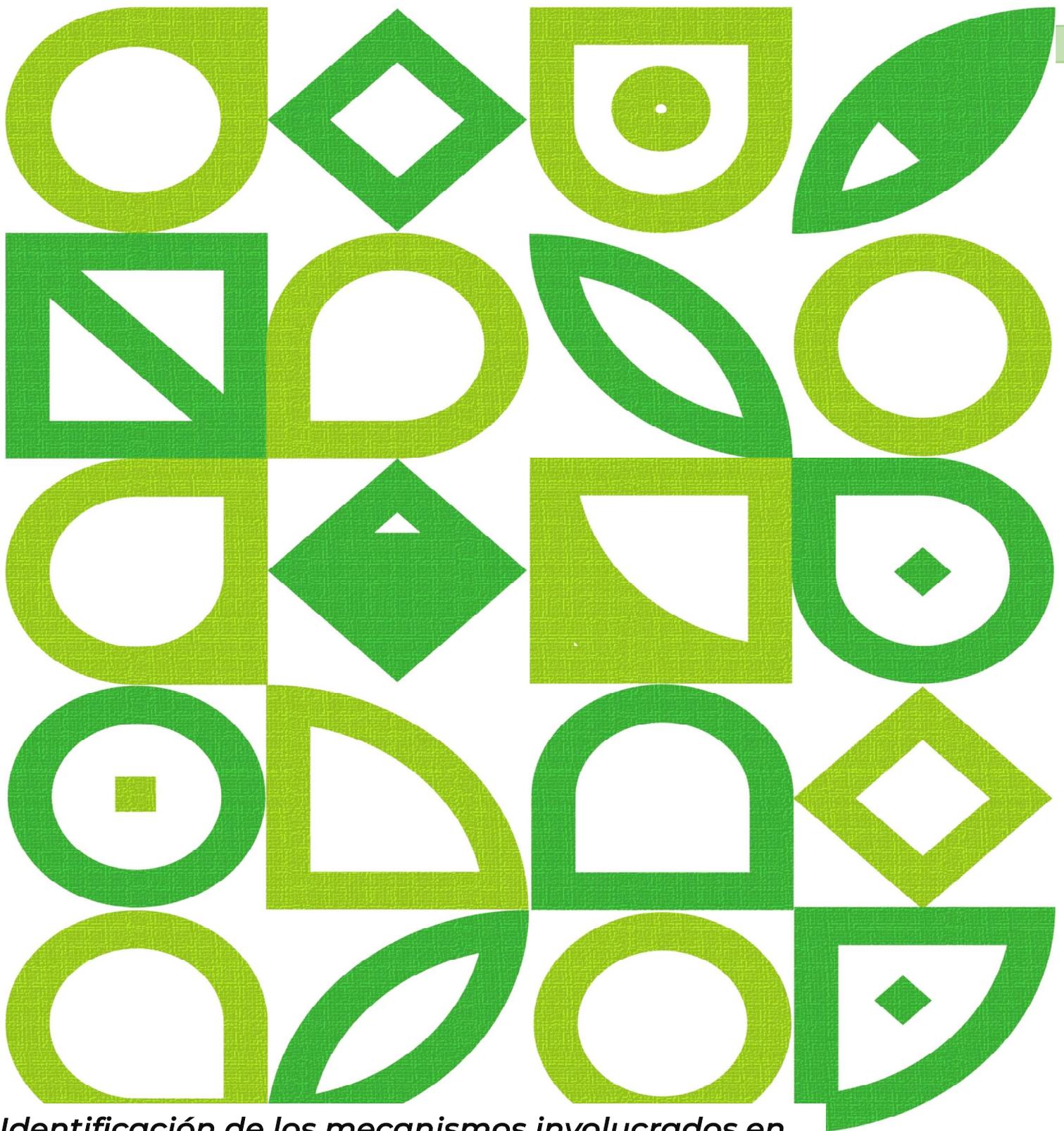


Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Especialización del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental / teórico: Identificación de los mecanismos involucrados en la degradación de endosulfan por la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* fue realizado de agosto de 2021 a diciembre 2023 en el laboratorio de bioprocesos (octavo piso) del Departamento de Procesos y Tecnología (DPT) de la división de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI).



Identificación de los mecanismos involucrados en la degradación de endosulfan por la cepa Bacillus subtilis

*IB Adriana Lizeth Casanova Olguín
Dra Irmene Ortiz López
Mtro Sergio Hernández Jiménez*



Identificación de los mecanismos involucrados en la degradación de endosulfan por la cepa bacteriana *Bacillus subtilis*

Idónea Comunicación de Resultados
Para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias Naturales e Ingeniería

Presenta:
I.B. Adriana Lizeth Casanova Olguín

Directora
Dra. Adela Irmene Ortiz López

Asesor:
Mtro. Sergio Hernández Jiménez

Ciudad de México, noviembre 2023

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana por la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

A CONAHCYT por la beca otorgada con CVU 1144744, la cual permitió financiar mis estudios de maestría.

A la Dra. Irmene por la dirección de este proyecto, por su apoyo constante, valiosos consejos y comentarios de mejora. Más allá de este proyecto, agradezco que haya compartido sus conocimientos conmigo, guiándome desde la licenciatura.

Al Mtro. Sergio, por su asesoría en este proyecto, por confiar en mí desde la licenciatura, por sus consejos e historias como la del caracol en momentos donde por poco me rindo.

Al Dr. Diego, por brindarme asesoría para el análisis bioinformático y consejos.

*A la Dra. Dolores, por su apoyo en la extracción del genoma de *B. subtilis*.*

A mis padres, Susana y Adrián por ser mi fuente de inspiración y mis pilares inquebrantables, por toda su motivación, amor y cariño. Su apoyo incondicional ha sido la luz que ha iluminado mi camino para la culminación de esta tesis.

A mi hermana, mi eterna amiga, por estar siempre a mi lado, apoyándome y alentándome con tus palabras de ánimo, por tu energía positiva y sobre todo por el rayito de luz que trajiste a la familia.

A Mau, mi compañero de desveladas, por compartir este viaje académico, gracias por celebrar mis éxitos, por tu amor y por sostenerme en momentos difíciles. Sabes que esta tesis es tanto tuya como mía.

A mis compañeros del laboratorio de bioprocesos, gracias por enseñarme que la vida es más divertida cuando hay compañía.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	10
2	ANTECEDENTES	12
2.1	Plaguicidas	12
2.1.1	Plaguicidas organoclorados	13
2.1.2	Destino ambiental de los plaguicidas	15
2.1.3	Enzimas involucradas en procesos de biodegradación	16
2.2	Endosulfan	20
2.2.1	Propiedades fisicoquímicas de endosulfan y su persistencia ambiental	21
2.2.2	Impactos del endosulfan: Efectos en la ecología y salud humana	23
2.2.3	Regulaciones de endosulfan	24
2.2.4	Endosulfan en México	25
2.2.5	Biodegradación de endosulfan	27
2.2.6	Metabolitos de endosulfan	28
		30
2.2.7	Estrategias para la remediación de endosulfan del ambiente	31
2.2.8	Microorganismos asociados a la degradación de endosulfan	31
3	ANTECEDENTES DIRECTOS	35
4	HIPOTESIS	37
5	OBJETIVO	37
5.1	Objetivo general	37
5.2	Objetivos específicos	37
6	MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1	Reactivos y medios de cultivo	38
6.2	Microorganismos	39
6.3	Aclimatación de la cepa	39
6.5	Ensayos de degradación	40
6.6	Técnicas analíticas	41
6.6.1	Cuantificación de CO ₂	41
6.6.2	Determinación de biomasa	41

6.7 Cuantificación de endosulfan e identificación de metabolitos	41
6.7.1 Extracción líquido-líquido	42
6.8 Extracción de ADN genómico	43
6.9 Análisis de la secuencia	43
6.9.1 Análisis de calidad de la secuencia de ADN	43
6.9.2 Ensamble	44
6.9.3 Perfil taxonómico	44
6.9.4 Anotación	44
6.10 Acoplamiento molecular	45
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
7.1 Aclimatación de B. subtilis a endosulfan	45
7.2 Actividad microbiana de B. subtilis	46
7.3 Degradación de endosulfan	48
7.4 Determinación de biomasa producida	50
7.5 Identificación de metabolitos	51
7.6 Extracción de ADN genómico	53
7.7 Análisis de calidad del resultado de la secuenciación	54
7.7.1 Ensamble	57
7.7.2 Perfil taxonómico	58
7.7.3 Anotación	59
7.8 Acoplamiento molecular	61
8. PROPUESTA DE RUTA DE DEGRADACIÓN	67
9 CONCLUSIÓN	68
10 REFERENCIAS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la estructura de diversos plaguicidas organoclorados.....	10
Figura 2. Origen y distribución de los plaguicidas en los diferentes compartimentos ambientales (aire, suelo, agua y biota)	11
Figura 3. Metabolismo de plaguicidas por fases.....	13
Figura 4. Proceso de biodegradación de endosulfan.....	23
Figura 5. Rutas de degradación reportadas por diferentes microorganismos.....	26
Figura 6. Producción de CO ₂ por <i>B. subtilis</i>	43
Figura 7 perfil de degradación de endosulfan hasta las 240 horas.....	44
Figura 8. Producción de biomasa efectiva generada hasta las 240 horas.....	46
Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 0.8% (p/v)	50
Figura 10. Distribución de la calidad de las secuencias.....	51
Figura 11. Distribución de gc de las secuencias.....	52
Figura 12. Calidad de la secuencia por pb.....	53
Figura 13. Clasificación taxonómica generada por GOTTCHA2.....	54
Figura 14. A) Sitio activo de 5uju; b) docking molecular 5uju; c) gráfica de energía de afinidad en kcal/mol.....	60
Figura 15. a) Sitio activo de 7ris; b) docking molecular 7ris; c) gráfica de energía de afinidad en kcal/mol.....	60
Figura 16. a) Sitio activo de 3dha; b) docking molecular 3dha; c) gráfica de energía de afinidad en kcal/mol.....	61
Figura 17. a) Sitio activo de 3mz0; b) docking molecular 3mz0; c) gráfica de energía de afinidad en kcal/mol.....	61
Figura 18. a) Sitio activo de 3njz; b) docking molecular 3njz; c) gráfica de energía de afinidad en kcal/mol.....	62
Figura 19. a) Sitio activo de 4d8l; b) docking molecular 4d8l; c) gráfica de energía de afinidad en kcal/mol.....	62
Figura 20. Ruta propuesta utilizada por <i>B. subtilis</i> para degradar endosulfan.....	63
Figura 21 propuesta de ruta de degradación de endosulfan.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de plaguicidas de acuerdo con su composición química ^a	12
Tabla 2 Propiedades fisicoquímicas del endosulfan.....	22
Tabla 3 Composición de medio cultivo LB, basado en la formulación Lennox.....	38
Tabla 4 Composición de medio mineral.....	39
Tabla 5 Tasa de degradación y % degradación de endosulfan por la cepa <i>B. subtilis</i>	49
Tabla 6 Productos de degradación identificados en la biotransformación de endosulfan por <i>B. subtilis</i>	52
Tabla 7 Ensamble comparando los estadísticos N50, N75 y L50 a partir de tres herramientas diferentes (IDBA, SPAdes y MegaHIT).....	58
Tabla 8 Análisis de clústeres de genes de <i>B. subtilis</i> por anti-SMASH.....	61
Tabla 9 Identificación de enzimas con función enzimática similar	62

RESUMEN

El uso indiscriminado de plaguicidas en las cadenas de producción agrícola pone en riesgo, tanto a los ecosistemas como a la salud humana. El endosulfan, es un plaguicida organoclorado de amplio espectro que, ha sido incluido en la lista de contaminantes orgánicos persistentes a ser eliminados a nivel mundial, según lo estipulado en el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, dentro del marco del Programa de las Naciones Unidas para el medio ambiente (PNUMA)(Sathishkumar *et al*, 2021).

Su persistencia en suelos ha motivado múltiples investigaciones enfocadas en la aplicación de microorganismos como agentes de degradación, y a su vez comprender los mecanismos adoptados para el desarrollo de estos procesos. En el presente estudio se evaluó la capacidad de una cepa pura de *B. subtilis*, aislada de un suelo hortícola con historial de uso de plaguicidas, para mineralizar endosulfan (biotransformarlo hasta CO₂ y agua), empleándolo en ensayos que contenían a dicho compuesto como única fuente de carbono. Los porcentajes de degradación fueron de 97.60% de α - endosulfan y 69.45% de β - endosulfan partiendo de una concentración inicial de 20 mg/L que corresponde a 14 mg/L de α -endosulfan y 6 mg/L de β - endosulfan.

En la biotransformación de endosulfan por *B. subtilis* fueron identificados tres metabolitos intermediarios en la vía de degradación: endosulfan éter, endosulfan lactona y endosulfan diol. Posteriormente, se secuenció el genoma de *B. subtilis*, y se permitió la identificación *in silico* de enzimas específicas asociadas a estos metabolitos intermediarios, los cuales fueron: Monooxigenasa de Alcanosulfonato dependiente de FMNH₂ (EC 1.14.14.5), Glucolactonasa (EC 3.1.1.17), Cloroacetaldehído oxidoreductasa (EC1.2.1.3), Cloroacetaldehído: NAD⁺ oxidoreductasa (EC 1.1.1.18)

Al realizar una simulación de acoplamiento molecular para predecir la fuerza de asociación o afinidad de enlace entre estas enzimas y los metabolitos identificados experimentalmente (endosulfan éter, endosulfan lactona y endosulfan diol), se propuso la ruta de degradación usada por *B. subtilis* para biotransformar endosulfan. El primer paso consistió en la formación de endosulfan diol a partir de endosulfan y se concluye con la formación de endosulfan lactona. Lo cual contribuirá al entendimiento de la biotransformación de endosulfan a partir de *B. subtilis* y su uso como herramienta en estrategias de remediación.

1 INTRODUCCIÓN

El papel de los plaguicidas en la agricultura es indispensable para aumentar el rendimiento de cultivos y controlar plagas. El más reciente informe emitido por la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura (FAO), reportó que en 2021 se utilizaron un total de 3.5 millones de toneladas de plaguicidas. Lo que equivale al 4% de incremento en un año, 11% en una década y el doble desde 1990 (FAOSTAT 2023).

Si bien, los plaguicidas ofrecen beneficios al sector agrícola, no podemos ignorar que debido a su uso indiscriminado y persistencia en el medio ambiente han generado un impacto negativo en el ecosistema y la salud humana. Ante esto, se ha impulsado la instauración de convenios, como el de Estocolmo que buscan abordar la problemática de Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) a nivel global, regulando o eliminando el uso de 28 COP, divididos en tres anexos diferentes (A, B y C). Entre los cuales se encuentran plaguicidas organoclorados tales como: aldrín, clordano, dieldrin, endrin y/o endosulfan, este último incluido desde el 2011 (Kumari 2021).

El endosulfan es un plaguicida de amplio espectro que se presenta en una mezcla que consiste en dos estereoisómeros (α -endosulfan y β - endosulfan), en una relación que varía de 2:1 a 7:3 (ATSDR 2015). Este plaguicida es persistente y recalcitrante, lo cual quiere decir, que pueden ser transportados largos períodos de tiempo en el medio ambiente, bioacumularse, así como ser resistentes a la degradación (Basak *et al*, 2016; Castrejón-Godínez *et al*, 2022). Debido a estas características ha aumentado su presencia en diversos entornos, tales como: aire,

suelo, sedimento y agua, siendo registrado en regiones remotas, alejadas de donde fue aplicado inicialmente, como en el Ártico y la Antártida, según el informe del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP 2008). Sin embargo, más allá de su dispersión generalizada, la presencia de endosulfan en estos entornos plantea una preocupación adicional: su capacidad de acumulación en organismos vivos, como plantas, algas, especies acuáticas, organismos terrestres y mamíferos, donde se encuentran incluidos los seres humanos (Sathishkumar *et al*, 2021).

Al ser liberado en el ambiente, el endosulfan puede transformarse a través de procesos oxidativos en endosulfan sulfato, un compuesto más tóxico que el endosulfan (Jimenez-Torres *et al*, 2016). Sin embargo, también puede convertirse por vía biológica a sus metabolitos menos tóxicos como; endosulfan diol, endosulfan éter, endosulfan lactona, entre otros (Mudhoo *et al*, 2019).

En este contexto, una de las estrategias más prometedoras en la búsqueda de soluciones sostenibles para mitigar los efectos negativos del endosulfan u otros plaguicidas es la biorremediación. Este proceso aprovecha la capacidad de organismos vivos, tales como: plantas, bacterias, algas, y levaduras, caracterizados por su diversidad genética (enzimas, genes) para incorporar contaminantes (plaguicidas) en su metabolismo. Estos organismos transforman los contaminantes en intermediarios, generalmente menos tóxicos, y continúan el proceso hasta alcanzar la mineralización completa. La mineralización de un compuesto implica la conversión de los compuestos orgánicos en formas inorgánicas más simples, como el dióxido de carbono (CO₂), agua y sales minerales que pueden ser incorporados nuevamente al ciclo biogeoquímico (Sales da Silva *et al*, 2020).

En este tipo de conversiones se incluyen metabolitos, enzimas y genes que conforman una ruta de biotransformación que al ser caracterizada podría proporcionar la base para el desarrollo de estrategias más efectivas de biorremediación.

Por tal motivo, el objetivo general de este trabajo fue identificar los mecanismos involucrados en la degradación de endosulfan por la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* previamente aislada de un suelo con historial de uso de plaguicidas.

2 ANTECEDENTES

2.1 Plaguicidas

La Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura o FAO (por sus siglas en inglés) define los plaguicidas como sustancias, que incluyen insecticidas, aceites minerales, herbicidas, fungicidas, reguladores de crecimiento de plantas, rodenticidas, y cualquier otra mezcla destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, lo que abarca vectores de enfermedades humanas o animales, así como especies no deseadas de plantas o animales que causen daños o interfieran con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, productos de madera, piensos para animales, o sustancias utilizadas para controlar insectos arácnidos u otras plagas (FAO-FAOSTAT 2019)

Los plaguicidas se pueden clasificar en función de factores tales como: su modo de acción, tipo de plaga objetivo y composición. En cuanto a su composición, los plaguicidas se agrupan en diversas familias, entre las que se encuentran los compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, triazinas. En la Tabla 1, se muestran la clasificación de algunos plaguicidas de acuerdo a su composición química (CICOPLAFEST 2004).

Tabla 1 Clasificación de plaguicidas de acuerdo con su composición química ^a

Composición	Ejemplos de formulaciones comerciales
Organoclorados	DDT, aldrin, endosulfan, endrín
Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malatión

Carbamatos	Carbaryl, methomyl, propoxur
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cypermethrin, fenvalerato, permetrín
Derivados bipyridilos	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, picram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazine, ametryn, desmetryn, simazine
Compuestos orgánicos del estaño	Cyhexatin, dowco, plictrán
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

^a (Yadav *et al*, 2017)

2.1.1 Plaguicidas organoclorados

Los plaguicidas organoclorados comúnmente abreviados como POC, también llamados hidrocarburos clorados son compuestos químicos de carácter orgánico, unidos a átomos de carbono en su estructura química, además de moléculas de cloro, esta combinación les confiere estabilidad tanto física y química. Como resultado, los POC tienden a ser insolubles en agua, no presentan volatilidad y exhiben una alta solubilidad en disolventes orgánicos (Ramírez *et al*, 2001). Recientemente se han informado sobre la síntesis de nuevos POC, como el imidacloprid, lo que amplía la diversidad de compuestos en esta categoría (Pankaj *et al*, 2019; Tsai 2014). Las estructuras de algunos POC (mencionados en la Tabla 1) se presentan en la Figura 1, entre ellos, aldrin, diclorodifeniltricloroetano (DDT), dieldrin, endosulfan, pentaclofenol y endosulfan.

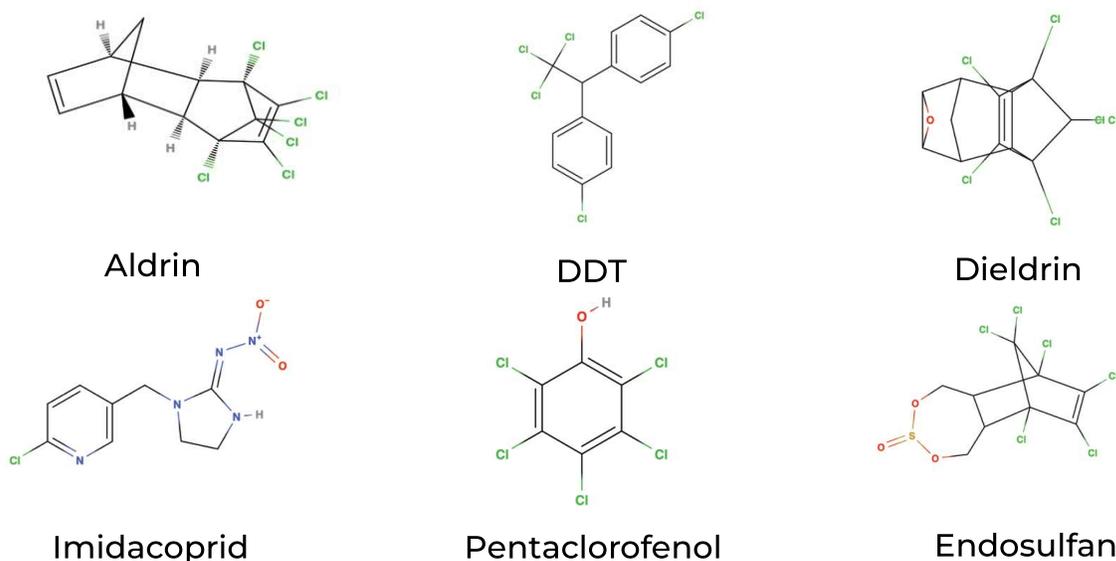


Figura 1. Representación de la estructura de diversos plaguicidas organoclorados

Estos compuestos pueden clasificarse en tres categorías diferentes según la estructura de la molécula: diclorodifeniltricloroetanos (por ejemplo, DDT), ciclodienos (por ejemplo, clordano) y hexaclorociclohexanos (por ejemplo, lindano) (Tsai 2014). El endosulfan se clasifica como un ciclodieno debido a su acción primaria en la que interfiere con los canales de cloruro en la membrana nerviosa, interrumpiendo la transferencia de iones y la transmisión de impulsos entre las células nerviosas (Devine *et al*, 2008; Sutherland *et al*, 2000). A pesar de esto, el endosulfan posee propiedades químicas y físicas diferentes en comparación a los ciclodienos, lo cual impacta tanto a su destino ambiental como a su destino biológico (acumulación en organismos vivos) (ATSDR 2015). En específico el endosulfan presenta un grupo diéster cíclico relativamente reactivo, lo que contribuye a menor persistencia en el suelo en comparación con otros ciclodienos, aunque más alta (>200 días) que algunos plaguicidas, como el aldrin (<120 días), cipermetrin (<56 días, en condiciones aeróbicas) (ATSDR 2015; Wexler *et al*, 2005). De manera general, la persistencia de un plaguicida puede ser cuantificada mediante su vida media que representa el tiempo necesario en días para que se pueda degradar a la mitad de su cantidad original en el suelo. Es decir, cuanto mayor sea la vida media,

mayor será la capacidad del plaguicida para desplazarse en el entorno (Castrejón-Godínez *et al*, 2022; Jones 2021)

2.1.2 Destino ambiental de los plaguicidas

Por lo general, cuando los plaguicidas se liberan en el medio ambiente, pueden dispersarse en diversos compartimientos (Figura 2), como el aire, suelo, agua y la biota (Tang *et al*, 2021). Estos compartimientos pueden experimentar movimientos de gases, líquidos y partículas sólidas a través de sus interfaces (Thakur *et al*, 2020). Las condiciones meteorológicas, la afinidad de la superficie de la planta con la formulación del plaguicida, la forma de pulverización, la cobertura del suelo, la densidad y extensión de las plantas, entre otros factores deben considerarse para determinar la cantidad del plaguicida adherido a la superficie del suelo o plantas (Tiryaki *et al*, 2010).

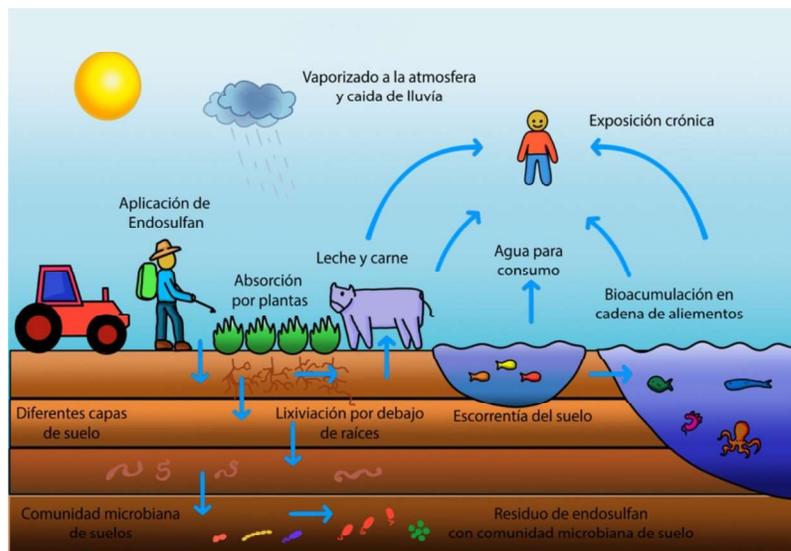


Figura 2. Origen y distribución de los plaguicidas en los diferentes compartimientos ambientales (aire, suelo, agua y biota).

A medida que los plaguicidas se adhieren a la superficie, ya sea de las plantas o del suelo, se encuentran expuestos a varios factores que pueden influir en su degradación. La degradación puede producirse mediante procesos abióticos o bióticos. Respecto a la degradación abiótica uno de los procesos más comunes es

la fotólisis, que implica la descomposición del endosulfan bajo la influencia de la luz natural o artificial. Otros procesos abióticos incluyen la oxidación y reacciones de reducción (Odukkathil *et al*, 2013).

Dichos movimientos son fundamentales para comprender cómo es que los plaguicidas interactúan con el entorno. Por ejemplo, en la atmosfera, el proceso de transferencia implica la volatilización, que puede resultar de procesos de oxidación. En el suelo, la transferencia puede ocurrir mediante procesos de sorción los cuales implican la adhesión del plaguicida a partículas del suelo y, en algunos casos, procesos de reducción que afectan su movilidad y persistencia, por último en el agua el desplazamiento de las moléculas ocurre por difusión, y en los organismos vivos por conjugación (Wheeler 2002).

2.1.3 Enzimas involucradas en procesos de biodegradación

Las enzimas son catalizadores biológicos que facilitan la conversión de sustratos en productos al proporcionar condiciones favorables que reducen la energía de activación de la reacción.

La identificación precisa de una enzima se logra mediante su número de Comisión de Enzima (EC), siguiendo las pautas establecidas por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB). El código de cuatro dígitos incluye el tipo de reacción química catalizada (donantes y receptores específicos de los grupos químicos que participan en las reacciones), luego el tipo de sustrato y, por último, la enzima. Estas pautas categorizan a todas las enzimas conocidas en seis divisiones principales, cada una con funciones específicas: hidrolasas, oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (Karigar *et al*, 2011).

La evolución y el desarrollo de sistemas enzimáticos especializados, capaces de catalizar una amplia variedad de reacciones en los procesos metabólicos emergen como una respuesta adaptativa crucial para los microorganismos que se enfrentan a condiciones de estrés en sus entornos. En estos procesos, las enzimas desempeñan un papel importante al catalizar diversas reacciones, de las cuales incluyen: romper enlaces mediante hidrólisis, agregar oxígeno a dobles enlaces,

transformar grupos amino en nitro y viceversa, agregar grupos hidroxilo a anillos de benceno, eliminar halógenos, entre otros (Arora 2019).

En esencia, estas complejas redes metabólicas proporcionan herramientas bioquímicas específicas que son aprovechadas por los microorganismos para degradar y modificar compuestos complejos, como los plaguicidas (Bose *et al*, 2021). Por tanto, la incorporación de los plaguicidas al metabolismo de los microorganismos puede implicar un proceso de tres fases mostradas en la Figura 3. En la primera fase, las hidrolasas y las esterasas rompen los enlaces químicos mediante la adición de agua, mientras que las oxidasas de función mixta (MFO) oxidan los compuestos para prepararlos para una degradación más completa. La segunda fase, involucra la conjugación del plaguicida o su metabolito a un azúcar o aminoácido, lo que aumenta su solubilidad en agua y reduce la toxicidad en comparación con el plaguicida original (Bose *et al*, 2021; Li *et al*, 2007). Por último, la tercera fase implica la conversión de los metabolitos de la segunda fase en conjugados secundarios, que tampoco son tóxicos (Ortiz-Hernández *et al*, 2011).

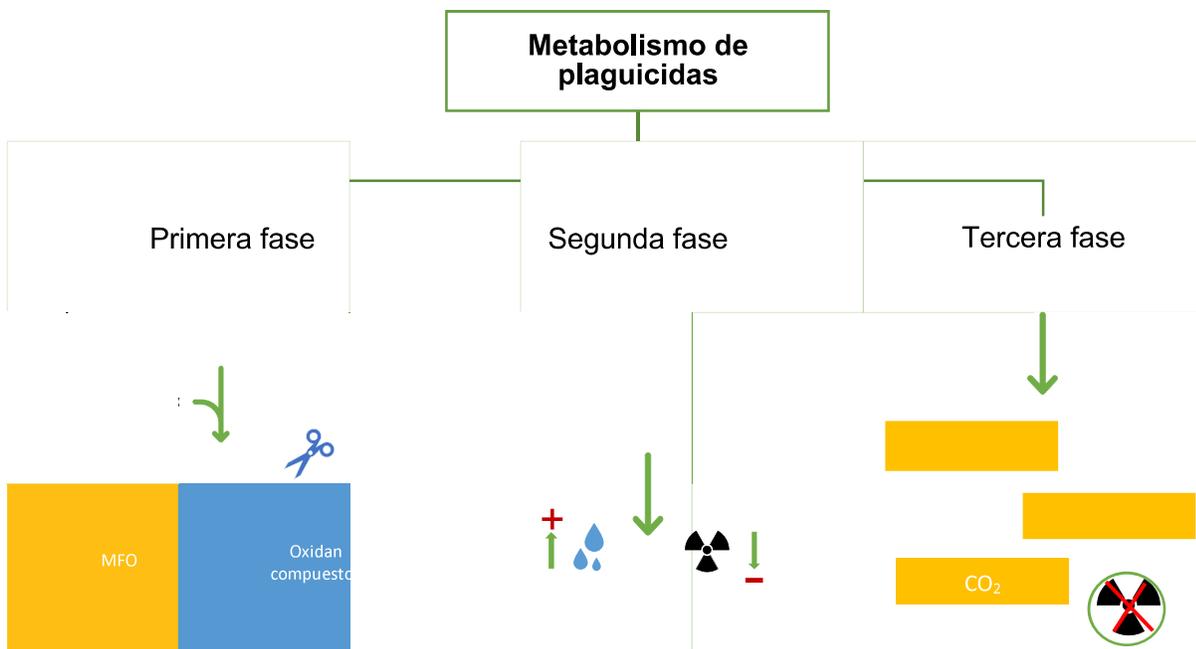


Figura 3 Fases del metabolismo de los plaguicidas

Dada la amplia variedad de compuestos químicos presentes en los plaguicidas, el metabolismo relacionado con la biodegradación de estos compuestos demanda una diversidad significativa de mecanismos catalíticos. En consecuencia, se requiere de una extensa variedad de clases de enzimas para llevar a cabo el proceso de degradación (Bose *et al*, 2021). A continuación, se mencionarán generalidades de las principales actividades enzimáticas aplicadas para la biodegradación de plaguicidas.

Hidrolasas

Las hidrolasas son la clase más grande y diversa de enzimas. Basado en su número EC, pertenecen a la clase enzimática 3 (3.1- 3.13). Se caracterizan por su capacidad hidrolítica, utilizando agua como fuente del grupo hidroxilo durante la descomposición del sustrato. Su acción involucra la interrupción de enlaces químicos claves, como: carbono-oxígeno (C-O), carbono-nitrógeno (C-N), carbono-carbono (C-C), fosforo-nitrógeno (P-N), entre otros. Dichos enlaces se encuentran moléculas contaminantes, lo que conlleva a la disminución de su toxicidad.

Dentro del espectro de enzimas hidrolasas con potencial para la biodegradación, se destacan moléculas como: lipasas, esterasas y proteasas (Shukla *et al*, 2022).

Oxidorreductasas

Facilitan la transferencia de electrones de una molécula, conocida como el reductor o donante de electrones, hacia otra molécula, denominada el oxidante o aceptor de electrones. Para llevar a cabo sus funciones, algunas de estas enzimas requieren cofactores adicionales, los cuales pueden actuar como donantes, aceptores de electrones o cumplir ambas funciones simultáneamente. Se dividen en 22 subclases identificadas por códigos EC entre 1.1 a 1.23 y 1.97 (Mansour *et al*, 2021).

Oxidasas de función mixta, MFO

Las enzimas MFO, también conocidas como monooxigenasas son identificadas con el número E.C 1.14.14.1, realizan un proceso catalizado, donde un átomo de oxígeno se une al sustrato, mientras que el otro se reduce para formar agua.

El citocromo P450 y la NADPH- citocromo P450 reductasa forman parte de un compuesto enzimático comprendido por dos proteínas de membrana. También son conocidas como monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 o sistema P450 (Shukla *et al*, 2022). El citocromo P-450 es el principal responsable del metabolismo oxidativo de los compuestos xenobióticos, de la que ya se han identificado más de 2000 isoformas diferentes (Anzenbacher *et al*, 2001).

La versatilidad funcional del citocromo P-450 se manifiesta en la amplia variedad de procesos que pueden catalizar, así como en su capacidad para metabolizar numerosos sustratos. Además de sus funciones fundamentales, como la oxidación, este sistema también puede llevar a cabo reducciones o hidrólisis. En general, a excepción de algunos casos, el citocromo P-450 requiere la presencia de NADPH para llevar a cabo la oxidación del sustrato (Bhandari *et al*, 2021; Donato 2004).

Liasas

Las liasas también conocidas como transeliminadas se encuentran implicadas en las reacciones enzimáticas catalíticas de escisión, que no implican hidrólisis ni oxidación de enlaces químicos, en este caso, una unión se rompe de forma no hidrolítica y da lugar a la formación de un doble enlace o un sistema aromático, de manera que los electrones que previamente se encontraban en el enlace, ahora quedaran “reposicionados” (Voet *et al*, 2016). Se clasifican en siete subgrupos según el tipo de enlace susceptible, que incluye carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno, carbono-azufre, fósforo-oxígeno, entre otros. Se encuentran en procesos celulares, como el ciclo del ácido cítrico, y la síntesis orgánica. Son clasificadas por su número E.C. del 4.1 al 4.8, 4.98 y 4.99 (Devlin 2019).

Ligasas

Las ligasas catalizan reacciones de enlaces covalentes entre dos moléculas. Son responsables del anabolismo celular. Se encuentran clasificadas bajo el número E.C. 6, al poseer alto peso molecular, se combinan como enlaces ricos en energía, divididos entre seis subclases diferentes que establecen enlaces carbono-oxígeno, carbono-azufre, carbono-nitrógeno, carbono-carbono, enlaces fosfórico-éster y nitrógeno-metal. Los nombres habituales de estas enzimas incluyen “ligasas” y sintetasas, este último debido a que sintetizan nuevas moléculas que requieren energía de los trifosfatos de nucleósido para catalizar la reacción sintética (Devlin 2019; Manubolu *et al*, 2018).

2.2 Endosulfan

El endosulfan nombrado químicamente como 6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5, 5a,6,9, 9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepina-3-óxido, es un plaguicida cíclico clorado. Fue introducido en el año 1954 por Farbwerke Hoechst A.G. bajo el nombre registrado de Thiodan® en Estados Unidos. Aunque también es comercializado bajo diversos nombres de marca, entre los que se incluyen Endox®, Thiomul®, Beosit®, Endocell®, Malix®, Thionex®, Insecto® y Tiovel® (ATSDR 2015; Weber *et al*, 2010). El proceso de síntesis de endosulfan más frecuentemente empleado implica la reacción entre hexaclorociclopentadieno y cis-buteno-1,4-diol, seguido por la hidrólisis del producto de reacción a un dialcohol. La etapa final consiste en la obtención del endosulfan mediante el tratamiento del dialcohol bicíclico con cloruro de tionilo (ATSDR 2015).

El endosulfan de grado técnico se encuentra en forma de escamas o cristales de color marrón. Según las especificaciones de la FAO debe contener al menos 94% de sustancia activa. De este porcentaje, el isómero- α debe estar presente en un rango entre el 64 y el 67%, mientras que el isómero- β debe estar presente en un rango del 29% al 32% (Lema 2011).

2.2.1 Propiedades fisicoquímicas de endosulfan y su persistencia ambiental

Como se mencionó anteriormente una vez que los plaguicidas son liberados en el ambiente, tienden a dispersarse en diversos compartimentos. Durante la aplicación del endosulfan, una fracción de la dosis se pierde en la atmósfera, la porción de esta pérdida, en forma de gotas que se mueven fuera del objetivo a través del aire se denomina pulverización. Las gotas de menor tamaño dentro del espectro son propensas a perderse a medida que la pulverización se desplaza. Las gotas más grandes son arrastradas por el viento y pueden arrastrarse justo fuera del área objetivo o a una distancia a favor del viento. Durante el transporte aéreo, el diámetro de las gotitas puede disminuir mediante la evaporación de la formulación del plaguicida, y cuando el diámetro es suficientemente pequeño, las partículas pueden permanecer en el aire con potencial para transporte a larga distancia e incluso lixiviarse por el agua de lluvia o riego hasta filtrarse a nivel freático (EPA 2009; Van den Berg *et al*, 1999). Una vez que los COP ingresan a las aguas subterráneas, plantean una amenaza significativa al infiltrarse en los pozos de agua potable y causar problemas de salud. Además, la capacidad de estos contaminantes, para acumularse en el tejido adiposo de los organismos vivos y magnificarse a niveles tróficos se ve acentuada por la prolongada vida media que poseen, la de endosulfan puede superar los 200 días, lo cual otorga una mayor capacidad para lixiviarse o moverse con la escorrentía de la superficie antes de que pueda degradarse. Factores como las características del suelo y las propiedades fisicoquímicas del plaguicida desempeñan un papel fundamental en este fenómeno, como ejemplo, los enlaces C-Cl que posee el endosulfan en su estructura, son conocidos por ser resistentes a hidrólisis y degradación química, lo que hace a la molécula poco soluble en agua (0.53 mg/L), valor mostrado en la Tabla 2 y por lo tanto persistente en el ambiente (ATSDR 2015; Navarrete-rodríguez *et al*, 2016; Weber *et al*, 2010).

Tabla 2 Propiedades fisicoquímicas del endosulfan

Característica	Información ^a
Identificador CAS	115-29-7
Peso molecular	406.93
Punto de fusión	106°C
Punto de ebullición	106°C (forma pura)
Solubilidad	
Diclorometano (20°C)	200 g/L
Acetato de etilo (20°C)	200 g/L
Tolueno (20°C)	200 g/L
Etanol (20°C)	65 g/L
Hexano (20°C)	24 g/L
Agua (25°C)	0.53 mg/L
Densidad (20°C)	1.745
Presión de vapor (25°C)	1.73 x 10 ⁻⁷ mmHg
Log K _{ow}	3.83 (endosulfan- α) 3.62 (endosulfan- β)
Log K _{oc}	4.03 (endosulfan- α) 4.13 (endosulfan- β)
Constante de Henry (20°C)	6.5x10 ⁻⁵ atm m ³ /mol

^a (HSDB Hazardous Substances Data Bank 2023)

En este sentido, el valor del coeficiente de partición octanol-agua, conocido con K_{ow}, expresa la afinidad de un compuesto por sustancias lipídicas. Dicho parámetro juega un papel crucial en la absorción y transporte de compuestos en plantas, así como en su capacidad de adsorción en el suelo y, por lo tanto, su potencial de lixiviación. Los valores de K_{ow} pueden encontrarse en rangos que oscilan entre -3 (muy hidrofílico) y +10 (extremadamente hidrofóbico) (Cumming *et al*, 2017). El Log K_{ow} del endosulfan suele estar en el rango de 4 a 5, dependiendo de su forma específica, lo que indica el alto potencial de adsorción al suelo y bioacumulación. Otro de los factores importantes para evaluar el comportamiento del endosulfan y su distribución en el ambiente es el coeficiente de distribución entre el carbono orgánico y el agua o K_{oc}. Ambos isómeros de endosulfan poseen valores de K_{oc}

alrededor de 4. Según la EPA valores altos (>5) sugieren mayor adsorción en la materia orgánica del suelo, lo cual implica una movilidad reducida del compuesto, mientras que un K_{oc} bajo (<1) indican mayor movilidad del endosulfan en el suelo (United States Environmental Protection Agency 2023).

Por otro lado, el coeficiente de la Ley de Henry, H , relaciona la distribución de los plaguicidas entre la fase acuosa y gaseosa, este indica la tendencia de un plaguicida para volatilizarse (Keshavarz *et al*, 2022). Se calcula utilizando la presión de vapor, solubilidad en agua y peso molecular del plaguicida en cuestión (Jáquez-Matas 2013). La constante de Henry para endosulfan es de 6.5×10^{-5} atm-m³/mol, lo que indica según la EPA que es propenso a quedarse en el agua y, por tanto, una menor posibilidad a volatilizarse hacia la atmósfera (Bouakkadia *et al*, 2020; Katyal *et al*, 2007; US-EPA 2023).

2.2.2 Impactos del endosulfan: Efectos en la ecología y salud humana

La toxicidad de endosulfan ha sido confirmada en una amplia variedad de organismos que van desde plantas, algas y especies acuáticas hasta organismos terrestres y mamíferos, incluyendo a los seres humanos (Sathishkumar *et al*, 2021). Es importante destacar que apenas el 0.1% de la cantidad de plaguicida aplicado, alcanza su plaga objetivo, mientras que el resto se dispersa por el medio ambiente, por lo que constituye un grave problema ecológico (Jáquez-Matas 2013). Existen reportes que indican la presencia de endosulfan en corteza de árboles, así como en productos de consumo humano como, miel de abeja, trigo, zanahoria, papa o arroz (Bejarano González *et al*, 2008; Díaz-Vallejo *et al*, 2021; Hernández *et al*, 2018).

Por otro lado, la acumulación de residuos de endosulfan en especies acuáticas representa un grave riesgo ecológico debido a su presencia en la cadena alimenticia. Su bioacumulación se ha documentado en diversas especies, como focas, cangrejos, peces, tortugas, mejillones, cocodrilos, organismos de arrecife y caracoles en diferentes regiones geográficas (Sathishkumar *et al*, 2021).

En humanos, la exposición de endosulfan puede ser accidental o intencional, y puede ocurrir a través de ingestión, inhalación, vía transplacentaria o absorción percutánea (Menezes *et al*, 2017). Diversos estudios han demostrado que el endosulfan presenta riesgos agudos, subagudos y crónicos para la salud humana, debido a sus efectos tóxicos en varios sistemas, incluidos el hepático, inmunológico y cardiovascular (Lu *et al*, 2000; Saiyed *et al*, 2003; Sathishkumar *et al*, 2021). Además, en mujeres embarazadas el endosulfan puede acumularse y transferirse al feto, afectando al crecimiento y desarrollo intrauterino, desencadenando la reducción en el crecimiento fetal, cáncer, trastornos metabólicos del neurodesarrollo y la reproducción (Alarcón *et al*, 2019; Menezes *et al*, 2017; Milesi *et al*, 2020).

2.2.3 Regulaciones de endosulfan

En respuesta a estos problemas de contaminación, numerosos países y organizaciones internacionales han implementado regulaciones y restricciones para controlar o prohibir el uso de endosulfan. Dichas medidas buscan minimizar los riesgos ambientales y proteger tanto la biodiversidad como la salud humana. Algunas de estas medidas se describen a continuación.

En 2001, el endosulfan fue incluido a la lista de Sustancias Prioritarias de la Directiva Marco en el sector del Agua de la Unión Europea, lo que requería el cese de descargas y emisiones en aguas superficiales y costeras, en un plazo de 20 años (Janssen 2011). Un año después en el 2002, se destacó como una Sustancia Química de Acción prioritaria según el Convenio para la Protección del Medio Marítimo del Nordeste Atlántico (OSPAR) y se incluyó en la lista de sustancias tóxicas prioritarias de la Tercera Conferencia del Mar del Norte. En ese mismo año fue catalogado como una Sustancia Tóxica Persistente (STP) en las evaluaciones regionales de STP del PNUMA-GEF y se detectó en el Programa de Monitoreo y Evaluaciones del Ártico (AMAP) en niveles que justificaban medidas a nivel global y regional. En el 2003, se incluyó en el anexo II del Borrador del Protocolo sobre el Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes del Convenio de Aarhus

de la Comisión Económica Europea de las Naciones Unidas (González *et al*, 2009; Kumar *et al*, 2019). Más tarde en 2005, la comunidad europea optó por no autorizar el uso de endosulfan para la protección de cultivos, con un periodo de gracia para algunos hasta de diciembre de 2007 (González *et al*, 2009).

Además de las regulaciones anteriores, el endosulfan se ha agregado al Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (POP) a eliminar a nivel mundial. En noviembre de 2007, la Unión Europea presentó la propuesta de incluirlo en el Anexo A. Tras la evaluación de riesgos realizada por el comité de revisión en su sexta reunión, que tuvo lugar en Ginebra del 11 al 15 de octubre de 2010, se determinó que tanto el Endosulfan técnico, sus isómeros α y β , así como el principal producto de degradación, el sulfato de endosulfan deberían ser incorporados en el Anexo A del Convenio de Estocolmo, lo que implicaría su eliminación a nivel global (Janssen 2011). En ese mismo año fue incluido también en el Convenio de Rotterdam sobre Procedimiento de Consentimiento Fundamentado Previo Aplicable a Ciertos Plaguicidas y Productos Químicos Peligroso Objeto de Comercio Internacional. Este convenio tiene como finalidad prevenir los riesgos asociados con la importación y exportación de estos productos químicos y garantizar que los países reciban información completa y previa sobre los riesgos de los productos químicos peligrosos (Landeros *et al*, 2018; Singh *et al*, 2014).

2.2.4 Endosulfan en México

En México el endosulfan fue utilizado a gran escala principalmente en el control de plagas en cultivos de café y en cultivos de alfalfa, algodón, berenjena, brócoli, calabaza, cebada, chile, ciruelo, frijol, jitomate, lechuga, maíz, manzana, melón, pepino, hortalizas, maíz, trigo, caña de azúcar, árboles ornamentales y frutales, tabaco, entre otros (Lema 2011).

Para el año 2010, México se encontraba entre los principales consumidores mundiales de endosulfan, lo que indica su amplia utilización en el país. Datos recopilados por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), en su catálogo de plaguicidas, así como el Pesticide Action Network

(PAN), revelaron que el endosulfan estaba registrado en México como un insecticida/ acaricida de categoría toxicológica II, destinado tanto a uso agrícola como industrial. Hasta septiembre de 2016, se contabilizaron hasta 47 registros de productos comerciales que contenían endosulfan (Atenodoro 2017).

En un reporte emitido por la Coordinación General de Contaminación y salud Ambiental del Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, durante el periodo que comprende del 2010 al 2013 se importaron 1, 422.8 toneladas de endosulfan, lo que representa un valor de 8.4 millones de dólares. Los países de los cuales se importó endosulfan a México fueron India (75.8%) e Israel (24.2%) (Atenodoro 2017).

El anuncio en 2011 de la eliminación gradual del uso de endosulfan en productos agroquímicos, marcó un paso significativo en la regulación de este plaguicida en el país. Lo que resultó en la prohibición total de su uso para fines agrícolas. Sin embargo, existen reportes recientes en los que se ha detectado endosulfan en distintos cultivos en México, a pesar de los acuerdos internacionales que indican que deberían estar prohibidos en el país debido a sus efectos adversos para la salud y el medio ambiente (García-Hernández *et al*, 2021; Jimenez-Torres *et al*, 2016; Polanco Rodríguez *et al*, 2019). Adicionalmente, en una investigación realizada por Díaz Vallejo y colaboradores indican que los límites máximos de residuos establecidos en ciertas regiones tienden a ser menos rigurosos en comparación con los estándares establecidos en la Unión Europea, por ejemplo. Por lo que implicaría una mayor exposición a plaguicidas en alimentos, lo cual conlleva un riesgo elevado para la salud de los consumidores (Díaz-Vallejo *et al*, 2021).

Lo anterior podría estar relacionado con una falta de asistencia técnica para los agricultores y un proceso regulatorio deficiente por parte de las autoridades sanitarias.

2.2.5 Biodegradación de endosulfan

El término degradación biológica o biodegradación se entiende como un proceso mediante el cual, compuestos orgánicos como el endosulfan son convertidos en formas más simples y menos perjudiciales para el ambiente. Se realiza a través de procesos metabólicos como la digestión o asimilación propias de microorganismos, como bacterias, hongos o levaduras (Cabrera 2020; Joutey *et al*, 2013).

El proceso de biotransformación de endosulfan involucra la modificación de la estructura química del compuesto orgánico inicial, lo que resulta en la pérdida de una propiedad específica, a través de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, como se muestra en la Figura 4. Posteriormente, estos productos son transformados en azúcares y aminoácidos, los cuales son más solubles en agua, hasta la conversión de moléculas más simples, por procesos de oxidación o reducción. Estas moléculas pueden incluir dióxido de carbono, sales y agua. Este proceso de transformación completa del endosulfan en componentes inorgánicos se conoce como mineralización. Si el proceso es realizado en condiciones de tipo aeróbico implica que las reacciones químicas de descomposición son realizadas utilizando oxígeno como aceptor final de electrones (Ortiz-Hernández *et al*, 2013). En el caso específico del endosulfan, su biotransformación conduce a la generación de metabolitos, entre ellos el endosulfan sulfato y endosulfan diol (Kataoka *et al*, 2013). Estos metabolitos representan una fase fundamental en el ciclo ambiental del endosulfan, evidenciando la forma en las que los microorganismos presentes en el entorno pueden modificarlo. En la naturaleza, existen comunidades microbianas que se encuentran presentes en el suelo, generalmente suelen ser mezclas de diferentes cepas de microorganismos que interactúan de manera sinérgica o antagónica, llevando a cabo procesos metabólicos coordinados, al implica una transferencia coordinada de sustratos y productos conocido como cooperación metabólica (Bhatt *et al*, 2021; Katsuyama *et al*, 2009).

Por otro lado, existen reportes acerca de la influencia de dextrosa, metanol o glucosa como fuentes de carbono adicionales para promover o aumentar la degradación de endosulfan (Bhattacharjee *et al*, 2014; Li *et al*, 2009).

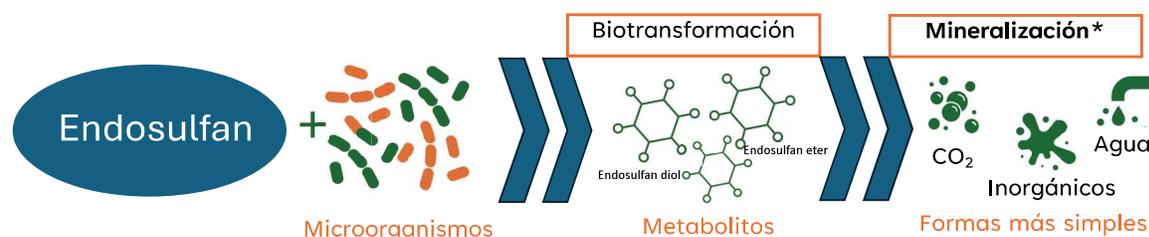


Figura 4. Proceso de biodegradación de endosulfan; produce la biotransformación en metabolitos y en algunas ocasiones la mineralización del compuesto*.

2.2.6 Metabolitos de endosulfan

Existen dos mecanismos principales de degradación de endosulfan: la oxidación que es el resultado de la acción de sistemas químicos y la hidrólisis, que ocurre a través de procesos biológicos (Bajaj *et al*, 2010; Rand *et al*, 2010). Alternativamente, mediante la biodegradación microbiana de endosulfan se puede hidrolizar a endosulfan diol en condiciones alcalinas. Este compuesto se puede convertir en endosulfan éter o endosulfan hidroxíeter para formar endosulfan lactona y al hidrolizarse produce hidroxicarboxilato de endosulfan (Kataoka *et al*, 2013; Kullman *et al*, 1996). Estas diversas vías de degradación de endosulfan dan como resultado la desulfuración del compuesto (Singh *et al*, 2017).

En la Figura 5, se muestra la biotransformación de endosulfan por diferentes microorganismos y las enzimas involucradas en cada una de las vías de degradación. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia* forman endosulfan diol a partir de endosulfan y lo pueden transformar a endosulfan éter o hidroxíeter por acción de las enzimas hidrolasa y deshidrogenasa, respectivamente, para posteriormente formar el metabolito endosulfan lactona, e hidrolizarlo a endosulfan hidroxicarboxilato. Adicionalmente, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhodococcus erythropolis* y *Arthrobacter sp.* oxidan endosulfan (endosulfan monooxigenasa) para formar endosulfan sulfato y transformarlo hasta endosulfan

monoalcohol por acción de dos enzimas más, una monooxigenasa y una sulfatasa. (Sutherland *et al*, 2004; Valerie Klema 2007; Weir *et al*, 2006).

Existen reportes de microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Achromobacter spanius*, *Bacillus pseudomycoides*, o *Peribacillus simplex* en donde se ha reportado la formación individual de algunos metabolitos como: endosulfan lactona, endosulfan diol o endosulfan éter en pero hasta el momento, la ruta de degradación no ha sido completamente caracterizada (Ahmad 2020; Casanova *et al*, 2021; Ishag *et al*, 2017).

2.2.7 Estrategias para la remediación de endosulfan del ambiente

Ante los problemas derivados del uso excesivo del endosulfan, en el ámbito agrícola, resulta importante desarrollar estrategias para garantizar su eliminación del ambiente. Esto abarca no solo al tratamiento de áreas contaminadas, sino también la remediación de sitios contaminados.

Entre las tecnologías existentes se encuentran las que aplican tratamientos físicos, como filtros de adsorción con carbón activado y percolador. Los tratamientos químicos los cuales involucran reacciones de hidrólisis y redox catalizadas por la superficie de las partículas del suelo como arcillas, óxidos metálicos, iones metálicos, entre otros, un ejemplo de esta tecnología es la fotocatalisis heterogénea que ha sido reportado previamente en la degradación de endosulfan, este proceso de oxidación avanzado utiliza compuestos inorgánicos como el TiO_2 o $\text{Fe}_2(\text{MoO}_4)_3$, como catalizadores (Calderón 2017; Landeros *et al*, 2018; Parveen *et al*, 2020). Sin embargo, este tipo de procesos pueden desencadenar reacciones químicas que pueden generar contaminación secundaria (Carpi 2011). En comparación con estos métodos, la biorremediación no requiere el uso de otros compuestos, lo cual conlleva a la generación de productos de degradación generalmente más simples y menos perjudiciales, por lo tanto generan menor impacto ambiental (Subashini *et al*, 2010). La biorremediación es el proceso mediante el cual los microorganismos degradan o transforman compuestos tóxicos en formas menos tóxicas a través del empleo de microorganismos como agentes de degradación (Kuddus 2018).

2.2.8 Microorganismos asociados a la degradación de endosulfan

Se ha reportado el uso de diferentes microorganismos como agentes en la degradación de endosulfan (bacterias, hongos, algas) (Ahmad 2020; Bhalerao 2012; Casanova *et al*, 2021; Lee *et al*, 2003; Sethunathan *et al*, 2004). Este proceso no sólo depende de la presencia de microorganismos con enzimas que propicien la

degradación sino también de una amplia gama de parámetros ambientales, como el pH, la temperatura, la humedad, la estructura del suelo, los nutrientes, el contenido de oxígeno (Bhattacharjee *et al*, 2014; Sharma 2020).

Generalmente, los estudios de biodegradación son realizados mediante el aislamiento de microorganismos presentes en suelos con historial de exposición al endosulfan (Casanova *et al*, 2021; Siddique *et al*, 2003).

En este trabajo, nos centraremos exclusivamente en la información relacionada con la degradación bacteriana, ya que es la más relevante para los objetivos de esta investigación.

La diversidad metabólica de las bacterias es sustancialmente mayor que la de los organismos superiores como animales, plantas, hongos, etc. debido a que suelen adaptarse constantemente a entornos de estrés (Ortiz-Hernández *et al*, 2013). Esta adaptabilidad ha llevado a cambios significativos en sus rutas metabólicas, permitiendo utilizar nuevos sustratos para su crecimiento y al mismo tiempo eliminar sustancias tóxicas (Guerrero Ramírez *et al*, 2023). La eficiencia catalítica de las bacterias frente a sustratos persistentes en el ambiente se atribuye a la notable plasticidad de su metabolismo (Díaz 2004; Umamaheswari *et al*, 2010). Algunas investigaciones relacionadas con la capacidad de bacterias referente a degradar endosulfan se señalan a continuación.

De una región de Irán con historial de uso de plaguicidas fueron aisladas cinco cepas bacterianas de los generos: *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* y *Bacillus*, que demostraron la capacidad de degradar endosulfan hasta el 90% (4.9×10^{-6} a 2.14×10^{-5} mg/L/día) (Kafilzadeh *et al*, 2015). Durante ese estudio, se observó la formación de endosulfan diol, endosulfan lactona y endosulfan éter. En otro contexto, Ozdal y colaboradores en el año 2016, aislaron a *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus atrophaeus*, *Citrobacter amolonacitus* y *Acinetobacter lwoffii*, de cucarachas que se encontraban en entornos contaminados con endosulfan, logrando una tasa de degradación de 5.67-8.85 mg/L día (Ozdal *et al*, 2016).

Recientemente, se aisló a *Pseudomonas sp.*, de suelos contaminados en Meenambur, Tamil, India, con una tasa de degradación de endosulfan de 2.85 mg/L

día. Aunque no se realizó la identificación de metabolitos se evidenció la capacidad de degradación (Sakthivel *et al*, 2022). Por otro lado, en una investigación en donde se identificó a *Achromobacter xylosoxidans* como una cepa capaz de utilizar endosulfan como fuente de carbono o energía, su tasa de degradación de endosulfan fue de 1.31 a 3.15 mg/L, se detectaron los metabolitos endosulfan diol y endosulfan éter (Li *et al*, 2009).

A pesar de las múltiples investigaciones desarrolladas entorno a la biodiversidad de agentes que degradan endosulfan existe muy poca información acerca de las enzimas y las rutas metabólicas que participan en estos procesos. La caracterización de dichas enzimas implica conocer las rutas metabólicas específicas que conducen a la degradación de endosulfan, lo que resulta esencial para el diseño de estrategias efectivas en la biorremediación.

En el año 2019 Sutherland y colaboradores, realizaron el aislamiento de la cepa bacteriana *Mycobacterium*, en donde describieron la presencia de una monooxigenasa dependiente de flavina denominada Esd, que tiene la capacidad de degradar β -endosulfan, transformándolo en monoaldehído y posteriormente en hidroxiéter de endosulfan (Sutherland *et al*, 2002). En un estudio alterno describen el aislamiento y la caracterización de la enzima Ese, de la bacteria *Arthrobacter sp.*, capaz de degradar endosulfan y endosulfan sulfato. Además, un grupo de investigación ha evidenciado el potencial de la enzima CotA de *Bacillus subtilis* Ps209 para degradar endosulfan (Singh *et al*, 2019).

Por otro lado, en algunos estudios donde se aplican tecnologías *in silico* basado en la similitud estructural, se reveló que la bacteria *Bacillus megaterium* codifica la enzima CYP-BM3. La similitud funcional fue estudiada a nivel organismo y se demostró que *B. megaterium* puede degradar endosulfan, como lo hace la enzima CYP-2B6 en el sistema humano. Así mismo, se reportó a partir del cribado de enzimas *in silico* con potencial para degradar endosulfan y endosulfan sulfato identificando a la enzima fenol hidroxilasa, 1PN0 de la cepa fúngica *Trichosporon cutaneum* (Seralathan *et al*, 2014).

El uso de métodos *in silico* ha revolucionado los procesos de biorremediación al proporcionar herramientas bioinformáticas avanzadas. Entre estas herramientas se incluyen bases de datos (ExPASY, BRENDA, KEGG, Enzyme, NCBI), sistemas de predicción de toxicidad química (VirtualToxLab, TOPKAT, Ecological Structure Activity Relationships), sistemas de predicción y acoplamiento molecular (AutoDock vina, DOCK, SEED), así como secuenciación de próxima generación (Roche/454, Illumina/Solexa, SOLiD/Life/APG), entre otros.

3 ANTECEDENTES DIRECTOS

En un estudio previo se aislaron siete cepas bacterianas de una región hortícola conocida como “Cinturón hortícola Platense” en Buenos Aires, Argentina, donde se siembra tradicionalmente desde hace más 20 años cultivos de tomate, pimiento, berenjena, perejil, brócoli, col, lechuga, alcachofa entre otros, con uso intensivo de plaguicidas orgánicos e inorgánicos incluyendo el endosulfan (Casanova *et al*, 2021).

A partir de muestras del suelo fueron aisladas seis cepas bacterianas: *Pseudomonas putida*, *Enterobacter Cloacae*, *Achromobacter spanius*, *Bacillus subtilis*, *Peribacillus simplex* y *Bacillus pseudomycoides*. Estas cepas fueron sometidas a ensayos donde se evaluó su capacidad de degradación de endosulfan. Obteniendo tasas de degradación expresadas en mg/L/día de 2.80, 5.58, 5.43, 4.79, 5.19 y 2.66, respectivamente, partiendo de una concentración inicial de 20 mg/L (14 mg/L de α -endosulfan y 6 mg/L de β - endosulfan). La mayor tasa de degradación fue observada por *E. cloacae* que fue aproximadamente el doble a la de *P. putida* y *B. pseudomycoides*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P=0.05$) entre *E. cloacae*, *A. spanius*, *P. simplex* y *B. subtilis* (Casanova *et al*, 2021).

Adicionalmente, la identificación de metabolitos reveló la formación de endosulfan diol y endosulfan éter en *Pseudomonas putida* y *Bacillus pseudomycoides*, aunque también se reportó que *Bacillus subtilis* biotransformó endosulfan hasta endosulfan lactona, uno de los metabolitos que se encuentra hacia el final de las rutas de degradación reportadas y que confirmó vías hidrolíticas por dicho microorganismo en presencia de endosulfan (Casanova *et al*, 2021).

Bacillus subtilis es una bacteria Gram- positiva, perteneciente al phylum *firmicutes*, produce endosporas que le permiten la supervivencia en entornos extremos como calor o desecación. Al encontrarse normalmente en el suelo es expuesta a condiciones de estrés, donde son comunes largos periodos de sequía y privación de nutrientes (Losick 2020). Por ende, se le reconoce como uno de los microorganismos más relevantes en el ámbito agrícola, principalmente porque se

ha comprobado su eficacia como promotor del crecimiento e inductor de resistencia ante diversas formas de estrés en las plantas (González-León *et al*, 2023).

Entre las seis cepas bacterianas mencionadas anteriormente, *Bacillus subtilis* surge como el microorganismo mejor estudiado lo cual lo convierte en un organismo modelo. En 1958, la cepa 168 de *B. subtilis* exhibió competencia genética natural, revelando que puede adquirir ADN del entorno de manera eficiente, facilitando su manipulación genética y por lo tanto contribuir en su estudio a nivel molecular y genético (Harwood *et al*, 2013).

Estas características hacen de *B. subtilis* un organismo prometedor para ser empleado en procesos de biorremediación, como lo ha evidenciado su presencia en diversas investigaciones al respecto. Dentro de las cuales se incluyen la transformación de metales como el cromo hexavalente (Cr6), Níquel, Cobre, Manganeso, entre otros, así como aceites, hidrocarburos, tintes textiles, plaguicidas, entre otros (Katkar *et al*, 2021; Kumar *et al*, 2014; Purnomo *et al*, 2020; Wang *et al*, 2019). Dicho proceso puede ocurrir a través de procesos donde los metales son adsorbidos en la superficie de las paredes celulares bacterianas, a través de intercambio iónico y adsorción física causada por interacciones intermoleculares (Rocco *et al*, 2023). Aunque también está relacionada con el crecimiento de las plantas, a través de metabolitos, enzimas y genes especializados o la exclusión de patógenos (Dhankhar *et al*, 2020; Hashem *et al*, 2019; Liu *et al*, 2020).

Con el propósito de profundizar en la comprensión de la degradación de endosulfan por parte de *B. subtilis*, el presente estudio tiene como objetivo principal identificar los mecanismos que intervienen en este proceso. Esto implica explorar los metabolitos generados, las enzimas involucradas y los genes que desencadenan esta transformación.

4 HIPOTESIS

A partir de la identificación de los metabolitos producidos por *B. subtilis* en la degradación de endosulfan, es posible asociar reacciones metabólicas, que incluyen a las enzimas y los genes involucrados, permitiendo así proponer una ruta de biotransformación de dicho compuesto.

5 OBJETIVO

5.1 *Objetivo general*

Proponer una ruta de degradación y transformación de endosulfan por *B. subtilis*, evaluando su degradación, identificando los metabolitos intermediarios y midiendo la afinidad de estos con las enzimas involucradas, de forma experimental y computacionalmente.

5.2 *Objetivos específicos*

- *Evaluar la capacidad de degradación de endosulfan por Bacillus subtilis a través de la cuantificación de endosulfan residual por GC-MS.*
- *Identificar experimentalmente los metabolitos involucrados en la degradación de endosulfan por Bacillus subtilis, comparandolos con los espectros de masas contenidos en la biblioteca NIST05.*
- *Identificar in silico las enzimas involucradas en la degradación de endosulfan por Bacillus subtilis a través de la anotación y análisis del genoma del microorganismo.*
- *Evaluar in silico la afinidad del complejo enzima-metabolito por análisis de acoplamiento molecular.*

- Proponer una ruta de degradación utilizada por *Bacillus subtilis* para degradar endosulfan a partir de una búsqueda en la literatura de enzimas que realicen la misma función enzimática que las reportadas para la degradación de endosulfan, la identificación de las enzimas del genoma de *B. subtilis* y los *intermediarios* de degradación (metabolitos).

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos y medios de cultivo

Para los ensayos de degradación se utilizó endosulfan (Sigma Aldrich, grado analítico), isómeros α y β , 7:3 v/v, 98.35% de pureza, el cual se disolvió en hexano. Los solventes utilizados durante la extracción fueron hexano y diclorometano, grado HPLC 99.9% (Burdick & Jackson).

Para la aclimatación de las cepas y la preparación del inóculo se utilizó medio LB, que contiene peptona de caseína, extracto de levadura y cloruro de sodio, las concentraciones se muestran a continuación en la Tabla 3. Mientras que en la Tabla 4 se muestra la composición del medio mineral utilizado en los ensayos de degradación.

Tabla 3 Composición de medio cultivo LB, basado en la formulación Lennox.

Compuesto	Cantidad (g/L)	Marca
Peptona de caseína	10	BD BIOXON
Extracto de levadura	5	BD BIOXON
Cloruro de sodio	5	Fermont

Tabla 4 Composición de medio mineral

Compuesto	Cantidad (g/L)	Marca
Na ₂ HPO ₄	5.97	JT BAKER
CaCl ₂ ·H ₂ O	0.01	LABKEM
KH ₂ PO ₄	2.27	Fermont
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.99	JT BAKER
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.025	Sigma Aldrich
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	HANNA instruments

6.2 Microorganismos

La cepa utilizada para las pruebas de degradación fue *Bacillus subtilis* del laboratorio de Bioprocesos de la UAM Cuajimalpa, aislada del "Cinturón hortícola platense" (S 34° 51' 23,897", O 58° 16' 19,198") de la localidad de La Plata en Argentina, sitio con historial de uso de plaguicidas, la cual fue identificada mediante el alineamiento de la secuenciación del 16S rRNA (MZ147606) (Casanova *et al*, 2021).

6.3 Aclimatación de la cepa

B. subtilis fue inoculado en un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía 200 mL de medio LB, a partir de un volumen de 2 mL de la cepa preservada en glicerol, así mismo se adicionó una concentración inicial de 5 mg/L de endosulfan y se incubó durante 72 horas a 150 rpm y una temperatura de 30°C, la concentración de endosulfan se incrementó cada 72 horas hasta alcanzar una concentración máxima de 20 mg/L.

6.4 Preparación del inóculo

Una vez aclimatada la cepa, se sometió a un proceso de centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos, seguido de una resuspensión en 20 mL de agua destilada y estéril. Este procedimiento se repitió tres veces bajo las mismas condiciones con el

propósito de lavar las células y eliminar residuos de medio de cultivo y endosulfan. La solución final fue utilizada como inóculo en los ensayos de degradación que se describen a continuación.

6.5 Ensayos de degradación

Las pruebas de degradación se realizaron por duplicado, para evaluar la capacidad de transformación y mineralización de endosulfan por *B. subtilis*, en matraces de 125 mL, recubiertos con papel aluminio para prevenir la fotodegradación. Se mantuvo un espacio cabeza de 95 mL y las condiciones de incubación fueron: temperatura de 30°C y agitación de 150 rpm.

Los ensayos de degradación contenían 27 mL de medio mineral, y endosulfan como única fuente de carbono con una concentración de 20 mg/L, es decir 14 mg/L y 6 mg/L de α - endosulfan y β - endosulfan, respectivamente. También se adicionaron 3 mL de inóculo que contenía a la cepa *Bacillus subtilis*. A cada uno de estos ensayos se le implementaron controles endógenos y abióticos. Los controles endógenos incluyeron medio mineral (27 mL) con el inóculo (3 mL). Por otro lado, los controles abióticos contenían únicamente medio mineral (30 mL) y endosulfan (a la misma concentración que los experimentos).

La evaluación de los ensayos se realizó en dos etapas, la primera fase consistió en interrumpir los ensayos a distintos intervalos de tiempo, permitiendo el registro detallado de la biotransformación de endosulfan en sus diversos metabolitos a lo largo del experimento. En la segunda fase, se extendió el monitoreo de los ensayos hasta que se alcanzó el punto donde no se observaron cambios en la producción de dióxido de carbono (CO₂).

Los parámetros que se cuantificaron fueron CO₂, biomasa, cuantificación de endosulfan residual, identificación de metabolitos y las metodologías analíticas utilizadas se describen a continuación

6.6 Técnicas analíticas

6.6.1 Cuantificación de CO₂

La cuantificación de CO₂ se utilizó como una medida indirecta de la actividad metabólica de *B. subtilis*. Se tomaron muestras de 100 µL del espacio cabeza de los matraces y se sometieron a análisis mediante cromatografía de gases en un equipo GOW-MAC series 550, EE. UU. Este dispositivo estaba equipado con un detector de conductividad térmica y una columna concéntrica CTR1 marca Altech de EE.UU. Se utilizó Helio como gas acarreador y las condiciones de análisis incluyeron las siguientes temperaturas: detector a 115°C, inyector a 50°C y la columna a 40°C. El modelo sigmoidal de Gompertz fue utilizado para ajustar la producción de CO₂ de *B. subtilis* y poder calcular su productividad máxima (Tjørve *et al*, 2017).

6.6.2 Determinación de biomasa

La biomasa fue cuantificada mediante la técnica de peso seco. Para ello, se filtró el contenido de cada matraz utilizando membranas de nylon con un tamaño de poro de 0.45 µm, las cuales fueron previamente pesadas y secadas en la estufa por al menos 24 horas. Con el objetivo de garantizar que no queden restos de endosulfan en las membranas, se realizaron lavados con diclorometano. Posteriormente, las membranas fueron sometidas a un proceso adicional de secado a 50°C hasta obtener peso constante. La cantidad de biomasa producida se calculó mediante la diferencia ente los pesos final e inicial de las membranas.

6.7 Cuantificación de endosulfan e identificación de metabolitos

6.7.1 Extracción líquido-líquido

La fase líquida recuperada después de la filtración se sometió a un procedimiento de extracción líquido-líquido, conforme el método *EPA-3510 (US Environmental Protection Agency 1996)*. Para el cual se adicionaron 33 mL de diclorometano, seguido de agitación magnética, durante 10 minutos. Tras este tiempo, las muestras se transfirieron en un embudo de separación en donde se mantuvieron en reposo hasta evidenciar la separación de fases orgánica y acuosa (10-20 min). La fase orgánica fue recuperada mediante filtración utilizando un embudo al que se adecuó un papel filtro que contenía sulfato de sodio anhidro, asegurando así la eliminación de cualquier rastro de humedad, que pudiese interferir con los análisis posteriores. A continuación, el solvente del extracto fue cambiado a hexano por rotoevaporación, (temperaturas de 35°C y 50°C) y su posterior concentración hasta alcanzar un volumen final de 10 mL, de acuerdo con la metodología propuesta por Hernández-Ramos y colaboradores (Hernández-Ramos *et al*, 2019).

6.7.2 Cuantificación de endosulfan e identificación de metabolitos

Los extractos concentrados fueron analizados mediante el método EPA 8270D mediante cromatografía de gases acoplada a un espectro de masas (Agilent 6890 N, MSD 2975B, EE.UU.) con una columna capilar SGE de 5 MS. Las temperaturas inicial y final del horno fueron 90°C y 250°C; la temperatura se aumentó a una velocidad de 5°C/ min, utilizando Helio como gas acarreador. La temperatura del detector e inyector fue de 250°C y 220°C, respectivamente.

Para el análisis de metabolitos, se realizó un método de escaneo de los iones el rango de 50 a 450 z/m a 70 eV. La identificación se realizó comparando los espectros de masas con los contenidos en la biblioteca de espectros de masas NIST05 del año 2005.

6.8 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN se cultivó biomasa de *B. subtilis* en 200 mL de medio LB, se incubó durante 3 días a una temperatura de 30°C y una agitación constante de 150 rpm. Posteriormente, se procedió a realizar la extracción del ADN genómico, empleando el kit de extracción del suelo Presto™, siguiendo rigurosamente las instrucciones del fabricante.

La pureza del ADN extraído se evaluó mediante la medición de la absorbancia utilizando un espectrómetro Nanodrop 2000. Para asegurar la integridad del ADN, se llevó a cabo una prueba de electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% usando 100mL de buffer TBE (Hames 1998).

La secuenciación del genoma completo fue realizada por la empresa Analitek life a través de una corrida de la secuenciación Illumina Miseq v2 Micro “paired ended” en un dispositivo Illumina Miseq con 300 ciclos.

6.9 Análisis de la secuencia

Los siguientes análisis de la secuencia y la manipulación de datos fueron realizados a través de las narrativas de la plataforma Kbase (Arkin *et al*, 2018).

6.9.1 Análisis de calidad de la secuencia de ADN

Se utilizó el software FastQC (FasTQC v0.12.1) para evaluar la calidad y la integridad de los datos generados en la secuenciación del genoma completo de *B. subtilis*.

Posteriormente, se empleó la herramienta Trimmomatic (Trimmomatic v0.36) para llevar a cabo un proceso de filtrado y ajuste de las lecturas (trimming), eliminando secuencias de baja calidad o adaptadores generados a partir de las librerías, que podrían sesgar la información y comprometer la interpretación precisa durante los análisis subsecuentes (Bolger *et al*, 2014).

6.9.2 Ensamble

Dado que las lecturas de ADN se encuentran fraccionadas en secuencias cortas desordenadas, se necesita un proceso de armado para superponerlas y unir las en una sola secuencia. Para ello se emplearon tres herramientas diferentes: IDBA-UD (v1.1.3), SPAdes (v3.15.3), y MEGA HIT (v1.2.9) (Li *et al*, 2015; Peng *et al*, 2012; Prjibelski *et al*, 2020). Los estadísticos N50, N75 y L50 fueron comparados, para la validación de este ensamble (Ismail 2023).

De manera general, el estadístico N50 representa la longitud de la secuencia para la cual el 50% de todas las bases de la secuencia se encuentra en fragmentos o contigs de igual o mayor longitud. El estadístico N75, tiende a ser similar al N50, sin embargo, representa el porcentaje acumulado hasta el 75% de las bases en lugar del 50%. Por otro lado, el estadístico L50, representa el número mínimo de contigs que suman al menos el 50% de todas las bases en el ensamble, lo cual complementa la información proporcionada por N50.

6.9.3 Perfil taxonómico

La relación taxonómica de la secuencia se realizó a partir de la herramienta GOTTCHA2 (v2.1.7). Utilizando la secuencia ya ensamblada como dato de entrada y comparando sus similitudes con la base de datos de referencia (Freitas *et al*, 2015).

6.9.4 Anotación

Para la anotación inicial, los contigs (secuencias unidas a partir de las lecturas obtenidas de la técnica de secuenciación) ensamblados se sometieron a un análisis en el servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (v1.073) (Aziz *et al*, 2008). Además, para una caracterización más detallada de la secuencia, se empleó la herramienta antiSMASH, que permite la identificación rápida, anotación y

análisis de grupos de genes relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios (Blin *et al*, 2023).

6.10 Acoplamiento molecular

Para poder realizar el acoplamiento, se partió de una búsqueda de enzimas con actividad catalítica similar a las encontradas en la ruta de degradación de endosulfan propuesta en la literatura, utilizando la base de datos del KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), dentro del genoma bacteriano de *B. subtilis* que se encontraba depositada en la base de datos del NCBI.

Posteriormente, se empleó la plataforma *Dogsitescorer* para realizar la búsqueda de los aminoácidos que conforman el sitio de unión de las enzimas involucradas.

Para realizar el acoplamiento molecular se utilizó la herramienta *Autodock vina* en la cual se usaron como ligandos la estructura de los metabolitos endosulfan diol, endosulfan éter, endosulfan hidroxiéter y endosulfan lactona. Debido a las variaciones de la posición de inicio que es aleatoria los resultados cambian en cada iteración, por lo que se tomó en cuenta un promedio de 100 procesos.

Los resultados acompañados de una breve descripción y discusión, se muestra en la sección 7. Mientras que la sección 8 ofrece una discusión integral de los resultados alrededor del objetivo general de proponer una ruta de degradación de endosulfan por *B. subtilis*.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Aclimatación de *B. subtilis* a endosulfan

La observación de la turbidez del frasco donde se cultivó a *B. subtilis* demostró que su maquinaria celular se adaptó a crecer en concentraciones de hasta 20 mg/L de endosulfan, en 72 horas.

Este comportamiento, explica que, cuando los microorganismos experimentan exposición ocasional a plaguicidas, se mantienen ciertas características inducibles (O'Keefe *et al*, 1988). Dichas características se activan selectivamente en respuesta a la presencia del plaguicida, facilitando así la expresión del fenotipo adaptativo frente a condiciones ambientales variables (Akbar *et al*, 2015).

Al respecto, se ha observado una inducción fisiológica de la tolerancia de plaguicidas después de una baja exposición a estos y, por el contrario, cuando los microorganismos experimentan una exposición a lo largo de múltiples generaciones, los efectos resultan en un aumento de la tolerancia que, eventualmente se manifiesta de manera constitutiva. Este último desarrollo culmina en una adaptación genética, donde las características que promueven la supervivencia en presencia de endosulfan y se expresan finalmente, resultando en una adaptación genética (Siddique *et al*, 2021).

7.2 Actividad microbiana de *B. subtilis*

Una estrategia implementada para monitorear la degradación de este compuesto es a través de la cuantificación del CO₂ producido a través del tiempo, tal y como se representa en la Figura 6, la actividad de *Bacillus subtilis* durante 792 horas.

Hasta las 300 horas las condiciones del experimento y del control endógeno muestran un comportamiento muy similar. Posteriormente, el experimento inicia la fase exponencial y se alcanza una producción de CO₂ máxima de 12 ± 3.98 mg. Es decir, 0.024 ± 0.007 mg de CO₂ por hora (considerando la fase exponencial del experimento, 505.37 h), en comparación con los 0.078 ± 0.001 mg de CO₂ por hora producidos del control endógeno. Este cambio sugiere una actividad microbiana mayor en el experimento de 5 veces más, evidenciando la capacidad de *Bacillus subtilis* de utilizar endosulfan como fuente de carbono y mineralizarlo.

Los balances de carbono resultaron en una mayor cantidad en la salida (tres veces más que a la entrada) lo cual se puede asociar a la presencia residual de hexano, solvente que se utilizó para la adición inicial de endosulfan. Lo anterior podría deberse a dos posibles escenarios. Por un lado, debido a la utilización de las trazas de hexano remanentes como fuente de carbono secundario (cosustrato). El otro posible escenario, es la utilización del hexano por *B. subtilis* en un proceso de cometabolismo, es decir, la utilización de un sustrato como fuente de energía y de otro como fuente de carbono.

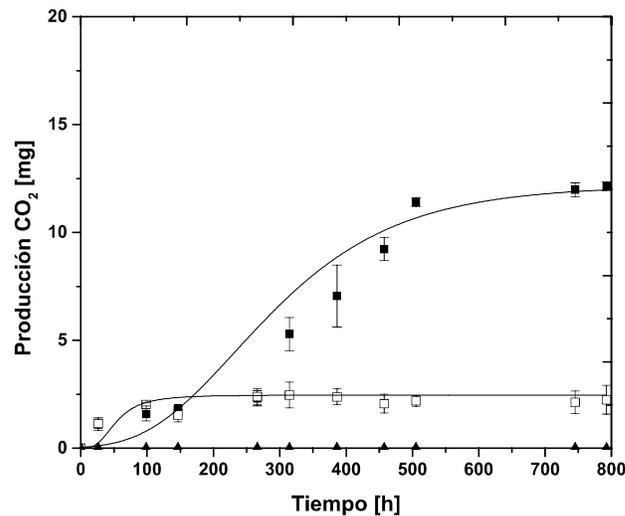


Figura 6. Producción de CO₂ por *B. subtilis*. (▲) control abiótico, (□) control endógeno y (■) experimento. La línea de tendencia corresponde al ajuste de datos usando el modelo de Gompertz: $a=12.154$, $x_c=232.5948$ y $k=0.00748$

7.3 Degradación de endosulfan

La Figura 7 muestra el perfil de degradación de α -endosulfan y β -endosulfan hasta aproximadamente 240 horas, considerando la concentración inicial de 20 mg/L (14 mg/L de α -endosulfan y 6 mg/L de β -endosulfan). La degradación de ambos isómeros aumentó del 3% \pm 0.01 a las 24 horas y hasta el 39.40% \pm 0.56 a las 242 horas.

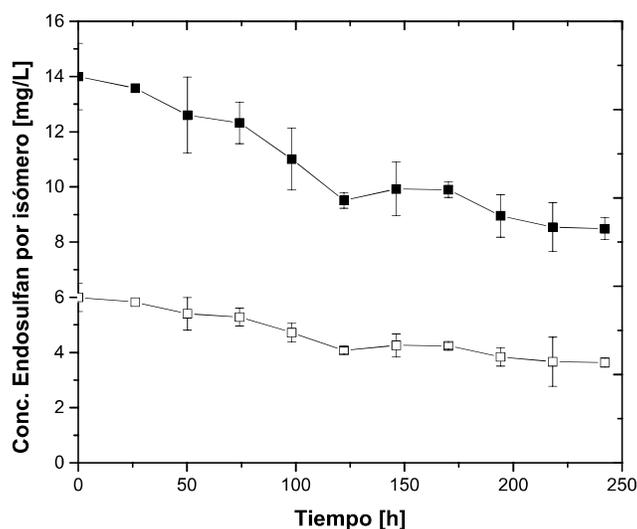


Figura 7. Perfil de degradación de endosulfan hasta las 240 horas. α -endosulfan (■), β -endosulfan (□). Cuantificación final (792 horas) fue de 2.28 mg/L de α -endosulfan y 1.68 mg/L de β -endosulfan

Al final del experimento (792 horas) la degradación de endosulfan fue de 97.60% \pm 1.15 para α -endosulfan y 69.45% \pm 5.75 para β -endosulfan, mostrados en la Tabla 5. Lo cual indica una tasa de degradación de 0.16 mg/L para el isómero α -endosulfan y 0.135 mg/L para el isómero β -endosulfan. Por el contrario, los controles abióticos, mostraron un porcentaje de recuperación de 76.35%, es decir hubo pérdidas de endosulfan de 23.65% que probablemente se originaron debido a la manipulación de los experimentos, o a factores ambientales. Así mismo, fue calculada la tasa específica de degradación referenciadas a la biomasa producida ($\text{mg}_{\text{endo}}/\text{L} / \text{mg}_{\text{biomasa}}$).

Tabla 5 Tasa de degradación y % degradación de endosulfan por la cepa *B. subtilis*

	Isómero α	Isómero β
Tasa de degradación total [mg /L/ día]	0.16 \pm 0.01	0.135 \pm 0.02
% de degradación	97.60 \pm 5.9	69.45 \pm 9.4

En una investigación realizada por Katkar y colaboradores en 2021, se reportaron tasas de degradación de 0.0057 mg/L/día para el isómero α -endosulfan y 0.0035 mg/L/día para isómero β -endosulfan para *B. subtilis*, que utilizó endosulfan como única fuente de carbono. De tal manera que, los resultados obtenidos en este estudio, son significativamente mayores, aproximadamente dos órdenes de magnitud a los reportados por Katkar y colaboradores (Katkar *et al*, 2021). Lo anterior probablemente debido al tipo de medio mineral utilizado en dicho estudio, conocido como BBM o Bold's Basal Medium, medio normalmente utilizado para el cultivo de microalgas y no especializado para el crecimiento bacteriano.

Al comparar este estudio con uno realizado anteriormente utilizando esta misma cepa, se reportó una tasa de degradación de 3.99 mg/L/día para el isómero α -endosulfan, mientras que para el isómero β - endosulfan fue de 1.55 mg/L/día (Casanova *et al*, 2021). Es decir, la capacidad de degradación de la cepa disminuyó en dos órdenes de magnitud lo cual podría estar relacionado con que el tiempo entre un estudio y otro fue de dos años, y las características metabólicas de *B. subtilis* vinculadas con la degradación de endosulfan fueron afectadas, desencadenando una disminución en su eficiencia como agente de remediación. En este sentido, la degradación de compuestos como el endosulfan a menudo implican procesos metabólicos que consumen energía y recursos (Baldwin *et al*, 1981) por lo que, en entornos donde la presencia de este tipo de compuestos no es constante, los microorganismos tienden a perder funciones metabólicas asociadas, siguiendo la regla de “*lo que no se usa se pierde*”, debido a un gasto energético sin fundamento aparente (Hottes *et al*, 2013).

7.4 Determinación de biomasa producida

La cuantificación de biomasa efectiva, es decir la biomasa generada exclusivamente por *B. subtilis* al encontrarse en presencia de endosulfan, se realizó mediante la corrección de la biomasa medida en los experimentos, a la que le fue restada la biomasa producida en los controles endógenos (sin endosulfan como fuente de carbono). La producción de biomasa efectiva de las primeras horas del experimento se observa en la Figura 8, la biomasa inicial fue de 13.66 mg/L y se mantuvo en un rango entre $15 \text{ mg/L} \pm 0.7$ y $15.33 \text{ mg/L} \pm 0.033$.

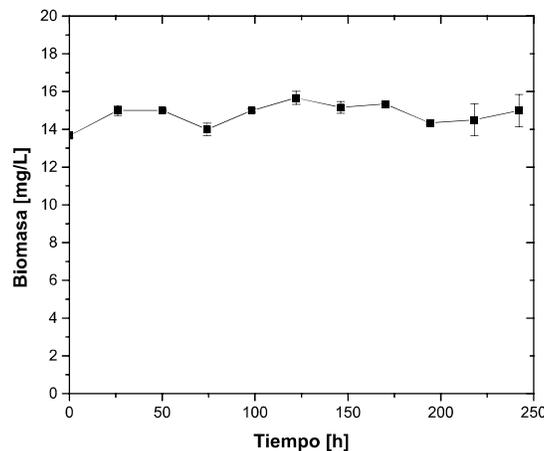


Figura 8. Producción de biomasa efectiva generada hasta las 240 horas

Además, se determinó que la biomasa efectiva producida al final de los experimentos (792 horas) fue de $155 \text{ mg}_{\text{biomasa}}/\text{L}$ en los experimentos y $185 \pm 0.002 \text{ mg}_{\text{biomasa}}/\text{L}$ en controles endógenos. Estos datos indicaron que la biomasa efectiva generada fue de $30.833 \pm 0.001 \text{ mg}/\text{L}$.

Al relacionar dichos datos con la producción de CO_2 , en los controles endógenos, encontramos que *B. subtilis* pudo sobrevivir en el medio, mostrando cierta actividad metabólica. Sin embargo, en ausencia de una fuente de carbono, las células bacterianas mantuvieron un estado de latencia sin experimentar un aumento

significativo en la población. Lo anterior destaca la adaptabilidad de *B. subtilis* y su capacidad para ajustar su metabolismo según la disponibilidad de carbono, contribuyendo así a la degradación de endosulfan, tal y como se ha reportado en otras investigaciones (Casanova *et al*, 2021; Jimenez-Torres *et al*, 2016).

7.5 Identificación de metabolitos

Los productos de degradación identificados a lo largo del experimento se muestran en la Tabla 6. Cabe resaltar que compuestos volátiles como hidrocarburos, cetonas, alcoholes, ésteres, éteres y compuesto aromáticos, no son mostrados aquí ya que no complementan la información de este estudio.

Durante el análisis se logró identificar a *Azuleno, 2,2,3,4,5,6,7- octahidro-1,4 dimetil-7* y *Ácido benzenodicarboxílico bis(2-metilpropil)* se encontraron en los tiempos de retención (TR) de 10.37 minutos y 19.84 minutos, respectivamente.

Azuleno, 2,2,3,4,5,6,7- octahidro-1,4 dimetil-7, con número de registro CAS de 22567-17-5, es un compuesto bioactivo, reconocido como un bioinsecticida. Se ha informado sobre sus síntesis a partir del extracto metanólico de compuestos bioactivos de *Eucalyptus citriodora* y su efectividad contra *Tribolium castaneum*, también conocido como escarabajo rojo (Sahi 2016). El segundo compuesto (*Ácido benzenodicarboxílico bis(2-metilpropil)*), registrado con CAS de 084-69-5, se encuentra reportado como un agente antimicrobiano sintetizado comúnmente por *B. subtilis* (Koilybayeva *et al*, 2023). La identificación de este tipo de compuestos contribuye a la comprensión de los mecanismos de degradación de endosulfan, puesto que podría indicar que estos compuestos son producidos por el microorganismo como una respuesta adaptativa, a condiciones estresantes.

Tabla 6 Productos de degradación identificados en la biotransformación de endosulfan por *B. subtilis*

TR	Compuesto	Formula	#CAS	Calidad
10.37 min	<i>Azulene, 2,2,3,4,5,6,7-octahydro-1,4 dimethyl-7</i>	C ₁₅ H ₂₄	22567-17-5	90%
19.84 min	<i>1,2 Benzenedicarboxylic acid bis (2-methylpropyl) ester</i>	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	084-69-5	90%
20.15 min	<i>4,7-methanoisobenzofuran, 4,5,6,7,8,8-hexachloro-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro (endosulfan ether)</i>	C ₉ H ₆ Cl ₆ O	003,369-52-6	92%
27.32 min	<i>4,7-methanoisobenzofuran-1[3H]-one, 4,5,6,7,8,8-hexachloro-3a,4,7,7a-tetrahydro (endosulfan lactona)</i>	C ₉ H ₄ Cl ₆ O ₂	003,868-61-9	90%
27.35 min	<i>Bicyclo (2.2.1) hept-5-ene ene-2,3-dimethanol, 1,4,5,6,7,7-hexachloro (endosulfan diol)</i>	C ₉ H ₈ Cl ₆ O ₂	002,157-19-9	86%

TR= Tiempo de Retención

Asimismo, se identificaron tres compuestos durante el análisis, que corresponden según su registro CAS a endosulfan éter, endosulfan lactona y endosulfan diol. Dichos compuestos se identificaron con tiempos de retención de 20.15 minutos, 27.32 minutos y 27.35 minutos, respectivamente, y porcentajes de calidad entre 86 % y 92%.

Como se mencionó en el apartado 2.3, endosulfan éter, endosulfan lactona y endosulfan diol se encuentran reportados en la degradación de endosulfan. Puesto que, ninguno de estos metabolitos fue detectado en los controles abióticos, fue posible confirmar la biodegradación del plaguicida por vía hidrolítica. Así mismo, el endosulfan sulfato, metabolito más persistente y recalcitrante que el endosulfan no fue detectado en ninguno de los experimentos o controles, lo que corrobora la preferencia de *B. subtilis* por utilizar la vía hidrolítica de degradación de endosulfan. En la literatura, la formación de endosulfan éter, endosulfan lactona y endosulfan diol se ha reportado por *B. subtilis*. Por ejemplo, en una investigación de Kumar y colaboradores de 2013, se encontró que dicha cepa puede utilizar endosulfan como única fuente de energía y transformarlo a endosulfan diol y endosulfan lactona

(Kumar *et al*, 2014). En otra investigación llevada a cabo recientemente con una cepa de *B. subtilis* aislada de un suelo de cultivo de cítricos, no solo se reporta la formación de estos dos metabolitos, sino también de endosulfan éter (Ahmad 2020). Sin embargo, la formación de endosulfan diol, endosulfan lactona y endosulfan éter también ha sido reportada por otros microorganismos, de manera que, endosulfan éter es producido por cepas como: *Pseudomonas spinosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus pseudomycooides* o *Pseudomonas putida* (Casanova *et al*, 2021; Hussain *et al*, 2007). Aunque, *Pseudomonas putida*, y *Bacillus pseudomycooides*, también se relacionan con la biotransformación a endosulfan diol al igual que, *Achromobacter xyloxidans*, *Ochrobacterum sp.*, y *Burkholderia sp* (Casanova *et al*, 2021; Kumar *et al*, 2008). En este sentido, la formación de endosulfan lactona se ha reportado por microorganismos como *Bordtella sp.* *Pseudomonas sp.* *Alkaligenes faecalis*, *Achromobacter xylosoxidans*, entre otros (Mukherjee *et al*, 2019).

La presencia de una amplia variedad de microorganismos en el suelo y la generación de estos productos de degradación pueden representar la especialización funcional de ellos en la degradación de componentes específicos del endosulfan. Además, estas interacciones pueden ser sinérgicas y cooperativas, en donde la producción de metabolitos por un grupo de microorganismos sirve como sustrato para otros, acelerando la velocidad de biotransformación.

7.6 Extracción de ADN genómico

La concentración final de ADN fue de 176 ng/ μ l. Según las mediciones de absorbancia efectuadas en un espectrofotómetro (nanodrop) que fueron determinadas con una relación de densidad óptica de 1.94 OD_{260nm}/OD_{280nm}, y según la literatura, dicho valor es aceptable ya que valores menores a 1.6 indicarían contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas; por el contrario, valores por encima de 2.1 indican la presencia de ARN en la muestra. En este tipo de análisis es importante contar con una muestra lo más pura posible para no afectar los análisis posteriores (Olson *et al*, 2012).

La electroforesis en gel de poliacrilamida al 0.8% (p/v), se muestra en la Figura 9, dicho análisis permitió la valoración de la integridad de la muestra de ADN. La muestra señalada al número 2 corresponde a la muestra extraída de *B. subtilis*, utilizada en el presente estudio, como se puede apreciar la banda se muestra definida en la parte superior del gel, lo cual indica una buena integridad de la muestra.

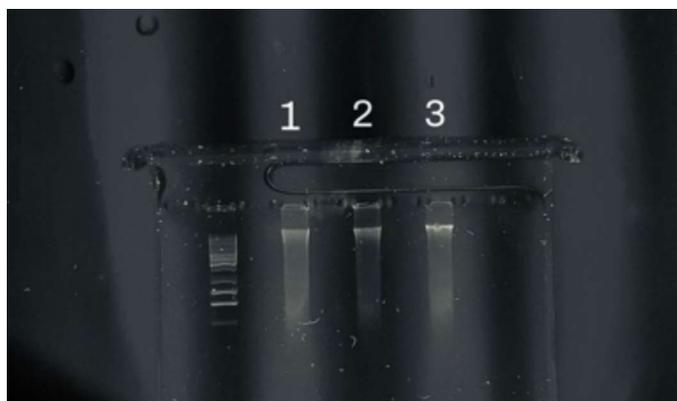


Figura 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 0.8% (p/v). Marcador molecular 10 Kb. Carril 1; concentración de la muestra 195.3 ng/uL, OD1.92nm/OD2.33. Carril 2; concentración de la muestra 176.3 ng/uL, OD1.94nm/OD2.35. Carril 3; concentración de la muestra 176.3 ng/uL, OD1.94nm/OD2.35. Carril 3; concentración de la muestra 109.6 ng/uL OD2.192/OD1.103.

7.7 Análisis de calidad del resultado de la secuenciación

La calidad de la secuenciación se evaluó mediante el análisis estadístico del error intrínseco del proceso de secuenciación, para la cantidad total de información genética secuenciada de 38 Mega pares de bases (Mpb). El procesamiento y evaluación de la calidad de los datos a través de la herramienta FastQC, indicó 256,196 lecturas de alta calidad.

En la Figura 10, se muestra la gráfica de la distribución de las puntuaciones de calidad por secuencia, en la cual una proporción significativa de las lecturas se encuentran con una puntuación de calidad de 35 o más, es decir, poseen una tasa de error baja del 0.03%, indicando que la preparación de la muestra fue la adecuada. Estas puntuaciones generalmente son registradas en la escala Phred, que asigna un valor numérico a la calidad de la llamada base en función de la probabilidad de que se produzca un error (Simons 2010).

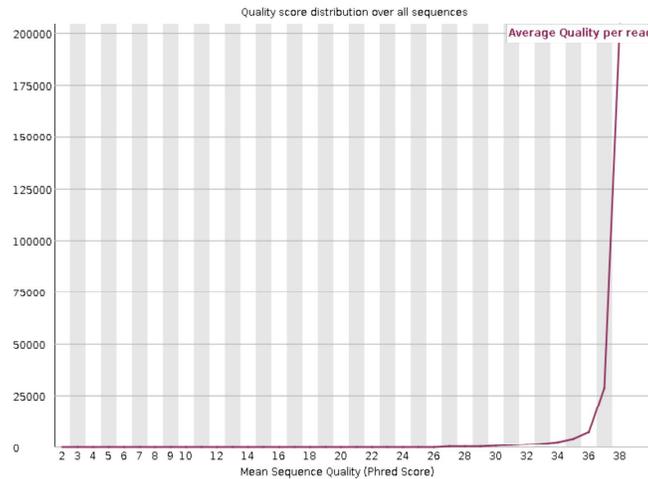


Figura 10. Distribución de la calidad de las secuencias

Además, se mostró que el contenido promedio de G+C (nucleótidos Guanina+Citosina) fue de 43%, el cual se encuentra representado en el pico central de la gráfica de distribución normal de secuencias de la Figura 11, es decir, el número de lecturas frente a la proporción de bases G y C, respecto al total de nucleótidos contenidos en el genoma. Lo anterior es relevante, ya que según la literatura, el apareamiento entre G y C (Guaninas y Citosinas) en las hebras de ADN se encuentra estabilizado por tres enlaces de puentes de hidrógeno, mientras que los apareamientos entre A y T solo contienen dos (Hildebrand *et al*, 2010). Lo cual hace que el enlace sea más fuerte y por lo tanto más resistente a la desnaturalización. Es decir que a medida que aumenta el porcentaje de G+C, mayor será la temperatura necesaria para desnaturalizarlo (Aptekmann 2017). Cabe destacar que esta información también funciona como una especie de huella dactilar del microorganismo, puesto que el porcentaje variará dependiendo de la especie y el género estudiado, en la literatura se reportan porcentajes de G+C entre 43 y 47% para *B. subtilis* (Akashi *et al*, 2013; Yu *et al*, 2012).

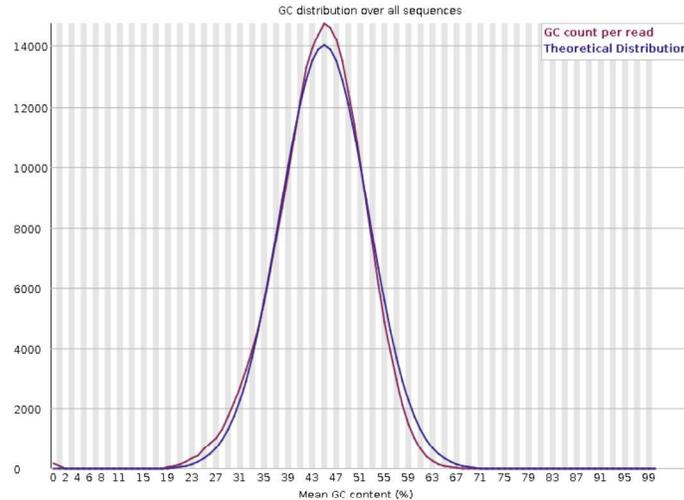


Figura 11. Distribución de GC de las secuencias

En la Figura 12 se muestran dos diagramas de tipo caja y bigote que presentan la distribución de las puntuaciones de calidad de las bases a lo largo de la longitud de la secuencia, tanto antes (Figura 12a), como después (Figura 12b) de utilizar la herramienta Trimmomatic para el filtrado de lecturas con el objetivo de mejorar la calidad general de datos, para llevar a cabo este proceso de limpieza de “lecturas” se fijó el parámetro leading y trailing para recortar bases con una calidad inferior a 3 al principio (extremo 5´) de las lecturas, también se especificó el Slidingwindow en 4:15, donde 4 se refiere al tamaño de la ventana, es decir el número de bases a evaluar en una región específica y que las bases menores a 15, fueron recortadas, por último se descartaron todas las lecturas cuya longitud final fue menor a 36 bases, después de aplicar el filtrado y recorte.

En las gráficas, el eje horizontal abarcó una longitud de 150 pares de bases (pb), lo cual denota la posición de las lecturas. Mientras que las puntuaciones de calidad se muestran en el eje vertical, donde una puntuación más alta indica una mejor calidad (valores Phred) de la base correspondiente.

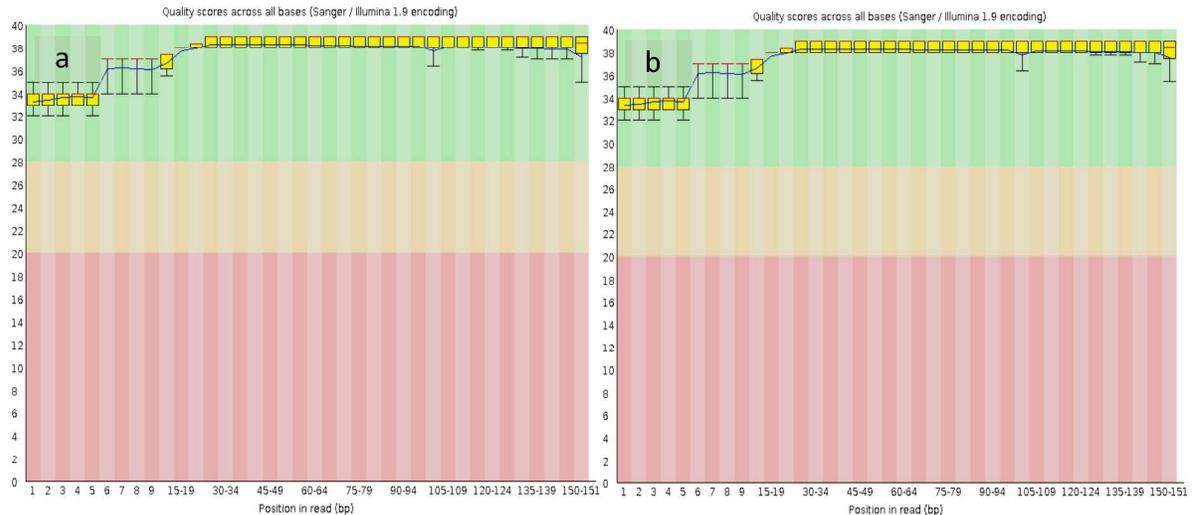


Figura 12. Calidad de la secuencia por pb. Antes (a) y después (b) de utilizar la herramienta *trimmomatic*. Diagrama de tipo caja y bigote. La caja representa el rango intercuartil (25-75%), los bigotes superior e inferior (10% y 90%).

La representación gráfica se divide en tres segmentos de colores distintos: rojo, naranja y verde, siendo este último la región de mayor calidad. En este caso, ambos conjuntos de datos (Figura 12a y Figura 12b) convergieron en la región verde de la gráfica, indicando una calidad satisfactoria, lo cual indica que se realizó una buena extracción y la secuenciación fue de alto rendimiento.

7.7.1 Ensemble

En la Tabla 7 se muestra la información obtenida por los estadísticos de tres herramientas diferentes de ensamblaje IDBA, SPAdes y MegaHIT. Un valor mayor de N50 indica un ensamblaje más preciso, debido a que una proporción significativa de las bases se encuentra contenida en contigs más largos y por lo tanto más completos. Lo mismo sucede con el estadístico N75, sin embargo, para L50 se

buscaron valores más bajos, que indicaron el mínimo de secuencias responsables de la mitad de la longitud total. Al comparar estas herramientas, se seleccionó a SPAdes debido a que respondió mejor a los factores N50, N75 y L50. En relación con el estadístico N50, se alcanzaron valores de hasta 1,027,590 así como también se registró el valor más pequeño de L50, que fue de 2. Estos resultados hacen referencia a una representación completa y detallada de la información genética, lo cual fue necesario para llevar a cabo una anotación funcional precisa

Tabla 7 Ensamble comparando los estadísticos N50, N75 y L50 a partir de tres herramientas diferentes (IDBA, SPAdes y MegaHIT)

Tipo de estadístico	IDBA	SPAdes	MegaHIT
Estadístico N50	348,963	1,027,590	536,950
Estadístico N75	173,824	284,600	285,124
Estadístico L50	5	2	3

7.7.2 Perfil taxonómico

El análisis resultante generado mediante la herramienta GOTTCHA2 permitió identificar la distribución taxonómica de la secuencia a través de un gráfico circular de Krona ilustrado en la Figura 13.

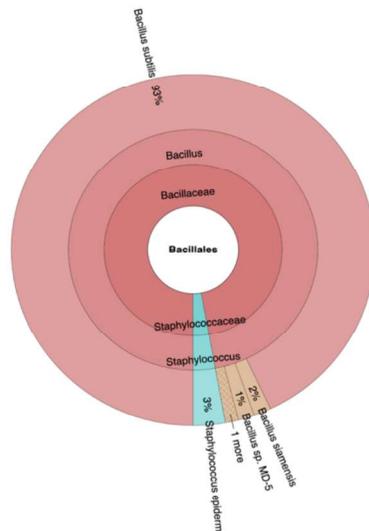


Figura 13 Clasificación taxonómica generada por GOTTCHA2

Este análisis, indicó que el 93% de la secuencia presenta similitud con la base de datos del microorganismo *Bacillus subtilis*. El porcentaje restante se distribuye entre *Bacillus siamensis* (2%), *Bacillus sp. MD-5* (1%), *Staphylococcus epidermidis* (3%). Lo cual pudo haber sucedido debido a que la base de datos no contiene información sobre todas las especies presentes en la muestra, por lo tanto, algunas secuencias pueden no ser asignadas a una categoría específica y son agrupadas bajo la categoría de otros microorganismos. Estos hallazgos respaldaron la identificación de *B. subtilis* como organismo de este estudio.

7.7.3 Anotación

La anotación funcional inicial fue llevada a cabo con la herramienta RAST, mediante la cual se identificó 7892 genes distribuidos en 40 contigs. Entre estos genes destacan algunos de interés, como la Monooxigenasa de Alcanosulfonato dependiente de FMNH₂ (EC 1.14.14.5), Gluconolactonasa (EC 3.1.1.17), Hidrolasa de la familia de plegamiento alfa/beta, Citocromo P450 CypA, y Cloroacetaldehído deshidrogenasa que podrían estar involucradas en la biodegradación de endosulfan debido a su función enzimática.

Como se indicó anteriormente, en la literatura se ha documentado la presencia de una monooxigenasa en *Arthrobacter*. Esta enzima, que depende de la reducción de la flavina, realiza la conversión del endosulfan en endosulfan sulfato. Además, se ha reportado que la bacteria *Mycobacterium sp.* emplea también una monooxigenasa para transformar el endosulfan en endosulfan monoaldehído, utilizando este compuesto como fuente de energía (Sutherland *et al*, 2002; Weir *et al*, 2006). También, se ha reportado la enzima Citocromo P450 utilizada por *B. megaterium* para transformar endosulfan a endosulfan sulfato (Seralathan *et al*, 2014).

En cuanto a la enzima cloro acetaldehído deshidrogenasa se ha reportado en la degradación de 1,2-Dicloroetano (1,2-DCE) por la cepa *Acncylobacter aquaticus*. La presencia de esta enzima en *B. subtilis* podría indicar la capacidad de la cepa de

metabolizar compuestos contengan cloro en su estructura, como es el caso de endosulfan (Kumar *et al*, 2018).

Por otro lado, la enzima Glucolactonasa no se ha reportado previamente para la degradación de compuestos orgánicos, sin embargo, de acuerdo con la función enzimática que desempeña, resulta importante su estudio. La actividad de esta enzima podría ser evaluada mediante análisis transcriptómicos con tecnologías como RNA-seq a través de un análisis de la expresión diferencial de genes de *Bacillus subtilis*.

En la literatura se ha reportado que en condiciones de estrés oxidativo, *Acinetobacter oleivorans*, produce la enzima monooxigenasa de alcanosulfonato durante la degradación de n-hexadecano en un papel de protección (Park *et al*, 2020).

Lo anterior, podría sugerir la posibilidad de que *B. subtilis* emplee a la monooxigenasa de alcanosulfonato como una respuesta adaptativa ante el estrés, por la presencia de endosulfan. Por otro lado, la enzima glucolactonasa de *Penicillium oxacillum* se ha reportado para mitigar la inhibición de la β -glucosidasa durante la biodegradación de lignocelulosa (Peng *et al*, 2017).

En la tabla 8. se muestran los resultados del análisis de anotación funcional del genoma de *B. subtilis*, en donde se identificaron cinco regiones con clústers de genes que mostraron un 100% de similitud. Cuatro de estos clústers se encuentran asociados a la producción de compuestos con propiedades antimicrobianas, a saber: Bacilysin, Subtilosin A, Bacillibactin y Bacillaene. El quinto clúster está relacionado con la biosíntesis de un sideróforo denominado Bacillibactin. Los sideróforos son compuestos quelantes de bajo peso molecular específicos de los iones hierro. Aunque no se encuentran involucrados directamente en la degradación de plaguicidas podrían influir en la capacidad de un microorganismo para degradar dichos compuestos al promover su metabolismo, aún en condiciones de estrés (Řezanka *et al*, 2019).

Tabla 8 Análisis de clústeres de genes de *B. subtilis* por anti-SMASH

Región	Tipo	Localización	Cluster	Similitud
1.2	-	301,361 to 342,779 nt	Bacilysin	100%
1.3	Sactipeptide	349,566 to 371,177 nt	Subtilosin A	100%
1.4	NRP- metallophore	892,857 to 944,634 nt	Bacillibactin	100%
2.2	TransAT-PKS PKS-like T3PKS NRPS	820,963 to 926,249 nt	Bacillaene	100%
2.3	NRPS Betalactone	999,268 to 1,027,590 nt	Fengycin	86%
3.1	NRPS	1 to 22,784 nt	Plipastatin	38%
3.3	T3PKS	164,049 to 205,146 nt	1-Carbapen 2-em-3- carboxylic acid	16%
5.1	NRPS	226,455 to 252,682 nt	Surfactin	43%
6.1	Lanthipeptide-class- i	28,637 to 53,094 nt	Subtilomycin	100%
6.2	NRPS	179,581 to 207,702 nt	Surfactin	43%
12.1	NRPS	1 to 13,052 nt	Plipastatin	23%
13.1	NRPS	1 to 10,027 nt	Plipastatin	23%
14.1	NRPS	1 to 9,166 nt	Surfactin	8%

7.8 Acoplamiento molecular

En el análisis de acoplamiento molecular se identificaron seis enzimas, las cuales poseen función enzimática similar a las reportadas en la literatura, mismas que se presentan en la Tabla 9. Tres de ellas desempeñan función de hidrolasa, mientras que las otras tres exhiben función de oxidoreductasa.

Tabla 9 Identificación de enzimas con función enzimática similar

Enzima	Función enzimática	Identificador	PDB
N-acil homoserina lactona hidrolasa	Hidrolasa	3.1.1.81	3DHA
Cloroacetaldeído:NAD ⁺ oxidoreductasa	Oxidoreductasa	1.1.1.18	3MZ0
Oxigenasa 1,2-oxidoreductasa (desiclizante)	Oxidoreductasa	1.13.14.11	3NJZ
Cloroacetaldeído oxidoreductasa	Oxidoreductasa	1.2.1.3	5UJU
L-Dehidroascorbato lactonohidrolasa	Hidrolasa	3.1.1.7	4D8L
2-pirona-4,6-dicarboxilato lactonohidrolasa	Hidrolasa	3.1.1.57	7RIS

PDB= Protein Data Bank

Estas enzimas fueron sometidas a un análisis de acoplamiento molecular, también conocido como docking molecular, con el objetivo de evaluar su afinidad con los intermediarios metabólicos, asociados en la degradación de endosulfan, tales como: endosulfan diol, endosulfan éter, endosulfan hidroxíeter y endosulfan lactona de acuerdo con lo encontrado en este estudio y a lo reportado en la literatura. Los resultados de este análisis se presentan en las Figuras 14 a 19 de este apartado.

En la sección A de cada Figura se presenta el resultado del analizador del sitio de unión, que proporciona información clave sobre las características estructurales y la topología del entorno de unión específico. Este análisis sirvió como punto de partida esencial para el desarrollo del acoplamiento molecular.

En la sección B, se presenta una representación gráfica de la posición del metabolito dentro de la enzima, lo que brinda un enfoque visual a la interacción molecular. Dicho aspecto es crucial para comprender como es que la enzima se une a los intermediarios metabólicos asociados a la degradación de endosulfan.

Posteriormente, en la sección C, se observa la energía de afinidad del complejo dada en unidades de kcal/ mol. Una energía de afinidad menor indica una

interacción más estable entre la enzima y el metabolito. En esta sección se puede evaluar la fuerza de unión y la estabilidad de la interacción molecular del complejo. Se encontró que cuatro de estas enzimas presentan una afinidad por endosulfan lactona. Las enzimas son las siguientes: Cloroacetaldeído oxidoreductasa (5UJU), 2-pirona-4,6-dicarboxilato lactonohidrolasa (7 RIS), N-acil homoserina lactona hidrolasa (3DHA) y Cloroacetaldeído: NAD⁺ oxidoreductasa 3MZ0.

La identificación inicial de enzimas con funciones de oxidorreductasa sugiere una relación estrecha entre este tipo de actividad enzimática y la afinidad por el metabolito endosulfan lactona. En el análisis la enzima N-acil homoserina lactona hidrolasa (3DHA) demostró mayor afinidad hacia este metabolito (endosulfan lactona), con un valor de -4.9 kcal/mol; la enzima Cloroacetaldeído: NAD⁺ oxidorreductasa (5UJU) registró mayor afinidad al endosulfan hidroxietéer y la enzima oxigenasa 1,2-oxidoreductasa (3NJZ), con una energía de afinidad de -3.7 kcal/mol, hacia el metabolito endosulfan diol.

Los resultados relacionados con la L-Dehidroascorbato lactonohidrolasa (4d8l) no fueron concluyentes, ya que se observó afinidad por dos metabolitos, endosulfan éter (-5.1kcal/mol) y endosulfan lactona (-5.3 kcal/mol). Esto podría indicar que la enzima posee capacidad multifuncional para catalizar múltiples reacciones o interactuar con diversos sustratos. Lo anterior demuestra que esta enzima es capaz de participar en diversas rutas metabólicas o responder a diferentes señales ambientales.

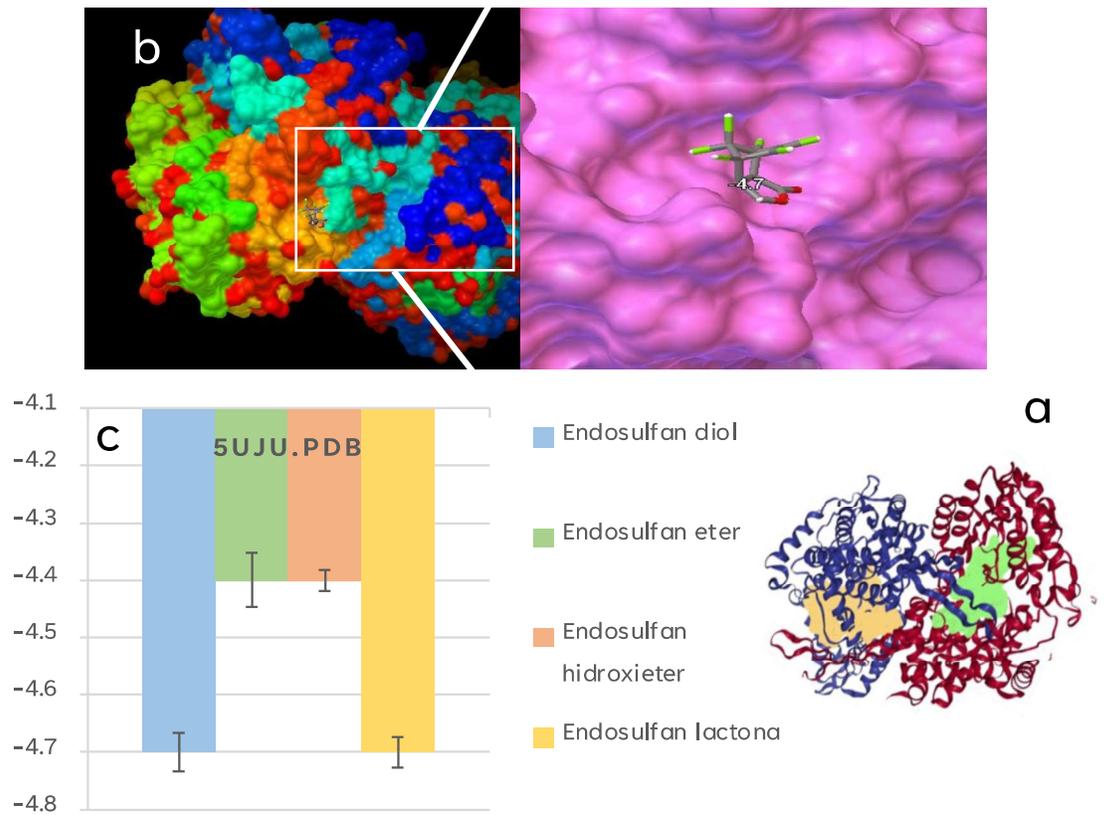


Figura 14. a) Sitio activo de 5uju; b) Docking molecular 5uju; c) Gráfica de energía de afinidad en kcal/mol

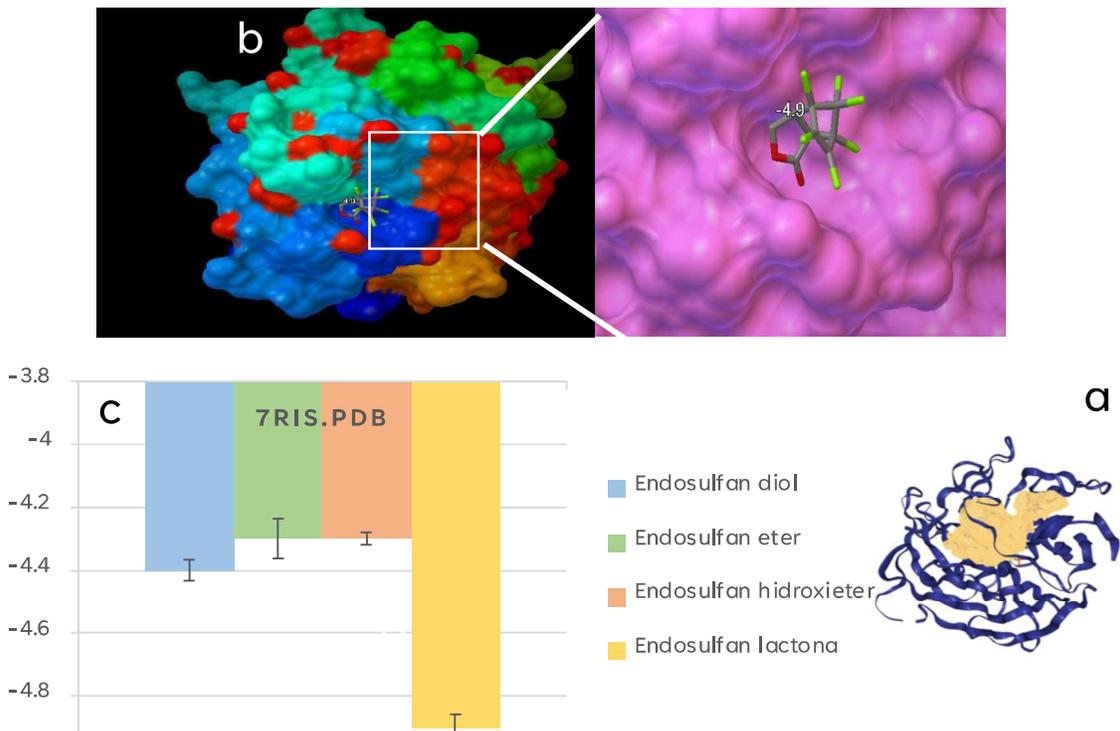


Figura 15. a) Sitio activo de 7ris; b) Docking molecular 7ris; c) Gráfica de energía de afinidad en kcal/mol

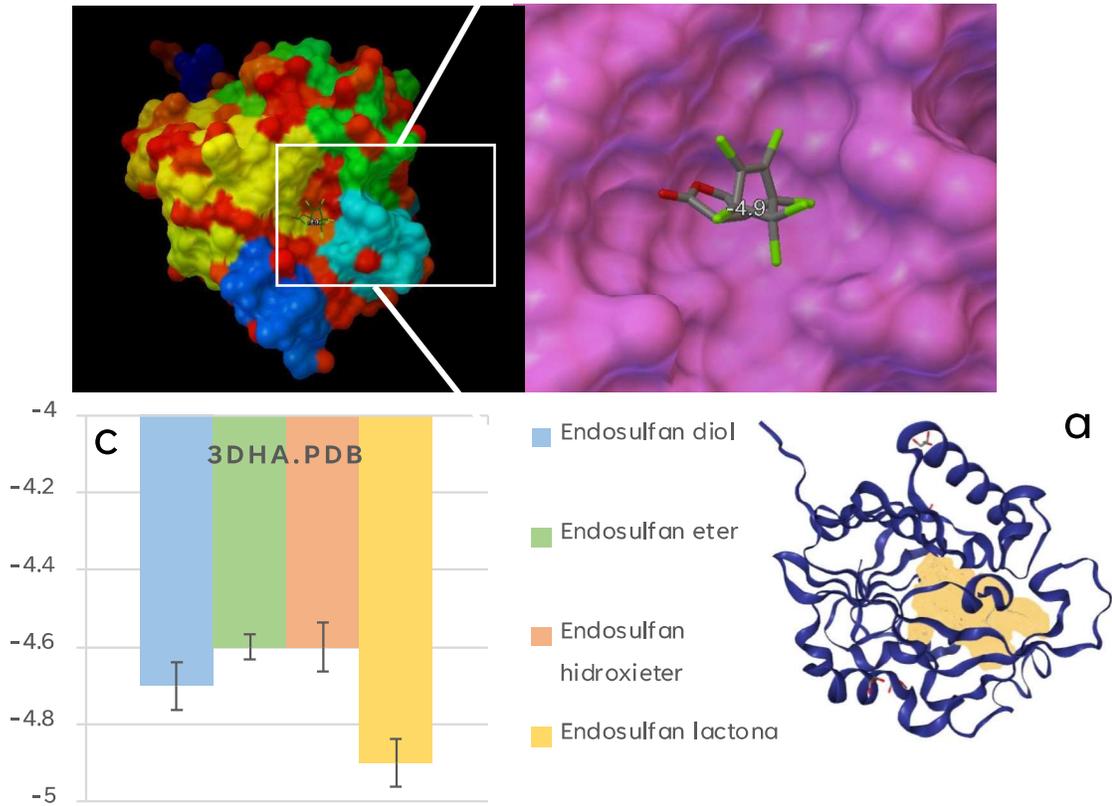


Figura 16. a) Sitio activo de 3dha; b) Docking molecular 3dha; c) Gráfica de energía de afinidad en kcal/mol

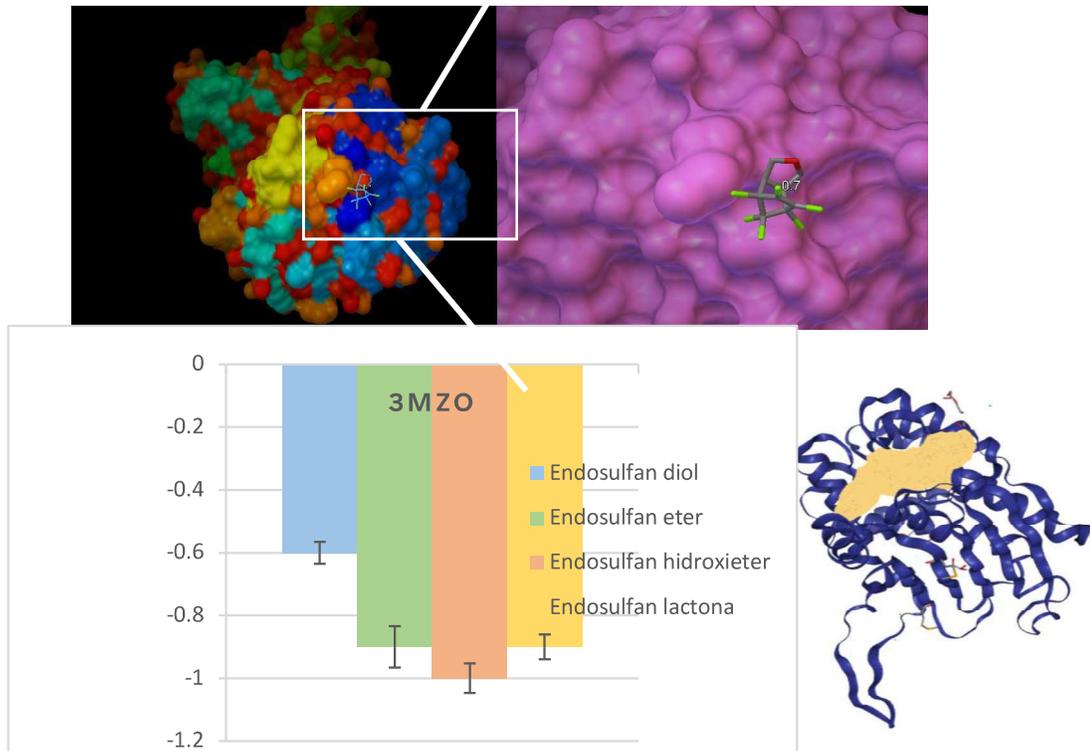


Figura 17. a) Sitio activo de 3mzo; b) Docking molecular 3mzo; c) Gráfica de energía de afinidad en kcal/mol

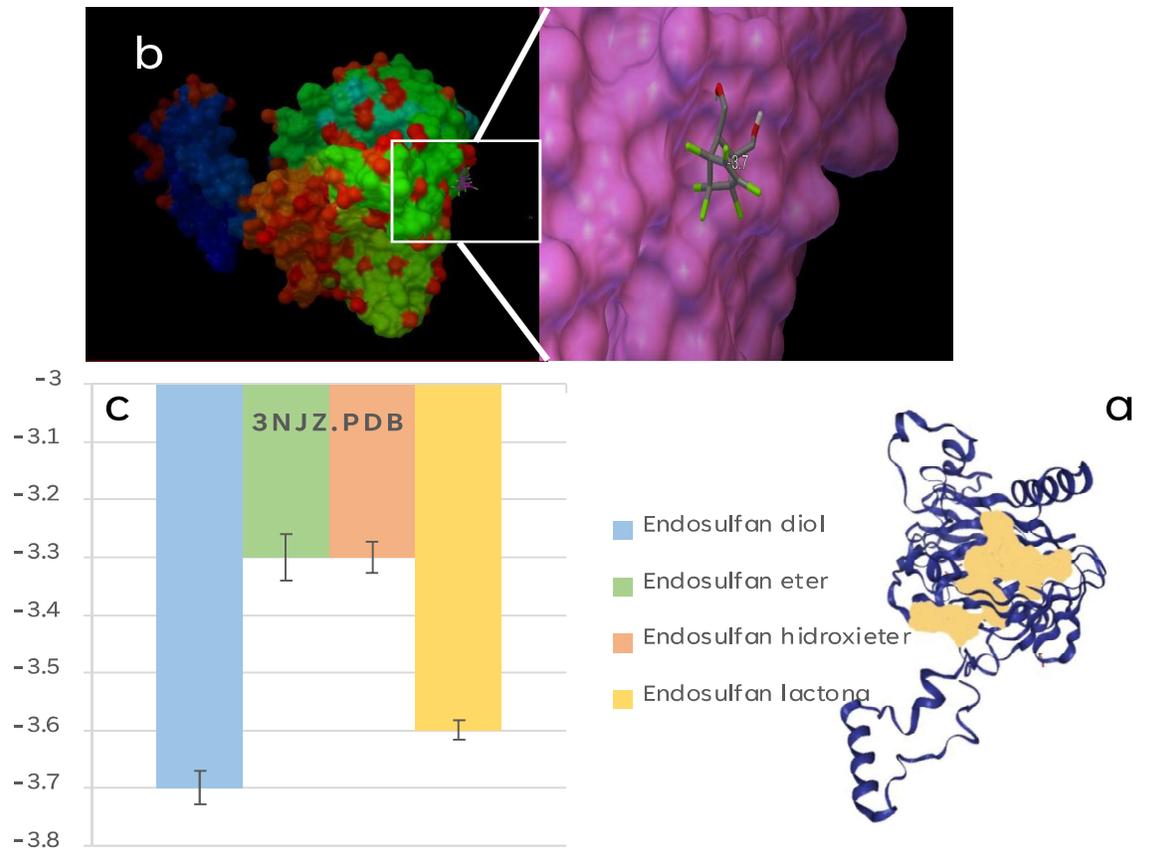


Figura 18. a) Sitio activo de 3njz; b) Docking molecular 3njz; c) Gráfica de energía de afinidad en kcal/mol

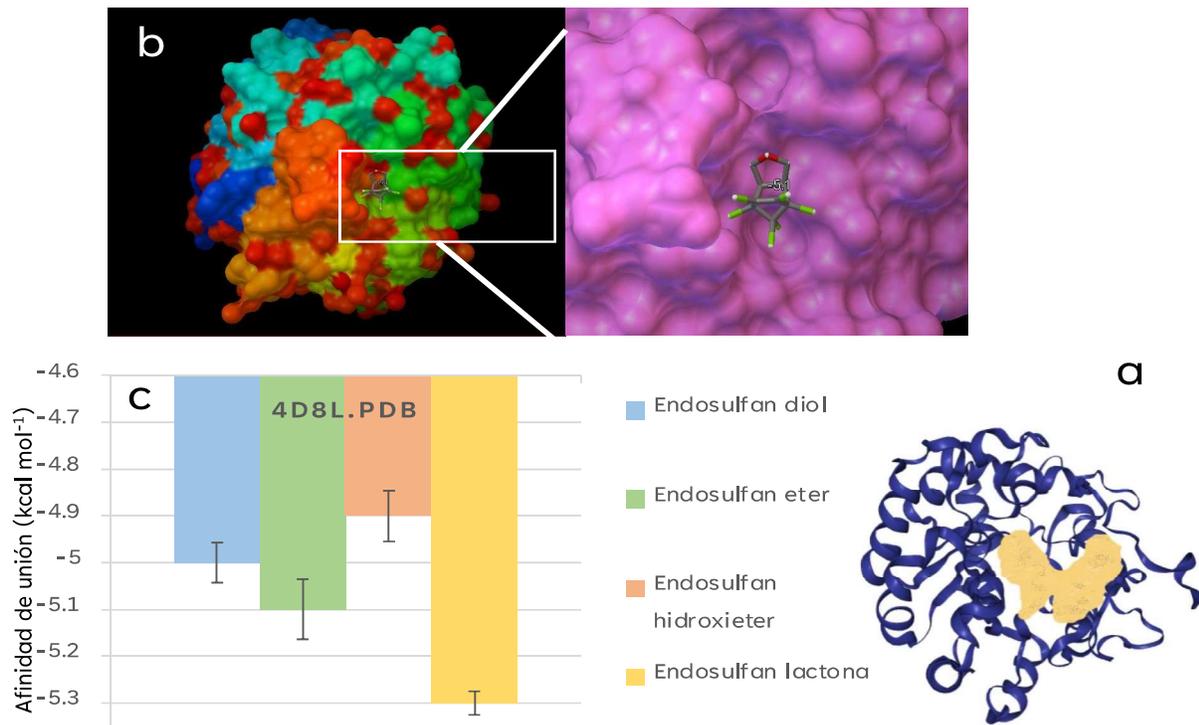


Figura 19. a) Sitio activo de 4d8l; b) Docking molecular 4d8l; c) Gráfica de energía de afinidad en kcal/mol

8. PROPUESTA DE RUTA DE DEGRADACIÓN

A partir de la identificación experimental de los metabolitos; endosulfan éter, endosulfan lactona y endosulfan diol se realizó un análisis *in silico* del acoplamiento molecular entre estos intermediarios de degradación, enzimas identificadas a partir de la secuenciación del genoma, y una nueva búsqueda en la literatura de enzimas que desempeñen mecanismos de acción de interés. A partir de esta información, se propuso la ruta de degradación empleada por *B. subtilis* para biotransformar endosulfan, mostrada en la Figura 20.

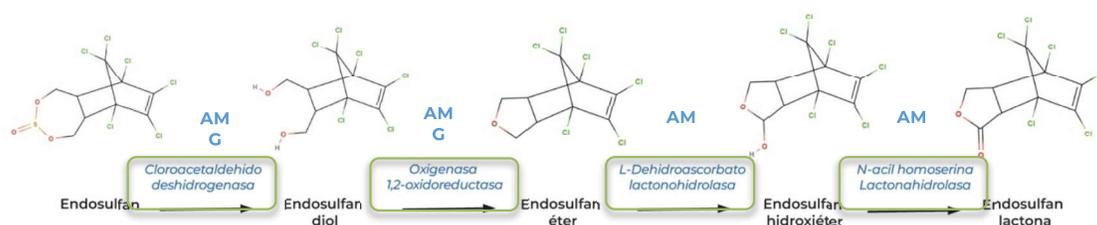


Figura 20. Ruta propuesta utilizada por *B. subtilis* para degradar endosulfan, AM (identificadas a partir del acoplamiento molecular), G (identificadas a partir del genoma)

El proceso de transformación de esta ruta desde endosulfan hasta endosulfan lactona implica una serie de reacciones enzimáticas, las cuales inician con la enzima Cloroacetaldehído deshidrogenasa que cataliza la conversión de endosulfan a endosulfan diol, donde se desencadena la primera etapa de la transformación.

Posteriormente, la enzima Oxigenasa 1,2-oxidoreductasa (desiclizante) realiza la transformación a endosulfan éter. Y a continuación, se involucra la L-Dehidroascorbato lactonohidrolasa que lleva a cabo la formación de endosulfan hidroxietér. Finalmente la última transformación tiene lugar mediante la participación de una lactona hidrolasa de nombre N- acil homoserina Lactonahidrolasa. Esta enzima concluye el proceso al catalizar la conversión de endosulfan hidroxietér a endosulfan lactona, lo cual completa la ruta de degradación que involucra a cuatro de las enzimas identificadas en este estudio.

En la literatura se encuentran rutas de degradación de endosulfan en las que sugieren que el endosulfan diol se forma inicialmente por vía hidrolítica a partir de endosulfan, por acción de una enzima reductora, que realiza función de hidrolasa y

elimina el dióxido de azufre (SO₂). Posteriormente, el endosulfan diol puede experimentar una degradación adicional a endosulfan éter, también por acción de una hidrolasa, al liberar agua. Finalmente es transformado en endosulfan lactona por acción de una deshidrogenasa al liberar dos protones y dos electrones (2H⁺ + 2e⁻). Sin embargo, se ha reportado en otras vías propuestas la presencia de endosulfan hidroxiéter, que puede transformarse a partir de endosulfan éter por acción de una endosulfan éter monooxigenasa, en presencia de oxígeno (O₂). Además, se ha planteado la posibilidad de transformar endosulfan lactona a endosulfan hidrocarboxilato, por acción de una endosulfan lactonasa al liberar un protón (H⁺), para finalmente llegar a la mineralización del compuesto por acción de una enzima con función de deshalogenasa. En este contexto, la ruta seguida para la biotransformación de endosulfan dependerá de la maquinaria celular que posea el microorganismo.

9 CONCLUSIÓN

B. subtilis demostró la capacidad para degradar el 97.60% de α- endosulfan y 69.45% de β- endosulfan partiendo de una concentración inicial de 20 mg/L. En este proceso se identificaron endosulfan éter, endosulfan lactona y endosulfan diol como productos de degradación.

La identificación de las enzimas involucradas en la degradación de endosulfan específicamente por la maquinaria celular de *B. subtilis* se logró mediante la secuenciación y análisis del genoma completo. Además, se evaluaron los complejos enzima-metabolito de acuerdo con su afinidad, y función enzimática. Esto contribuyó a la propuesta de una ruta de degradación de endosulfan por *B. subtilis*. La presente investigación marca el inicio de un análisis exhaustivo sobre las enzimas clave implicadas en la degradación de endosulfan por este microorganismo.

Como perspectivas a esta investigación, se podrían analizar los mecanismos catalíticos enzimáticos, de las enzimas descritas en este estudio, mediante la adición de una coenzima y midiendo los cambios en la concentración de sustratos o productos durante la reacción. Así mismo, se incluye la posibilidad de realizar los experimentos de biodegradación de endosulfan incorporando su marcaje isotópico (^{14}C), que permitiría rastrear la movilidad de los átomos de carbono en la muestra, ofreciendo una visión más precisa de los procesos de degradación. Además, son necesarias pruebas cuantitativas de los metabolitos, para determinar las concentraciones, así como también se proponen análisis fisiológicos y transcriptómicos de *Bacillus subtilis* para caracterizar la expresión diferencial de genes en respuesta a la presencia de endosulfan y entender mejor los mecanismos de biotransformación utilizados hasta alcanzar la mineralización del compuesto. Comprender el mecanismo por el cual los microorganismos metabolizan el endosulfan, permitiría conducir al desarrollo de estrategias de biorremediación más eficientes, incluyendo la aplicación de biología de sistemas como la genómica, transcriptómica y metabolómica para la construcción de un consorcio microbiano sintético para mejorar su capacidad de biorremediación.

10 REFERENCIAS

- Ahmad KS (2020) Remedial potential of bacterial and fungal strains (*Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium chrysogenum*) against organochlorine insecticide Endosulfan. *Folia Microbiol* 65:801-810. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00792-7>
- Akashi M, Yoshikawa H (2013) Relevance of GC content to the conservation of DNA polymerase III/mismatch repair system in Gram-positive bacteria. *Frontiers in Microbiology* 4:266.
- Akbar S, Sultan S, Kertesz M (2015) Determination of cypermethrin degradation potential of soil bacteria along with plant growth-promoting characteristics. *Current microbiology* 70:75-84.
- Alarcón R, Varayoud J, Luque EH, Milesi MM (2019) Effect of neonatal exposure to endosulfan on myometrial adaptation during early pregnancy and labor in rats. *Molecular and cellular endocrinology* 491:110435.
- Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58:737-747.
- Aptekmann AA (2017) Análisis evolutivo de la interacción proteína-ADN. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
- Arkin AP et al. (2018) KBase: the United States department of energy systems biology knowledgebase. *Nature biotechnology* 36:566-569.
- Arora PK (2019) Microbial metabolism of xenobiotic compounds. vol 10. Springer,
- Atenodoro Js (2017) Diagnóstico nacional del uso de nuevos Contaminantes Orgánicos persistentes (COP) en México. <http://www.gob.mx/inecc>
- ATSDR (2015) Toxicological profile for endosulfan. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Ga, USA.
- Aziz RK et al. (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics* 9:1-15.
- Bajaj A, Pathak A, Mudiam MR, Mayilraj S, Manickam N (2010) Isolation and characterization of a *Pseudomonas sp.* strain IITR01 capable of degrading a -endosulfan and endosulfan sulfate. 2135-2143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04845.x>
- Baldwin JE, Krebs H (1981) The evolution of metabolic cycles. *Nature* 291:381-382.
- Basak B, Dey A (2016) Bioremediation approaches for recalcitrant pollutants: Potentiality, successes and limitation. In *Toxicity and waste management using bioremediation*. IGI Global, pp 178-197
- Bejarano González F et al. (2008) El endosulfán y sus alternativas en América Latina. https://ipen.org/sites/default/files/documents/ipen_alt_endosulfan_latino-es.pdf
- Bhalerao TS (2012) Bioremediation of endosulfan-contaminated soil by using bioaugmentation treatment of fungal inoculant *Aspergillus niger*. *Turkish Journal of Biology* 36:561-567. <https://doi.org/10.3906/biy-1112-44>
- Bhandari S et al. (2021) Microbial enzymes used in bioremediation. *Journal of Chemistry* 2021:1-17.

- Bhatt P, Bhatt K, Sharma A, Zhang W, Mishra S, Chen S (2021) Biotechnological basis of microbial consortia for the removal of pesticides from the environment. *Critical Reviews in Biotechnology* 41:317-338.
- Bhattacharjee K, Banerjee S, Bawitlung L, Krishnappa D, Joshi S (2014) A study on parameters optimization for degradation of endosulfan by bacterial consortia isolated from contaminated soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 84:657-667.
- Blin K et al. (2023) antiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic acids research*:gkad344.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114-2120.
- Bose S, Kumar PS, Vo D-VN, Rajamohan N, Saravanan R (2021) Microbial degradation of recalcitrant pesticides: a review. *Environmental Chemistry Letters* 19:3209-3228.
- Bouakkadia A, Driouche Y, Kertiou N, Messadi D (2020) Modeling of the henry constant of a series of pesticides: Quantitative structure-property relationship approach. *Journal homepage: <http://ieta.org/journals/ijssse>* 10:389-396.
- Cabrera SM (2020) Evaluación de estrategias para la biorremediación de suelos hortícolas bonaerenses impactados con endosulfán y clorpirifos. Universidad de Buenos Aires
- Calderón M (2017) Diferentes estrategias para minimizar la contaminación por plaguicidas de aguas superficiales y subterráneas en zonas olivareras.
- Carpi A (2011) Progress in molecular and environmental bioengineering: from analysis and modeling to technology applications. *BoD—Books on Demand*,
- Casanova A, Cabrera S, Díaz-Ruiz G, Hernández S, Wachter C, Zubillaga M, Ortiz I (2021) Evaluation of endosulfan degradation capacity by six pure strains isolated from a horticulture soil. *Folia Microbiologica*:1-9.
- Castrejón-Godínez ML, Rodríguez A, Sánchez-Salinas E, Mussali-Galante P, Tovar-Sánchez E, Ortiz-Hernández ML (2022) Soils Contaminated with Persistent Organic Pollutants (POPs): Current Situations, Management, and Bioremediation Techniques: A Mexican Case Study. In *Pesticides Bioremediation*. Springer, pp 413-453
- CICOPLAFEST (2004) Catálogo Oficial de Plaguicidas. Fertilizantes y Sustancias Tóxicas
- Cumming H, Rücker C (2017) Octanol–water partition coefficient measurement by a simple ¹H NMR method. *ACS omega* 2:6244-6249.
- Devine GJ, Eza D, Ogusuku E, Furlong MJ (2008) Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista peruana de medicina experimental y Salud Pública* 25:74-100.
- Devlin TM (2019) *Bioquímica con aplicaciones clínicas (Obra completa): Libro de texto con aplicaciones clínicas*. Reverté,
- Dhankhar P, Dalal V, Mahto JK, Gurjar BR, Tomar S, Sharma AK, Kumar P (2020) Characterization of dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus subtilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 693:108590.
- Díaz E (2004) Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility.

- Díaz-Vallejo J, Barraza-Villarreal A, Yáñez-Estrada L, Hernández-Cadena L (2021) Plaguicidas en alimentos: riesgo a la salud y marco regulatorio en Veracruz, México. *salud pública de México* 63:486-497.
- Donato MT (2004) ¿ Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona? Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia
- Persistent Organic Pollutants: A Global Issue, A Global Response (2009) United States Environmental Protection Agency.
- FAO-FAOSTAT (2019) Estadísticas nacionales e internacionales de producción, comercialización y valor de la miel en el periodo 2010-2019. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación,
- FAOSTAT (2023) Pesticide use Food and Agriculture Organization, <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>
- Freitas TAK, Li P-E, Scholz MB, Chain PS (2015) Accurate read-based metagenome characterization using a hierarchical suite of unique signatures. *Nucleic acids research* 43:e69-e69.
- García-Hernández J, Leyva-Morales JB, Bastidas-Bastidas PdJ, Leyva-García GN, Valdez-Torres JB, Aguilar-Zarate G, Betancourt-Lozano M (2021) A comparison of pesticide residues in soils from two highly technified agricultural valleys in northwestern Mexico. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 56:548-565.
- González FB et al. (2009) El endosulfán y sus alternativas en América Latina. RAP-AL, Chile https://rap-al.org/articulos_files/Alternativas_12_Julio.pdf
- González-León Y, Ortega-Bernal J, Anducho-Reyes MA, Mercado-Flores Y (2023) *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 25:1-14.
- Guerrero Ramírez JR, Ibarra Muñoz LA, Balagurusamy N, Frías Ramírez JE, Alfaro Hernández L, Carrillo Campos J (2023) Microbiology and Biochemistry of Pesticides Biodegradation. *International Journal of Molecular Sciences* 24:15969.
- Hames BD (1998) Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. vol 197. OUP Oxford,
- Harwood CR, Pohl S, Smith W, Wipat A (2013) *Bacillus subtilis*: model Gram-positive synthetic biology chassis. In *Methods in microbiology*, vol 40. Elsevier, pp 87-117
- Hashem A, Tabassum B, Abd_Allah EF (2019) *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi journal of biological sciences* 26:1291-1297.
- Hernández JAR, Chávez AA, Rivera MGM, Fabila MMG (2018) Métodos cromatográficos para la determinación de Endosulfán En Alimentos. *Revista internacional de contaminación ambiental* 34:81-94.
- Hernández-Ramos AC, Hernández S, Ortíz I (2019) Study on endosulfan-degrading capability of *Paecilomyces variotii*, *Paecilomyces lilacinus* and *Sphingobacterium sp.* in liquid cultures. *Bioremediation J* 23:251-258. <https://doi.org/10.1080/10889868.2019.1671794>
- Hildebrand F, Meyer A, Eyre-Walker A (2010) Evidence of selection upon genomic GC-content in bacteria. *PLoS genetics* 6:e1001107.
- Hottes AK, Freddolino PL, Khare A, Donnell ZN, Liu JC, Tavazoie S (2013) Bacterial adaptation through loss of function. *PLoS genetics* 9:e1003617.

- Annotation Record for ENDOSULFAN (2023) National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Hussain S, Arshad M, Saleem M, Khalid A (2007) Biodegradation of α - and β -endosulfan by soil bacteria. *Biodegradation* 18:731-740. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9102-1>
- Ishag ASA, Abdelbagi AO, Hammad AMA, Elsheikh EAE, Elsaid OE, Hur JH (2017) Biodegradation of endosulfan and pendimethalin by three strains of bacteria isolated from pesticides-polluted soils in the Sudan. *Appl Biol Chem* 60:287-297. <https://doi.org/10.1007/s13765-017-0281-0>
- Ismail HD (2023) *Bioinformatics: A Practical Guide to Next Generation Sequencing Data Analysis*. CRC Press,
- Janssen M (2011) *Endosulfan: A closer look at the arguments against a worldwide phase out*.
- Jáquez-Matas SV (2013) Comportamiento de plaguicidas persistentes en el medio ambiente.
- Jimenez-Torres C, Ortiz I, San-Martin P, Hernandez-Herrera RI (2016) Biodegradation of malathion, α - and β -endosulfan by bacterial strains isolated from agricultural soil in Veracruz, Mexico. *J Environ Sci Health Part B* 51:853-859. <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1211906>
- Jones KC (2021) Persistent organic pollutants (POPs) and related chemicals in the global environment: some personal reflections. *Environmental Science & Technology* 55:9400-9412.
- Joutey NT, Bahafid W, Sayel H, El Ghachtouli N (2013) Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. *Biodegradation-life of science* 1:289-320.
- Kafilzadeh F, Ebrahimnezhad M, Tahery Y (2015) Isolation and identification of endosulfan-degrading bacteria and evaluation of their bioremediation in Kor River, Iran. *Osong public health and research perspectives* 6:39-46.
- Karigar CS, Rao SS (2011) Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme research* 2011
- Kataoka R, Takagi K (2013) Biodegradability and biodegradation pathways of endosulfan and endosulfan sulfate. *Appl Biol Chem* 97:3285-3292. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4774-4>
- Katkar P, Gargelwar A, Wankhede C, Sheikh S (2021) STUDY OF POTENTIAL ACTIVITY OF SOIL ISOLATED STRAIN OF BACILLUS SUBTILIS IN DEGRADING ORGANOPHOSPHATE PESTICIDE ENDOSULFAN. *Journal of Advanced Scientific Research* 2021:69-74.
- Katsuyama C, Nakaoka S, Takeuchi Y, Tago K, Hayatsu M, Kato K (2009) Complementary cooperation between two syntrophic bacteria in pesticide degradation. *Journal of Theoretical Biology* 256:644-654.
- Katyal A, Morrison RD (2007) Forensic applications of contaminant transport models in the subsurface. In *Introduction to Environmental forensics*. Elsevier, pp 513-575
- Keshavarz MH, Rezaei M, Hosseini SH (2022) A simple approach for prediction of Henry's law constant of pesticides, solvents, aromatic hydrocarbons, and persistent pollutants without using complex computer codes and descriptors. *Process Safety and Environmental Protection* 162:867-877.

- Koilybayeva M et al. (2023) Molecular Characterization of Some *Bacillus* Species from Vegetables and Evaluation of Their Antimicrobial and Antibiotic Potency. *Molecules* 28:3210.
- Kuddus M (2018) *Bioremediation: Advances in Research and Applications*. Recent Trends in Biotechnology Ser. Nova science publishers, **New York**
- Kullman SW, Matsumura F (1996) Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan. *App Environ Microbiol* 62:593-600. <https://doi.org/10.1128/AEM.62.2.593-600.1996>
- Kumar A, Bhoot N, Soni I, John PJ (2014) Isolation and characterization of a *Bacillus subtilis* strain that degrades endosulfan and endosulfan sulfate. *3 Biotech* 4:467-475. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0176-7>
- Kumar A, Khan FI, Olaniran AO (2018) Chloroacetaldehyde dehydrogenase from *Ancylobacter aquaticus* UV5: Cloning, expression, characterization and molecular modeling. *International journal of biological macromolecules* 114:1117-1126.
- Kumar ADD, Jayakumar C (2019) From precautionary principle to nationwide ban on endosulfan in India. *Business and Human Rights Journal* 4:343-349.
- Kumar W, Lakshmi CV, Khanna S (2008) Biodegradation and bioremediation of endosulfan contaminated soil. *Bioresource Technology* 99:3116-3122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.057>
- Kumari K (2021) *Persistent Organic Pollutants: Gaps in Management and Associated Challenges*. CRC Press,
- Landeros CR, Díaz CEB, Bilyeu B (2018) Dissemination of Endosulfan into the Environment. In *Persistent Organic Pollutants*. IntechOpen,
- Lee S-E, Kim J-S, Kennedy IR, Park J-W, Kwon G-S, Koh S-C, Kim J-E (2003) Biotransformation of an organochlorine insecticide, endosulfan, by *Anabaena* species. *J Agric Food Chem* 51:1336-1340. <https://doi.org/doi.org/10.1021/jf0257289>
- Lema II (2011) Diagnóstico de la situación del endosulfán en México. Dirección General de Investigación sobre la Contaminación Urbana y Regional:3-19.
- Li D, Liu C-M, Luo R, Sadakane K, Lam T-W (2015) MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31:1674-1676.
- Li W, Dai Y, Xue B, Li Y, Peng X, Zhang J, Yan Y (2009) Biodegradation and detoxification of endosulfan in aqueous medium and soil by *Achromobacter xylosoxidans* strain CS5. *J Hazardous Materials* 167:209-216. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.111>
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR (2007) Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52:231-253.
- Liu J, Xue J, Wei X, Su H, Xu R (2020) Optimization of Cr 6+ removal by *Bacillus subtilis* strain SZMC 6179J from chromium-containing soil. *Indian journal of microbiology* 60:430-435.
- Losick RM (2020) *Bacillus subtilis*: a bacterium for all seasons. *Current Biology* 30:R1146-R1150.
- Lu Y, Morimoto K, Takeshita T, Takeuchi T, Saito T (2000) Genotoxic effects of alpha-endosulfan and beta-endosulfan on human HepG2 cells. *Environmental Health Perspectives* 108:559-561.

- Mansour MA, Blumenberg M (2021) Oxidoreductase. BoD—Books on Demand,
- Manubolu M, Goodla L, Pathakoti K, Malmjöf K (2018) Enzymes as direct decontaminating agents—mycotoxins. In *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. Elsevier, pp 313-330
- Menezes RG et al. (2017) Endosulfan poisoning: An overview. *Journal of forensic and legal medicine* 51:27-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.07.008>
- Milesi MM, Durando M, Lorenz V, Gastiazoro MP, Varayoud J (2020) Postnatal exposure to endosulfan affects uterine development and fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology* 511:110855.
- Mudhoo A, Bhatnagar A, Rantalankila M, Srivastava V, Sillanpää M (2019) Endosulfan removal through bioremediation, photocatalytic degradation, adsorption and membrane separation processes: a review. *Chemical Engineering Journal* 360:912-928.
- Mukherjee A, Singh K, Das S (2019) Biodegradation and detoxification of chlorinated pesticide endosulfan by soil microbes. *Endosulfan: Uses, Toxicological Profile and Regulation* Nova science publishers, USA:247-274.
- Navarrete-rodríguez G, Landeros-Sánchez C, Soto-Estrada A (2016) Endosulfan : Its Isomers and Metabolites in Commercially Aquatic Organisms from the Gulf of Mexico and the Caribbean. *J Agric Sci* 8 <https://doi.org/10.5539/jas.v8n1p8>
- O'Keefe DP, Romesser JA, Leto KJ (1988) Identification of constitutive and herbicide inducible cytochromes P-450 in *Streptomyces griseolus*. *Archives of microbiology* 149:406-412.
- Odukkathil G, Vasudevan N (2013) Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil. *Rev Environ Sci Bio-Technol* 12:421-444.
- Olson ND, Morrow JB (2012) DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC research notes* 5:1-14.
- Ortiz-Hernández ML, Sanchez-Salinas E, Godínez MLC, González ED, Ursino ECP (2013) Mechanisms and strategies for pesticide biodegradation: opportunity for waste, soils and water cleaning. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29:85-104.
- Ortiz-Hernández ML, Sánchez-Salinas E, Olvera-Velona A, Folch-Mallol JL (2011) Pesticides in the environment: impacts and their biodegradation as a strategy for residues treatment.
- Ozidal M, Ozidal OG, Algur OF (2016) Isolation and Characterization of α -Endosulfan Degrading Bacteria from the Microflora of Cockroaches. *Pol J Microbiol* 65:63-68. <https://doi.org/10.5604/17331331.1197325>
- Pankaj R, Anita S, Pardeep S, Hosseini-Bandegharaei A, Gupta VK, Shilpi A (2019) Silver-mediated Bi₂O₃ and graphitic carbon nitride nanocomposite as all solid state Z scheme photocatalyst for imidacloprid pesticide abatement from water. *Desalination and water treatment* 171:344-355.
- Park C, Shin B, Park W (2020) Protective role of bacterial alkanesulfonate monooxygenase under oxidative stress. *Applied and environmental microbiology* 86:e00692-00620.
- Parveen S et al. (2020) Synthesis, characterization and photocatalytic performance of iron molybdate (Fe₂ (MoO₄)₃) for the degradation of endosulfan pesticide. *Materials Research Express* 7:035016.

- Peng S, Cao Q, Qin Y, Li X, Liu G, Qu Y (2017) An aldonolactonase AltA from *Penicillium oxalicum* mitigates the inhibition of β -glucosidase during lignocellulose biodegradation. *Applied microbiology and biotechnology* 101:3627-3636.
- Peng Y, Leung HC, Yiu S-M, Chin FY (2012) IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics* 28:1420-1428.
- Polanco Rodríguez AG, Magaña Castro TV, Cetz Luit J, Quintal López R (2019) Uso de agroquímicos cancerígenos en la región agrícola de Yucatán, México. *Centro Agrícola* 46:72-83.
- Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A (2020) Using SPAdes de novo assembler. *Current protocols in bioinformatics* 70:e102.
- Purnomo AS, Rizqi HD, Rafi LH (2020) Culture of bacterium *Bacillus subtilis* as degradation agent for sea water remediation contaminated by petroleum. *J Idn Chem Soc* 3:53-58.
- Ramírez J, Lacasaña M (2001) Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor* 4:67-75.
- Rand GM, Carriger JF, Gardinali PR, Castro J (2010) Endosulfan and its metabolite, endosulfan sulfate, in freshwater ecosystems of South Florida: a probabilistic aquatic ecological risk assessment. *Ecotoxicology* 19:879-900.
- Řezanka T, Palyzová A, Faltýšková H, Sigler K (2019) Siderophores: amazing metabolites of microorganisms. *Studies in natural products chemistry* 60:157-188.
- Rocco D et al. (2023) *Bacillus subtilis* as an effective tool for bioremediation of lead, copper and cadmium in water.
- Sahi NM (2016) Evaluation of insecticidal activity of bioactive compounds from *Eucalyptus citriodora* against *Tribolium castaneum*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 8:1256-1270.
- Saiyed H et al. (2003) Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environmental Health Perspectives* 111:1958-1962.
- Sakthivel S, Dhanapal AR, Palaniswamy R, Dhandapani S, Kathiravan MN (2022) Biodegradation of Endosulfan—a Chlorinated Cyclodiene Pesticide by Indigenous *Pseudomonas* sp. MSCAS BT01. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 194:2747-2761.
- Sales da Silva IG, Gomes de Almeida FC, Padilha da Rocha e Silva NM, Casazza AA, Converti A, Asfora Sarubbo L (2020) Soil bioremediation: Overview of technologies and trends. *Energies* 13:4664.
- Sathishkumar P, Mohan K, Ganesan AR, Govarthanan M, Yusoff ARM, Gu FL (2021) Persistence, toxicological effect and ecological issues of endosulfan—a review. *Journal of hazardous Materials* 416:125779. <https://doi.org/https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.jhazmat.2021.125779>
- Seralathan MV, Sivanesan S, Bafana A, Kashyap SM, Patrizio A, Krishnamurthi K, Chakrabarti T (2014) Cytochrome P450 BM3 of *Bacillus megaterium* - A possible endosulfan biotransforming gene. *J Environ Sci* 26:2307-2314. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.09.016>

- Sethunathan N, Megharaj M, Chen Z, Williams BD, Lewis G, Naidu R (2004) Algal degradation of a known endocrine disrupting insecticide, α -endosulfan, and its metabolite, endosulfan sulfate, in liquid medium and soil. *Journal of agricultural and food chemistry* 52:3030-3035.
- Sharma I (2020) Bioremediation techniques for polluted environment: concept, advantages, limitations, and prospects. In *Trace metals in the environment-new approaches and recent advances*. IntechOpen,
- Shukla E, Bendre AD, Gaikwad SM (2022) Hydrolases: The Most Diverse Class of Enzymes. In *Hydrolases*. IntechOpen London,
- Siddique A, Shahid N, Liess M (2021) Multiple stress reduces the advantage of pesticide adaptation. *Environmental Science & Technology* 55:15100-15109.
- Siddique T, Okeke BC, Arshad M, Frankenberger WT (2003) Enrichment and isolation of endosulfan-degrading microorganisms. *J Environ Qual* 32:47-54. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.0047>
- Simons A (2010) A quality control tool for high throughput sequence data. *A quality control tool for high throughput sequence data* 10:f1000research.
- Singh NS, Sharma R, Singh DK (2019) Identification of enzyme(s) capable of degrading endosulfan and endosulfan sulfate using in silico techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 124:32-40. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.01.003>
- Singh P, Volger B, Gordon E (2014) Endosulfan. In: Wexler P (ed) *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Academic Press, Oxford, pp 341-343
- Singh SP, Guha S, Bose P (2017) Impact of the composition of the bacterial population and additional carbon source on the pathway and kinetics of degradation of endosulfan isomers. *Environmental Science-Processes & Impacts* 19:964-974. <https://doi.org/10.1039/c7em00154a>
- Subashini HD, Sekar S, Devi VRS, Rajam A, Malarvannan S (2010) Biodegradation of Pesticidal Residue Using Traditional Plants with Medicinal Properties and Trichoderma. *Research Journal of Environmental Toxicology* 4:256-262.
- Sutherland TD, Horne I, Lacey MJ, Harcourt RL, Russell RJ, Oakeshott JG (2000) Enrichment of an endosulfan-degrading mixed bacterial culture. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2822-2828.
- Sutherland TD, Horne I, Russell RJ, Oakeshott JG (2002) Gene cloning and molecular characterization of a two-enzyme system catalyzing the oxidative detoxification of beta-endosulfan. *Applied and Environmental Microbiology* 68:6237-6245. <https://doi.org/10.1128/aem.68.12.6237-6245.2002>
- Sutherland TD, Horne I, Weir KM, Russell RJ, Oakeshott JG (2004) Toxicity and Residues of Endosulfan Isomers. *Rev Environ Contam Toxicol* 183:99-113. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9100-3_4
- Tang FH, Lenzen M, McBratney A, Maggi F (2021) Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nature Geoscience* 14:206-210.
- Thakur M, Pathania D (2020) Environmental fate of organic pollutants and effect on human health. In *Abatement of Environmental Pollutants*. Elsevier, pp 245-262
- Tiryaki O, Temur C (2010) The fate of pesticide in the environment. *Journal of Biological and Environmental Sciences* 4

- Tjørve KM, Tjørve E (2017) The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS one* 12:e0178691.
- Tsai W (2014) Organochlorine insecticides. *Encyclopedia of Toxicology*:711-713.
- Umamaheswari S, Murali M (2010) Prevalence of plasmid mediated pesticide resistant bacterial assemblages in crop fields. *Journal of Environmental Biology* 31:957-964.
- UNEP (2008) Informe del Comité de Examen de los Contaminantes Orgánicos Persistentes sobre la labor de su cuarta reunión. Ginebra
- United States Environmental Protection Agency E (2023) Guidance for Reporting on the Environmental Fate and Transport of the Stressors of Concern in Problem Formulations. https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/guidance-reporting-environmental-fate-and-transport#l_b
- US Environmental Protection Agency (1996) Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction 3510C. (US EPA), Washington, DC
- US-EPA (2023) Guidance for Reporting on the Environmental Fate and Transport of the Stressors of Concern in Problem Formulations. United States Environmental Protection Agency, https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/guidance-reporting-environmental-fate-and-transport#l_b
- Endosulfan pathway map (2007) University of Minnesota. http://eawag-bbd.ethz.ch/end/end_map.html.
- Van den Berg F et al. Emission of pesticides into the air. In: *Fate of Pesticides in the Atmosphere: Implications for Environmental Risk Assessment: Proceedings of a workshop organised by The Health Council of the Netherlands, held in Driebergen, The Netherlands, April 22–24, 1998*, 1999. Springer, pp 195-218
- Voet D, Voet JG, Pratt CW (2016) *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. John Wiley & Sons,
- Wang D, Lin J, Lin J, Wang W, Li S (2019) Biodegradation of petroleum hydrocarbons by *Bacillus subtilis* BL-27, a strain with weak hydrophobicity. *Molecules* 24:3021.
- Weber J et al. (2010) Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Sci Total Environ* 408:2966-2984. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.077>
- Weir KM, Sutherland TD, Horne I, Russell RJ, Oakeshott JG (2006) A single monooxygenase, is involved in the metabolism of the organochlorides endosulfan and endosulfate in an *Arthrobacter* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3524-3530. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3524-3530.2006>
- Wexler P, Anderson BD (2005) *Encyclopedia of toxicology*. vol 1. Academic Press,
- Wheeler WB (2002) *Pesticides in Agriculture and the Environment*. CRC Press,
- Yadav IC, Devi NL (2017) Pesticides classification and its impact on human and environment. *Environmental science and engineering* 6:140-158.
- Yu C-S, Yim K-Y, Tsui SK-W, Chan T-F (2012) Complete genome sequence of *Bacillus subtilis* strain QB928, a strain widely used in *B. subtilis* genetic studies. *Am Soc Microbiol*,

