

Estudio De La Estructura De Las Biopelículas De *Pseudomonas Putida* Mediante Microscopia De Fuerza Atómica (Afm) En Presencia De Permetrina Y Cipermetrina

Mendoza-Hernández José Carlos¹, Vega-Hernández Miriam², Silveti-Loeza Ángel³,
Arriola-Morales Janette⁴ & Pérez-Osorio Gabriela⁵

Resumen

En este trabajo, evaluamos la arquitectura de las biopelículas de cepas *Pseudomonas Putida* tratadas con 100 mg/l de plaguicidas del tipo piretroide (permetrina y cipermetrina) en un periodo de 14 días, aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos en el Estado de Puebla, México. Se realizó un análisis topográfico y cuantitativo por AFM, demostrando que las biopelículas son influenciadas por la estructura de las mismas y la degradación de los plaguicidas. Las biopelículas con tratamiento de plaguicidas revelan la formación de comunidades de células heterogéneas unidas por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), separados por múltiples canales de agua, en comparación con los testigos que presentaron una topografía homogénea. Resultados que se corroboran con el análisis estadístico de las alturas de las biopelículas con tratamiento de plaguicidas, ya que tanto las áreas, volumen y perímetro de las alturas presentaron un incremento respecto a su testigo, el mismo comportamiento se presentó en el análisis estadístico de los canales de agua (área, volumen y perímetro) de las biopelículas. El consorcio bacteriano presentó la mayor capacidad de biodegradación, en un porcentaje mayor al 95% para permetrina y del 90% para cipermetrina.

Palabras Clave: Microscopía de Fuerza Atómica (AFM); Biopelículas; Biodegradación; Cipermetrina; Permetrina; *Pseudomonas Putida*

Abstract

In this work, we evaluated the biofilm architecture *Pseudomonas putida* strains treated with 100 mg / l of pyrethroid pesticides (permethrin and cypermethrin) type over a period of 14 days, isolated from a soil contaminated with hydrocarbons in the State of Puebla, Mexico. A topographic and quantitative analysis was performed by AFM, showing that biofilms are influenced by the structure of the same and degradation of pesticides. Treating biofilms with pesticides reveal the formation of heterogeneous cell communities together by a matrix of extracellular polymeric substances (EPS), separated by interstitial water channels, compared to controls that had a homogeneous topography. Results corroborate the statistical analysis of the hills of the biofilm with pesticide treatment, since both areas, volume and perimeter, the hills showed an increase over its witness, the same behavior was presented in the statistical analysis channels (area, volume and perimeter) of biofilms. The bacterial consortium showed the highest biodegradability, in a percentage higher than 95% for permethrin and 90% for cypermethrin.

Keywords: Atomic Force Microscopy (AFM); Biofilm; Biodegradation; Cypermethrin; Permethrin; *Pseudomonas Putida*.

¹ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 4 sur 104, C.P. 72000. Correo: josecarlos.mendoza@correo.buap.mx

² Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 4 sur 104, C.P. 72000.

³ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 4 sur 104, C.P. 72000.

⁴ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 4 sur 104, C.P. 72000.

⁵ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 4 sur 104, C.P. 72000.

1. Introducción

A nivel mundial, se estima que el uso de plaguicidas es de más de 2.27 billones de Kg en el 2001, de los cuales un 37% eran herbicidas, 24% insecticidas, 9% fungicidas y 29% de otros plaguicidas convencionales (Kiely *et al.* 2004). Aproximadamente 1.8 millones de personas se dedican a la agricultura y la mayoría utilizan pesticidas para proteger los alimentos y productos comerciales que producen, ocupacionalmente otros usos de los pesticidas son para programas de salud pública, aplicaciones comerciales y de jardinería en el hogar (Alavanja, 2009).

Los pesticidas se originan principalmente de las actividades agrícolas y entran en ambientes acuáticos a través de fuentes difusas como la escorrentía. Su concentración normalmente alcanza su máximo después de las lluvias y de la pulverización en los campos agrícolas (Rabiet *et al.*, 2010), (Vercraene-Eairma *et al.*, 2010). Los insecticidas piretroides son compuestos fotoestables e hidrofóbicos, exhiben alta actividad insecticida con un perfil de persistencia favorable que los insecticidas convencionales, combinado con baja toxicidad para los mamíferos y las aves, en consecuencia se han utilizado para reemplazar algunos compuestos más tóxicos y persistentes en el medio ambiente como los organoclorados y organofosforados (Pérez-Fernández *et al.*, 2010; Albaseer *et al.*, 2011; Saikia *et al.*, 2005); representan más del 25% del mercado de insecticidas foliares (Maloney *et al.*, 1988). Una preocupación ambiental debido a su creciente uso y alta toxicidad acuática, es por su acumulación en sedimentos acuáticos, debido a que absorben fuertemente a las partículas del suelo, además que se ha demostrado que causan toxicidad a organismos no objetivo como a los invertebrados y peces (Pérez-Fernández *et al.*, 2010), así como la producción de niveles por encima de concentración letal 50 (CL50) para el anfípodo *Hyaella azteca* (Hladik y Kuivila, 2012; Harwood *et al.*, 2013).

La cipermetrina [(1RS)-cis,trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato de (RS)-ciano-3-Fenoxibencilo] y permetrina [3-fenoxibencil (1RS)-cis,trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato], son plaguicidas piretroides sintéticos, altamente tóxicos para los peces y los invertebrados acuáticos, en concentraciones tan bajas como 10 ngL⁻¹, causan reacciones alérgicas en la piel e irritación de los ojos (Vander Werf *et al.*, 2015; Harwood *et al.*, 2013; Hladik y Kuivila 2012; Pérez-Fernández *et al.*, 2010, Grant *et al.*, 2002), este tipo de compuestos genera procesos de bioacumulación en las cadenas tróficas y su persistencia en el ambiente durante periodos muy prolongados. Afectan negativamente el sistema nervioso central, algunos estudios sugieren efectos adicionales como desarrollo de neurotoxicidad, generación de muerte neuronal, y acciones mediadoras por metabolitos piretroides, podrían tener implicaciones para la salud humana (Ray *et al.*, 2006). La cipermetrina se ha clasificado como un posible carcinógeno humano por la Agencia de Protección Ambiental (Bernardes, *et al.*, 2015; U.S.E.P.A. 1989).

La degradación microbiana es uno de los mecanismos clave de la transformación de plaguicidas (Campos *et al.*, 2015; Grant *et al.* 2002) y la mayoría de las bacterias acuáticas se encuentran creciendo en biopelículas sobre sustratos o sedimentos sumergidos (Jackson *et al.*, 2001). En contraste con los microorganismos planctónicos que siguen la corriente de agua, y son por lo tanto, menos expuestos a cambios antropogénicos, las comunidades biofilm epilíticas pueden ser considerados como una visión integradora de las condiciones ambientales presentes y pasadas. Por lo cual, estas comunidades pueden tener capacidades metabólicas para la transformación de los pesticidas. (Liu *et al.*, 2012; Vercraene-Eairmal *et al.*, 2010).

Las biopelículas son ensamblajes de simple o múltiple poblaciones que se adjuntan a superficies abióticas o biótico a través de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), y representan una fase de crecimiento diferente de las bacterias (Pozo *et al.*, 2014; Singhet *et al.*, 2006). La mayoría de las bacterias se encuentran de esta forma en la naturaleza, debido a que las biopelículas proporcionan una cooperación fisiológica entre las células y protección contra diferentes efectos ambientales (Liu *et al.*, 2012). Se encuentran en casi todos los ambientes húmedos donde el flujo de nutrientes es suficiente y la unión de superficie se puede lograr. Una biopelícula puede estar formada por una especie bacteriana única, aunque también pueden consistir muchas especies de bacterias, hongos, algas y protozoos. Aproximadamente el 97% de la matriz de la biopelícula es agua, que se une a las cápsulas de células microbianas, o disolvente, las propiedades físicas de los cuales (como la viscosidad) son determinadas por los solutos disueltos en ella. El fenómeno de transporte de masa en las biopelículas está influenciado por la estructura de la biopelícula, que a su vez depende de la disponibilidad local de sustratos.

El transporte de solutos en las biopelículas es impulsado por transporte convectivo dentro de los canales de agua y también por la difusión en los agregados densos. Por lo tanto, la matriz muestra un alto grado de microheterogeneidad debido a los numerosos microambientes que coexisten dentro de ella (Pozo *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2006).

Los microorganismos desempeñan un papel importante en la desintoxicación de los pesticidas en el medio ambiente. Hay pocos informes sobre la degradación de los insecticidas piretroides en suelos (Liu *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015) y en procesos de tratamiento de aguas residuales (Tain *et al.*, 2015; Adrados *et al.*, 2014; Gou *et al.*, 2010). Sin embargo, mucho menos se sabe acerca de la ultraestructura y propiedades físicas de las superficies de biopelículas bacterianas. En este trabajo se describe la estructura de las biopelículas de *Pseudomonas putida* en la presencia de permetrina y cipermetrina.

2. Metodología

2.1. Aislamiento de las bacterias: Se tomaron muestras de suelo contaminado con hidrocarburos en la Ciudad Acatzingo, Puebla a distancias de 30 cm, 1.5 m y 3 m, de cada perfil se recolectaron 10 muestras. Se colocó 0.5g de suelo en 10 mL de caldo Luria Bertani (LB) y se incubó a 30°C durante 24h. Una vez transcurrido el tiempo de tomo una alícuota de 50µL y se sembró en agar Mc Conkey.

2.2. Extracción de ADN y amplificación de rRNA 16S. El DNA bacteriano fue extraído usando el kit Genomic DNA from Tissue de Macherey-Nagel. El gen 16S de rRNA fue amplificado PCR usando los pares de primers F2C AGAGTTTGATCATGGCTC y C ACGGGCGGTGTGTAC para obtener fragmentos de 900-pb del 16S rDNA aislado. La amplificación de los fragmentos del DNA genómico fue obtenido con un volumen de reacción de 50 µl conteniendo: H₂O 34.5 µl, Buffer 10X 5 µl, MgCl₂ 1.5 µl, F₂C 2 µl, C 2 µl dNTP 10 mM 2.5 µl, Taq 50 U/ µl 0.4 µl, ADN bacteriano 2 µl. las condiciones de reacción fueron una fase de desnaturalización a 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, unión a 60°C por 1 minuto y la extensión a 60°C por 1:30 minutos. Una extensión final a 72°C durante 5 minutos. La purificación del producto de PCR fue hecha mediante el kit PCR clean-up gel extraction de Macherey-Nagel. La secuenciación se realizó en LANGE BIO Cinvestav-Campus Guanajuato. La búsqueda de BLAST fue usando el servidor NCBI en www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi. El árbol filogenético derivado de la secuencia del gen de rARN 16S fue generada en comparación con secuencias de genes de cepas bacterianas estándar diferentes obtenidas de Genbank: *Pseudomonas varnovensis strain IBFC2012-27*, *Pseudomonas putida strain PSEIAM19*

2.3. Formación de biopelículas: Las bacterias de las cepas B01 y B44 se crecieron en caldo Luria Bertani (LB) durante 12 h. Del crecimiento de 12 h, se centrifugó a 11 000 rpm durante 15 minutos, la pastilla obtenida se resuspendió en buffer de fosfatos salinos (0.1 M pH 7.4), hasta obtener una absorbancia de 0.2 a 600nm, equivalente a 1×10⁶ células/ml. Para la formación de biopelículas la prueba se realizó por triplicado para cada tratamiento. Se colocaron 25 µl de la suspensión bacteriana (de cada cepa) en cada uno de los pozos de las placas lab.tek II, con 450 µl de caldo LB incubándolas a 30°C durante 14 días.

2.4. Biopelículas con el plaguicida: Una vez formadas las biopelículas se retiró el sobrenadante, se lavó tres veces con buffer de fosfatos salinos (0.1 M pH 7.4), posteriormente se agregó medio mínimo mineral (3 g K₂HPO₄, 0.5 g KH₂PO₄, 1.25 g (NH₄)₂SO₄, 10 mg NaCl, 100 mg MgSO₄, 1 mg FeSO₄ 7H₂O, 200 mg EDTA por litro) conteniendo 100 mgL⁻¹ del plaguicida (permetrina o cipermetrina) incubándose a 30° C durante 14 días. Después de este procedimiento, se retiró el medio de cultivo, y cada pozo se lavó 3 veces con buffer de fosfatos salinos (0.1M pH 7.4). Para la fijación de las biopelículas a cada pozo, se agregó una solución de buffer de fosfatos salinos (0.1M pH 7.4) formaldehído 4%, glutaraldehído 4% v/v y se dejó 12 h a 4°C. Posteriormente, se retiró la solución para su observación al microscopio.

2.5. Observaciones al microscopio óptico y de fuerza atómica. Para la observación de las biopelículas, se retiró el medio de fijación y se dejó secar a temperatura ambiente hasta su análisis al microscopio. A las placas se les retiraron las divisiones y se procedió a realizar las observaciones en el microscopio óptico (marca Zeiss modelo Stemi 2000-C), identificando los campos para su posterior observación en el microscopio de fuerza atómica (AFM, Quesant Modelo Q250). Para realizar la microscopia de fuerza atómica se colocó el cantiléver en la posición identificada anteriormente y se procedió al barrido de esa zona. En caso de no observarse claramente, se procedió a revisar otra zona, hasta obtener una imagen clara.

De las imágenes obtenidas con el microscopio de fuerza atómica, se procedió al procesamiento de las mismas con el software del microscopio, eliminando el ruido, sacando las estadísticas correspondientes y obteniendo la imagen en tercera dimensión. Las estadísticas de área, superficie y volumen de los diferentes canales de agua y de las alturas se procesaron mediante el programa de software wxsm 4.0 producido por nanotec electrónica.

2.6. Cuantificación de los plaguicidas mediante cromatografía de gases. Una muestra de 2 ml se transfirió a un tubo para centrifuga de 50 ml y se agregó 25 ml de una mezcla de extracción de acetona-metanol (1:1). El contenido del tubo fue homogenizado mediante una agitación constante mediante un agitador orbital durante 3 minutos. El contenido fue centrifugado a 2500 rpm/min durante 3 minutos y el sobrenadante se decantó directamente en una probeta de 100 ml. Se agregaron 20 ml adicionales de la mezcla extractora acetona – metanol (1:1) en el tubo para centrifuga y homogenizado por agitación orbital por 3 minutos, nuevamente fue centrifugado y decantado en la misma probeta.

El extracto se transfirió a un embudo de separación de 500 ml al que se le agregó 100 ml de una solución de sulfato de sodio (2.5 g por cada 100 ml) y 12.5 ml de diclorometano, el embudo se agito vigorosamente durante 2 minutos. Las fases permitieron separar y colectar la capa más baja de diclorometano en un matraz erlenmeyer de 250 ml. la separación de la capa acuosa se repitió un par de veces. Los extractos combinados de diclorometano se pasaron a través de 25 g de sulfato de sodio anhidro. El extracto seco se colectó en un matraz elenmeyer y el sulfato de sodio fue lavado con 10ml de diclorometano. Los extractos combinados se concentraron y lavaron a 1 ml aproximadamente en un rotaevaporador. Los extractos acuosos fueron descartados.

Para limpieza por columna, 1 ml del extracto en diclorometano se transfirió en una columna de vidrio de 450 mm por 25 mm de diámetro interno, que contenía 15 g de óxido de aluminio empacado en suspensión con diclorometano. Se dejó pasar la solución a través de la columna y se eluyo con diclorometano. El flujo fue ajustado a 1ml/min y se colectaron 200 ml de eluyente. Los lavados combinados y el eluido fueron concentrados a 1 ml con un rotaevaporador. Para un lavado adicional se empleó un minicolumna de polipropileno que fue tapada con algodón, empacada con 4 g de una mezcla de óxido de aluminio y carbón activado (12:1) entre 2 capas de 1 g cada una de sulfato de sodio anhidro. La columna fue pre-lavada con 10 ml de diclorometano y el extracto concentrado se transfirió a la minicolumna de polipropileno. Se colectó en total 15 ml de eluido y fue evaporado a sequedad. Los residuos fueron disueltos en 1 ml de hexano. De los residuos disueltos, se inyectó 1 microlitro al cromatógrafo de gases.

Las condiciones de Cromatografía de gases fueron las siguientes: detector de captura de electrones, columna capilar Velocity-5 (5% Difenill and 95% Dimetil Polisisiloxano) de 30m, 0.25 mm de diámetro interno, temperatura del inyector de 260°C, temperatura del horno 240°C, temperatura del detector: 300°C y N₂ como gas acarreador a 1 ml/min.

3. Resultados

Las bacterias aisladas del suelo contaminado con hidrocarburos y que presentaron la capacidad de crecer en concentraciones de 100 ppm de los plaguicidas permetrina y cipermetrina fueron identificadas como *Pseudomonas putida* (Figura 1).

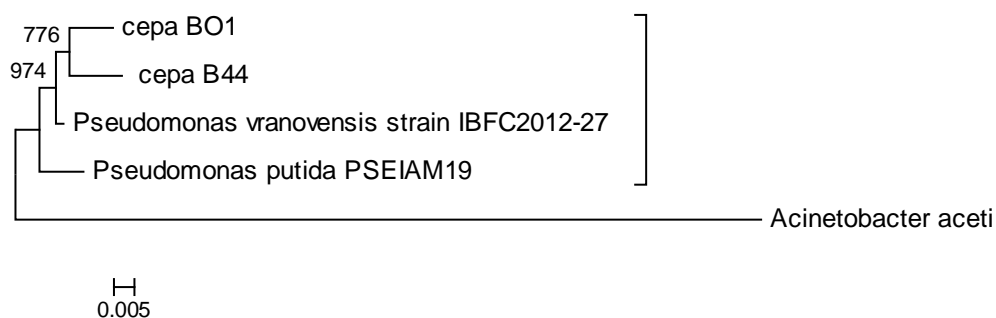


Figura1. Árbol de identificación de las bacterias.

El análisis topográfico de las biopelículas de *Pseudomonas putida* B01(b), *Pseudomonas putida* B44 (d) y el consorcio (f), a 5 μm en un tiempo de 14 días con tratamiento de Permetrina respecto a sus respectivos testigos (a, c y e), muestra que hay más material polimérico extracelular (EPS) en las biopelículas con permetrina, así como un reordenamiento diferente, con una mayor heterogeneidad (figura 2)

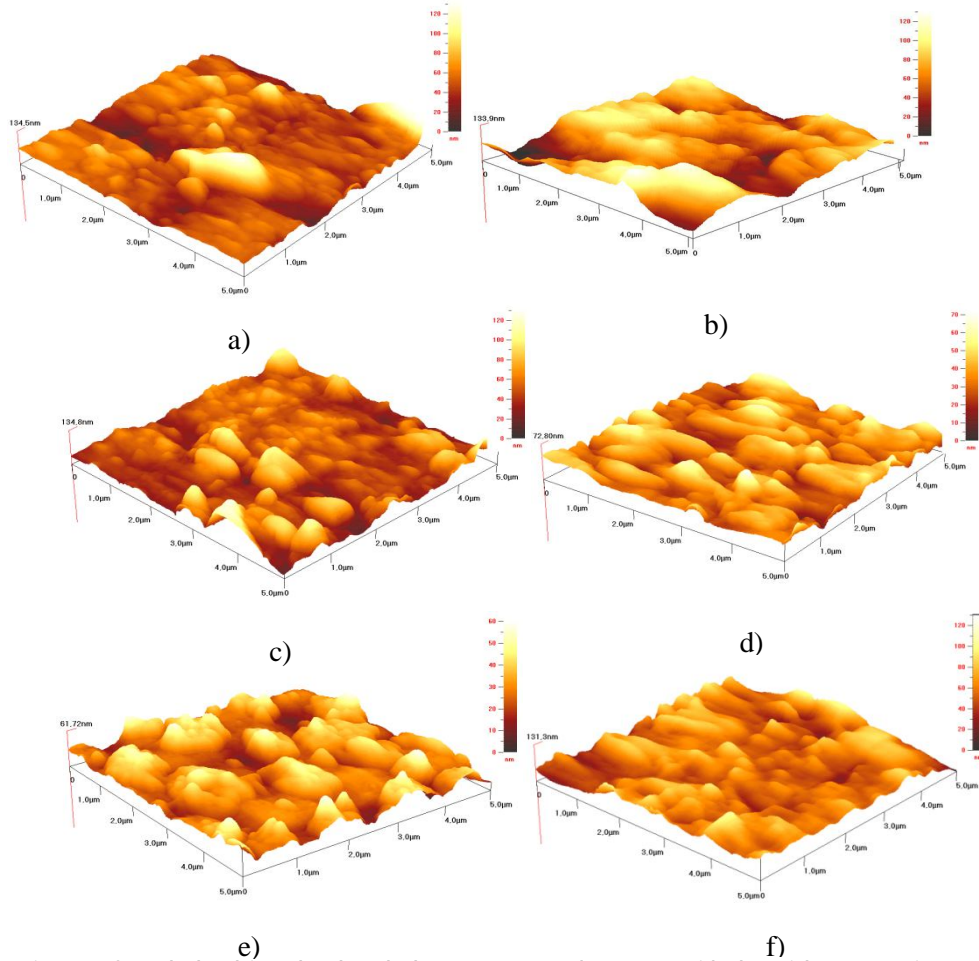


Figura 2. Micrografías de las biopelículas de las cepas *Pseudomonas putida* obtenidas por microscopia de fuerza atómica a 5 micras; a y b, cepa *Pseudomonas putida* B01 testigo y con 14 días de tratamiento de permetrina, c y d cepa *Pseudomonas putida* B44 testigo y con 14 días de tratamiento de permetrina e) y f) consorcio testigo con tratamiento de 14 días de tratamiento de permetrina.

El análisis estadístico de las biopelículas de las cepas *Pseudomonas putida* B01, *Pseudomonas putida* B44 y el consorcio, obtenido de los estudios topográficos a 5 micrometros después de los 14 días de desarrollo del testigo y tratadas con permetrina a 100 mg/L; los datos estadísticos contemplan la altura promedio, desviación estándar, pico máximo, pico máximo al valle y altura máxima. Las alturas promedio y la desviación estándar siempre son mayores en las cepas *Pseudomonas putida* B01, *Pseudomonas putida* B44 y el consorcio en la presencia de permetrina; para el caso del pico máximo, y el pico máximo al valle (suma del pico más alto y del valle más profundo) para la cepa *Pseudomonas putida* B01, el testigo presento valores de 82.4 y 136 nm respectivamente, ligeramente mayores que con el plaguicida, los cuales son 67.58 y 134 nm. Para el caso del valor estadístico de altura máxima la cepa con tratamiento presentó un incremento de 12.79 nm con respecto al testigo.

En la cepa *Pseudomonas putida* B44 con tratamiento de permetrina el pico máximo, el pico máximo al valle y la altura máxima presentaron un incremento de: 43.67, 81.38 y 37.68 nm respectivamente en comparación con son su testigo. El comportamiento del consorcio nos establece que hay un incremento en el pico máximo al valle y altura máxima de 21.5 y 24.81 nm respectivamente con respecto a su testigo, en tanto que para el pico máximo el testigo tiene un valor de 3.25 nm más elevado que con permetrina (Figura 3).

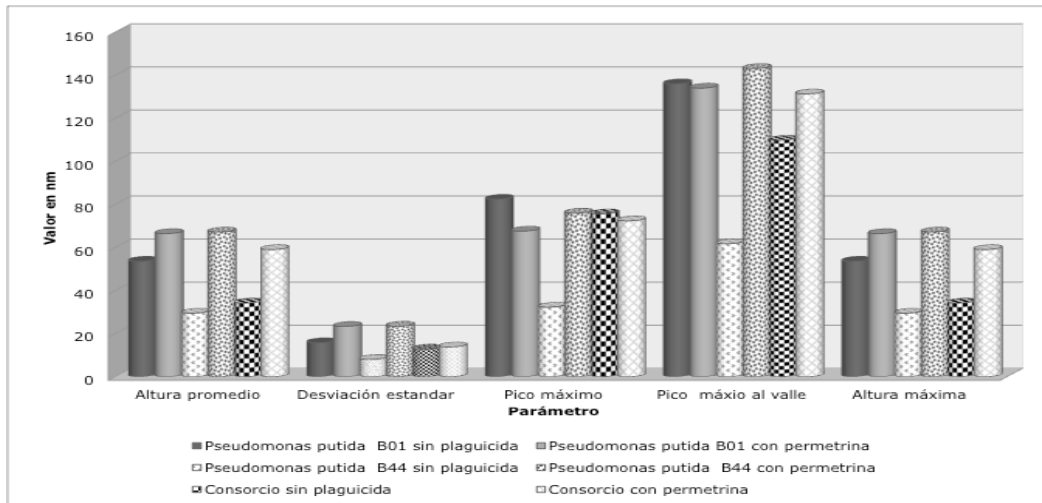


Figura 3. Estadísticos de las biopelículas a los 14 días con el plaguicida permetrina.

Las microfografías de las biopelículas de las cepas: testigo y *Pseudomonas putida* B01 (a y b), testigo y *Pseudomonas putida* B44 (c y d) y el testigo y consorcio bacteriano (e y f), a 14 días con Cipermetrina, se observa que la cepa de *Pseudomonas putida* B01 está prácticamente embebida en EPS, con una distribución relativamente homogénea, mientras que las otras dos cepas en presencia del plaguicida se observa una mayor presencia de canales de agua y una distribución más heterogénea (Figura 4).

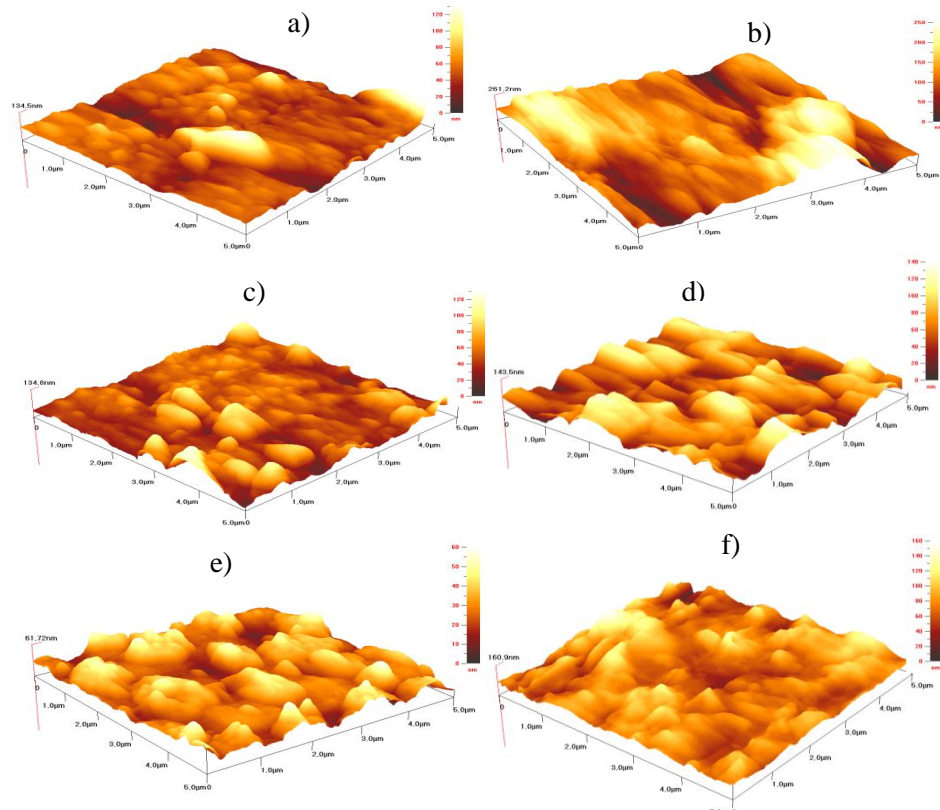


Figura 4. Micrografías de las biopelículas de las cepas *Pseudomonas putida* obtenidas por microscopia de fuerza atómica a 5 μm ; a y b, cepa *Pseudomonas putida* B01 testigo y con 14 días de tratamiento de cipermetrina, c y d cepa *Pseudomonas putida* B44 testigo y con 14 días de tratamiento de cipermetrina e) y f) consorcio testigo con tratamiento de 14 días de tratamiento de cipermetrina.

En las biopelículas de las cepas *Pseudomonas putida* B01, *Pseudomonas putida* B44 y el consorcio con su respectivo testigo en presencia de cipermetrina el análisis estadístico que contemplan la altura promedio, desviación estándar, pico máximo, pico máximo al valle, altura máxima a 5 μm a los 14 días de desarrollo de las biopelículas a 100 mg/L se encontró que en todos los parámetros los valores son mayores en presencia del plaguicida con respecto a su testigo. La cepa *Pseudomonas putida* B01 en presencia de la cipermetrina presentó los mayores valores obteniéndose; altura promedio (129 nm), desviación estándar (50.02 nm), pico máximo (132 nm), pico máximo al valle (261.2 nm), altura máxima (129 nm) (Figura 5).

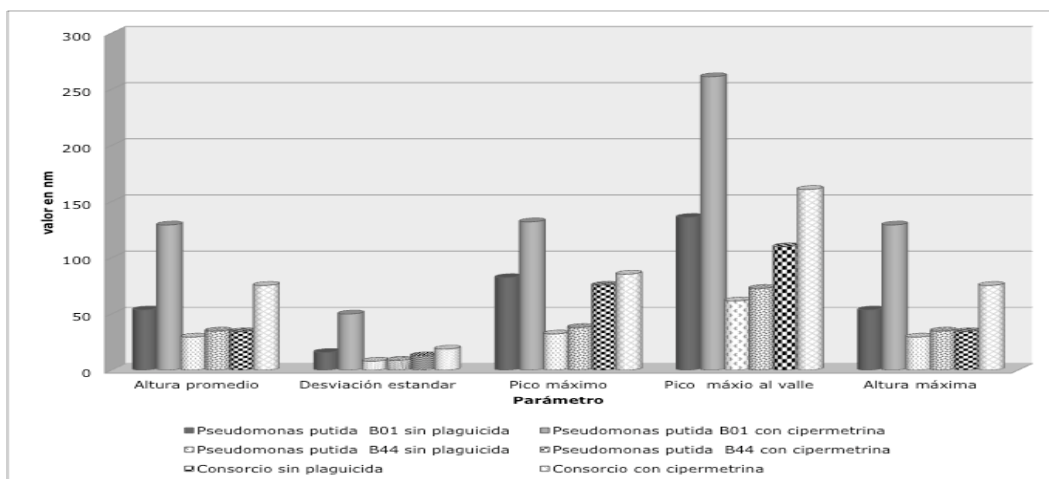


Figura 5. Estadísticos de las biopelículas a los 14 días con el plaguicida cipermetrina.

La comparación estadística de áreas, volumen y perímetros de los canales de agua de las biopelículas formados en presencia de la permetrina, mediante el software wxsm 4.0, nos indica que todos los valores son mayores en presencia de la permetrina con respecto al testigo. La cepa *Pseudomonas putida* B01 con tratamiento de plaguicida presentó la mayor área de los canales (huecos) con 198.24045 μm² con respecto a su testigo de 1.894096μm², mientras que en la cepa *Pseudomonas putida* B44 y el consorcio los valores varían solamente en una unidad. En el volumen de los huecos fue mayor en presencia de permetrina correspondiendo el valor más elevado al consorcio 0.21586755μm³, seguido de la cepa *Pseudomonas putida* B01 con 0.115017057μm³ y por último la cepa *Pseudomonas putida* B44 con 0.052298991 μm³. Al igual que área y el volumen el perímetro fue mayor en la presencia del plaguicida con la siguiente progresión: consorcio bacteriano (60.3586 μm), cepa *Pseudomonas putida* B44 (6.83027088 μm) y cepa *Pseudomonas putida* B01 con 1.834260375 μm (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis estadístico de los canales de las biopelículas con plaguicida permetrina

Área de los huecos (μm ²)		Volumen de los canales de agua (μm ³)		Perímetro de los canales de agua (μm)	
Cepa B01					
Testigo	Permetrina	Testigo	permetrina	Testigo	permetrina
1.894096	198.24045	0.001754492	0.115017057	1.81720483	1.834260375
Cepa B44					
Testigo	Permetrina	Testigo	permetrina	Testigo	permetrina
1.33703817	2.3575328	0.006572823	0.052298991	5.18512486	6.83027088
Consorcio					
Testigo	Permetrina	Testigo	permetrina	Testigo	permetrina
1.33703817	2.6575328	0.017876893	0.21586755	4.746235533	60.3586

Al realizar la comparación estadística de las áreas, volumen y perímetro de los canales de las biopelículas de las cepas estudiadas y el consorcio en presencia de cipermetrina todas muestran un incremento en los valores con respecto al testigo, sin embargo, es importante destacar que en la cepa *Pseudomonas putida B01* el área de los huecos correspondió a 208.2291 μm^2 con respecto a su testigo de 1.894096 μm^2 ; y el perímetro del consorcio con un valor de 80.3492 μm y el testigo correspondiente de 4.746235533 μm . (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis estadístico de los canales de las biopelículas con diferentes parámetros la cepa con plaguicida cipermetrina.

Área de los huecos (μm^2)		Volumen de los canales de agua (μm^3)		Perímetro de los canales de agua (μm)	
Cepa B01					
Testigo	Cipermetrina	Testigo	Cipermetrina	Testigo	Cipermetrina
1.894096	208.2291	0.001754492	0.095890642	1.81720483	12.2505945
Cepa B44					
Testigo	Cipermetrina	Testigo	Cipermetrina	Testigo	Cipermetrina
1.33703817	13.685859	0.006572823	0.110529056	5.18512486	22.6712417
Consortio					
Testigo	Cipermetrina	Testigo	Cipermetrina	Testigo	Cipermetrina
1.33703817	20.493198	0.017876893	0.21586755	4.746235533	80.3492

Comparando estadísticamente las áreas, perímetros y volúmenes de las alturas de las biopelículas con presencia de plaguicida permetrina se observó un aumento en el área para la cepa *Pseudomonas putida B01* (20.399742 μm^2), consorcio (4.71997067 μm^2) y *Pseudomonas putida B044* (2.32142514 μm^2) con relación a su testigo, el mismo orden de incremento se observó para el perímetro de las alturas, siendo la cepa *Pseudomonas putida B01* la que presentó el mayor valor con 30.966651 μm en presencia de permetrina. Para el caso del volumen de las alturas la cepa *Pseudomonas putida B01* obtuvo el valor de 0.71375565 μm^3 , el consorcio bacteriano con permetrina presentó una disminución de volumen de las alturas de 0.05421273 μm^3 en comparación con su testigo (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis estadístico de las alturas de las biopelículas con tratamiento de plaguicida permetrina.

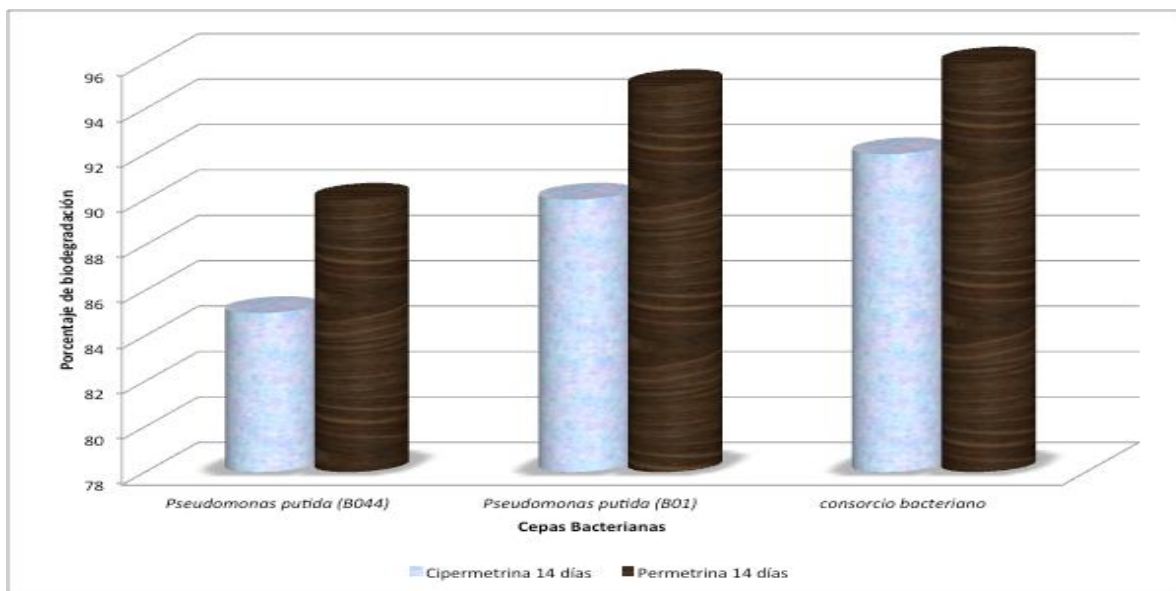
Área de las alturas (μm^2)		Volumen de las alturas (μm^3)		Perímetro de las alturas (μm)	
Cepa B01					
Testigo	Permetrina	Testigo	Permetrina	Testigo	Permetrina
16.991271	20.399742	0.39486224	0.71375565	4.3177882	30.966651
Cepa B44					
Testigo	Permetrina	Testigo	Permetrina	Testigo	Permetrina
1.528736	2.32142514	0.02513896	0.06898814	4.966038091	7.4143905
Consortio					
Testigo	Permetrina	Testigo	Permetrina	Testigo	Permetrina
0.10067022	4.71997067	0.0632833	0.00907057	0.66582558	15.8484268

Las variaciones del área, volumen y perímetro de las alturas de las biopelículas en presencia de cipermetrina, mostraron un incremento con respecto a su testigo para todos los parámetros en el siguiente orden descendente *Pseudomonas putida B01*, Consorcio, *Pseudomonas putida B044*. Los valores de las alturas fueron: cepa *Pseudomonas putida B01* (23.432985 μm^2), consorcio (6.2782464 μm^2) y *Pseudomonas putida B44* (3.435425143 μm^2), para el caso de los perímetros de *Pseudomonas putida B01* (32.966651 μm), consorcio (16.55258057 μm) y *Pseudomonas putida B44* (8.4143905 μm); y el volumen de las alturas de *Pseudomonas putida B01* (0.89486224 μm^3), consorcio (0.16251742 μm^3) *Pseudomonas putida B44* (0.07513896 μm^3) y *Pseudomonas putida B44* (0.07513896 μm^3) (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis estadístico de las alturas de las biopelículas con tratamiento de plaguicida cipermetrina.

Área de las alturas (μm^2)		Volumen de las alturas (μm^3)		Perímetro de las alturas (μm)	
Cepa B01					
Testigo	Cipermetrina	Testigo	Cipermetrina	Testigo	Cipermetrina
16.991271	23.432985	0.39486224	0.89486224	4.3177882	32.966651
Cepa B44					
Testigo	Cipermetrina	Testigo	Cipermetrina	Testigo	Cipermetrina
1.528736	3.435425143	0.02513896	0.07513896	4.966038091	8.4143905
Consortio					
Testigo	Cipermetrina	Testigo	Cipermetrina	Testigo	Cipermetrina
0.10067022	6.2782464	0.0632833	0.16251742	0.66582558	16.55258057

Los porcentajes de degradación obtenidos por cromatografía de gases (GC), demuestran que las biopelículas formadas por las cepas *Pseudomonas putida* B01, *Pseudomonas putida* B044 y consorcio bacteriano a los 14 días de tratamiento con los plaguicidas permetrina y cipermetrina fueron mayores al 80%. Siendo el consorcio bacteriano el que presenta la mayor capacidad de biodegradación, en un porcentaje mayor al 95% para permetrina y del 90% para cipermetrina, seguido de la cepa *Pseudomonas putida* B01 con un porcentaje de degradación de 90 y 95% respectivamente, como se muestra en la figura 6.

**Figura 6: Porcentaje de degradación de las biopelículas a los 14 días con el plaguicida permetrina y cipermetrina.**

5. Discusión De Resultados

La intensificación de la agricultura se ha traducido en un aumento de pesticidas en los suelos, aguas superficiales y subterráneas, afectando en gran medida los ecosistemas cambiando la diversidad bacteriana en el suelo y amenazando a los organismos acuáticos (Chien-Jung *et al.*, 2013; Fenner *et al.*, 2013; Hladik *et al.*, 2012). Actualmente se están investigando nuevas estrategias para profundizar más en el tratamiento de diversos contaminantes con biopelículas para su uso en sistemas de biorremediación (Sigh *et al.*, 2006), lo cual nos abre la posibilidad de usarlos en la biodegradación de plaguicidas del tipo piretroide, debido a que en cuantificaciones realizadas en suelos, sedimentos urbanos y agrícolas, en aguas superficiales y afluentes de plantas de tratamiento de estados unidos se han encontrado en concentraciones tóxicas para organismos invertebrados (Vander werf *et al.*, 2015; Harwood *et al.*, 2013). Dentro de estas estrategias se propone el uso de biopelículas bacterianas, por lo que es necesario comprender que sucede en estas asociaciones de los microorganismos durante la biodegradación de los plaguicidas.

En este trabajo el análisis cuantitativo de la biopelículas bacterianas mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) que en los últimos años han demostrado una versatilidad en la caracterización morfológica de la superficie, siendo de alta importancia el análisis cuantitativo de la rugosidad de la superficie, tamaño de poro de la superficie, distribución del tamaño del poro (Johnson *et. al.*, 2015) debido a que proporciona información importante de los cambios sufridos en las biopelículas con los plaguicidas del tipo piretroide. Las imágenes topográficas de las biopelículas bacterianas en presencia de permetrina y cipermetrina nos indican que hay una mayor heterogeneidad en la distribución espacial de las bacterias en comparación con sus testigos.

En las biopelículas de las bacterias de *Pseudomonas putida* B01 en presencia de cipermetrina se observa que están embebidas en una gran cantidad de sustancia polimérica extracelular (EPS), la cual les confiere una mayor resistencia a condiciones ambientales adversas. Durante los procesos de degradación de los plaguicidas permetrina y cipermetrina se ve alterada la arquitectura y la cantidad de EPS concordando con lo reportado por (Mangwani *et al.*, 2014) en *Pseudomonas mendocina* en donde se alteran estos parámetros durante la degradación de fenantreno. El análisis de los canales de agua y de las alturas de las biopelículas en el proceso de biodegradación de los plaguicidas nos muestra que los valores más elevados de los perímetros, áreas y volúmenes de estos, son consecuencia de los procesos de adaptación al estrés generado por la presencia de los plaguicidas, y que la estructura de las biopelículas es única dependiendo de la cepa bacteriana y de las condiciones ambientales a las que está sujeta. El mayor volumen de los canales de agua puede ayudar a las bacterias a disminuir la toxicidad de los plaguicidas y al mantenimiento del equilibrio químico dentro de las biopelículas ayudando en los procesos de biodegradación de éstos.

Las biopelículas de *Pseudomonas putida* tienen un alto potencial para la remoción de los plaguicidas del tipo piretroide como permetrina (90-95%) y cipermetrina (85-90%), sugiriendo que las biopelículas pueden ser usadas en los sistemas de biorremediación como ha sido reportado para la eliminación de plaguicidas del tipo carbamato (Tienet *al.*, 2013).

6. Conclusiones

El análisis cuantitativo de las biopelículas de *Pseudomonas putida* mediante AFM en los procesos de biodegradación de los plaguicidas permetrina y cipermetrina nos ayuda a comprender los cambios estructurales que sufren para adaptarse a condiciones ambientales adversas.

7. Referencias Bibliograficas.

- Adrados, B., Sánchez, O., Arias, C. A., Becares, E., Garrido, L., Mas, J., ... & Morató, J. (2014). Microbial communities from different types of natural wastewater treatment systems: vertical and horizontal flow constructed wetlands and biofilters. *Water research*, 55, 304-312.
- Alavanja, M. C. (2009). Introduction: Pesticides Use and Exposure, Extensive Worldwide. *Reviews on environmental health*, 24(4), 303-310.
- Albaseer, S. S., Mukkanti, K., Rao, R. N., & Swamy, Y. V. (2011). Analytical artifacts, sample handling and preservation methods of environmental samples of synthetic pyrethroids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(11), 1771-1780.
- Bernardes, M. F. F., Pazin, M., Pereira, L. C., & Dorta, D. J. (2015). Impact of Pesticides on Environmental and Human Health.
- Bradbury, S. P., & Coats, J. R. (1989). Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 133-177). Springer New York.
- Campos, M., Perruchon, C., Vasilieiadis, S., Menkissoglu-Spiroudi, U., Karpouzias, D. G., & Diez, M. C. (2015). Isolation and characterization of bacteria from acidic pristine soil environment able to transform iprodione and 3, 5-dichloraniline. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 201-211.
- Guo, P., Wang, B. Z., Hang, B. J., Li, L., Li, S. P., & He, J. (2010). *Sphingobium faniae* sp. nov., a pyrethroid-degrading bacterium isolated from activated sludge treating wastewater from pyrethroid manufacture. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(2), 408-412.
- Grant, R. J., Daniell, T. J., & Betts, W. B. (2002). Isolation and identification of synthetic pyrethroid-degrading bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 92(3), 534-540.

- Harwood, A. D., Landrum, P. F., Weston, D. P., & Lydy, M. J. (2013). Using SPME fibers and Tenax to predict the bioavailability of pyrethroids and chlorpyrifos in field sediments. *Environmental Pollution*, 173, 47-51.
- Hladik, M. L., & Kuivila, K. M. (2012). Pyrethroid insecticides in bed sediments from urban and agricultural streams across the United States. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(7), 1838-1845.
- Jackson, G., Beyenal, H., Rees, W. M., & Lewandowski, Z. (2001). Growing reproducible biofilms with respect to structure and viable cell counts. *Journal of microbiological methods*, 47(1), 1-10.
- Johnson, D., & Hilal, N. (2015). Characterisation and quantification of membrane surface properties using atomic force microscopy: A comprehensive review. *Desalination*, 356, 149-164.
- Kiely, T., Donaldson, D., & Grube, A. (2004). Pesticides industry sales and usage. Washington, DC: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, United States Environment Protection Agency, 16.
- Liu, J., Zhou, X. H., & Shi, H. C. (2012). Inhibitory effects of pentachlorophenol on wastewater biofilms as determined by phospholipid analysis and microelectrode. *Biochemical Engineering Journal*, 66, 8-13.
- Liu, J., Huang, W., Han, H., She, C., & Zhong, G. (2015). Characterization of cell-free extracts from fenpropathrin-degrading strain *Bacillus cereus* ZH-3 and its potential for bioremediation of pyrethroid-contaminated soils. *Science of The Total Environment*, 523, 50-58.
- Maloney, S. E., Maule, A., & Smith, A. R. (1988). Microbial transformation of the pyrethroid insecticides: permethrin, deltamethrin, fastac, fenvalerate, and fluvalinate. *Applied and environmental microbiology*, 54(11), 2874-2876.
- Pérez-Fernández, V., García, M. Á., & Marina, M. L. (2010). Characteristics and enantiomeric analysis of chiral pyrethroids. *Journal of Chromatography A*, 1217(7), 968-989.
- Mangwani, N., Shukla, S. K., Rao, T. S., & Das, S. (2014). Calcium-mediated modulation of *Pseudomonas mendocina* NR802 biofilm influences the phenanthrene degradation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 301-309.
- Pozo, I. N., Olmos, D., Orgaz, B., Božanić, D. K., & González-Benito, J. (2014). Titania nanoparticles prevent development of *Pseudomonas fluorescens* biofilms on polystyrene surfaces. *Materials Letters*, 127, 1
- Rabiet, M., Margoum, C., Gouy, V., Carluer, N., & Coquery, M. (2010). Assessing pesticide concentrations and fluxes in the stream of a small vineyard catchment—effect of sampling frequency. *Environmental Pollution*, 158(3), 737-748.
- Ray, D. E., & Fry, J. R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology & therapeutics*, 111(1), 174-193.
- Saikia, N., Das, S. K., Patel, B. K., Niwas, R., Singh, A., & Gopal, M. (2005). Biodegradation of beta-cyfluthrin by *Pseudomonas stutzeri* strain S1. *Biodegradation*, 16(6), 581-589.
- Singh, R., Paul, D., & Jain, R. K. (2006). Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in microbiology*, 14(9), 389-397.
- Tien, C. J., Lin, M. C., Chiu, W. H., & Chen, C. S. (2013). Biodegradation of carbamate pesticides by natural river biofilms in different seasons and their effects on biofilm community structure. *Environmental Pollution*, 179, 95-104.
- United States Environmental Protection Agency. (1989). Cypermethrin Pesticide Fact Sheet. Washington, D.C.
- Vander Werf, R., Aldana, A., Teerlink, J., & Budd, R. (2015). Department of Pesticide Regulation Environmental Monitoring Branch 1001 I Street Sacramento, CA 95812.
- Vercaene-Eairmal, M., Lauga, B., Saint Laurent, S., Mazzella, N., Boutry, S., Simon, M., ... & Duran, R. (2010). Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure. *Chemosphere*, 81(7), 837-843.
- Tian, H. L., Zhao, J. Y., Zhang, H. Y., Chi, C. Q., Li, B. A., & Wu, X. L. (2015). Bacterial community shift along with the changes in operational conditions in a membrane-aerated biofilm reactor. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(7), 3279-3290.
- Xu, Z., Shen, X., Zhang, X. C., Liu, W., & Yang, F. (2015). Microbial degradation of alpha-cypermethrin in soil by compound-specific stable isotope analysis. *Journal of hazardous materials*, 295, 37-42.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por PROMEP (Programa para el Desarrollo Profesional Docente). Agradecemos al Dr. Fernando Chávez Ramírez del Departamento de Físicoquímica de Materiales por su apoyo para la realización de la Microscopía de Fuerza Atómica.