioremediation purposes and low the risk to human health and other wild communities. Identification of specific strains also facilitates the study of the molecular mechanism of PAHs degradation applying the emerging technology "omics". For instance, the bacterial identification/classification method per excellence has been the 16S rRNA gene sequencing PCR-based, nevertheless, is costly and time consuming and is important the selecting the accurate region gene to sequence to distinguish closely related bacterial species [8].

The molecular identification and classification of microorganisms using proteomic profiles provided by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) coupled to time-of-flight mass spectrometry (TOF MS) has been widely used over the last two decades in clinical, environmental and food microbiology [9]. Through analysis by MS of intact-cell or partial bacterial cell lysis, abundant proteins (principally ribosomal) are detected based on  $m/z$  value and intensity. The proteins profile of each strain can be used for taxonomic classification at the level of genus or species using spectra of reference organisms included is specialized libraries. In general, identification by MALDI is fast, inexpensive with effective great resolution to discriminate species and reliable results as more as 16S rRNA gene sequence analysis. However, these advantages are still controversial and strongly dependent on the software/database used to analyze the result. Currently, five are commercially available systems [10].

This study was conducted to identify pyrene-utilizing bacteria isolated from the coastal area of Rosarito Port, B.C., Mexico by use MALDI-Biotyper (Bruker, Daltonics) and demonstrate that it is becoming an essential analytical tool in the environmental microbiology field.

## Experimental

### Reagents

All chemicals were of analytical reagent grade. Deionized water (18.2 MΩ cm, Labconco); ethanol, acetonitrile (MeCN), trifluoroacetic acid (TFA), dichloromethane, hexane and chloroform, as well as the matrix for MALDI ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid: HCCA) were purchased from Sigma-Aldrich. Twenty five PAHs analytical standard were naphthalene, 1-methylnaphthalene, 2-methylnaphthalene, biphenyl, 2-dimethylnaphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, 3-trimethylnaphthalene, fluorene, dibenzothiophene, phenanthrene, anthracene, 1-methylphenanthrene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, benzo(e)pyrene, perylene, benzo(g,h,i)perylene, dibenzo(a,h)anthracene, indene (1,2,3) pyrene were from UltraScientific.

## Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons concentration in marine sediments and surface seawater samples

**Extraction of PAHs from sediments.** A modified method to PAHs extraction of sediments developed according to Murphy et al [11] using an accelerated extraction system by solvent Dionex ASE 350. A stainless steel cell of 34 mL was used. The method consists of four static cycles of 5 minutes at 100 °C and 1500 psi of constant pressure, with 60% replacement volume of total cell capacity, 180 seconds of purge and dichloromethane as extraction solvent. To remove interferences during the sample extraction, in-cell cleanup was used (layer of silica and basic alumina). The quality control included certified standard reference material (NIST SRM 1941b), procedure blanks and surrogate recoveries.

**Extraction of PAHs from seawater.** Seawater (1.8 L) samples were extracted with dichloromethane in funnel (3 X 60 mL). The extracts were concentrated and cleaned through liquid chromatography by column (10 mL syringe) packed with basic alumina and eluted in sequence with 10 mL hexane, 20 mL hexane:dichloromethane (1:1, v/v) and 10 mL dichloromethane. The quality control included fortified and procedure blank, and surrogate recoveries.

**Chromatographic method to determine PAHs concentration in seawater and sediments samples.** Gas chromatography coupled to mass-spectrometer detector (GC-MS) in electronic impact mode (EI) was used to analyze extracts obtained from seawater and sediments samples. The DB-5MS 30m long column (250  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies, Inc) was used to separate analytes. The GC-MS conditions were as follows: 1  $\mu\text{L}$  was injected in the splitless mode 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Helium was used as carrier gas at flow of 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Injection port and interface detector were maintained at 280 °C. The oven program consisted of initial temperature at 70°C for 0 min to a final temperature of 325°C and a rate of 5 °C  $\text{min}^{-1}$ , with a final hold time of 6 min, for a total run time of 60 min. PAHs were quantitated by selective ion monitoring (SIM) with standard mixture 25 analytes and *p*-terphenyl- $\text{d}^{14}$  as internal standard [11, 12].

## Enrichment culture and bacterial isolation

Pyrene-utilizing bacteria were obtained from marine sediments and surface seawater samples collected at three sites in the coastal area of Rosarito Port, Baja California, Mexico (M, C and CFE sampling sites). The medium Bushnell Haas broth (BH) supplemented with 25  $\text{mg L}^{-1}$  pyrene (as the sole carbon and energy source) was used for the bacterial enrichment and isolation. Briefly, for the first enrichment, 1 g of marine sediment or 1 mL of surface seawater from each sample was added to sterilized culture medium and then incubated in the dark at 25 °C  $\pm$  2 °C, in rotatory shaker (160 rpm), for 7 days. Ten percent of the first enrichment of each culture was transferred to the flasks with fresh media supplemented with pyrene. The enrichment and transfer processes were made three times. Bacterial isolates were obtained by inoculate 20, 50 and 100  $\mu\text{L}$  of the last enrichment in Bushnell Haas agar plates previously sprayed with 25  $\text{mg L}^{-1}$  of pyrene. Colonies morphologically distinct were recovered and submitted to the streaking method on BH agar plates supplemented with 25  $\text{mg L}^{-1}$  pyrene to obtain pure cultures.

## MALDI-TOF MS and identification of the isolate by Biotyper system

The isolates obtained from the previous step were identified by the MALDI-Biotyper system. Briefly, 500  $\mu\text{L}$  of overnight cultures (18 h/37 °C) in LB broth were centrifuged, the pellet was suspended in 1 mL of water and centrifuged again. The pellet obtained was mixed with 1 mL of ethanol (70%) centrifuged and the pellets were resuspended in equal parts of formic acid (70%) and acetonitrile. The protein extract of each isolate was obtained in triplicate, from independent cultures (biological replica) and 1  $\mu\text{L}$  of extracts was deposited on a spot of polished steel target, air dried, and spot each were overlay with 1  $\mu\text{L}$  of matrix solution (2.5 mg of HCCA in 250  $\mu\text{L}$  of 50 % acetonitrile / 2.5% TFA v/v). Each biological replica was applied to five spots and acquired in duplicate. Samples were processed using a AutoFlex speed MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Germany) equipped with a smartbeam<sup>TM</sup>-II Nd:YAG laser. Mass spectra profiles were recorded in a linear positive ion mode with instrument parameters optimized for the range of  $m/z$  2,000 to 20,000 under control software (flexControl 3.0; Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The acquisition spectrometer parameters were using the pre-programmed MBT.FC.par method: the voltages of ion sources 1 and 2 were set at 19.4 kV and 18.07 kV, respectively. The lens voltage was set at 7.0 kV. External mass calibration was done with a mixture of proteins contained in the Bacterial Test Standard (BTS, Bruker Daltonics) with an average mass tolerance of about 25 ppm.

After each measurement, the spectra were manually inspected using FlexAnalysis3.4 software to verify the quality. Spectra quality criteria of base peak signal-to-noise (S/N threshold of 5) ratio, minimum relative intensity threshold of 5%, base peak resolution, number of peaks, and mass range of peaks were selected according to previous reports [13]. Mass deviation within the spectra sets was analyzed. Flat-liners

and spectra with peak variations (outliers) were removed from the collection, and additional measurements were carried out. Raw spectra were transferred to Biotyper Compass Explorer (Bruker Daltonics, Germany, Version 4.1.14) [14]. Before starting the identification, the preprocessing of the mass spectra was performed and that included five steps: mass adjustment (Spectra Compressing by a factor of 10), smoothing (Savitsky-Golay algorithm with a frame size of 25 Da to the mass adjusted data), baseline subtraction (TopHat algorithm), normalization (Maximum) and peak picking, following the recommendations for Bacterial identification strategies by MALDI-TOF MS [15] was then assigned to its specific node on the taxonomy tree.

In order to visualize the discrimination or relationship between the mass spectra of isolate related [16], Principal Components Analysis (PCA) and the Composite Correlation Index (CCI) were performed using Biotyper Compass Explorer (Bruker Daltonics, Germany, Version 4.1.14).

## Results and Discussion

### Determination of PAHs in surface seawater and marine sediments

The analysis of 25 PAHs from samples of surface seawater and marine sediment of three sites from at area of coastal in Rosarito Port, B.C., Mexico (M, C and CFE) was performed using GC-MS (Table 1). It should be noted that in these sampling areas there is a discharge of fuel (M and C sites) and boat transit (CFE). The total concentration of PAHs presented similar values in all surface water samples analyzed (0.461 – 0.525 ng mL<sup>-1</sup>); whereas higher levels were found in the sample of marine sediment (74 -266 ng g<sup>-1</sup> dry weight) indicating light PAHs pollution. The levels of PAHs reported in our study were resemble to the levels found in other regions of the world [17-19].

The results obtained from each individual PAH of marine sediments and surface seawater at each tested place are displayed in Table 1. It is clearly observed that in the surface water samples the predominant PAHs were compounds of low molecular weight (LMW) PAHs (2–3 rings). Specifically, largest values presented were for naphthalene (0.044 -0.063 ng mL<sup>-1</sup>), fluorene (0.061 – 0.073 ng mL<sup>-1</sup>), and phenanthrene (0.088 – 0.095 ng mL<sup>-1</sup>) while high molecular weight (HMW) PAHs (4–6 rings) were present at much lower concentrations (0.003 -0.005 ng mL<sup>-1</sup>). This suggests that the incomplete combustion of fossil hydrocarbons may be the predominant source of PAHs in surface water [20].

On the other hand, HMW-PAHs have prevalence in the sediment samples. Being the CFE site the one that contains the highest concentrations of PAHs, particularly, of fluoranthene (45.82 ng g<sup>-1</sup>), pyrene (39.12 ng g<sup>-1</sup>), and benzo (a)pyrene (26.09 ng g<sup>-1</sup>). It is known that LMW-PAHs are more easily biodegradable and consequently, predominant in seawater due to their partial solubility, whereas HMW-PAHs are recalcitrant and hydrophobic compounds, therefore, they can adsorb onto settling particles and reach the marine sediment bed [21, 22].

Additionally, to evaluate potential petrogenic or pyrogenic PAHs sources in samples of sediments, FI/Pyr and BaAnt/Chr ratios were calculated. The FI/Pyr index values obtained for CFE and C sampling sites were 1.17 and 0.76, respectively, while at M sampling site could not be calculated, since fluoranthene was below the detection limit. As for the BaAnt/Chr index, calculated values in three sampling sites were 1.96 (CFE), 2.64 (C) and 2.44 (M). Hydrocarbon source maybe pyrogenic, if ration is of FI/Pyr >1 and BaAnt/Chr <2, but if values are <1 y >2, respectively, indicate a possible petrogenic source [23]. Indices values obtained in this work suggest that hydrocarbons present in CFE sampling site could be from pyrogenic source, while in M and C sampling sites, a petrogenic origin of these compounds is likely. This is in accordance with anthropogenic activities that are carried out in the coastal area of the Rosarito Port, where there are fuel discharges (M and C sampling sites) and boat traffic (CFE sampling site).

One of the most abundant HWM PAHs found in seawater and marine sediments was pyrene. Therefore, the isolated bacteria were considered as highly promising to degrade this pollutant. Despite the fact that pyrene *per se* is not carcinogenic compound [21, 24], it has a chemical structure of four rings similar to several carcinogenic PAHs as benzo(a)pyrene which is highlights the importance to remove it of the environment [25]. Further, numerous studies on pyrene degradation by *Mycobacterium* spp. have been reported and their degradation pathways have subsequently been studied through chemical and omics analyses [23, 26-28]. Biodegradation by bacteria has been further advanced through the documentation of new isolates that represent diverse bacterial types that have been isolated from different environments and that possess different metabolic capabilities [18, 29, 30]. Therefore, in this work we carried out the isolation of indigenous bacteria from seawater and marine sediments samples through the enrichment method using pyrene as the sole carbon and energy source.



**Table 1.** PAHs concentrations values measured in surface seawater and marine sediments from Rosarito Port, B.C., Mexico.

Compound	Sampling site					
	M		C		CFS	
	SW <sup>1</sup>	S <sup>2</sup>	SW <sup>1</sup>	S <sup>2</sup>	SW <sup>1</sup>	S <sup>2</sup>
NAPHTHALENE (N)	0.051	L.D.L.	0.063	L.D.L.	0.044	L.D.L.
1-METHYL NAPHTHALENE (1-MN)	0.026	L.D.L.	0.028	L.D.L.	0.023	L.D.L.
2-METHYL NAPHTHALENE (2-MN)	0.013	L.D.L.	0.015	L.D.L.	0.012	L.D.L.
BIPHENYL (BPh)	0.008	L.D.L.	0.009	L.D.L.	0.007	L.D.L.
2-DIMETHYL NAPHTHALENE (2-DMN)	0.010	L.D.L.	0.010	L.D.L.	0.009	L.D.L.
ACENAPHTHYLENE (Acy)	0.004	L.D.L.	0.004	L.D.L.	0.004	L.D.L.
ACENAPHTHENE (Ace)	0.009	L.D.L.	0.010	L.D.L.	0.008	L.D.L.
3-TRIMETHYL NAPHTHALENE (3-TMN)	0.008	L.D.L.	0.010	L.D.L.	0.009	L.D.L.
FLUORENE (F)	0.061	1.37	0.073	1.09	0.063	L.D.L.
DIBENZOTHIOPHENE (DBT)	0.034	L.D.L.	0.041	L.D.L.	0.036	L.D.L.
PHENANTHRENE (P)	0.088	13.08	0.093	10.14	0.095	15.21
ANTHRACENE (Ant)	0.032	L.D.L.	0.036	L.D.L.	0.032	5.42
1-METHYL PHENANTHRENE (1-MP)	0.020	L.D.L.	0.023	L.D.L.	0.021	L.D.L.
FLUORANTHENE (Fl)	0.034	L.D.L.	0.042	5.78	0.037	45.82
PYRENE (Pyr)	<b>0.024</b>	<b>5.00</b>	<b>0.029</b>	<b>7.53</b>	<b>0.027</b>	<b>39.12</b>
BENZO (A) ANTHRACENE (BaAnt)	0.004	6.17	0.004	8.16	0.004	24.43
CHRYSENE (Chr)	0.004	2.52	0.005	3.09	0.005	12.32
BENZO(b) FLUORANTHENE (BbFl)	0.004	6.27	0.004	8.20	0.004	17.67
BENZO(k) FLUORANTHENE (BkFl)	0.004	3.70	0.004	4.38	0.004	11.24
BENZO(e) PYRENE (BePyr)	0.004	5.69	0.004	10.55	0.004	17.16
BENZO(a) PYRENE /BaPyr)	0.004	9.90	0.004	15.88	0.004	26.09
PERYLENE (Per)	0.004	5.58	0.004	9.01	0.004	8.20
INDENO(1,2,3) PYRENE (Ipyr)	0.003	7.91	0.003	8.70	0.003	19.17
DIBENZO(a,h) ANTHRACENE (DBahAnt)	0.004	L.D.L.	0.004	6.74	0.004	8.25
BENZO(g,h,i) PERYLENE (BghiPer)	0.003	6.94	0.003	8.30	0.003	16.15
<b>ΣPAHs</b>	<b>0.461</b>	<b>74.12</b>	<b>0.525</b>	<b>107.6</b>	<b>0.467</b>	<b>266.2</b>

D.L.= Detection Limit

L.D.L.=Low Detection Limit

SW=Seawater

S=Marine sediments

<sup>1</sup> = [ng mL<sup>-1</sup>]<sup>2</sup> = [ng g<sup>-1</sup> d.w.]

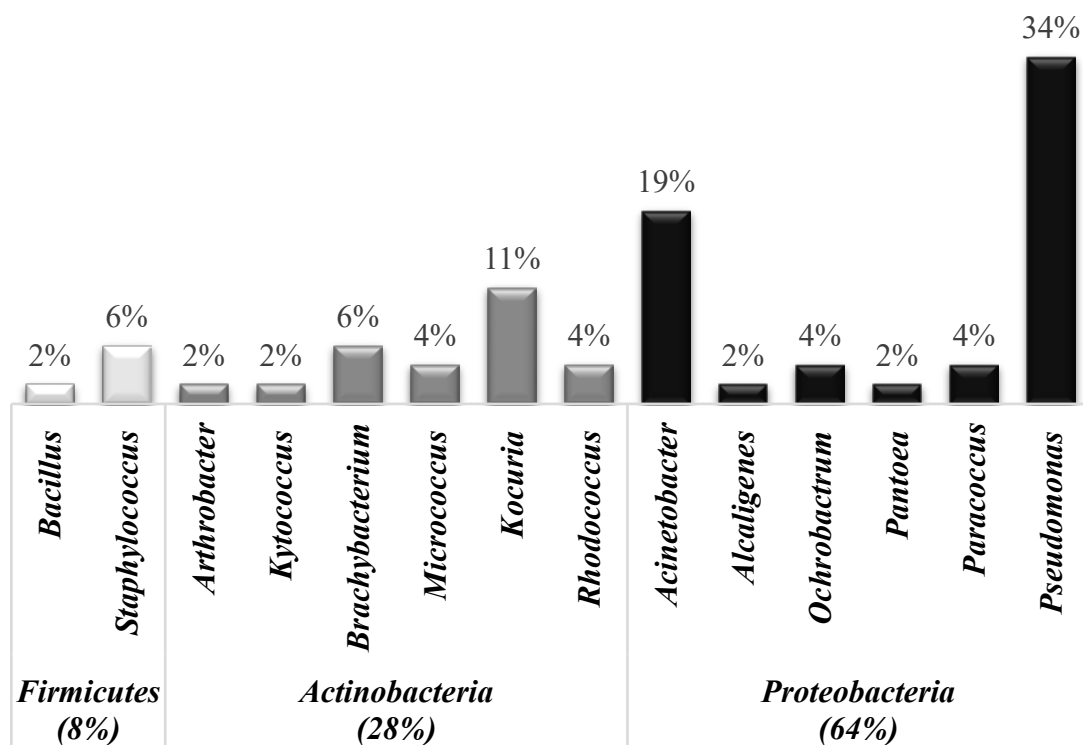
d.w.=dry weight

### Isolation and characterization of bacteria with high potential to degrade pyrene

A total of 52 native isolates with capacity to growth in 25 mg L<sup>-1</sup> of pyrene as sole source of carbon and energy were classified by MALDI Biotyper system. Initially, mass spectra obtained for each isolate were compared with reference database spectra (total of 5989 input). For this purpose, a pattern recognition algorithm uses peak positions, peak intensity distributions and peak frequencies, providing identification if the score value agree with the criteria established by the manufacturer [14]. Based on that, 12 of the isolates presenting the log(score) values between 1.70 and 1.99 were identified only at the genus level, whereas 19 of the isolates were assigned with the log(score) values  $\geq 2.00$  and  $\leq 2.30$ , so the allocation was at the species level. Finally, 21 isolates presented a log(score) levels up to 2.30, with highly probable species identification (Supplementary Table S1). It is important to note that although the database used is mainly composed of organisms of clinical origin, score values with high probability of identification have been

previously reported for environmental samples with results comparable equal or higher than those generated by 16S rRNA sequence [31, 32].

The distribution of the population isolated of the culture enriched with pyrene is presented in Fig. 1. The isolates fall into three large phyla: *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria*. The phylum *Firmicutes* was the least abundant with four isolates: one *Bacillus sp.* (2%) and three strains of *Staphylococcus* (6%). Curiously, despite the fact that *Bacillus* genus possesses a high metabolic versatility toward pyrene and other toxic compounds, it was found as the least abundant. Otherwise, some members of the *Staphylococcus* genus are well known human pathogens and also some of them as *S. warneri* have been reported to have the ability to degrade PAH [33]. In our case, for their ability to degrade PAHs [23, 34, 35]. and several reports proved utility of MALDI-TOFMS as a robust technique for identification of bacteria isolated from different environments [15, 32, 36, 37]. Of note, is important to use the database of clinical origin for the identification of isolated microorganisms with potential use in bioremediation and at the same time discard those that may represent a risk to health.



**Fig. 1.** Relative abundance distribution of strains isolated from PAHs-contaminated sediment from of culture enriched with pyrene.

### Chemotaxonomy of isolates identified as *Acinetobacter*, *Kocuria* and *Pseudomonas*

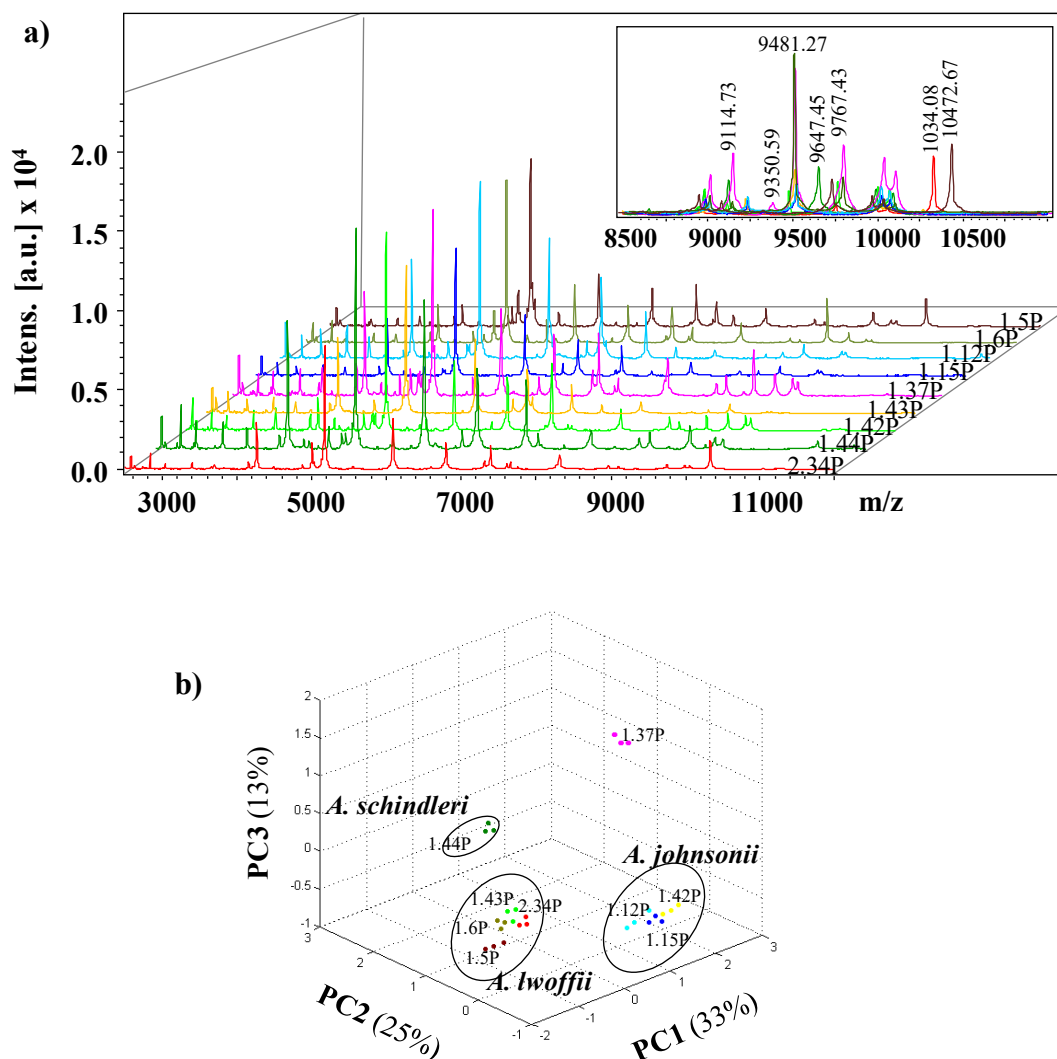
Because *Acinetobacter*, *Kocuria* and *Pseudomonas* were the most abundant bacterial communities and in some isolate of *Kocuria* and *Pseudomonas* the log (score) was less than 2.0, a detailed spectra analysis of the protein profile was also performed using chemometric tools as PCA and CCI. The aim of this analysis was to inquire the feasibility of differentiation or typification of strains from the same species.

### Typing of isolates identified the genus *Acinetobacter*, *Kocuria* and *Pseudomonas*

***Acinetobacter*.** The genus *Acinetobacter* consists of non-fermenting coccobacilli, strictly aerobic, non-motile that are widely distributed in nature [38] and recently some strains obtained of soils have demonstrated a hydrocarbon-degrading capability [39]. Furthermore, several MALDI-TOF MS studies showed its ability to differentiate various *Acinetobacter* spp. as well as organisms that fall within the Acb (*A. calcoaceticus*- *A. baumannii*) complex those are closely from each other and are considered pathogenic

species [40, 41]. In our case, all the nine isolates identified as *Acinetobacter* showed a log (score) value  $\geq 2$  (Table S1) and present the phenotypic characteristics of the genus.

Figure 2a shows typical protein fingerprints of the region between 2,500 and 12,500  $m/z$  obtained by MALDI-TOF MS of these nine isolates. The number of peaks in this range was similar for each of the strains, oscillating from 25-50. As an example, the peak at  $m/z$  9481 was present in all the isolates, while the peaks at  $m/z$  9114 and 9350, were only found in the isolated 1.37P; and peaks of  $m/z$  10340 and 10472 were characteristic for the isolated 2.34P and 1.5P, respectively (Fig. 2a). To increase the allowance of peaks distinguishing and reducing the weighting of common peak in data sets from closely related organisms, a PCA-based approach was used (Fig. 2b). In the obtained model, the first three components accounted for 75% of the total data variability. The distribution of samples agreed to the species and three perfectly defined clusters are observed according with three different species: *A. lwoffii*, *A. johnsonii* and *A. schindleri*. Cluster analysis of PCA separated the 1.44P isolate identified as *A. schindleri* of the other two identified species. All isolates identified as *A. johnsonii* (1.12P, 1.15P and 1.42P) were classified in the same cluster located on the right of the first component. Whereas the 1.37P isolate was grouped distant from the rest of the isolates identified as *A. lwoffii* (1.5P, 1.6P, 1.43P, 2.34P). In summary, these results clearly suggest that the 1.37P isolate is a different strain of *A. lwoffii* and confirm the relevancy of Biotyper system for easily distinguish between species and biotyping of *Acinetobacter* strains.

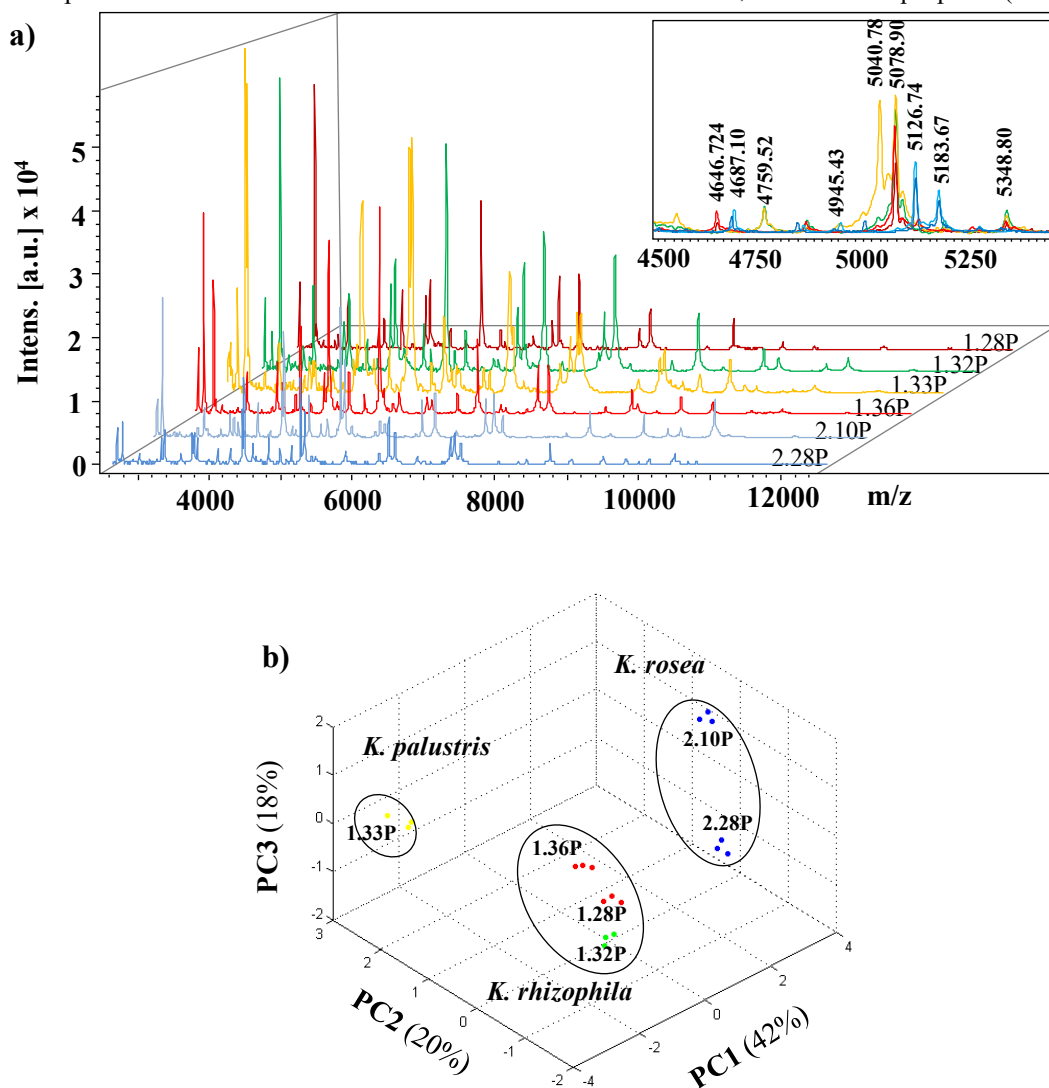


**Fig. 2.** Representative MALDI-TOF mass spectra of nine isolates identified as *Acinetobacter* and PCA 3D dot plots. a) Typical mass spectra of isolates 1.5P, 1.6P, 1.12P, 1.15P, 1.37P, 1.42P, 1.43P, 1.44P, and 2.34P are presented in the  $m/z$  range of 2,500 to 12,500 Da. b) PCA 3D dot plot of mass spectra obtained for the

isolates of *Acinetobacter* using Biotyper software (version 4.0.14). The PCA was realized considering three biological replicas for each isolate.

**Kocuria.** This genus was created in 1995 after a detailed phylogenetic and chemotaxonomic analysis of the genus *Micrococcus* from which it was separated. Currently it contains 19 species with validly published names and classified into four clades based in 16S rRNA gene sequence [42]. The members of the *Kocuria* genus were rarely associated with human infection so they are excellent candidates for bioremediation processes. In fact, several strains of *K. rosea* isolated from soil can degrade LMW-PAHs [43, 44].

The initial analysis of classification by MALDI-TOF mass spectrometry based on protein fingerprints using the Bruker database (22 reference spectra for different *Kocuria* strain) showed that isolates 1.28P, 1.32P, 1.33P, 1.36P, 2.10P and 2.18P, belong to the *Kocuria* genus (Table S1). Figure 3a shows mass spectra acquired for these strains in the  $m/z$  region 2,500 - 12,500. Macroscopic inspection of reveals both, common and differential peaks appearing in spectra of different strains. For example,  $m/z$  signals at 4687, 5126 and 5183 were found in the isolates identified as *K. rosea* whereas the  $m/z$  5078 and 5348 characteristic for the isolated of *K. rhizophila*. Despite being classified as different species, the 1.32P isolate presents some common ions with 1.33P isolate such as  $m/z$  4759, as well as unique peaks ( $m/z$  5040).



**Fig. 3.** Representative MALDI-TOF mass spectra of six isolates identified as *Kocuria* and PCA 3D dot plots. a) Typical mass spectra of isolate 1.28P, 1.32P, 1.33P, 1.36P, 2.10P and 2.28P are presented in the

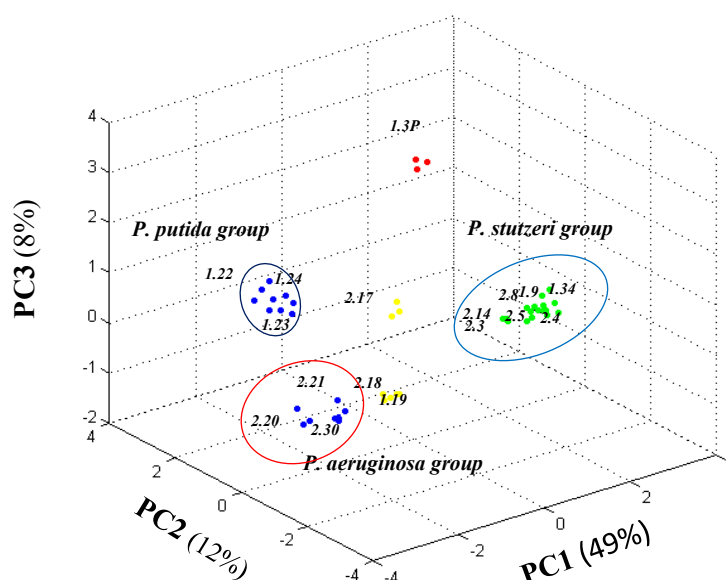
*m/z* range 2,500 - 12,500. b) PCA 3D dot plot of mass spectra of isolates of *Kocuria* using Biotyper software (version 4.0.14). The PCA was realized considering three biological replicas for each isolate.

Moreover, the PCA analysis of the MALDI mass spectrum was performed to determine the minimized differential peaks set and to investigate the relationships between the different strains of isolated that belong to *Kocuria* genus. The first three principal components contribute for 82% of the total data variability. Through the initial of identification analysis, the 1.33P isolate is classified as best match as *K. palustri* (log score =1.86) and as a second-best option as *K. rhizophila* (log score =1.86) but in the PCA analysis is separated from the 1.28P and 1.32P isolates which corresponds to *K. rhizophila* with a cutoff value above of 2.0. Whereas the 1.36P isolate with a log(score) of 1.86, was grouped together with isolates 1.28P and 1.32P. Otherwise, the isolates 2.10P and 2.28P are in the same cluster, suggesting that both isolates belong to *K. rosea*, although the 2.28P isolate has a lower cut-off value that recommended (log score=1.77). Together, these results suggest with high probability species identification of *Kocuria* by analysis chemotaxonomy.

***Pseudomonas*.** *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like bacteria are a genus per excellence in biodegradation processes of various organic compounds, including PAHs, while many produce bioactive substances, enzymes, and biosurfactants, other *Pseudomonas* isolates are used for biological control of plant diseases and bioremediation [45, 46]. Depending on the species of *Pseudomonas* MALDI-TOF MS performed equally as well as conventional systems for the correct identification the distinction at the level of species, subspecies, genomovars or strains. MALDI-TOF has gained popularity, and it is also a useful tool for the phenotypic characterization and identification of *Pseudomonas* strains, allowing the detection of *Pseudomonas* in environmental samples [32, 47].

Similar as for typing *Acinetobacter* and *Kocuria*, we applied PCA of mass spectra obtained from 17 isolates identified as *Pseudomonas* like. In our analysis, most of the isolated were clustered into three groups defined as *P. putida*, *P. aeruginosa* and *P. stutzeri* (Fig. 4). The first three principal components described 82% of the total data variability.

The cluster analysis locates the 1.22P, 1.23P and 1.24P isolated in the *P. putida* group, however, the 1.22P isolate had previously been classified as *P. mendocina* with a log (score) of 2.22 (Table S1), so, its identification at the species level must be taken with reservation. Otherwise, the isolate 1.3P (*P. oryzihabitans*) is distributed in a space away from the rest of the isolates of *P. putida* group. Moreover, the 2.20P, 2.21P and 2.30P isolates were grouped within *P. aeruginosa* group as expected (Fig. 4).



**Fig. 4.** Principal components analysis (PCA) from mass spectra obtained by MALDI-TOF of 17 isolates identified as *Pseudomonas* using Biotyper software (version 4.0.14). The PCA was realized considering three biological replicas for each isolated.

Species of *P. stutzeri* and *P. xanthomarina* belong to *P. stutzeri* cluster. However, isolates 1.19P, 2.17P, and 2.18P that were previously identified as probable *P. xanthomarina* with a log (score)  $\leq 2.0$  (Table S1) were clearly separated: the 1.19P and 2.18P isolated are located between the positive side of PC2 and negative side of PC3, while 2.17P is located more positive side PC1 and less negative side of PC3, which suggests that these is probably a different strain of *P. xanthomarina*. The figure 4a shows that all isolates identified as *P. stutzeri* with a log(score)  $\geq 2.25$ , are grouped in the same space. Moreover, according to the identification using the database, some of them it made a match with two different strains of *P. stutzeri* (Table S1).

Further study with mass spectra of the seven isolates as *P. stutzeri*, in order to check the relatedness between each set and discriminate between strains was conducted by CCI analysis available with MALDI Biotyper software (Table 2). CCIs for 2.3, 2.8, and 2.14 was a high match value (0.9) suggesting that it may be the same strain. The 1.9P presents no relationship (value 0.03) with the isolates 1.34P and 2.4P.

In summary, in this work we found diverse genera of three large phylogenetic groups, which are ubiquitous in saline environments or in hydrocarbon-impacted sites. In addition, using a library of clinical origin, it allowed detect possible strains that can be a danger to health in a fast and reliable way.

**Table 2.** CCI matrix value for the MALDI TOF MS data of *P. stutzeri* isolate.

<i>Isolate</i>	<b>1.9P</b>	<b>1.34P</b>	<b>2.3P</b>	<b>2.4P</b>	<b>2.5P</b>	<b>2.8P</b>	<b>2.14P</b>
<b>1.9P</b>	<b>1.00</b>						
<b>1.34P</b>	0.03	<b>1.00</b>					
<b>2.3P</b>	0.65	0.70	<b>1.00</b>				
<b>2.4P</b>	0.03	0.72	0.51	<b>1.00</b>			
<b>2.5P</b>	0.74	0.73	0.59	0.80	<b>1.00</b>		
<b>2.8P</b>	0.71	0.75	0.96	0.59	0.68	<b>1.00</b>	
<b>2.14P</b>	0.75	0.78	0.92	0.58	0.68	0.96	<b>1.00</b>

The CCI matrix was calculated with MALDI Biotyper 4.0.14 software with the default settings: the lower bound is 3,000-12500 Da, the resolution of the mass range is four, and the number of intervals for CCI is five. A CCI value near 1.0 indicates relatedness between the spectral sets, and 0 indicates no match.

## Conclusions and Perspectives

Anthropogenic activities have contributed to the PAHs inputs in the coastal area of Rosarito Port, B.C., Mexico. A promising alternative to remove PAHs from this environment is by using autochthonous microbiota. However, it is important to identify microorganisms with potential use in bioremediation and, at the same time, discard those that may represent a risk to health. Biotyping by MALDI-TOFMS has provided compelling evidence of strain diversity coming from these environments with potential use in bioremediation in a way of low costs, fast and reliable. Additionally, the applying of chemotaxonomic techniques can detect very minor differences in the expression of major protein, allowing the characterization in some cases, at strain level. The above demonstrate that MALDI-Biotyper system is becoming an essential analytical tool in the environmental microbiology field and it can be considered an alternative for conventional biochemical and molecular identification in a microbiological laboratory. It should be noted that, as far as we know, it is the first report that generates information on cultivable bacterial diversity in areas impacted with PAHs in the coastal zone of Rosarito Port and in the Baja California Coast.

Finally, an excellent candidate to carry out bioremediation studies in saline environments is the *Kocuria* genus, because, despite members of this genus mostly have been reported as LMW-PAHs-degrading microorganisms, in this work, we have been able to obtain pyrene-utilizing *Kocuria* isolates and, in addition, they are not human pathogens, so, they could be applied in HMW-PAHs bioremediation.

## Acknowledgements

The financial support from National Council of Science and Technology, Mexico (CONACYT), projects 123732 and 253879 is gratefully acknowledged. The authors thankfully acknowledge the support

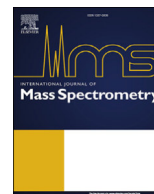
from the Universidad de Guanajuato, project 768/2017 and Instituto de Investigaciones Oceanológicas-Universidad Autónoma de Baja California, project IIO-UABC [403/1751]. The authors also thank for the support from the Ministry of Public Education (PRODEP), project UABC-PTC-621.

## References

1. Samanta S. K.; Singh O. V.; Jain R. K. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 243-248.
2. Seo J. S.; Keum Y. S.; Li Q.X. *Int J Environ Res Public Health.* **2009**, *6*, 278-309.
3. Macias-Zamora J. V.; Melendez-Sanchez A. L.; Ramirez-Alvarez N.; Gutierrez-Galindo E. A.; Orozco-Borbon M.V. *Environ Monit Assess.* **2014**, *186*, 1051-1061.
4. Macias-Zamora J. V.; Mendoza-Vega E.; Villaescusa-Celaya J. A. *Chemosphere.* **2002**, *46*, 459-468.
5. Fuentes S.; Barra B.; Caporaso J. G.; Seeger M. *Appl Environ Microbiol.* **2015**, *82*, 888-896.
6. Fuentes S.; Mendez V.; Aguila P.; Seeger M. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2014**, *98*, 4781-4794.
7. Guermouche M'rassi A.; Bensalah F.; Gury J.; Duran R. *Environ Sci Pollut Res Int.* **2015**, *22*, 15332-15346.
8. Conlan S.; Kong H.H.; Segre J.A. *PloS one.* **2012**, *7*, e47075
9. Sandrin T.R.; Demirev P.A. *Mass Spectrom. Rev.* **2017**, *37*, 321-349
10. Bader O. *Proteomics.* **2013**, *13*(5), 788-799.
11. Murphy B.; Lingam S.; Richter B.; Carlson R. *Thermo Fisher Scientific Inc Application Note 1025.* **2012**, Available from [http://www.dionex.com/en-us/webdocs/113838-AN1025-ASE-PCBs-PAHs-mussel-tissue-soil-AN70253\\_E.pdf:1-5](http://www.dionex.com/en-us/webdocs/113838-AN1025-ASE-PCBs-PAHs-mussel-tissue-soil-AN70253_E.pdf:1-5).
12. Puy-Alquiza M.J.; Reyes V.; Wrobel K.; Wrobel K.; Torres Elguera J.C.; Miranda-Aviles R. *Environ Sci Pollut Res Int.* **2016**, *23*, 11947-11956.
13. Schumaker S.; Borrer C.; Sandrin T.R. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2012**, *26*, 243-253.
14. Maier T.; Klepel S.; Renner U.; Kostrzewa M. *Nat. Methods.* **2006**, *3*, 1-2.
15. Sauguet M.; Valot B.; Bertrand X.; Hocquet D. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 447-455.
16. Vithanage N. R.; Bhongir J.; Jadhav S. R.; Ranadheera C. S.; Palombo E. A.; Yeager T. R.; Datta N. *J Proteome Res.* **2017**, *16*, 2188-2203.
17. Qiu Y-W.; Zhang G.; Liu G-Q.; Guo L-L.; Li X-D.; Wai O. *Estuar Coast Shelf Sci.* **2009**, *83*, 60-66.
18. Keshavarzifard M.; Moore F.; Keshavarzi B.; Sharifi R. *Mar. Pollut. Bull.* **2017**, *123*, 373-380.
19. Liu L.Y.; Wang J. Z.; Wei G. L.; Guan Y. F.; Zeng E. Y. *Environ Pollut.* **2012**, *167*, 155-162.
20. Kafilzadeh F. *Egypt J Aquat Res.* **2015**, *41*, 227-231.
21. Nikolaou A.; Kostopoulou M.; Lofrano G.; Meric S. in: Determination of PAHs in marine sediments: Analytical methods and environmental concerns, Vol. 11, Ed. Global NEST Journal; **2009**, 391-405.
22. Gupte A.; Tripathi A.; Patel H.; Rudakiya D.; Gupte S. *Open Biotechnol J.* **2016**, *10*, 363-378.
23. Kuppusamy S.; Thavamani P.; Venkateswarlu K.; Lee Y. B.; Naidu R.; Megharaj M. *Chemosphere.* **2017**, *168*, 944-968.
24. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. **2010**; 92:1-853.
25. Kanaly R.A.; Harayama S. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 2059-2067.
26. Zhong Y.; Luan T.; Lin L.; Liu H.; Tam N. F. *Bioresour Technol.* **2011**, *102*, 2965-2972.
27. Kim S. J.; Kweon O.; Sutherland J. B.; Kim H. L.; Jones R. C.; Burbach B. L.; Graves S. W.; Psurny E.; Cerniglia C. E. *Appl Environ Microbiol.* **2015**, *81*, 4263-4276.
28. Badejo A. C.; Choi C. W.; Badejo A. O.; Shin K. H.; Hyun J. H.; Lee Y. G.; Kim S. I.; Park K.S.; Kim S. H.; Jung K. H.; Chung Y. H.; Chai Y. G. *Biodegradation.* **2013**, *24*, 741-752.
29. Duarte M.; Nielsen A.; Camarinha-Silva A.; Vilchez-Vargas R.; Bruls T.; Wos-Oxley M.L.; Jauregui R.; Pieper D. H. *Environ Microbiol.* **2017**, *19*, 2992-3011.
30. Wanapaisan P.; Laothamteep N.; Vejarano F.; Chakraborty J.; Shintani M.; Muangchinda C.; Morita T.; Suzuki-Minakuchi C.; Inoue K.; Nojiri H.; Pinyakong O. *J Hazard Mater.* **2018**, *342*, 561-570.
31. Oberle M.; Wohlwend N.; Jonas D, Maurer F. P.; Jost G, Tschudin-Sutter S.; Vranckx.; Egli A. *PloS one.* **2016**, *11*, e0164260.
32. Timperio A. M.; Gorrasi S.; Zolla L.; Fenice M. *PloS one.* **2017**, *12*(7), e0181860.
33. Moscoso F.; Tejjiz I.; Deive F. J., Sanroman M. A. *Bioresour Technol.* **2012**, *119*, 270-276.
34. Margesin R.; Moertelmaier C.; Mair J. *Int Biodeterior Biodegradation.* **2013**, *84*, 185-191.
35. Bourguignon N.; Isaac P.; Alvarez H.; Amoroso M.J.; Ferrero M. A. *J Basic Microbiol.* **2014**, *54*, 1288-1294.

36. Mohamed H.; Miloud B.; Zohra F.; Garcia-Arenzana J. M.; Veloso A.; Rodriguez-Couto S. *Int J Mol Cell Med.* **2017**, *6*, 109-120.
37. Emami K.; Nelson A.; Hack E.; Zhang J.; Green D. H.; Caldwell G. S.; Mesbahi E. *Front Microbiol.* **2016**, *7*, 104.
38. Doughari H. J.; Ndakidemi P. A.; Human I. S.; Benade S. *Microbes Environ.* **2011**, *26*, 101-112.
39. Zamaroli G.; Di Toro S.; Todaro D.; Varese G. C.; Bertolotto A.; Fava F. *Microb Cell Fact.* **2010**, *9*, 10.
40. Wu M. S.; Collier S.; Liu P. Y.; Lee Y. T.; Kuo S. C.; Yang Y. S.; Chen T. L.; Shi Z. Y.; Lin C. F. *J Microbiol Methods.* **2017**, *140*, 58-60
41. Sousa C.; Botelho J.; Silva L.; Grosso F.; Nemeč A.; Lopes J.; Peixe L. *Int J Med Microbiol.* **2014**, *304*, 669-677.
42. Stackebrandt E.; Koch C.; Gvozdiak O.; Schumann P. *Int J Syst Bacteriol.* **1995**, *45*, 682-692.
43. Li F.; Guo S.; Hartog N.; Yuan Y.; Yang X. *Biodegradation.* **2016**, *27*, 1-13.
44. Ahmed R.; Ahmed N.; Michael Gadd G. *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, *9*, 3611-3617.
45. Ghosh I.; Jasmine J.; Mukherji S. *Bioresour Technol.* **2014**, *166*, 548-558.
46. Tauler M.; Vila J.; Nieto J.M.; Grifoll M. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2016**, *100*, 3321-3336.
47. Santos I. C.; Martin M. S.; Carlton D. D.; Amorim C. L.; Castro P. M. L.; Hildenbrand Z. L.; Schug K. A. *Microorganisms.* **2017**, *5*, 47.





## Comparative evaluation of two *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* strains grown on two different carbon sources: LC-MS - based secretome study after in vivo $^{15}\text{N}$ metabolic labeling

Kazimierz Wrobel <sup>a</sup>, Katarzyna Wrobel <sup>a</sup>, Bianey Garcia Lara <sup>a</sup>,  
Moises Guerrero Esperanza <sup>a</sup>, Maria Isabel González Roncero <sup>b</sup>,  
Alma Rosa Corrales Escobosa <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Chemistry Department, University of Guanajuato, L. de Retana 5, 36000, Guanajuato, Mexico

<sup>b</sup> Department of Genetics, University of Cordoba, E-14071, Cordoba, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 September 2019

Received in revised form

2 December 2019

Accepted 27 December 2019

Available online 28 December 2019

#### Keywords:

Quantitative proteomics

Metabolic labeling

Liquid chromatography

Mass spectrometry

*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Pathogenicity

Secretome

### ABSTRACT

To get new insight on the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, metabolic labeling was performed, and secretomes of the wild type strain 4287 (W) and non-virulent mutant  $\Delta\text{chsV}$  (M) were compared while switching the main carbon source from glucose (Glc) to the freeze-dried vascular tomato tissue (VTT).  $^{14}\text{N}$ - or  $^{15}\text{N}$ -containing  $\text{KNO}_3$  was used for fungal growth and two combined ( $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ) protein extracts were obtained: 1- W + M in Glc; 2- W + M in VTT. Trypsin digests of 1 and 2 were analyzed by capHPLC-ESI-QTOF-MS and Skyline was applied to compare the abundances of individual proteins between two strains in each sample and between the samples. Protein grouping was suggested as follows: (1) seven proteins apparently adsorbing on VTT were of importance during the initial stage of invasion; (2) three adsorbing on VTT were involved in compensative mutant adjustment, in growth and nutrients supply; (3) eleven might contribute in pathogenicity without direct interaction with the plant cell wall; (4) fourteen were involved in mutant adaptation, fungal growth and nutrients supply, not excluding their role in pathogenicity. The above proteins comprised carbohydrate-active enzymes, protein/peptide- and lipid-hydrolyzing enzymes, few classified as effectors (NEP-like, serine protease, GLEYA adhesion domain, LysM domain), catalyzing redox processes and few of unknown function.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Among different species of soil-born filamentous fungi, *Fusarium oxysporum* is classified as one of the top ten fungal pathogens, causing wilt disease on a variety of plants [1]. In particular, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* acts as a pathogen of tomato [2]. Understanding the physiological and molecular bases of fungal pathogenicity is necessary for designing strategies against pest that is responsible for world-wide agronomic losses. Indeed, numerous studies have been focused of the elucidation of pathogenic determinants in *F. oxysporum* [3–11] with increasing applications of “omics” tools in this research area [6,7,12–15].

In functional genomics approach, several processes and specific genes involved in virulence can be assessed and manipulated to

obtain strains of decreased pathogenicity [7,13]. The topics of interest include: transcription factors, different components of cAMP-PKA and MAPK pathways, transcriptional regulators, lineage specific (LS) chromosomes, genes involved in cell wall biosynthesis, secretion enzymes and avirulence/effector proteins [1,2,11]. Within the context of this work, deletion  $\Delta\text{chsV}$  mutant of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* with alteration in the fungal cell wall biosynthesis, showed strongly lower virulence with respect to the wild type strain (4287), demonstrating the requirement for a class V chitin synthase during host infection [16–18]. As reported in the cited works, after deletion of class V chitin synthase gene the mycelial growth of mutant was only slightly declined as compared to the wild type strain but the cell wall chitin content was decreased by 10%.

In proteomics studies, valuable information on proteins involved in the pathogen-host interaction can be obtained, especially while focusing on the fungal cell wall components [19] or

\* Corresponding author.

E-mail address: [alma\\_rce@ugto.mx](mailto:alma_rce@ugto.mx) (A.R. Corrales Escobosa).

secretome [10,20,21]. In addition to the characterization of full proteome or secretome of a given organism, functional roles of proteins can be assigned by assessing dynamic changes occurring due to different growth conditions or via comparative proteomics of different phenotypes [6,8,9,14,22,23]. In regard to *Fusarium* genus, considerable effort has been devoted to secretome of *Fusarium graminearum* [10,24,25] whereas limited data are available for *F. oxysporum* [26]. Given the pathogenicity and the lifestyle of the latter, the challenge of secretome analysis is to identify proteins facilitating invasion and colonization of the host, those efficiently defeating defensive response, and those ensuring food supply from the host [20,27].

Liquid chromatography with high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) in combination with fit-per-purpose platform of data analysis shapes a powerful proteomics tool enabling for gel-free identification of thousands of proteins in a single analytical run [28,29]. Quantitative approach is more challenging, especially when the assessment of changes in the protein amount needs to be evaluated based on the independent analytical runs of two or more samples. Indeed, in label-free quantitative proteomics, abundances of the peptide ions acquired in LC-HRMS or LC-MS/MS spectral counts of the identified protein are taken from different datasets obtained for individual samples. Some requirements of label-free quantification include: (i) unambiguous finding of these same peptides in different chromatograms and acquisition of their abundances avoiding spectral interferences, (ii) acceptable repeatability achieved during the pretreatment and LC-MS/MS analysis of two different samples in biological and technical replicates [30]. These issues become less troublesome while using stable isotope labeling methods that allow for the analysis of mixtures of two or more samples in a single run [31]. The strength of stable isotope labeling relies on the negligible effect of isotopic composition on the physicochemical properties of a given compound and on the isotopic capabilities of mass spectrometry, therefore, this same peptide coming from different samples can be easily detected by the expected mass shift between ions eluting at the same retention time. It should be stressed that stable isotope labeling has been used in several studies comparatively evaluating fungal proteomes [32–34]; however, as far as we are aware, no such approach has been applied to *F. oxysporum* secretomes. Among different chemical, enzymatic or metabolic tagging procedures available [30,35], *in vivo* metabolic labeling seems an attractive and feasible alternative for this task. By introducing  $^{15}\text{N}$  containing inorganic salt to one of the cultures, proteins become labeled during their synthesis and can be distinguished from proteins in the another culture, in which this same salt with natural nitrogen isotope distribution was applied [33,36]. Based on the ion currents count, molar ratios between these same proteins in two cultures can be computed. Since the equivalent proteins amounts from the two cultures are combined prior to the sample treatment and analysis, the quantitative comparison is hardly affected by any of these procedural steps thus enabling for reliable assessment of biological effects [36]. On the other hand, relative quantification of peptides/proteins is not straightforward because of the presence of light nitrogen isotope in the inorganic salt used for labeling (below 2%  $^{14}\text{N}$ ); other issues that need to be considered involve the changing number of nitrogen atoms among different peptides and the uncertain enrichment yield of these atoms achieved during organism growth [37,38]. One of the informatic platforms supporting quantitative proteomics based on metabolic labeling is the freely available Skyline (<http://proteome.gs.washington.edu/software/Skyline>). In particular, Skyline is fully compatible with LC-MS/MS data from different instrument vendors and it provides different tools of statistical analysis and data visualization [39].

The goal of this work was to get new insight on the

pathogenicity of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* at secretome level. To this end, the wild type strain (4287) causing vascular wilt disease in tomato and non-virulent  $\Delta\text{chsV}$  mutant [16–18] were used; each of them was grown in minimum medium with glucose or with addition of the freeze-dried tomato vascular tissue as the main carbon source. For quantitative proteomic analysis, *in vivo* metabolic labeling was performed using  $^{15}\text{N}$  in form of potassium nitrate and, after combining two differentially labeled protein extracts and trypsin lysis, the analysis was carried out by capillary liquid chromatography - electrospray ionization - quadrupole time of flight mass spectrometry (capHPLC-ESI-QTOF-MS). Based on the observed differences in proteins abundances between virulent and non-virulent strain and those found while switching carbon source from glucose to the vascular tomato tissue, possible functional role of 35 proteins was suggested.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fungi strains and $^{15}\text{N}$ *in vivo* metabolic labeling

*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* strains 4287 (race 2) and  $\Delta\text{chsV}$  were generously provided by M.I.G. Roncero (Universidad de Cordoba, Spain); microconidia suspensions were stored in 30% glycerol at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . For propagation,  $10^6$  microconidia  $\text{mL}^{-1}$  were inoculated in a series of 250 mL flasks containing 50 mL of a modified Czapek-Dox minimum medium ( $0.5\text{ g L}^{-1}$  KCl,  $0.5\text{ g L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $1.0\text{ g L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.01\text{ g L}^{-1}$   $\text{FeSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $2.0\text{ g L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ ,  $20\text{ g L}^{-1}$  glucose). Each strain was propagated in eight flasks; potassium nitrate- $^{15}\text{N}$  (Sigma reagent > 98 atom %  $^{15}\text{N}$ ) was applied in four of them whereas in the other four flasks non-labeled salt was added. All cultures were incubated 24 h at  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  with shaking at 150 rpm and then centrifuged (4000 g, 10 min). Each of the obtained mycelia was separately washed with 20 mL of water followed by two 20 mL portions of the respective growth medium and was transferred to 250 mL flask containing 50 mL of medium. At this stage, for the wild type strain (4287) propagated in the presence of potassium nitrate- $^{15}\text{N}$ , freeze-dried tomato vascular tissue (VTT) was added to the medium ( $0.5\text{ g L}^{-1}$ ) and this medium contained 0.5% m/v glucose. Plant tissue was obtained as described elsewhere [40]. For other four portions of 4287 mycelium that were propagated in non-labeled potassium nitrate, new medium contained glucose 1% m/v. The mutant mycelia (M) propagated in the presence of potassium nitrate- $^{15}\text{N}$ , were transferred to medium containing glucose 1% m/v whereas for non-labeled mycelia, the growth medium with lowered glucose (0.5% m/v) was amended with freeze-dried vascular tissue of tomato ( $0.5\text{ g L}^{-1}$ ). All sixteen cultures were incubated for 72 h at  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  with shaking at 150 rpm and then filtered (Whatman,  $15\text{ }\mu\text{m}$ ); the recovered liquid media were centrifuged to eliminate fungal spores (2500 g, 5 min). Finally, each supernatant was freeze-dried after addition of phenylmethylsulfonyl fluoride ( $50\text{ }\mu\text{L}$ , 1 M). Two replicates of each culture were pooled yielding two biological replicates of the following four: (4287-Glc-14N) - wild type strain with natural nitrogen isotope ( $^{14}\text{N}$ ) and glucose 1% v/m as a sole carbon source, (4287-VTT-15N) - wild type strain labeled with  $^{15}\text{N}$ , tomato tissue and reduced glucose as a carbon sources, (M-Glc-15N) -  $\Delta\text{chsV}$  labeled with  $^{15}\text{N}$  and glucose 1% m/v as a sole carbon source, (M-VTT-14N)  $\Delta\text{chsV}$  with  $^{14}\text{N}$ , freeze-dried tomato vascular tissue and reduced glucose as a carbon sources. General scheme of fungal growth and metabolic labeling is presented in the Electronic Supplementary Material (Fig. 1S, ESM2).

It should be stressed that, by providing heavy nitrogen isotope since the early stage of fungi propagation, full labeling was ensured. As to the carbon source, it was verified that glucose was still present at the end of experiment in cultures 4287-Glc-14N and M-Glc-15N

(1% m/v glucose initially added) whereas in cultures 4287-VTT-15N and M-VTT-14N it was depleted after 24 h (0.5% m/v glucose initially added), so in further growth, vascular tomato tissue was the sole carbon source for 4287-VTT-15N and M-VTT-14N cultures. Experimental evidence demonstrating utilization of plant tissue for nutrients supply in 4287-VTT-15N and M-VTT-14N, is provided in Fig. 11S (Electronic Supplementary Material, ESM2). Finally, similar growth of the two strains was observed in glucose, whereas mutant growth was slightly poorer in the presence of tomato tissue, in consistency with previous studies [16–18].

## 2.2. Proteins extraction and preparation of the mixed samples

The protocol reported elsewhere was adopted [41]. In brief, the freeze-dried pooled supernatants were separately re-constituted in 4 mL of water and filtered (Millex®GP filter unit, 0.22 µm); next, 16 mL of methanol, 4 mL of chloroform and 12 mL of water were added, shaking the mixture after each addition and finally, centrifuged (4000 g, 10 min). Once the upper water-methanol phase was discarded, 12 mL of methanol were added and again, the mixtures were agitated, centrifuged and the upper phase was eliminated. The sediment containing proteins was dried at room temperature and then, re-suspended in a small volume of ammonium bicarbonate 20 mM, pH 8.0. Proteins were quantified by the Bradford method [42] and the final concentration was adjusted to 1 mg mL<sup>-1</sup>.

Prior to the further treatment, two 0.1 mL aliquots from different extracts were combined yielding 200 µg of proteins in each of two biological replicates of the following mixtures: **(1)** (4287-Glc-14N)+(M-Glc-15N); **(2)** (4287-VTT-15N)+(M-VTT-14N); **(3)** (4287-Glc-14N)+(4287-VTT-15N); **(4)** (M-Glc-15N)+(M-VTT-14N). These mixtures are referred throughout the text as samples **1–4**. Of note is that fungal cultures obtained in the presence of freeze-dried plant tissue were macroscopically different from those containing only glucose, due to visible adhesion of microorganisms on the solid material. Therefore, it was decided to focus the study on samples **1** and **2** that were composed of two strains grown in this same source of carbon (glucose or plant tissue, respectively). Even though equal protein amounts from the two cultures were always combined, the results obtained for samples **3** and **4** (each of them containing this same strain yet grown on different carbon source) were considered unreliable since partial sorption of proteins on the powdered tissue certainly affected the estimation of their actual amount in the analyzed secretome. Nonetheless, samples **3** and **4** were also analyzed and used to support the results obtained for samples **1** and **2**.

## 2.3. Preparation of tryptic digests

For protein denaturalization, the samples **1–4** were heated at 100 °C for 5 min; then, the reduction was carried by adding 1 µL of DTT 1 M (final concentration 5 mM) and incubation at room temperature during 30 min. For alkylation of cysteinyl thiols, 2 µL of iodoacetamide (IAM) 0.5 M were added (final concentration 10 mM) and the samples were left for 1 h at room temperature in the dark; the excess of IAM was eliminated by adding 1 µL of DTT 1M and keeping the mixture at room temperature during 10 min.

For enhanced coverage in protein analysis, enzymatic deglycosylation was carried out [43]; to this end, 10 µL of PNGase (5U, Sigma F8435) were added and the samples were incubated at 37 °C for 8 h, followed by heating at 100 °C for 5 min to stop the reaction. Once cooled to room temperature, hydrolysis was carried out using 1:50 m/m trypsin-to-protein ratio; after overnight incubation at 37 °C, the reaction was stopped by acidification with formic acid 3.8% v/v, the samples were then centrifuged (16000 g, 2 min) and supernatants were passed to the new vials (protein concentration

0.5 µg µL<sup>-1</sup> as referred to non-digested sample). Prior to the analysis, vials were kept at –20 °C.

## 2.4. capHPLC-ESI-QTOF-MS and MS/MS

The analytical system consisted of a mass spectrometer maXis impact ESI-QTOF-MS equipped with Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics), which was coupled to Ultimate 3000 RLSCnano system operated by Hystar 3 software (Thermo Scientific Dionex). The autosampler temperature was kept at 4 °C. The sample aliquot containing 5 µg of the digested proteins (10 µL) was loaded on a Zorbax capillary trap (300SB-C18, 5 × 0.3 mm, 5 µm) during 2 min, using 0.1% aqueous TFA with 1% MeCN v/v as the trap wash solvent and the flow rate 15 µL min<sup>-1</sup>. Next, the flow was switched to the reversed phase capillary column Zorbax 300Extend-C18 (150 × 0.3 mm, 3.5 µm), maintained at 40 °C. Two mobile phases were used: A - 0.1% aqueous formic acid and B - 0.1% formic acid in MeCN; the total flow rate was 4 µL min<sup>-1</sup> with a following gradient elution: 1%–35% B during 80 min; 35%–98% B during 10 min; 98%–1% B during 4 min; 1% B during 4 min; 5 min washing with 1% B was applied for column re-equilibration which resulted in total chromatographic run of 103 min. The column exit was connected to ESI source via 50 cm capillary (i.d. 50 µm) using the lock-mass standard *m/z* 1221.9907 in the ion source. ESI was operated in a positive mode with ion spray voltage 4500 V, end plate offset 500 V, dry gas 4 L min<sup>-1</sup>, drying temperature 180 °C and nebulizing gas pressure 0.4 bar. The chromatograms were obtained with acquisition rate 2 Hz for MS within the *m/z* range 50–2000. For auto MS/MS mode, filtration for amino acids was applied with acquisition rate 2 Hz and 10 Hz for low (<25000) and high (>25000) counts, respectively. Line spectra calculated as a sum of intensities were always registered. Three technical replicates were performed for each sample; considering two biological replicates of each, 24 chromatograms were acquired.

## 2.5. Data analysis

Raw capHPLC-ESI-QTOF-MS data were recalibrated and deconvoluted in DataAnalysis 4.4, and then, exported in.mgf format to ProteinScape 3.1.3 (Bruker Daltonics). The initial search of light nitrogen containing proteins was carried out via Mascot engine (version 2.4.0), using FASTA *Fusarium oxysporum* 4287 taxonomy database from UniProtKB. Next, for finding <sup>15</sup>N-labeled and non-labeled proteins, the re-search was performed. The initial precursor mass tolerance of 5 ppm and MS/MS tolerance of 0.1 Da were applied. Trypsin was selected as the hydrolyzing enzyme and two missed cleavages were allowed; carbamidomethylation of cysteines was selected as fixed modification whereas methionine oxidation was allowed as variable modification. Peptide charge states +2 and +3 were set; seven amino acids chain was the minimum length of peptide. For quantification, <sup>15</sup>N metabolic labeling was selected. The decoy was activated, adjusting maximum false discovery rate (FDR) for peptides and proteins to 1%; the statistical significance of Mascot hits was accepted at *p* < 0.05. Once the list of protein was returned, for enhanced reliability, filtration procedure was applied. Acceptable score for the individual ions was set at >21 and significance threshold at *p* < 0.01; by so doing, the average experimental FDR found for individual datasets was 0.06% (screenshot of Mascot filtration parameters applied and experimental decoy FRD for one of the samples is presented in Fig. 3S, ESM2). The list of peptides was exported in a Mascot data file format to Skyline (<http://proteome.gs.washington.edu/software/Skyline>), generating spectral library to which all chromatograms were imported. Of note, in the library, MS and MS/MS data are linked with the respective retention times. Individual peptides

containing light and heavy nitrogen atoms were assigned based on the same retention time, the same peak symmetry and  $\text{idotp} > 0.95$ . The latter parameter (isotope dot product) denotes the consistency between expected and experimentally observed distribution of the peak areas for precursor ion isotopes (for both, labeled and non-labeled peptides). Each sample contained protein extracts from two cultures; for proteins of high abundance in one of them and very low abundance in another,  $\text{idotp}$  values  $> 0.75$  were accepted (example for NEP-like protein shown in Fig. 10S in ESM2).

For accurate quantification of changes in protein abundances based on  $^{15}\text{N}$ - metabolic labeling, the means of  $^{14}\text{N}$ -to- $^{15}\text{N}$  intensity ratios for the most abundant peptide ions with different charges were computed ("mean mean total area ratio" option in Skyline) together with respective standard deviations. To assess the abundance of given protein in the sample composed of two differentially labeled cultures, Skyline provides "sum mean total area", which is calculated considering both,  $^{14}\text{N}$ - and  $^{15}\text{N}$ -containing signals. The abundances of individual proteins in each fungal culture were calculated based on "sum mean total area" ( $^{14}\text{N} + ^{15}\text{N}$ ) and "mean mean total area ratios" ( $^{14}\text{N}$ -to- $^{15}\text{N}$ ).

Principal component analysis was performed taking abundances of 38 proteins in each of the cultures as "variables" and four cultures as "cases". All abundances were normalized by standard deviation and a model was computed using the software package The Unscrambler 7.0 (Camo, Ltd.).

### 3. Results and discussion

In application of the criterions given in Data analysis section 2.5, the lists of proteins in the samples 1 and 2 were obtained and compared, yielding 38 proteins that were common for all fungal cultures. On the bases of UniProt Knowledgebase that contains 17 reviewed and 19730 unreviewed proteins of a wild type race 4287 of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, among 38 selected proteins, several were located as unreviewed with submitted names (further referred to as "characterized"), but the majority corresponded to those uncharacterized with known function or with function suggested by 90–100% identity to other *Fusarium* species. Some proteins with unknown function were also detected. As could be expected based on previous reports on pathogenic fungal secretomes [20,22,24,25,27,44], proteins regulating architecture of the cell wall, those facilitating nutrients supply and providing defense against external stress were identified as well as few directly involved in the invasion of the host plant. The list of 38 proteins together with their UniProtKB code, gene and functional description, is presented as Table 1S in the Electronic Supplementary Material 1 (ESM1). In this Table, the values of mutant-to-wild "mean mean total area ratio" and of "sum mean total areas", both with respective standard deviations, are provided for each protein in samples 1 and 2, based on two biological- and three technical replicates; additionally, the computed abundances of each protein in two extracts composing given sample is included. The above data were obtained via Skyline-aided analysis and allowed us to quantitatively compare the abundances of secreted proteins between  $^{15}\text{N}$  and  $^{14}\text{N}$  cultures combined in a single sample and, also to make comparisons between the samples. In the Electronic Supplementary Material 2 (ESM2), some examples are given to visualize different stages of data analysis (Fig. 2S: a chromatogram showing separation of peptides belonging to a random protein; Fig. 3S: Mascot screenshot with filtration parameters applied and experimental decoy FRD for one of the samples; Fig. 4S: Skyline screenshot with quantitative data obtained for sample 1; Fig. 5S: Skyline visualization of mass spectrum and  $\text{idotp}$  values for randomly selected peptide; Fig. 6S: concordance of the retention times between  $^{14}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  peptides; Fig. 7S: chromatographic separation of

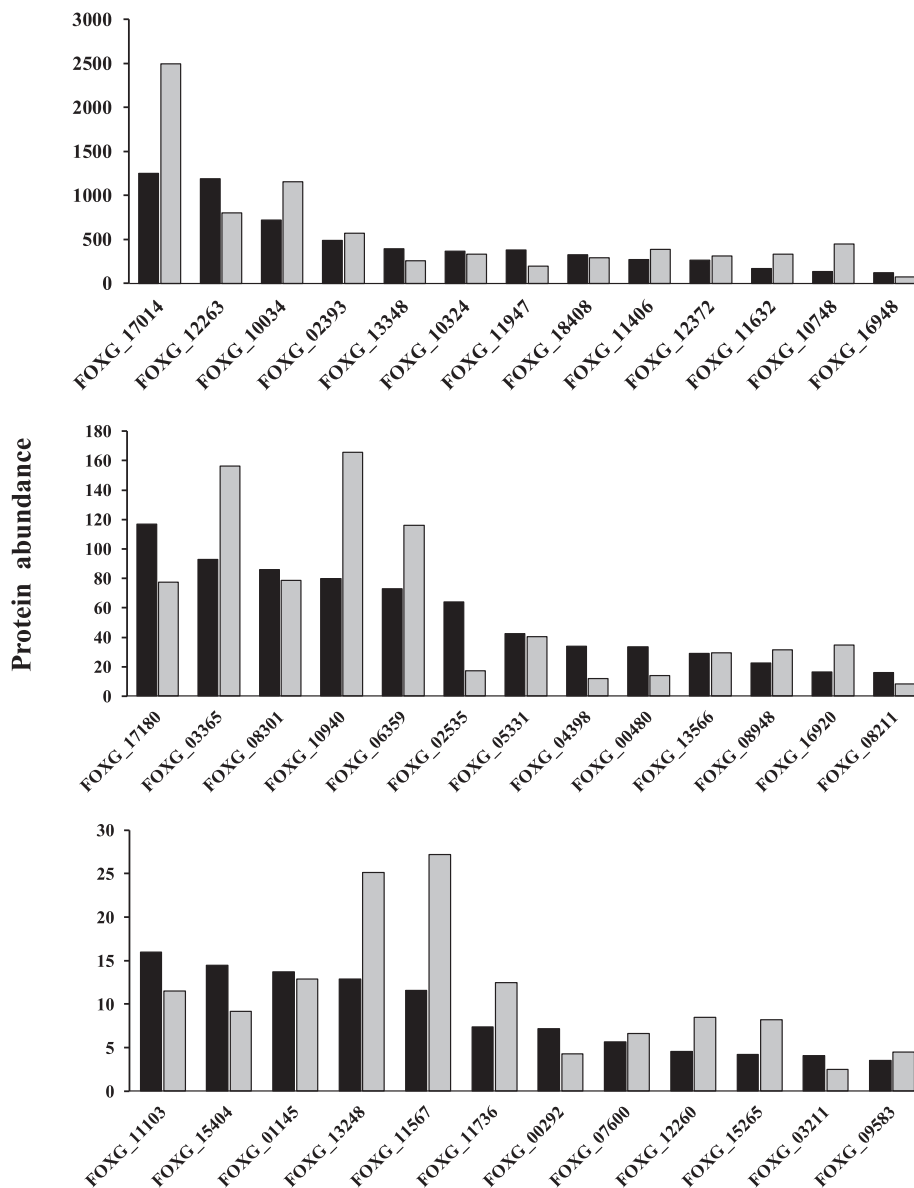
serine protease peptides in sample 3 and respective peak areas for  $^{14}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  in six replicates; Fig. 8S:  $\text{idotp}$  values for  $^{14}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  peptide of serine protease; Figs. 9S and 10S: peak areas and  $\text{idotp}$  values for NEP-like peptides containing  $^{14}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  in sample 3).

In order to propose functional role of secretome proteins in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, the two following issues were addressed: (i) what is the difference between secretomes of pathogenic wild strain and non-pathogenic mutant in the presence of glucose as a sole carbon source; (2) how the presence of tomato vascular tissue (VTT) affects secretomes of the two strains. In the next sections, the discussion is first focused on 38 proteins in sample 1 and then, the results obtained for samples 1 and 2 are comparatively evaluated. As the outcome of this study, proteins were grouped according to their proposed function during nutrient acquisition and possibly, in the initial process of plant infection by *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; proteins involved in a compensative adjustment of deletion mutant were also observed.

#### 3.1. Secretomes of 4287 and $\Delta\text{chsV}$ in the presence of glucose as a sole carbon source (sample 1)

Sample 1 was prepared and analyzed to compare protein profiles in the wild type strain against mutant, in the presence of glucose as the main carbon source. Since down-regulation of class V chitin synthase was associated with the lack of pathogenicity of  $\Delta\text{chsV}$  [16], it was assumed that proteins presenting higher abundance in the wild type strain might be associated with pathogenic potential whereas proteins found in larger amount in mutant would rather be related with fungus adaptation to the deletion of class V chitin synthase gene. For 38 selected proteins, their abundances in the wild type and in mutant strains combined in sample 1 were calculated based on the "sum mean total areas" values and the "mean mean total area ratios"; the obtained results are presented in Fig. 1. Additionally, specific values of mutant-to-wild area ratios with respective standard deviations are given in Table 1S. It can be observed in Fig. 1 and Table 1S that thirteen proteins presented higher abundance in the wild type strain (mutant-to-wild ratio from  $0.27 \pm 0.09$  to  $0.72 \pm 0.028$ ) and the abundance of fifteen proteins was higher in  $\Delta\text{chsV}$  mutant (mutant-to-wild ratio from  $3.35 \pm 1.38$  to  $1.39 \pm 0.12$ ). Other proteins were found in similar amounts in the two strains (mutant-to-wild ratio from  $0.90 \pm 0.07$  to  $1.28 \pm 0.36$ ); it is also noteworthy that four proteins presented relatively high abundances with "sum mean total areas"  $> 1000$  as compared with the range 6.6–700 for other 34 proteins. The proteins abundant in sample 1 were: NEP-like (FOXG\_17014), serine protease (FOXG\_12263), one uncharacterized from chitin-binding glycosyl hydrolase 18 family (FOXG\_10034) and one of unknown function (FOXG\_02393). It should be mentioned that, despite difference in the expression of class V chitin synthases certainly existing between the two strains, such difference could not be observed due to the intracellular location of these proteins.

According with the above description and with data presented in Fig. 1 and Table 1S, larger amounts in the wild type strain were found for four characterized and one uncharacterized *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* proteins involved in polysaccharide degradation and/or cell wall organization; in the increasing order of mutant-to-wild abundance ratio, those with submitted names were: alpha-galactosidase (FOXG\_04398), glucanase (FOXG\_00480), murein transglycosylase (FOXG\_11947) and beta-fructofuranosidase lyase (FOXG\_03211). The uncharacterized was a protein related to endogluconase B (FOXG\_08211), by 90% identity with *F. mangiferae* and *F. oxysporum* (F. vascular wilt). One hydrolytic enzyme identified as carboxylic ester hydrolase (FOXG\_11103) from fungal carboxylesterase lipase family was also elevated in the wild type strain. Furthermore, serine protease (FOXG\_12263), and one

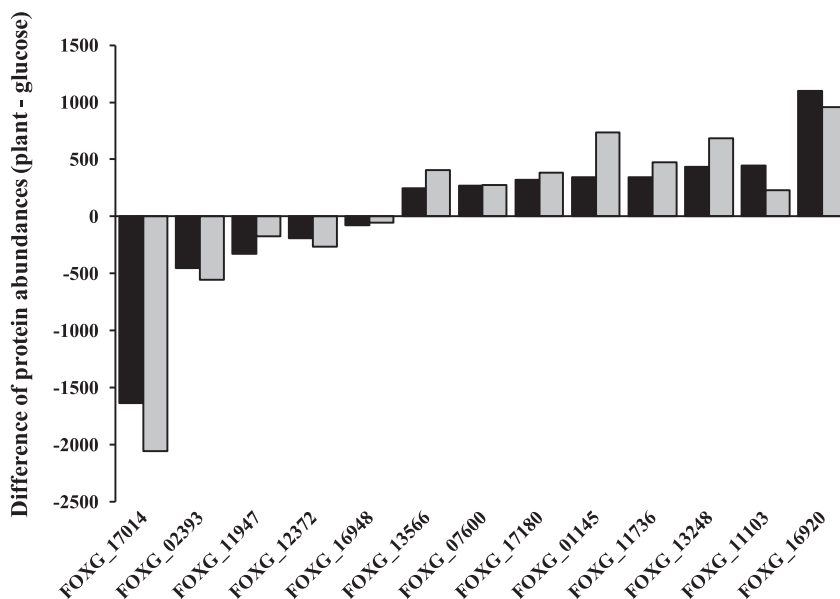


**Fig. 1.** Abundances of individual proteins in the extracts of wild type (dark gray) and in mutant (light gray) strains combined in sample 1, calculated based on the “sum mean total areas” values and the “mean mean total area ratios” (Table 1S); for better clarity, 38 proteins are separated in three groups according with their decreasing abundance in the wild type strain.

protein presenting serine-type peptidase activity (FOXG\_00292) were found at higher abundances in 4287 with respect to the mutant. Additionally, zinc ion binding carboxypeptidase A4 (FOXG\_13348) was also elevated in the wild type strain. On the other hand, two proteins presenting higher abundances in the wild type strain were related with redox processes; these were: the characterized catalase peroxidase (FOXG\_17180) and one with oxidoreductase activity (FOXG\_15404). Finally, two uncharacterized proteins more abundant in the wild type strain presented GLEYA adhesin domain (FOXG\_02535) and carbohydrate binding module with lysine-like motif (LysM) domain (FOXG\_16948), respectively.

Owing to the difference in virulence between two strains under study, the above results seem to confirm the association of

carbohydrate-active enzymes with the pathogenicity of *E. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, as previously reported in several studies performed on this and other plant infectious fungi [3,9,10,23,25,44]. As to the functional assignment, proteins from this group contribute in disruption of the plant cell wall and provide the fungus with food; noteworthy is however, that the actual requirements differ among fungal species and are also influenced by the external conditions, therefore the group of carbohydrate-active enzymes is usually large and diverse [15,45]. Finding the increased amounts of serine protease (FOXG\_12263), a protein with serine-type peptidase activity (FOXG\_00292) and carboxypeptidase A4 (FOXG\_13348) in the virulent 4287 strain as compared to non-pathogenic mutant is of relevance, due to their demonstrated role as effectors of filamentous plant pathogens [46]. Specific



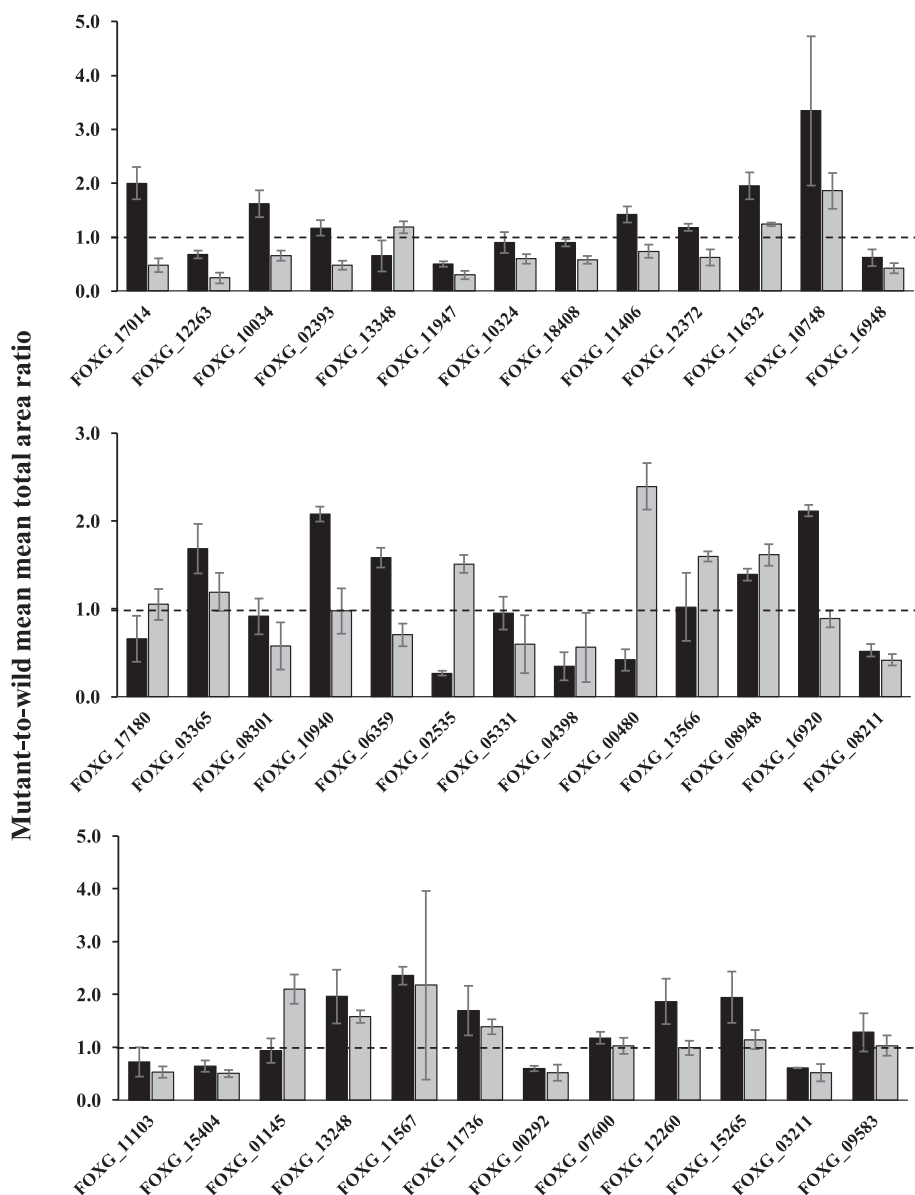
**Fig. 2.** Effect of vascular tomato tissue on the abundances of individual proteins in the wild type strain (dark gray) and in  $\Delta$ chsV mutant (light gray). Data were obtained analyzing sample **1** and **2**, respectively; for each protein, difference between its abundance in the strain grown in the presence of plant biomass and glucose is presented (data included in Table 1S).

function of serine proteases during the invasion of a host plant has been proposed as the cleavage of chitin-binding domain in anti-fungal plant chitinases [20]; particularly for *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, a combined synergic action of serine protease and fungalsin metalloprotease was reported [26]. In direct relation with invasion, proteins containing LysM (FOXG\_16948) and GLEYA adhesin domain (FOXG\_02535) are also of relevance. Fungal adherence to the host surface is a necessary pre-infection stage; among different proposed mechanisms, specific interactions through lectins present on the plant surface should be noted [47]. In *Saccharomyces cerevisiae*, GLEYA was reported as an lectin-like ligand-binding domain of adhesins [48] and higher amount of FOXG\_02535 in the wild type strain suggests that similar process might also contribute in the pathogenicity of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Noteworthy is that putative adhesins were predicted in *F. oxysporum* proteome under adhesion-inducing conditions [19]. As to LysM protein, one of the conserved fungal strategies relies on the secretion of effectors containing this motif, which upon binding to chitin oligosaccharides helps to avoid host immune response via expression of chitinases [49–51]. Among other effectors disabling plant immunity during intrusion by this fungus, cysteine-rich proteins secreted in xylem (SIX) have been characterized [20]; however, their expression occurs in the presence of the living host cells [52] hence none such protein could be detected in this study.

In regard with the proteins up-regulated in mutant as compared to the wild type strain in sample **1**, the most pronounced change with mutant-to-wild ratio of  $3.35 \pm 1.38$  was observed for chitinase (FOXG\_10748). Other increased proteins involved in the cell wall structure, degradation or modification were: a related to cell wall protein PhiA by 90% identity with *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. mangiferae*, *F. proliferatum* (FOXG\_11567), and one from a chitin-binding glycosyl hydrolase 18 family (FOXG\_10034). Enhanced abundances in mutant strain were also found for protein/peptide- and lipid-hydrolyzing enzymes. These included: trypsin (FOXG\_13248), a protein with amidase domain (FOXG\_11632), alkaline ceramidase (FOXG\_15265) and putative arabinase, by 90%

identity with *F. oxysporum* (*F. vascular wilt*) and *F. proliferatum* (FOXG\_11736). Lithic enzymes alpha amylase (FOXG\_16920) and murein transglycosylase (FOXG\_06359) were also elevated in the mutant strain. Higher abundance of NEP-like factor (FOXG\_17014) with mutant-to-wild ratio  $2.00 \pm 0.30$  should be noted as well as the up-regulated proteins catalyzing redox processes: one with oxidoreductase activity (FOXG\_08948), catalase peroxidase (FOXG\_12260) and alcohol dehydrogenase (FOXG\_11406). Finally, extracellular protein with eight cysteine containing domain (FOXG\_03365) and a protein of unknown function (FOXG\_10940), were found with higher abundances in mutant as compared to the wild type strain (Fig. 1, Table 1S).

The results summarized above, demonstrate that down-regulation of class V chitin synthase caused notable modification of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* secretome. In filamentous fungi, the assembly and plasticity of cell wall during vegetative growth and morphogenesis rely on the subtle equilibrium between synthesis and degradation of chitin, during which branching and binding with other cell wall components occurs, principally with beta-(1,3)- and beta-(1,6) glucan chains and proteins [53,54]. In this work, up-regulation of chitinase and related enzymes in  $\Delta$ chsV mutant as well as higher amounts of lipid- and peptide bond hydrolyzing enzymes, suggest that the fungus adjust to the lack of chitin synthase gene, trying to maintain cell wall integrity by getting necessary components from the surrounding environment. Indeed, depending on the deleted gene, different compensative adjustments in the structure of fungal cell wall have been reported [55,56]. Specifically in filamentous fungi, chitinases might participate in cell wall remodeling and facilitate growth under non-optimal conditions providing enhanced defensive capability and contributing to overall fitness [51]. In support to our results, during hyphal growth of *Candida albicans*, chitinase activity was significantly higher in the extracellular space after deletion of chitin synthase gene as compared to the wild type strain [57]. On the other hand, necrosis and ethylene inducing factor (NEP-like) found as abundant protein in sample **1** is of relevance; in addition to its



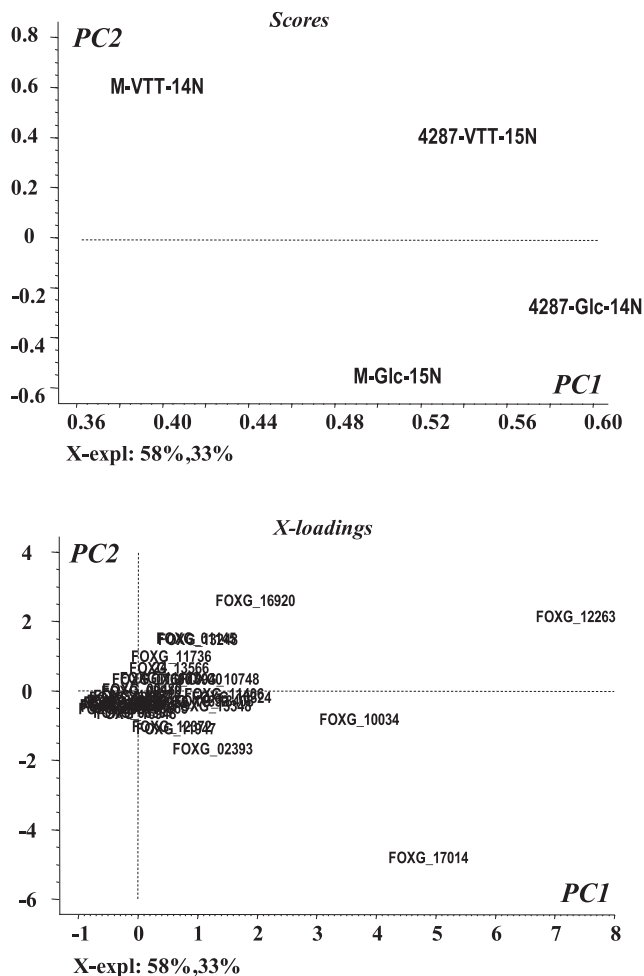
**Fig. 3.** Mutant-to-wild “mean mean total area ratios” with respective standard deviations obtained for samples **1** (dark gray) and **2** (light gray). In each sample, protein extracts of the two strains were combined; sample **1** contained two strains grown in glucose whereas strains in sample **2** were grown in the presence of vascular tomato tissue as carbon source (data included in Table 1S).

role in wilt disease [20], this family of proteins is involved in vegetative growth and asexual reproduction [58]. Higher abundance observed in mutant with respect to the wild type strain suggests that NEP-like might form a part of compensatory mechanisms through which the mutant adjusts to the lack of class V chitin synthase gene.

Fungal plant pathogens secrete a series of redox-active enzymes, capable of natural polymer degradation [59] and participating in the defense against reactive oxygen species produced by the host plant and/or by environmental stressors [5,44]. In sample **1**, two proteins of this type were increased in the wild type strain (FOXG\_17180, FOXG\_15404) and three others were higher in  $\Delta chsV$  mutant (FOXG\_08948, FOXG\_12260, FOXG\_11406), suggesting that the two strains might apply different proteins for aforementioned purposes.

Four relatively abundant proteins with no marked changes between wild type and mutant strains were: one from ribonuclease T2 family (FOXG\_12372), one related to cell wall protein PhiA, by 90% identity with *F. oxysporum* (*F. vascular wilt*) and *F. mangiferae* (FOXG\_18408) and two with unknown function (FOXG\_02393, FOXG\_10324).

It should be stressed once again that sample **1** contained protein extracts of the wild type and mutant strains grown in the absence of host plant therefore the results obtained do not allow for direct assignment of candidate proteins participating in fungus pathogenicity. For this purpose, samples **1** and **2** were analyzed in search of proteins affected by the presence of vascular tomato tissue in each of the two strains.



**Fig. 4.** Principal Component Analysis of the abundances of 38 proteins in four fungal cultures 4287-Glc-14N, M-Glc-15N, 4287-VTT-15N and M-VTT-14N: (a) scores plot showing distribution of cultures and (b) X-loadings plot showing distribution of proteins, both in the reduced dimensionality of PC1 and PC2.

### 3.2. Effect of the vascular tomato tissue on the protein abundances in the two strains (samples 1, 2)

The sample 2 contained combined extracts of the two strains that were grown in the presence of freeze-dried vascular tomato tissue. Fig. 11S (ESM2) shows altered isotope pattern of randomly selected  $^{15}\text{N}$ -containing peptide found in this sample 2 as compared to sample 1, which confirms that fungus was acquiring nutrients from VTT. To observe the effect caused by changing the carbon source, abundances of individual proteins in the wild type and mutant strains were calculated in samples 1 and 2. Next, for each protein in each strain, the abundance found in glucose was rested from that attained in the presence of plant and the differences obtained for thirteen proteins noticeably affected by tomato plant tissue, are shown in Fig. 2. As can be observed in this Figure, abundances of five proteins decreased in the presence of plant tissue in both strains and for eight proteins, higher amounts were found in the presence of VTT. Increased protein expression in the fungal secretomes after switching from glucose to more challenging carbon sources or in the presence of the host, has been reported in several studies [9,12,23,45,60,61]. For plant pathogens, such up-regulation of specific proteins is indicative of their involvement in fungal pathogenicity, in defense against anti-fungal

agents produced by the host and/or in the hydrolytic processes necessary for growth and nutrient supply.

Finding five proteins, whose abundances decreased in both strains after introducing vascular tomato tissue (Fig. 2) was somehow disconcerting; in the order of decreasing difference, these were: NEP-like (FOXG\_17014), a protein with unknown function (FOXG\_02393), murein transglycosylase (FOXG\_11947), one with ribonuclease T2 activity (FOXG\_12372) and LysM containing protein (FOXG\_16948). This same effect was also observed while analyzing sample 3; as an example, Skyline visualized changes of the abundances for NEP-like peptides in the wild type strain upon switching from glucose to vascular tomato tissue, are shown in Figs. 9S and 10S (ESM2). Decreasing abundances of five aforementioned proteins was ascribed to their sorption on the surface of the powdered tissue rather than to their down-regulation. Given the functional description provided in the previous section 3.1 for most of these proteins, and due to their suggested sorption on the freeze-dried plant tissue, they might be considered as directly associated with pathogenicity and particularly important during the initial stage of plant invasion by fungus. It is noteworthy that the above proteins were abundant in both strains in the presence of glucose, and for majority of them, different amounts were found in mutant with respect to the wild type strain (sample 1, Fig. 1). At this stage however, it is difficult to explain why proteins involved in pathogenicity decreased after introduction of the host tissue similarly in both, virulent and non-pathogenic strains (Fig. 2).

On the other hand, secretome proteins with abundances increased in the presence of vascular tomato tissue were: alpha-amylase (FOXG\_16920), carboxylic ester hydrolase from (FOXG\_11103), trypsin (FOXG\_13248), putative arabinase (FOXG\_11736), subtilisin (FOXG\_01145), catalase peroxidase (FOXG\_17180), lipase (FOXG\_07600) and glucoamylase (FOXG\_13566).

### 3.3. Effect of plant tissue on the difference in proteins expression between two strains (samples 1,2)

Quantitative analysis of datasets acquired for samples 1 and 2 provided mutant-to-wild “mean mean total area ratios” with respective standard deviations (two biological and three technical replicates). In each of these samples, protein extracts of the two strains were combined; for sample 1, glucose was applied as a carbon source and for sample 2, both strains were grown in the presence of freeze-dried plant tissue. The obtained mutant-to-wild protein abundances ratios are presented in Fig. 3; the ratio values  $> 1$  indicate higher abundance in mutant strain whereas for proteins of higher abundance in the wild type strain, ratios values  $< 1$  were obtained. In Fig. 3, these same 38 proteins are included as in Fig. 1 (also in Table 1S). It can be noted on the first glance that, in the absence of the host tissue, seventeen proteins were more abundant in  $\Delta chsV$  mutant as compared to the wild type strain (sample 1 in Fig. 3); however, in the presence of vascular tomato tissue, this effect became less pronounced (ten proteins more abundant in mutant strain). Certainly, the wild type strain in contact with the host tissue needs to activate mechanisms responsible not only for nutrient supply and defensive response but most importantly, fungus secretes proteins promoting infection. In contrast, the effort of non-pathogenic mutant is always centered principally at compensation of its vulnerability due to deletion of chitinase synthase V gene (Fig. 12S, ESM2, shows the number of proteins up-regulated in each strain in the presence of each carbon source). In this regard, proteins more abundant in the wild type strain in sample 1 and whose mutant-to-wild abundance ratio decreases in the presence of plant tissue as compared to glucose, could be related with pathogenicity. As can be observed in Fig. 3,



these included: serine protease (FOXG\_12263), murein transglycosylase (FOXG\_11947), a protein related to cell wall protein PhiA (FOXG\_18408), LysM containing protein (FOXG\_16948), a protein with O-glycosylase activity (FOXG\_08301), 1,3-beta-glucanotransferase (FOXG\_05331), one related to endoglucanase B (FOXG\_08211), carboxylic ester hydrolase (FOXG\_11103), a protein with oxidoreductase activity (FOXG\_15404), lipase (FOXG\_07600), chitinase (FOXG\_09583), and a protein of unknown function (FOXG\_10324). Increased abundances in the wild type strain after changing glucose to VTT was also observed in the analysis of sample **3** which was a combination of two cultures of this strain grown in different carbon sources; as an example, Figs. 7S and 8S (ESM2) show Skyline visualization for <sup>15</sup>N- and <sup>14</sup>N- containing serine protease peptides in sample **3**.

Second group of proteins included in Fig. 3 was found at higher abundances in mutant in the presence of glucose and, when plant tissue was introduced, the mutant-to-wild ratios for these proteins was lower in sample **2** with respect to sample **1** indicating enhanced synthesis in the wild type strain. These changes are indicative of the involvement of proteins in the mutant adaptation to deletion of *chsV* gene and, also of their possible participation in virulence. Fifteen proteins in this group were: NEP-like (FOXG\_17014), one belonging to chitin-binding glycosyl hydrolase 18 family (FOXG\_10034), alcohol dehydrogenase (FOXG\_11406), a protein with amidase domain (FOXG\_11632), chitinase (FOXG\_10748), a protein with eight cysteine-containing domain (FOXG\_03365), murein transglycosylase (FOXG\_06359), alpha-amylase (FOXG\_16920), trypsin (FOXG\_13248), putative arabinase (FOXG\_11736), catalase peroxidase (FOXG\_12260), alkaline ceramidase (FOXG\_15265), one from ribonuclease T2 family (FOXG\_12372) and two proteins with unknown function (FOXG\_02393, FOXG\_10940).

For six proteins more abundant in the wild type strain in the presence of glucose (Fig. 1), their mutant-to-wild ratios in sample **2** (VTT as the main carbon source) were increased with respect to sample **1** (Fig. 3). It is proposed that these proteins are important in mutant strain when it copes with plant tissue as the main carbon source, yet their possible role during plant invasion cannot be excluded. As already discussed earlier in the text, some proteins preferentially up-regulated in the wild type strain might be adhered to the plant tissue and interact directly with the host cell wall. This group of proteins includes: carboxypeptidase A4 (FOXG\_13348), catalase peroxidase (FOXG\_17180), a protein containing GLEYA adhesin domain (FOXG\_02535), glucanase (FOXG\_00480), glucoamylase (FOXG\_13566), and subtilisin (FOXG\_01145).

Three following proteins were found at higher abundances in the wild type strain with similar mutant-to-wild ratios independently on the carbon source, which also suggests their contribution in virulence: alpha-galactosidase (FOXG\_04398), a protein with serine-type peptidase activity (FOXG\_00292), beta-fructofuranosidase (FOXG\_03211).

Finally, three proteins showed similar abundances ratio between two strains combined in samples **1** and **2** (mutant-to-wild ratio  $\geq 1$ , Table 1S); since these proteins were not influenced by the presence of host tissue, they probably would not be directly associated with pathogenicity. The proteins in this group were: one with FAD-binding oxidoreductase activity (FOXG\_08948), one related to cell wall protein PhiA (FOXG\_11567) and one with submitted name lipase (FOXG\_07600).

### 3.4. A proposal for functional assignment of the proteins identified in *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* secretome

Taken together the results presented and discussed in the

previous sections concerning abundances of 38 proteins in different extracts and samples, as well as changes of their abundances between two strains of different pathogenicity and between glucose and vascular tomato tissue as a carbon source, the functional assignment of 35 proteins found in secretome of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* has been proposed. The list of these proteins distributed in four groups is presented in Table 1, together with a summary of experimental evidence supporting the proposed ordering.

The first group comprises proteins involved in pathogenicity and/or defensive response, most probably during the initial stage of host invasion. Based on the experimental evidence, a protein with GLEYA adhesin domain (FOXG\_02535), three carbohydrate-active enzymes participating in cell wall degradation or in nutrients supply (FOXG\_11947, FOXG\_00480, FOXG\_13566), two proteases (FOXG\_01145, FOXG\_13348) and catalase peroxidase (FOXG\_17180) were included.

Three proteins of importance in mutant adaptation to *chsV* gene deletion and probably associated with plant invasion were collocated in the second group (Table 1). It seems interesting that NEP-like factor, whose functional diversification had previously been suggested [58], apparently was relevant in both, invasion and mutant adaptation. Other proteins were: one from ribonuclease T2 family (FOXG\_12372) and one unknown (FOXG\_02393).

In the third proposed group (Table 1), proteins involved in pathogenicity and/or defensive response, yet probably not interacting directly with the plant cell wall, were brought together. These included three proteins acting as potential effectors (FOXG\_12263, FOXG\_16948, FOXG\_00292), four hydrolases degrading polysaccharide structures (FOXG\_08301, FOXG\_04398, FOXG\_08211, FOXG\_03211), carboxylic ester hydrolase from lipases family (FOXG\_11103), a protein with oxidoreductase activity (FOXG\_15404), one of unknown function (FOXG\_10324) and, unexpectedly, one related to cell wall protein PhiA (FOXG\_18408).

Proteins comprised in the last group (Table 1), were assigned as important for mutant adaptation, for growth and nutrient supply yet not excluding their possible association with pathogenicity; these proteins probably did not interact directly with the host cell wall. Three protein/peptide hydrolyzing enzymes (FOXG\_11632, FOXG\_13248, FOXG\_11736), one eight cysteine-containing domain with previously proposed role in fungal pathogenicity [62] (FOXG\_03365), alkaline ceramidase (FOXG\_15265), six proteins degrading polysaccharides (FOXG\_10748, FOXG\_06359, FOXG\_05331, FOXG\_16920, FOXG\_10034, FOXG\_09583), two with oxidoreductase activity (FOXG\_12260, FOXG\_11406) and one of unknown function (FOXG\_10940), were included.

Finally, each of the above groups contained at least one protein of unknown function, which clearly indicates the urgent need for the advance in functional characterization of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* proteome.

In addition to the protein grouping proposed in Table 1 and discussed above, the abundances of individual proteins in each of the four cultures were submitted to the principal component analysis (data for 4287-Glc-14N, M-Glc-15N, 4287-VTT-15N, M-VTT-14N included in Table 1S). This unsupervised method was used to attain possible relationships existing among variables and cases in the original dataset while reducing its dimensionality; in the obtained model, the first two principal components (PC1, PC2) accounted for 91% of total data variability. In Fig. 4a, a scores plot is shown, in which PC2 separates cultures (cases) according with the carbon source while PC1 is related with the strain type. On the X-loadings plot (Fig. 4b), the variables (proteins) are allocated in this same bi-dimensional space. While comparing scores and X-loadings plots, it is noted that the abundances of four proteins weigh in differences among the four cultures (Fig. 4). Specifically, serine

**Table 1**  
Four groups of proteins and the experimental evidence supporting their proposed role in pathogenicity of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. (Glc - glucose; VTT - vascular tomato tissue the main carbon source; W - wild type strain; M -  $\Delta$ chsV mutant; A - abundance; **1** - sample composed by W + M, both grown in Glc; **2** - sample composed by W + M, both grown in VTT).

Proteins group	Experimental evidence ( <i>deduced effect</i> )	Proteins	
1. Involved in pathogenicity and/or defensive response, preferentially during initial stage of plant invasion	$A(W) \geq A(M)$ in Glc ( <b>1</b> )	Carboxypeptidase A4 (FOXG_13348)	
	$A(W)$ in VTT $\leq A(W)$ in Glc ( <b>2 vs 1</b> )	Murein transglycosylase (FOXG_11947)	
	$A(M)/A(W)$ in Glc $\leq 1$ and different in VTT ( <b>1 vs 2</b> )	Catalase peroxidase (FOXG_17180)	
	<i>(preferential synthesis in W for two carbon sources and possible sorption on the plant tissue)</i>	GLEYA adhesin domain (FOXG_02535) Glucanase (FOXG_00480) Glucoamylase (FOXG_13566) Subtilisin (FOXG_01145)	
2. Important in mutant adaptation to chsV gene deletion and probably associated with plant invasion	$A(M) > A(W)$ in Glc ( <b>1</b> )	NEP-like (FOXG_17014)	
	$A(W)$ in VTT $\leq A(W)$ in Glc ( <b>2 vs 1</b> )	Ribonuclease T2 family (FOXG_12372)	
	$A(M)/A(W)$ in Glc $\geq 1$ and lowered in VTT ( <b>1 vs 2</b> ) <i>(preferential synthesis in M for Glc and after switching to VTT, increased synthesis in W with possible sorption on the plant tissue)</i>	Unknown (FOXG_02393)	
3. Involved in pathogenicity and/or defensive response but probably without direct interaction with the host cell wall	$A(W) \geq A(M)$ in Glc ( <b>1</b> )	Serine protease (FOXG_12263)	
	$A(W)$ in VTT $\geq A(W)$ in Glc ( <b>2 vs 1</b> )	Unknown (FOXG_10324)	
	$A(M)/A(W)$ in Glc $\leq 1$ , lowered in VTT or for both carbon sources $A(M)/A(W) < 1$ ( <b>1 vs 2</b> )	Related to cell wall protein PhiA (FOXG_18408)	
	<i>(preferential synthesis in W as compared to M for both carbon sources, but difference between two strains more marked in VTT)</i>	LysM domain (FOXG_16948) O-glycosyl hydrolase activity (FOXG_08301) Alpha-galactosidase (FOXG_04398) Related to endoglucanase B (FOXG_08211) Carboxylic ester hydrolase (FOXG_11103) Oxidoreductase activity (FOXG_15404) Serine-type peptidase activity (FOXG_00292) Beta-fructofuranosidase (FOXG_03211)	
	4. Important for mutant adaptation, for growth and nutrient supply, not excluding association with pathogenicity	$A(M) \geq A(W)$ in Glc ( <b>1</b> )	Chitin-binding glycosyl hydrolase 18 family (FOXG_10034)
		$A(W)$ in VTT $\geq A(W)$ in Glc ( <b>2 vs 1</b> )	Alcohol dehydrogenase (FOXG_11406)
		S1 (W + M, Glc), S4 (W + M, VTT): $A(M)/A(W)$ in Glc and in VTT $< 1$ , yet lower for VTT ( <b>1 vs 2</b> ) <i>(preferential synthesis in M for Glc; after switching to VTT, increased synthesis in two strains)</i>	Amidase domain (FOXG_11632) Chitinase (FOXG_10748) Eight cysteine-containing domain (FOXG_03365) Unknown (FOXG_10940) Murein transglycosylase (FOXG_06359) 1,3-beta-glucanosyltransferase (FOXG_05331) Alpha-amylase (FOXG_16920) Trypsin (FOXG_13248) Putative arabinase (11736) Catalase peroxidase (FOXG_12260) Alkaline ceramidase (FOXG_15265) Chitinase 1 (FOXG_09583)

protease (FOXG\_12263) is associated with 4287-VTT-15N pointing to the involvement of this protein in fungus pathogenicity (group 3 in Table 1); alpha-amylase (FOXG\_16920) is also associated with VTT as a carbon source, but is closer to mutant strain as compared to serine protease, which supports inclusion of this protein in group 4, Table 1. The position of NEP-like (FOXG\_1704) in Fig. 4 relates high abundance of this protein with glucose as a carbon source and indicate its importance in the two fungal strains, as proposed in Table 1, group 2. The fourth protein, chitin-binding glycosyl

hydrolase 18 family (FOXG\_10034) is associated in Fig. 4 with mutant strain, practically independently on the carbon source (group 4 in Table 1). On the other part, most of the proteins in Fig. 4 present low PC1 and PC2 values, which points out that the abundances of these proteins are insufficient to explain their contribution in differences among cultures. Indeed, to propose proteins grouping, not only abundances but a combination of different criteria was applied as depicted in column 2 of Table 1.

#### 4. Conclusions

In this work, secretome of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* was studied for the first time, providing experimental evidence on the potential involvement of several individual proteins in fungus pathogenicity. In quantitative approach, efficient metabolic labeling was achieved by introducing <sup>15</sup>N potassium nitrate to the growth medium from the early stage of fungal propagation. Four pairs of differentially labeled cultures of the wild type 4287 strain and  $\Delta$ chsV mutant, grown in glucose or in the presence of vascular tomato tissue were combined and, after trypsin digestion, the obtained samples were analyzed by capHPLC-ESI-QTOFMS and MS/MS. Comparative evaluation of the abundance changes occurring for individual proteins between virulent and non-virulent strains and the observed effect of host tissue on protein abundances, enabled to propose functional annotation of 35 proteins separating them in four groups according with the suggested role. The first group included seven proteins adhering to the plant tissue hence potentially involved in the initial stage of host invasion. Another group gathered eleven proteins whose contribution in virulence might not require direct interaction with the host cell wall. On the other hand, seventeen proteins of importance for compensative adjustment of mutant, those participating in growth and nutrients supply, not excluding their role in virulence, were brought together in two other groups (one of them consisted of three proteins apparently adsorbing on the plant tissue).

The above 35 proteins comprised carbohydrate-active enzymes, protein/peptide- and lipid hydrolyzing enzymes, effectors inactivating plant immunity during intrusion by fungus (NEP-like, serine protease and related proteins, GLEYA adhesion domain, LysM domain), several proteins catalyzing redox processes and few proteins of unknown function. Furthermore, Principal Component Analysis carried out for the abundances of individual proteins in all fungal cultures reinforced the importance of four proteins (serine protease, NEP-like, alpha-amylase and chitin-binding glycosyl hydrolase 18 family) weighing on differences among four cultures containing two strains and two carbon sources.

To get further evidence on the identity of proteins involved in fungal virulence, further studies are in progress focusing on the effect of living host cells on the secretome profiles in both strains.

#### Author Contributions

**Kazimierz Wrobel:** conceptualization, methodology, formal analysis, validation, data curation, supervision; **Katarzyna Wrobel:** conceptualization, visualization, writing-original draft, editing; PhD students **Moises Guerrero Esperanza** and **Bianey Garcia Lara:** formal analysis, investigation; **MIG Roncero:** investigation, resources; **Alma Rosa Corrales Escobosa:** funding acquisition, project administration, conceptualization, methodology, validation, investigation, data curation, supervision.

#### Declaration of competing interest

None.

#### Acknowledgements

The financial support from National Council of Science and Technology, Mexico (CONACYT, projects 294094, 253879) is gratefully acknowledged.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2019.116288>.

#### References

- [1] R. Dean, J.A.L. Van Kan, Z.A. Pretorius, K.E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P.D. Spanu, J.J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis, G.D. Foster, The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology, *Mol. Plant Pathol.* 13 (2012) 414–430, <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>.
- [2] C.B. Michielse, M. Rep, Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*, *Mol. Plant Pathol.* 10 (2009) 311–324, <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>.
- [3] A. Di Pietro, M.P. Madrid, Z. Caracuel, J. Delgado-Jarana, M.I.G. Roncero, *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus, *Mol. Plant Pathol.* 4 (2003) 315–325, <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00180.x>.
- [4] L. Guo, L. Han, L. Yang, H. Zeng, D. Fan, Y. Zhu, Y. Feng, G. Wang, C. Peng, X. Jiang, D. Zhou, P. Ni, C. Liang, L. Liu, C. Mao, X. Fang, M. Peng, J. Huang, Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense causing banana vascular wilt disease, *PLoS One* 9 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095543> e95543.
- [5] P.M. Houterman, D. Speijer, H.L. Dekker, C.G. de Koster, B.J. Cornelissen, M. Rep, The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants, *Mol. Plant Pathol.* 8 (2007) 215–221, <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00384.x>.
- [6] E. Li, J. Ling, G. Wang, J. Xiao, Y. Yang, Z. Mao, X. Wang, B. Xie, Comparative proteomics analyses of two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* that differ in pathogenicity, *Sci. Rep.* 5 (2015) 13663, <https://doi.org/10.1038/srep13663>.
- [7] L.J. Ma, H.C. Van Der Does, K.A. Borkovich, J.J. Coleman, M.J. Daboussi, A. Di Pietro, M. Dufresne, M. Freitag, M. Grabherr, B. Henrissat, P.M. Houterman, S. Kang, W.B. Shim, C. Woloshuk, X. Xie, J.R. Xu, J. Antoniw, S.E. Baker, B.H. Bluhm, A. Breakspear, D.W. Brown, R.A.E. Butchko, S. Chapman, R. Coulson, P.M. Coutinho, E.G.J. Danchin, A. Diener, L.R. Gale, D.M. Gardiner, S. Goff, K.E. Hammond-Kosack, K. Hilburn, A. Hua-Van, W. Jonkers, K. Kazan, C.D. Kodira, M. Koehrsen, L. Kumar, Y.H. Lee, L. Li, J.M. Manners, D. Miranda-Saavedra, M. Mukherjee, G. Park, J. Park, S.Y. Park, R.H. Proctor, A. Regev, M.C. Ruiz-Roldan, D. Sain, S. Sakthikumar, S. Sykes, D.C. Schwartz, B.G. Turgeon, I. Wapinski, O. Yoder, S. Young, Q. Zeng, S. Zhou, J. Galagan, C.A. Cuomo, H.C. Kistler, M. Rep, Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*, *Nature* 464 (2010) 367, <https://doi.org/10.1038/nature08850>.
- [8] R. Manikandan, S. Harish, G. Karthikeyan, Comparative proteomic analysis of different isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* to exploit the differentially expressed proteins responsible for virulence on tomato plants, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 420, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00420>.
- [9] J.M. Paper, J.S. Scott-Craig, N.D. Adhikari, C.A. Cuomo, J.D. Walton, Comparative proteomics of extracellular proteins in vitro and in planta from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*, *Proteomics* 7 (2007) 3171–3183, <https://doi.org/10.1002/pmic.200700184>.
- [10] V. Phalip, F. Delalande, C. Carapito, F. Goubet, D. Hatsch, E. Leize-Wagner, P. Dupree, A. van Dorsseleer, J.M. Jeltsch, Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall, *Curr. Genet.* 48 (2005) 366–379, <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0040-3>.
- [11] E. Perez-Nadales, M.F.A. Nogueira, C. Baldin, S. Castanheira, M. El Ghalid, E. Grund, K. Lengeler, E. Marchegiani, P.V. Mehrotra, M. Moretti, V. Naik, M. Oses-Ruiz, T. Oskarsson, K. Schäfer, L. Wasserstrom, A.A. Brakhage, N.A.R. Gow, R. Kahmann, M.H. Lebrun, J. Perez-Martin, A. Di Pietro, N.J. Talbot, V. Toquin, A. Walther, J. Wendland, Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants, *Fungal Genet. Biol.* 70 (2014) 42–67, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.06.011>.
- [12] F.J. Fernández-Acero, T. Colby, A. Harzen, M. Carbu, U. Wieneke, J.M. Cantoral, J. Schmidt, 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors, *Proteomics* 10 (2010) 2270–2280, <https://doi.org/10.1002/pmic.200900408>.
- [13] A. Klimes, K.F. Dobinson, B.P. Thomma, S.J. Klosterman, Genomics spurs rapid advances in our understanding of the biology of vascular wilt pathogens in the genus *Verticillium*, *Annu. Rev. Phytopathol.* 53 (2015) 181–198, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120224>.
- [14] Y. Sun, X. Yi, M. Peng, H. Zeng, D. Wang, B. Li, Z. Tong, L. Chang, X. Jin, X. Wang, Proteomics of *Fusarium oxysporum* race 1 and race 4 reveals enzymes involved in carbohydrate metabolism and ion transport that might play important roles in banana *Fusarium* wilt, *PLoS One* 9 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113818> e113818.
- [15] Z. Zhao, H. Liu, C. Wang, J.R. Xu, Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi, *BMC Genomics* 14 (2013) 274, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-274>.
- [16] M.P. Madrid, A.R. Di Pietro, M.I.G. Roncero, Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defense compounds, *Mol. Microbiol.* 47 (2003) 257–266, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03299.x>.
- [17] M. Martin-Urdiroz, M.P. Madrid, M.I.G. Roncero, Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*, *Microbiology* 150 (2004) 3175–3187, <https://doi.org/10.1099/mic.0.27236-0>.
- [18] M. Martin-Urdiroz, M.I.G. Roncero, J.A. Gonzalez-Reyes, Ruiz-Roldan C. ChsVb, A class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*, *Eukaryot. Cell* 7 (2008) 112–121, <https://doi.org/>

- 10.1128/EC.00347-07.
- [19] R. Prados-Rosales, J.L. Luque-García, R. Martínez-López, C. Gil, A. Di Pietro, The *Fusarium oxysporum* cell wall proteome under adhesion-inducing conditions, *Proteomics* 9 (2009) 4755–4769, <https://doi.org/10.1002/pmic.200800950>.
  - [20] M. de Sain, M. Rep, The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 23970–23993, <https://doi.org/10.3390/ijms161023970>.
  - [21] L. Bianco, G. Perrotta, Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: from sample preparation to secretome analysis, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 5803–5829, <https://doi.org/10.3390/ijms16035803>.
  - [22] C. Rampitsch, J. Day, R. Subramaniam, S. Walkowiak, Comparative secretome analysis of *Fusarium graminearum* and two of its non-pathogenic mutants upon deoxynivalenol induction in vitro, *Proteomics* 13 (2013) 1913–1921, <https://doi.org/10.1002/pmic.201200446>.
  - [23] F. Yang, S. Jacobsen, H.J. Jørgensen, D.B. Collinge, B. Svensson, C. Finnie, *Fusarium graminearum* and its interactions with cereal heads: studies in the proteomics era, *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 37, <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00037>.
  - [24] N.A. Brown, J. Antoniwi, K.E. Hammond-Kosack, The predicted secretome of the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*: a refined comparative analysis, *PLoS One* 7 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033731> e33731.
  - [25] F.E.N. Yang, J.D. Jensen, B. Svensson, H.J. Jørgensen, D.B. Collinge, C. Finnie, Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat, *Mol. Plant Pathol.* 13 (2012) 445–453, <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00759.x>.
  - [26] M.K. Jashni, I.H. Dols, Y. Iida, S. Boeren, H.G. Beenen, R. Mehrabi, J. Collemare, P.J. de Wit, Synergistic action of a metalloprotease and a serine protease from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity, and enhances fungal virulence, *Mol. Plant Microbe Interact.* 28 (2015) 996–1008, <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-15-0074-R>.
  - [27] V. Girard, C. Dieryckx, C. Job, Job D. Secretomes, The fungal strike force, *Proteomics* 13 (2013) 597–608, <https://doi.org/10.1002/pmic.201200282>.
  - [28] R. Aebersold, M. Mann, Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function, *Nature* 537 (2016) 347, <https://doi.org/10.1038/nature19949>.
  - [29] M. Alfaro, J.A. Oguiza, L. Ramirez, A.G. Pisabarro, Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi, *J. Proteomics* 102 (2014) 28–43, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.001>.
  - [30] W. Zhu, J.W. Smith, C.M. Huang, Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics, *BioMed Res. Int.* 2010 (2010), <https://doi.org/10.1155/2010/840518>. Article ID 840518.
  - [31] M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, B. Kuster, Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1017–1031, <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1486-6>.
  - [32] R.D. Taylor, A. Saparno, B. Blackwell, V. Anoop, S. Gleddie, N.A. Tinker, Proteomic analyses of *Fusarium graminearum* grown under mycotoxin inducing conditions, *Proteomics* 8 (2008) 2256–2265, <https://doi.org/10.1002/pmic.200700610>.
  - [33] J.W. Gouw, J. Krijgsveld, A.J. Heck, Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms, *Mol. Cell. Proteom.* 9 (2010) 11–24, <https://doi.org/10.1074/mcp.R900001-MCP200>.
  - [34] I.N. Kaneva, J. Longworth, P.E. Sudbery, M.J. Dickman, Quantitative proteomic analysis in *Candida albicans* using SILAC-based mass spectrometry, *Proteomics* 18 (2018) 1700458, <https://doi.org/10.1002/pmic.201700278>.
  - [35] O. Chahrouh, D. Cobice, J. Malone, Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 2–20, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.04.013>.
  - [36] S.X. Yao, Y. Zhang, Y.L. Chen, H.T. Deng, J.Y. Liu, SILARS: an effective stable isotope labeling with ammonium nitrate-15N in rice seedlings for quantitative proteomic analysis, *Mol. Plant* 7 (2014) 1697–1700, <https://doi.org/10.1093/mp/ssu089>.
  - [37] M.J. MacCoss, C.C. Wu, D.E. Matthews, J.R. Yates, Measurement of the isotope enrichment of stable isotope-labeled proteins using high-resolution mass spectra of peptides, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7646–7653, <https://doi.org/10.1021/ac0508393>.
  - [38] B. Arsova, S. Kierszniowska, W.X. Schulze, The use of heavy nitrogen in quantitative proteomics experiments in plants, *Trends Plant Sci.* 17 (2012) 102–112, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.001>.
  - [39] L.K. Pino, B.C. Searle, J.G. Bollinger, B. Nunn, B. MacLean, M.J. MacCoss, The Skyline ecosystem: informatics for quantitative mass spectrometry proteomics, *Mass Spectrom. Rev.* (2017), <https://doi.org/10.1002/mas.21540>.
  - [40] A. Di Pietro, M.I.G. Roncero, Purification and characterization of a pectate lyase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* produced on tomato vascular tissue, *Physiol. Mol. Plant* 49 (1996) 177–185, <https://doi.org/10.1006/pmpp.1996.0047>.
  - [41] D.M. Wessel, U.I. Flügge, A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Anal. Biochem.* 138 (1984) 141–143, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90782-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90782-6).
  - [42] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
  - [43] M.L. Medina, W.A. Francisco, Isolation and enrichment of secreted proteins from filamentous fungi, in: S. Posch (Ed.), *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation*, Humana Press, Totowa, NY, 2008, pp. 275–285.
  - [44] Y. Wang, J. Wu, Z.Y. Park, S.G. Kim, R. Rakwal, G.K. Agrawal, S.T. Kim, K.Y. Kang, Comparative secretome investigation of *Magnaporthe oryzae* proteins responsive to nitrogen starvation, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 3136–3148, <https://doi.org/10.1021/pr200202m>.
  - [45] B.C. King, K.D. Waxman, N.V. Nenni, L.P. Walker, G.C. Bergstrom, D.M. Gibson, Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi, *Biotechnol. Biofuels* 4 (2011) 4, <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-4>.
  - [46] M. Franceschetti, A. Maqbool, M.J. Jiménez-Dalmaroni, H.G. Pennington, S. Kamoun, M.J. Banfield, Effectors of filamentous plant pathogens: commonalities amid diversity, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 81 (2017), <https://doi.org/10.1128/MMBR.00066-16> e00066-16.
  - [47] S.L. Tucker, N.J. Talbot, Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi, *Annu. Rev. Phytopathol.* 39 (2001) 385–417, <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.385>.
  - [48] T. Linder, C.M. Gustafson, Molecular phylogenetics of ascomycotal adhesins - a novel family of putative cell-surface adhesive proteins in fission yeasts, *Fungal Genet. Biol.* 45 (2008) 485–497, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.08.002>.
  - [49] R. De Jonge, M.D. Bolton, B.P. Thomma, How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors, *Curr. Opin. Plant Biol.* 14 (2011) 400–406, <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.005>.
  - [50] R. de Jonge, B.P. Thomma, Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol.* 17 (2009) 151–157, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.01.002>.
  - [51] T. Langner, V. Göhre, Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions, *Curr. Genet.* 62 (2016) 243–254, <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0530-x>.
  - [52] H.C. van der Does, R.G. Duyvesteyn, P.M. Goltstein, C.C. van Schie, E.M. Manders, B.J. Cornelissen, M. Rep, Expression of effector gene SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells, *Fungal Genet. Biol.* 45 (2008) 1257–1264, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.06.002>.
  - [53] N.A. Gow, J.P. Latge, C.A. Munro, The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function, *Microbiol. Spectr.* 5 (2017), <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>.
  - [54] C. Roncero, A. Sanchez-Diaz, M.H. Valdivieso, Chitin synthesis and fungal cell morphogenesis, in: D. Hoffmeister (Ed.), *Biochemistry and Molecular Biology*, Springer, Cham, 2016, pp. 167–190.
  - [55] M.D. Lenardon, C.A. Munro, N.A. Gow, Chitin synthesis and fungal pathogenesis, *Curr. Opin. Microbiol.* 13 (2010) 416–423, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.002>.
  - [56] L.A. Walker, C.A. Munro, I. de Bruijn, M.D. Lenardon, A. McKinnon, N.A.R. Gow, Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins, *PLoS Pathol.* 4 (2008), <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000040> e1000040.
  - [57] S. Selvaggini, C.A. Munro, S. Paschoud, D. Sanglard, N.A. Gow, Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, *An. Microbiol.* 150 (2004) 921–928, <https://doi.org/10.1099/mic.0.26661-0>.
  - [58] P. Santhanam, H.P. van Esse, I. Albert, L. Faino, T. Nürnberger, B.P. Thomma, Evidence for functional diversification within a fungal NEP1-like protein family, *Mol. Plant Microbe Interact.* 26 (2013) 278–286, <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0222-R>.
  - [59] A. Levasseur, F. Piumi, P.M. Coutinho, C. Rancurel, M. Asther, M. Delattre, B. Henrissat, P. Pontarotti, M. Asther, E. Record, FOLy: an integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds, *Fungal Genet. Biol.* 45 (2008) 638–645, <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.01.004>.
  - [60] D. Liu, J. Li, S. Zhao, R. Zhang, M. Wang, Y. Miao, Y. Shen, Q. Shen, Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources, *Biotechnol. Biofuels* 6 (2013) 149, <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-149>.
  - [61] S.W. McCotter, L.C. Horianopoulos, J.W. Kronstad, Regulation of the fungal secretome, *Curr. Genet.* 62 (2016) 533–545, <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0578-2>.
  - [62] R.D. Kulkarni, H.S. Kelkar, R.A. Dean, An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 118–121, [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00025-2).